



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA UNICO DE ESPECIALIZACIONES EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

BIOGÉNESIS DE LAS PROTEÍNAS DE SECRECIÓN EN CÉLULAS EUKARIONTES

TESINA

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA PARA EL
BACHILLERATO

PRESENTA:

DIANA CÁRDENAS GONZÁLEZ

DIRECTORA DE LA TESINA:

DRA. LOURDES TERESA AGREDANO MORENO

FACULTAD DE CIENCIAS

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la revolución de mi vida, *ma petite Marianne*, por haberme tenido paciencia cuando aún eras muy pequeña. Te amo luz de mi vida y por ti uno todo lo puede lograr.

A Nany por alentarme y apoyarme para lograr esta meta, una aventura más juntos amor *so happy together*.

A mis padres porque ahora más que nunca, sin ustedes este logro no hubiera sido posible. Gracias por toda una vida llena de amor.

A mi abuelita Ani por apoyarme y consentirme toda mi vida, al igual que mis tíos (Licha, Marce y Javier), a mis primos (Clau, Lucy y Victor) y a mis amigos que siento como si fueran mi familia (Elsa, Karen, Elias, Mati, Ale y muchos más).

A mi amigo Alfredo, por compartir una aventura de posgrado más, dando como siempre enormes muestras de amistad.

A mi directora de tesina, la Dra. Lourdes Agredano, por haberme guiado de forma inmejorable, en el plano académico, pero sobre todo humano, al ser una gran motivadora, muy empática, extremadamente comprometida, simplemente genial.

Al resto del comité Dra. Lourdes Segura, Dra. María Luisa Escobar y Dra. Sandra Cabrera por su detallada y enriquecedora revisión.

A aquellas personas por las cuales esta tesina tiene su razón de ser, mis alumnit@s.

Contenido

1. Introducción	3
2. Objetivos	6
3. Método.....	6
4. Resultados.....	6
4.1 Expresión génica en eucariontes.....	7
4.2 Procesamiento del RNA pre-mensajero (pre-mRNA).....	9
4.3 Transporte núcleo-citoplasma de los mRNAs.....	11
4.4 Mecanismo de síntesis de proteínas.....	14
4.5 Direccionamiento y translocación de las proteínas de secreción al lumen del RER.....	15
4.6 Procesamiento de proteínas en el lumen del retículo endoplásmico.	18
4.7 Transporte de proteínas mediado por vesículas hacia el aparato de Golgi.....	20
4.8 Maduración de las proteínas de secreción en el Aparato de Golgi	22
4.9 Transporte de las proteínas de secreción a sus destinos finales.....	23
4.10 Biogénesis de la insulina	25
5. Discusión y conclusiones.....	37
6. Bibliografía	39

Resumen

Con el fin de brindar una visión integral y sistémica de los diferentes componentes y procesos de las células eucariontes implicados en la biogénesis de las proteínas de secreción, en este trabajo se realizó una investigación documental que pretende servir como documento de apoyo para la enseñanza de la Biología en el Bachillerato Universitario (particularmente en el Colegio de Ciencias y Humanidades). En este texto se hace un recorrido por los procesos de biogénesis de las proteínas de secreción, los cuales inician con la transcripción de los genes que codifican para proteínas en el núcleo celular, dando como producto moléculas de RNA pre-mensajero (pre-mRNA), que sufren procesos de maduración antes de abandonar el núcleo celular a través de los complejos de poro nuclear, iniciando posteriormente su traducción en el citosol y deteniéndose una vez sintetizado su péptido señal, el cual interviene en su direccionamiento junto con la maquinaria traduccional hacia el retículo endoplásmico, para que después la cadena peptídica en formación sea translocada hacia el lumen del retículo, donde sufre procesos de maduración química como son la N-glicosilación y el correcto plegamiento de la proteína, para continuar su camino mediante transporte vesicular hacia el Aparato de Golgi, en el que sigue sufriendo modificaciones químicas y posteriormente se direcciona hacia su destino final. Para proporcionar un ejemplo concreto de la biogénesis de una proteína de secreción en humanos, que pueda servir para la enseñanza y aprendizaje de esta temática en el bachillerato, al despertar el interés de los alumnos, se indago también la ruta de secreción de la insulina.

Palabras clave: proteínas de secreción, flujo de información genética, ruta secretora, insulina, enseñanza a nivel bachillerato.

1. Introducción

Las proteínas son biomoléculas con una gran variedad de estructuras y funciones tanto dentro, como fuera de las células, siendo esenciales para la vida. Constituyen la mayor parte del peso seco de las células, en un 55%, mientras que el ácido ribonucleico (RNA), constituye alrededor del 25% (Milo & Phillips, 2012; Schönheit, Buckel & Martin, 2016), por ejemplo, una célula animal contiene alrededor de 10 mil millones de moléculas de proteínas de unos 10,000 tipos distintos (Alberts, *et al.*, 2008). En los sistemas vivos, las proteínas cumplen una amplia variedad de funciones. Por ejemplo, las proteínas catalizan casi todas las reacciones bioquímicas que ocurren en la célula (Alberts *et al.*, 2015); como proteínas estructurales brindan soporte mecánico, tanto dentro y fuera de la célula; como hormonas, factores de crecimiento y activadores génicos realizan una gran cantidad de funciones reguladoras; como receptores de membrana y transportadoras, determinan ante qué estímulos reacciona una célula y qué tipos de sustancias entran y salen de ella; como filamentos contráctiles y motores moleculares, permiten los movimientos biológicos, además de presentar funciones adicionales como anticuerpos, toxinas o fuente de bioluminiscencia (Karp, 2014).

Las proteínas son los productos finales de la expresión de los genes que las codifican. Estos genes, contienen el código para la formación de una estructura proteica única. Cada proteína se ensambla con una secuencia de aminoácidos particular, que forma diferentes tipos de uniones, plegándose y dando lugar a una estructura tridimensional específica.

En las células, las proteínas de cloroplastos y mitocondrias, así como las proteínas nucleares y citosólicas, se sintetizan en ribosomas libres en el citosol donde adquieren su conformación funcional. Por el contrario, las proteínas de lisosomas, proteínas integrales de la membrana plasmática y proteínas extracelulares, siguen la vía secretora que es responsable de la síntesis, plegamiento y la entrega de estas proteínas a sus destinos celulares o extracelulares.

El análisis del genoma humano señala que aproximadamente un tercio de todos los marcos de lectura que codifican para proteínas, entran a la ruta secretora, la cual inicia en el retículo endoplásmico. Lo anterior, demuestra la importancia de las proteínas de secreción (Braakman & Bulleid, 2011). En la *figura 1* se resumen los diferentes tipos de proteínas de secreción así como ejemplos de los mismos.

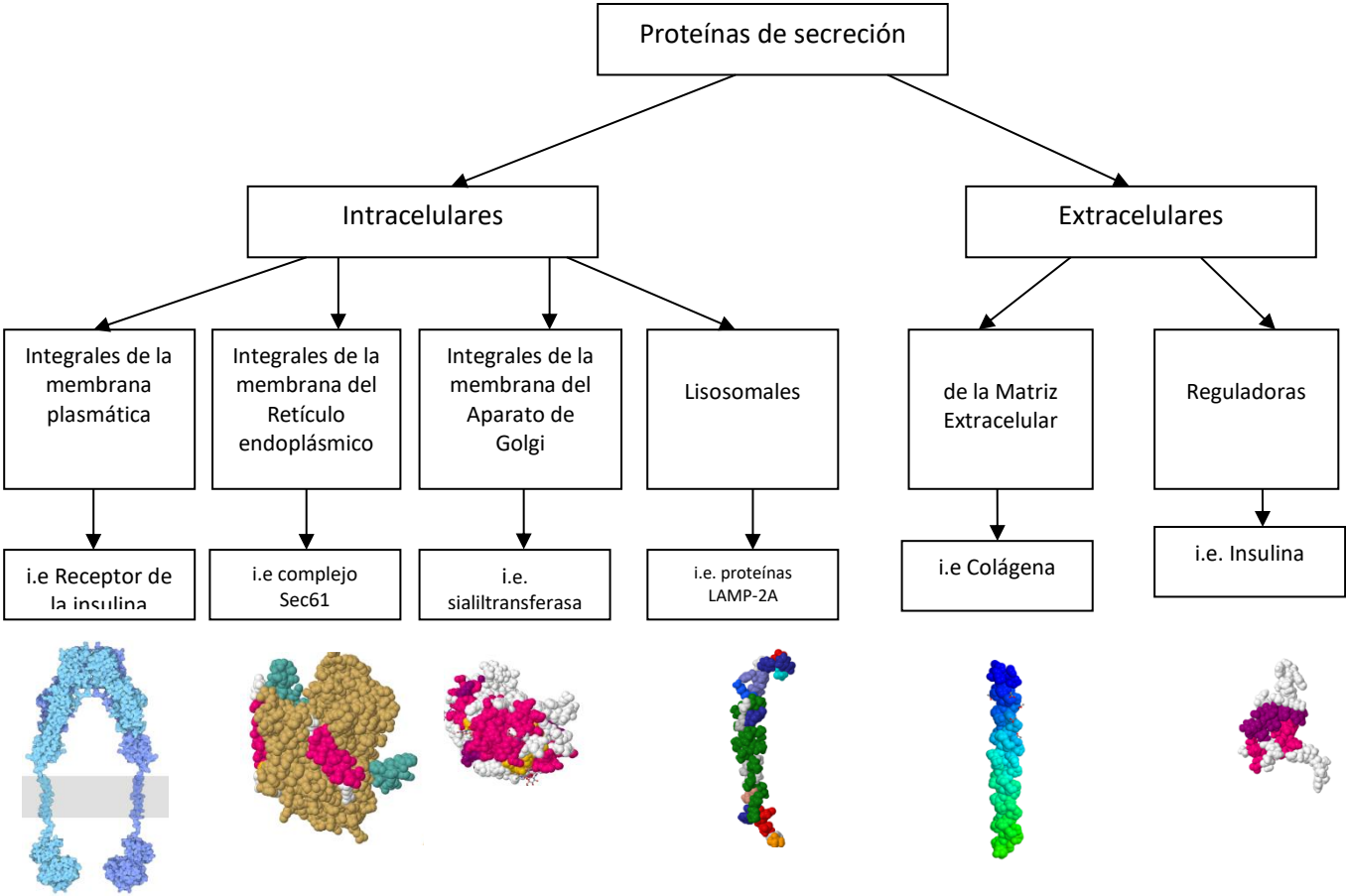


Figura 1. Diferentes tipos de proteínas de secreción. Modelos tridimensionales tomados del Protein Data Bank (PDB, 2016).

La ruta para la síntesis y maduración de las proteínas secretoras es justamente el eje que le da estructura a los diferentes apartados del presente documento, el cual pretende servir como un texto de apoyo para la enseñanza de la Biología en el Bachillerato Universitario, específicamente en la Escuela Nacional Colegio de Ciencias y Humanidades (CCH), en algunas de las temáticas incluidas en los nuevos programas de Biología I y III (*figura 2*).

Biología I	Temáticas	Aprendizajes
	Moléculas presentes en las células: carbohidratos o glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.	El alumno identifica a las biomoléculas como componentes químicos de la célula.
	Estructuras de las células procariota y eucariota.	El alumno describe las semejanzas y diferencias estructurales entre las células procariotas y eucariotas.
	Síntesis de proteínas.	El alumno relaciona el tránsito de moléculas con el sistema de endomembranas a partir de la información genética contenida en la célula.
Biología III	Temáticas	Aprendizajes
	Síntesis de proteínas.	El alumno identifica los procesos de transcripción, procesamiento y traducción genética como base de la expresión génica en la síntesis de proteínas.

Figura 2. Contenidos temáticos y aprendizajes de los cursos de Biología, relacionados a la biogénesis de proteínas de secreción. Tomados de Colegio de Ciencias y Humanidades (CCH, 2016).

2. Objetivos

Los objetivos a alcanzar con la elaboración de la presente tesina fueron:

- Brindar una visión integradora y sistémica de los diferentes componentes celulares y procesos celulares implicados en la biogénesis de las proteínas de secreción, tal y como lo plantea el enfoque sistémico de los programas de estudios de los cursos de Biología del CCH.
- Realizar una investigación sobre la biogénesis de la insulina como un ejemplo concreto de una proteína de secreción en células animales.

3. Método

Para brindar un panorama general de la ruta de secreción, en el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica del tema que incluyó libros de texto actuales de biología molecular y celular, artículos científicos de revisión y la búsqueda de estructuras determinadas experimentalmente en la página del "RCSB Protein Data Bank" (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Lo anterior permitió ofrecer una visión integradora de los organelos y procesos moleculares que participan en la ruta de las proteínas de secreción.

Para el ejemplo concreto de la insulina de humano *Homo sapiens sapiens*, además de consultar libros y artículos recientes, se consultó la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con el propósito de obtener la secuencia del gen y del mRNA que codifica para la insulina de humano.

4. Resultados.

A continuación se detalla la ruta de secreción, comenzando con la expresión de los genes que codifican a las proteínas de secreción en el núcleo celular, el transporte del mRNA al citosol, el inicio de la traducción, el proceso de direccionamiento de las

proteínas al retículo endoplásmico, la glicosilación y la modificación de las proteínas, su transporte al aparato de Golgi en vesículas cubiertas de COPII, la subsecuente modificación de las glicoproteínas en el aparato de Golgi y finalmente el movimiento de los productos finales a sus diferentes destinos celulares. Después de describir el flujo de información en la vía de secreción de las proteínas, se brinda como ejemplo concreto, la biogénesis de la insulina humana. Este ejemplo servirá como material de apoyo para la enseñanza de la biología en el bachillerato, ya que se trata de una proteína de la cual los alumnos ya han escuchado previamente, que se sintetiza en su propio cuerpo, con una importante función reguladora de la glucosa y relacionada con temas de salud.

4.1 Expresión génica en eucariontes.

Un gen, o unidad hereditaria, es un segmento de DNA o de RNA genómico viral, que codifica para la secuencia de una proteína o de un RNA estructural (Lesk, 2010).

El flujo de la información genética que va del DNA, al RNA y de ahí a una proteína fue enunciado en 1958 por Francis Crick, como el dogma central de la biología molecular, constituyendo desde entonces una piedra angular en la biología, al describir la forma en la que fluye la información genética en los sistemas vivos, aunque con el paso de los años se han encontrado excepciones, que hicieron que el mismo Crick lo replanteara en 1970, incorporándose, por ejemplo, el caso de los retrovirus que guardan su información genética en RNA y de ahí sintetizan DNA (Crick, 1970), gracias al proceso de retrotranscripción, realizado por la enzima transcriptasa inversa (*figura 3*).

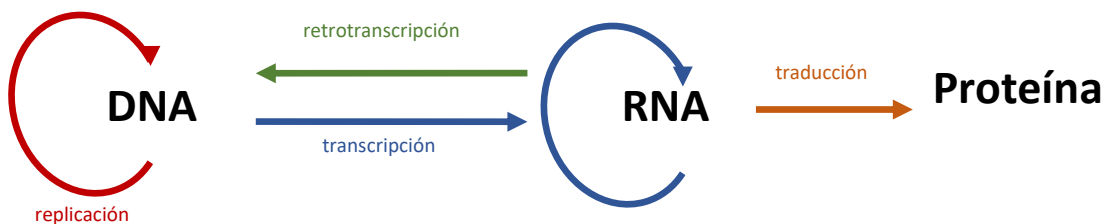


Figura 3. Dogma central de la Biología Molecular.

En eucariontes el flujo de la información genética del DNA hasta proteínas, implica el paso del DNA a una molécula de RNA inmadura, denominada RNA pre-mensajero (pre-mRNA), mediante el proceso de transcripción, posteriormente gracias a los procesos de corte y empalme (*splicing*), se eliminan los intrones (regiones de los genes que no codifican a proteínas) y se unen los exones (regiones codificantes), para obtener un RNA mensajero maduro (mRNA), el cual se ocupa como molde en la traducción, donde se unen aminoácidos en un orden particular para dar origen a las cadenas polipeptídicas que forman a las proteínas. Es importante mencionar que la expresión de los genes que codifican para proteínas y la maduración del pre-mRNA ocurren en el núcleo celular de los organismos eucariontes (figura 4).

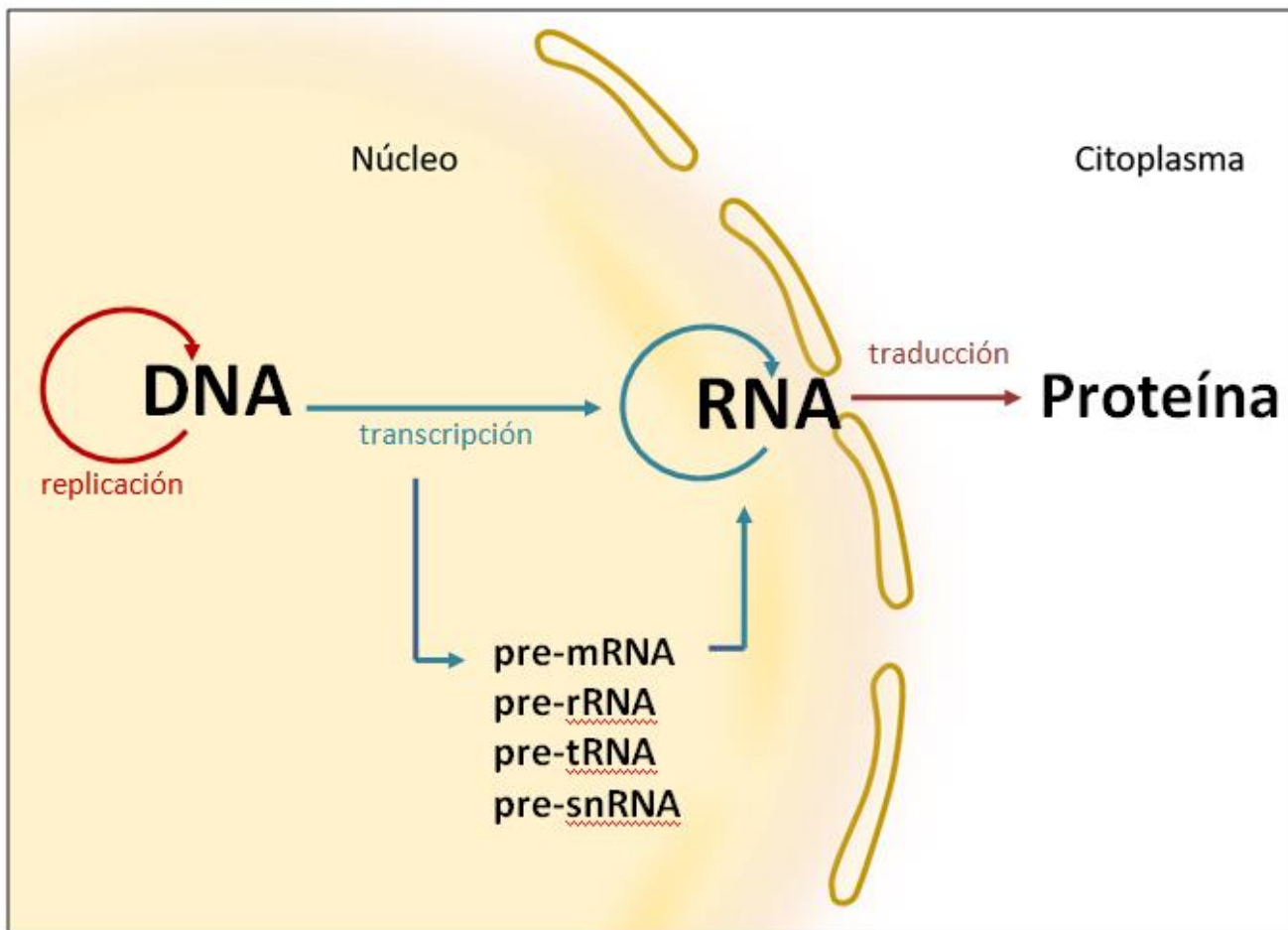


Figura 4. Flujo de la información genética en células eucariontes. Modificado de Jiménez y Segura (2010).

Algunos genes no contienen información para sintetizar proteínas, pero codifican para RNAs funcionales involucrados en la síntesis de proteínas (*figura 4*), como es el caso de los RNAs de transferencia (tRNAs) y RNAs ribosomales (rRNAs). Además, la expresión de algunos genes nucleares da lugar a RNAs pequeños que participan en el proceso de maduración de los pre-mRNAs como es el caso de los RNAs pequeños nucleares ricos en uracilo (snRNAs) (Jiménez & Segura, 2010).

4.2 Procesamiento del RNA pre-mensajero (pre-mRNA)

El primer proceso de maduración que sufre un pre-mRNA naciente es el proceso de “*capping*”, en su extremo 5'. Ocurre cuando el transcrito alcanza una longitud de aproximadamente 20 a 30 nucleótidos y consiste en la adición de una caperuza de 7-metilguanosina a su extremo 5', lo cual protege al mRNA de la degradación y favorece la traducción. La caperuza se une por el complejo de unión CBP20, conformado por las proteínas CBP20 y CBP80 (Carmody & Wentz, 2009).

La siguiente modificación que le ocurre al pre-mRNA es el proceso conocido como “*splicing*”, el cual ocurre debido a que los genes eucariontes no son continuos, sino que están segmentados (*split genes*), ya que presentan secuencias codificantes (exones) y secuencias no codificantes (intrones). En este proceso los intrones se eliminan y se unen los exones de los RNA intranucleares inmaduros. El *splicing* se lleva a cabo en el núcleo celular con la ayuda de grandes partículas ribonucleoprotéicas conocidas como snRNPs y otros factores no snRNPs como la proteína SC35, juntos estos complejos forman el spliceosoma.

En el *splicing* alternativo, a diferencia del *splicing* constitutivo, se producen varias moléculas de mRNA a partir del mismo gen. Cada uno de estos mensajeros produce diferentes proteínas. Por tanto, los patrones de *splicing* alternativo brindan a los genes una dimensión extra de versatilidad. Esto también hace que la tarea de interpretar la secuencia de un genoma sea más compleja y difícil, ya que se ha estimado que en el genoma humano alrededor de la mitad de los genes sufren *splicing* alternativo (Lesk, 2010).

El *splicing* ocurre asociado a un dominio nuclear observado con microscopía óptica de epifluorescencia, conocido como "*speckled*" o moteado, debido a que se evidencia con inmunofluorescencia cuando se usan anticuerpos contra factores de *splicing* (Jiménez & Segura, 2010).

Los procesos finales de maduración de los pre-mRNAs son: el corte en su extremo 3' y la poliadenilación. El sitio de poliadenilación es reconocido en la región no traducida (3' UTR), resultando en el corte inmediatamente posterior. La cola de poly-(A) es adicionada por una poly-(A) polimerasa y unida por una proteína ligadora poly-(A) (Carmody & Wenthe, 2009). En resumen, los genes son transcritos como un RNA precursor o pre-mRNA, el cual madura para dar lugar a un mRNA a través de los procesos de *capping*, *splicing* y poliadenilación (Jiménez & Segura, 2010), como se representa en la *figura 5*.

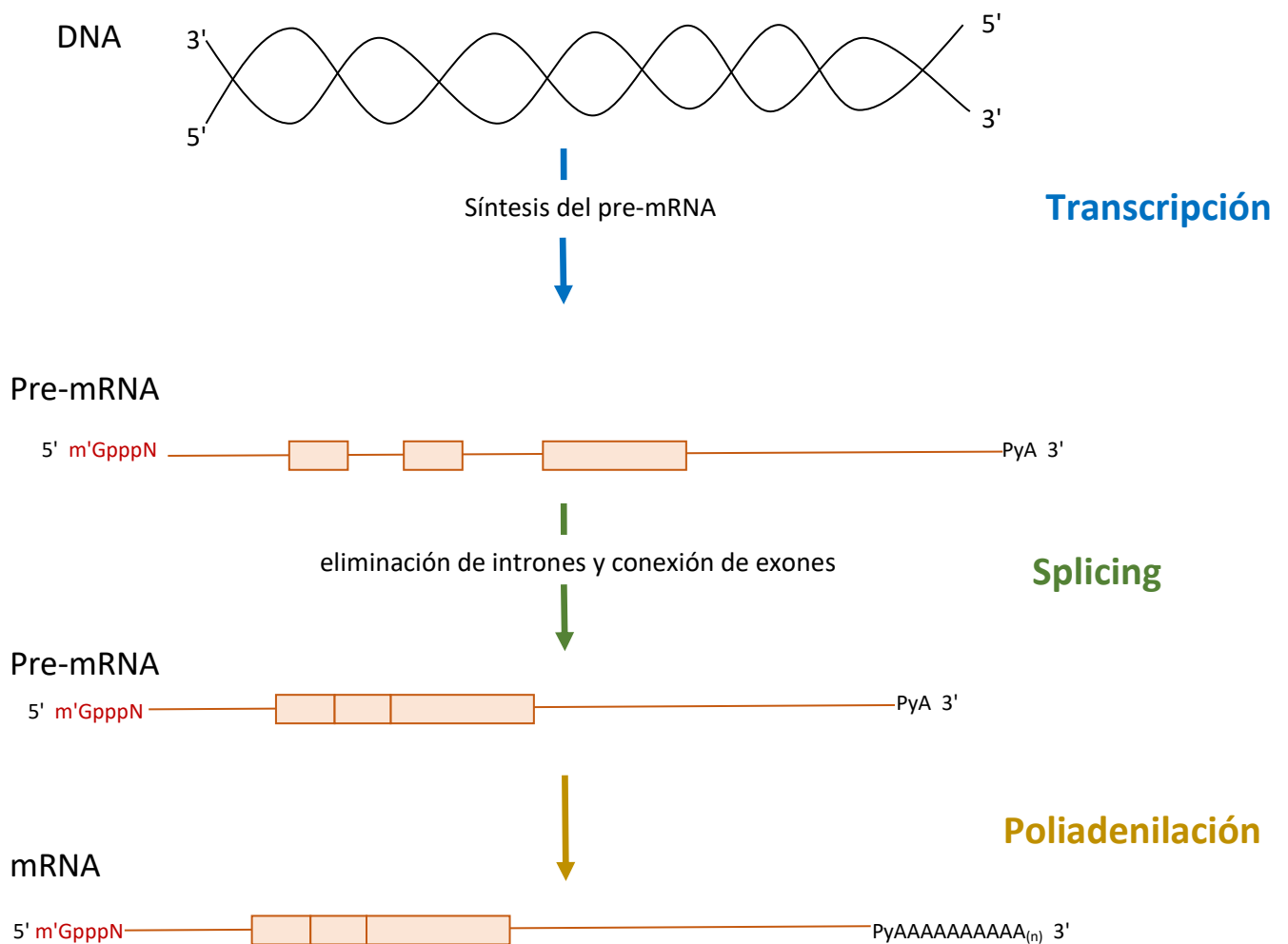


Figura 5. Procesos de maduración del pre-mRNA.

4.3 Transporte núcleo-citoplasma de los mRNAs

Los RNAs que se forman en el núcleo celular, incluyendo los mRNAs, salen al citoplasma, a través de los complejos de poro nuclear (NPCs del inglés *nuclear pore complexes*), los cuales se extienden a través de la envoltura nuclear, proyectándose tanto al citoplasma como al nucleoplasma (Delaleau & Borden, 2015).

El NCP es un complejo supramolecular (ver *figura 6*) que presenta simetría octogonal y está conformado por 30 tipos diferentes de proteínas llamadas nucleoporinas (Nups), las cuales están muy conservadas en los vertebrados. En el centro de los poros nucleares hay un conducto cilíndrico rodeado por un anillo de nucleoporinas cuyo reordenamiento permite que su diámetro de abertura pase de 20 a 40 nanómetros. El NCP presenta hacia el nucleoplasma una estructura conocida como canasta nuclear y hacia el citoplasma filamentos citoplásmicos (Karp, 2013).

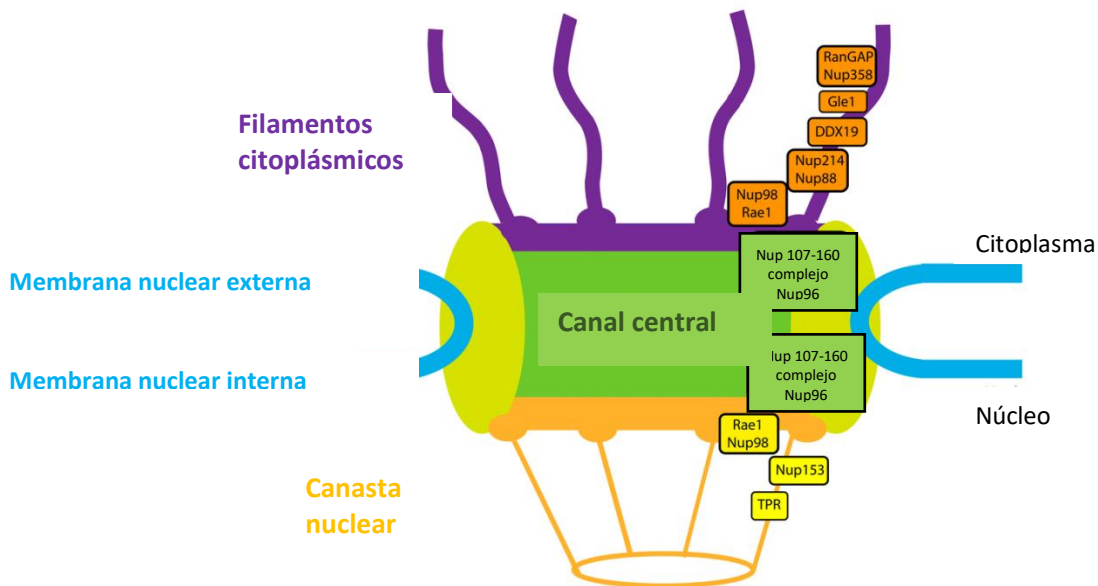


Figura 6. Estructura del complejo del poro nuclear. Tomado de Delaleau y Borden (2015).

Los procesos de maduración de los pre-mRNAs, como el *capping* en su extremo 5', el *splicing* y la poliadenilación en su extremo 3', son indispensables para que los

mRNAs puedan ser transportados por el complejo de poro nuclear, pues de no realizarse correctamente estos procesos, los mRNAs son retenidos en el núcleo y marcados para su degradación (Carmody & Wentz, 2009).

Conforme inicia la transcripción y los procesos de maduración de los pre-mRNAs ocurren, se asocian a estas moléculas de RNA nacientes, algunos factores proteicos de exportación, como las proteínas SR (ricas en los aminoácidos serina y arginina) y algunas ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs), conformando así los denominados complejos ribonucleoproteicos (mRNPs), que son dirigidos hacia las diferentes vías de exportación nuclear para salir al citoplasma. Diferentes hnRNPs se van asociando con el mRNP en diferentes etapas de las vías de exportación hacia el citoplasma. Una vez que se formaron los complejos de los mRNPs, estos son direccionados hacia los complejos del poro nuclear, donde se asocian con la canasta nuclear, transitan a través del canal central del poro y finalmente sean liberados al citoplasma gracias a la acción de los filamentos citoplásmicos (*Figura 7*) (Delaleau & Borden, 2015).

Algunas hnRNPs presentan señales de retención nuclear y son removidas antes de la exportación de los mRNPs, mientras que otras permanecen asociadas al mRNA durante la exportación y son liberadas en el citoplasma una vez que el transporte del mensajero ha sido completado para después regresar al núcleo por los poros nucleares (Carmody & Wentz, 2009). En humanos hay 30 tipos diferentes de hnRNPs, entre las cuales se encuentra la proteína nuclear de unión a la cola poli A (PAB2).

Los eventos de exportación de los mRNAs están altamente regulados, por lo que constituyen uno de los mecanismos por los cuales las células eucariontes controlan la expresión de sus genes (Carmody & Wentz, 2009), ya que subconjuntos específicos de mRNAs pueden ser exportados de forma diferencial hacia el citoplasma lo cual conduce a la regulación del proteoma de la célula al controlar la cantidad de transcritos disponibles en el citoplasma para ser traducidos. Esta exportación diferencial se logra gracias a la presencia de elementos específicos en

las secuencias de los transcritos de las regiones no traducidas, denominadas UTRs (Delaleau & Borden, 2015).

Estos elementos UTR generalmente localizados en el extremo 3' se unen a las proteínas de unión al mRNA e intervienen en su direccionamiento y exportación.



Figura 7. Salida de los mRNAs a través del complejo del poro nuclear.

4.4 Mecanismo de síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas es el proceso por el cual las células unen aminoácidos en un orden particular, proceso al que se le denomina traducción, y en el cual se pasa de la secuencia de nucleótidos en el mRNA a la secuencia de aminoácidos de una proteína (que constituye su estructura primaria).

La importancia de la traducción radica en que la secuencia precisa de aminoácidos de una proteína, determina cómo ésta se va a plegar en una o en un número reducido de formas tridimensionales relacionadas, llamadas conformaciones, siendo que la conformación de una proteína, junto con las propiedades químicas distintivas de los aminoácidos que la componen, determinan la función de la proteína (Lodish, *et al.*, 2013).

En el proceso de traducción, intervienen los ribosomas, que están formados por dos subunidades, compuestas tanto de proteínas como de RNA ribosomal (rRNA). Durante la traducción, la subunidad pequeña del ribosoma se une al mRNA en el sitio de iniciación o codón de inicio para metionina (AUG). Entonces la subunidad grande se une, proceso en el que interviene el RNA de transferencia (tRNA). Los tRNAs interactúan con la enzima aminoacil-tRNA sintetasa, que une aminoácidos a los tRNAs. Después de la iniciación, los aminoácidos se unen entre sí a través de enlaces covalentes, llamados enlaces peptídicos (que se forman entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente aminoácido), gracias a la acción de la enzima peptidil-transferasa, que permite el crecimiento de la cadena polipeptídica. El ribosoma se mueve a lo largo del mRNA, avanzando en bloques de tres nucleótidos o codones (Nature Educational [NE], 2014).

Los anticodones del tRNA se unen a los codones del mRNA y esto permite que se unan nuevos aminoácidos, conforme avanza la traducción, la cadena polipeptídica se empieza a plegar. Cuando el ribosoma llega al codón de paro, la traducción termina. Una vez formada, la proteína puede sufrir modificaciones postraduccionales, como son, la adición de carbohidratos, lípidos, metales en los grupos prostéticos, cromógenos y flavonoides, etc. También puede ocurrir la

eliminación de ciertos aminoácidos, o la unión de una cadena polipéptica con otra u otras, para formar una proteína con diferentes subunidades (Karp, 2010).

4.5 Direccionamiento y translocación de las proteínas de secreción al lumen del RER.

El direccionamiento de las proteínas sintetizadas hacia diferentes destinos celulares, se regula gracias a sus señales de clasificación, conocidas como *secuencias señal*, que se ubican en una región continua de la secuencia de aminoácidos, de 15-60 aminoácidos de longitud, a menudo ubicada en el extremo amino terminal (N-terminal) (Alberts, *et al.*, 2008). Aunque estas secuencias pueden variar mucho en su composición de aminoácidos, todas contienen un fragmento de aproximadamente unos 20 aminoácidos hidrofóbicos, en el que es común el aminoácido leucina (Jiménez & Segura, 2010).

Las proteínas de secreción son dirigidas a la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), por la secuencia señal, mediante el proceso conocido como “*targeting*”, que incluye dos componentes: la partícula de reconocimiento de señal (SRP del inglés *signal recognition particle*), conformada por un complejo ribonucleoproteico soluble que comprende seis péptidos y un RNA (Agredano, Segura, Trinidad & Jiménez, 2003), la cual se une al péptido señal y viaja de forma cíclica entre la membrana del RE y el citosol y un receptor de la SRP presente en la membrana del RE. Cuando el complejo ribosoma-SRP se ha formado, se une al receptor de la SRP, que es una proteína integral de membrana embebida en la membrana del RER. Esta interacción une el complejo SRP-ribosoma a un translocador de proteínas, constituido por un poro proteico acuoso de la membrana del RER, denominado translocón, el cual está formado por varias proteínas integrales de membrana, como las del complejo Sec61 (Braakman & Bulleid, 2011),

Tanto la SRP como el receptor de la SRP son liberados y el translocón transfiere la cadena polipeptídica en crecimiento hacia el lumen del retículo endoplásmico (*ver figura 8*) donde sufrirá modificaciones traduccionales y post-traduccionales (Alberts, *et al.*, 2008). Completado el proceso de clasificación de la proteína, la enzima peptidasa señal, eliminan la secuencia señal de la proteína en el lumen del retículo endoplásmico.

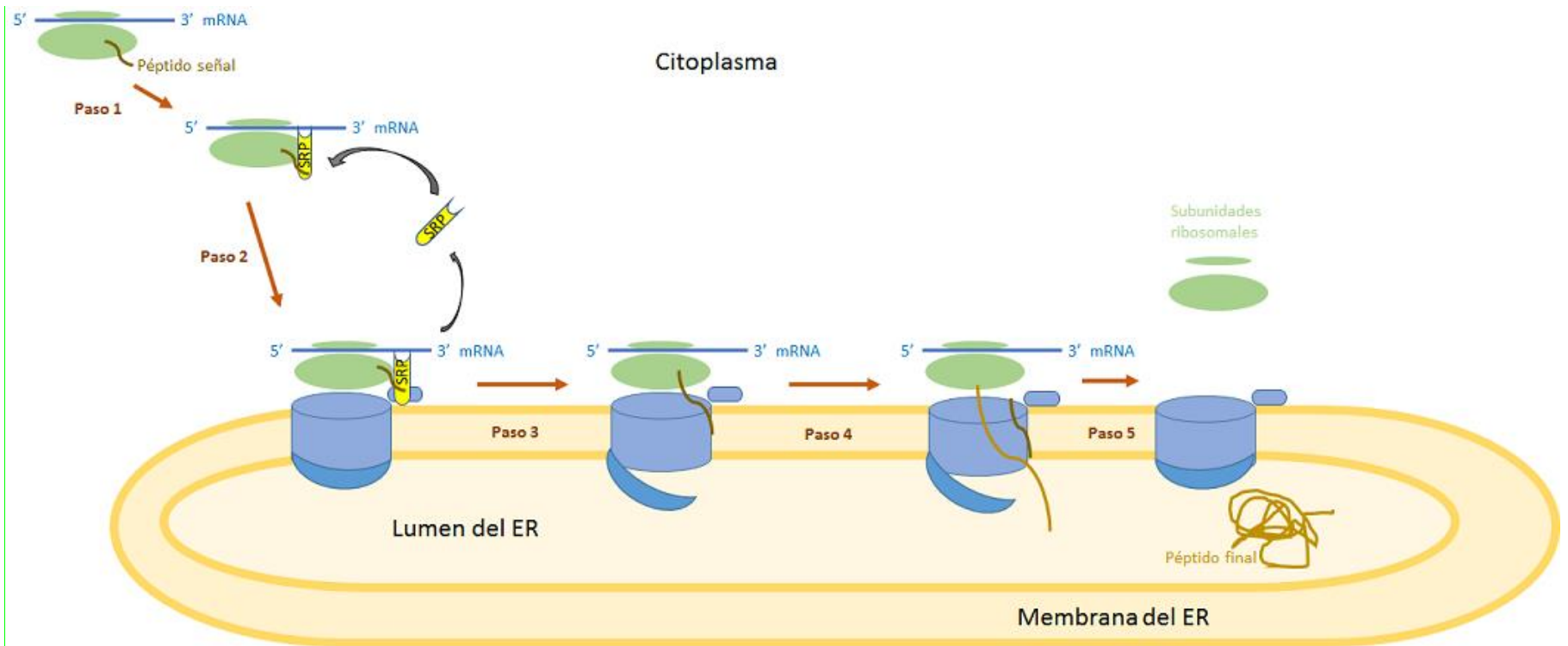


Figura 8. Translocación de proteínas hacia el lumen del RER

El translocón es una estructura dinámica, que modifica el diámetro de su poro de forma transitoria, cuando una cadena polipeptídica atraviesa la membrana del RER o cuando se libera el ribosoma al que se asocia (Agredano *et al.*, 2003). Al parecer la secuencia señal de la cadena polipeptídica en crecimiento desencadena la apertura del poro acuoso del translocón. Después de que la secuencia señal se ha liberado de la SRP y de que la cadena en crecimiento ha alcanzado una longitud suficiente, la secuencia señal se une a un sitio de unión situado en el mismo poro y abre así el poro por lo que la secuencia señal es reconocida dos veces: primero por la SRP en el citosol y después por un sitio de unión en el translocón, actuando como una señal de inicio de transferencia (o péptido de inicio de transferencia) que abre el poro. Este doble reconocimiento asegura que sólo entren en el lumen del RE las proteínas con la secuencia señal correcta (Alberts, *et al.*, 2008).

4.6 Procesamiento de proteínas en el lumen del retículo endoplásmico.

En el RE ocurre la adición covalente de carbohidratos a las proteínas, conocida como glicosilación tipo N, en la que se agregan carbohidratos al átomo de nitrógeno de un residuo de asparagina dentro de una región consenso (Asn-Xaa-Ser-Thr), en la que el residuo asparagina se encuentra seguido de cualquier aminoácido excepto prolina y la tercera posición está ocupada por residuos de serina o treonina (Jiménez y Segura, 2010). La adición de estos carbohidratos, ocurre como una transferencia en bloque de un oligosacárido formado previamente (compuesto de N-acetilglucosamina (2), manosa (9) y glucosa (3)), con un total de 14 monómeros unidos específicamente al grupo amino (NH₂), de la cadena lateral de asparagina. Lo anterior, gracias a la actividad del complejo enzimático de la proteína oligosacárido transferasa, que se encuentra unida a la membrana del RE, con su sitio activo expuesto hacia el lumen del RE, lo que explica porque las proteínas citosólicas no son glicosiladas (Agredano *et al.*, 2003).

La transferencia del oligosacárido ocurre inmediatamente después de que la asparagina diana aparece en el lumen del RE durante la translocación de la proteína. La diversidad de estructuras de N-oligosacáridos que se presentan en las glucoproteínas maduras se produce por modificación posterior de la estructura del oligosacárido precursor. En el RE, se eliminan tres residuos de glucosa y uno de manosa de los oligosacáridos de la mayoría de las glucoproteínas. Este proceso es un mecanismo auxiliar en el correcto plegamiento de las proteínas (Alberts *et al.*, 2008).

El RE está constituido por un ambiente molecular diferente al citosol que permite el plegamiento de las proteínas, el ensamblaje de diferentes subunidades proteicas, el control de calidad y el reciclado de proteínas (Braakman & Bulleid, 2011). Es en el lumen del RE donde ocurre la oxidación de los grupos sulfhidrilos libres (SH) de las cisteínas, para formar enlaces disulfuro (S-S), proceso catalizado por la enzima disulfuro isomerasa (PDI). Casi todas las cisteínas de los dominios proteicos expuestos al espacio extracelular o al lumen del RE en la vía secretora están unidos por enlaces disulfuro. Por el contrario, se forman muy pocos enlaces disulfuro en los dominios expuestos al citosol debido a que es un ambiente reductor (Alberts, *et al.*, 2008).

Para salir del RE, las proteínas deben estar correctamente plegadas y si son subunidades de complejos proteicos multiméricos, es necesario que estén bien ensambladas. Aquellas que están mal plegadas o mal ensambladas son retenidas en el RE, donde permanecen unidas a proteínas chaperonas, tales como *BiP* ó *calnexina/calreticulina*, que bloquean las señales de salida. Las proteínas mal plegadas son transportadas de nuevo al citosol donde son degradadas por el sistema ubiquitina-proteosoma, lo que constituye un mecanismo de control de calidad de las proteínas (Alberts, *et al.*, 2008), de tal forma que sólo las conformaciones nativas de las proteínas alcanzan a salir del RE, lo cual permite controlar y mantener la fidelidad de las funciones celulares (Ellgaard & Helenius, 2003).

4.7 Transporte de proteínas mediado por vesículas hacia el aparato de Golgi

En la ruta secretora, las proteínas que se han sintetizado en el RE y están destinadas al complejo del aparato de Golgi o compartimientos posteriores, son empaquetadas en pequeñas vesículas de transporte recubiertas con COPII (un complejo multiproteico). Estas vesículas se forman en regiones especializadas del RE denominadas zonas de transición o sitios de salida del RE, cuya membrana carece de ribosomas o cuenta con muy pocos de estos. La mayoría de las células animales tienen los lugares de salida del RE dispersos de forma aleatoria a través de la red del RE, por ejemplo, en mamíferos las células generalmente tienen entre 50 y 70 lugares de salida del RE, con mayor concentración en el área adyacente al aparato de Golgi (Szul & Sztul, 2011).

Las proteínas que serán secretadas presentan señales de salida (transporte) en su superficie, que son reconocidas por componentes de la cubierta COPII; estos componentes de cubierta actúan como receptores de carga y son reciclados de nuevo al RE después de liberar su carga en el complejo de Golgi (Alberts, *et al.*, 2008).

Después de que las vesículas de transporte se hayan formado en los lugares de salida del RE y se hayan desprendido de la cubierta, empiezan a fusionarse entre sí, para lo que requieren un conjunto complementario de proteínas, pertenecientes a una superfamilia de proteínas pequeñas, llamadas SNAREs (acrónimo del inglés *SNAP Soluble NSF Attachment Protein* y de *RE receptor*). Las cuales permiten la fusión de membranas vesiculares en todos los pasos de la ruta secretora, gracias a que estas proteínas SNAREs se localizan en membranas opuestas, es decir, las proteínas v-SNARE en la vesícula de un compartimento donador y las proteínas t-SNARE en la membrana diana de un compartimento receptor, formando complejos estables *trans*-SNAREs, que aproximan las dos membranas, mediante la formación de un ramillete de cuatro hélices paralelas que aproximan las dos membranas hasta que sus capas lipídicas se fusionan (Jahn & Scheller, 2006). Ver *figura 9*.

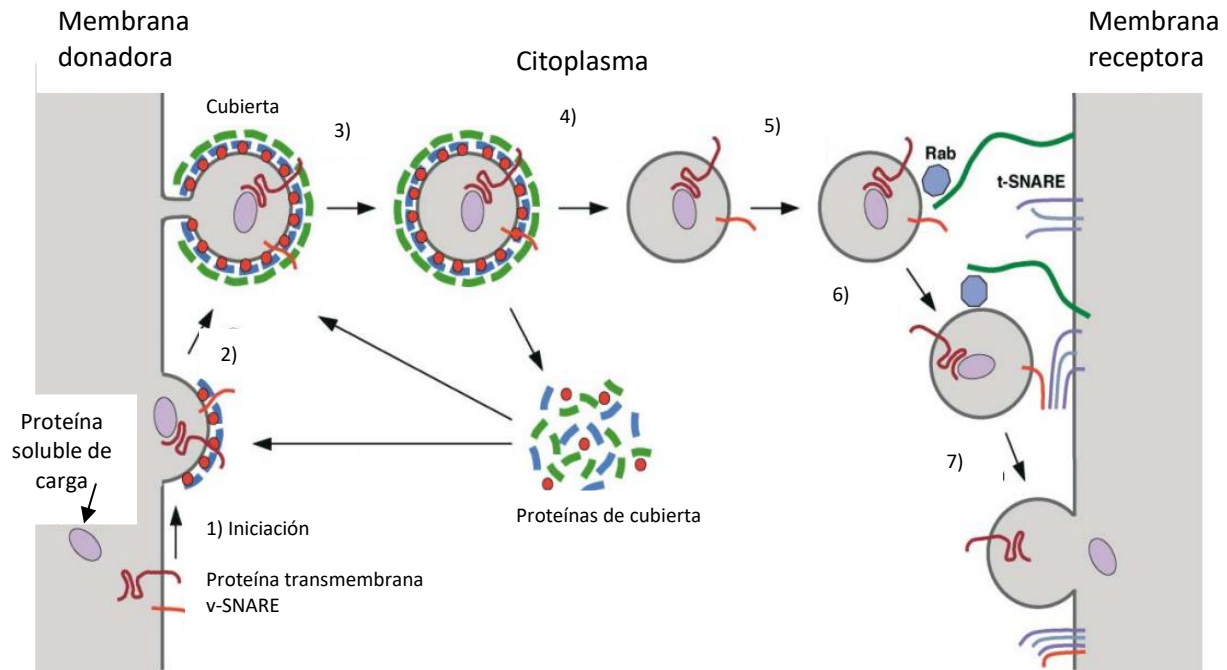


Figura 9. Formación, transporte y fusión de vesículas. Tomado de Bonifacino JS y Glick BS (2004).

Las estructuras formadas cuando las vesículas derivadas del RE se fusionan unas con otras, se denominan agregados túbulo-vesiculares, por su aspecto replegado cuando se observa al microscopio electrónico. Estas agrupaciones forman un nuevo compartimento separado del RE, el cual se forma constantemente y actúa como un contenedor que lleva material desde el RE hasta Golgi (ver figura 10). Estos agregados vesiculares o intermediarios pre-Golgi, tienen una composición bioquímica diferente a la del RE y a la de Golgi, y no tienen continuidad con ellos (Szul & Sztul, 2011), además de que tienen una vida media relativamente corta, ya que son desplazados con rapidez a lo largo de microtúbulos hacia el complejo de Golgi, con el que se fusionan liberando su contenido (Alberts, *et al.*, 2008).

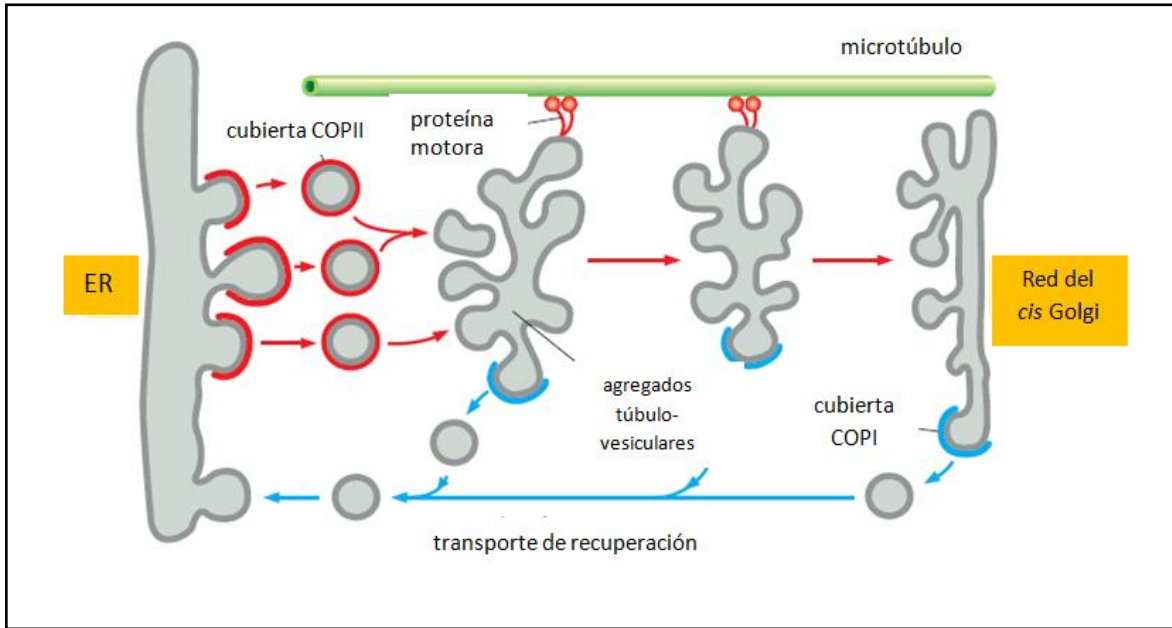


Figura 10. Transporte de los agregados túbulo-vesiculares desde el RE hasta el aparato de Golgi. Imagen tomada de Alberts y colaboradores (2015).

4.8 Maduración de las proteínas de secreción en el Aparato de Golgi

Durante su paso a través del aparato de Golgi las proteínas sufren una serie ordenada de modificaciones, por ejemplo, transformaciones de sus oligosacáridos, a través de rutas de procesamiento que tienen lugar siguiendo etapas sucesivas, en las que en cada cisterna del aparato de Golgi intervienen una gran cantidad de enzimas (Alberts, *et al.*, 2008).

El aparato de Golgi tiene dos caras distintas: una cara *cis* (o cara de entrada) y una cara *trans* (o cara de salida). Ambas caras están asociadas a compartimentos especiales, formados por una red de estructuras tubulares y cisternas: la red *cis* Golgi (CGN; *cis* Golgi network) y la red *trans* Golgi (TGN: *trans* Golgi network), respectivamente. La CGN es una colección de agrupaciones túbulo-vesiculares fusionadas que proceden del RE. Las proteínas entran por la red *cis* Golgi y salen por la red *trans* Golgi en vesículas de transporte hacia su destino final. Las proteínas que entran en la CGN pueden o bien seguir a través del complejo de Golgi o bien regresar al RE, si continúan, pasan al primer compartimento de procesamiento del aparato de Golgi (la cisterna *cis*). Las cisternas contienen enzimas residentes que

procesan de manera secuencial las proteínas y lípidos (a nivel de glicosilación), que se mueven por la pila de una manera vectorial. El mecanismo por el cual las proteínas y lípidos se transportan a través del complejo de Golgi se desconoce, aunque el modelo de transporte más aceptado es el de maduración cisternal que plantea que las proteínas y los lípidos son retenidos en las cisternas, las cuales maduran progresivamente a medida que migran a través de la pila en una dirección de *cis* a *trans* (Lowe, 2011).

El lumen de las cisternas *trans* se cree que forma un continuo con la TGN, esta red *trans* de túbulos membranosos genera vesículas de transporte que dirigen las proteínas hacia sus diferentes destinos finales, por lo que la TGN se considera como un importante centro de clasificación y salida dirigida de proteínas, ya sea a través de vías endocíticas o exocíticas (De Matteis & Luini, 2008).

4.9 Transporte de las proteínas de secreción a sus destinos finales

Las proteínas de secreción pueden ser dirigidas hacia vías lisosomales (en el caso de enzimas lisosomales), a la membrana plasmática o bien, fuera de la célula. Se ha sugerido que sus transportadores membranosos se producen cuando la TGN se fragmenta en vesículas y túbulos de diferentes tamaños. Este proceso se adapta al modelo de maduración de cisternas, que propone que las cisternas del aparato de Golgi se mueven en forma continua en dirección a la TGN, donde tendrían que dispersarse para permitir la maduración continua de las pilas del complejo de Golgi (Karp, 2013).

Se cree que las proteínas que salen de la célula mediante un proceso de secreción regulada, como el caso de las enzimas digestivas o las hormonas, forman agregados selectivos, que al final se retienen en granulos secretores grandes y muy concentrados. Al parecer, estos gránulos secretores inmaduros se desprenden de los márgenes de las cisternas de la red *trans* Golgi y la TGN. En algunas células se observan túbulos largos que emergen de la TGN y son guiados por proteínas motoras que operan a lo largo de trayectos microtubulares del citoesqueleto. Luego estos túbulos se dividen en varias vesículas o gránulos por fusión de membranas.

Una vez que salen de la TGN, el contenido de los gránulos secretores se concentra. Al final, los granulos maduros se almacenan en el citoplasma hasta que su contenido se libera después de la estimulación de la célula, ya sea por una hormona o impulso nervioso (Karp, 2013).

La fusión de una vesícula secretora o gránulo secretor con la membrana plasmática y la descarga subsecuente de su contenido se llama exocitosis. Es probable que la exocitosis ocurra en forma continua en la mayor parte de las células, conforme se envían proteínas y otros materiales de la membrana plasmática al espacio extracelular. Cuando una vesícula citoplásmica se fusiona con la membrana plasmática, la superficie luminal de la membrana de la vesícula se vuelve parte de la superficie externa de la membrana plasmática, mientras que la superficie citosólica de la membrana vesicular se torna parte de la cara interna (citosólica) de la membrana plasmática. La fusión de estas membranas también estaría mediada por proteínas SNAREs (Jahn & Scheller, 2006), que conducirían a la formación de un poro de fusión de la membrana y a la consiguiente exocitosis (Karp, 2013).

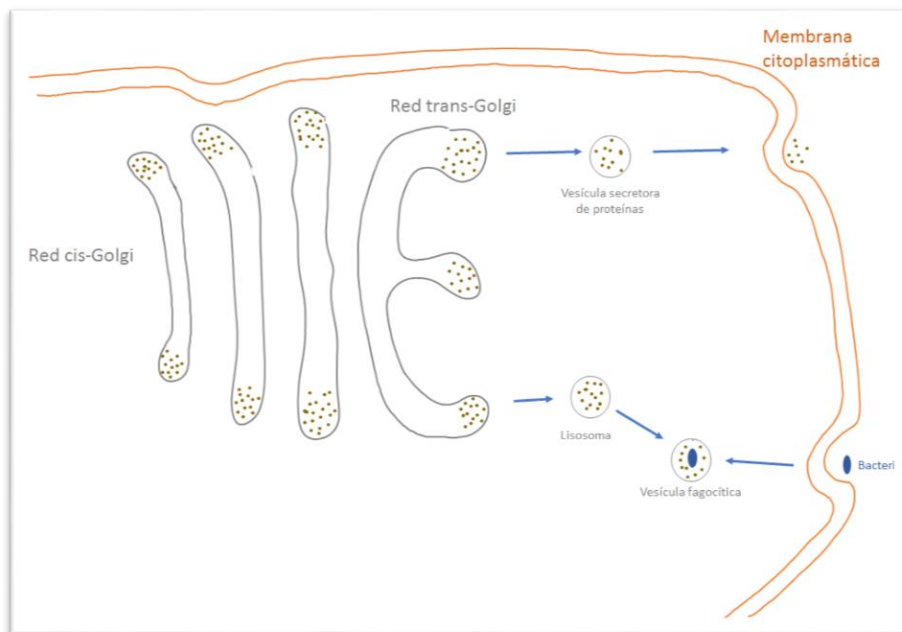


Figura 11. Transporte vesicular hacia la Red Trans Golgi. Modificado de Jahn & Scheller, 2006.

A continuación se detalla como ejemplo concreto de una proteína de secreción, la biogénesis de la insulina humana en las células de páncreas.

4.10 Biogénesis de la insulina

La insulina es una hormona muy conservada en vertebrados que se produce en las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas y que participa en la regulación de la glucosa en sangre, al intervenir en el transporte de la glucosa hacia el interior de las células (Wilcox, 2005).

Los islotes de Langerhans del páncreas (*figura 12*), están conformados por mosaicos de diferentes tipos celulares, en donde las células beta se encuentran en el interior de los islotes (Fernández, 1992).

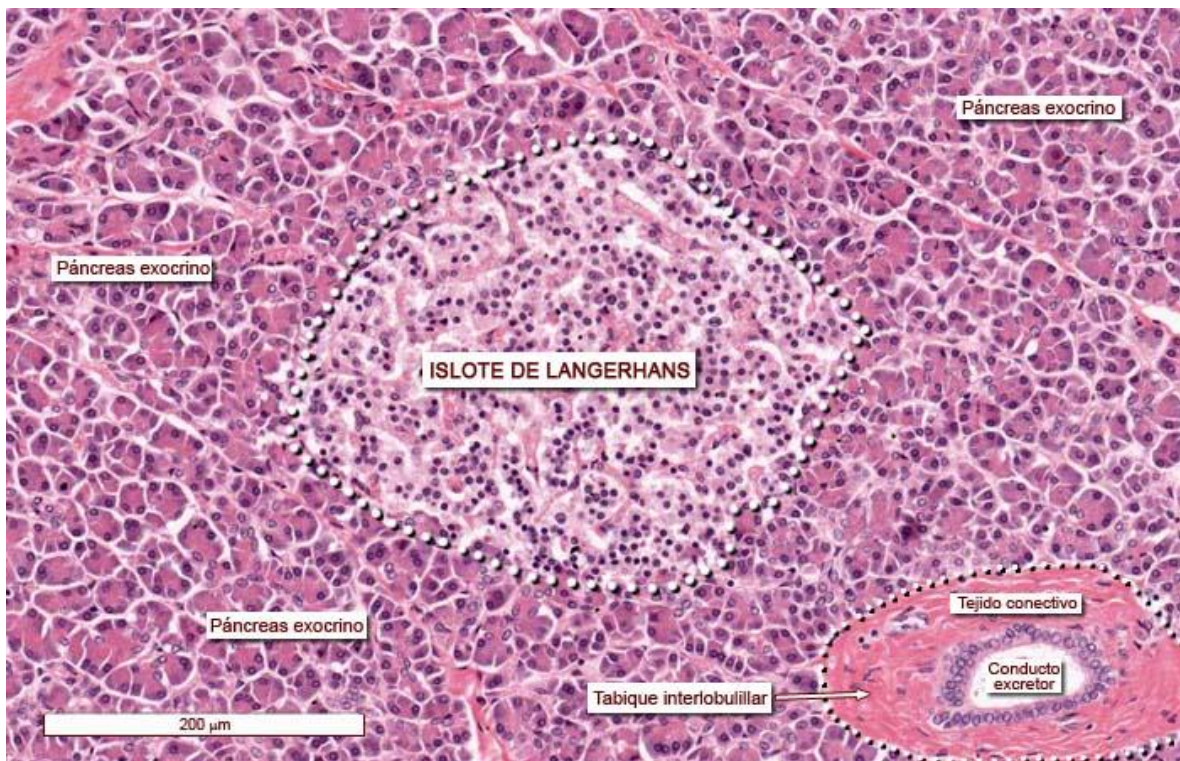


Figura 12. Islote de Langerhans, tomado del Atlas de histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza (2016).

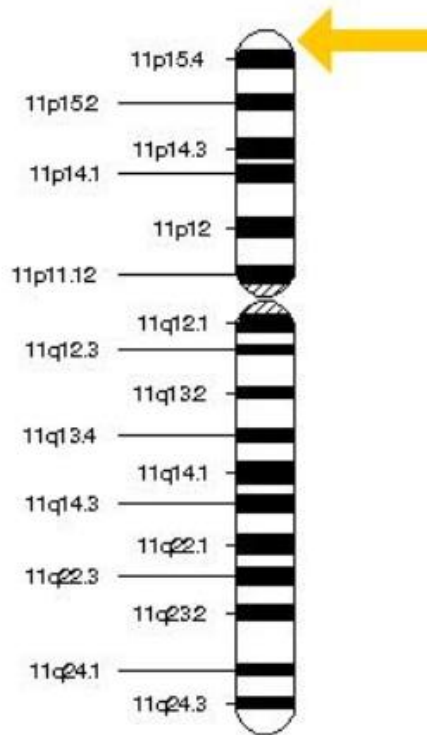
Los ambientes con concentraciones elevadas de glucosa en los islotes de Langerhans promueven la biosíntesis de la insulina y constituyen el regulador

primario de su secreción. Cuando se eleva la concentración de glucosa, esto provoca un aumento en los niveles de Adenosín monofosfato cíclico (cAMP), por un mecanismo que parece no involucrar la activación de la adenilato ciclasa. El cAMP ejerce su efecto a través de un mecanismo que involucra a la proteína cinasa A (PKA), llevando a la fosforilación y activación de proteínas clave. A través de esta compleja cadena de eventos, la glucosa, el cAMP y posiblemente la contribución de una elevación del calcio libre intracelular y el IP3 inositol fosfato, promueven la transcripción del gen de insulina en el núcleo de las células β y por lo tanto la traducción del mRNA que codifica para insulina (Weiss *et al.*, 2014).

Hormonas y sustancias químicas juegan un rol importante en la regulación de la secreción de insulina, incluyendo: al glucagón que es secretado por las células α de los islotes pancreáticos; la colecistoquinina; y los péptidos gástricos inhibidores, todos actuando a través de receptores en las células β . Los inhibidores de la secreción de insulina incluyen catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) que interactúan con los receptores adrenérgicos en la membrana de las células β ; la somatostatina que es secretada por las células de los islotes pancreáticos (Weiss *et al.*, 2014).

El estímulo más importante en la secreción de la insulina es la glucosa, la célula β se comporta como un verdadero glucostato, siendo sensible a pequeñas variaciones de la concentración de la glucosa en sangre. Tras un incremento de la glucosa en sangre, la célula beta responde en segundos al estímulo, mediante la secreción de la insulina ya sintetizada e inmediatamente comienza una fase de síntesis y secreción simultánea (Fernández, 1992, p. 995).

En humanos, el gen de la insulina se localiza en el cromosoma 11, en metafase en el brazo pequeño (p), posición 15.5 (Genetics Home Reference [GHR], 2016) (*figura*



13). Figura 13. Locus del gen de la insulina en el cromosoma metafásico humano número once. Esquema tomado del GHR (2016).

El gen de la insulina humana (GenBank: AH002844.2), tiene tres exones y dos intrones. El primer intrón incluye del nucleótido 2186 al 2227 (longitud 41 pb) y el segundo intrón va del nucleótido 2611 al 3396 (longitud 785 pb), (figura 14).

```

1  ctcgaggggc  ctagacattg  ccctccagag  agagcaccca  acaccctcca  ggcttgaccg
61  gccaggggtg  ccccttctca  ccttggagag  agcagcccca  gggcatcctg  caggggggtg
121  tgggacacca  gctggccttc  aaggtctctg  cctccctcca  gccaccccac  tacacgctgc
181  tgggatcctg  gatctcagct  ccctggccga  caacactggc  aaactcttac  tcatccacga
241  aggeccctct  gggcatgggtg  gtccttccca  gcctggcagt  ctgttctca  cacacctgtg
301  tagtgcccag  ccctgaggt  tgcagctggg  ggtgtctctg  aagggtgtg  agccccagg
361  aagccctggg  gaagtgcctg  ccttgcctcc  ccccggcct  gccagcgcct  ggctctgccc
421  tcctacctgg  gctcccccca  tccagcctcc  ctccctacac  actcctctca  aggaggcacc
481  catgtcctct  ccagctgccg  ggctcagag  cactgtggcg  tcctggggca  gccaccgcat
541  gtctgtctgt  ggcatggctc  agggtgaaa  gggcgaagg  gaggggtcct  gcagatagct
601  ggtgcccact  accaaaccog  ctggggcag  gagagccaaa  ggctgggtgt  gtgcagagcg
661  gccccgagag  gttccgaggc  tgaggccagg  gtgggacata  gggatgagag  ggccggggc
721  acaggatact  ccaacctgcc  tgccccatg  gtctcatcct  cctgcttctg  ggacctctg
781  atcctgccc  tggtgctaag  aggcaggtaa  ggggtgcag  gcagcagggc  tcggagccca
841  tgccccctca  ccatgggtca  ggctggacct  ccaggtgcct  gtctggggga  gctgggaggg
901  ccggaggggt  gtaccccagg  ggctcagccc  agatgacact  atgggggtga  tgggtgcatg
961  ggacctggcc  aggagagggg  agatgggctc  ccagaagagg  agtgggggct  gagaggggtg
1021  ctggggggcc  aggacggagc  tgggcccag  cacagcttcc  cacacctgcc  cacccccaga
1081  gtctgtccgc  cccccccaga  tcacacggaa  gatgaggctc  gagtggcctg  ctgaggactt
1141  gctgctgtgc  cccaggtccc  caggtcatgc  cctccttctg  ccaccctggg  gagctgaggg

```

1201 cctcagctgg ggctgtgtc ctaaggcagg gtgggaacta ggacgccagc agggagggga
1261 cccctccctc actcccactc tcccaccccc accaccttgg cccatccatg gcggcatctt
1321 gggccatccg ggactgggga caggggtctc ggggacaggg gtccggggag aggggtcctg
1381 ggacaggggt gtggggacag ggggtctggg acaggggtgt ggggacaggg gtgtggggac
1441 aggggtctgg ggacaggggt gtggggacag ggttccgggg acaggggtgt ggggacaggg
1501 gtctggggac aggggtgtgg ggacaggggt gtggggacag ggttctgggg acaggggtgt
1561 ggggacaggg gtcctgggga caggggtgtg gggacagggg tgggggaca ggggtgtggg
1621 gacaggggtg tggggacagg ggtcctgggg ataggggtgt ggggacaggg gtgtggggac
1681 aggggtcccg gggacagggg tgtggggaca ggggtgtggg gacaggggtc ctggggacag
1741 gggctctgagg acaggggtgt gggcacaggg gtcctgggga caggggtctc ggggacaggg
1801 gtcctgggga caggggtctg gggcacaggg cgcaaagagc cccgccctgc agctccagc
1861 tctcctggtc taatgtgga agtggcccag gtgaggctt tgcctcctg gagacattg
1921 cccccagctg tgagcagga caggtctggc caccgggcc ctggttaaga ctctaatagac
1981 ccgctgttcc tgaggaagag gtgctgacga ccaaggagat ctcccacag acccagcacc
2041 agggaaatgg tccggaat gacagctcag ccccagcca tctgccgacc cccccacccc
2101 gccctaatgg gccaggcggc aggggttgac aggtagggga gatgggctct gagactataa
2161 agcagcggg ggcccagcag ccctcagccc tccaggacag gctgcatcag aagaggccat
2221 caagcaggtc tgttccaagg gcctttgcgt caggtgggct cagggttcca ggggtgtgg
2281 accccagggc ccagctctgc agcagggagg acgtggctgg gctcgtgaag catgtggggg
2341 tgagcccagg ggcccagg cagggcacct ggcttcagc ctgctcagc cctgctgtc
2401 tcccagatca ctgtcctct gccatggccc tgtgatgag cctcctgcc ctgctggcgc
2461 tgctggccct ctggggacct gaccagccg cagccttgt gaaccaacac ctgtgctgct
2521 cacacctgtt ggaagctctc tacctagtgt gggggaac aggttctc tacacacca
2581 agaccccg ggaggcag gacctgcag gtgagccaac cgccattgc tgccttggc
2641 cgccccagc caccctctgc tccctggcgt cccaccagc atgggcagaa gggggcagga
2701 ggctgccacc cagcaggggg tcaggtgac ttttttaaaa agaagtctc ttggtcacgt
2761 cctaaaagt accagctccc tgtggcccag tcagaatctc agcctgagga cgggttggc
2821 ttcggcagcc ccgagataca tcagaggtg ggcacgctc tccctccact cgccctcaa
2881 acaaatgccc cgcagcccat ttctccacc tcatttgatg accgcagatt caagtgtttt
2941 gttaaagtaa gtctgggtg acctggggct acagggctgc ccacgctgc tgcctctggg
3001 cgaacacccc atcacgccc gaggaggcgt tggctgctg cctgagtggt ccagacccc
3061 gtcgccagcc tcacggccc tccatagtea ggagatggg aagatgctg ggacagccc
3121 tggggagaag tactgggatc acctgttcag gctcccactg tgacgctgcc ccggggcggg
3181 ggaaggagg gggacatgtg ggcgttggg cctgtaggtc cacaccagt gtgggtgacc
3241 ctccctctaa cctgggtcca gcccgctgg agatgggtg gagtgcgacc tagggctggc
3301 gggcagggcg gcactgtgtc tccctgactg tgcctcctg tgcctctg cctgcgctg
3361 gttccggaac ctgctctgog cggcacgtcc tggcagtggt gcaggtggg ctgggcccgg
3421 gccctgtgag aggcagcctg cagcccttgg cctggaggg cctcctgag gtcctgcca
3481 ttgtggaaca atgctgtacc agcatctgct cctctacca gctggagaac tactgcaact
3541 agacgcagcc tgcaggcagc cccacacccg ccgctcctg caccgagaga gatggaataa
3601 agccctgtaa ccagccctgc tgtgcctct gtgtgtctt ggggccctg gccaaagccc
3661 acttcccggc actgttgtga gccctccca gctctctcca cgtctctggt gtgccacag
3721 gtgccaacgc cggccaggcc cagcatgag tggctctccc caaagcggcc atgctctgt
3781 gctgctgtc gcccccaccc tgtggctcag ggtccagtat gggagcttc ggggtctctg
3841 aggggccagg gatgtgggg ccactgagaa gtgactctt gttcagtagc tctggactct
3901 tggagtcccc agagacctg ttcaggaaag ggaatgagaa cattccagca attttcccc
3961 cacctagccc tcccaggtc ttttttaga gttattctg atggagtccc tgtggaggga
4021 ggaggctggg ctgaggagg gggtnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
4081 nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
4141 nnnctcag ggaggagccc ggggtgggg tacggaggcc tctgcacatc ttagagtaa
4201 acaagcagga gaggctgggt cgggtggctc atgcctataa tccagcact ttagggct
4261 gaggcgggca gatcacctga ggtcgggagt tcaagaccag cctgaccaac agggagaaac
4321 cccatcttta ctaaaactac aaaattagct ggggtgtgtg gcacatgct gtaatcccag
4381 atattcggga ggctgaggca ggagaatcgc ttgaacctg gaagcagagg ttgcctgag
4441 ccgagatggc accttgacac tccagcctg gcaacgagag cgaactccg tctcaaaaaa
4501 acaaaaaaaa aaaaatcaaa acaatcaaaa aaacaagcag gaggggtctc gaggtgctg
4561 caaccccag gtacaatcog tggccctgag gccatcaca ggaaggggt ctttgagct
4621 ctttcaacc ccagcccagc atccaaggaa gccaggggca gggagaaacc tcagctgac
4681 catcagagct cagaacagag aaggcagaaa ttagcaggga gtggggctg ggaggcttc
4741 tagaagagct gtctcccgc ttgctggcac tgaggcctg aggatgggtc catactgggc
4801 cccactgccc agggatgag atccggcca ctgctgaaat ctgtgctcct ggagcctccc
4861 tctgttcat gggccacagg ctgtgaaaac ccagagctc tcccaggcag caagtgtttg
4921 tttgttttt gttgtttgc ttgtttgtt tttgagagtc tgcctgca

Figura 14. Secuencia de insulina de Homo sapiens. GenBank: AH002844.2. Tomada del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2016), de: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1036032746?report=genbank&log\\$=nucleotide&blast_rank=1&RID=MAEA9J4W013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1036032746?report=genbank&log$=nucleotide&blast_rank=1&RID=MAEA9J4W013). La fecha que se señala es 10 de junio 2016.

El gen de la insulina codifica para un sólo péptido conocido como preproinsulina que contiene la información para la cadena A, B y C de la insulina, así como la secuencia señal (Bell, *et al.*, 1980; NCBI, 2016).

Los pasos que intervienen en la conversión de la información codificada en el gen de la insulina en su producto proteico inicia con la transcripción del gen en el núcleo celular lo que da como resultado un pre-mRNA, que es modificado mediante la adición en el extremo 5' de 7-metilguanosa “*capping*”, la escisión de los intrones y unión de exones, y la poliadenilación en el extremo 3' de la molécula inmadura. Los procesos anteriores producen un RNA mensajero maduro (mRNA) (*figura 15*), (Código de acceso BT006808 del NCBI), que codifica para la síntesis de la preproinsulina y que sale al citosol a través del complejo del poro nuclear.

```

1 atggccctgt ggatgagcct cctgccctg ctggcgtgc tggccctctg gggacctgac
61 ccagccgcag cctttgtgaa ccaacacctg tgcggtcac acctggtgga agctctctac
121 ctagtgtgcg gggaaacgagg cttctcttac acaccaaga cccgccggga ggcagaggac
181 ctgcaggtgg ggcaggtgga gctggcgagg ggcctggtg caggcagcct gcagccctg
241 gccctggagg ggtccctgca gaagcgtggc attgtggaac aatgctgtac cagcatctgc
301 tccctctacc agctggagaa ctactgcaac tag

```

Figura 15. Secuencia del RNA mensajero (mRNA) del gen de la insulina humana (longitud 333 nucleótidos). El codón de inicio (aug) y el codón de termino (uag), se marcan con rojo.

La traducción de la pre-proinsulina, se inicia en el citosol para continuar en el lumen del retículo endoplásmico (RE). La pre-proinsulina, al igual que otras proteínas que entran en la vía secretora, contiene un péptido señal hidrofóbico, en este caso de 24 aminoácidos (Met-Ala-Leu-Trp-Met-Arg-Leu-Leu-Pro-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Leu-Trp-Gly-Pro-Asp-Pro-Ala-Ala-Ala) (*figura 16*), el cual interacciona con la

partícula de reconocimiento de señal (SRP) y el receptor de la partícula de reconocimiento de la señal (SRP), de la membrana del RE.

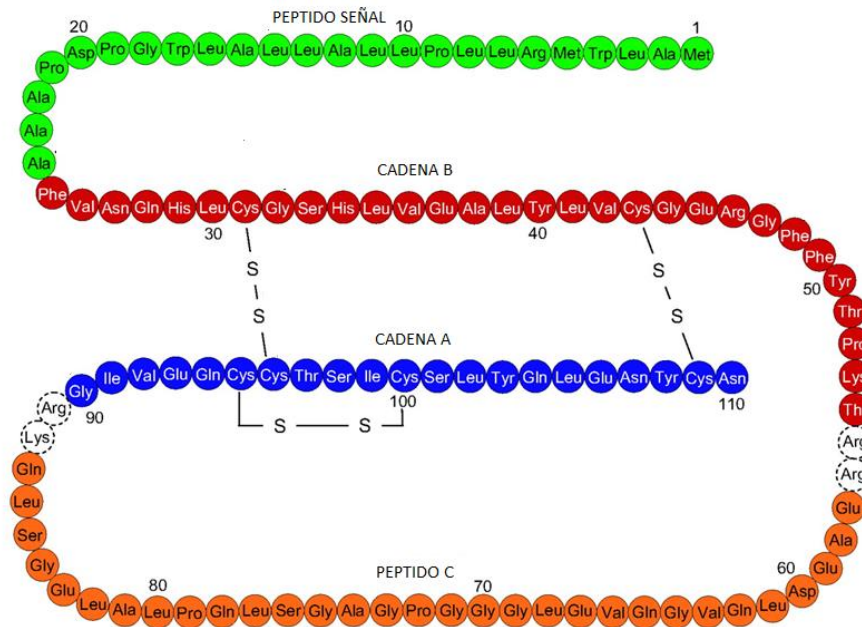


Figura 16. Diagrama que muestra la molécula de pre-proinsulina humana. Los residuos de aminoácidos del péptido señal se muestran en verde, la cadena B en rojo, el péptido C en anaranjado y la cadena A en azul. Diagrama modificado de Stoy y colaboradores (2007).

El péptido señal de la pre-proinsulina es cortado en el lumen del RE por una peptidasa señal localizada en el lumen del RE, convirtiéndose el péptido que se está produciendo en proinsulina (*figura 17*). Dentro del lumen del RE, la proinsulina se pliega por la formación de tres puentes disulfuro (dos entre el péptido A y C y uno en el péptido A), para tomar la forma nativa de su estructura terciaria, que constituye el precursor directo de la insulina. El péptido señal es degradado rápidamente en el ER, por lo que no es un producto final de secreción de las células β del páncreas (Weiss *et al.*, 2014).

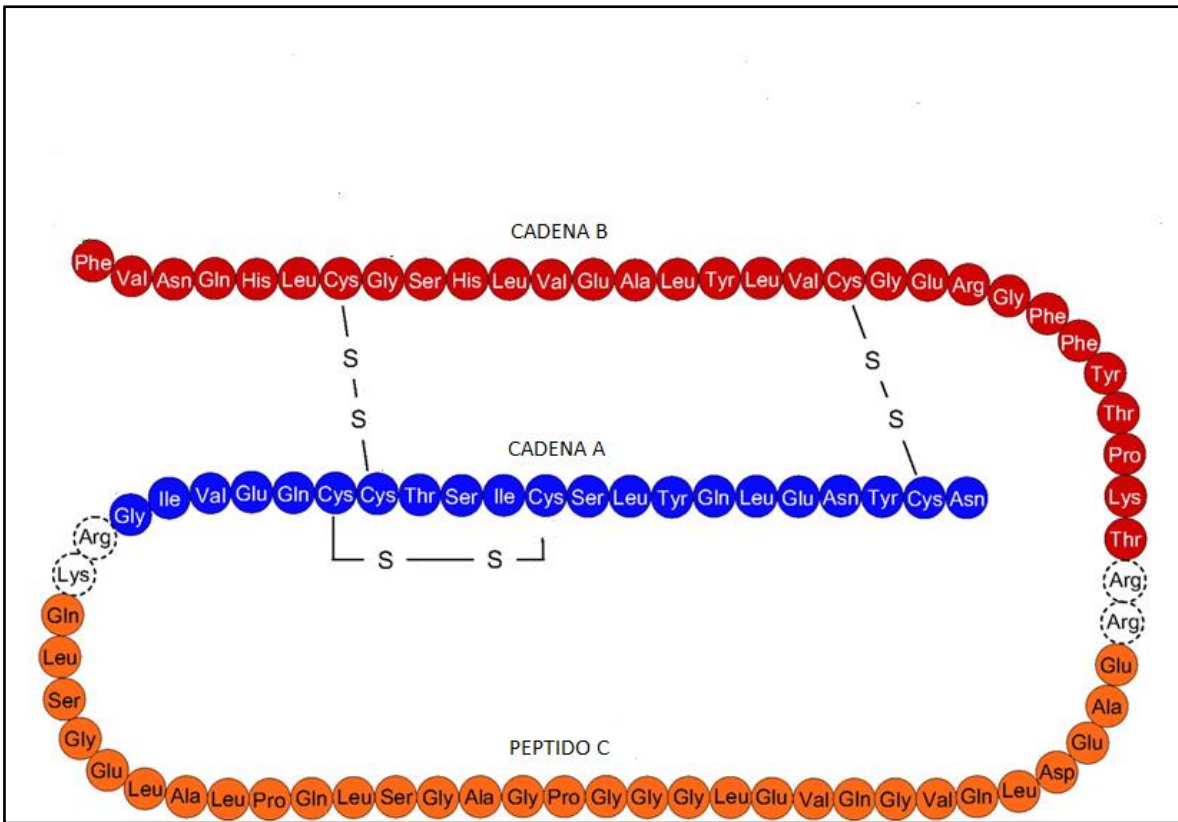


Figura 17. Estructura primaria de la proinsulina humana. Los residuos de aminoácidos de la cadena B se muestran en rojo, el péptido C en anaranjado y la cadena A en azul. Los círculos discontinuos indican los residuos básicos que son el sitio de corte para la conversión de proinsulina a insulina. Esquema modificado de Stoy y colaboradores (2007)

En los pasos siguientes del procesamiento de la proinsulina, ésta es transportada al aparato de Golgi en vesículas cubiertas de COPII. En Golgi, la insulina es empaquetada en gránulos de secreción y convertida en la forma nativa de la insulina, separada del péptido C. El proceso de conversión puede empezar en la red trans Golgi y continuar en las vacuolas de condensación también llamados gránulos inmaduros de secreción (Weiss *et al.*, 2014). La insulina es un heterodímero de dos cadenas: la cadena A de 21 residuos de aminoácidos y la cadena B de 30 residuos, unidas por dos puentes disulfuro a partir de los residuos (A7-B7 y A20-B19). Con un puente disulfuro al interior de la cadena A (uniendo A6-A11), figura 18.

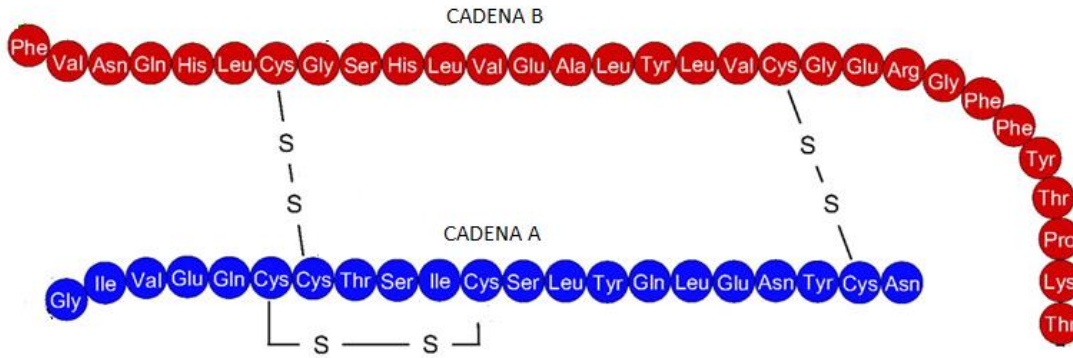


Figura 18. Estructura de la insulina humana. Está formada por dos cadenas, la cadena B en rojo con 21 aminoácidos y la cadena A en azul con 30 aminoácidos. Las dos cadenas están unidas por dos puentes disulfuro (—S—S) cada uno conectando a dos residuos de cisteína de las cadenas. Diagrama modificado de Stoy y colaboradores (2007).

La conversión de proinsulina a insulina ocurre a través de la acción conjunta de dos tipos de proteasas: las endoproteasas tipo tripsina, que cortan después de los residuos dibásicos a cada extremo del dominio C; y de las exopeptidasas. Se han identificado dos tipos de endoproteasas integrales de membrana dependientes de iones Ca^{2+} en los gránulos secretores: PC2 y PC1/3. PC2 corta en la Arg31-Arg32 (primeras dos posiciones del péptido C) y PC1/3 (dependiente de 0.1 mM Ca^{2+}) que corta predominantemente en los residuos de Lys64-Arg65 (que son las últimas dos posiciones del péptido C) (Weiss *et al.*, 2014).

Mediante estudios de inmunocitoquímica de las células β de los islotes pancreáticos se ha reportado la presencia de PC2 y PC1/3, en la red trans Golgi, con habilidad para convertir la proinsulina a insulina. La carboxilpeptidasa es otra exopeptidasa que remueve residuos básicos en el extremo carboxilo terminal después de los cortes por la PC2 y PC1/3 (Weiss *et al.*, 2014).

Los gránulos inmaduros de secreción se acidifican a través de una bomba de protones dependiente de ATP, para que la proinsulina pueda sufrir los rompimientos

proteolíticos específicos que dan como resultado la formación de insulina y la liberación del péptido C (Hou *et al.* 2009).

El detonante de la iniciación para la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática es la elevación del calcio intracelular, se piensa que el calcio interactúa con los miembros de las proteínas reguladoras de la fusión de membranas (sinaptogaminas y complexinas), las cuales a su vez interactúan con las proteínas de fusión Q- o t-SNAREs y SNAP₂₅ de la membrana plasmática, que se asocian con las proteínas R- o v-SNAREs de los gránulos de insulina, permitiendo la fusión de las membranas y la exocitosis de la insulina (Hou *et al.*, 2009).

La exocitosis de los gránulos de secreción de insulina dependiente de Calcio, es el principal mecanismo de secreción tanto a niveles basales de glucosa como a niveles elevados. Muy poco o ninguna secreción de la proinsulina ocurre del ER hacia la membrana plasmática por medio de vías no reguladas (Weiss *et al.*, 2014).

Para que se libere la insulina debe atravesar la membrana del gránulo y la membrana de la célula beta. La membrana del gránulo se fusiona con la membrana plasmática. De esta forma se permite la secreción, sin perder la continuidad de la membrana durante el proceso. Finalmente, la insulina atraviesa las paredes del endotelio capilar gracias a sus numerosos poros cubiertos por una finísima membrana. En sangre, se puede medir tanto la insulina como el péptido C, siendo la proinsulina prácticamente insignificante (Fernández, 1992).

En los gránulos de secreción maduros de las células β , PC2, PC1/3 y la carboxipeptidasa E, trabajan juntas para convertir la proinsulina en insulina madura, separando el péptido C. Se ha visto que la PC1/3 corta primero la proinsulina en el punto de unión con la cadena B, generando un intermediario que es cortado posteriormente por PC2 para producir insulina. Los gránulos de secreción de las células B, maduran en el citosol (Weiss *et al.*, 2014). Durante los procesos de maduración de los gránulos, la insulina es cristalizada con zinc y calcio en la forma de gránulos con un centro denso y proteínas de membrana que permiten que ocurran las diferentes vías de secreción de la insulina. Los recién formados gránulos

con centro denso forman ahora parte de dos reservorios intracelulares: el reservorio listo para liberarse (RRP) y el de reserva. Los cuales se piensa que son los responsables de los dos tipos de liberación de la insulina: uno a través de los gránulos de RRP que se asocian con la membrana plasmática y llevan a una liberación dependiente del calcio, contribuyendo a una primera fase de secreción de la insulina. Mientras, la segunda fase de secreción de la insulina requiere el tráfico de los gránulos de reserva a la membrana plasmática (Hou *et al.*, 2009), como se esquematiza en la *figura 19*.

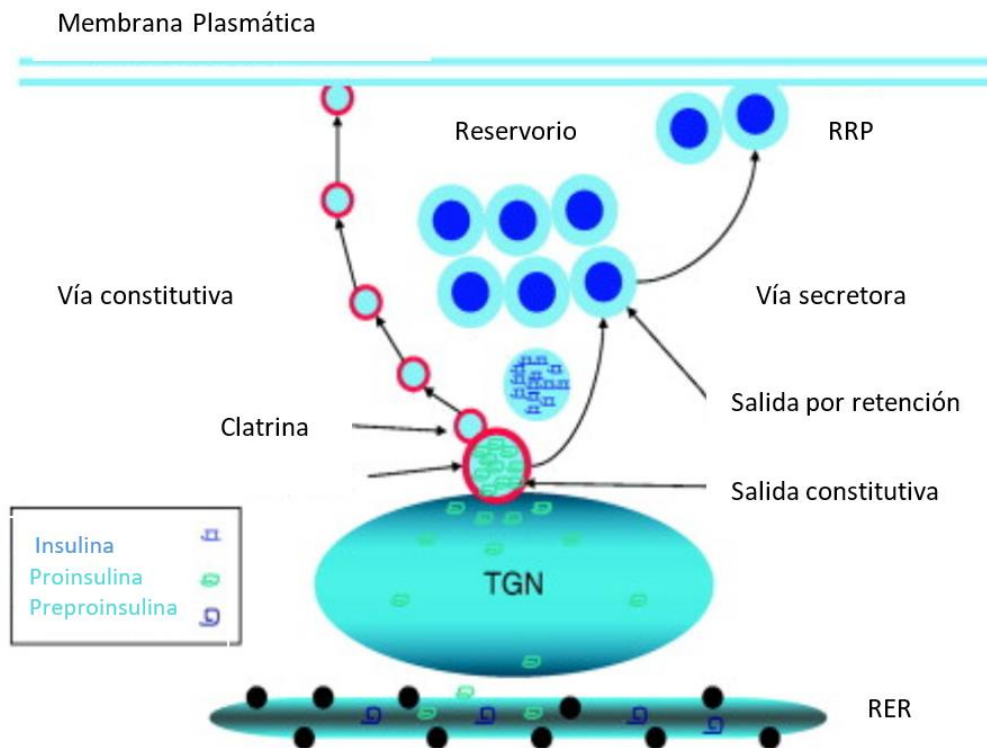


Figura 19. Rutas de secreción de la insulina. Tomado de Hou y colaboradores (2009).

Algunas enfermedades relacionadas con anomalías en la síntesis de insulina se pueden deber a mutaciones del gen de la insulina que causan hiperinsulinemia o hiperproinsulinemia, debido al remplazo de aminoácidos biológicamente importantes que llevan a la unión defectuosa entre la insulina y su receptor de membrana (Nishi y Najó, 2011).

Algunos tipos de diabetes MODY (maturity-onset diabetes of the young), que constituyen las diabetes hereditarias, se deben a mutaciones en genes relacionados con factores de transcripción, como es el caso de la mutación en el factor promotor de la insulina IPF-1. Las diabetes tipo MODY suponen sólo entre el 1 y el 5% de todos los tipos de diabetes (Barrio, 2007).

La secreción de insulina puede verse influenciada en algunos casos, por alteraciones en su síntesis, a nivel transcripcional, traduccional o postraduccional (en el Aparato de Golgi), así como por factores que influyen la liberación de los gránulos de secreción (Wilcox, 2005).

Por último, se cree que en la mayoría de los casos, la resistencia a la insulina, que presenta una prevalencia más alta en la población, se debe a defectos relacionados con las vías de señalización celular posteriores a la unión de la insulina con su receptor en la membrana citoplásmica, o a nivel de las proteínas de transporte de la glucosa como GLUT 4 presente en las células adiposas y musculares (Wilcox, 2005, p. 27). La figura 20 resume la biogénesis de la insulina de manera esquemática.

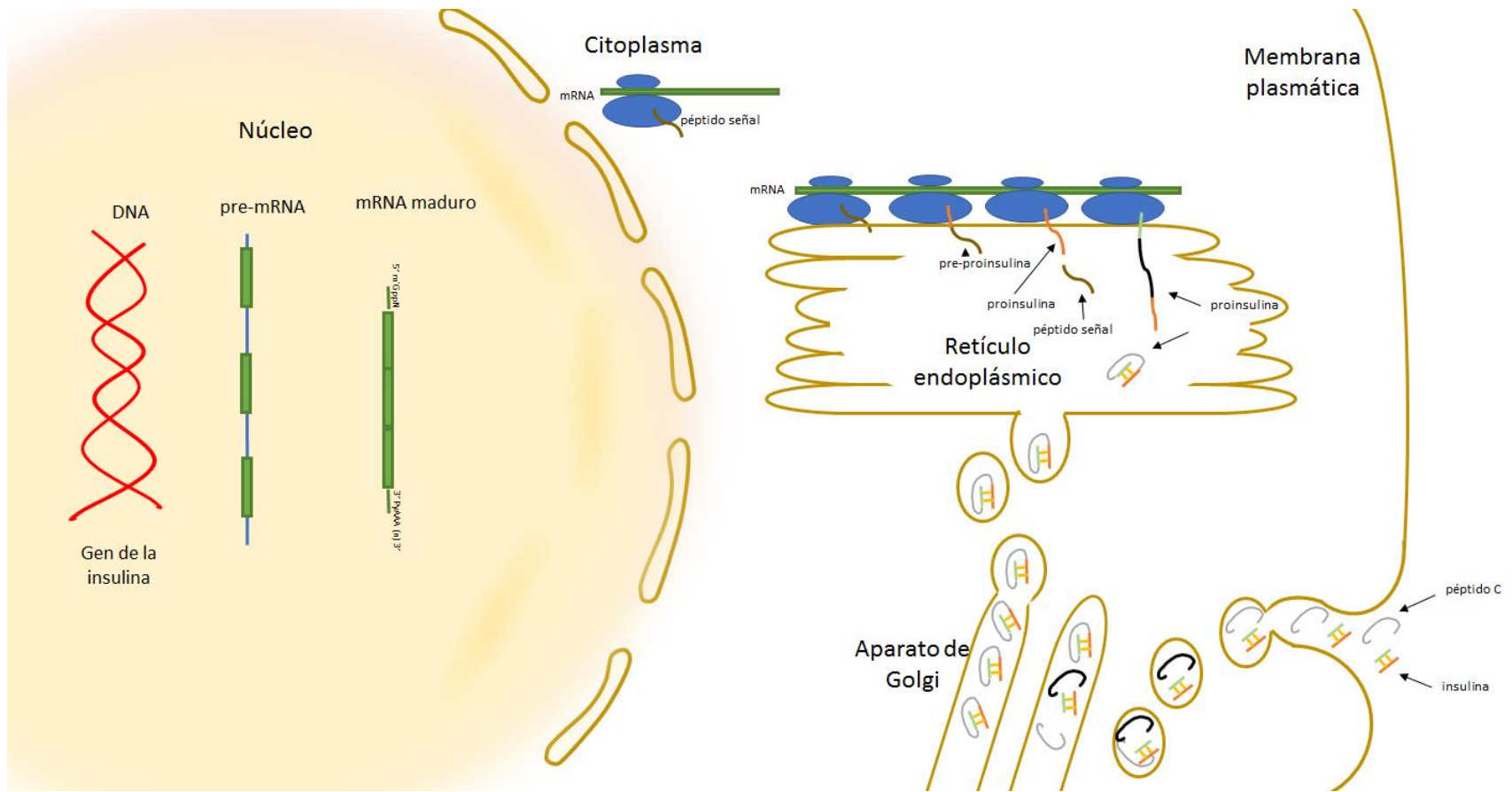


Figura 20. Biosíntesis y secreción de la insulina.

5. Discusión y conclusiones

Se lograron los objetivos inicialmente planteados, al obtenerse un documento que hace un recorrido por los procesos involucrados en la biogénesis de las proteínas de secreción así como por los compartimentos de las células eucariontes en los que este proceso ocurre (núcleo, retículo endoplásmico y aparato de Golgi). Lo anterior, con una visión integral y sistémica, tal como lo señala el enfoque disciplinario del programa de estudios de Biología del CCH.

Por otra parte, en el presente trabajo se investigó y obtuvo información sobre la biogénesis de la insulina; desde la secuencia del gen (indicándose la posición de sus intrones y exones), la secuencia del mRNA, su procesamiento en las células pancreáticas y su secreción. Este conocimiento será de utilidad para facilitar el aprendizaje de los alumnos de bachillerato ya que permitirá implementar una actividad en la que a partir de la secuencia del gen de la insulina, realicen la transcripción y posterior traducción del mRNA, con lo que se favorece su aprendizaje. Además, el ejemplo que se brinda sobre la biosíntesis de la insulina, permite tener un panorama general de la biogénesis de proteínas de secreción y de cómo este proceso se inicia en el núcleo celular con el proceso de transcripción, del gen de la insulina (DNA), activado por la presencia de concentraciones de glucosa elevadas, para producir un pre-mRNA que sufre diferentes procesos de maduración como el *capping*, *splicing*, y poliadenilación.

La expresión del gen de la insulina ocurre en el núcleo de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas para después salir a través del complejo de poro nuclear, hacia el citoplasma, donde inicia su traducción, la cual se detiene una vez que se ha sintetizado el péptido señal, que se une a la partícula de reconocimiento de la señal SRP, que dirige a toda la maquinaria traduccional hacia la superficie del retículo endoplásmico. La proteína que se va sintetizando se trasloca al lumen del retículo endoplásmico, donde se irá plegando y modificando hasta convertirse en proinsulina la cual es transportada mediante vesículas hasta el Aparato de Golgi, donde se forman los gránulos de secreción que van sufriendo procesos de

maduración y en los cuales se elimina de la proinsulina, el péptido C, y se convierte en insulina, la cual es enviada a través de vesículas hasta la membrana plasmática, para poder ser secretada.

Por todo lo anterior, el presente trabajo, constituye un valioso documento que podrá ser de apoyo a los docentes del bachillerato universitario, sobre todo para el abordaje e implementación de los nuevos programas de Biología que entrarán en vigor a partir del ciclo escolar 2017-2018 y en donde se integraron nuevos aprendizajes como el siguiente: *"El alumno relaciona el tránsito de moléculas con el sistema de endomembranas de la célula a partir de la información genética contenida en la célula"*. Sin duda el presente trabajo podrá servir como material de apoyo y fuente de un ejemplo concreto (síntesis de insulina) para la promoción de este aprendizaje en el aula.

6. Bibliografía

- Agredano, L., Segura, M.L., Zavala, G. & Jiménez, L.F. (2003). El Retículo Endoplásmico. En: L.F. Jiménez & H. Merchant. (Coord.), *Biología Celular y Molecular* (pp.411-444). México: Prentice Hall.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*. (6a ed.). New York: Garland Science.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Biología molecular de la célula*. (4a ed.). New York: Garland Science.
- Barrio, R. (2007). Diabetes monogénicas: enfoque diagnóstico y tipos más frecuentes. *Av Diabetol*, 23(5), 333-40.
- Bell, G.I., Pictet, R.L., Rutter, W.J., Cordell, B., Tischer, E. & Goodman, H.M. (1980). Sequence of the human insulin gene. *Nature*, 284 (5751), 26-32.
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), 153-166.
- Braakman, I., & Balleid, N. J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*, 80, 71-99.
- Carmody, S. R., & Wentz, S. R. (2009). mRNA nuclear export at a glance. *J Cell Sci*, 122(12), 1933-1937.
- Colegio de Ciencias y Humanidades. (2016). *Programas de estudio de Biología I a IV*. México: Autor.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258).

- Delaleau, M., & Borden, K. L. (2015). Multiple export mechanisms for mRNAs. *Cells*, 4(3), 452-473.
- De Matteis, M. A., & Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. *Nature reviews molecular cell biology*, 9(4), 273-284.
- Ellgaard, L., & Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews molecular cell biology*, 4(3), 181-191.
- Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. (2016). Atlas de histología. Recuperado el 8 de marzo de 2017, de http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas_hg/03_GIEndo/GIEIsIote_20etq.htm
- Fernández, J.A. (1992). *Fisiología humana*. México: Interamericana McGraw-Hill.
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006). SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature reviews molecular cell biology*, 7(9), 631-643.
- Genetics Home Reference (GHR). (2016). Insuline gene. NIH. National Library of Medicine. Recuperado el 19 de diciembre de 2016 de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/INS>
- Hou, J. C., Min, L., & Pessin, J. E. (2009). Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis. *Vitamins & Hormones*, 80, 473-506.
- Jiménez, L.F. & Sagura, L. (2010). *Biología celular del genoma*. México: UNAM, Facultad de Ciencias.
- Karp, G. (2014). *Biología celular y molecular*. (7a ed.). México: McGraw Hill.
- King, M. (2016). Themedicalbiochemistrypage.org. Recuperado el 5 de diciembre de 2016 de: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/protein-modifications-sp.php>
- Lehninger, A. & Cox, M. (2013). *Principles of biochemistry*. (6a ed.). Nueva York: McMillan.

- Lesk, A. M. (2010). *Introduction to protein science. Architecture, function and genomics*. (2a ed.). Nueva York: Oxford University Press
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M. (2016). *Molecular Cell Biology*. (7a ed.). Nueva York: W.H. Freeman and Company.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Appling, D.R. & Anthony-Cahill, S.J. (2013). *Bioquímica*. (4ª ed.). Madrid: Pearson Educación.
- Milo, R. & Phillips, R. (2012). *Cell Biology by the numbers*. Garland Science.
- National Center for Biotechnology Information (2017). Insuline gene Homo sapiens ID 3630. Recuperado el 17 de febrero de 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3630>
- Nature education. (2014). How Do Cells Decode Genetic Information into Functional Proteins. Recuperado el 13 de diciembre de 2016 de: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/ribosomes-transcription-and-translation-14120660>
- Nishi, M., & Nanjo, K. (2011). Insulin gene mutations and diabetes. *Journal of diabetes investigation*, 2(2), 92-100.
- Protein Data Bank (2016). An information Portal to Biological Macromolecular Structures. Recuperado el día 15 de diciembre de 2016 de <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=5MIZ>
- Researchgate (2008). Intrafamilial Variability of Early-Onset Diabetes due to an INS Mutation - Scientific Figure on ResearchGate. Recuperado el 8 de marzo de 2017 de: https://www.researchgate.net/publication/232278856_Intrafamilial_Variability_of_Early-Onset_Diabetes_due_to_an_INS_Mutation/figures?lo=1
- Schönheit, P., Buckel, W. y Martin, W. (2016). On the origin of heterotrophy. *Trends in microbiology*. 24 (1), Enero de 2016, 12-25.

- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(5), 363-375.
- Støy, J., Edghill, E. L., Flanagan, S. E., Ye, H., Paz, V. P., Pluzhnikov, A., ... & Lipton, R. B. (2007). Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(38), 15040-15044.
- Szul, T., & Sztul, E. (2011). COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology*, 26(5), 348-364.
- Weiss, M., Steiner, D. F., & Philipson, L. H. (2014). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, 26(2), 19-39.