

Rescate de proteínas aberrantes

Consideradas durante largo tiempo inoperantes, las proteínas mutantes patológicas recuperan su funcionalidad si se repliegan con la ayuda de un molde farmacológico

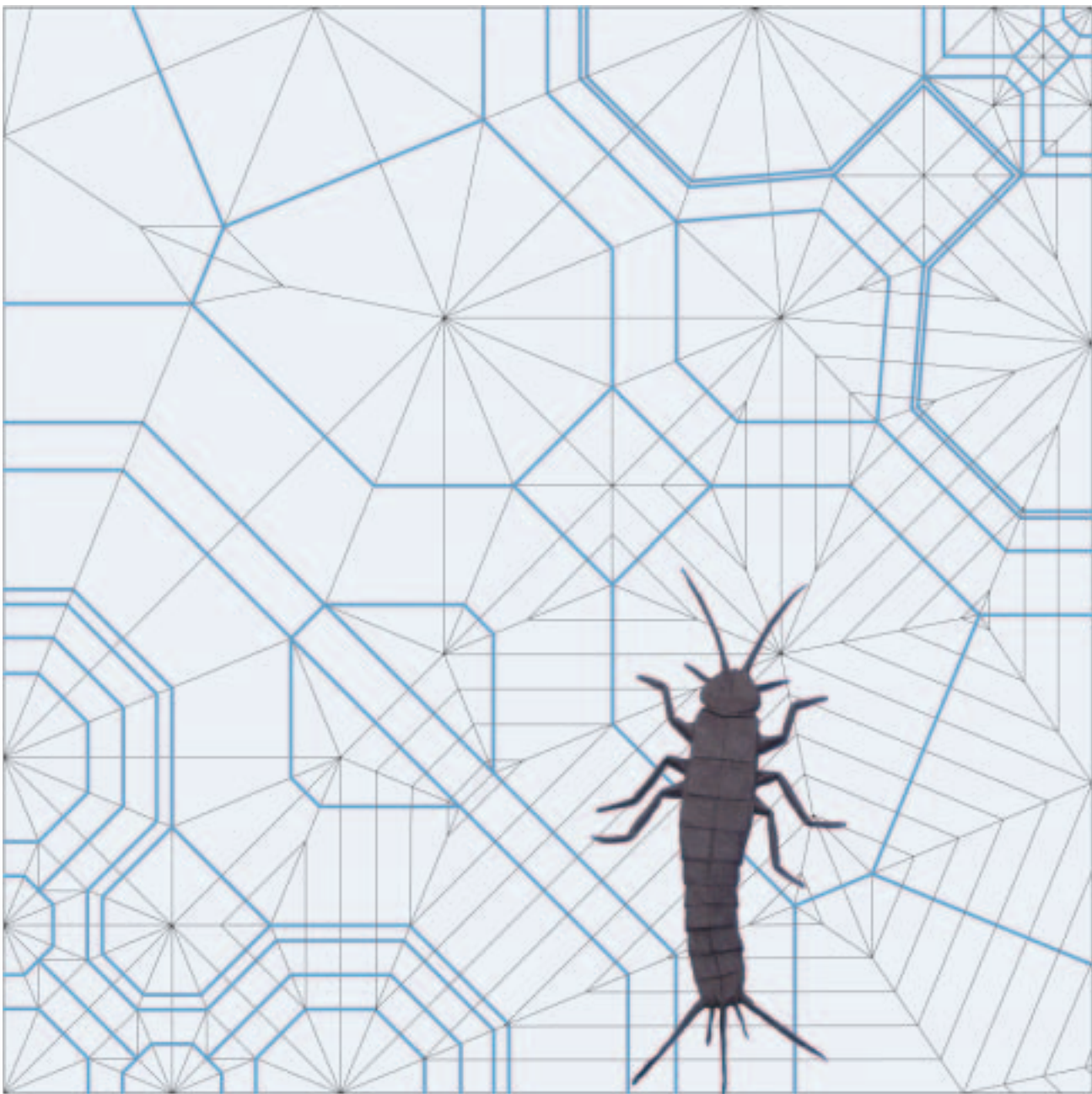
P. Michael Conn y Jo Ann Janovick

Numerosas enfermedades se deben a mutaciones del ADN. Alteran éstas la composición aminoacídica de las proteínas que los genes codifican. En el estudio de enfermedades genéticas se experimenta con células que contienen una mutación y, por tanto, producen una proteína defectuosa, que suele presentar alteraciones funcionales; pensemos, por ejemplo, en un receptor celular que no se une a su ligando o una enzima sin capacidad catalítica. Se dice que estas mutaciones provocan una “pérdida de función”.

Hasta ahora se consideraba defectuosas e inservibles las proteínas correspondientes, lo que resulta cierto en algunos casos pero de generalidad cuestionable a tenor de la investigación reciente. De acuerdo con los resultados obtenidos en diversos laboratorios, el nuestro incluido, las mutaciones patológicas provocan a menudo que la proteína adopte un plegamiento defectuoso y se extravíe; a la manera de una carta con el código postal equivocado y una dirección ilegible, la proteína aberrante no alcanza su destino en el interior de la célula. Este descubrimiento entraña repercusiones terapéuticas de interés: resulta mucho más fácil corregir el rumbo de una proteína mutada en el interior de la célula que reemplazar, mediante terapia génica, un gen mutante.

Las proteínas se extravían cuando se pliegan de forma incorrecta, un yerro frecuente incluso en células normales. Y ello a pesar de las chaperonas, moléculas que ayudan a las proteínas a adoptar la estructura tridimensional, o *conformación*, correcta. Cuando el mecanismo celular de control de calidad (CC) identifica una proteína mal plegada (entre las que se incluyen la mayoría de las mutantes), la marca, para luego destruirla o reciclarla.

En nuestro laboratorio hemos experimentado con chaperonas farmacológicas. Las *farmacoperonas* en cuestión, así las hemos llamado, corrigen la asignación de la ruta intracelular de una proteína que, aunque mal plegada, conserva, en potencia, la funcionalidad. De ese modo se revierte, en células en cultivo, una de las causas del *hipogonadismo hipogonadotrópico*, un trastorno hormonal. Los resultados sugieren una vía terapéutica basada en la reposición de proteínas aberrantes. (La terapia génica procede con idéntico enfoque, aunque entraña mayores riesgos.) Se aplicaría, en principio, a cualquier enfermedad provocada por un plegamiento proteico defectuoso: desde la fibrosis quística hasta enfermedades de aparición tardía (alzheimer, cataratas y algunos tipos de cáncer), pasando por retinitis pigmentaria y otros trastornos congénitos.



1. EN EL ARTE JAPONES DEL ORIGAMI (papiroflexia) se crean complejas esculturas tridimensionales a partir de una simple hoja de papel mediante una serie de precisos pliegues y torsiones. Así lo muestra la pareja de la imagen: plantilla y producto terminado. De forma análoga, una proteína empieza siendo una hilera (unidimensional) de aminoácidos, que, a través de un proceso de plegamiento asistido por chaperonas, se convierte en una compleja estructura tridimensional, capacitada para desempeñar

las funciones celulares. Sin embargo, las mutaciones en el ADN provocan cambios en la secuencia aminoacídica que frustran el plegamiento normal de la proteína. Estas alteraciones resultan, a menudo, patológicas. La investigación reciente nos indica que un gran número de mutantes defectuosos de una proteína receptora recuperan su funcionalidad cuando se pliegan con la ayuda de determinada "farmacoperona". La estrategia se nos ofrece prometedora para el tratamiento de enfermedades genéticas.

"Papiroflexia" molecular asistida

El plegamiento de las proteínas constituye un proceso complejo, difícil de llevar a cabo en el abigarrado interior de la célula. Según la proteína y su destino, el polipéptido se sintetiza en los ribosomas

del citoplasma o en los ribosomas que residen en el retículo endoplasmático (RE). El plegamiento de los productos proteicos se acomete de forma inmediata o al cabo de varios días, mientras flotan libremente en el citoplasma o permanecen confi-

nados en el interior del RE u otros orgánulos.

Con independencia de la velocidad o lugar de síntesis, la mayoría de las proteínas adoptan su conformación a través de diversas etapas. Según los modelos actuales, el esqueleto protei-

co se pliega en grupos de cuatro o más aminoácidos para evitar interferencias con las regiones voluminosas o dotadas de carga. Se cree que el proceso que lleva a las proteínas a adoptar su conformación activa final no es espontáneo.

En células vegetales y animales, las proteínas destinadas a ser secretadas o a residir en la membrana celular se sintetizan en el retículo endoplasmático, donde una espesa sopa de moldes, enzimas y azúcares favorecen unas conformaciones e inhiben otras. Estos guías ejecutan tandas sucesivas de complejas modificaciones, bajo la mirada atenta del sistema celular de control de calidad. El sistema vigila las proteí-

nas nuevas desde que se sintetizan hasta que alcanzan su destino en el interior de la célula y marca a las mal plegadas o mal procesadas mediante chaperonas endógenas y sensores que reconocen conformaciones anómalas.

Mediante la eliminación de las proteínas defectuosas, el sistema de control protege a la célula de la actividad aberrante de aquéllas y mantiene el equilibrio entre la síntesis, la maduración y la degradación de proteínas. Impide también la acumulación de proteínas descarriadas y dirige el transporte de las proteínas sintetizadas a otros compartimentos celulares. Asimismo, evita que las proteínas parcialmente plegadas o los

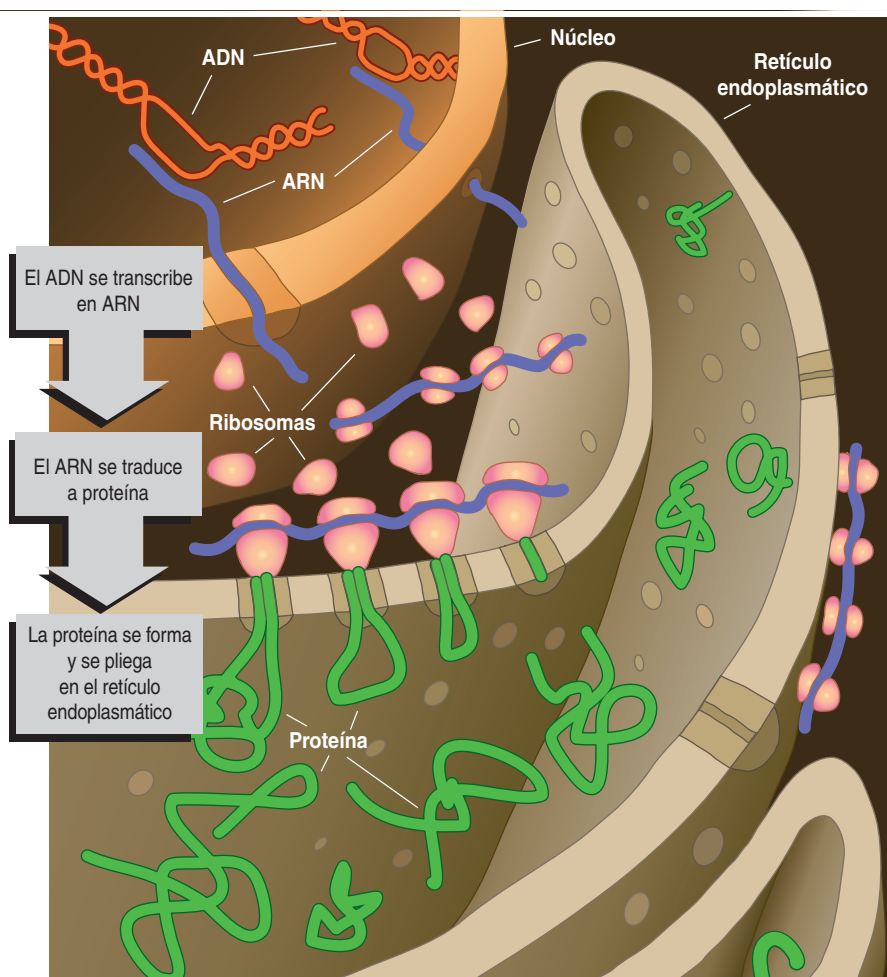
ensamblajes proteicos incompletos, potencialmente tóxicos para la célula, escapen prematuramente del retículo endoplasmático.

La eficacia del sistema de control de calidad depende, en gran medida, de su capacidad para detectar las proteínas procesadas de forma incompleta o incorrecta. Una de las notas distintivas de una proteína mal plegada estriba en la presencia de regiones hidrofóbicas expuestas. Las chaperonas del retículo endoplasmático interaccionan con dichas regiones y retienen las proteínas que las poseen.

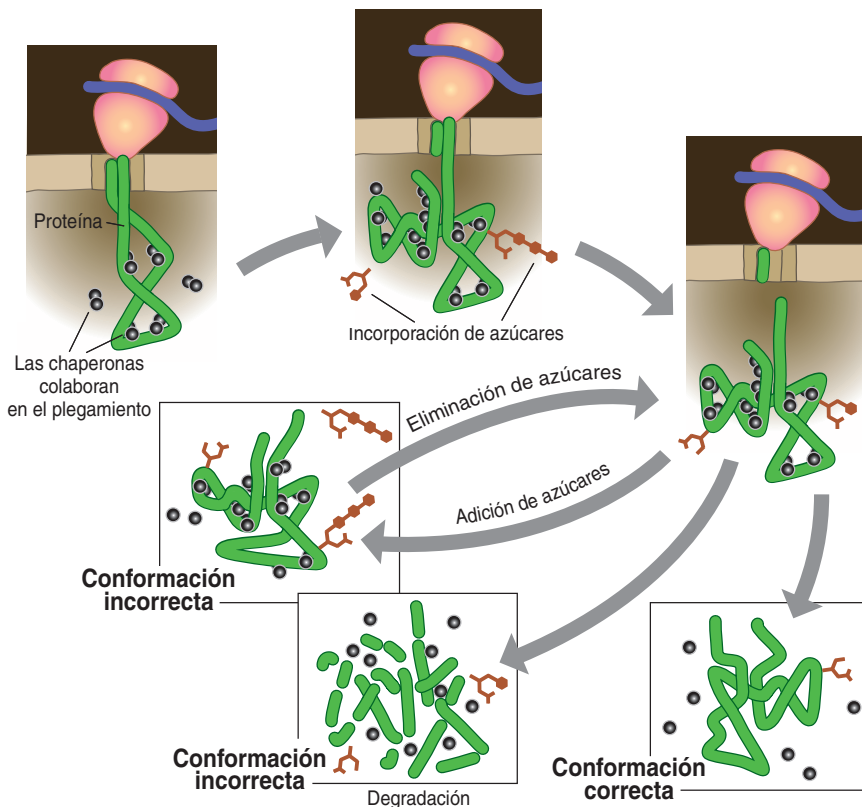
El mecanismo de control de calidad se sirve también de la adición y sustracción de azúcares a la proteína. La conjugación crea estructuras que facilitan la identificación de las moléculas aberrantes.

Antaño se suponía que las proteínas defectuosas y los fragmentos proteicos se digerían en el retículo endoplasmático. Sabemos ya que las moléculas mal plegadas se expulsan del retículo endoplasmático para ser degradadas por el *proteosoma*, un sistema de eliminación de residuos que fragmenta las proteínas indeseadas. También la exportación de una proteína aberrante unida a chaperonas está asociada al reclutamiento de un proteosoma. En ambos casos, la adición covalente de múltiples copias de *ubiquitina* (proteína de tamaño reducido) señala a las proteínas candidatas a ser destruidas. Un cúmulo de estas señales podría facilitar la extracción del polipéptido de la membrana del RE mediante la entrada de moléculas auxiliares; al propio tiempo, opera como baliza para el proteosoma.

El sistema de control de calidad encuentra una limitación determinante en el reconocimiento de proteínas con conformación defectuosa, que se basa en criterios químicos, no funcionales. La presencia de una superficie hidrofóbica expuesta, característica habitual de proteínas mal plegadas o perjudiciales, no informa de la operatividad de las mismas. Cuando se trata de comprender la relación entre el sistema de control de calidad y los datos obtenidos en los experimentos con farmacoperonas, conviene tener en cuenta que no todas las proteínas mutantes destinadas a ser destruidas carecen de actividad.



2. EL ADN NUCLEAR contiene la información que especifica la secuencia aminoacídica de todas las proteínas de la célula. El ARN transporta una copia de esta información al compartimento citoplasmático. Con la ayuda de los ribosomas y de otras moléculas, el código del ARN se traduce a una cadena de aminoácidos que configura una proteína. Las proteínas destinadas a la secreción o de membrana se originan en el retículo endoplasmático. Se suponía antaño que la cadena proteica naciente se plegaba de forma espontánea, pero sabemos ya que las chaperonas colaboran en el plegamiento.



3. LAS CHAPERONAS SE UNEN A LAS PROTEINAS NACIENTES, a medida que se van sintetizando para facilitar el plegamiento. El sistema de control de calidad de la célula utiliza también las chaperonas para reconocer rasgos que suelen indicar un plegamiento erróneo (regiones hidrofóbicas expuestas, por ejemplo). En función del diagnóstico, las chaperonas añaden o sustraen azúcares y, en última instancia, distinguen las conformaciones correctas de las incorrectas. Las proteínas que superan el control se encaminan hacia su lugar de destino, donde deberán llevar a cabo su función en el interior de la célula. Las que fracasan podrían incorporarse a la lista de candidatas a la degradación o sufrir un reprocesamiento, en un intento por corregir su alteración estructural.

A las mutaciones, hemos de agregar otros factores causantes de plegamientos anómalos. Recordemos el exceso de proteínas, los cambios de temperatura, el estrés oxidativo y algunas señales celulares.

La célula interpreta el plegamiento defectuoso de algunas proteínas como una pérdida de funcionalidad, dado que ninguna de éstas escapa al sistema de control de calidad. Puede ocurrir también que las proteínas mal plegadas se peguen unas a otras y, por esa vía, formen agregados potencialmente tóxicos en el interior de la célula o produzcan una acumulación extracelular de placas amiloides.

En el curso de los últimos diez años, la investigación se ha propuesto aclarar la vinculación de un plegamiento anómalo con la aparición de ciertas enfermedades. Se han venido buscando también terapias que evi-

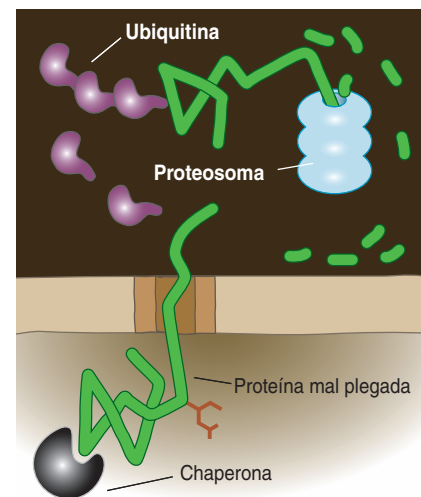
ten o corrijan las anomalías estructurales. En este sentido, el rescate, mediante chaperonas farmacológicas, de proteínas mal plegadas y extraviadas constituye una de las vías más prometedoras.

Extravío por plegamiento incorrecto

Nuestro interés por el plegamiento proteico comenzó con el descubrimiento de una mutación en el gen que cifra un receptor de la hormona liberadora de gonadotropina. El gen mutante procedía de un paciente que sufría hipogonadismo hipogonadotrópico. Esta enfermedad impide que se produzca una liberación suficiente de testosterona, lo que imposibilita una espermatogénesis normal. En la mayoría de los varones, el hipotálamo libera hormona liberadora de gonadotropina al torrente sanguíneo,

provocando que la glándula pituitaria segregue la hormona luteinizante y la posterior secreción de testosterona por parte de las gónadas.

Los que padecen hipogonadismo hipogonadotrópico, en cambio, suelen contar con una cantidad reducida, si no nula, de hormona luteinizante y, por tanto, presentan niveles escasos de testosterona. En este caso, los niveles de hormona luteinizante del paciente no aumentaron cuando su médico, Juan Pablo Méndez, del Instituto Mexicano de Seguridad Social, le suministró una dosis de hormona liberadora de gonadotropina. Ello nos hizo sospechar que el fallo se encontraba en el receptor para esa hormona. Cuando en el laboratorio de Méndez secuenciaron el gen, descubrieron una mutación en el aminoácido 90 que reemplazaba un ácido glutámico dotado de carga negativa por una lisina dotada de carga positiva. Apoyándonos en las



4. LAS PROTEINAS MAL PLEGADAS se marcan, mediante la adición covalente de ubiquitina, una proteína de escaso tamaño reducido, para su posterior destrucción. Una vez se ha unido la primera molécula de ubiquitina, se le incorporan otras, creando un agregado de ubiquitinas que atrae al proteosoma; en el interior de esta estructura en forma de barril se corta la proteína en pedazos. La ubiquitina marca también proteínas transmembrana, así los receptores de hormonas, para que se extraigan de la membrana, interviene, pues, en el reciclaje continuo de las proteínas celulares. Como su nombre indica, la ubiquitina se encuentra en todas las células eucariotas, casi sin excepción.

letras que designan los aminoácidos intercambiados, denominamos a este mutante E90K.

Cuando nuestro equipo de Oregón introdujo el gen clonado en células en cultivo, las que portaban la versión mutante no se unían a la hormona liberadora de gonadotropina y no generaban las señales intracelulares apropiadas. Deducimos que el mutante estaba incapacitado para dicha unión (una interpretación coherente la información disponible en aquel momento).

A modo de divertimento acometimos un experimento adicional. Modificamos el receptor E90K para que dirigiera la proteína hacia la membrana plasmática, el lugar más indicado para el buen funcionamiento de un receptor. Estas “secuencias señal” se encontraban alejadas del aminoácido 90; era poco probable que interaccionasen con él. Para nuestra sorpresa, el mutante E90K redirigido operó de forma correcta. De hecho, funcionó incluso mejor que la versión silvestre (no mutada). Por tanto, el

receptor mutante no era defectuoso, sino sólo incapaz de alcanzar la membrana plasmática.

Farmacoperonas al rescate

¿Cómo rescatar las proteínas extraviadas y mal plegadas? Para responder, se nos ocurrió utilizar compuestos peptidomiméticos (estructuras que remedan los ligandos peptídicos del receptor, aunque de un tamaño menor y, a diferencia de los péptidos, se introducen en las células). Empleamos antagonistas porque no queríamos que el receptor se activase durante el proceso de “salvamento”.

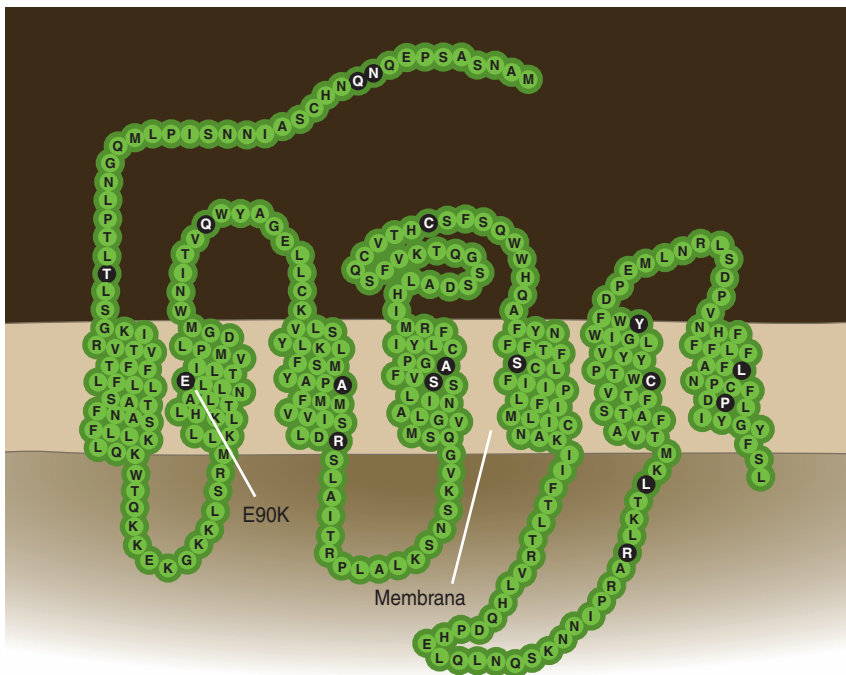
Necesitábamos una molécula de tamaño reducido e hidrofóbica (dos requisitos para acceder al interior celular), cuya estructura operara a modo de molde y sobre el cual el mutante se plegara de forma correcta, hurtándose así al sistema de control de calidad. Nuestra molécula ideal debería unirse al receptor de la hormona liberadora de gonadotropina con especificidad y afinidad elevadas. La especificidad minimizaría

las interacciones con otras proteínas del interior de la célula; si el agente se empleara algún día en la práctica clínica, tales interacciones provocarían efectos secundarios. La afinidad maximizaría los efectos del fármaco. Sin embargo, éste debía poder separarse del receptor una vez rescatado; por tanto, la unión tenía que ser, además, reversible. Y una condición más: la molécula debía ser estable en el medio celular. La interpretación de los datos sería más sencilla si no hubiera que tomar en consideración la posibilidad de que el compuesto se degradase durante el experimento.

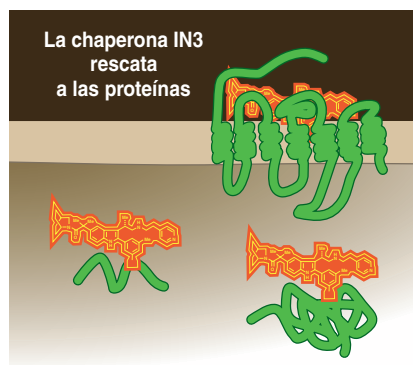
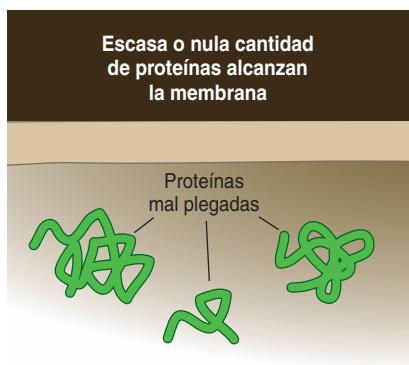
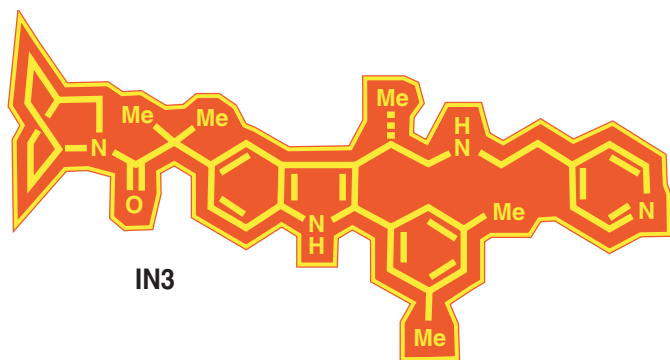
Wallace T. Ashton y Mark T. Goulet, de los Laboratorios Merck, han obtenido una molécula que reúne justamente estos atributos. En un principio la denominada IN3 se creó mientras se buscaba un fármaco de tamaño reducido que se incorporase al sistema circulatorio y se uniese al receptor de la hormona liberadora de gonadotropina.

Para comprobar el efecto de nuestro molde exógeno, lo añadimos a células en cultivo portadoras de la versión mutante del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina. Esperábamos que IN3 penetrara en las células y en el retículo endoplásmico, se uniera a la proteína mutante conforme se iba sintetizando e instara su plegamiento correcto. Si E90K se plegara de forma adecuada, sortearía el control de calidad y proseguiría su camino hacia la membrana. Una vez en la superficie, los siete segmentos del receptor que atraviesan la membrana deberían mantenerlo con la conformación apropiada, de suerte que pudiéramos retirar el fármaco y quedarnos con un receptor operativo. La eliminación del IN3 constituía un paso crítico: se trataba de un antagonista y, por tanto, bloquearía el receptor e inhibiría su respuesta a niveles normales de hormona liberadora de gonadotropina.

Funcionó. El molde farmacológico rescató con éxito el receptor mutante de entre los residuos que no habían superado el control de calidad. Demostramos así que, en presencia de IN3, el receptor siguió su camino hacia la superficie de la célula. Pero, ¿se comportó el receptor mutante igual que el normal? Comprobamos que el mutante redirigido reconocía



5. EL RECEPTOR HUMANO DE LA HORMONA liberadora de gonadotropina constituye una proteína transmembrana formada por 328 aminoácidos (representados por letras en el esquema de la figura). Varias sustituciones aminoacídicas de esta proteína (*las marcadas en negro*) se han relacionado con el hipogonadismo hipogonadotrópico, una enfermedad caracterizada por niveles muy bajos o nulos de ciertas hormonas que se activan en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropina. Se sabe que el receptor atraviesa la membrana siete veces y que determinadas regiones se proyectan hacia los espacios intracelular y extracelular. Sigue sin conocerse su estructura molecular exacta.



6. EL COMPUESTO IN3 guarda semejanza con un péptido. Sin embargo, es lo bastante pequeño e hidrofóbico como para atravesar la membrana celular y alcanzar el retículo endoplasmático. En ausencia de IN3, los receptores de la hormona liberadora de gonadotropina portadores de la mutación E90K se pliegan incorrectamente; son degradados antes de alcanzar su destino en la superficie celular. El IN3 se une al receptor de la hormona liberadora de gonadotropina a medida que se va sintetizando en el retículo endoplasmático, lo que ayuda al receptor naciente a adoptar un plegamiento correcto, incluso en presencia de algunas mutaciones; le faculta también para superar el control de calidad de la célula. IN3 compite con la hormona liberadora de gonadotropina del propio organismo en la unión al receptor; ello significa que interaccionan con la misma región de la proteína, si bien el lugar específico al que se une IN3 no se ha determinado.

los mismos agonistas y antagonistas que la forma silvestre y que se unía a ellos también con idéntica afinidad. La tasa de recambio de la proteína mutante era la misma; una vez incorporada a la membrana plasmática, se reciclaba con normalidad. Además, pareció que el receptor mutante se acoplaba sin problemas con sus proteínas efectoras, puesto que generaba, en respuesta a la hormona, mensajeros intracelulares similares a los originados por el receptor silvestre. En cada ensayo, la versión rescatada operaba exactamente igual que la normal. El mutante nunca perdió su función, sólo el rumbo.

Al rescate de otras mutaciones

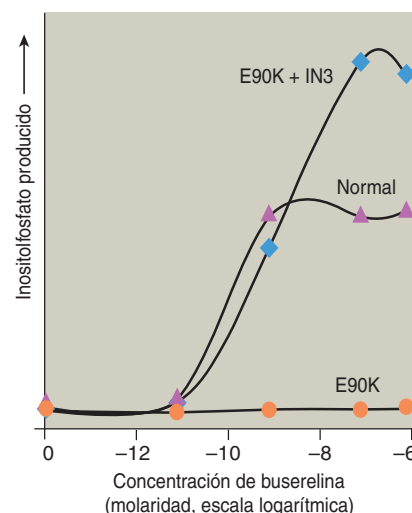
Por la fecha en que terminamos este estudio, otros laboratorios habían ya descrito 17 mutaciones más en genes del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina procedentes de

pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico. Queríamos saber si nuestra técnica de rescate para este receptor resultaba eficaz sólo con el mutante E90K o si funcionaría también con los otros. Los 17 errores se encontraban dispersos por todo el gen: quince de ellos ocasionaban cambios en un solo aminoácido de la proteína, uno provocaba el corte y empalme incorrecto del ARN mensajero y otro hacía que el receptor fuese más corto de lo habitual. Nuestra técnica no consiguió salvar los dos últimos, porque originaban una proteína incompleta.

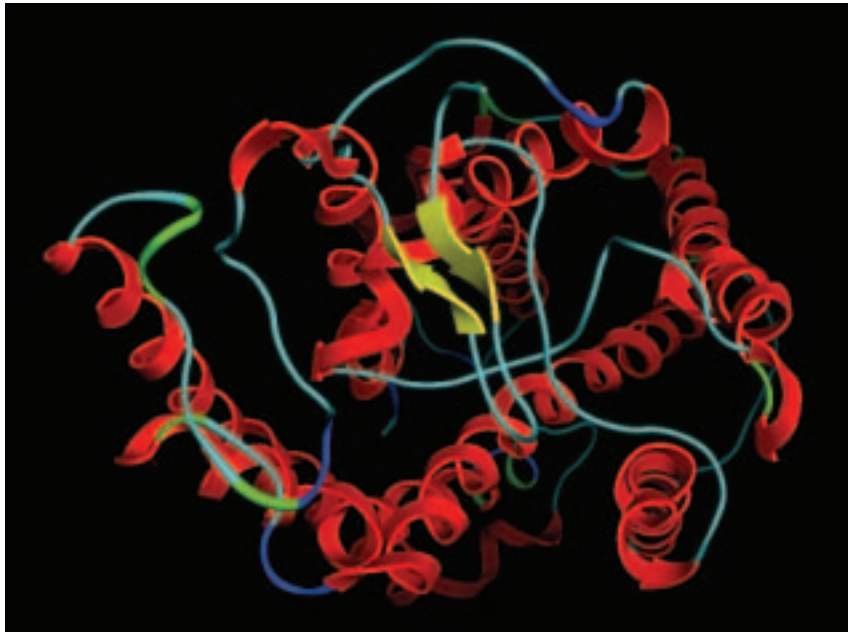
Reconstruimos todos los genes mutantes en el laboratorio, los introdujimos en células en cultivo y acometimos la síntesis de la proteína receptora; quedó demostrada la incapacidad de la célula para unirse a la hormona liberadora de gonadotropina. Cuando añadimos IN3,

se rescataron trece de ellos. De los quince mutantes con un aminoácido cambiado, los dos que fallaron se encontraban muy cerca uno de otro. Tal vez los cambios afectasen a una región crítica para la unión al ligando o para la activación de los efectores de forma que silenciaran a una proteína perfectamente plegada y ubicada; eso era lo que se presumía para las mutaciones que provocaban disfunción. O quizá los dos que no respondieron al tratamiento estaban tan mal plegados, que IN3 se veía incapaz de rescatarlos.

Llamó nuestra atención el fenómeno siguiente: 11 de las 15 sustituciones aminoacídicas alteraban la dotación de carga eléctrica; por ejemplo, de carga positiva a negativa o de ausencia de carga a carga, positiva o negativa. Tales modificaciones, si bien resultan irrelevantes para la carga global de la proteína, alteran la estructura del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina. Nos sorprendió que bastara una sola carga de un total de 328 aminoácidos para causar tamaño cambio. Los resultados sugerían que el receptor de la hormona liberadora



7. LOS E90K MUTANTES RESCATADOS CON IN3 alcanzan la membrana plasmática, donde operan incluso mejor que sus homólogos normales. La actividad del receptor se mide en razón de la producción de inositolfosfato (la señal intracelular que emite el receptor de hormona liberadora de gonadotropina) en respuesta a la buserelina, un compuesto que remeda los efectos de hormona liberadora de gonadotropina.



8. MODELO DEL RECEPTOR de hormona liberadora de gonadotropina. Se trata de una estructura hipotética de la conformación correcta, según se vería desde el exterior de la célula. Se piensa que la hormona liberadora de gonadotropina se une a la cavidad formada por los siete dominios transmembrana (*helicoides en rojo*). Además, es probable que interaccione también con los bucles extracelulares (*azul y verde*) y con una región con estructura de hoja beta antiparalela (*flechas amarillas*). Cabe señalar que esta estructura se halla incompleta; la determinación estructural de las proteínas de membrana entraña suma dificultad porque resultan inadecuadas para los métodos de difracción de rayos-X.

de gonadotropina humana era muy sensible a las perturbaciones.

Ninguna de las mutaciones observadas en los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico era *conservativa*, es decir, cambiaba un aminoácido por otro con propiedades semejantes: por ejemplo, alanina por glicina o treonina por serina (ambas parejas sólo difieren en un grupo metilo $-\text{CH}_3$). Asimismo, no observamos ningún ejemplo en el que la simple sustitución de un aminoácido hidrofóbico por otro también hidrofóbico (valina por alanina), de uno dotado de carga positiva por otro dotado de carga positiva (lisina por arginina) o de uno con carga negativa por otro con carga negativa (aspartato por glutamato) resultase patológico. Algunas de estas mutaciones se producen, sin la menor duda: pero, o bien se encuentran silenciadas desde el punto de vista clínico (no causan enfermedad) o provocan la muerte (o infertilidad) de cualquier embrión que las porte.

Efecto negativo dominante

El traslado de las proteínas transmembrana, incluido el receptor de la hormona liberadora de gonadotropina, desde el retículo endoplasmático hasta la membrana plasmática entraña cierta complejidad. Las proteínas que se encuentran cómodas en una membrana lipídica no son solubles en los contenidos acuosos del resto de la célula. En el caso de una proteína

con siete dominios transmembrana (el receptor de la hormona liberadora de gonadotropina, por ejemplo), la alternancia de dominios hidrofílicos e hidrofóbicos dificulta el desplazamiento a través del citoplasma. Parece que la célula soluciona este problema mediante el transporte conjunto de un grupo numeroso (oligómero) de receptores. Los dominios hidrofóbicos se orientan, enfrentados entre sí, hacia el interior del oligómero y se ocultan del citosol; los hidrofílicos, en cambio, quedan expuestos hacia el exterior, para que interaccionen con el agua circundante. Esta asociación molecular facilita, desde el punto de vista termodinámico, el transporte de los receptores hasta la membrana plasmática.

Pero la oligomerización puede resultar perjudicial, pues la “manzana podrida” termina por corromper todo el “cesto”. Este escenario se pone de manifiesto en las personas portadoras de una copia normal y una copia defectuosa del gen. A pesar de que en un oligómero pueden mezclarse proteínas plegadas correctamente y proteínas mal plegadas, ocurre con frecuencia que el sistema de control de calidad reconoce a los mutantes y marca toda la estructura para su posterior eliminación. Así, se destruye la proteína mutante, pero también la silvestre. Es el llamado efecto “negativo dominante”: la mutación provoca daños que no se producirían por la simple ausencia de ese gen.

Para hacer visible ese efecto recurrimos a la microscopía confocal. Fusionamos el gen del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina con el gen que codifica la proteína fluorescente verde (PFV). La “proteína quimérica” resultante reveló la ubicación intracelular de los receptores de la hormona liberadora de gonadotropina, mediante los destellos que emitía al ser irradiada con luz de una longitud de onda determinada. Las células portadoras del receptor quimérico mostraban parte de la señal verde en el retículo endoplasmático, pero la mayoría siguió su ruta hacia la membrana externa. Sin embargo, cuando añadimos el mutante E90K a la vez que la quimera, la señal fluorescente aparecía confinada en el retículo endoplasmático, incapaz de alcanzar la superficie. La farmacoperona IN3 revertía el esquema: devolvía la proteína quimérica a su emplazamiento correcto en la membrana externa, incluso en presencia del receptor mutante. Por tanto, IN3 rescataba ambas versiones, la mutante y la normal.

Normas de salvamento

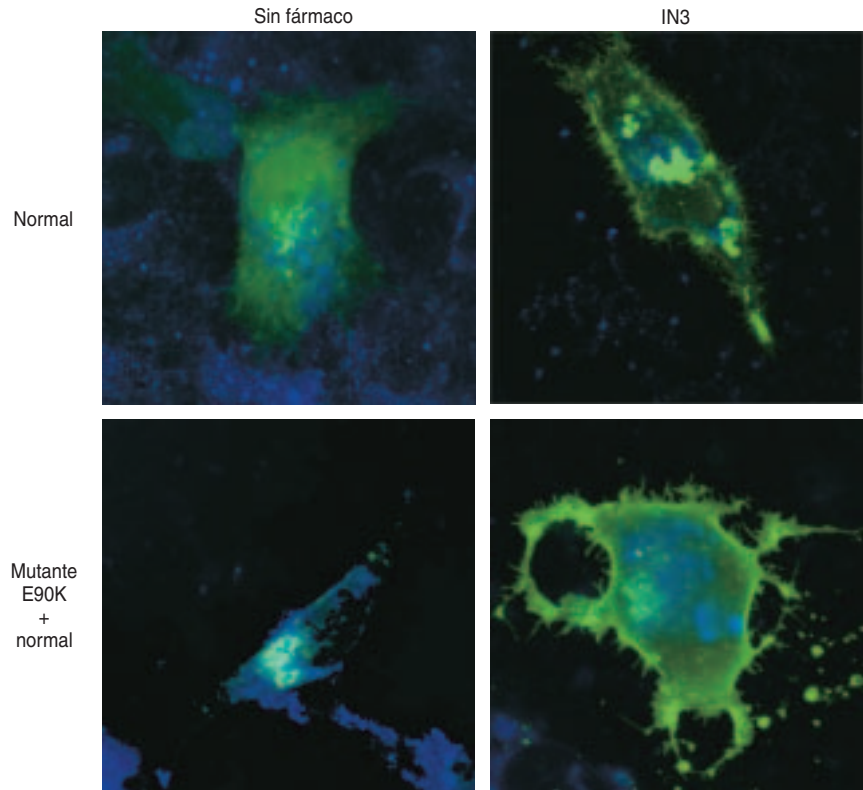
El rescate de proteínas mediante farmacoperonas puede aplicarse, en potencia, al tratamiento de cualquier enfermedad provocada por una proteína mal plegada o descarriada. Nuestros experimentos han corroborado la hipótesis para el hipogonadismo hipogonadotrópico. Pero, ¿cuáles son los principios generales aplicables a terapias contra la enfer-

medad de Parkinson, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (versión humana de la enfermedad de las vacas locas), la cardiomiopatía hipertrófica y otras alteraciones del plegamiento proteico?

Para comprobar si nuestros resultados se limitaban al IN3, buscamos otras moléculas que pudiesen también rescatar a mutantes del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina. Ensayamos con un compuesto semejante, aunque con una baja constante de afinidad: no funcionó. Los antagonistas proteicos fracasaron también, pese a unirse a los receptores silvestres alojados en la superficie de las células en cultivo. A tenor de los resultados, las proteínas aparecían demasiado grandes o demasiado cargadas (dotadas de un exceso de carga eléctrica) para introducirse en la célula y unirse al receptor.

Sí se mostraron eficaces, sin embargo, antagonistas que, igual que IN3, eran peptidomiméticos. Varios indoles, quinolonas y eritromicina superaron la prueba: se unían al receptor de la hormona liberadora de gonadotropina. Todos ellos rescataron E90K en mayor o menor grado. Apoyados en ese conocimiento, establecimos unas “normas básicas de salvamento”: la eficacia de las moléculas de un mismo grupo químico era proporcional a su afinidad para con el receptor de la hormona liberadora de gonadotropina; dentro de cada grupo, los ligandos con mayor afinidad funcionaban mejor; entre grupos, el factor más determinante era la solubilidad relativa, vale decir, la capacidad para atravesar la membrana celular y alcanzar la proteína naciente.

¿Y si una farmacoperona estabilizara una proteína sin unirse al mismo lugar que el ligando natural? Tal contingencia resultaría ventajosa, pues no exigiría la eliminación del fármaco previa a la actuación del receptor rescatado. Esta hipótesis nos recordaba la miríada de compuestos que las compañías farmacéuticas analizan en busca de propiedades específicas. Su interés se centra en moléculas que operen como agonistas o antagonistas de la diana de interés. Pero se trata de un criterio de búsqueda demasiado restrictivo; se olvidaría de toda una farmacoperona que no



9. EN CELULAS EN CULTIVO, el IN3 rescata al receptor de la hormona liberadora de gonadotropina mutante e incrementa la eficacia del plegamiento de la proteína normal. En ausencia del fármaco, el receptor normal (*verde*) aparece sobre la superficie de la célula y en el retículo endoplasmático (*teñido de azul*). Cuando están presentes el receptor normal (*verde*) y el mutante E90K (*sin marcar*), en cambio, casi todas las proteínas receptoras (normales y mutantes) se degradan y pocas, si alguna, alcanzan la membrana externa. En ambos casos, la adición de IN3 incrementa la cantidad de proteína receptora presente en la superficie celular y la cantidad total de proteína receptora, quizá porque un plegamiento más eficaz se traduce en un aumento del número de receptores de hormona liberadora de gonadotropina que superan el sistema de control de calidad de la célula. Estas imágenes representan apilamientos de múltiples secciones ópticas a través de la célula.

fuese ni agonista ni antagonista. En los archivos de los laboratorios farmacéuticos podría haber multitud de estructuras útiles que se han descartado en razón de unos criterios poco exhaustivos.

Si el rescate de proteínas mutantes basado en la asistencia de su plegamiento puede convertirse en una nueva vía terapéutica, ¿por qué no imaginar fármacos que aplicasen la misma estrategia a proteínas normales? Si una farmacoperona alterase la velocidad de plegamiento de una proteína normal, provocaría un plegamiento defectuoso y su posterior degradación. Este “naufrago proteínico” podría facilitar la inhibición de genes cancerígenos descontrolados o

aportar nuevas perspectivas para la anticoncepción.

Otras proteínas recuperables

Con los resultados obtenidos con el receptor de la hormona liberadora de gonadotropina, especulamos sobre qué mutantes patológicos serían óptimos candidatos para el rescate mediante compuestos peptidomiméticos de tamaño reducido y permeables.

De entrada la proteína aberrante no debería portar mutaciones en aminoácidos esenciales para la unión al ligando (en el caso de proteínas receptoras), la unión al sustrato o a cofactores (en el caso de enzimas), la unión a iones (en el caso de canales iónicos) o para la interacción

Anomalía proteica	Trastorno	Proteína(s) responsable(s)
Extravío	Fibrosis quística	CFTR (canal de iones cloruro)
	Amiloidosis sistémica	Fibrillas amiloides
	Diabetes insípida nefrogénica	Acuaporina-2, receptor V-2
	Cáncer	Supresor tumoral p53
	Hipogonadismo hipogonadotrópico	Receptor de hormona liberadora de gonadotropina
	Retinitis pigmentaria	Rodopsina, receptores carotenoides
Agregación	Enfermedad de Alzheimer	Amiloide, proteína tau
	Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob	Amiloide
	Encefalopatías espongiiformes	Glicoproteína prion
Negativo dominante	Anemia falciforme	Hemoglobina
	Enfermedad de Parkinson	α -sinucleína, parkina, ubiquitina C, proteínas del cristalino
	Cataratas	Proteínas del cristalino
	Cardiomiopatía hipertrófica	Troponina T

10. LAS PROTEÍNAS MAL PLEGADAS se hallan en el origen de numerosas enfermedades, algunas de las cuales se listan. El ejemplo del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina sugiere que las terapias basadas en farmacoperonas rescatarían algunas de estas proteínas aberrantes y recuperarían su funcionalidad.

con otros efectores (en el caso de las proteínas G y otras moléculas de señalización). Estas mutaciones comportan una pérdida de función, incluso en los mutantes que están correctamente plegados y alojados.

En segundo lugar, las delecciones y los truncamientos notables generan una proteína irrecuperable, debido a la ausencia de elementos necesarios para restablecer estructuras de orden superior.

En tercer lugar, la pérdida o ganancia de ciertos aminoácidos puede representar un obstáculo insalvable para el rescate farmacológico. El aminoácido cisteína forma enlaces covalentes con otras cisteínas de la proteína, enlaces de suma importancia para el mantenimiento de la conformación. La ausencia o la formación inadecuada de tales uniones puede resultar tan perjudicial, que la proteína no se pliegue correctamente ni siquiera en presencia de un molde. De manera análoga, la pérdida o ganancia de prolina puede limitar o bloquear el rescate del mutante, porque fuerza la aparición de giros en el esqueleto proteico. La estructura nativa de algunas proteínas puede exigir un giro brusco que las farmacoperonas no pueden corregir. Otros candidatos dudosos para el rescate son los mutantes en los que las sustituciones de aminoácidos impiden o favorecen la formación de

puentes de hidrógeno, interacciones decisivas para el mantenimiento de la estructura de las proteínas.

En cuarto lugar, también las mutaciones que introducen residuos de tamaño reducido (glicina o alanina) dan lugar a candidatos propicios para las terapias con farmacoperonas. A diferencia de los problemas derivados de la introducción de un aminoácido voluminoso (valina, triptófano o treonina), la incorporación de aminoácidos de menor tamaño dota de mayor libertad de movimiento y, por tanto, facilita el plegamiento asistido por un molde y aumenta la eficacia de un rescate farmacológico.

Plegamientos aberrantes patológicos

Amén de las mutaciones en genes específicos, todo tipo de estrés celular causa errores generalizados en el plegamiento, modificación o direccionamiento de las proteínas; cualquiera de estas alteraciones provocan su degradación en manos de la maquinaria del control de calidad. Sin embargo, es de suponer que un exceso de moléculas defectuosas en el interior de la célula anularía el sistema de eliminación de residuos y provocaría la acumulación de proteínas aberrantes en el retículo endoplasmático. Se piensa que la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas son las responsables

de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer de aparición temprana, la enfermedad de Parkinson y las patologías priónicas, así como las cataratas de aparición temprana, la deficiencia de α 1-antitripsina, la diabetes mellitus de tipo II y la amiloidosis sistémica. En todos estos trastornos, intervienen proteínas o fragmentos proteicos que convierten su conformación soluble normal en fibras insolubles y pegajosas (amiloides). Como ocurre con el β -amiloide en el caso de la enfermedad de Alzheimer o la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson, estas proteínas se aglutinan para formar agregados fibrilares. Los agregados insolubles se forman en el interior y en el exterior celular.

A diferencia de los amiloides que forman agregados, la mayoría de las enfermedades relacionadas con el plegamiento proteico están causadas, simplemente, por la degradación de la proteína mutante o por su ubicación errónea en el interior de la célula. Un gran número de estos trastornos, entre ellos la retinitis pigmentaria, la fibrosis quística, la diabetes insípida y algunas formas de hipercolesterolemia familiar, afectan a proteínas de membrana. En el caso de la hipercolesterolemia familiar, diversas mutaciones del receptor de la lipoproteína de baja densidad engendran un procesamiento defectuoso que atrae la atención del sistema de control de calidad, que luego marca al receptor para su degradación. La fibrosis quística se debe a mutaciones en el gen *CFTR*, codificador de un canal que transporta iones cloruro a través de la membrana celular externa. La mutación más frecuente es la desaparición del aminoácido en posición 508. Provoca la retención, mediada por chaperonas, en el retículo endoplasmático y la rápida proteólisis de la proteína CFTR incompletamente procesada (aunque operativa). Así, el canal no alcanza la membrana plasmática y, por tanto, la célula no puede regular el flujo de iones cloruro. Mecanismos similares explican casos de diabetes insípida nefrogénica (mutaciones en el gen que codifica el canal de agua acuaporina-2) y de retinitis pigmentaria (mutaciones en el gen de la rodopsina).

Ante el número de enfermedades animales y humanas causadas por

proteínas mal plegadas, se ha despertado el interés por desarrollar tratamientos correctores de este mecanismo patogénico. Las farmacoperonas, moléculas de tamaño limitado que penetran fácilmente en la célula, se unen a la proteína mutante y promueven su plegamiento correcto, parecen aplicables a todo el espectro de trastornos relacionados con el plegamiento proteico. Además, en nuestra opinión, compartida por otros expertos, presentan notables ventajas sobre vías terapéuticas conocidas. Los ensayos clínicos que utilizan farmacoperonas para el tratamiento del hipogonadismo hipogonadotrópico, la fibrosis quística o la deficiencia de α 1-antitripsina empezarán pronto. Y es muy probable que otros compuestos con propiedades similares figuren en el futuro panorama del desarrollo farmacológico.

Los autores

P. Michael Conn es director adjunto e investigador del Centro Nacional de Investigación de Primates en Oregón. Ocupa una cátedra en el departamento de fisiología y farmacología del departamento de biología celular y del desarrollo de la Universidad de Ciencias y Medicina de Oregón. **Jo Ann Janovick**, experta en diseño de fármacos, lleva 20 años en el equipo que dirige Conn.

©American Scientist Magazine.

Bibliografía complementaria

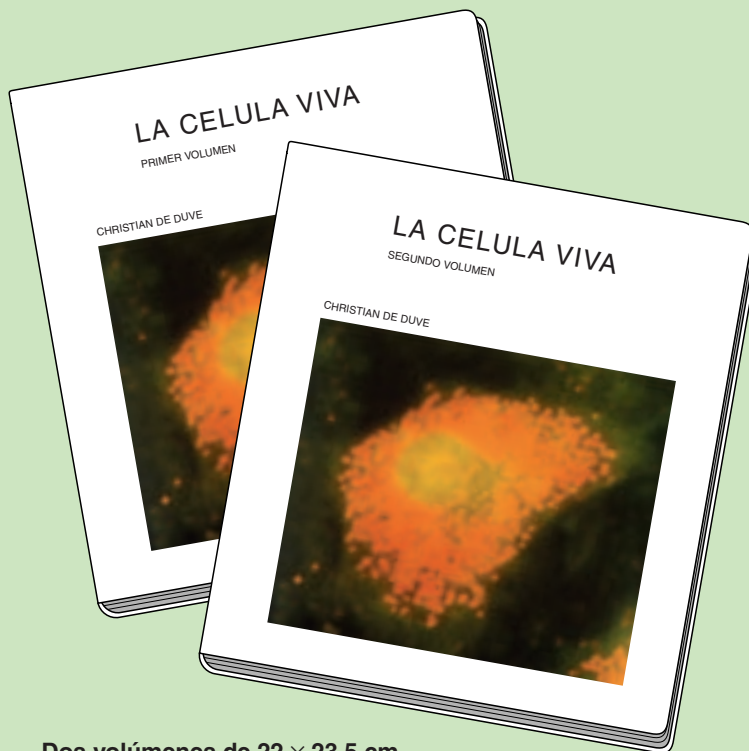
FOR WHOM THE BELL TOLLS: PROTEIN QUALITY CONTROL OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM AND THE UBIQUITIN-PROTEASOME CONNECTION. Z. Kostova y D. H. Wolf en *EMBO Journal* 22, vol. 2309-2317; 2003.

QUALITY CONTROL IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM. L. Ellgaard y A. Helenius en *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4, págs. 181-191; 2003.

PHARMACOLOGIC RESCUE OF CONFORMATIONALLY-DEFECTIVE PROTEINS: IMPLICATIONS FOR THE TREATMENT OF HUMAN DISEASE. A. Ulloa Aguirre, J. A. Janovick, S. P. Brothers y P. M. Conn en *Traffic*, vol. 5, págs. 821-837; 2004.

BEYOND THE SIGNAL SEQUENCE: PROTEIN ROUTING IN HEALTH AND DISEASE. C. Castro-Fernández, G. Maya-Núñez y P. M. Conn en *Endocrine Reviews*, vol. 26, n.º 4; págs. 479-503; 2005.

BIBLIOTECA SCIENTIFIC AMERICAN



Dos volúmenes de 22 × 23,5 cm con un total de 443 páginas, profusamente ilustradas en negro y en color.

LA CELULA VIVA

En *La célula viva*, Christian de Duve nos invita a participar en una absorbente y magníficamente ilustrada expedición hacia un mundo tan importante para nuestro organismo cuan apartado de nuestras vivencias cotidianas. Se trata del reino de los billones de células que componen el cuerpo humano. Guía a la vez audaz y seguro, de Duve nos brinda las experiencias y conocimientos de que ha hecho acopio a lo largo de una vida entera dedicada a la investigación, y lo hace en un estilo que, sin renunciar a la precisión que exige el técnico, resulta accesible y ameno para el profano.



Prensa Científica, S. A.