



ACADEMIA DE CIENCIAS
DE LA
REGIÓN DE MURCIA

**DEL GENOMA AL PROTEOMA HUMANO:
DIVERSIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
Y PATOLOGÍAS DERIVADAS**

Discurso del Académico de Número
Ilmo. Sr. D. Cecilio J. Vidal Moreno
Leído en la Sesión Solemne de Apertura de Curso,
el 22 de Febrero de 2011

Murcia
2011

Índice	Pag.
1. Preámbulo.....	5
2. El Proyecto Genoma Humano: Objetivos y Resultados....	6
3. Origen de la Diversidad de Proteínas en la Especie Humana	10
3.1. Ensamblado alternativo de exones y diversificación de las proteínas	11
3.2. Fallos en la maduración de los mRNAs y enfermedades humanas	18
4. Modificaciones Post-traduccionales de las Proteínas	24
4.1. Modificaciones reversibles	25
4.1.1. Fosforilación/desfosforilación	25
4.1.2. Acetilación/desacetilación	27
4.1.3. Metilación/desmetilación	28
4.1.4. Oxidación de cisteínas	28
4.1.5. Adición y eliminación de ubiquitina	31
4.2. Modificaciones irreversibles	33
4.2.1. Maduración de las proteínas Ras. Funciones e implicación en cáncer	35
4.2.2. Glicosilación de distroglicanos y sarcoglicanos: fallos y distrofias musculares	36
4.2.3. Maduración de tau y biosíntesis de beta-amiloide: relación con la enfermedad de Alzheimer	38
5. Epílogo	42
6. Bibliografía	43

Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades,
Ilustrísimos Señores Académicos,
Queridos Estudiantes,
Señoras y Señores

Es para mí un honor, un placer, una obligación aceptada de buen grado y una gran oportunidad de difundir la ciencia, ante tan selecta audiencia, el que me haya correspondido impartir esta lección inaugural del Curso 2010-2011 de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia.

1. Preámbulo

Como muchos de ustedes saben, la Bioquímica y la Biología Molecular intentan resolver el problema más complejo y fascinante al que se puede enfrentar la mente humana, y que no es otro que desentrañar los principios que dirigen y regulan todas y cada una de las actividades de los seres vivos. La expresión de esas actividades constituye la manifestación visible de la cualidad esencial de lo que todos entendemos por vida.

El desarrollo de la Biología Molecular ha sido formidable a lo largo del pasado siglo y, especialmente, desde la década de los 50, cuando James D. Watson y Francis Crick hicieron público el modelo de doble hélice para el DNA. La propuesta, verificada más tarde en todos sus extremos por Arthur Kornberg y otros, tuvo tal impacto que para muchos representa el arranque de la Biología Molecular. La semilla de la nueva ciencia fructificó rápidamente, de modo que los nuevos descubrimientos permitieron conocer y comprender la lógica de la célula en términos moleculares, sobre todo en lo que atañe a la replicación del DNA, al papel de los distintos RNAs y a la conversión del mensaje genético en proteína. A los primeros éxitos siguieron otros muchos de gran importancia para establecer las secuencias de nucleótidos en los genes y sus cambios en las enfermedades. Las técnicas de la Biología Molecular permitieron incorporar y expresar genes en células bacterianas y no bacterianas, localizar genes

particulares en los cromosomas y valorar la cantidad de RNA mensajeros (mRNA) en células normales y patológicas.

Por sus numerosas aplicaciones, la Biología Molecular se extendió pronto a todos los campos de las Ciencias de la Vida. En palabras de Arthur Kornberg “cuando disciplinas tan distintas como la Genética, Fisiología, Microbiología, Endocrinología, Neurobiología, etc., profundizan en su nivel de observación hasta encontrar preguntas y respuestas de carácter bioquímico, se confunden con la Bioquímica y de la comunión de intereses nace la Biología Molecular”. El comentario alcanza su plena justificación si consideramos que, en último término, todas las manifestaciones de los seres vivos descansan sobre una base molecular.

Por sus principios, técnicas y resultados, la Biología Molecular ha rebasado con creces los límites de la Biología para convertirse en la doctrina que guía a los que intentan conocer las bases moleculares de las enfermedades y explorar nuevas terapias, a los que pretenden aumentar los recursos naturales y satisfacer las necesidades nutricionales de una demografía en continuo crecimiento, y a los que se esfuerzan en conservar el medio ambiente, todo ello con el objetivo último de mejorar la condición humana y legar a las generaciones futuras un mundo en el cual puedan crecer con salud y en armonía con la naturaleza.

Sirva este preámbulo para señalar las dudas que me asaltaron a la hora de elegir el tema de esta lección. Al final, decidí abordar la relación entre el genoma humano, esto es, el conjunto de genes de nuestra especie, y el proteoma, entendido como el repertorio de proteínas que pueden producir las células humanas. Comentaré, pues, los mecanismos por los que las proteínas se diversifican y las ventajas de la diversificación. Por último, intentaré aclarar cómo los errores en la expresión de los genes o en la síntesis de proteínas pueden romper el delicado hilo que separa la salud y la enfermedad.

2. El Proyecto Genoma Humano: Objetivos y Resultados

La información que almacena cada gen reside en la secuencia de nucleótidos del DNA. La secuencia del DNA se convierte en otra sucesión de nucleótidos en el RNA (Figura 1). Por último, el mensaje

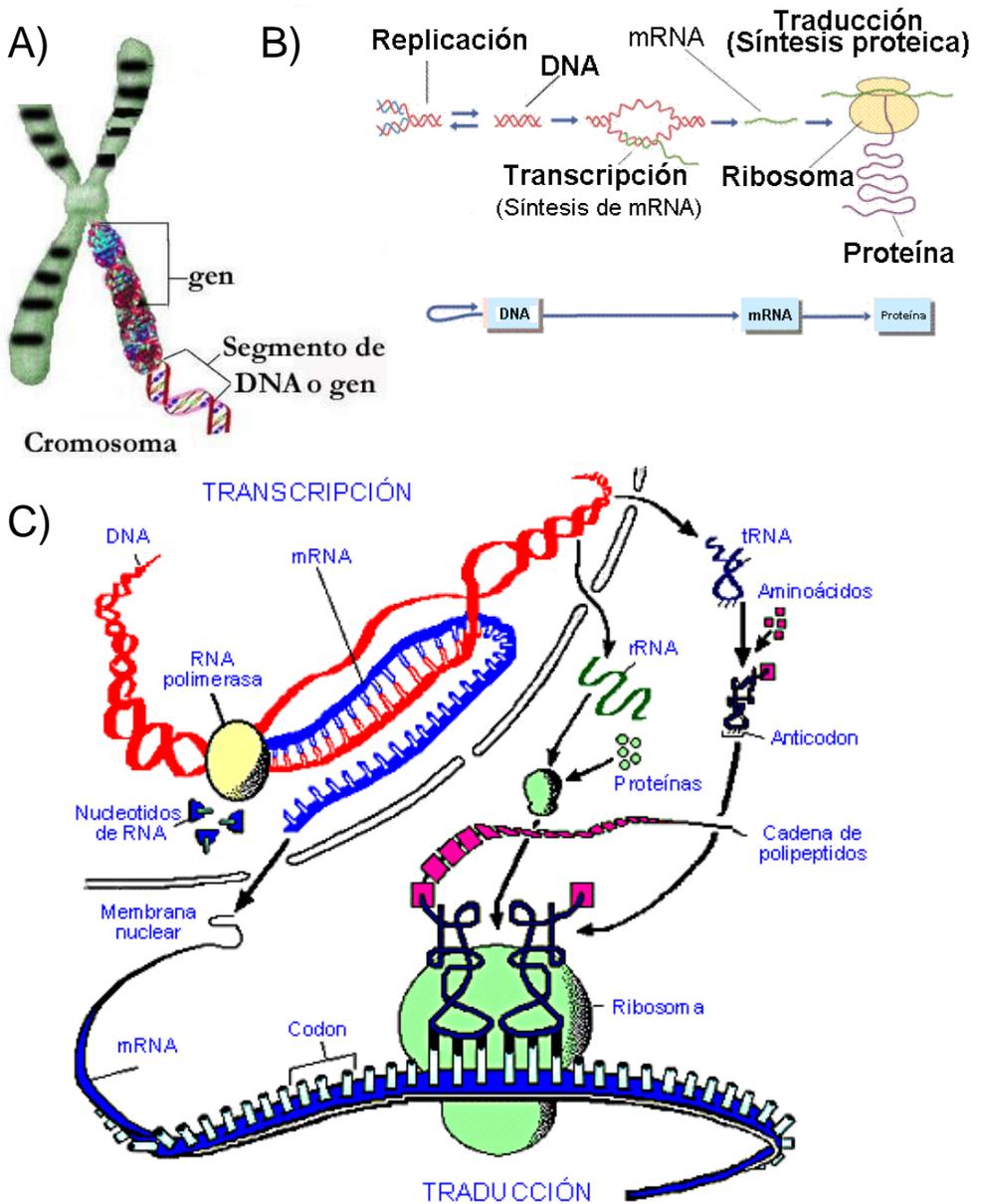


Figura 1. Conversión del DNA en proteína.

(A) Cromosomas y genes; (B) La ruta del DNA a la proteína. Una de las hebras del DNA sirve de molde para un RNA mensajero (mRNA). El ribosoma convierte la secuencia de nucleótidos en una cadena de aminoácidos. (C) Cada triplete de nucleótidos (codón) del mRNA define uno de los veinte aminoácidos que forman las proteínas.

de tripletes (codones) del RNA se transforma en una secuencia de 20 signos, en la que cada codón señala uno de los 20 aminoácidos que forman las proteínas.

Puesto que numerosas enfermedades, conocidas como monogénicas, derivan de anomalías en un solo gen, el Proyecto Genoma Humano fue abordado con la certeza de que la secuencia completa del DNA permitiría conocer el conjunto de proteínas que puede fabricar la especie humana e identificar los cambios del genoma en patologías de origen desconocido. En definitiva, la información del Proyecto Genoma daría un fuerte impulso al desarrollo de la Biomedicina y la Genética Clínica, por cuanto podría aclarar la causa de enfermedades poco conocidas, facilitar la obtención de marcadores para el diagnóstico y sentar las bases de nuevas alternativas terapéuticas.

El Proyecto Genoma Humano fue propuesto en 1990 en el Departamento de Energía y los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de los Estados Unidos y fue dotado con 90.000 millones de dólares. La dirección corrió a cargo del profesor James D. Watson, de Estados Unidos, quien junto al inglés Francis Crick, había sido galardonado con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1962, por sus trabajos sobre la estructura del DNA.

Los objetivos del Proyecto Genoma eran muy ambiciosos y constituían, sin duda, uno de los mayores retos de la investigación científica. Su intención era conocer la secuencia de los 3.000 millones de pares de bases del DNA humano, identificar los genes que contiene y situarlos en los 46 cromosomas de nuestra especie. El plazo de ejecución era de 15 años, pero los avances tecnológicos y la implicación de unos 1.200 científicos de Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda, Reino Unido y otros sesenta países aceleraron los trabajos. En febrero de 2001, se publicó la secuencia completa del Genoma Humano con un 99.9% de confianza en las revistas *Nature* y *Science*. La secuencia definitiva fue presentada oficialmente en el año 2003, tras trece años de trabajo y dos años antes de lo previsto.

Los resultados del proyecto sorprendieron a la comunidad científica por el pequeño número de genes que contiene el genoma humano. Se creía que los más de 3.000 millones de pares de bases del

DNA humano podrían albergar unos 100.000 genes. En la Tabla 1 se comparan los genomas de varios organismos, en cuanto al tamaño, número de genes, cantidad de cromosomas y proteínas codificadas. La secuencia de nucleótidos reveló que en el Genoma Humano “sólo” había 23.000-25.000 genes, 4 veces menos de lo esperado. La comparación de los genomas del hombre, ratón, perro y gallo (Tabla 1) confirmó el hecho ya conocido de que el número de genes no está relacionado con el número de cromosomas ni con la cantidad de nucleótidos. Merece la pena destacar que el genoma relativamente pequeño del arroz contiene casi el doble de genes que el genoma humano. En definitiva, el análisis del genoma humano reveló que el funcionamiento biológico del organismo más complejo del planeta descansaba sobre unos 25.000 genes.

Los datos de la Tabla 1 revelan que el número de genes de un organismo dista mucho de ser un índice de su complejidad biológica. La razón estriba en que el conjunto de genes (el genoma) de un organismo señala la información que pueden expresar sus células, pero no la que expresa cada clase de célula y en una situación concreta. Como la unidad funcional en biología es la proteína, la complejidad biológica emana de la diversidad de proteínas (el proteoma) en cada tipo celular, tejido y órgano. Esta diversidad habrá de ser modificada cualitativa y cuantitativamente para adaptarse a situaciones cambiantes, unas inherentes a la propia biología celular, otras derivadas de las modificaciones en el entorno.

Por tanto, cuanto mayor sea la diversidad de proteínas en células u organismos, más posibilidades tendrán de adaptarse a las condiciones del medio, enfrentarse a los agentes patógenos y sobrevivir en circunstancias hostiles. Cuanto mayor sea la diversidad proteica, mayor será la capacidad de las células para crear redes complejas con las que coordinar todas sus actividades.

	Organismo	Tamaño (p. de bases)	Nº de genes	Nº cromosomas
	<i>Homo sapiens</i> (humano)	3.274 millones	~25.000	46
	<i>Mus musculus</i> (ratón)	3.420 millones	~25.000	40
	<i>Canis familiaris</i> (perro)	2.385 millones	~20.000	78
	<i>Gallus gallus</i> (gallo)	1.050 millones	~18.000	66
	<i>Danio rerio</i> (pez cebra)	1.563 millones	~22.000	48
	<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca de la fruta)	168 millones	~13,000	8
	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	487 millones	~44.000	24
	<i>Caenorhabditis elegans</i> (gusano)	103 millones	~19.000	12
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura)	12 millones	~6.000	32

Tabla 1. Comparación del tamaño del DNA, número de genes y de cromosomas en humanos, en varias especies animales y vegetales, y en la levadura de cerveza.

3. Origen de la Diversidad de Proteínas en la Especie Humana

Aunque se desconoce el número de proteínas distintas que puede producir la especie humana, algunos científicos admiten que puede ser entre tres y cuatro veces mayor que el número de genes, esto es 100.000 proteínas, sin contar las variantes post-traduccionales. Obviamente, no todos los tipos celulares tendrán el mismo repertorio de proteínas, ni en la misma cantidad. Además, la variedad y cantidad de cada proteína cambiará de acuerdo con las necesidades de la célula en cada momento, la disponibilidad de aminoácidos, la etapa del ciclo celular y los estímulos externos que reciba.

Hasta la fecha, se han identificado más de 20.000 proteínas en la especie humana; entre ellas, unas 1.000 en la mitocondria, otras 1.000 en el líquido cefalorraquídeo y unas 3.000 en el suero sanguíneo, pero el número de proteínas identificadas aumenta sin cesar, a medida que mejora la sensibilidad de las técnicas de detección. Es previsible, por tanto, que en los próximos años tengamos información muy precisa de la variedad y cantidad de proteínas en el suero de personas sanas, en distintas edades y grupos étnicos concretos. Cuando eso ocurra, se habrán alcanzado las condiciones ideales para descubrir proteínas marcadoras en el suero, cuya cantidad cambie en enfermedades concretas y sean útiles para el diagnóstico.

3.1. Ensamblado alternativo de exones y diversificación de las proteínas

El hecho de que con unos 25.000 genes, la especie humana sea capaz de producir unas 100.000 proteínas pone en tela de juicio el viejo dogma de la Biología Molecular, según el cual cada gen codifica una proteína. Aunque la traslación directa del gen a la proteína es válida en bacterias, y no en todas, la realidad es que la síntesis de proteínas en células no bacterianas transcurre en tres etapas principales: 1) la transcripción del gen y la creación de un mRNA concreto; 2) el transporte del mRNA desde el núcleo al citoplasma; y 3) la traducción del mRNA en proteína (Figura 2).

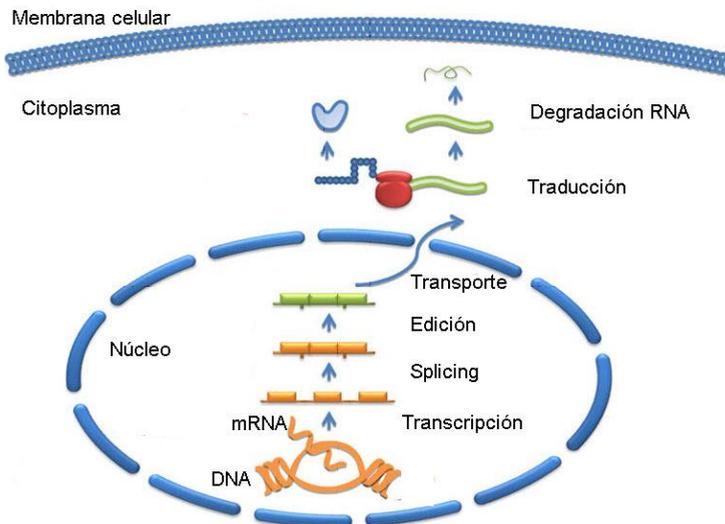


Figura 2. El camino del gen a la proteína.

La extraordinaria complejidad del proceso se explica por la necesidad que tienen las células de producir una proteína concreta, que sea plenamente funcional, en una cantidad precisa y que, además, debe variar para ajustarse a las necesidades temporales. Como cada mRNA final codifica una proteína específica y la viabilidad de los distintos tipos celulares depende, a menudo, de la actividad de proteínas concretas, es lógico que el camino del gen a la proteína esté fuertemente regulado en sus diferentes etapas. Conviene tener en cuenta que cualquier fallo en alguna de las etapas puede comprometer gravemente la viabilidad de las células y ocasionar diversas patologías, como veremos más adelante.

Al contrario que los genes de las bacterias, los genes de las células no bacterianas y, obviamente, los genes humanos, están formados por dos clases de fragmentos de DNA: los exones y los intrones, pero sólo los exones codifican la proteína. Un gen humano contiene 8 exones de promedio y cada exón unos 145 nucleótidos. El tamaño de los intrones puede sobrepasar los 20.000 nucleótidos. La síntesis del mRNA final implica la eliminación de intrones y la unión de exones. Sirva como ejemplo la producción del mRNA de la ovoalbúmina, cuyo gen consta de ocho exones (L-E7) y siete intrones (A-G) (Figura 3). Los intrones desaparecen en el mRNA final.

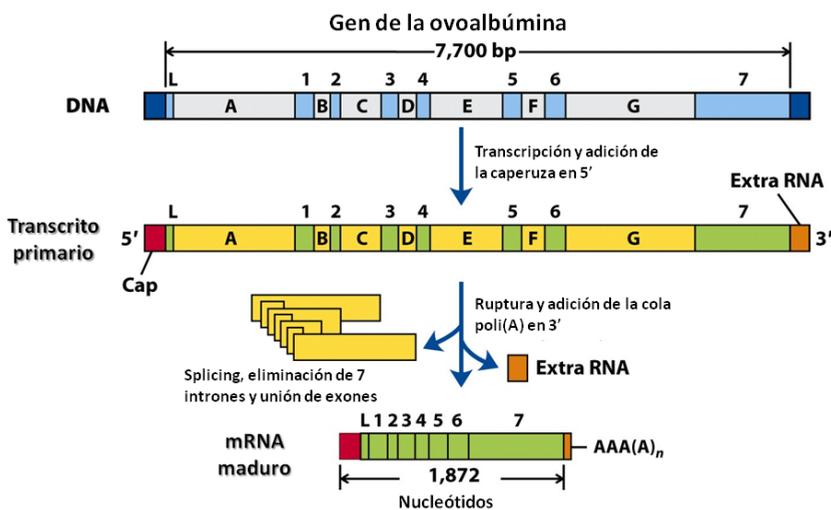


Figura 3. Procesamiento del gen de la ovoalbúmina.

Aunque la unión de los ocho exones del gen de la ovoalbúmina proporciona un solo mRNA y, por tanto, una sola proteína, este caso representa la excepción más que la regla. Numerosos científicos creen que el 90% de los mRNAs humanos derivan del ensamblado alternativo de exones. Esto quiere decir que si un gen posee, pongamos 6 exones (E1-E6), la síntesis del mRNA maduro (y de la proteína codificada) dependerá de los exones seleccionados (E1-E2-E3-E4; E1-E2-E3-E5; E1-E2-E3-E6). Este fenómeno se conoce como procesamiento alternativo del RNA primario y explica por qué el mismo gen puede generar un conjunto de mRNAs en distintos tipos celulares e incluso en la misma célula.

Los diversos mRNAs producirán una serie de proteínas, distintas en su secuencia de aminoácidos y, por tanto, en su estructura global y funcionalidad. Un ejemplo de ello, es la maduración del mRNA primario de la α -tropomiosina. Con sus 15 exones, el ensamblado alternativo produce 9 proteínas distintas (Figura 4). Del mismo modo, el gen de la calcitonina genera dos péptidos: la propia calcitonina en el tiroides y un péptido relacionado en el hipotálamo (Figura 5).

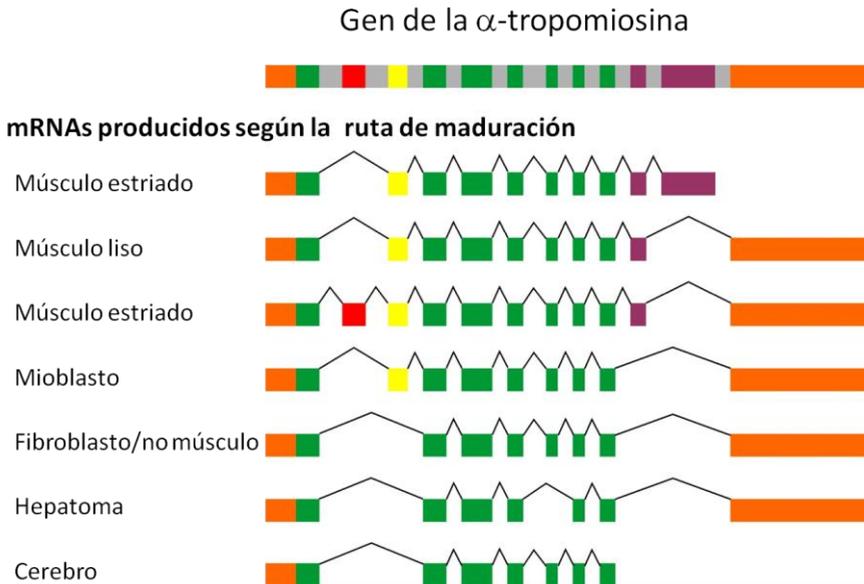


Figura 4. Procesamiento de un mRNA primario.
 El ensamblado alternativo de exones genera todo un repertorio de variantes de tropomiosina en un mismo tejido y en distintos tejidos.

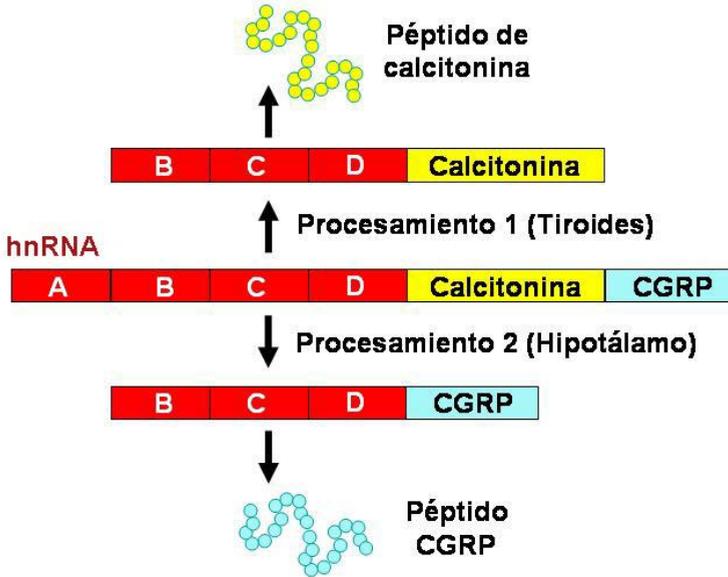
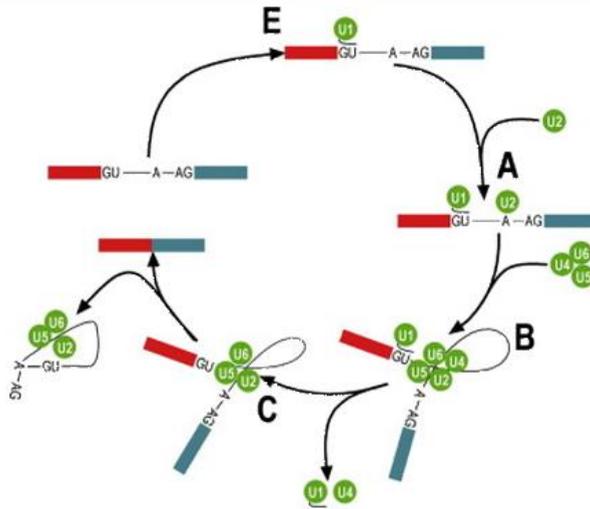
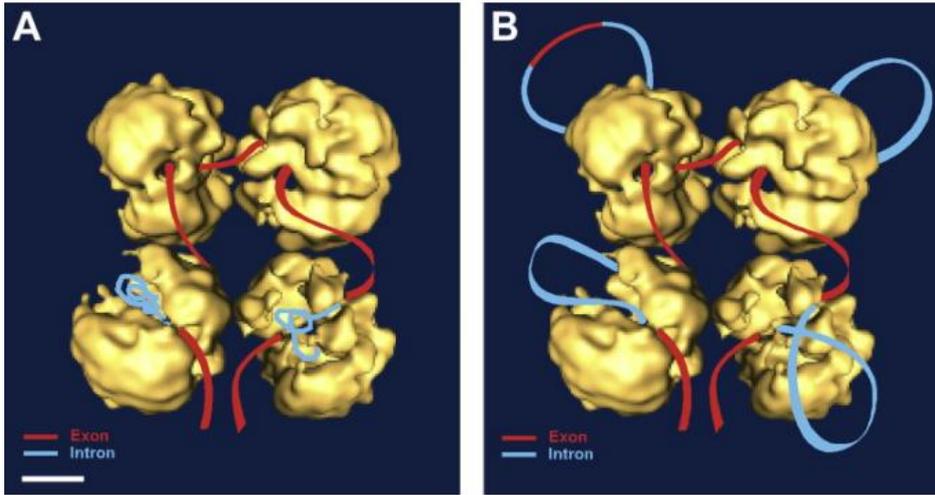
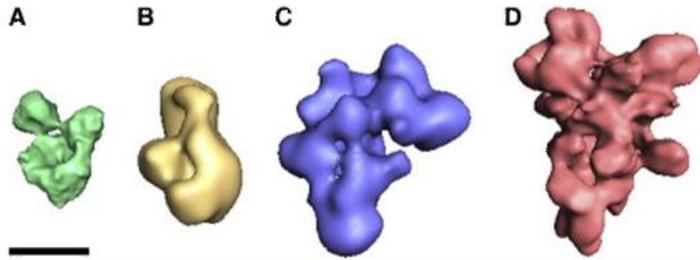


Figura 5. Producción de dos hormonas distintas a partir de un mismo gen.

Pero si un mismo mRNA primario puede generar varias proteínas distintas, ¿cómo se seleccionan los exones y se cortan los intrones? y lo más importante, ¿por qué razón y a través de qué mecanismos un tipo celular escoge una serie de exones y otras células eligen otros exones? La razón estriba en el hecho de que cada tipo celular, por ejemplo, la neurona, fabrica las proteínas que necesita para llevar a cabo sus funciones, y que serán distintas de las que desarrollan las células del hígado o del intestino. Los tres tipos de células contienen los mismos genes, pero el repertorio de proteínas será distinto en cada caso, que a su vez será el más acorde con el papel fisiológico que ejerza cada tipo celular.

Veamos ahora cómo tiene lugar la selección de exones. Las células no bacterianas disponen de una maquinaria molecular sumamente eficiente, denominada “espliceosoma”, el cual se encarga de elegir los exones, cortar los intrones y unir los exones (proceso conocido en inglés como “splicing”) (Figura 6). El voluminoso agregado proteico del espliceosoma contiene más de 150 proteínas. De ellas, unas forman parte de 5 partículas ribonucleoproteicas snRNPs



(U1, U2, U4/U6, U5) y las otras son proteínas reguladoras del splicing.

El espliceosoma rastrea y localiza, con exquisita precisión, las marcas de los exones e intrones y los sitios concretos que reconocen las proteínas reguladoras del splicing. Estos sitios se sitúan en el RNA primario y son conocidos como potenciadores y silenciadores del splicing de exones (ESE y ESS) e intrones (ISE e ISS). La unión a estos sitios de proteínas que activan o reprimen el reconocimiento de exones e intrones (y cuyo conjunto depende del tipo celular) explica por qué un mismo gen genera un mRNA y una proteína particular en unas células, y otro mRNA y otra proteína en otras células.

Los mRNA primarios poseen numerosos sitios en los que se fijan las proteínas reguladoras de splicing; según estudios recientes, los sitios cubren más del 75% del total de nucleótidos de los mRNA. En último término, son las proteínas reguladoras las que deciden los exones a incluir en el mRNA final. Las partículas U1-U6 y el conjunto de proteínas reguladoras “cuelgan” de la RNA polimerasa II, la enzima que sintetiza el mRNA primario. Tal disposición permite que el espliceosoma “lea” y “procese” el mRNA, a medida que se transcribe el DNA. Al dictado de las proteínas reguladoras, el espliceosoma trabaja con gran rapidez y precisión para generar el mRNA particular que requiere la célula en cada instante.

La complejidad de la regulación del splicing del mRNA primario queda patente en el caso de la expresión de la distrofina. La distrofina procede del gen *DMD* y sus mutaciones producen la Distrofia Muscular de Duchenne. Con 79 exones y más de 2.000 kb, el gen *DMD* es uno de los más grandes que se conocen. Las mutaciones en el gen pueden alterar el marco de lectura, pero también los sitios del RNA en donde se fijan las proteínas que potencian y/o reprimen la adición de exones. La deficiencia de distrofina funcional produce daños irreparables en el músculo.

La elevada energía que supone la construcción del complejo macromolecular del espliceosoma es el precio que debe pagar la célula para garantizar, con absoluta precisión, que la combinación de exones sea la adecuada para generar el mRNA final que necesita. Conviene tener presente que los errores en el ensamblado de exones pueden

añadir o quitar un nucleótido, lo que trastocará la información del mRNA. Cuando eso ocurre, la célula producirá una proteína aberrante no funcional o un fragmento de la proteína deseada y, posiblemente, con una actividad biológica anormal o sin actividad alguna.

La aparición del ensamblado alternativo de exones, a lo largo de la evolución, no sólo permitió ampliar el número de proteínas distintas que podía expresar un mismo gen, sino también ajustar la cantidad de proteína sintetizada, vía eliminación o adición de elementos reguladores de la traducción, la estabilidad del mRNA o su localización celular. Además, la expansión del número de proteínas distintas y de variantes de una misma proteína supuso un gran avance para aumentar las posibilidades de supervivencia de las células en las más diversas circunstancias y para afrontar el problema de la falta de una proteína esencial, mediante el principio de redundancia. Según éste, varias proteínas pueden desempeñar funciones parecidas, de modo que una proteína defectuosa o ausente puede ser sustituida funcionalmente por otra.

El ensamblado alternativo de exones es más frecuente a medida que se asciende en la escala evolutiva; es escaso en plantas, medio en invertebrados y elevado en vertebrados. La opinión general es que el 90% de los genes humanos se procesan de forma alternativa, un 40% de ellos generan al menos 5 variantes proteicas, y alrededor del 10% más de 10 variantes. La alternancia de exones es particularmente intensa en cerebro y los fallos en el splicing originan patologías neurodegenerativas. Desde luego, no todos los mRNAs llegan a producir proteínas, algunos se eliminan poco después de su síntesis y otros no se traducen porque su mensaje queda bloqueado por la unión de microRNAs.

El procesamiento alternativo fue de capital importancia para la aparición de proteínas multimodulares (con varios dominios), conforme los organismos unicelulares se convertían en pluricelulares. Tan trascendental salto evolutivo no habría sido posible sin la necesaria adaptación de las células para funcionar de un modo cooperativo. La necesidad de una perfecta colaboración entre las células impulsó la síntesis de proteínas esenciales para el reconocimiento célula-célula, las que intervienen en la interacción célula-matriz extracelular y las que facilitan la comunicación entre

células y tejidos, por ejemplo vía receptores que promueven la síntesis de segundos mensajeros químicos. De este modo se consiguió que el organismo pluricelular llegara a funcionar como una unidad perfectamente integrada.

Llegado a este punto, tengo que referirme al caso de la acetilcolinesterasa (AChE), una enzima a cuyo estudio he dedicado la mayor parte de mi actividad profesional. La AChE hidroliza con gran eficiencia al neurotransmisor acetilcolina, de modo que su acción es esencial para que termine cada pulso de actividad colinérgica en el sistema nervioso central, el sistema autónomo y la unión neuromuscular. Los vertebrados contienen un gen *ACHE* y el procesamiento alternativo del mRNA primario produce tres mRNAs (Figura 7). Sus productos, las proteínas AChE-R, AChE-H y AChE-T, se encuentran en los tejidos y fluidos corporales como monómeros, dímeros, tetrameros y oligómeros superiores (Figura 7).

3.2. Fallos en la maduración de los mRNAs y enfermedades humanas

Según parece, el 15% de todas las enfermedades humanas en las que cambia un solo nucleótido derivan de errores en el splicing del mRNA primario. Si consideramos que, además del splicing, la maduración del mRNA primario incluye la edición, la exportación del mRNA final al citoplasma y su estabilidad, los fallos en alguna de esas etapas pueden estar detrás de casi la mitad de todas las patologías humanas (Tabla 2).

Algunas enfermedades derivan de mutaciones genómicas, que cuando se trasladan al RNA primario afectan al ensamblado de exones. Es lo que ocurre, por ejemplo, en el gen de la distrofina, cuyas mutaciones producen Distrofia Muscular de Duchenne. Otro ejemplo es la proteína tau. Las anomalías genéticas producen formas aberrantes de tau que, generalmente, incorporan numerosos restos fosfato. Tau hiperfosforilada tiende a la agregación y eventual formación de los nudos neurofibrilares que se observan en el cerebro de enfermos con Alzheimer. El Parkinson y otras demencias también se relacionan con mutaciones de tau (Tabla 2).

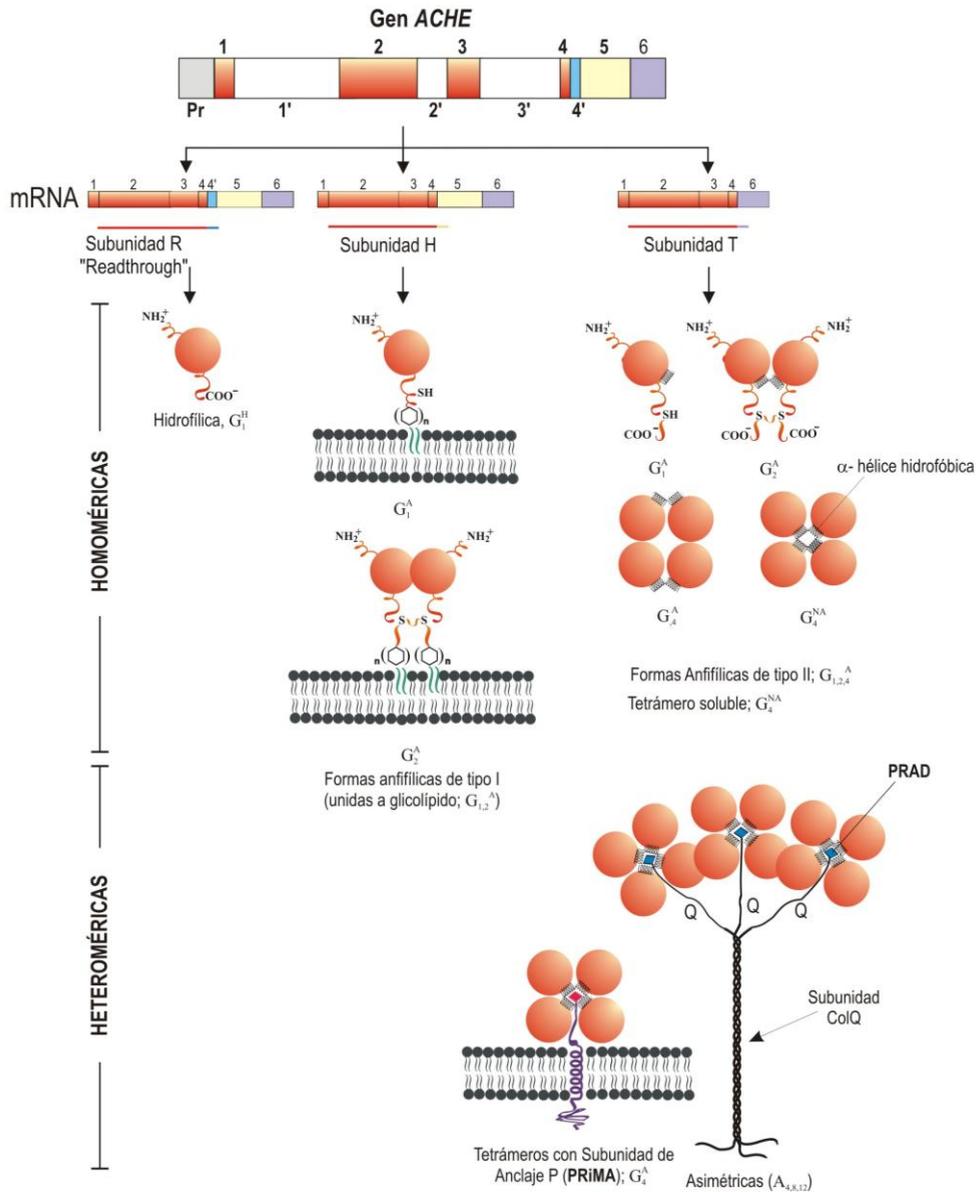


Figura 7. Procesamiento del mRNA primario del gen ACHE.
 El ensamblado alternativo genera tres mRNAs: AChE-R, AChE-H y AChE-T. Las proteínas producto forman homo- y hetero-oligómeros, los últimos con la ayuda de otras proteínas.

En cuanto a las proteínas del espliceosoma, apenas se han encontrado anomalías, lo que sugiere que las mutaciones son letales para la célula. Con todo, se han identificado aberraciones en cuatro proteínas de los complejos U4/U5/U6. La consiguiente pérdida de función del espliceosoma parece ser la razón que impulsa la degeneración de las células como de la retina y el origen de la Retinitis Pigmentosa (Tabla 2).

La Atrofia Muscular Espinal se origina por mutaciones en el gen *SMN1*. La proteína SMN1 no forma parte del espliceosoma, pero juega un papel esencial en su construcción. En consecuencia, la deficiencia de SMN1 afecta al procesamiento de numerosos mRNAs, pero la deficiencia de SMN1 no tiene los mismos efectos en todas las células. Las más perjudicadas son las neuronas motoras de la médula espinal, cuya pérdida de función produce parálisis. Algunas patologías se originan por mutaciones en las proteínas que regulan el splicing, mediante la ocupación errónea de los sitios en el RNA primario que potencian o silencian el reconocimiento de exones. Así, por ejemplo, las mutaciones en los factores reguladores Nova y Fox se asocian con retraso mental, epilepsia y autismo (Tabla 2).

En cuanto a la relación entre las anomalías en el procesamiento de los RNA primarios y el cáncer, resultados recientes indican que algunos factores de splicing se sobre-expresan en ciertos tumores. Este es el caso de la proteína SF2/ASF, la cual induce la transformación maligna de las células, a través de un cambio en el splicing del mRNA para la proteína ribosómica S6-quinasa- β 1. Cabe pensar que los fallos en la construcción del espliceosoma, en el mecanismo de unión de exones, o en su regulación producirán proteínas aberrantes que favorezcan la división celular y el cáncer. Los errores en el splicing y/o la estabilidad de los mRNAs pueden alterar la expresión y/o la cantidad de las proteínas que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células. El crecimiento desordenado de la masa celular puede dar paso a un tumor y más tarde a un cáncer.

Tabla 2. Neuropatologías derivadas de errores en el procesamiento y transporte del mRNA

Enfermedad	Fallo en la maduración del RNA	Gen, mRNA o proteína afectados	Efectos
Esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Huntington	Edición del pre-mRNA	Receptor de glutamato GluR2 AMPA Escasa eficiencia en la edición	Patologías neurodegenerativas y demencias
Epilepsia	Edición del pre-mRNA	Receptor de glutamato GluR2 AMPA Excesiva eficiencia	Patologías neurodegenerativas
Epilepsia	Edición del pre-mRNA	Receptor de glutamato GluR6 kainato Edición alterada	Patologías neurodegenerativas
Depresión	Edición del pre-mRNA	Receptor de serotonina 5-HT2C Edición alterada	Patologías neurodegenerativas
Deficiencia familiar de la hormona crecimiento	Procesamiento alternativo	Mutaciones en el gen <i>GH-1</i>	Reducción de la estatura
Síndromes de WGAR, Desnys Drash y Frasier	Procesamiento alternativo	Mutaciones en el gen <i>WT1</i> (supresor de tumores de Wíllms)	Cáncer renal pediátrico, anomalías genitourinarias, aniridia, déficit cognitivo
Demencia frontotemporal y parkinsonismo asociados al cromosoma 17 (FTDP-17)	Procesamiento alternativo	Mutaciones en el gen <i>MAPT</i> (Tau)	Demencias y Parkinson
Fibrosis quística atípica	Procesamiento alternativo	Polimorfismo en el gen <i>CTFR</i>	Enfermedad pulmonar obstructiva, infertilidad en hombres
Esclerosis lateral amiotrófica	Procesamiento alternativo	Acumulación citoplasmática de ciertos factores reguladores del splicing	Enfermedad neuromuscular con origen en neuronas motoras. Causa incapacidad y eventualmente la muerte

Esclerosis lateral amiotrófica	Procesamiento alternativo	Expresión anormal de variantes de periferina	Enfermedad neuromuscular con origen en las neuronas motoras
Esclerosis lateral amiotrófica	Procesamiento alternativo	Pérdida del transportador de glutamato EAAT2	Enfermedad neuromuscular con origen en neuronas motoras
Distrofia muscular miotónica tipos 1 y 2	Procesamiento alternativo	Repeticiones CTG en la región UTR del gen <i>DMPK</i> y secuestro de factores de splicing para repeticiones GUG y CCUG	Hiperexcitabilidad (mitotonia) y pérdida de masa muscular, defectos en músculo liso y cardíaco, cataratas, problemas cognitivos y psiquiátricos, etc...
Síndrome de Rett	Procesamiento alternativo	Mutaciones en el gen <i>MECP2</i> alteran el splicing del mRNA diana	Enfermedad neurológica grave ligada al cromosoma X. Retraso mental
Alzheimer esporádico	Procesamiento alternativo	La sobre-expresión de la proteína HMGA1A, que liga RNA, altera el splicing de presenilina-2	Problemas cognitivos y psiquiátricos
Alzheimer esporádico	Procesamiento alternativo	Sobre-expresión del factor de splicing UAP56	Problemas cognitivos y psiquiátricos
Síndrome de tremor/ataxia asociado al cromosoma X frágil	Procesamiento alternativo	Secuestro de factores de splicing por repeticiones en el gen <i>FMR1</i>	Enfermedad neurológica. Problemas de coordinación al caminar. Parkinsonismo y déficit cognitivo
Ataxia opsoclonal-mioclónica	Procesamiento alternativo	Respuesta autoinmune contra el factor de splicing Noval	Trastornos neurológicos. Falta de control motor. Sacudidas en tronco y extremidades
Ataxia espinoocerebelar tipos 2, 8, 10 y 12	Procesamiento alternativo	Los factores de splicing interactúan con proteínas inductoras de ataxia	Trastornos neurológicos graves
Ataxia espinoocerebelar tipo 1	Procesamiento alternativo	Interacción de ataxina con el factor de splicing RBM17	Trastornos neurológicos graves
Atrfia muscular espinal	Construcción y función del espliceosoma. Fallo en el tránsito citosol/núcleo/citosol	Pérdida homocigótica de la copia telomérica del gen <i>SMN1</i>	Reducción del número de neuronas motoras en la médula, denervación del músculo y parálisis. Mortalidad infantil

Retinitis pigmentosa	Construcción y función del espliceosoma	Mutaciones en los genes <i>PRPF31</i> , <i>HPRF3</i> , <i>HPRF8</i>	Degeneración de la retina, pérdida de la visión periférica, ceguera nocturna o total
Distrofia muscular óculo-faríngea	Poliadenilación	Expansión de polialamina en la proteína nuclear 1 necesaria para la poliadenilación	Caída de párpados (ptosis), dificultad para deglutir y debilidad muscular
Distrofia muscular óculo-faríngea	Exportación del mRNA nuclear	Secuestro de proteínas necesarias para la exportación	Caída de párpados (ptosis), dificultad para deglutir y debilidad muscular
Retraso mental ligado al cromosoma X	Exportación del mRNA nuclear	El gen candidato <i>MXF5</i> codifica una proteína de exportación	Trastornos neurológicos
Síndrome del cromosoma X frágil	Exportación del mRNA nuclear	La delección de la proteína FMRP impide su interacción con el factor de exportación NXF2	Retraso mental
Síndrome de contractura congénita fetal	Exportación del mRNA nuclear	Mutaciones en el gen para la proteína de exportación Gle1	Retraso en el desarrollo fetal, contracturas en las articulaciones, hipoplasia pulmonar
Atrofia muscular espinal	Estabilización y localización del mRNA	Localización anormal de β -actina en los conos de crecimiento de neuronas motoras	Pérdida de neuronas motoras en la médula, denervación del músculo y parálisis. Mortalidad infantil
Distrofia miotónica	Estabilización y localización del mRNA	El secuestro de la proteína MBNL2 parece afectar a la localización del mRNA para integrina- $\alpha 3$	Miotomía y pérdida de masa muscular

Información tomada de Anthony & Gallo, 2010.

4. Modificaciones Post-traduccionales de las Proteínas

Aunque el procesamiento alternativo de los RNAs primarios explica la expansión de la diversidad de proteínas, la realidad es que la variedad de proteínas en las células humanas (el proteoma) es mucho mayor de lo que cabría esperar del splicing alternativo. La razón estriba en el hecho de que una misma proteína puede generar todo un abanico de variantes a través de las **modificaciones post-traduccionales**. Este término se refiere a los cambios que sufren las proteínas a medida que se sintetizan o inmediatamente después de su síntesis. Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 200 clases de cambios post-traduccionales. En general, los cambios afectan a la estructura espacial de la proteína, a sus propiedades físico-químicas y a su capacidad para interactuar con otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

La importancia de los cambios post-traduccionales queda claramente de manifiesto si tenemos en cuenta que alrededor del 5% del genoma humano, unos 1.200 genes, se ocupan de la síntesis de enzimas directamente implicadas en tales cambios y que el 1% al menos de los genes humanos, el equivalente a unos 250 genes, codifican enzimas de la glicosilación. La verdad es que son escasas las proteínas que a lo largo de su vida útil se ven libres de algún cambio post-traduccionales. Teniendo en cuenta las 200 clases de cambios conocidos y que la misma proteína puede sufrir varios cambios, en respuesta a diversos estímulos, se comprenderá fácilmente el extraordinario número de variantes de una misma proteína que pueden coexistir en la célula y la tremenda expansión de la diversidad de proteínas a partir del moderado número de elementos del genoma.

Veamos un ejemplo de hasta dónde puede llegar la diversidad de proteínas. La proteína Abl, con actividad tirosina quinasa, puede incorporar fosfato en once aminoácidos: una serina, una treonina y nueve tirosinas. Esto implica que, en principio, el número de variantes de fosfo-Abl será más de 2.000, y eso para ¡¡ una sola proteína !!. Mención especial merece la proteína tau de los microtúbulos, con 40 sitios de fosforilación. Los cambios post-traduccionales pueden ser reversibles o irreversibles, y una misma proteína puede ser modificada de las dos maneras.

4.1. Modificaciones reversibles

Las modificaciones reversibles actúan como interruptores biológicos, pues permiten que, en un momento dado, una proteína particular exprese sus capacidades, las modifique o incluso las suprima. Las capacidades incluyen la posible interacción con otras proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. Los cambios reversibles marcan la velocidad a la que operan las rutas metabólicas, la variedad de genes que expresan las células en cada instante, cuándo empieza la división celular, la diferenciación, la asociación con otras células y la apoptosis. También regulan el paso de iones a través de las membranas y la duración de las respuestas a hormonas y neurotransmisores. Es obvio que cualquier fallo en la regulación de esas actividades puede comprometer gravemente la viabilidad de las células y afectar a la fisiología de los tejidos, lo que al final se traducirá en una determinada patología. Entre los cambios reversibles figuran, entre otros, la fosforilación, acetilación, metilación, acilación, oxidación, nitrosilación, carbonilación, la adición de azúcares y de ubiquitina. Pasaré a comentar brevemente las repercusiones funcionales de algunos de ellos.

4.1.1. Fosforilación/desfosforilación

De entre todas las modificaciones de las proteínas, la mejor conocida y la que ejerce más influencia sobre numerosas actividades celulares, a través de las rutas de señalización, es sin duda la adición de fosfato y su eliminación, por la acción concertada de quinasas y fosfatasa. Las proteín-quinasa catalizan la entrada del grupo γ -fosfato del ATP en restos de serina, treonina o tirosina. La fosforilación suele modificar la estructura de la proteína (Figura 8), lo que explica que cambie su actividad biológica, su capacidad para reconocer a otras proteínas o su destino celular. Las proteín-fosfatasa contrarrestan las acciones de las quinasas, de modo que el conjunto de proteínas-fosfato en la célula depende de la variedad y cantidad de quinasas y fosfatasa. Los cambios en el entorno y las moléculas de señalización (hormonas, neurotransmisores u otras) aumentan las actividades quinasas o fosfatasa, que a su vez desencadenan numerosos acontecimientos celulares.

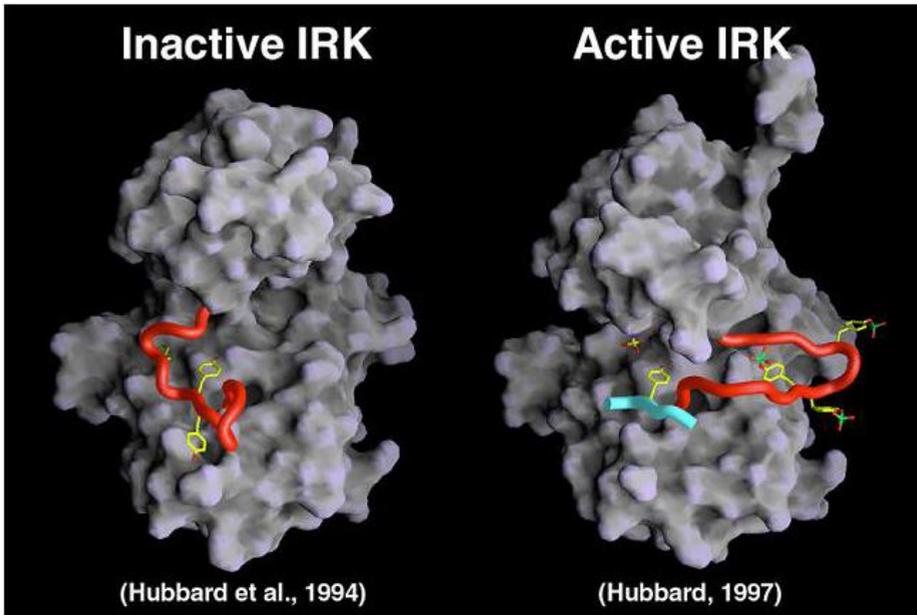


Figura 8. La fosforilación cambia la estructura y actividad de algunas proteínas. La entrada de fosfato altera profundamente la estructura y actividad del dominio quinasa del receptor de insulina. La separación del dominio inhibitorio (en rojo) permite la entrada al centro activo de la proteína sustrato (en azul).

De hecho, quinasas y fosfatasas regulan la mayoría de las actividades celulares (si no todas), operan sobre una gran variedad de proteínas y lo hacen del modo más eficiente y preciso. Estas circunstancias explican que se hayan identificado hasta ahora más de 500 proteín-quinasas y más de 150 proteín-fosfatasas. Al número de quinasas y fosfatasas hay que añadir numerosas proteínas adaptadoras, que, en último término, hacen que una misma proteín-quinasa (o fosfatasa) pueda actuar sobre casi un tercio del total de proteínas del proteoma humano. De momento, se han identificado más de un centenar de proteínas diana para la proteín-quinasa A y 20.000 proteínas para el repertorio de quinasas.

Los aspectos funcionales de quinasas y fosfatasas adquieren gran complejidad por el hecho de que ambas puedan actuar sobre otras quinasas y fosfatasas. Este fenómeno se ilustra en la Figura 9, en la que podemos ver que la señalización celular, en este caso por el sistema proteín-quinasa activada por mitógenos (MAPK), se organiza en forma

de cascada, en las que la activación de una quinasa induce la activación de otras quinastas. Las últimas deciden el o los procesos celulares que ocurren en respuesta al estímulo inicial. Los fallos en la funcionalidad de quinastas y fosfatasas están detrás de la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos neurodegenerativos. Además, dado que las quinastas juegan un papel central en el control de la división celular, y el cáncer se origina por una proliferación descontrolada de las células, es fácil comprender el interés terapéutico de los inhibidores de las quinastas para combatir el cáncer.

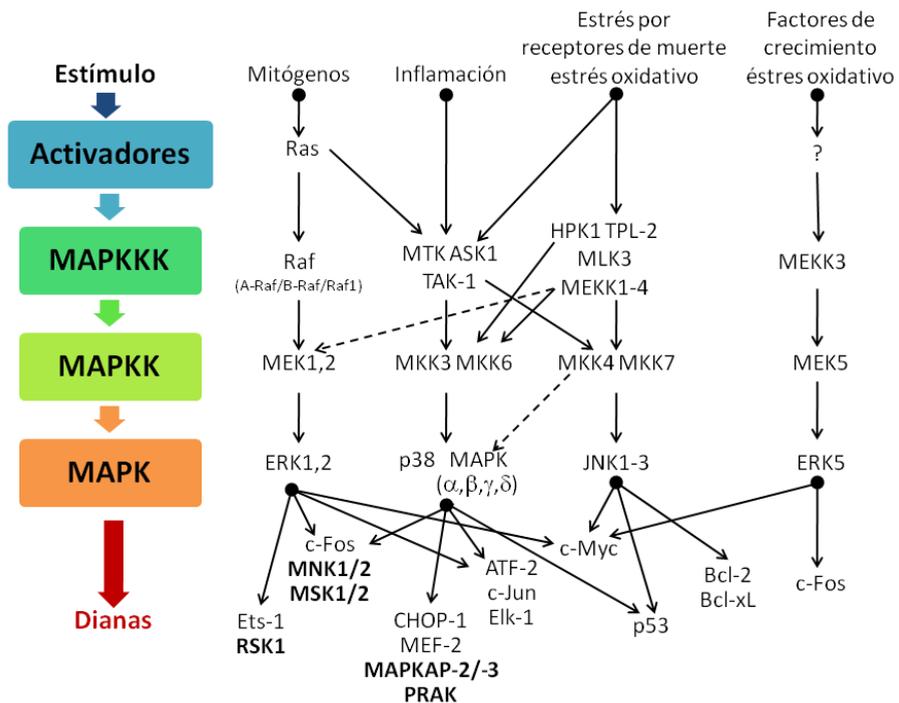


Figura 9. Activación secuencial de sucesivas quinastas y sus proteínas diana.

4.1.2. Acetilación/desacetilación

Otro cambio que afecta a las funciones de las proteínas es la adición y eliminación de restos acetilo a lisinas por las enzimas acetiltransferasas y desacetilasas. Trabajos recientes en células humanas han revelado unos 3.600 sitios de ocupación con restos acetilo en más de 1.750 proteínas, lo que da una magnitud de acetilación/desacetilación

de proteínas comparable a la de la fosforilación/desfosforilación. La acetilación de las histonas H3 y H4 afecta a la estructura de la cromatina y a la expresión génica. La desacetilación de proteínas ha atraído la atención de los científicos por los efectos de la limitación nutricional sobre las funciones de la sirtuina-1, una desacetilasa conocida como “la proteína de la longevidad” por su impacto en el aumento de la esperanza de vida en levaduras, gusanos, moscas y mamíferos.

4.1.3. Metilación/desmetilación

Respecto a las enzimas metil-transferasas y desmetilasas, que añaden y quitan restos metilo en lisinas y argininas de las proteínas, conviene precisar que, si bien se descubrieron en relación con la función de los quimiorreceptores en flagelos bacterianos y la estructura de la cromatina, sus efectos van mucho más allá. La metilación reversible es muy importante para regular la formación de mielina, la estabilidad del citocromo *c*, la funcionalidad de ciertos factores de transcripción y la señalización celular a través del receptor de interferón.

4.1.4. Oxidación de cisteínas

El proteoma humano contiene unos 214.000 restos de cisteína y el número de proteínas con una cisteína, al menos, aumenta conforme se asciende en la escala evolutiva. El aumento de cisteínas desde las bacterias hasta los humanos sugiere que la cantidad de cisteína en las proteínas puede estar relacionada con los cambios evolutivos, tanto en lo que atañe a la diversidad funcional de las proteínas como a la versatilidad de los sistemas de señalización celular. La cisteína puede reaccionar con otra cisteína de la misma u otra proteína, así como con glutatión y oxígeno. También puede reaccionar con óxido nítrico, aldehídos, restos acilo y otras moléculas (Figura 10).

A través de estas reacciones, la cisteína regula la actividad de numerosas proteínas, participa activamente en la adquisición y mantenimiento de sus estructuras y actividades biológicas, en la interacción con proteínas del citoesqueleto y de las membranas celulares, y en el transporte de proteínas al núcleo, a la mitocondria y al medio extracelular.

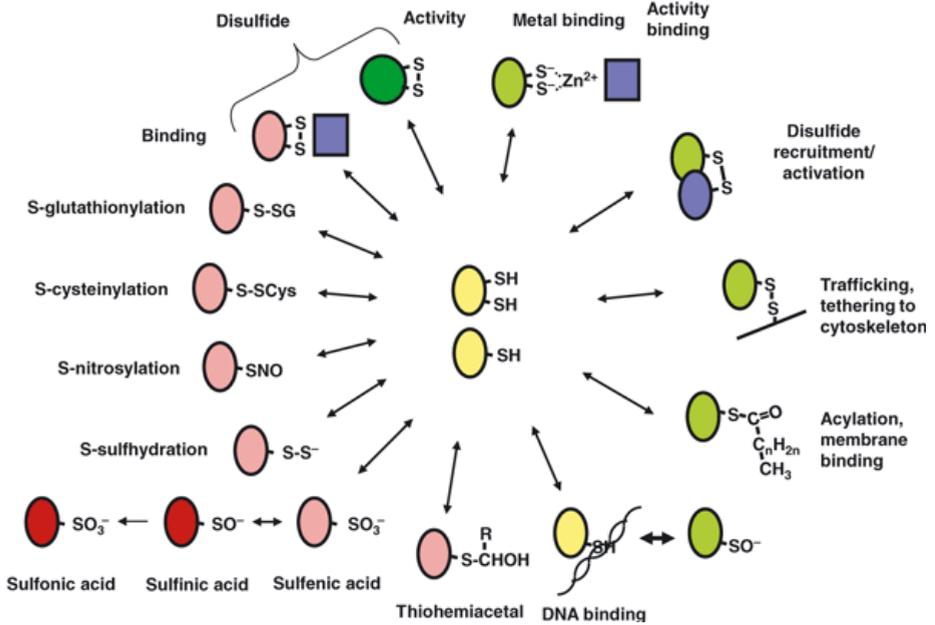


Figura 10. Modificaciones que pueden sufrir los restos SH de las cisteínas.

Cada minuto, la célula produce suficiente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como para oxidar el 0.5% de todos los grupos tioles libres de las proteínas y demás componentes celulares. Como resultado del estrés oxidativo, cientos de proteínas se oxidan parcialmente durante la actividad celular. Entre ellas, se encuentran enzimas del metabolismo, proteínas del citoesqueleto, tubulinas y dineínas, factores de transcripción, Ras, fosfatasa, proteínas del ribosoma, de señalización celular, de choque térmico, de la traducción y de los complejos respiratorios mitocondriales. El conjunto de proteínas oxidadas es el mismo o parecido en distintos tipos celulares y organismos. Aunque el estrés oxidativo, en general, perjudica a la célula, puede favorecer la actividad de algunas proteínas. Trabajos recientes indican que el H_2O_2 actúa como una molécula de señalización, ya que algunos factores de transcripción sólo son activos en estado oxidado, precisamente, para impulsar la expresión de proteínas de defensa contra la oxidación. El estrés oxidativo cambia la actividad de las células, que se ven obligadas a adaptarse a la nueva situación, mediante la activación de ciertas quinasas e inhibición de algunas fosfatasa.

Excepto en la situación anterior y en algunas más, lo normal es que el estrés oxidativo sea nocivo para la actividad celular. Para evitarlo, la célula dispone de una batería de proteínas que devuelven las cisteínas oxidadas al estado reducido, como son las tiorredoxinas, peroxirredoxinas, transferasas del glutatión y otras. El problema viene cuando la síntesis de estas proteínas reductoras falla o la producción de H_2O_2 excede la capacidad de las células para eliminarlo. Lo anterior señala la importancia del equilibrio entre las formas reducidas y oxidadas de glutatión y cisteína a la hora de mantener la funcionalidad de las proteínas y la viabilidad celular.

Pero el interés de la relación cisteína reducida/oxidada va más allá de la preservación de las actividades celulares. El estado redox varía en los ambientes celulares (más reductor en el núcleo y mitocondria, y menos en el medio intersticial y plasma). En los últimos años, se ha propuesto que el estado redox puede actuar como un sensor que condiciona y coordina todas las actividades celulares. Lo demuestran las acciones pro-apoptósicas y pro-necróticas de oxidantes, metales y reactivos electrofílicos, tanto más intensas cuanto mayor es la oxidación de las cisteínas. Además, parece probable que el estado redox influya en el ciclo celular. Dos hechos sustentan esta idea: el primero, la mayor cantidad de glutatión y tiorredoxinas en células de proliferación rápida que en las que se dividen más lentamente. El segundo, que la velocidad de división celular cambia de acuerdo con la relación de glutatión reducido y oxidado. El estado redox es más reductor en células que proliferan que en las que se diferencian. En la sangre, cuando el estado redox del plasma se hace más reductor comienzan la división de monocitos y células endoteliales; al contrario, aumenta la síntesis de citoquinas proinflamatorias en dichas células.

De momento, se desconoce cómo se regula el estado redox en las células o en la sangre “in vivo”, pero cabe la posibilidad de que la dieta desempeñe un papel importante. En efecto, se ha visto que los suplementos de cinc, en combinación con vitaminas C y E, protegen contra la oxidación en personas mayores.

En cuanto a la S-nitrosilación, entendida como la adición de óxido nítrico (NO) al grupo tiol de la cisteína, los primeros trabajos de

1985 relacionaban el NO con la activación de la guanilato ciclasa (GC). La guanilato ciclasa es la enzima que genera GMP cíclico (cGMP), un mensajero químico que activa una de las diferentes clases de proteína-quinasas. Veinticinco años después, se han identificado unas 1.000 proteínas con cisteínas modificadas con NO y varias S-nitrosilasas, transnitrosilasas y desnitrosilasas, las enzimas que añaden y quitan NO. Las proteínas que incorporan NO participan en las más diversas actividades celulares, entre las que cabe incluir la propia síntesis de NO, la actividad mitocondrial, la expresión de genes, la proliferación celular y la apoptosis, la transducción de señales, el tráfico celular, la funcionalidad de la hemoglobina y otras. Tales funciones quedarán, en mayor o menor medida, afectadas por la falta o el mal funcionamiento de alguna nitrosilasa o desnitrosilasa. Ello explica por qué los errores en la S-nitrosilación de proteínas ocasionan patologías en los sistemas respiratorio, circulatorio y cardíaco, dañan la contracción del músculo, producen trastornos neurológicos y favorecen el desarrollo del cáncer.

4.1.5. Adición y eliminación de ubiquitina

Los trabajos relativos a la identificación de la proteína ubiquitina y su participación en todo un conjunto de aspectos esenciales de la biología celular fueron desarrollados por los profesores Ciechanover, Hershko y Rose, quienes recibieron el premio Nobel de Química en el año 2004. Sus hallazgos permitieron sentar las bases de la implicación de la ubiquitina en la división celular, la replicación y reparación del DNA, la estructura de la cromatina y la expresión de genes, la endocitosis de receptores, el recambio de proteínas funcionales y la degradación de proteínas defectuosas, entre otros procesos. Para desarrollar sus acciones, la ubiquitina monomérica u oligomérica debe incorporarse, de modo reversible o irreversible a proteínas particulares. Hoy día se sabe que las células contienen cientos de enzimas que añaden ubiquitina y casi un centenar que la quitan, la mayoría con la ayuda de otro elevado número de proteínas adaptadoras (Figura 11).

Con tan solo 76 aminoácidos y 7 lisinas en las posiciones 6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63, la ubiquitina se une a algunas proteínas para alterar su estructura, actividad y capacidad de asociación con otras proteínas; también puede marcar la proteína diana para su completa destrucción

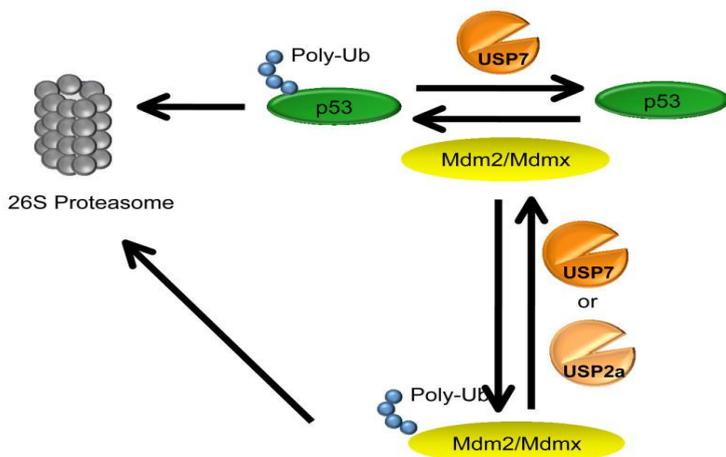


Figura 11. Adición y eliminación de ubiquitina en las proteínas.

en el proteasoma. El destino de la proteína dependerá de cuántas unidades de ubiquitina incorpore y de cómo se enlacen. Con una sola unidad, el cambio estructural de la proteína objetivo es reversible. Así se regula la asociación de las histonas H2A/H2B con el DNA y la expresión de genes. También se regula la interacción proteína-proteína y la señalización celular, via endocitosis de ciertos receptores. Con frecuencia, la proteína diana incorpora hasta cuatro unidades de ubiquitina, pero según queden ligadas el resultado será distinto. Como vemos en la Figura 12, mientras que la unión de ubiquitinas por las lisinas 48 y 29 sirve para marcar las proteínas diana para su degradación, la unión de ubiquitinas por la lisina 63 se relaciona con la activación de proteínas que reparan el DNA, regulan el tráfico de vesículas o controlan la actividad de algunas quinasas.

De entre las actividades de la ubiquitina, la más estudiada ha sido, sin duda, la relativa a la degradación proteica. A través de la degradación de proteínas, el sistema ubiquitina-proteasoma regula el ciclo celular, la autofagia, la expresión de genes y otros procesos. El conocimiento de esta vía degradativa ha permitido conocer por qué el virus del papiloma produce el cáncer de cuello de útero. El mal funcionamiento del tándem ubiquitina-proteasoma está en el origen del aumento de la actividad telomerasa y la senescencia replicativa

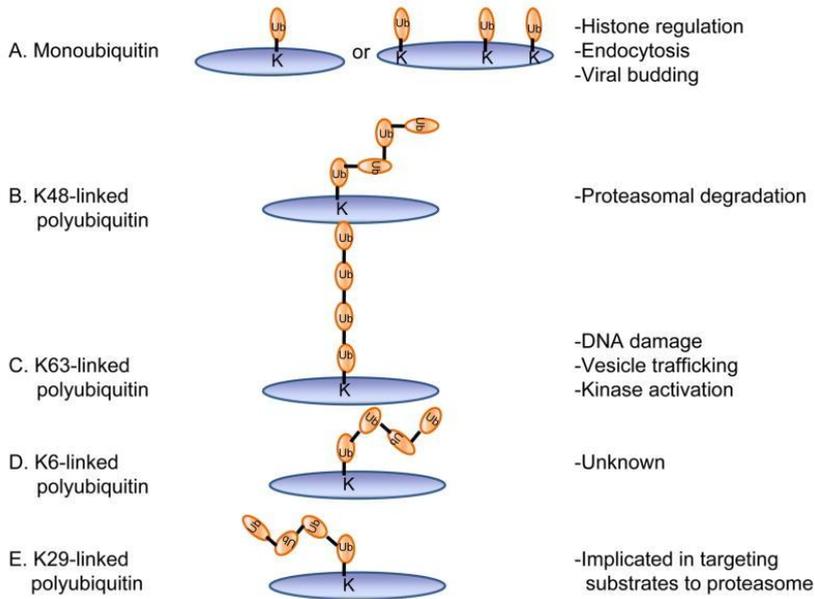


Figura 12. Significado funcional de la incorporación de ubiquitina a las proteínas.

acelerada. Los fallos en la eliminación de proteínas, vía proteasoma, contribuyen al desarrollo de tumores, inmunodeficiencias, y patologías neurodegenerativas y musculares.

4.2. Modificaciones irreversibles

Estas modificaciones permiten que muchas proteínas consigan su estructura espacial óptima y desarrollen actividad biológica, puedan alcanzar su destino celular preferente y se protejan de la proteólisis. Son cambios irreversibles, y por tanto duraderos, la formación de enlaces disulfuro, la adición de metales y grupos prostéticos y la adición permanente de restos hidroxilo, acetilo, carboxilo y sulfato. Otra modificación importante es la adición de azúcares. Lo prueba el hecho de que más de la mitad de las proteínas humanas lleven oligosacáridos. La mayoría de ellas añaden una o más copias de un oligosacárido base y ramificado en el retículo endoplásmico, que luego se remodela en el aparato de Golgi. Otras proteínas reciben azúcares sucesivos, como ocurre en las mucinas.

Algunas proteínas quedan, de modo permanente, ancladas a las membranas por restos de ácidos grasos, cadenas de poli-isopreno o restos de glicosilfosfatidilinositol. Los resultados disponibles indican que unas 500 proteínas humanas incorporan cadenas de poli-isopreno, más de 100 ácido mirístico, otras tantas ácido palmítico y casi un centenar de las proteínas de *Trypanosoma cruzi* contienen glicosilfosfatidilinositol.

Otras proteínas adicionan, de modo duradero o transitorio, nucleótidos como AMP, UMP y ADP-ribosa. Finalmente, las proteínas pueden ser fragmentadas por toda una batería de enzimas proteolíticas, un proceso cuyo interés se extiende mucho más allá de la digestión de los alimentos. La ruptura de las cadenas polipeptídicas en sitios concretos es absolutamente necesaria para que las proteínas marchen al orgánulo celular donde ejercerán sus funciones y para que proenzimas, pro-hormonas y neuropéptidos se conviertan en sus formas biológicamente activas. La división y la diferenciación celular, la fecundación, la embriogénesis, la morfogénesis, la muerte celular programada y la necrosis no serían posibles sin la ayuda de la proteólisis; tampoco la coagulación de la sangre, la activación del sistema complemento, la respuesta inmunológica y la lucha contra las infecciones. La presencia en humanos de unas 650 proteínas con actividad proteolítica pone de relieve la importancia de la proteólisis para el sostenimiento de las actividades celulares, para la construcción de los tejidos y para otros muchos procesos biológicos.

En la última parte de esta lección, comentaré los cambios post-traduccionales a que se ven sometidas las proteínas Ras, los sarcoglinanos y la tubulina para que puedan desarrollar sus funciones e intentaré explicar cómo los errores en la maduración de esas proteínas originan enfermedades como el cáncer, las distrofias musculares y el Alzheimer.

4.2.1. Maduración de las proteínas Ras. Funciones e implicación en cáncer

La familia de las proteínas Ras incluye 39 miembros que se diferencian en la región del extremo carboxilo. Algunas proteínas Ras intervienen activamente en el control de la expresión de genes que influyen en la proliferación y la diferenciación celular (Figura 13). Conviene señalar que todas las células del organismo dejan de ser funcionales al cabo de cierto tiempo, por lo que han de renovarse de forma periódica. Para la renovación, las células tienen que dividirse, pero de forma muy controlada. El crecimiento desordenado de alguno de los tipos celulares que componen los tejidos produce un tumor, que a menudo evoluciona para dar un cáncer.

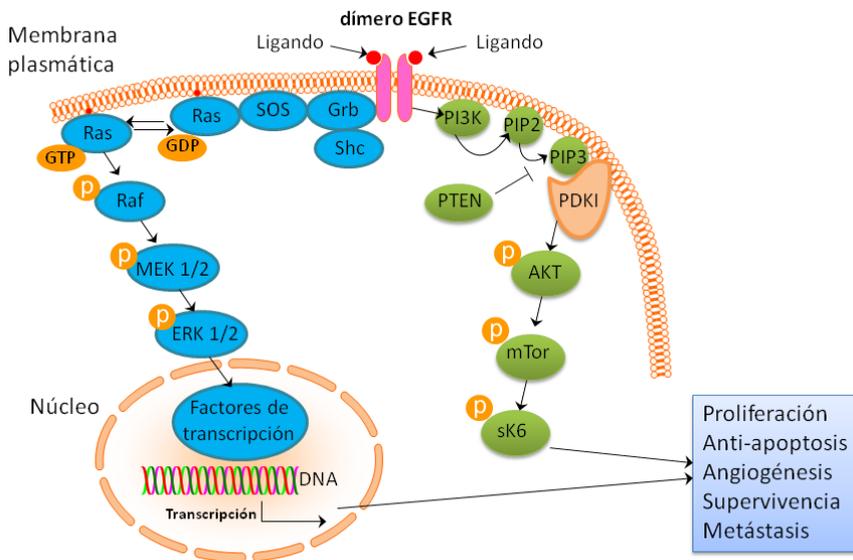


Figura 13. La activación de los receptores de crecimiento dispara toda una serie de acontecimientos celulares.

Entre las funciones de las proteínas Ras (por ejemplo K-Ras) figura la proliferación celular. La proteína K-Ras normal, es decir, la variante que no produce cáncer, impulsa la división celular de forma altamente ordenada, esto es, sólo cuando se necesita y en la medida justa. Para ello, Ras se activa por factores que favorecen la división celular y se desactiva rápidamente (Figura 13). La falta de K-Ras

afectará a la renovación celular y al funcionamiento correcto de los tejidos. En cambio, la activación prolongada de K-Ras o su producción en exceso pueden impulsar la división celular de forma persistente, el aumento del número de células y la formación de tumores.

La maduración y ubicación de K-Ras en la membrana requieren cuatro cambios post-traduccionales: 1) adición de poliisopreno; 2) incorporación de ácido palmítico; 3) ruptura del polipéptido por una proteasa específica; y 4) adición de un resto metilo en la cisteína del nuevo extremo carboxilo. Cualquier error impedirá la función de Ras para la renovación de las células. Al contrario, los fallos en la secuencia de aminoácidos, y por tanto en su estructura y función impulsarán la formación de tumores. Esto explica la observación de formas anómalas de K-Ras en el 80% de los carcinomas de páncreas, en el 40-50% de los de colon y en el 30-50% de los del pulmón. También aparecen formas aberrantes de K-Ras en carcinomas del tracto biliar, endometrio y cérvix, vejiga, hígado y mama, y en algunas leucemias.

En la medida que se consiga impedir que las variantes anómalas de K-Ras marchen a la membrana, se podrá detener la división celular en exceso y el desarrollo del cáncer. En esa dirección van las pruebas para bloquear la síntesis de la cadena poliisoprenica e impedir así que K-Ras quede anclada a la membrana. Los primeros intentos han sido francamente positivos; se ha logrado revertir el estado canceroso de las células del páncreas.

4.2.2. Glicosilación de distroglicanos y sarcoglicanos: fallos y distrofias musculares

Para que el músculo funcione correctamente es absolutamente necesario que la membrana plasmática mantenga sus propiedades de barrera, esto es, que sea impermeable a iones, metabolitos y proteínas plasmáticas. Sin embargo la membrana del músculo es muy frágil y propensa a las lesiones por el estrés mecánico inherente a los repetidos ciclos de contracción y relajación. Con todo, la realidad es que la organización de la membrana se mantiene a lo largo de la vida de un individuo y ello sólo es posible gracias a la protección que aportan otras proteínas, las cuales actúan como “grapas” que aumentan

poderosamente la resistencia de la membrana frente a la fuerza mecánica.

La resistencia de la fibra muscular está estrechamente relacionada con los complejos distrofina/laminina y utrofina/laminina. Estos complejos residen en la membrana muscular y la refuerzan por dentro y por fuera con la ayuda de otras proteínas. En la Figura 14, vemos que el eje distrofina/laminina está formado, de abajo a arriba, por distrofina, sarcoglicanos, distroglicanos y laminina.

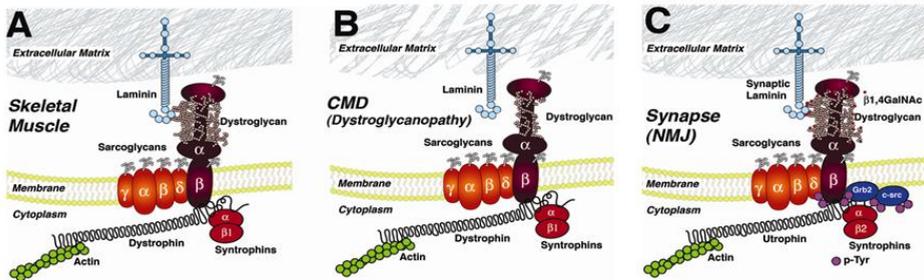


Figura 14. Proteínas del eje distrofina/laminina.
 La deficiencia de alguna de ellas produce varias clases de distrofia muscular.

Los sarcoglicanos y distroglicanos son glicoproteínas y la adición de azúcares es decisiva para que ejerzan su papel fisiológico. La importancia del eje distrofina/laminina para la integridad de la membrana muscular es tan grande que la deficiencia genética de distrofina, sarcoglicanos o laminina origina varias clases de distrofias musculares. Las distrofias son patologías de extrema gravedad porque, entre otros efectos, producen parálisis como resultado de la destrucción continua de la fibra muscular. Son enfermedades incurables, por ahora.

Los distroglicanos α y β forman parte del conjunto de proteínas del eje distrofina-laminina. En mamíferos, los dos están codificados por el mismo gen. La proteína producto incorpora azúcares antes de desdoblarse en los dos distroglicanos. El distroglicano β reside en la membrana celular y sujeta al distroglicano α. A diferencia del distroglicano β, la proteína α añade una gran cantidad de azúcares en sus 55 restos de serina y treonina. De hecho, tras la glicosilación, el tamaño del distroglicano α aumenta al doble en el músculo. Los

distroglicanos juegan un papel crucial en la construcción y función de los complejos distrofina/laminina, utrofina/laminina y actina/laminina en células musculares, neurales y en células no excitables. La pérdida de distroglicanos impide que se formen los complejos, una circunstancia letal para ratones y la razón por la que ninguna de las distrofias musculares en humanos tenga su origen en anomalías genéticas de los distroglicanos. En cambio, sí que se produce distrofia muscular cuando faltan las enzimas que introducen azúcares en el distroglicano α , un hecho que resalta la importancia de la glicosilación del distroglicano para preservar la integridad de la membrana plasmática y la funcionalidad del músculo.

En realidad, los errores congénitos en las enzimas que intervienen en la adición de azúcares, su remodelado y eliminación acarrear, con frecuencia, fallos multisistémicos, en el sentido de que afectan a la mayoría, si no a todos los órganos y tejidos, y dañan las funciones de muchas proteínas y orgánulos en los más diversos tipos celulares y en la sangre. Los errores en los genes que codifican enzimas de la glicosilación y los fallos en su transcripción, síntesis, procesamiento, transporte y acumulación en orgánulos subcelulares están detrás de numerosas patologías. Entre ellas, algunas variantes de hipotiroidismo, diabetes e hiperplasia adrenal, inmunodeficiencias, enfermedades hematológicas, la deficiencia de sacarasa/isomaltasa, las enfermedades de Gaucher y Niemann-Pick, fibrosis quística, retinitis pigmentosa, quilomicronemia, hipercolesterolemia, enfisema y varios trastornos neurológicos. La lista incluye el cáncer, dado que los glicanos son importantes para regular la actividad y endocitosis de algunos receptores de factores de crecimiento celular.

4.2.3. Maduración de tau y biosíntesis de beta-amiloide: relación con la enfermedad de Alzheimer

Voy a terminar esta lección comentando algunos aspectos relativos a la maduración de la proteína tau y del péptido precursor del beta-amiloide porque, en opinión de los expertos, los fallos en su procesamiento pueden estar en el origen, o al menos contribuir en buena medida, al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias.

Se calcula que actualmente hay 30 millones de personas con la enfermedad de Alzheimer y se admite que la población afectada aumentará hasta los 100 millones en las próximas décadas, si no se descubre un tratamiento eficaz. En España hay unos 600.000 enfermos de Alzheimer y en 20 años habrá el doble. A pesar de los numerosos estudios y los cuantiosos recursos invertidos, hoy por hoy se desconoce el verdadero origen del Alzheimer. Aunque su desarrollo se ha relacionado con efectos neurotóxicos, infecciosos e inmunológicos, es probable que confluyan factores genéticos y ambientales. En este sentido, se sabe que el riesgo de contraer Alzheimer es mayor en pacientes aquejados de hipertensión, niveles elevados de colesterol en sangre, diabetes y patologías coronarias.

En el cerebro de Alzheimer abundan dos tipos de formaciones histopatológicas: los nudos u ovillos neurofibrilares (Figura 15) y las placas seniles (Figura 16). La opinión más extendida es que las dos estructuras son tóxicas para las neuronas y que la toxicidad favorece su destrucción. La muerte de neuronas en áreas cerebrales concretas, la supresión parcial de algunas redes y la consiguiente interrupción de la comunicación entre circuitos cerebrales ocasionan Alzheimer y otras neuropatologías.

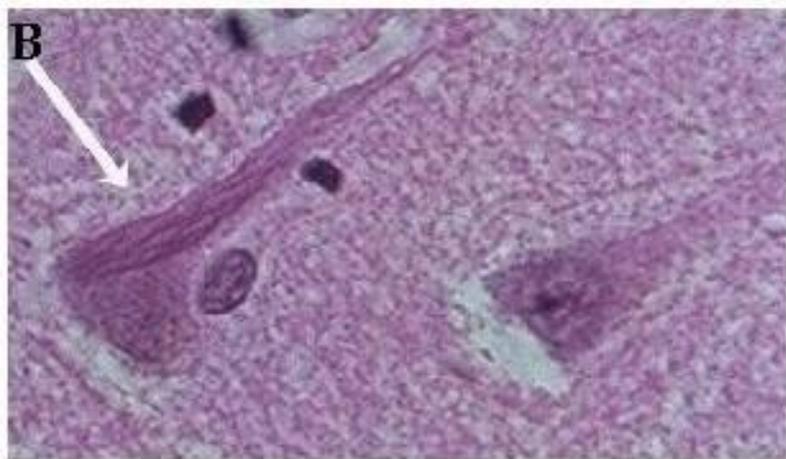


Figura 15. Aspecto de los nudos neurofibrilares en cerebro post-mortem de pacientes con Alzheimer.

Los ovillos neurofibrilares están compuestos por variantes aberrantes de tau. Estas variantes contienen numerosos restos de fosfato y presentan fuerte tendencia a formar agregados insolubles.

Mientras que la proteína tau no patológica desempeña un papel esencial en la estabilidad de los microtúbulos y el transporte axonal, las variantes aberrantes de tau, bien por fallos en la unión de exones, bien por errores en los cambios post-traduccionales, pierden la capacidad de regular la formación de microtúbulos y perjudican a su funcionalidad. La relación entre las variantes anormales de tau y el mal de Alzheimer se sustenta en el hecho de que la desorganización de los microtúbulos altera el transporte de material hacia los orgánulos subcelulares de la neurona y, por tanto, afecta a su viabilidad. Algunos científicos creen que el deterioro cognitivo del mal de Alzheimer se puede detener, o frenar, con sustancias que estabilicen los microtúbulos. Los primeros resultados de esta aproximación han sido muy alentadores, por lo que las investigaciones continúan.

En cuanto a las placas seniles, el hecho que las distingue es la profusión de agregados de beta-amiloide ($A\beta$), un péptido que se genera por proteólisis limitada de la proteína precursora del péptido beta-amiloide (APP). En la proteólisis intervienen BACE1 y el complejo γ -secretasa, formado por las proteasas presenilina-1 o presenilina-2 y otras proteínas. El péptido $A\beta$ ejerce acciones protectoras sobre las neuronas, pero en exceso produce agregados con acciones neurotóxicas. En situaciones normales, la cantidad de $A\beta$ se regula ajustando la velocidad de síntesis y destrucción, de modo que los fallos en la eliminación pueden tener graves consecuencias.

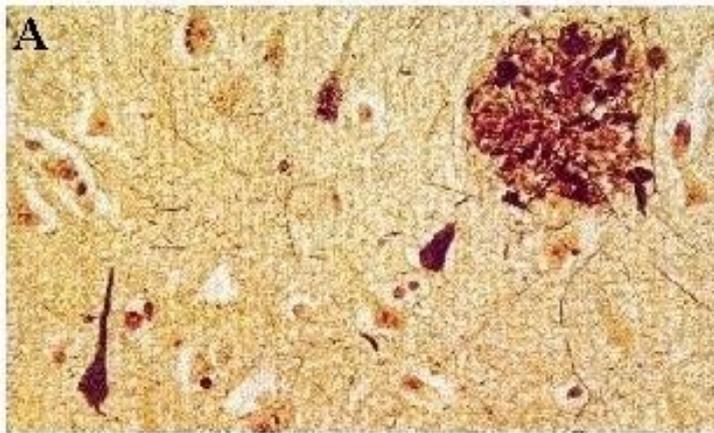


Figura 16. Aspecto de las placas seniles en el encéfalo de pacientes con Alzheimer.

Para comprender la importancia del procesamiento de $A\beta$ y su síntesis en cantidad suficiente, pero no en exceso, basta decir que las personas que presentan errores congénitos en la expresión de la proteína APP o las presenilinas manifiestan una fuerte tendencia a la formación de placas seniles y al desarrollo de una forma temprana y agresiva de Alzheimer. Por otro lado, cuanto mayor es la cantidad de $A\beta$ mayor es la síntesis de la proteasa BACE1 y, al revés, los ratones manipulados genéticamente para que no expresen BACE1 no producen $A\beta$ y, aparentemente, son normales.

Con todo lo anterior, es fácil comprender que una de las estrategias que se persiguen para rebajar la producción de $A\beta$ y combatir el Alzheimer, se basa en la supresión o, al menos, inhibición de las actividades BACE1 y/o γ -secretasa. El problema que surge a la hora de abordar esta aproximación es la necesidad de salvar la escasa permeabilidad de la barrera hematoencefálica. En efecto, el agente en cuestión debe ser capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro para que, ya en el interior de las neuronas, pueda ejercer la acción supresora o inhibidora. A pesar de este problema, hoy día se dispone de inhibidores de BACE1 que cuando se administran a ratones reducen la producción de $A\beta$ a la mitad. Las pruebas clínicas en fase III con pacientes de Alzheimer comenzaron en 2008, y aunque los resultados no sean totalmente satisfactorios, las pruebas marcarán un antes y un después en la lucha contra el Alzheimer.

La segunda alternativa, la que se refiere a la inhibición de la actividad proteolítica del complejo γ -secretasa, para prevenir la excesiva producción de $A\beta$, choca con el problema de la impermeabilidad de la barrera sangre-cerebro y con otro todavía mayor, el elevado número de proteínas que necesitan la acción de γ -secretasa para convertirse en sus formas biológicamente activas. Entre éstas figuran APP, los receptores Notch, cadherinas y otras 30 proteínas. Naturalmente, la inhibición de γ -secretasa afectará, en mayor o menor medida, a la maduración de todas ellas, lo que acarreará más problemas que soluciones. Con todo, los estudios en curso se centran en la búsqueda de inhibidores específicos de la acción de γ -secretasa sobre APP y que no afecten al procesamiento de otras proteínas. El hallazgo de varios agentes con esa condición ha dado un fuerte impulso a la investigación en este campo. Actualmente, la

combinación de inhibidores de BACE1 y γ -secretasa parece ser la alternativa más prometedora para combatir el Alzheimer.

5. Epílogo

Como acabamos de ver, la complejidad biológica no sólo emana del número de genes de los organismos. La uniformidad de la dotación cromosómica en el repertorio de células contrasta con el conjunto de RNA mensajeros y proteínas en cada tipo celular. La razón estriba en el delicado control de la expresión de genes en cada clase de célula, de modo que la diversidad de proteínas mejore sus posibilidades de supervivencia y las relaciones con otras células y con el entorno. La diversificación de las proteínas, mediante el sellado alternativo de exones y los cambios post-traduccionales, supuso un fuerte impulso a la aparición de la variedad de tipos celulares, facilitando la formación de tejidos, órganos y organismos. Sin embargo, estas estrategias de diversificación trajeron consigo nuevas fuentes potenciales de error, y con ello nuevas enfermedades, a consecuencia de fallos moleculares.

El interés creciente por la ciencia, el entusiasmo de los jóvenes investigadores, los hábitos más saludables y los nuevos tratamientos farmacológicos, todo ello unido al mejor conocimiento del origen de las enfermedades, la disponibilidad de técnicas de diagnóstico más precisas y las nuevas terapias reparadoras, a nivel molecular y celular, alumbrarán una nueva era con más y mejores alternativas para prevenir y combatir las enfermedades.

6. Bibliografía

Anthony K., Gallo J.M. (2010) Aberrant RNA processing events in neurological disorders. *Brain Res.* 1338: 67-77.

Brunden K.R., Yao Y., Potuzal J.S., et al. (2010) The characterization of microtubule-stabilizing drugs as possible therapeutic agents for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Pharmacol. Res.* En prensa.

Cooper T.A., Wan L., Dreyfuss G. (2009) RNA and disease. *Cell* 20: 777-793.

De Strooper B., Annaert W. (2010) Novel research horizons for presenilins and γ -secretases in cell biology and disease. *Annu. Rev. Cell Dev.* 26: 235-260.

Elvang A.B., Volbracht C., Pedersen L.O., et al. (2009) Differential effects of γ -secretase and BACE1 inhibition on brain A β levels in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 110:1377-1387.

Faustino N.A., Cooper T.A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 17: 419-437.

Giuffrida M.L., Carci F., de Bona P., et al. (2010) The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology. *Rev. Neuroci.* 21: 83-93.

Hoe H.S., Lee H.K., Park D.T. (2010) The upside of APP at synapses. *CNS Neurosci. Ther.* In press.

Hubbard, S.R. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J.* 16: 5572-5581.

Jones D.P. (2010) Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling. *J. Intern. Med.* 268: 432-448.

Legendre P., Förstera B., Jüttner R., Meier J.C. (2009) Glycine receptors caught between genome and proteome. Functional implications of RNA editing and splicing. *Front. Mol. Neurosci.* En prensa.

Leoni V., Salomon A., Kivipelto M. (2010) Links between ApoE, brain cholesterol metabolism, tau and amyloid beta-peptide in patients with cognitive impairment. *Biochem. Soc. Trans.*, 38: 1021-1025.

Licatalosi D.D., Darnell R.B. (2010) RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nature Rev. Genet.* 11: 75-87.

Lukong E., Chang K.W., Khandjian E.W., Richard S. (2008) RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet.* 24: 416-425.

Martone R.L., Zhou H., Atchison K., et al. (2009) Begacestat (GSI-953). A novel, selective thiophene sulphonamide inhibitor of amyloid precursor protein gamma-secretase for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331: 598-608.

Montanaro F., Martin P.T. (2011) Defective glycosylation of dystroglycan in muscular dystrophy and cancer. En: *Protein Reviews Series 13. Post-Translational Modifications in Health and Disease* (C.J. Vidal ed.) pp. 119-143. Springer. New York, USA.

Moral-Naranjo M.T., Montenegro M.F., Muñoz-Delgado E., et al. (2010) The level of both lipid rafts and raft-located acetylcholinesterase dimers increase in muscle of mice with muscular dystrophy by merosin deficiency. *Biochim. Biophys. Acta. Molecular Basis of Disease.* 1802: 754-764.

Muñoz-Delgado E., Montenegro M.F., Campoy F.J., et al. (2010) Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma. *FEBS J.* 277: 4159-4529.

Nguyen U.T.T., Goodall A., Alexandrov K., et al. (2011) Isoprenoid modifications. In: *Protein Reviews Series 13. Post-Translational Modifications in Health and Disease* (C.J. Vidal ed.) pp. 1-37. Springer. New York, USA.

Ohtsubo K., Marth J.D. (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855-867.

Reinders J., Sickmann A. (2007) Modificomics: posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. *Biomol. Eng.* 24: 169-177.

Sims R.J. 3rd, Reinberg D. (2008) Is there a code embedded in proteins that is based on posttranslational modifications? *Nature Rev.* 9: 1-6.

Sperling J., Azubel M., Sperling R. (2008) Structure and function of the pre-mRNA splicing machine. *Structure* 16: 1605-1615.

Van Blitterswijk M., Landers J.E. (2010) RNA processing pathways in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* 11: 275-290.

Walsh C., Garneau-Tsodikova S., Gatto G.J. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversification. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 7342-7372.