

XIII Ciclo de Conferencias Juan March sobre Biología

Dinámica de las proteínas de membrana

Los Premios Nobel de Medicina 1985, **J. L. Goldstein** y **M. S. Brown**, **H. Pelham** y **T. A. Springer** intervinieron en el ciclo *Dynamics of Membrane Proteins* («Dinámica de las proteínas de membrana»), XIII Ciclo de Conferencias Juan March sobre Biología, que se desarrolló, en sesiones públicas y en inglés (con traducción simultánea) entre el 28 de febrero y el 21 de marzo.

El lunes 28 de febrero, **Joseph L. Goldstein** habló de *Prenylated Proteins: Regulators of Signal Transduction and Membrane Traffic* («Proteínas preniladas: reguladores de la transducción de señales y del tráfico de membranas») y fue presentado por **Dionisio Martín Zanca**, del Instituto de Microbiología Bioquímica, de la Universidad de Salamanca.

El lunes 7 de marzo, **Michael S. Brown** habló de *How Cells Control Cholesterol* («Cómo las células contro-

lan el nivel de colesterol») y fue presentado por **Jorge Moscat**, del Centro de Biología Molecular, C.S.I.C.-Universidad Autónoma de Madrid.

El lunes 14 de marzo, **Hugh R. B. Pelham** habló de *Protein Sorting and Secretion* («Tráfico intracelular y secreción de proteínas») y fue presentado por **Balbino Alarcón**, también del Centro de Biología Molecular.

El ciclo concluyó el lunes 21 de marzo con la intervención de **Timothy A. Springer** quien habló de *Sequential Adhesive Steps in Leukocyte Interactions with Endothelium* («Regulación molecular de la migración de neutrófilos y linfocitos desde el sistema vascular») y fue presentado por **Miguel López-Botet**, del Servicio de Inmunología, del Hospital de la Princesa, de Madrid.

En páginas siguientes se ofrece un resumen de las diversas intervenciones del ciclo.

Los ponentes

Joseph L. Goldstein nació en 1940 en Sumter, Carolina del Sur (EE.UU.). Estudió en la Washington Lee University y en la University of Texas, en Dallas. En 1985 fue nombrado «regental professor» de la Universidad de Texas y obtuvo el Premio Nobel de Medicina.

Michael S. Brown nació en 1941 en Nueva York. Estudió en la Universidad de Pensilvania y trabajó en el Massa-

chusetts General Hospital, de Boston, entre otras instituciones. Desde 1971 pertenece a la Universidad de Texas (Southwestern Medical School, Dallas); desde 1985 es «regental professor» de dicha Universidad y Premio Nobel.

Hugh R. B. Pelham nació en 1954 y se especializó en Bioquímica en la Universidad de Cambridge. Entre 1979 y 1981 realizó estudios de postgraduado en Es-

tados Unidos y desde ese año está integrado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Cambridge.

Timothy A. Springer nació en 1948, en Fort Benning, Georgia, y estudió en la Universidad de California, en Berkeley, y en Harvard. Ha sido vicepresidente del Center for Blood Research de Boston y es profesor de la Harvard Medical School de Boston.

Joseph Goldstein

«Proteínas preniladas: reguladores de la transducción de señales y del tráfico de membranas»

Las células poseen distintos mecanismos para localizar determinadas proteínas en membranas; el más común consiste en la presencia de un péptido señal, que dirige las proteínas que lo poseen a la membrana. Existen otros mecanismos basados en la modificación covalente mediante unión a proteína de ciertos grupos lipídicos, tales como el grupo miristil, palmitoil o prenil. Este último mecanismo, la prenilización, es el tema de la presente conferencia. La existencia de proteínas preniladas se produjo hace quince años. Entonces se pensó que no tenía especial importancia biológica; este punto de vista cambió radicalmente con el descubrimiento de que el producto del oncogen Ras está prenilado. Hoy sabemos que, aproximadamente, una de cada doscientas proteínas de una célula eucariótica sufre este tipo de modificación y que es esencial para la función de algunas proteínas importantes.

Las proteínas preniladas poseen un grupo farnesil (de 15 átomos de carbono) o geranil (20 átomos de carbono). Ambas son moléculas altamente hidrofóbicas, lo que permite que las proteínas preniladas se asocien a los lípidos de la membrana plasmática. La unión del grupo prenil a la proteína se realiza mediante un enlace tioéter con el átomo de azufre de una cisteína de la zona carboxi terminal. Geranil y Farnesil son sintetizados a partir de acetyl-CoA, mediante la llamada ruta del mevalonato.



Esta ruta metabólica también conduce a la síntesis del colesterol.

El estudio de este proceso metabólico se ha facilitado enormemente gracias al desarrollo de tres técnicas específicas. La primera es el uso de Mevalonato marcado con tritio radiactivo, cuyos productos pueden detectarse después en autorradiografía. La segunda técnica consiste en utilizar inhibidores de la síntesis de mevalonato endógeno y la tercera consiste en añadir un gen a las células en estudio que facilita la incorporación de mevalonato exógeno.

Dentro de las proteínas preniladas hay que destacar dos grupos principales. El primero son las denominadas proteínas «Ras», implicadas en la transducción de señales (modificadas con un grupo farnesil de quince átomos de carbono que ancla la proteína a la membrana plasmática). El segundo grupo son las proteínas «Rab», que intervienen en el control del transporte intracelular (modificadas por un grupo geranil-geranil que las ancla a la membrana externa de vesículas endocíticas, exocíticas o sinápticas). Ras y Rab pertenecen a la familia de proteínas con afinidad por GTP, cuya actividad se regula mediante la unión e hidrólisis controlada de GTP. Se ha identificado un buen número de proteínas de este tipo y todas ellas parecen estar preniladas.

Una de las cuestiones más importantes es cómo estas proteínas adquieren su grupo prenil. Para la unión de un

grupo farnesil es necesario que la proteína diana posea una caja «CAAX», esto es, una secuencia de cuatro aminoácidos en la zona C terminal, donde «C» es cisteína, «A» es un aminoácido alifático y X es un aminoácido cualquiera. La enzima responsable de esta modificación, la CAAX farnesil transferasa, ha sido purificada por cromatografía de afinidad y el gen correspondiente ha sido clonado. Esta enzima está formada por dos subunidades alfa y beta, ambas necesarias para su actividad enzimática. La enzima requiere también Zn^{2+} y Mg^{2+} como cofactores.

Del estudio de estas enzimas se deriva la posibilidad de conseguir

sustancias que inhiban su actividad. Esto tiene una aplicación clínica particularmente importante para el caso de las proteínas Ras. Algunos tipos de cáncer son debidos a mutaciones que hacen que se produzcan cantidades excesivas de estas proteínas, con lo que la célula se divide sin control, convertida en una célula cancerosa. Hemos visto que algunos tetrapéptidos cuya secuencia es similar a una caja CAAX actúan como inhibidores competitivos de la farnesil transferasa. Estos experimentos han permitido el desarrollo de moléculas sintéticas que mimetizan la acción de los tetrapéptidos y son aún más eficaces como inhibidores del enzima.

Dionisio Martín Zanca

«Metabolismo del colesterol»

El doctor Goldstein, junto con su colega el doctor Brown, constituye uno de los mitos de la investigación en Biología Molecular, tanto por la calidad como por el carácter pionero de su trabajo. El doctor Goldstein estudió Medicina en la Universidad de Texas Southwest, en Dallas, y realizó el doctorado en el Hospital General de Boston, Massachusetts; en 1972 regresó a Dallas, donde actualmente desempeña el puesto de Director del Departamento de Genética Molecular.



Los trabajos más significativos del doctor Goldstein se centran en el metabolismo del colesterol, y en concreto en la caracterización bioquímica de las Lipo-proteínas de baja densidad (que son las encargadas del transporte del colesterol en el torrente sanguíneo), y en el mecanismo

mediante el cual estas lipo-proteínas se unen a un receptor específico de la membrana celular y penetran en la célula mediante endocitosis. Esta cuestión básica del metabolismo celular tiene importantes aplicaciones clínicas relacionadas con la deposición excesiva de colesterol en las arterias y los problemas cardiovasculares que ello conlleva. Por estos trabajos, el doctor Goldstein y su colega el doctor Brown recibieron el premio Nobel de Medicina en 1985.

En los últimos años, el doctor Goldstein se ha centrado en el estudio de la prenilización de proteínas: un tipo de modificación covalente por unión de un grupo lipídico que tiene importantes consecuencias para procesos tan diversos como la proliferación celular o el tráfico de membranas en el interior de la célula.

Michael S. Brown

«Cómo las células controlan el nivel de colesterol»

Hace aproximadamente veinte años se puso de relieve que un buen número de personas en los países desarrollados tenían niveles altos de colesterol en sangre y que este hecho podía estar relacionado con distintas enfermedades de tipo cardiovascular. Sabemos que el colesterol se deposita en el interior de las arterias, dando lugar a una placa de color amarillo, denominada placa de ateroma. Esta placa acaba ocluyendo la sección de la arteria, lo que da lugar al infarto.

Todas las células animales requieren colesterol como elemento constituyente de la membrana plasmática. Sin embargo, un exceso de colesterol resulta letal. Por eso las células animales han desarrollado un delicado mecanismo de control que permite satisfacer las necesidades y evitar el exceso. El colesterol puede ser sintetizado por la propia célula a partir de acetil coenzima A, o puede venir del exterior, siendo transportado por el torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas partículas están formadas por un núcleo que contiene ésteres de colesterol rodeados de una capa de colesterol libre y fosfolípidos asociados a una proteína, denominada apo-proteína B-100.

Es importante comprender el metabolismo de las LDL. Inicialmente el hígado produce unas partículas de mayor tamaño: las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Estas partículas contienen colesterol y triglicéridos. Estos últimos son eliminados por lipasas y las partículas resul-



tantes tienen una densidad intermedia (IDL). Las IDL pueden unirse a receptores en las células hepáticas, lo que conlleva la eliminación de estas partículas de la sangre. Las IDL que no pueden internalizarse en células hepáticas se convierten posteriormente en

LDL. Las LDL también pueden ser retiradas de la circulación mediante endocitosis mediada por receptor; si no ocurre así permanecen en el torrente sanguíneo y estas partículas son las responsables directas de la deposición de colesterol en las arterias. Por lo tanto, el factor fundamental que controla el nivel de LDL en sangre es la cantidad y actividad de los receptores de colesterol en las células del hígado.

Cuando las lipoproteínas entran en contacto con la superficie celular se produce una unión específica entre el receptor y la apoproteína, lo que lleva a la formación de una vesícula que se internaliza en la célula. En la vesícula existen bombas de protones, que acidifican el interior, y este cambio de pH da lugar a la separación del receptor, el cual es reciclado y vuelve a ocupar su lugar en la membrana; por otro lado, el colesterol se metaboliza en los lisosomas, utilizándose como componente de la membrana plasmática y como precursor de algunas moléculas con actividad biológica importante, tales como las hormonas esteroideas.

El receptor es una proteína compleja que consta de cinco dominios diferentes. En el extremo N-terminal se encuentra la zona que permite la

unión con el ligando; esta unión se produce a través de siete bucles repetidos, cada uno de los cuales posee seis cisteínas. A continuación hay un dominio que tiene homología con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y que actúa como un sensor de pH: permite el desacoplamiento entre receptor y ligando cuando se acidifica el interior de la vesícula. Después viene un dominio glicosilado, que contribuye a la estabilidad de la proteína. A continuación, hay una región formada por aminoácidos hidrofóbicos que atraviesa la membrana plasmática, ya que la mayor parte del receptor se encuentra situado en la cara exterior de la membrana. Finalmente, está el dominio C-terminal que es citoplásmico y que contiene la secuencia se-

ñal que permite el correcto direccionamiento subcelular del propio receptor.

Los individuos que presentan ciertas mutaciones en el gen que codifica para el receptor tienen un metabolismo del colesterol muy diferente de las personas normales y presentan un síndrome denominado «hipercolesterolemia familiar». Los individuos homocigotos recesivos en el alelo mutante tienen pocos o ningún receptor en sus células; en consecuencia, sus niveles de LDL en sangre son seis veces mayores que en personas normales. Estos individuos desarrollan enfermedades coronarias en la niñez. Afortunadamente, se trata de una condición bastante rara, presentándose un caso por cada millón.

Jorge Moscat

«Endocitosis mediada por receptor»

El doctor Brown recibió el Premio Nobel de Medicina en 1985 por su contribución a la Biología Molecular de la Arteriosclerosis. Su trabajo permitió aclarar la relación existente entre el nivel de colesterol en sangre (que es uno de los factores de riesgo más importantes para la aparición de la arteriosclerosis y su manifestación clínica más dramática, la cardiopatía isquémica) y la formación de la placa de ateroma, responsable última de muchas enfermedades cardiovasculares.

El doctor Brown, junto con su colega el doctor Goldstein, identificaron el mecanismo de reconocimiento de esta molécula en la superficie celular, proceso conocido como endocitosis mediada por receptor, que describieron ellos por primera vez.



El trabajo más reciente del doctor Brown se ha centrado en la regulación de la expresión de este receptor celular, habiendo identificado un factor de transcripción responsable de este hecho.

Estas investigaciones constituyen una aportación fundamental a la Biología Básica de la homeostasis del colesterol y tienen, además, una aplicación clínica evidente, puesto que contribuyen a explicar por qué las dietas ricas en colesterol acaban produciendo enfermedades cardiovasculares.

El trabajo del doctor Brown tiene otro importante corolario: que es imposible entender los problemas clínicos y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas sin el aporte generoso de la Biología Molecular y Celular.

Hugh R. B. Pelham

«Tráfico intracelular y secreción de proteínas»

Una característica de las células eucarióticas, descubierta hace más de cien años por los trabajos pioneros de Golgi y Ramón y Cajal, es que estas células son capaces de enviar algunas proteínas al medio extracelular, esto es, de secretarlas. Este mecanismo requiere el concurso de un conjunto de orgánulos membranosos organizados. Este tráfico de proteínas comienza en el retículo endoplásmico. A la cara citoplásmica de este orgánulo se insertan determinados ribosomas, llamados ribosomas ligados a membranas, los cuales sintetizan proteínas que nada más nacer son insertadas en el retículo endoplásmico. De aquí pasarán al aparato de Golgi y de ahí a la membrana plasmática o al medio extracelular, mediante un proceso de gemación y fusión vesicular. Todas las células eucarióticas poseen las estructuras necesarias para realizar este proceso. En una levadura estas estructuras son muy simples, mientras que, por ejemplo, en una célula pancreática, que está especializada en la secreción, ocupan un porcentaje elevado del citoplasma.

La función de este entramado de vesículas es suministrar un entorno adecuado para que las proteínas que se van a secretar puedan realizar el plegamiento tridimensional adecuado, con ayuda de otras proteínas denominadas «chaperones». Además, estas proteínas suelen sufrir modificaciones post-traduccionales. El más frecuente es la unión de uno o varios residuos de azúcar a la cadena polipeptídica. Estos procesos requieren una maqui-



naria enzimática apropiada y tienen lugar en los diferentes compartimentos membranosos. Sin embargo, a la célula se le plantea un problema formidable: cómo distinguir entre las proteínas que están en el retículo o en el aparato de Golgi de forma transitoria,

durante el proceso de secreción, y aquellas que tienen que estar de forma permanente porque ejercen su función biológica en estos orgánulos.

Se ha identificado un buen número de proteínas que son residentes en el retículo endoplásmico. Todas ellas poseen una secuencia de aminoácidos en el extremo carboxi-terminal que sigue el consenso KDEL (lisina, aspártico, glutámico, leucina). Esta secuencia KDEL (o HDEL en levaduras) está orientada hacia el lumen del retículo y es indispensable para que las proteínas sean retenidas en el mismo. Aquellas proteínas que no poseen esta secuencia son transportadas al aparato de Golgi en su camino hacia la membrana plasmática o el medio extracelular. Este mecanismo de retención específico funciona de manera dinámica; esto es, las proteínas KDEL son transportadas al aparato de Golgi (igual que el resto), pero allí se unen a un receptor específico, lo que origina la formación de una vesícula que las transporta de nuevo al retículo endoplásmico.

Este receptor de las proteínas KDEL debe cumplir una serie de funciones. En primer lugar, debe estar situado en la membrana del aparato de Golgi. En segundo lugar, debe unirse específicamente a la secuencia car-

boxi-terminal KDEL. Una vez que se ha producido esta unión, debe promover el transporte de la proteína al retículo, y cuando esto ha tenido lugar, el receptor debe ser transportado de vuelta al aparato de Golgi. Sabemos que este proceso está controlado, en parte, por el pH de los distintos compartimentos. La unión entre el receptor y la secuencia KDEL es máxima a pHs ácidos (4-5.5) y es prácticamente nula a pHs cercanos a la neutralidad. Ocurre que el pH del aparato de Golgi es ácido y el del retículo es neutro. Este hecho proporciona una explicación a cómo el complejo proteína KDEL-receptor es liberado cuando la vesícula llega al retículo endoplásmico.

Un problema semejante se produce en las proteínas residentes del aparato de Golgi. Aunque aquí hay que distin-

guir entre dos clases de proteínas de Golgi. Las primeras son aquellas residentes en la región trans, que son las cisternas orientadas hacia la membrana plasmática y, por tanto, más cercanas al exterior celular.

El segundo tipo de proteínas residentes en Golgi se encuentra en la región cis, cercana al retículo. En este caso no se ha identificado una secuencia de retención en el extremo C-terminal, sino que la zona implicada en este proceso se encuentra en la región hidrofóbica de la proteína que atraviesa la membrana plasmática. Sin embargo, la comparación de secuencias entre este tipo de proteínas y las que son realmente exportadas a la membrana plasmática no ha permitido deducir una secuencia consenso de retención en Golgi.

Balbino Alarcón

«Un descubrimiento sorprendente»

El doctor Pelham realizó sus estudios de doctorado en la Universidad de Cambridge (Reino Unido), en 1978, desarrollando un sistema de transcripción «in vitro», técnica que ha resultado ser muy importante para el desarrollo de la Biología Molecular. Desde 1981 trabaja en el Departamento de Biología Celular del Medical Research Council, en Cambridge. En 1986, se encontraba estudiando una proteína, la hsp70, relacionada con ciertos tipos de estrés; entonces realizó un descubrimiento sorprendente: una forma de esta proteína se localiza en el retículo endoplásmico y no en el citoplasma, como lo hacen la mayoría de estas proteínas. Además, existía una secuencia C-terminal que estaba implicada en la localización subcelular de dicha pro-



teína. Desde entonces las investigaciones del doctor Pelham se han centrado en los mecanismos moleculares mediante los cuales se segregan las diferentes proteínas a los distintos compartimientos de la célula eucariótica. Se sabe que algunas son sintetizadas en el interior de la célula y secretadas después mediante un sistema de cisternas que permite su correcta conformación y modificación. Este sistema tiene un inconveniente: requiere que la célula distinga entre las proteínas que se van a exportar y las que son residentes de los distintos sistemas de cisternas. Una de las aportaciones más importantes del doctor Pelham ha sido, precisamente, descubrir algunas de las señales que contienen las proteínas para ser residentes en estos orgánulos.

Timothy A. Springer

«Regulación molecular de la migración de neutrófilos y linfocitos desde el sistema vascular»

El sistema inmunológico permite responder rápida y eficazmente a las infecciones que pueden iniciarse en cualquier lugar del organismo. Para ello es necesario que los leucocitos circulen constantemente por los distintos tejidos, «patrullando» a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático. Este sistema permite identificar agentes infecciosos donde quiera que se encuentren; y una vez encontrados se desencadena una serie compleja de señales bioquímicas, cuyo síntoma macroscópico es la inflamación. Durante este proceso se produce una migración de ciertos subtipos de leucocitos hacia los sitios de inflamación. Este proceso se encuentra, finalmente, regulado.

Los avances de la electrónica han hecho cambiar radicalmente la forma en que podemos estudiar este tipo de fenómenos. Actualmente es posible visualizar el comportamiento de diferentes tipos celulares, haciendo circular plasma sanguíneo a través de una cámara de video acoplada a un microscopio. Este sistema «in vitro» permite estudiar el efecto que tienen sustancias individuales sobre el comportamiento de los leucocitos, incorporando las moléculas que se quieren probar mediante liposomas. Esto permite realizar una disección bioquímica del proceso de adhesión de neutrófilos y linfocitos al endotelio vascular.

Durante la inflamación se pro-



duce la adhesión firme de algunos leucocitos circulantes a las paredes del endotelio. Una vez adheridas, las células cambian de forma, adquiriendo una configuración aplanada. Posteriormente atraviesan la membrana del endotelio y se dirigen hacia el punto donde se ha producido la inflamación. Para que esta migración se produzca se requieren tres pasos secuenciales, cada uno de los cuales puede contribuir a la especificidad.

El primero de estos pasos está mediado por una clase de proteínas denominadas selectinas. Estas proteínas poseen un dominio similar a las lectinas y, por tanto, pueden unirse específicamente a ciertos carbohidratos. La unión de selectinas a la pared de los leucocitos cambia sus propiedades, permitiendo que éstos se adhieran lábilmente a la pared del endotelio, lo cual hace que se retrasen respecto a las otras células que circulan en el torrente sanguíneo. Visto a través del video, estas células parecen «rodar» lentamente a lo largo de la pared del endotelio. Sólo las selectinas, y no otras moléculas de adhesión, capacitan a neutrófilos y linfocitos para formar asociaciones lábiles con el endotelio.

El segundo paso en la unión firme al endotelio requiere el concurso de otra clase de moléculas, denominadas quimioatrayentes. Los quimioatrayentes se unen a receptores específicos de la membrana de linfocitos e inician una etapa de transducción

de señal mediada por proteínas G específicas (proteínas con afinidad por GTP). El resultado de la transducción de señal es la activación de integrinas. Las integrinas son proteínas que se encuentran en la membrana de linfocitos y neutrófilos y que, una vez activadas, adquieren la capacidad de unirse a determinados ligandos extracelulares. Esta unión a ligandos es la que permite la adhesión firme de las células a la pared del endotelio.

Algunas moléculas quimioatrayentes de linfocitos han podido purificarse mediante una serie de técnicas cromatográficas de fraccionamiento, unidas a un ensayo de quimioatracción de las fracciones correspondientes. De esta forma se ha purificado una proteína, MCP-1, cuya secuencia de aminoácidos ha podido determinarse.

Al realizarse una comparación de secuencias con el banco de datos se puso de relieve que esta proteína ya había sido identificada y se sabía que tiene capacidad de inducir actividad en monocitos, aunque se pensaba que no tenía actividad sobre linfocitos. Esta discrepancia se debe, probablemente, a la utilización de diferentes técnicas para ensayar la actividad.

Los anticuerpos contra esta proteína permiten estudiar su expresión en distintas situaciones fisiológicas. De esta forma ha podido comprobarse que, en casos de dermatitis, alergias o soriasis, aparecen alteraciones de la expresión de MCP-1 respecto a la situación fisiológicamente normal. Estos anticuerpos también han puesto de relieve que MCP-1 es el principal quimioatrayente de linfocitos.

Miguel López-Botet

«Aspectos cruciales de los mecanismos moleculares»

El doctor Springer comenzó su andadura como investigador en el laboratorio del doctor Milstein, donde realizó sus estudios de doctorado. La intensa actividad investigadora del profesor Springer, desarrollada en la Universidad de Harvard, ha contribuido a aclarar aspectos cruciales de los mecanismos moleculares que regulan los procesos inflamatorios y la relación de éstos con la respuesta inmunitaria. Ambos procesos requieren la diferenciación de leucocitos, inducida por otras células, por proteínas de la matriz o por los propios leucocitos. El trabajo del doctor Springer se ha centrado precisamente en la identi-



ficación de los receptores de la membrana de estas células y de los ligandos correspondientes, que actúan a modo de señales, que permiten a los leucocitos responder ante distintas situaciones fisiológicas.

Estas investigaciones atañen a aspectos básicos de la fisiología celular. No obstante, también pueden tener aplicaciones clínicas importantes. Por ejemplo, han servido para demostrar que una forma de inmunodeficiencia hereditaria se debe a una mutación en el gen que codifica para una integrina leucocitaria. Este tipo de inmunodeficiencia tiene consecuencias muy graves para la salud de los pacientes que la sufren. □