

Las proteínas DING, una familia con intrigantes funciones celulares

DING proteins, a family with intriguing cellular functions

LIGIA BRITO-ARGÁEZ¹, MARTHA CHÍ-POOT¹, RITA UC-KU¹, JOSÉ AARÓN TAMAYO-SANSORES¹,
DIANELI MADERA-PIÑA¹, IGNACIO ISLAS-FLORES^{1,2}

Recibido: Enero 16, 2014

Aceptado: Febrero 2, 2014

Resumen

La familia de las proteínas DING recibe este nombre porque en especies filogenéticamente distantes, dichos aminoácidos están altamente conservados en el extremo N-terminal. Sus integrantes tienen un peso molecular ~40 kDa, están relacionadas con el metabolismo del fosfato, son secretadas y en su mayoría poseen actividad enzimática de fosfatasa. Inicialmente se creyó que las proteínas DING eran exclusivas de *Pseudomonas* sp., pero ahora se sabe que están distribuidas en los diferentes reinos biológicos. El descubrimiento de esta familia se fundamentó en la secuenciación de aminoácidos debido a que, con excepción de *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* y algunos otros procariontes, los genes que las codifican no han sido encontrados en las bases de genes de los eucariontes cuyos genomas han sido ya secuenciados. Las proteínas DING tienen funciones biológicas controversiales y por ello están siendo objeto de intensa investigación. En células animales se les ha asociado con la aparición de enfermedades como el cáncer de mama y la caquexia, pero también con la protección contra la arterioesclerosis y la litiasis. En vegetales, algunas proteínas DING muestran propiedades citotóxicas sobre células tumorales o de inhibición de la replicación del virus VIH-1. La evidencia biológica muestra que el mecanismo de acción de las proteínas DING puede ser variado y el resultado contrastante. Dada la potencial aplicación terapéutica de estas proteínas, en esta revisión se describen los hallazgos que se han realizando en esta familia debido a que previamente a su aplicación es necesario entender los mecanismos que regulan sus funciones.

Palabras clave: *Hypericum perforatum*, *Pseudomonas* sp., proteínas DING, anticancerígenos.

Abstract

The DING family of proteins called because in phylogenetically distant species, these amino acids are highly conserved in the N-terminal. The members have a molecular weight of ~40 kDa, are related to phosphate metabolism, are secreted and have mostly phosphatase enzymatic activity. Initially it was believed that DING proteins were unique to *Pseudomonas* sp., but is now known they are distributed in different biological kingdoms. The discovery of this family was based on the sequencing of amino acids because, with the exception of *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* and some other prokaryotes, the genes that encode them have not been found on the basis of genes of eukaryotes whose genomes have already been sequenced. The DING proteins have controversial biological functions and are therefore the subject of intense research. In animal cells they have been associated with the occurrence of diseases such as breast cancer and cachexia, but also to protection against atherosclerosis and gallstones. In plants, DING proteins exhibit some cytotoxic properties on tumor cells or on inhibiting the replication of HIV-1 virus. Biological evidence shows that the mechanism of action of the DING proteins can be varied and with contrasting results. Given the potential therapeutic application of these proteins, in this review, we described the findings that have been made in this family, since before its exploitation it is necessary to understand the mechanisms that regulate their functions.

Keywords: *Hypericum perforatum*; *Pseudomonas* sp., DING proteins, anticancer drugs.

¹ Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Calle 43 No. 130, colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México. 97200.

² Dirección electrónica del autor de correspondencia: islasign@cicy.mx.

Introducción

Las proteínas DING reciben este nombre debido a que se ha determinado que aún en especies filogenéticamente distantes, los aminoácidos, ácido aspártico (D), isoleucina (I), asparagina (N) y glicina (G), están altamente conservados en el extremo N-terminal de esta familia de proteínas (Berna *et al.*, 2008).

Las proteínas DING tienen un peso molecular promedio de 40 kDa, son secretadas y están relacionadas con el metabolismo del fosfato dado que lo unen con alta afinidad (Berna *et al.*, 2008; Darbinian *et al.*, 2009). Inicialmente se creyó que las proteínas DING eran exclusivas de *Pseudomonas* sp., pero evidencias posteriores han confirmado su existencia en los diferentes reinos biológicos (Lewis y Crowther, 2005; Berna *et al.*, 2009b; Bernier, 2013). En eucariontes, el descubrimiento y descripción de esta familia se fundamentó en la secuenciación directa de aminoácidos a partir de péptidos aislados o directamente de las proteínas de interés, debido a que, con excepción de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y algunos otros procariontes, los genes que las codifican no han sido encontrados en las bases de secuencias de genes de los organismos eucariontes cuyos genomas han sido ya secuenciados (Berna *et al.*, 2009b). Hasta la fecha, las únicas proteínas DING secuenciadas en su totalidad a nivel de aminoácidos son la proteína humana de unión a fosfatos (HPBP, por sus siglas en inglés) y pfluDING de *Pseudomonas fluorescens* (Ahn *et al.*, 2007; Diemer *et al.*, 2008).

Las proteínas DING han sido asociadas con diferentes actividades enzimáticas, siendo la más prominente la de fosfatasa (Darbinian *et al.*, 2009). La función de esta familia de proteínas es motivo de controversia y por ello están siendo objeto de intensa investigación. En células animales se les asocia con la aparición de enfermedades como la artritis reumatoide (Hain *et al.*, 1996), el cáncer de mama (Lamartiniere *et al.*, 1995) y la caquexia (Todorov *et al.*, 2007), pero también hay evidencias de que las proteínas DING participan en la protección

contra la arterioesclerosis (Morales *et al.*, 2006) y la litiasis (Kumar *et al.*, 2004). En vegetales se han descrito algunas proteínas DING con propiedades terapéuticas; por ejemplo, una proteína DING de 28 kDa aislada de *Helianthus tuberosum* fue citotóxica para células tumorales (Bookland *et al.*, 2012) y un polipéptido de 263 aminoácidos (denominado p27^{SJ}), aislado de la planta *Hypericum perforatum* inhibió la replicación del HIV-1 en células infectadas con el mismo (Perera *et al.*, 2008); cabe mencionar que p27^{SJ} es un fragmento de degradación de p38^{SJ}, el cual fue obtenido posteriormente (Amini *et al.*, 2009). En general, se conoce muy poco sobre las proteínas DING, pero la evidencia sugiere que los mecanismos de acción pueden ser variados y que el resultado puede ser totalmente contrastante, dado que en ciertos tipos celulares puede desencadenar enfermedad y en otros actuar como agente preventivo del desorden (Berna *et al.*, 2009a; Bernier, 2013). En nuestro grupo hemos estado trabajando con una fracción proteica de chile habanero que contiene proteínas DING y mantenemos un interés particular en las posibilidades terapéuticas y agroecológicas de dicha fracción; es por ello, que en este trabajo de revisión se describen los hallazgos que han llevado a la descripción de esta interesante familia de proteínas. Es necesario entender los mecanismos que regulan las funciones biológicas de la familia de proteínas DING para poder aprovechar su enorme potencial, tanto a nivel terapéutico como agroecológico.

Origen de las proteínas DING

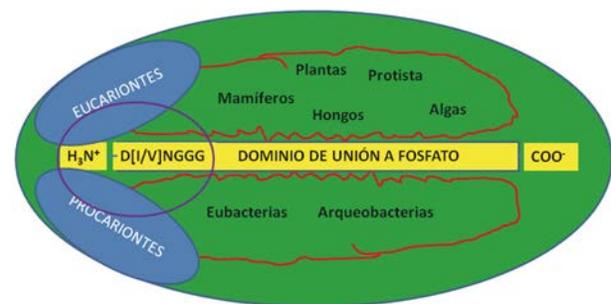
Las proteínas DING son una familia descubierta en la década de 1990 e inicialmente se creyó que eran exclusivas del reino

procarionte, particularmente de *Pseudomonas* sp. (Lewis y Crowther, 2005), y que su detección en organismos eucariontes, específicamente en plantas, era producto de contaminación, dada la coexistencia comensal o simbiótica entre dichos organismos (Lewis y Crowther, 2005). En la actualidad, esa hipótesis ha sido descartada, de tal forma que los hallazgos experimentales sustentan la ubicuidad de las proteínas DING en los diferentes reinos (Di Maro *et al.*, 2008; Berna *et al.*, 2009b; Bernier, 2013).

En procariontes se ha determinado que tanto las proteínas DING como los genes que las codifican están representados en cinco especies de *Pseudomonas* sp. y que incluyen *P. brassicacearum*, *P. extramaustralis* (Bernier, 2013), y las ya bien caracterizadas *Pseudomonas fluorescens* SBW-4 y *P. aeruginosa* PA14 (Lewis y Crowther, 2005; Ball *et al.*, 2012). Hallazgos alternos han mostrado la existencia de proteínas DING en otros procariontes como *Thermus thermophilus* (Pantazaki *et al.*, 2008), *Bacillus Mojavensis* (Haddar *et al.*, 2009), *Streptomyces mirabilis* (Yang *et al.*, 2012) y *Sulfolobus solfataricus* (Di Maro *et al.*, 2008). En contraste, el descubrimiento y descripción de las proteínas DING eucariontas se fundamentó en la secuenciación parcial de los aminoácidos del extremo N-terminal de las proteínas aisladas y a partir de la alta conservación de la secuencia D[I/V]NGGG es que se les asignó su nombre (Berna *et al.*, 2009b; Figura 1). En lo que respecta a los genes que codifican a las proteínas DING en eucariontes, éstos han sido difíciles de amplificar por PCR, ya sea a partir del DNA genómico o de DNA complementario (Lewis y Crowther, 2005; Berna *et al.*, 2009b). La búsqueda de los genes que codifican a estas proteínas en los genomas eucariontes ya secuenciados ha rendido escasos resultados, y sólo unos pocos fragmentos de cDNA o DNA han sido registrados en las bases públicas de genes (Darbinian-Sarkisian *et al.*, 2009; Bernier, 2013). La ausencia de las secuencias génicas para estas proteínas en las bases de genes parece estar asociada con la depuración de las

secuencias, dado que dichos genes al parecer tienen altos contenidos de los nucleótidos G y C o se encuentran en regiones que contienen altos porcentajes de G y C, y por ello se pudieron haber descartado como ADN silente (Sachdeva y Simm, 2011). El alto contenido de G y C de las secuencias de ADN codificantes de las proteínas DING, también puede ser uno de los factores que dificultan su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de los DNAs o cDNAs aislados de los diversos organismos de interés. Esta hipótesis ha encontrado sustento en el hecho de que recientemente, a partir del mRNA de las células CD4, se consiguió amplificar el cDNA codificante de la proteína X-DING-CD4 mediante PCR, gracias a una estrategia novedosa de anillamiento ultra rápido de DNA desnaturalizado en cadenas lineales de poliacrilamida (Sachdeva y Simm, 2011).

Figura 1. Esquematización de los diferentes reinos donde se ha descrito la presencia de proteínas DING. La barra intermedia representa la secuencia de aminoácidos conservados en las proteínas DING, tanto de procariontes como de eucariontes. La secuencia de aminoácidos D[I/V]NGGG en el extremo amino terminal de la proteína y la región de unión a fosfatos localizada entre los dos dominios globulares. Se cree que cercano al extremo carboxilo (CO) se encuentra(n) el(os) aminoácido(s) responsables de la capacidad para inhibir la replicación del virus VIH-1, agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia humana.



Se ha descrito la secuenciación parcial de 52 proteínas de la familia DING; 20 son de origen animal, 11 se han obtenido de plantas, 16 provienen de procariontes, cuatro de hongos y una de algas (Berna *et al.*, 2008; Darbinian *et al.*, 2009; Bernier, 2013). La primera proteína DING que se describió se obtuvo de lipopartículas del plasma humano, y actualmente

se le conoce como HPBP (por sus siglas en inglés; Human Phosphate Binding Protein), además de que es la única proteína cuya secuencia de aminoácidos se ha obtenido en su totalidad (Diemer *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, se han obtenido secuencias parciales de aminoácidos para proteínas DING a partir de 11 especies de plantas (Cuadro 1); no obstante, la primera secuencia de una proteína DING de vegetales se obtuvo en un estudio proteómico de la pared celular del frijol francés (Robertson *et al.*, 1997); sin embargo, como en ese entonces la superfamilia de las proteínas DING aún no se conocía, la proteína secuenciada en frijol no pudo ser relacionada con ninguna clase de proteínas. Posteriormente, éstas fueron redescubiertas en plantas en un estudio sobre las proteínas parecidas a la germina (GLPs, por sus siglas en inglés Germin Like Proteins). En ese estudio, el gen de la germina AtGER3 de *Arabidopsis thaliana* fue sobreexpresado en plantas de tabaco; la proteína heteróloga de 23 kDa fue copurificada de manera estable con una proteína de 40 kDa. La secuenciación de los primeros 28 aminoácidos del extremo amino terminal y de varios péptidos internos, mostró claramente que la proteína de 40 kDa pertenecía a la superfamilia de las proteínas DING (Perera *et al.*, 2008). Hasta el momento ninguna de las proteínas DING aisladas de plantas ha sido secuenciada completamente; esto se debe a que todas se han aislado como productos de proteólisis (péptidos). La proteólisis parece ser producto de un proceso autoproteolítico, dado que en la secuencia de la proteína HPBP sólo se ha encontrado un péptido blanco para la proteasa Xa, un factor de coagulación (Morales *et al.*, 2006). No obstante, y contrario a lo que se pudiera esperar, aún como fragmentos peptídicos, las proteínas DING muestran una actividad biológica importante.

En procariontes, las proteínas DING tienen un peso molecular de 40 kDa y hasta la fecha no se conocen precursores proteicos de mayor peso molecular que les den origen. En

contraste, en eucariontes, i.e., plantas, mediante inmunoblots y electroforesis desnaturante se ha determinado que las proteínas DING provienen de precursores de mayor peso molecular, y que su desnaturalización por calor resulta en un polipéptido de 40 kDa (Perera *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Especies de plantas donde se ha detectado la presencia de proteínas DING. Modificado de Bernier (2013).

Especie	Origen de Proteína, DNA o cDNA	Actividad enzimática o función conocida	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fragmentos de DNA	No determinada	Bernier (2013)
<i>Brassica rapa</i>	Proteína de yemas florales	β -esterasa	Zhang <i>et al.</i> (2010)
<i>Brassica oleracea</i>	Proteína de Inflorescencia	Parte del complejo de ribonucleoproteínas	Samaha <i>et al.</i> (2010)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Proteína extraída de suspensiones celulares	Proteína de pared celular	Robertson <i>et al.</i> (1997)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Proteína de hojas	Ligando de la proteína parecida a germina	Perera <i>et al.</i> (2008)
<i>Ipomoea batatas</i>	Proteína de retoños	No determinada	Bernier (2013)
<i>Solanum tuberosum</i>	Proteína de tubérculo	No determinada	Bernier (2013)
<i>Triticum aestivum</i>	Proteína de Hojas	No determinada	Aviram y Rosenblat (2004)
<i>Hypericum perforatum</i>	Proteína extraída de callos celulares	Fosfatasa	Darbinian <i>et al.</i> (2009)
<i>Helianthus tuberosum</i>	Proteína de secreción de tubérculo	Toxicidad para células tumorales	Griffaut <i>et al.</i> (2007)
<i>Sesbania grandiflora</i>	Proteína de flor	Inhibidor de α -glucosidasa	Laladhas <i>et al.</i> (2010)
<i>Capsicum chinense</i>	Proteína de semilla	Fosfatasa	Datos no publicados

Estructura de las proteínas DING y características de su dominio de unión de fosfatos

Sólo dos estructuras de proteínas DING han sido resueltas a nivel de cristalografía, la proteína PfluDING (Ahn *et al.*, 2007; Moniot *et al.*, 2007; Liebschner *et al.*, 2009) y la proteína HPBP (Morales *et al.*, 2006). Dada la alta conservación encontrada mediante la superposición del arreglo estructural y de la

secuencia de aminoácidos de ambas proteínas, en la actualidad se acepta que la estructura de las proteínas DING se ha conservado a través del proceso evolutivo (Berna *et al.*, 2009b). Las proteínas DING tienen una estructura de pliegue alargado compuesta de dos dominios globulares adyacentes, entre los cuales se forma un pliegue en forma de canal. Cada dominio está formado por un núcleo central de aminoácidos en arreglos laminares de tipo β , dicho arreglo es flanqueado a su vez por arreglos de aminoácidos en α -hélice. Entre ambos arreglos hay establecido un enlace disulfuro, el cual en la proteína HPBP puede involucrar a las cisteínas C113-C158 o a C306-C359. Ambos dominios están interconectados por dos arreglos β -laminares antiparalelos que actúan como una bisagra. Los dos dominios forman una hendidura profunda en cuyo interior, con una elevada afinidad se asocia una molécula de fosfato. A dicha disposición estructural también se le conoce como «atrapamoscas de Venus» o «trampa de Venus». Es de resaltar que este arreglo estructural está presente en la familia de proteínas PstS (Felder *et al.*, 1999), así como en las seis que unen solutos (SBP, por sus siglas en inglés Solute Binding Proteins; Felder *et al.*, 1999).

Los análisis de la superposición estructural entre PfluDING y HPBP revelaron que las estructuras son tan parecidas que únicamente se pudieron detectar diferencias de 0.65 Å, en la comparación de 366 de sus carbonos alfa ($C\alpha$) y que cuando ambas se comparan con la estructura parcialmente dilucidada de PstS de *Escherichia coli*, ambas mantienen diferencias de sólo 1.88 Å en 276 de sus carbonos α . De hecho, las mayores diferencias entre las proteínas DING y PstS es la presencia de cuatro asas que sobresalen de los dominios globulares de las proteínas DING y los dos puentes disulfuro, los cuales están ausentes en PstS (Berna *et al.*, 2009b).

El análisis estructural reveló que en las proteínas DING el sitio de unión al fosfato se encuentra entre los dos dominios globulares, específicamente en la hendidura que se forma

entre ambos dominios. En dicha región se secuestra o captura un fosfato inorgánico, ya sea en forma libre o unido a moléculas organofosfatadas; la asociación de dicho ión induce importantes cambios conformacionales en la estructura de la proteína, pero aún se desconoce el significado biológico de tales cambios (Berna *et al.*, 2009a; Bernier, 2013). En la hendidura, el fosfato se encuentra estrechamente unido a la proteína a través de 12 puentes de hidrógeno establecidos con ocho residuos de aminoácidos, localizados en ambos lados de la hendidura. Los enlaces de hidrógeno más cortos (2.43 Å) involucran al átomo de oxígeno del fosfato [PO_4] y al carboxilato de una cadena lateral del ácido aspártico (Wang *et al.*, 1997; Leibschnner *et al.*, 2009). Los enlaces son de baja energía y son los únicos aceptores de hidrógeno en la hendidura de las proteínas DING. Aunque aún no se ha establecido de manera definitiva, se hipotetiza que el ácido aspártico 62 podría desempeñar una función clave en la especificidad de la unión del fosfato, puesto que sólo aceptaría especies protonadas de fosfato (Luecke y Quioco, 1990; Liebschnner *et al.*, 2009). Con respecto a su afinidad por el ligando, HPBP une al fosfato con una afinidad nanomolar (Morales *et al.*, 2006), mientras que PfluDING tiene una afinidad en el rango micromolar (Scott y Wu, 2005) y PstS tiene afinidades de entre 0.34 y 1 micromolar (Berna *et al.*, 2009a). Esta diferencia de afinidades apoya la hipótesis de que las proteínas DING, como proteínas extracelulares, transfieren el fosfato a las proteínas PstS, dado que estas últimas están unidas a la célula (Berna *et al.*, 2009a).

El estudio particular de la mecánica de movimiento del dominio «atrapamoscas de Venus», mostró que remover el fosfato de tal sitio no es una tarea fácil, pero que, si por mutagénesis se ocasionan cambios en los aminoácidos involucrados en la unión del fosfato (Wang *et al.*, 1994; Berna *et al.*, 2009b), entonces se puede obtener el dominio en su conformación abierta. En contraste, mientras el ligando se encuentra unido, la estructura

adopta una conformación cerrada (Felder *et al.*, 1999). Tal cambio conformacional indica que la modificación en la conformación abierta-cerrada es un aspecto común en la función bioquímica de las proteínas DING. La expresión heteróloga de una forma truncada de PfluDING (carente del carboxilo terminal) en la que el sitio de unión a fosfato (flytrap) está totalmente abierto, mostró que la proteína resultante tiene importante actividad biológica, debido a que estimula la proliferación de fibroblastos humanos, y que tal actividad se potencia cuando el sitio de unión a fosfato (flytrap) se encuentra abierto (Ahn *et al.*, 2007).

Actividades catalíticas de las proteínas DING

Con base en la homología de secuencia y la similitud de función, se sabe que en procariontes las proteínas DING forman parte de la superfamilia de proteínas que unen fosfato, y que incluye a: (i) las proteínas membranales o periplásmicas conocidas como PstS y que funcionan en coordinación con transportadores ABC, (ii) algunas fosfatasas alcalinas de bajo peso molecular solamente descritas en *Pseudomonas* y, (iii) las «verdaderas» proteínas DING, las cuales su extremo N-terminal inicia con la secuencia de aminoácidos DING y que originalmente se pensó estaban restringidas a *Pseudomonas* sp. (Berna *et al.*, 2008; Bernier, 2013). Las proteínas PstS y las fosfatasas alcalinas de bajo peso molecular son exclusivas de los organismos procariontes (Bernier, 2013), mientras que las proteínas DING bacterianas son una familia distinta, puesto que mantienen un parecido más estrecho con las proteínas DING purificadas de eucariontes.

Las proteínas DING en eucariontes han sido asociadas a diferentes funciones catalíticas (Darbinian *et al.*, 2009), la mayoría, si no es que todas ellas, de tipo hidrolítico, i.e. fosfatasas, fosfodiesterasas y nucleotidasas, proteasas y cutinasas (Tan y Worobec, 1993; Pantazaki *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2007; Bernier, 2013). En los procariontes existen evidencias que sugieren

que esta familia de proteínas tienen otras posibles funciones. En *Thermus thermophilus* se aisló una proteína DING, la cual posee actividades asociadas de fosfatasa alcalina, ATPasa y nucleasa (Pantazaki *et al.*, 2008). En *Sulfolobus solfataricus* se aisló una enzima tipo DING que posee actividad de poly-(ADP ribosa) polimerasa (Di Maro *et al.*, 2008).

Se ha especulado que algunas de las actividades observadas en dichas proteínas son el resultado de una actividad de esterasa no específica (Berna *et al.*, 2009b). No obstante tal diversidad de funciones enzimáticas descritas en las proteínas DING, la habilidad para unir y transportar fosfato es la característica común que comparten entre todas ellas (Liebschener *et al.*, 2009). Tal característica puede ser el resultado de la perfecta conservación del sitio de unión de fosfato, tal como ha sido revelado por los estudios de cristalografía (Bernier, 2013). La sorprendente diversidad de actividades enzimáticas observadas en las proteínas DING no tienen un precedente; sin embargo, esta característica puede ser explicada como el resultado de la formación de varios homo y hetero-oligómeros de las proteínas DING con otras proteínas, de esta forma, las proteínas DING podrían estar actuando como moléculas efectoras y reguladoras de las interacciones con otras enzimas. Esta propuesta se sustenta en la observación experimental que mostró que la paraoxonasa del plasma sanguíneo es estabilizada por HPBP (Rochu *et al.*, 2007; Bernier, 2013). Adicionalmente, las proteínas DING de eucariontes frecuentemente se encuentran como isoformas de diferente tamaño (Berna *et al.*, 2009a). Cada isoforma podría poseer actividades enzimáticas intrínsecas o modular las actividades de proteínas oligoméricas, tal como ocurre con las «microproteínas», las cuales actúan como supresores dominantes negativos de la función de complejos proteicos mayores o de factores de transcripción (Seo *et al.*, 2011; Staudt y Wenkel, 2011).

Importancia fisiológica de las proteínas DING y contradicciones acerca de su función

La presencia de las proteínas DING en humanos se asocia con el desarrollo de enfermedades como la artritis reumatoide, el cáncer de mama y la caquexia asociada al cáncer (Renault *et al.*, 2006; Berna *et al.*, 2009a); sin embargo, muy poca correlación se ha visto entre las propiedades catalíticas de las proteínas DING y la inducción de la enfermedad, debido a que el inicio de estas enfermedades es el resultado de varios desórdenes fisiológicos que resultan en complejas interacciones multifactoriales (Berna *et al.*, 2009a; Bernier, 2013). En contraste, se ha demostrado que la presencia de las proteínas DING protege a los humanos contra la arteriosclerosis, debido a que la proteína HPBP estabiliza a la proteína PON1, la cual es la protectora primaria contra la arteriosclerosis (Morales *et al.*, 2006; Bernier, 2013). En el desorden conocido como nefrolitiasis, la proteína DING, inhibidora de la adhesión a calcio (CAI, por sus siglas en inglés), se une de manera importante a los cristales de oxalato de calcio monohidratado, y con ello evita su adhesión a las paredes del epitelio de riñón y facilita su excreción en la orina (Kumar *et al.*, 2004).

En el caso de las proteínas DING descritas en plantas, recientemente se observó que los tubérculos heridos de *Helianthus tuberosum* excretan una proteína de 28 kDa con un amino terminal, relacionado a las proteínas DING y a la fosfatasa alcalina de *Pseudomonas* sp. Esta proteína se asocia estrechamente con una proteína de 18 kDa, la cual mostró actividad de superóxido dismutasa. En conjunto, ambas proteínas mostraron actividad citotóxica contra células tumorales de origen animal (Griffaut *et al.*, 2007).

El ejemplo más importante donde se ha demostrado el potencial terapéutico de las proteínas DING, se obtuvo con un fragmento de 263 aminoácidos denominado p27^{SJ} aislado a

partir de *Hypericum perforatum*, también conocida como hierba de San Juan (Darbinian-Sarkissian *et al.*, 2006). Dicho polipéptido inhibió la expresión génica, así como la replicación de células infectadas con HIV-1, células de glioblastoma y glioma (Henderson y Calame, 1997). La inhibición de la replicación se registró después de que p27^{SJ} interaccionó con el factor de transcripción C/EBP β , y lo mantuvo en el citoplasma celular, previniendo de esta forma la activación de los genes nucleares blanco de su regulación (Darbinian-Sarkissian *et al.*, 2006).

En pacientes de glioma, se ha visto que C/EBP β está desregulado. La inhibición de C/EBP β es consistente con las propiedades antiproliferativas de p27^{SJ} observadas en las células del glioblastoma. Las proteínas C/EBP β se requieren para la replicación del HIV-1 en macrófagos (Henderson y Calame, 1997). Por lo tanto, y con base en la inhibición del crecimiento de las células cancerígenas, así como de las células infectadas con el virus del HIV-1, se puede concluir que la proteína p27^{SJ} tiene un potencial terapéutico muy interesante para el tratamiento del HIV-1, particularmente en las primeras etapas de infección de este virus.

El modelado de la interacción entre la forma truncada p27^{SJ} y C/EBP β , mostró que el sitio de interacción entre ambas proteínas ocurre en el sitio de unión de fosfatos, lo que sugiere que la capacidad para modular la actividad transcripcional de estas proteínas está asociada con su capacidad de unión a fosfato (Darbinian-Sarkissian *et al.*, 2006). La secuenciación de aminoácidos de p27^{SJ} reveló que el polipéptido se deriva de la proteína CHP-10, la cual tiene una masa molecular de 39 kDa y un extremo amino terminal idéntico a las proteínas DING (Khalili y Sarkissian, 2003). A partir de la secuencia de aminoácidos, se diseñaron iniciadores de DNA con la intención de clonar el cDNA que codifica a la proteína completa. La clona más grande codifica un polipéptido de 27 kDa truncado en el extremo carboxilo terminal.

En otro estudio, la expresión heteróloga de una versión truncada de la proteína p27^{SJ} presentó actividad de fosfatasa y ésta abate el nivel de fosforilación de la ERK1/2. En consecuencia, Erk1/2 pierde capacidad para fosforilar sustratos ubicados corriente abajo en su ruta de transducción de señales; STAT3, CREB y la ciclina A se afectan de forma dramática. La modificación de las actividades catalíticas y/o regulatorias de dichas proteínas impacta de forma directa el ciclo celular, reduciendo la división celular (Darbinian *et al.*, 2009). En eucariontes, la proteína p27^{SJ} es la segunda caracterizada en la familia DING; su interacción con los factores de transcripción y su efecto sobre el ciclo celular, son los mecanismos mediante los cuales inhibe el crecimiento de ciertos tipos de células tumorales y abate la replicación viral (Darbinian *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante caracterizar bioquímicamente las actividades catalíticas y los mecanismos que regulan las funciones biológicas de otras proteínas DING.

En mamíferos es bien conocido que la ingesta frecuente de etanol causa muerte neuronal a través del estrés oxidativo y que tal evento produce serios daños físicos, cognitivos e intelectuales (Watts *et al.*, 2005). Es por ello que es necesario encontrar alternativas naturales que activen los mecanismos de defensa celulares que prevengan la oxidación de los componentes fundamentales de la célula. Es bien conocido que en los sistemas vegetales existe una amplia batería de compuestos, tanto del metabolismo primario como secundario, i.e., flavonoides, fenoles, glutatión, etc., mismos que pueden actuar en la prevención de los fenómenos de oxidación celular. En este sentido, Amini *et al.* (2009) describieron que una proteína DINGG denominada p38^{SJ}, obtenida de *Hypericum perforatum* protegió a las células neuronales contra el daño oxidativo causado por el abuso del alcohol, de tal forma que las proteínas DING podrían considerarse como una potencial alternativa para prevenir/reducir el daño celular causado por la producción celular excesiva de especies reactivas de oxígeno.

Durante varios años, nuestro grupo ha estado interesado en identificar y estudiar proteínas de origen vegetal con actividad biológica, y que puedan ser la base para el desarrollo de antimicrobianos naturales o de agentes con propiedades antitumorales y anticancerígenas (Islas-Flores *et al.*, 2005; Brito-Argáez *et al.*, 2009; Moguel-Salazar *et al.*, 2011). A partir de nuestro interés y del trabajo desarrollado en *Capsicum chinense* Jacq., aislamos una fracción proteica denominada G10P1.7.57 que contiene una proteína DING. La secuencia de aminoácidos para algunos de los péptidos de esta proteína ha sido determinada, y creemos que la caracterización bioquímica y molecular de la misma permitirá obtener información acerca de los mecanismos de regulación y de sus propiedades catalíticas. Además, esta información es importante para entender a las proteínas DING en su actividad antimicrobiana en *C. chinense*.

Perspectiva sobre las aplicaciones biotecnológicas potenciales de las proteínas DING

Los reportes recientes revelan la importancia biológica y el potencial biotecnológico de la familia de proteínas DING, pero debido al escaso conocimiento que aún se tiene sobre ellas, es que su estudio resulta de gran relevancia científica. Por ejemplo, en el mundo hay decesos frecuentes debido a desórdenes relacionados con el cáncer (Ferlay *et al.*, 2013), y aunque la tasa es variable y dependiente de factores tanto genéticos (Belenky *et al.*, 2003) como ambientales (Bray *et al.*, 2013), i.e., la localización geográfica de las ciudades, los grupos étnicos, la edad, las actividades industriales de las áreas y la alimentación, entre otras. Es claro también que la cura para tal desorden no radica en encontrar o diseñar un medicamento alopático único, porque en la aparición de los diferentes tipos de cáncer no parece haber un elemento común que actúe como gatillo y que a través de él se originen las células malignas. Además, los resultados obtenidos con las estrategias de cura

de tipo químico (quimioterapia) o radiológica (radioterapia), en muchas ocasiones tienen más efectos colaterales adversos en contraste con el beneficio. Por otra parte, el uso de compuestos naturales como agentes preventivos contra la aparición de cáncer es una práctica ampliamente extendida, usualmente por factores culturales (i.e., los asiáticos consumen altas cantidades de soya, la cual contiene altas concentraciones de isoflavonoides, compuestos que se ha visto inhiben la aparición de cáncer). La genisteína, uno de los isoflavonoides más abundantes en soya, se conoce que es inhibidor de las cinasas de tirosina, proteínas involucradas en la regulación de las rutas de señalización que transducen las señales mitogénicas mediadas por los factores de crecimiento (Yu *et al.*, 2013). Si bien las terapias preventivas atenuan la posibilidad de la aparición de cáncer, no hay garantía de que dicho desorden no aparecerá, de tal forma que la búsqueda de procedimientos alternos o complementarios para inhibir el desarrollo de la enfermedad son totalmente válidos.

Ciertos tipos de cáncer se presentan como consecuencia de infecciones virales (i.e., leucemias, y osteosarcomas), por lo que es deseable encontrar estrategias que prevengan la infección viral y en caso de no ser posible, entonces de implementar estrategias para contener la replicación viral. En este sentido, las proteínas DING representan una alternativa biotecnológica interesante, particularmente la proteína de origen vegetal denominada como p27^{SJ}, dado que se ha demostrado su habilidad para interactuar físicamente o funcionalmente con varias proteínas regulatorias, incluyendo C/EBP β y la RNA polimerasa II, y con ello modular la expresión de los genes virales y celulares (Perera *et al.*, 2008). Mediante construcciones moleculares que incluían la secuencia parcial de cDNA de p27^{SJ} y su sobreexpresión en células animales, se encontró que p27^{SJ} o p38^{SJ} modifican la señalización y la proliferación celular a través de la hipofosforilación de la cinasa ERK1/2 (Darbinian *et al.*, 2009; Bookland *et al.*, 2012). Estudios en la línea celular maligna

U-87MG (glioma humano) demostraron la habilidad de p27^{SJ} para inhibir la síntesis de la ciclina A a través de la modulación de ERK1/2 y, por lo tanto, inhibir la progresión del ciclo celular en la fase S y G2 (Darbinian *et al.*, 2009; Bookland *et al.*, 2012).

Los gliomas malignos son tumores cerebrales altamente agresivos con una pobre prognosis dado que son altamente invasivos, frecuentemente incurables y resistentes a la quimioterapia y la radioterapia (Bookland *et al.*, 2012). Por lo tanto, se requiere de nuevas terapias cuyo blanco sean las rutas involucradas en el crecimiento y sobrevivencia de las células tumorales, con el fin de tratar esta clase de tumores cerebrales. Estudios previos (Darbinian *et al.*, 2009) revelaron que los receptores del factor de crecimiento epidérmico y las cinasas reguladas por factores extracelulares (ERKs), las cuales están involucradas en la inducción de la proliferación celular están activadas en los tipos de glioma más agresivos (i.e. glioblastoma multiforme o GBM); de hecho, GBMs con niveles aumentados de actividad de ERK, exhiben fenotipos más agresivos que otros con actividades moderadas de ERKs, resaltando con ello la importancia de ERKs y su actividad de cinasa en el desarrollo y progresión de esa clase de tumores (Bookland *et al.*, 2012). La evaluación del efecto de p38^{SJ} en el crecimiento de las líneas celulares malignas de glioma T98G y U-87MG, mostró que p38^{SJ}, a través de su actividad de fosfatasa, afectó el estado de fosforilación de varias cinasas importantes en la modulación de las rutas del crecimiento celular y la proliferación, y que con ello redujo la viabilidad del glioma y detuvo la progresión del ciclo celular en G0/G1. La inhibición del crecimiento resultó de la disminución de la actividad de proteínas clave del ciclo celular, incluyendo a la ciclina E, Cdc2 y E2F-1. Esos resultados sugieren que p38^{SJ} puede considerarse como un potencial candidato para el desarrollo de un agente terapéutico para el tratamiento directo de los gliomas malignos, o como un radiosensibilizador previo a la aplicación de la radioterapia (Bookland *et al.*, 2012).

En el caso de las infecciones con el virus HIV-1, agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia humana, el tratamiento de esta infección viral se realiza mediante la combinación de terapia anti-retroviral (cART, por sus siglas en inglés), medicamentos que inhiben la entrada del virus a nuevas células o que inhiben la retrotranscripción del genoma viral, impidiendo así su integración al genoma del hospedante, o medicamentos que impiden la maduración de las proteínas virales (Suh *et al.*, 2013). El tratamiento en conjunto es efectivo en reducir la carga viral, pero no consigue la erradicación total del virus, por lo que la posibilidad de mutación viral y la adquisición de resistencia al tratamiento continúan siendo una preocupación y un reto de salud (Colgrove y Japour, 1999; Shafer *et al.*, 2008; Domingo y Vidal, 2011; Suh *et al.*, 2013). Es en este sentido que las proteínas DING podrían ser empleadas como una estrategia complementaria de curación debido a su capacidad para actuar como reguladores de la transcripción en humanos (Suh *et al.*, 2013) y en particular como proteínas que inhiben la replicación del VIH-1 a través del secuestro de los factores de transcripción esenciales para la retrotranscripción viral. Se están realizando esfuerzos sustanciales para el desarrollo de p27^{SJ} y p38^{SJ} recombinantes para destinarlos al combate del VIH-1 principalmente, pero las proteínas resultantes, ya sea truncadas o en forma de péptidos, podrían también ser activos contra los glioblastomas y otros tipos de tumores (Bookland *et al.*, 2012).

Por último, la comparación estructural *in silico* de las proteínas DING de procariontes PA14DING y pfluDING, mostró que ambas tienen un 74% de identidad a nivel de secuencia primaria de aminoácidos y que, sin embargo, a nivel de estructura terciaria sólo se pueden detectar unas pocas diferencias a nivel de tres asas externas, denominadas a, b y c, respectivamente. Tales diferencias son en solo 5, 6 y 15 aminoácidos, de acuerdo al orden mencionado para las asas. Esas pequeñas diferencias de aminoácidos parecen ser

fundamentales para la regulación de la actividad inhibitoria de la transcripción del VIH-1, de tal forma que es posible sugerir que esas pequeñas regiones de péptidos podrían ser utilizadas como farmacóforos dirigidos al tratamiento de la infección por VIH-1 o de tumores, y que debido a su pequeño tamaño, tales péptidos podrían tener una mejor cinética de absorción y de estabilidad, dado que serían poco susceptibles a la degradación por proteasas (Suh *et al.*, 2013).

En lo que respecta a la proteína DING obtenida a partir de chile habanero (*C. chinense*), esta también ha mostrado actividad de fosfatasa y de manera interesante tiene actividad citotóxica contra microorganismos bacterianos, fúngicos y líneas humanas de tipo tumoral, pero aún falta explorar su selectividad y su potencia (datos no mostrados). Si bien estos hallazgos pueden definirse como preliminares, también permiten ver que *C. chinense* podría ser una fuente aún no explorada para la obtención de esta familia de proteínas, cuya posibilidad de aplicación más clara es el área médica, pero que podría tener aristas importantes orientadas a la protección agrícola, un área a la que poca atención se ha prestado. Es claro que las plantas también son blanco de agentes fitopatógenos, i.e., virus, bacterias, hongos, etc., mismos que las diezman, ya sea de forma simultánea o separada.

Se conoce que durante el proceso infeccioso los patógenos desarrollan estrategias generales de colonización que pueden ser comunes, tanto en la infección de células animales como vegetales, i.e., la inserción de virus de DNA o retrovirus en el genoma, la colonización fúngica y la infección bacteriana (Haldar *et al.*, 2006). Bajo esta perspectiva, las proteínas DING también podrían ser utilizadas para el combate de dichos fitopatógenos. Es por ello que en el grupo de trabajo, además de estudiar las propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antitumorales de la proteína DING, también hemos estado intentando clonar el cDNA que en chile habanero codifica a la proteína DING de esta especie. Si bien, los resultados de la

clonación no han sido los esperados, sí creemos que la expresión en sistemas heterólogos, i.e., levadura, células de insecto o bacteria, del cDNA que codifica a la proteína DING será benéfica, dado que permitirá obtenerla en mayor cantidad con el objetivo de realizar los estudios pertinentes que permitan demostrar su potencial como biocidas agrícolas. Es claro que la clonación y la expresión heteróloga de la proteína DING de chile habanero o de cualquier planta es un reto intelectual y técnico, pero que la expresión heteróloga de este tipo de proteínas, por su potencial médico y biotecnológico, representa una posibilidad estratégica de explotación que no debe dejarse de lado.

Agradecimientos

Se agradece a CONACYT por el financiamiento al proyecto Núm. CB 2010/157135 y del cual este trabajo forma parte.

Literatura citada

- AHN, S., S. Moniot, M. Elias, E. Chabriere, D. Kim, K. Scott. 2007. Structure-function relationships in bacterial DING protein. *FEBS Letters* 581: 3455-3460.
- AMINI, S., N. Merabova, K. Khalili, N. Darbinian. 2009. P38S_J, a novel DINGG protein protects neuronal cells from alcohol induced injury and death. *Journal of Cellular Physiology* 221: 499-504.
- AVIRAM, M., M. Rosenblat. 2004. Paraoxonase 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology and Medicine* 37:1304-1316.
- BALL, G., V. Viarre, S. Garvis, R. Voulhoux, A. Filloux. 2012. Type II-dependent secretion of a *Pseudomonas aeruginosa* DING protein. *Research in Microbiology* 163: 457-469.
- BELENKY, M., J. Prasain, H. Kim, S. Barnes. 2003. DING a genistein target in human breast cancer: a protein without a gene. *Journal of Nutrition* 133: 2497S-2501S.
- BERNA, A., F. Bernier, E. Chabriere, M. Elias, K. Scott, A. Suh. 2009a. For whom the bell tolls? DING proteins in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 2205-2218.
- BERNA, A., F. Bernier, E. Chabriere, T. Perera, K. Scott. 2008. DING proteins: novel members of a prokaryotic phosphate-binding protein superfamily which extends into the eukaryotic kingdom. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40: 170-175.
- BERNA, A., K. Scott, E. Chabriere, F. Bernier. 2009b. The DING family of proteins: ubiquitous in eukaryotes, but where are the genes? *BioEssays* 31: 570-580.
- BERNIER, F. 2013. DING proteins: numerous functions, elusive genes, a potential for health. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70: 3045-3056.
- BOOKLAND, M., N. Darbinian, M. Weaver, S. Amini, K. Khalili. 2012. Growth inhibition of malignant glioblastoma by DING protein. *Journal of Neuro-oncology* 107: 247-256.
- BUSH, D., H. Fritz, C. Knight, J. Mount, K. Scott. 1998. A hirudin-sensitive, growth-related proteinase from human fibroblast. *Journal of Biological Chemistry* 379: 225-229.
- BRAY, F., J. S. Ren, E. Masuyer, J. Ferlay. 2013. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer* 132: 1133-1145.
- BRITO-ARGÁEZ, L., F. Moguel-Salazar, F. Zamudio, T. González-Estrada, and I. Islas-Flores. 2009. Characterization of a *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity. *Asian Journal of Biochemistry* 4(3): 77-87.
- BOOKLAND, M. J., N. Darbinian, M. Weaver, S. Amini, K. Khalili. 2012. Growth inhibition of Malignant glioblastoma by DING protein. *Journal of Neuro-oncology* 107: 247-256.
- CHEN, Z., C. F. Franco, R. P. Baptista, J. M. Cabral, A. V. Coelho, C. J. Rodrigues, E. P. Melo. 2007. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 1306-1313.
- COLGROVE, R., A. Japour. 1999. A combinatorial ledge: reverse transcriptase fidelity, total body viral burden, and the implications of multiple-drug HIV therapy for the evolution of antiviral resistance. *Antiviral Research* 41: 45-56.
- DARBINIAN, N., M. Czernik, A. Darbinian, M. Elias, E. Chabriere, S. Bonasu, K. Khalili, and S. Amini. 2009. Evidence for phosphatase activity of p27^{S_J} and its impact on the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry* 107: 400-407.
- DARBINIAN-SARKISSIAN, N. A. Darbinian, J. Otte, S. Radhakrishnan, B. E. Sawaya, A. Arzumanyan, G. Chispitsyna, Y. Popov, J. Rappaport, S. Amini, K. Khalili. 2006. P27^{S_J}, a novel protein in St John's Wort, that suppresses expression of HIV-1 genome. *Gene Therapy* 13: 288-295.
- DI MARO, A., A. De Maio, S. Castellano, A. Parente, B. Farina, M. R. Faraone-Menella. 2008. The ADP-ribosylating thermozyyme from *Sulfolobus solfataricus* is a DING protein. *Journal of Biological Chemistry* 390: 27-30.
- DIEMER, H., M. Elias, F. Renault, D. Rochu, C. Contreras-Martel, C. Schaeffer, A. Van Dorsselaer, E. Chabriere. 2008. Tandem use of X-ray crystallography and mass spectrometry to obtain ab initio the complete and exact amino acids sequence of HPBP, a human 38-kDa apolipoprotein. *Protein Structure Function Bioinformatics* 71: 1708-1720.
- DOMINGO, P., F. Vidal. 2011. Combination antiretroviral therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 12: 995-998.
- FELDER, C. B., R. C. Gaul, A. Y. Lee, H. P. Merkle, W. Sadee. 1999. The venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci* 1: E2.
- FERLAY, J., I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, M. D. Parkin, D. Forman, F. Bray. 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase No. 11 (internet). Lyon, France: *International Agency for Research on Cancer*. Available from <http://globocan.iarc.fr>
- GRIFFAUT, B., E. Debiton, J. C. Madelmont, J. C. Mauriziz, G. Ledoigt. 2007. Stressed *Jerusalem artichoke* tubers (*Helianthus tuberosus* L.) excrete a protein fraction with specific cytotoxicity on plant and animal tumour cell. *Biochimica et Biophysica Acta* 1170: 1324-1330.
- HADDAR, A., A. Bougateg, R. Agrebi, A. Sellami-Kamoun, M. Nasri. 2009. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. *Process Biochemistry* 44: 29-35.

- HAIN, N. A., B. Stuhlmüller, G. R. Hahn, J. R. Kalden, R. Deutzmann, G. R. Burnester. 1996. Biochemical characterization and microsequencing of a 205-kDa synovial protein stimulatory for T cells and reactive with rheumatoid factor containing sera. *Journal of immunology* 157: 1773-17780.
- HALDAR, K., S. Kamoun, N. L. Hiller, S. Bhattacharje, C. Van Ooij. 2006. Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology* 4: 922-931.
- HENDERSON, A.J., K. L. Calame. 1997. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) sites are required for HIV-1 replication in primary macrophages but not CD4(+) T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 8714-8719.
- ISLAS-FLORES, I., Y. Minero García, y C. James. 2005. Proteínas contra las infecciones de las plantas. *Ciencia* 56: 64-74.
- KHALILI, K., N. Sarkissian. 2003. Antiproliferative protein from *Hypericum perforatum* and nucleic acids encoding the same. US patent 60/376,996.
- KUMAR, V., S. Yu, G. Farrell, F. G. Toback, J. C. Lieske. 2004. Renal epithelial cells constitutively produce a protein that blocks adhesion of crystals to their surface. *American Journal of Physiology* 287: F373-F383.
- LALADHAS, K. P., V. T. Cheriyan, V. T. Puliappadamba, S. V. Bava, R. G. Unnithan, P. L. Vijayammal, R. J. Anto. 2010. A novel protein fraction from *Sesbania grandiflora* shows potential anticancer and chemopreventive efficacy, *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14: 636-646.
- LAMARTINIERE, C. A., J. B. Moore, N. M. Brown, R. Thompson, M. J. Hardin, S. Barnes. 1995. Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 16: 2833-2840.
- LEWIS, P. A., and D. Crowther. 2005. DING proteins are from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology* 252: 215-222.
- LIEBSHNER, D., M. Elias, S. Moniot, B. Fournier, K. Scott, C. Jelsch, C. Leconte, E. Chabriere. 2009. Elucidation of the phosphate binding mode of DING proteins revealed by subangstrom X-ray crystallography. *Journal of the American Chemical Society* 131: 7879-7886.
- LUECKE, H., F. A. Quijcho. 1990. High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature* 347: 402-406.
- MOGUEL-SALAZAR, F., L. Brito-Argáez, M. Díaz-Brito, and I. Islas-Flores. 2011. A review of a promising therapeutic and agronomical alternative: antimicrobial peptides from *Capsicum* sp. *African Journal of Biotechnology* 10(8): 19918-19928.
- MONIOT, S., M. Elias, D. Kim, K. Scott, E. Chabriere. 2007. Crystallization, diffraction data collection and preliminary crystallographic analysis of DING protein from *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Crystallographica F* 63: 590-592.
- MORALES, R., A. Berna, P. Carpentier, C. Contreras-Martel, F. Renault, M. Nicodeme, M. L. Chesne-Seck, F. Bernier, J. Dupuy, C. Schaeffer, H. Diemer, A. Van-Dorsselaer, J. C. Fontecilla-Camps, P. Masson, P. Rochu, E. Chabriere. 2006. Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein. *Structure* 14: 601-609.
- PANTAZAKI, A. A., G. P. Tsolkas, D. A. Kyriakidis. 2008. A DING Phosphatase in *Thermus thermophilus*. *Amino acids* 34: 437-448.
- PERERA, T., A. Berna, K. Scott, C. Lemaitre-Guillier, F. Bernier. 2008. Proteins related to St. John's Wort p27^{SJ}, a suppressor of HIV-1 expression, are ubiquitous in plants. *Phytochemistry* 69: 865-872.
- RENAULT, F., E. Chabriere, J.P. Andrieu, B. Dublet, P. Masson, D. Rochu. 2006. Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *Journal of Chromatography B* 836: 15-21.
- ROBERTSON, D., G. P. Mitchell, J. S. Gilroy, C. Gerrish, G. P. Bolwell, A. R. Slabas. 1997. Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *Journal of Biological Chemistry* 272: 15841-15848.
- ROCHU, D., F. Renault, C. Clery-Barraud, E. Chabriere, P. Masson. 2007. Stability of highly purified human paraoxonase (PON1): association with human phosphate binding protein (HPBP) is essential for preserving its active conformation(s). *Biochimica et Biophysica Acta* 1774:874-883.
- SACHDEVA, R., M. Simm. 2011. Application of linear polyacrylamide coprecipitation of denaturated templates for PCR amplifications of ultra-rapidly reannealing DNA. *Biotechniques* 50: 217-219.
- SAMAHA, H., V. Delorme, F. Pontvianne, R. Cooke, F. Delalande, A. Van Dorsselaer, M. Echeverria, J. Saez-Vasquez. 2010. Identification of protein factors and U3 snoRNAs from *Brassica oleracea* RNP complex involved in the processing of pre-rRNA. *Plant Journal* 61: 383-398.
- SCOTT, K., L. Wu. 2005. Functional properties of a recombinant bacterial DING protein: comparison with homologous human protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1744: 234-244.
- SEO, P. J., S. G. Hong Kim, C. M. Park. 2011. Competitive inhibition of transcription factors by small interfering peptides. *Trends in Plant Sciences* 16: 541-549.
- SHAFER, R. W., J. M. Schapiro. 2008. Drug Resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Review* 10: 67-84.
- STAUDT, A. C., S. Wenkel. 2011. Regulation of protein function by "microProteins". *EMBO Reports* 12: 35-42.
- SUH, A., V. Le Douce, O. Rohr, C. Schwartz, and K. Scott. 2013. *Pseudomonas* DING proteins as human transcriptional regulators and HIV-1 antagonists. *Virology Journal* 10: 234-242.
- TAN, A. S., E. A. Worobec. 1993. Isolation and characterization of two immunochemically distinct alkaline phosphatases from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 106: 281-286.
- TODOROV, W. K., S. M. Wyke, M. J. Tisdale. 2007. Identification and characterization of a membrane receptor for proteolysis-inducing factor on skeletal muscle. *Cancer Research* 67: 11419-11427.
- WANG, Z., A. Choudhary, P.S. Ledvina, F. A. Quijcho. 1994. Fine tuning the specificity of the periplasmic phosphate transport receptor. Site-directed mutagenesis, ligand binding, and crystallographic studies. *Journal of Biological Chemistry* 269: 25091-25094.
- WANG, Z., H. Luecke, N. Yao, F. A. Quijcho. 1997. A low energy short hydrogen bond in very high resolution structures of protein receptor-phosphate complexes. *Natural Structural and Molecular Biology* 4:519-522.
- WATTS, L. T., M. L. Rathinam, S. Schenker, and G. I. Henderson. 2005. Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death. *Journal of Neuroscience Research* 80: 655-666.
- YANG, J., B. Xie, Q. Yang. 2012. Purification and characterization of a nitroreductase from the soil bacterium *Streptomyces mirabilis*. *Process Biochemistry* 47: 720-724.
- YU, S., H. Huang, A. Liuk, W. H. Wang, K. B. Javasundera, W.A. Tao, C.B. Post, R.L. Geahlen. 2013. SyK inhibits the activity of protein kinase A by phosphorylating tyrosine 330 of the catalytic subunit. *Journal of Biological Chemistry* 288(15): 10870-10881.
- ZHANG, S. L., L. G. Zhang, M.K. Zhang, M. X. Hui. 2010. Sequence analysis of beta-esterase isoenzymes related to fertility change-over in TsCMS7311 of chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. pekinensis). *African Journal Biotechnology* 9: 8833-8836. 

Este artículo es citado así:

Brito-Argáez, L., M. Chí-Poot, R. Uc-Ku, J. A. Tamayo-Sansores, D. Madera-Piña, I. Islas-Flores. 2014. Las proteínas DING, una familia con intrigantes funciones celulares. *TECNOCENCIA Chihuahua* 8(1): 17-29.

Resumen curricular del autor y coautores

LIGIA GUADALUPE BRITO ARGÁEZ. Terminó su licenciatura en 1997, en 1999 le fue otorgado el título de Químico Biólogo Bromatólogo por la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Realizó su posgrado en el Instituto Tecnológico de Mérida (ITM), donde obtuvo el grado de Maestra en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología. Desde 1998 labora en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y posee la categoría de Técnico Académico Titular C. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde el 2009 (candidato 2009-2012; Nivel 1 2013-2015). Su área de especialización es la Bioquímica de plantas y la interacción con patógenos. Ha co-dirigido 6 tesis de licenciatura. Es autora principal o co-autora de 14 publicaciones en revistas arbitradas, 1 libro, 2 capítulos de libro, 1 revista de divulgación, ha participado en 56 trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales y ha participado en 7 proyectos de investigación financiados por fuentes externas.

MARTHA CHÍ POOT. Egresó en 2012 de la carrera en Ingeniería en Industrias Alimentarias, impartida en el Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, Campeche (ITESCAM). Actualmente realiza su trabajo de tesis de Licenciatura en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), en las instalaciones de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

RITA RAMONA UC KU. Egresó en 2013 de la carrera de Ingeniería Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, Campeche (ITESCAM). Actualmente se encuentra realizando su trabajo de tesis de Licenciatura en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

JOSÉ AARÓN TAMAYO SANSORES. Terminó su Licenciatura en 2012, año en el que le fue otorgado el título de ingeniero Bioquímico por el Instituto Tecnológico de Mérida. Actualmente cursa sus estudios de Maestría en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBMMP). Realizó dos estancias de iniciación a la investigación en el 2013, en los periodos febrero-junio y agosto-diciembre del mismo año. En el año 2011 fue co-autor de un artículo científico titulado Caracterización preliminar de la Polifenoloxidasas en el Gel de Sábila (*Aloe barbadensis* Mill).

DIANELI DE JESÚS MADERA PIÑA. Egresada en 2010 de la Licenciatura en Ingeniería Bioquímica con Especialidad en Biotecnología e impartida por el Instituto Tecnológico de Mérida. Se graduó como ingeniero bioquímico en el 2011. De febrero de 2012 a enero de 2013 laboró en la planta congeladora MSCBJ SEAFOOD'S S.A DE C.V., en el área de control de calidad. Durante este periodo se logró ante COFEPRIS la certificación de la planta para la exportación de "Camarón Congelado" a países de la Comunidad Europea. Actualmente es estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas que oferta el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., opción Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

IGNACIO RODRIGO ISLAS FLORES. Licenciado en Biología en 1988 por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estudio la Maestría en Biotecnología Vegetal en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., en colaboración con el Instituto Tecnológico de Mérida, se graduó en 1994. Realizó sus estudios de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., se graduó en 1998. Labora desde 1994 en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., donde actualmente es investigador titular C. Es autor principal o co-autor en 26 artículos de investigación publicados en revistas internacionales con arbitraje estricto. Es autor principal o coautor de cinco capítulos publicados en libros de circulación internacional. Es autor de 10 artículos de divulgación publicados en revistas nacionales y de tres artículos publicados en revistas indizadas por el CONACYT. Pertenece al SNI, nivel I de 2002-2017. Ha dirigido 12 tesis de Licenciatura, 6 tesis de Maestría, 3 de Doctorado. Ha sido responsable técnico de 6 proyectos de investigación y participante en tres. Ha presentado trabajos en 105 congresos, tanto nacionales como internacionales.