

SE CELEBRO EL CICLO «RECEPTORES CELULARES Y SEÑALES QUÍMICAS»

■ Cincuenta científicos, entre ellos 11 Premios Nobel, han participado en estas sesiones desde 1982

Cincuenta destacados científicos de diversos países —entre ellos once Premios Nobel— han participado en los ciclos que en torno a diversos temas relacionados con la Biología Molecular y sus Aplicaciones viene organizando la Fundación Juan March en su sede desde 1982, dentro de la especial atención que esta institución dedica a dicha área, a través de conferencias y de su Plan de Ayudas y Becas en la materia. «La nueva Biología», «La nueva Neurobiología», «ADN y cáncer», «DNA y expresión genética», «Medicina Molecular» y, recientemente, «Receptores celulares y señales químicas» han sido los temas de los seis ciclos de conferencias en los que investigadores considerados como máximos especialistas en sus respectivas áreas de trabajo, así como destacados doctores españoles, procedentes de diversas universidades y laboratorios de investigación de nuestro país, han explicado los resultados de sus últimos trabajos. En estos seis últimos años han intervenido en estas sesiones los Premio Nobel de Medicina Rodney Porter, César Milstein, David H. Hubel, Roger Guillemin, Christian De Duve, Gerald M. Edelman y el español Severo Ochoa; y los Premios Nobel de Química Frederick Sanger, Aaron Klug, Walter Gilbert y Max Ferdinand Perutz.

En cada ciclo, las conferencias fueron precedidas de una presentación del ponente, a cargo de un científico conocedor de sus investigaciones y de su significación en el panorama general de la investigación biológica.

En el primero de estos ciclos, dedicado a la nueva Biología, dieron conferencias **Antonio García Bellido**, profesor de Investigación en el Centro de Biología Molecular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, de Madrid, quien habló sobre «La morfogénesis en los seres vivos», y fue presentado por el doctor Federico Mayor Zaragoza; el Premio Nobel de Medicina 1972 **Rodney Porter**, profesor de Bioquímica en la Universidad

de Oxford (Inglaterra), que abordó el tema de la base molecular de la inmunidad en las enfermedades infecciosas, presentado por José M. Kreisler; el argentino **César Milstein**, también Premio Nobel de Medicina, cuya conferencia se titulaba «Anticuerpos monoclonales: ¿por qué y para qué?», quien fue presentado por Julio Rodríguez Villanueva; y **Sidney Brenner**, director del Laboratorio de Biología Molecular del Medical Research Council, de Cambridge (Inglaterra), quien, presentado por Carlos Asensio, habló sobre «La nueva Biología: avances en Ciencia y Tecnología».

También de cuatro sesiones constó el Ciclo que en mayo de 1983 se dedicó al tema de «La

nueva Neurobiología». En él participaron los Premios Nobel de Medicina **David H. Hubel** y **Roger Guillemin**, quienes, presentados, respectivamente, por Antonio Gallego Fernández y José Manuel Rodríguez Delgado, disertaron sobre «El ojo, el cerebro y la percepción» (Hubel) y «Control de la hormona del crecimiento» (Guillemin). Además de estos dos científicos, participaron el argentino **A. Claudio Cuello**, supervisor de los Laboratorios de Investigación del Departamento de Farmacología y Anatomía Humana de Oxford («De Cajal a la Neuroanatomía bioquímica»), y el inglés **Leslie L. Iversen**, director ejecutivo del Neuroscience Research Centre («Mensajeros químicos del cerebro»). Fueron presentados por los doctores Galo Ramírez Ortiz y David Vázquez Martínez, respectivamente.

Al tema del «ADN y cáncer» se consagró el tercero de estos ciclos, celebrado en febrero de 1984. En esta ocasión también dos de los cuatro conferenciantes eran Premios Nobel (de Química): **Frederick Sanger** (que obtuvo el citado galardón en 1958 y 1980) y **Aaron Klug** (Premio Nobel en 1982), ambos del Medical Research Council Centre, de la Universidad de Cambridge (Inglaterra). Sanger, que fue presentado por Juan Antonio Subirana, habló de «Cómo leer el mensaje del ADN», y Aaron Klug, que lo fue por Eladio Viñuela, acerca de «La estructura de los cromosomas». Las dos últimas sesiones del ciclo estuvieron a cargo de **George Klein**, del Karolinska Institutet, de Estocolmo (Suecia), que habló sobre «La activación de oncogenes por translocaciones cromosómicas: ¿un mecanismo en la carcinogénesis?», y de **Manuel Perucho**, de la Universidad del Estado de Nueva York

en Stony Brook (Estados Unidos), que se ocupó de «Transferencia génica y oncogenes». José María Segovia de Arana y Carlos Vicente Córdoba presentaron, respectivamente, a estos dos científicos.

La cuarta reunión científica de esta serie, en 1985, trató del «DNA y expresión genética» y contó con la intervención de cinco destacados especialistas: la doctora **Margarita Salas**, profesora de Investigación del CSIC, adscrita al Centro de Biología Molecular («Iniciación de la replicación del DNA»); el británico **John Bertrand Gurdon**, catedrático de Biología Celular de la Universidad de Cambridge e investigador en la Campaña de Investigación del Cáncer-Grupo de Embriología Molecular de dicho centro («La expresión genética y su control durante el desarrollo embrionario»); el Premio Nobel de Química 1980 **Walter Gilbert** («Intrones/exones: la evolución del gen»); el científico holandés **Piet Borst**, director de Investigación del Instituto Holandés del Cáncer, de Amsterdam («Control de la expresión genética mediante la redistribución de los genes»); y el soviético **Yuri Ovchinnikov**, director del Instituto Shemyakin de Química Biorgánica, de Moscú («Transcripción, promotores y expresión de genes heterólogos»). Presentaron a estos cinco científicos los doctores Francisco García Olmedo, Joan Modolell, Enrique Cerdá, Antonio Sillero y el Premio Nobel Severo Ochoa.

En mayo de 1986, el ciclo trató sobre el tema genérico de «Medicina Molecular» y contó con la participación de tres Premios Nobel: **Max Ferdinand Perutz** (de Química 1962), **Christian De Duve** (de Medicina 1974) y, en calidad de presentador, el español **Severo Ochoa** (de Medi-

cina 1959). El doctor Perutz habló sobre «Cristalografía de Rayos X y diseño de drogas»; De Duve, del Instituto Internacional de Patología Celular y Molecular de Bruselas, lo hizo sobre «Lisosomas y Medicina»; el doctor **David J. Weatherall**, del Departamento de Medicina Clínica de Nuffield, Universidad de Oxford, trató sobre «ADN recombinante y la prevención de enfermedades hereditarias»; y el español **Eladio Viñuela**, del Centro de Biología Molecular del C.S.I.C., sobre «Evasión del virus de la peste porcina africana del sistema inmunológico». Estos cuatro científicos fueron presentados por José A. López de Castro (Perutz); Antonio García-Bellido (Viñuela); Manuel Serrano Ríos (De Duve); y César Milstein (Weatherall).

Receptores celulares y señales químicas

El Premio Nobel de Medicina 1972, Gerald M. Edelman, y los doctores Michael J. Berridge, de la Universidad de Cambridge (Inglaterra); Jean-Pierre Changeux, del Instituto Pasteur, de París; Pedro Cuatrecasas, de la Glaxo Inc. (Estados Unidos); Miguel Beato, de la Phillips Universität, de Marburgo (Alemania); y Leo Sachs, del Weizmann Institute of Science, de Rehovot (Israel), intervinieron en el último de estos ciclos científicos, celebrado recientemente, del 2 de marzo al 6 de abril, en la Fundación Juan March.

Los citados científicos fueron presentados, respectivamente, por los doctores **Severo Ochoa**, del Centro de Biología Molecular, de Madrid, y Premio Nobel de Medicina; **José A. Hedo**, del C.S.I.C.-Fundación Jiménez-Díaz;

Antonio G. García, de la Universidad de Alicante; **Alberto Sols**, **Gabriela Morreale** y **Manuel N. Fernández**, los tres últimos de la Universidad Autónoma de Madrid.

Abrió el ciclo **Michael J. Berridge** con una conferencia sobre «Señales de transducción en membranas biológicas». Nacido en Rhodesia en 1938, el doctor Berridge investiga desde 1969 en la Unidad de Química y Fisiología de Invertebrados de la Universidad de Cambridge (Inglaterra). Su campo de investigación principal se centra en la acción de las hormonas y los neurotransmisores al nivel celular. Por su parte, el doctor **Jean-Pierre Changeux** habló sobre «El receptor de la acetilcolina». Nacido en Domont (Val d'Oise), Francia, en 1936, Changeux es jefe del Laboratorio de Neurobiología Molecular del Instituto Pasteur, de París, y profesor de este Instituto y del Collège de France.

La tercera sesión del ciclo corrió a cargo del científico de origen español, nacionalizado norteamericano, **Pedro Cuatrecasas**, y versó sobre «Receptores de membrana: estructura y función». Nacido en 1936 en Madrid, es actualmente profesor en los Departamentos de Medicina y de Farmacología y Fisiología de las Universidades de Duke, en Durham, y de Carolina del Norte, en Chapel Hill, y vicepresidente «senior» de los Laboratorios Glaxo Inc. de Investigación y Desarrollo, que dirige desde 1986.

De la «Regulación de la expresión génica por hormonas esteroideas» trató el español, residente en Alemania, **Miguel Beato**. Nacido en Salamanca en 1939, desde 1977 es profesor de Bioquímica en el Instituto de Química Fisiológica de la Universidad de Marburgo (Alema-

nia) y anteriormente fue investigador asociado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Columbia en Nueva York.

Siguió la intervención de **Leo Sachs**, en torno a «Control molecular del desarrollo». Nacido en 1924, Sachs es, desde 1952, investigador científico y director del Departamento de Genética del Weizmann Institute of Science, de Rehovot (Israel).

Finalmente, el ciclo se cerró con la intervención del Premio Nobel de Medicina 1972 **Gerald**

M. Edelman, que habló sobre «Regulación molecular del desarrollo de tejidos y órganos». Nacido en Nueva York en 1929, Edelman es profesor en la Rockefeller University de Nueva York. Desde 1981 dirige un Programa de Investigación en Neurociencia del Instituto de Neurociencia. Le debemos nuestro conocimiento actual de la estructura de los anticuerpos.

Seguidamente se ofrece un resumen de las distintas conferencias del ciclo, así como un extracto de las palabras de los presentadores.

Michael Berridge:

«SEÑALES DE TRANSDUCCION
EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS»



Las células responden a una gran variedad de señales químicas externas, como por ejemplo hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, los cuales se unen específicamente a receptores situados en la superficie celular. Estos receptores están ligados a mecanismos de transducción, cuya misión consiste en transformar la señal externa en una o unas pocas señales internas o segundos mensajeros —el ATP cíclico es el clásico ejemplo.

En esta conferencia nos centraremos en un mecanismo de transducción descubierto recientemente, el cual se basa en la ruptura de un lípido de inositol para generar dos segundos mensajeros: el inositol trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DG). En este mecanismo de transducción están implicadas tres proteínas de membrana: la más externa es una proteína recep-

tora, capaz de unirse específicamente a la señal externa. La siguiente es una proteína transductora, capaz de trasladar a la señal a una enzima.

Esta proteína transductora es de especial interés, ya que podría tratarse del producto del oncogen «Ras». La proteína más interna cataliza la hidrólisis de un substrato fosforilado, el PIP₂, que es un componente de la membrana plasmática, en inositol trifosfato y diacilglicerol. La primera es una sustancia soluble en el citoplasma, donde actúa como segundo mensajero, provocando la liberación de calcio procedente de almacenes intracelulares del retículo endoplásmico.

La elevación de la concentración de calcio en el citoplasma modifica diversas actividades intracelulares y desencadena la

respuesta biológica final. El otro producto de la hidrólisis inicial, el diacilglicerol, permanece en la membrana plasmática, donde activa una enzima denominada proteína-quinasa C, la cual es capaz de transferir grupos fosfato a otras proteínas y modificar así la función de las mismas. Por otra parte, un derivado del IP₃, el I (1, 3, 4, 5) P₄, modifica la actividad de las proteínas de la membrana plasmática responsables del transporte de calcio. Tanto el IP₃ como el DG son finalmente reciclados al componente fosforilado inicial.

Este mecanismo de activación celular es utilizado por un buen número de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, y está implicado en una gran variedad de procesos biológicos, entre los que cabe destacar la contracción del mús-

culo, la fertilización y la transmisión del impulso nervioso.

Utilizando colorantes fluorescentes específicos para el calcio, hemos podido comprobar que el proceso de fertilización de la célula huevo lleva consigo un drástico aumento de los niveles de calcio. La inyección de IP₃ en oocitos mimetiza la acción de la fertilización. En este caso la liberación de calcio parece afectar a la regulación de la expresión génica.

Este mecanismo también interviene en la transmisión del impulso nervioso. El PIP₂, al controlar los niveles intracelulares de calcio, es capaz de modular la señal nerviosa.

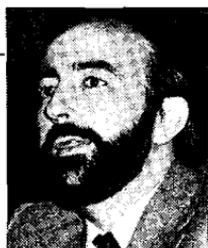
Por otra parte, tanto IP₃ como DG afectan a la apertura-cierre de los canales de potasio, regulando así la excitabilidad neuronal.

José A. Hedo:

«ACTIVACION CELULAR POR SEGUNDOS MENSAJEROS»

Una de las cuestiones centrales de la biología moderna es el estudio de los mecanismos por los que las señales químicas externas son analizadas, transmitidas y amplificadas en el interior de la célula. Los trabajos de Michael J. Berridge han tenido un papel fundamental en la caracterización de un nuevo sistema de activación celular mediante segundos mensajeros. En este sistema, la unión de la hormona o señal química al receptor provoca la escisión o hidrólisis de un componente de la membrana celular, un fosfolípido denominado fosfatidilinositol bifosfato.

El descubrimiento del mecanismo de activación celular a



partir de los derivados del fosfatidilinositol ha estimulado a numerosos laboratorios a estudiar su papel en muy diversos modelos biológicos. Este sistema es utilizado por un buen número de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento y está involucrado en una gran variedad de procesos fisiológicos, tales como la fertilización, la secreción, la contracción muscular, el metabolismo y la multiplicación celular. No obstante, su mayor interés conceptual estriba en que muestra cómo en respuesta a una señal química externa se generan dos mensajeros intracelulares distintos.

Jean-Pierre Changeux:

«EL RECEPTOR DE LA
ACETILCOLINA»



La comunicación entre las neuronas y los órganos que inervan se realiza mediante el proceso de transmisión sináptica. A la terminación nerviosa que genera el mensaje se denomina elemento presináptico, y la célula efectora que recibe el mensaje se llama elemento postsináptico. Ramón y Cajal demostró que ambos elementos no tienen contacto físico. La transmisión del impulso nervioso a través de la hendidura sináptica se realiza mediante una sustancia neurotransmisora. En el caso de las sinapsis colinérgicas, el neurotransmisor es acetilcolina. Cuando el impulso nervioso, que se transmite en forma de señal eléctrica, llega a la terminación del elemento presináptico, se produce una entrada de calcio extracelular en dicha terminación, que produce la liberación de acetilcolina. Esta molécula se difunde rápidamente y alcanza la superficie del elemento postsináptico, donde se une reversiblemente a una proteína: el receptor colinérgico. El efecto de esta unión es la apertura de un poro o canal iónico formado por la propia proteína receptora, lo que genera una nueva señal eléctrica que acarrea una determinada respuesta fisiológica. La aplicación exógena de acetilcolina mimetiza la respuesta eléctrica.

El receptor de acetilcolina es una proteína oligomérica compuesta de cuatro subunidades, una de las cuales está repetida. Su peso molecular es de 50-60.000 d. Se trata de una pro-

teína transmembranal, esto es, que atraviesa la membrana plasmática de la célula postsináptica, yendo desde el exterior de dicha célula hasta el citoplasma. Este receptor posee un eje de cuasimetría. El receptor se ha purificado utilizando un análogo de acetilcolina marcado radiactivamente y empleando cromatografía líquida de alta presión. Una ventaja importante para el estudio del sistema estriba en que el receptor purificado puede incorporarse en membranas artificiales manteniendo su actividad biológica.

Cada una de las subunidades que constituyen el receptor ha sido purificada y determinada su secuencia de aminoácidos. Se ha encontrado que existe un 40-60% de homología entre las cadenas. A partir de estos datos es posible predecir la estructura espacial del receptor. La zona más externa es hidrofílica y contiene el sitio de unión a acetilcolina. La parte que atraviesa la membrana está formada por varias hélices alfa, ricas en aminoácidos hidrofóbicos; en esta zona se encuentra el canal iónico. Finalmente, la parte de la proteína que se encuentra en el citoplasma tiene carácter hidrofílico.

Utilizando un antagonista fotolábil (DDF), ha sido posible localizar el sitio de unión a acetilcolina en el dominio 179-207 de la subunidad alfa. Asimismo se ha encontrado un sitio único

de alta afinidad para la sustancia clorpromazina, un inhibidor no competitivo del canal iónico.

La evolución de la distribución topográfica y propiedades del receptor de acetilcolina durante la formación de la unión neuromuscular en células de pollo conlleva una secuencia compleja de procesos, incluyendo diferentes niveles en la expresión del gen del receptor. Podemos distinguir tres etapas básicas. En la primera se produce una expresión del gen consecutiva a la fusión de mioblastos y miotúbulos. Posteriormente se produce una represión de la biosíntesis del receptor

que conduce a su desaparición en las zonas de la membrana ajenas a la unión sináptica. Finalmente hay un incremento en la expresión de este gen cuya consecuencia es la acumulación del producto en la zona sináptica. La obtención de clones de c-DNA de las distintas subunidades del receptor ha permitido establecer que la represión transitoria de su biosíntesis es esencial para la correcta transmisión del impulso nervioso. La obtención y caracterización de clones genómicos ha permitido comprobar que los promotores de estos genes inducen especificidad de tejido.

Antonio G. García:

«ESTRUCTURA Y FUNCION DEL RECEPTOR COLINERGICO»

Las contribuciones científicas más notables del doctor Changeux se relacionan con la caracterización molecular de una proteína de membrana: el receptor para la acetilcolina. La estructura molecular y la función del receptor colinérgico se conocen hoy en detalle gracias a los trabajos del doctor Changeux. Ha utilizado metodologías fisiológicas para esclarecer los cambios eléctricos que la activación del receptor genera en las células que lo poseen. Descubrió que el sitio de unión para el neurotransmisor podría ser ocupado irreversiblemente por ciertas toxinas extraídas de venenos de serpientes y otras que se fijaban específicamente al poro que forma el canal iónico. La utilización de toxinas radiactivas llevó al doctor Changeux a una observación importante: que se unían de manera irreversible al receptor. En consecuencia, las utilizó



como sondas para marcar irreversiblemente los receptores; con ello dio importantes pasos en el intento de aislar, purificar y caracterizar molecularmente el receptor.

Previamente había trabajado con el Premio Nobel Monod y junto con Wyman había descrito un «modelo alostérico concertado» que explicaba los mecanismos de acción de ciertas enzimas.

Hoy, gracias a sus trabajos, conocemos la secuencia completa de las cuatro subunidades de que se compone el receptor y muchas de sus transiciones conformacionales, que regulan la apertura y cierre del canal. Es posible que en la actualidad no se conozca con tanto grado de detalle y sofisticación ninguna otra proteína receptora como la del receptor para la acetilcolina.

Pedro Cuatrecasas:

«RECEPTORES DE MEMBRANA:
ESTRUCTURA Y FUNCION»



Los receptores son proteínas de membranas capaces de unirse específicamente a un ligando (por ejemplo, hormonas, factores de crecimiento, etc.) y desencadenar una respuesta biológica. Este proceso puede llevarse a cabo mediante distintos mecanismos: (1) En el caso más simple, el propio receptor es un ionóforo. La unión con el ligando lo activa permitiendo el paso de iones a través de la membrana. Este cambio transitorio en la concentración iónica del citoplasma es desencadenante de una respuesta celular. (2) El receptor puede activar una enzima, o bien (3) el propio receptor tiene actividad enzimática cuando se une al ligando y da lugar a un producto que desencadena una respuesta. (4) La respuesta también puede producirse a través de la actividad kinasa del receptor, el cual es capaz de fosforilar a otras moléculas activándolas, o bien (5) el propio receptor se autofosforila, abandona la membrana plasmática y viaja al núcleo, donde modifica la expresión génica. Otro mecanismo (6) consiste en la presencia de receptores diméricos en la superficie que, al unirse al ligando, viajan a otra parte de la célula donde ejercen su acción; este mecanismo se conoce como endocitosis mediada por receptor.

Se ha determinado la estructura de numerosos receptores, tales como los de la insulina, el EGF, el LDL, la interleukina 2, el del IgA/IgM, entre otros. En general, son proteínas transmem-

branales. En algunos casos aparece un corto segmento cerca del extremo C terminal, que contiene una tirosina; es posible que la fosforilación de esta tirosina juegue un papel importante.

Las técnicas de ingeniería genética han permitido realizar un extraordinario avance en el estudio de estos receptores. Ha sido posible, en algunos casos, localizar el dominio del receptor que tiene afinidad por el ligando construyendo moléculas quiméricas a partir de c-DNA que contienen mezclas de dominios de dos receptores diferentes, y observando el efecto al transformar con este DNA células animales. De esta forma se han conseguido receptores de insulina que responden a EGF y viceversa.

En general, las proteínas que constituyen un receptor están compuestas de varias subunidades iguales o diferentes o bien son proteínas que atraviesan la membrana plasmática. Sin embargo, es más difícil entender cómo se desencadena una señal a través de la membrana cuando el receptor está constituido por un solo dominio proteico, como es el caso del EGF. Se han propuesto dos hipótesis: según la primera, la unión del receptor con el ligando induce un cambio de conformación que lo desplaza hacia el exterior o el interior de la célula (hipótesis del «push-pull»); la segunda hipótesis sugiere que la unión con el ligando induce la agru-

pación de las proteínas receptoras.

En algunos casos, los receptores no atraviesan la membrana, sino que se encuentran anclados a ésta mediante cadenas de ácidos grasos. Recientemente hemos estudiado receptores que tienen en su extremo carboxi-terminal una cola de glicosil-fosfatidil-inositol, la cual se une a dos cadenas de ácidos grasos que anclan la molécula. Receptores tales como los de la acetilcolinesterasa, 5' nucleotidasa y ThI, entre otros, responden a esta estructura. En el mecanismo de acción de la insulina parece que interviene una molécula de este tipo como segundo men-

sajero. El receptor de la insulina activa una fosfolipasa C, la cual provoca la ruptura entre las cadenas de ácidos grasos y la cola de glicosil-fosfatidil-inositol del segundo mensajero. Esta molécula queda así liberada de la membrana, pudiendo viajar a otra célula o unirse a otro receptor de la propia membrana. Existe una estrecha relación entre el modo de acción de los oncogenes y los receptores de membrana. Las proteínas oncogénicas pueden actuar mimetizando factores de crecimiento, mimetizando receptores de factores de crecimiento o por efecto intracelular directo sobre el control del crecimiento.

Alberto Sols:

«VEINTE AÑOS DE ASOMBROSA PRODUCTIVIDAD»

Uno de los secretos de la eficacia de muchos sistemas biológicos a nivel molecular es la frecuentemente gran afinidad entre biomoléculas: macromoléculas con micromoléculas o macromoléculas entre sí. Constantes de disociación en el rango micromolar o nanomolar permiten una sorprendente eficacia en el mundo vivo a nivel molecular; siendo posible como fruto de un largo proceso de evolución de proteínas biológicamente activas hasta valores óptimos de afinidades con substratos y efectores.

El doctor Cuatrecasas fue un pionero del estudio de la afinidad entre enzimas y substratos, a nivel básico: mecanismo de acción de los enzimas; y aplicado: la cromatografía de afinidad que le hizo famoso y le ha servido de potente abordaje experimental.

De las interacciones enzima-substrato, el doctor Cuatrecasas



pasó a ser pionero en el campo de receptores hormonales, con la identificación y aislamiento del receptor para la insulina, hace una quincena de años; para culminar en 1986 con la identificación preliminar de lo que puede ser el largamente buscado segundo mensajero para la insulina: un inositol-glucano, que hubiera sido impensable hace unos años, pero que podría ser ahora una lógica consecuencia del actual rápido frente de avance en el conocimiento del fascinante mundo de la circuitería reguladora en membranas celulares.

La asombrosa productividad del doctor Cuatrecasas a lo largo de una veintena de años tiene, pues, ahora una perspectiva del mayor interés en fisiología y medicina.

Miguel Beato:

«REGULACION DE LA
EXPRESION GENICA POR
HORMONAS ESTEROIDES»



Cada una de las células que componen un organismo vivo contiene en su DNA toda la información genética y, sin embargo, cada célula en particular sólo expresa una parte de dicha información. La regulación de la expresión génica está programada y la información necesaria para realizar este programa está también contenida en el DNA. En organismos superiores existen al menos dos niveles superpuestos de control de la actividad génica: el primero concierne a los mecanismos de diferenciación celular, se realiza a nivel estructural —cromatina o DNA— y tiene un carácter básicamente irreversible; el segundo actúa sobre células ya diferenciadas, modulando la expresión de programas genéticos determinados, y es de naturaleza transitoria.

El mecanismo de acción de las hormonas glucocorticoides corresponde a este segundo grupo. Estas hormonas atraviesan la membrana plasmática mediante un proceso de transporte no muy bien conocido y se unen a receptores específicos que se encuentran en el citoplasma celular. La unión con la hormona activa el receptor y este complejo activado se dirige al núcleo y es capaz de unirse a secuencias específicas del DNA; la consecuencia de esta unión es la activación o represión de determinados genes.

El receptor de glucocorticoides es una proteína que, por su movilidad electroforética, tiene un tamaño de 750 aa. Me-

dante ensayos de protección frente a DNasa I (foot-printing), es posible averiguar a qué segmento del DNA se une específicamente el receptor. Se han estudiado los promotores de varios genes, tales como el del tumor de mama del ratón (MMTV) y el gen de liozima de pollo, entre otros; localizándose los segmentos de DNA con afinidad por el receptor. Esta propiedad puede ensayarse clonando los segmentos de DNA en una construcción apropiada que contiene el promotor del gen de la timidin-kinasa unido a la parte estructural del gen de la acetilcloranfenicol-transferasa. Con esta construcción se transforman fibroblastos y se mide si el segmento clonado confiere inducibilidad por glucocorticoides. El análisis de la secuencia de nucleótidos de los sitios fijadores de varios genes permite establecer una secuencia consenso, en la que el hexanucleótido TGTTCT está muy conservado. El receptor se aproxima a la doble hélice a través de la hendidura mayor, estableciendo contacto con el DNA al menos en cuatro puntos dentro de la secuencia consenso; estos puntos se encuentran separados 9-10 bp, por lo que tendrán la misma orientación en dos vueltas consecutivas de la doble hélice. Este tipo de estructura es compatible con un modelo en el que un dímero del receptor interacciona con un sitio fijador. Para explicar el modo de

acción de la hormona se ha propuesto una hipótesis cinética. Se ha visto que el receptor, en ausencia de la hormona, es capaz de fijarse a secuencias específicas de DNA, pero la hormona aumenta las constantes de asociación y disociación. Esto ayudaría al receptor a buscar su secuencia reguladora entre la totalidad del genoma. También se ha visto que la unión del receptor a su elemento regulador, en ausencia de hormona, no afecta a la transcripción. Parece que la unión del recep-

tor activado (unido a la hormona), al elemento regulador, modifica la estructura de la cromatina en la región circundante y probablemente disuelve el nucleosoma, permitiendo el acceso a la polimerasa, la enzima encargada de la transcripción.

Más difícil resulta explicar la acción de los elementos reguladores situados lejos del inicio de transcripción. Una posibilidad radica en que el DNA fuera una molécula alostérica capaz de transmitir información a lo largo de la doble hélice.

Gabriela Morreale:

«**IMPORTANTES CONTRIBUCIONES A LA ENDOCRINOLOGIA**»

El profesor Beato ha realizado importantes contribuciones dentro del campo de la regulación de la expresión génica por esteroides. Nacido en Salamanca, en 1939, estudió Medicina en Valladolid y Barcelona. Terminada su licenciatura trabajó un año con su padre, ginecólogo de Burgos, e inició en Madrid su carrera de investigación. En el 67 marchó a Alemania. Como becario de la Fundación Alexander von Humboldt, investigó el modo de acción de los glucocorticoides en hígado usando técnicas bioquímicas clásicas.

Tras sus trabajos en la Universidad de Columbia, en Nueva York, desarrolló en Marburgo (Alemania) dos líneas principales de investigación: por una parte, la caracterización y purificación de la uteroglobina, proteína típica del útero de conejo, que se induce por progesterona; la determinación de su estructura primaria y terciaria, y la caracterización de la región del DNA que la codi-

fica, estudiando finalmente la interacción del receptor de progesterona con este gen. Por otra parte, ha contribuido de forma decisiva a la caracterización, purificación y modo de acción del receptor de glucocorticoides, habiendo identificado la región del DNA con la que interactúa.

Actualmente está investigando qué ocurre después de esta interacción entre el receptor hormonal y los elementos reguladores del DNA y cuáles son los mecanismos por los que esta interacción se traduce en un cambio en la eficiencia de transcripción de los genes. Así pues, no sólo ha contribuido de forma notable a que la Endocrinología ya no tenga «hueco el corazón», sino al esclarecimiento de cómo las células especializadas expresan de diferente manera su dotación genética, que es la misma para todas las células de un individuo.



Leo Sachs:

«**CONTROL MOLECULAR
DEL DESARROLLO**»



Todas las células de un organismo descienden de precursoras, denominadas células madre, las cuales son capaces de multiplicarse rápidamente, dando lugar a los distintos tipos de células especializadas. Concomitantemente a este proceso de diferenciación, las células dejan de reproducirse. En un organismo vivo este proceso está estrechamente regulado. Algunos tejidos son capaces de regenerarse y otros no. Por ejemplo, las células sanguíneas se están produciendo y diferenciando de forma continua a partir de las células hematopoyéticas pluripotentes de la célula ósea. En mi laboratorio hemos escogido este sistema como modelo para estudiar el proceso de diferenciación celular. El primer paso consistió en desarrollar un método para cultivar «in vitro» precursores de células sanguíneas. Sólo se obtuvo éxito cuando se realizaba el cultivo sobre una «capa nutricia» de fibroblastos. Posteriormente se vio que los fibroblastos segregaban al medio sustancias que inducen el crecimiento y la diferenciación de las células sanguíneas. De esta forma se identificaron dos tipos de factores: aquellos que inducen el crecimiento celular y aquellos que inducen la diferenciación, los cuales actúan en varias etapas del proceso. Estos factores son de naturaleza proteica; en algunos casos se trata de glicoproteínas, aunque no parece que el carbohidrato sea esencial, ya que el componente no glicosilado man-

tiene la actividad biológica «in vitro». El clonaje de los genes que codifican para estas proteínas ha puesto de manifiesto la existencia de familias multi-génicas.

Las dos clases de inductores deben actuar de forma distinta. Se ha comprobado que los inductores de diferenciación son capaces de unirse a DNA modificando la expresión de ciertos genes. Por el contrario, los inductores de crecimiento no se unen a DNA. Deben estimular la multiplicación de células precursoras por algún procedimiento indirecto.

Uno de los inductores estimula el crecimiento de las células madre, que luego pueden diferenciarse en una amplia gama de descendientes, por ejemplo, macrófagos, granulocitos, megacariocitos y otros. Otro actúa sobre células que pueden diferenciarse solamente en macrófagos y granulocitos. El tercero y cuarto inductores del crecimiento afectan sólo a los precursores de los macrófagos y granulocitos, respectivamente. Parece que los inductores de crecimiento establecen una jerarquía de especificidad.

En las células normales, las acciones de los inductores de crecimiento y diferenciación están acopladas. El factor de crecimiento estimula la producción del factor de diferenciación. Las células leucémicas son capaces de reproducirse incesantemente. Se ha visto que algunas cepas

de células malignas tienen escasos o nulos requerimientos de factor de crecimiento exógeno; otras cepas requieren el factor, pero lo producen endógenamente. Otro tipo de cambio en las células cancerosas desacopla el equilibrio entre multiplicación celular y diferenciación.

Ante el aporte artificial de factores de diferenciación, algunas líneas de células leucémicas son capaces de responder adoptando las características de células especializadas y, por tanto,

revirtiéndose el proceso canceroso. En contraposición a este tipo de células de diferenciación positiva (D+), se han encontrado clones incapaces de diferenciarse (D-). En consecuencia, estos factores de diferenciación podrían utilizarse clínicamente para corregir anormalidades en el desarrollo de las células sanguíneas. De ser así, la remisión de la malignidad por diferenciación celular inducida abriría un nuevo tipo de terapia contra el cáncer.

Manuel N. Fernández:

«NUEVAS PERSPECTIVAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER»



Los trabajos que desde los años sesenta han venido desarrollando el Dr. Sachs y sus colaboradores en el Departamento de Genética del Instituto Weizmann, de Israel, han tenido como objetivo la investigación de los mecanismos que regulan la proliferación y la diferenciación de las células de carácter germinal de las que depende la permanente normal renovación de las células de la sangre, así como las alteraciones de estos procesos cuando tales células precursoras experimentan la transformación tumoral que determina el desarrollo de las leucemias; enfermedades éstas que constituyen un modelo ventajoso para el estudio del problema de la oncogénesis y de la acción de los agentes terapéuticos de efecto anti-neoplásico.

La célula que experimenta la transformación pierde capacidad de diferenciación, en tanto que mantiene capacidad de proliferación. Las investigaciones realizadas por el Dr. Sachs son

demostrativas de que una y otra alteración obedecen a mecanismos reguladores de la diferenciación, que permiten que ésta pueda ser inducida por la acción de factores naturales o por la de fármacos que pueden actuar, bien activando la acción de dichos factores, bien a través de mecanismos diferentes. Estos hallazgos han abierto nuevas perspectivas para el tratamiento de las leucemias agudas y de los procesos tumorales en general: la de soslayar el defecto genético provocado por los agentes causales, reconduciendo la célula tumoral hacia un comportamiento biológico normal.

En el momento actual estas posibilidades de tratamiento están siendo investigadas mediante ensayos terapéuticos en los que se utilizan fármacos con capacidad de inducir diferenciación celular, como tratamiento único o en combinación con agentes que ejercen efecto citotóxico.

Gerald Edelman:

«REGULACION MOLECULAR
DEL DESARROLLO DE
TEJIDOS Y ORGANOS»



El problema de la diferenciación celular, en otras palabras, de cómo los animales adquieren su forma a partir del huevo fertilizado, es muy antiguo en la historia de la biología y no exento de polémica. Actualmente no existe una teoría adecuada del desarrollo, de la misma forma que sí existen teorías que explican la evolución de las especies o los procesos genéticos. La razón estriba en que sólo ahora se están empezando a describir los procesos moleculares que conducen a la formación del animal adulto. La cuestión clave es: cómo puede un código genético unidimensional especificar a un ser vivo de una especie dada con tres dimensiones.

Durante el desarrollo las células se ven abocadas a cinco posibilidades distintas; esto es, las células pueden (1) dividirse, (2) diferenciarse, (3) moverse a otro lugar del embrión, (4) interactuar con otras células o (5) morir. Recientes experimentos sobre los procesos fundamentales que regulan el desarrollo han abierto nuevas perspectivas que pueden dar una solución al problema. El mayor interés radica en el conocimiento de las moléculas que regulan la adherencia de un tipo de células con otro. Algunas de estas moléculas han sido identificadas y se han realizado estudios sobre el lugar y el momento del desarrollo embrionario en que son expresadas. Con ello hemos empezado a comprender cómo el plegamiento de las distintas ca-

pas de tejidos conduce al desarrollo del embrión.

Parece que la clave de la regulación radica en unas moléculas llamadas CAM: moléculas de adhesión celular. Se trata de glicoproteínas de membrana que median la unión célula-célula durante la embriogénesis y la histogénesis. Las CAM primarias, como la N-CAM (molécula de adhesión celular de neuronas), aparece en los primeros estadios de la histogénesis y se redistribuye espacialmente en la inducción neuronal y las siguientes inducciones secundarias. El análisis del mecanismo de unión indica que es hemofílico (las células N-CAM se unen a otras células N-CAM) y dependiente de Ca^{2+} . Una CAM secundaria, la Ng-CAM, media la unión entre neuronas y entre neuronas y células de glía y aparece sólo en tejido nervioso y sólo en células postmitóticas. L-CAM aparece en células hepáticas.

Todas las CAMs sufren modulaciones de superficie celular, cambios de predominio, cambios en su distribución (polaridad) o modificaciones químicas durante el desarrollo embrionario. Algunos de estos cambios modifican las constantes de afinidad entre células. En el desarrollo del sistema nervioso aparece una secuencia definida espaciotemporal en la distribución de N-CAM y Ng-CAM. Los análisis con sondas de c-DNA sugieren que estas molé-

culas están codificadas por uno o pocos genes. Los datos sobre las secuencias temporales definidas de expresión de las CAM, sobre la conservación evolutiva de la especificidad de unión y su influencia en la modulación de la unión, indican que el efecto principal de las CAM en la morfogénesis se ejerce mediante retroalimentación de los propios genes CAM y la subsiguiente distribución de las diferentes moléculas en las superficies celulares. Este punto de vista se ve reforzado por recientes experimentos en la aparición regular y periódica de N-CAM y L-CAM durante la formación de papilas, bárbulas y barbas de las plumas de las

aves. La aparición de masas celulares unidas por N-CAM junto a otras unidas por L-CAM se ha encontrado repetidas veces en todos los puntos de inducción embrionaria. Trabajos más recientes indican que las CAM pueden jugar un papel causal en ciertos aspectos de la inducción: es posible perturbar *in vitro* la inducción de plumas utilizando anticuerpos contra las CAM. Este conjunto de datos sugiere que, si bien las mismas CAM pueden emplearse tanto en sistemas neuronales como no-neuronales, sus funciones en el desarrollo del sistema nervioso dependen de la morfología y otras características específicas de las neuronas.

Severo Ochoa:

«ABORDAJE MOLECULAR DEL SISTEMA NERVIOSO»



Debemos a Gerald Edelman y a Rodney Porter, que recibieron conjuntamente el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1972, nuestro conocimiento de la estructura molecular de los anticuerpos, lo que abrió un amplio cauce al estudio de los mecanismos genéticos y moleculares de la inmunidad. Las inmunoglobulinas son proteínas de alto peso molecular formadas por dos parejas de cadenas polipeptídicas: la cadena ligera y la pesada, las cuales están unidas por puentes disulfuro. Cada una de estas cadenas consta de una región constante y otra variable. La región variable es responsable de la fijación del antígeno y confiere al anticuerpo su especificidad. La región constante determina las propiedades efectoras, como por ejemplo la fijación del complemento.

En la actualidad, Edelman se ha interesado en el estudio del desarrollo embrionario del sistema nervioso y trata de encontrar un abordaje molecular al mismo. Estos estudios le han conducido al descubrimiento de lo que él llama «moléculas de adhesión celular», glicoproteínas de elevado peso molecular, de las que se conocen hasta ahora tres tipos. Dos de ellas provocan la adhesión de las neuronas, es decir, de las células nerviosas propiamente dichas, y la de las neuronas a las células gliales. La modulación de la distribución, concentración o naturaleza química de estas sustancias jugaría, según Edelman, un papel esencial en el desarrollo y morfogénesis del sistema nervioso. ■