



Boletín 5 Medicina Molecular

28 de abril de 2008

Índice

Revisiones	3
Terapia antiviral con anticuerpos monoclonales	3
Temas	10
Elementos móviles en el genoma humano	10
Proteolisis intracelular (Proteasoma)	14
Telómeros	17
Glosario	19
Receptores	20
Repeticiones Alu	21
Potenciación a largo plazo	22
Oncogen	23
Ligando	24
Noticias	24
Nuevas proteínas involucradas en la respuesta al daño en el ADN	24
Eventos	25
Tercer congreso GTCBio sobre proteínas quinasas en descubrimiento de fármacos	26
Del 22 al 25 de Septiembre se celebra en Filadelfia (Estados Unidos) el tercer congreso internacional sobre diagnóstico molecular en el desarrollo de terapia contra el cáncer	26
Del 28 al 31 de Mayo se celebra en Boston (Estados Unidos) un congreso sobre la epigenética en el cáncer	26
Del 10 al 11 de Julio se celebra en Boston (EEUU) el segundo congreso anual sobre detección, desarrollo y validación de biomarcadores	27

Del 17 al 19 de Septiembre se celebra en Granada BioSpain 2008, cuarto congreso internacional sobre biotecnología. 27

Revisiones

Terapia antiviral con anticuerpos monoclonales



Resumen

Recientemente el desarrollo de anticuerpos monoclonales como terapia antiviral ha experimentado un gran avance. En esta revisión se recogen los aspectos fundamentales del desarrollo de la terapia antiviral basada en anticuerpos monoclonales ofreciéndose una visión global del tema y abordando aspectos como las plataformas empleadas para la generación de estos anticuerpos monoclonales, los mecanismos de aclaramiento de partículas víricas y células infectadas y el empleo de este tipo de anticuerpos monoclonales en biodefensa y frente a pandemias víricas.

Introducción

A finales del siglo XIX se describió por primera vez el empleo de anticuerpos en el tratamiento de enfermedades víricas, en concreto el posible uso de un suero procedente de una oveja convaleciente de difteria para el tratamiento y cura de una niña enferma de difteria. Durante el siglo XX ya se estableció la práctica del suministro de inmunoglobulinas humanas para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades víricas como la hepatitis A, la B y la C, la rabia y la enfermedad causada por el virus respiratorio sincitial entre otras.

A continuación se describen los aspectos generales de la terapia antiviral empleando anticuerpos monoclonales. El uso de este tipo de anticuerpos frente a enfermedades víricas aún se encuentra bajo estudio y tan sólo un anticuerpo monoclonal se encuentra actualmente aprobado para su uso como tratamiento antiviral (ver tabla). El reciente desarrollo en tecnologías de cribado de anticuerpos, aislamiento y purificación de proteínas y modelado in silico augura un gran desarrollo en el diseño y producción de anticuerpos monoclonales como tratamiento antiviral.

Estado actual

A lo largo de esta revisión se desarrollarán los siguientes aspectos:

- Distintas plataformas empleadas para generar anticuerpos monoclonales
- Mecanismos y modelos para la neutralización de los virus por parte de estos anticuerpos
- Mecanismos de aclaramiento de virus y células infectadas en el organismo
- Desarrollo de este tipo de anticuerpos en laboratorios comerciales y su empleo en laboratorios de investigación
- Empleo de cócteles de anticuerpos monoclonales
- El uso de anticuerpos monoclonales antivirales en biodefensa y defensa frente a pandemias víricas

Tecnologías para obtener anticuerpos monoclonales

El desarrollo y avance de tecnologías para la expresión y obtención de proteínas ha permitido la producción de anticuerpos monoclonales con el objetivo de poder ser empleados con fines terapéuticos.

La capacidad terapéutica de los anticuerpos radica en la alta afinidad y especificidad con la que se unen a los antígenos que reconocen. Los anticuerpos monoclonales, además, generan respuestas muy reproducibles y suponen un producto mucho más activo y potente que los policlonales.

Actualmente se ha conseguido obtener anticuerpos monoclonales frente a virus de humanos mediante diversas tecnologías de expresión, aislamiento y purificación de proteínas. Entre ellas están la expresión de fragmentos de anticuerpos en la superficie de microorganismos, el empleo de ratones transgénicos capaces de sintetizar IgG humana o el aislamiento de linfocitos B memoria de pacientes infectados.

Las técnicas de expresión en superficie emplean diversos microorganismos en los que promueven la expresión de cadenas sencillas de la zona variable de los anticuerpos, de fragmentos de unión a antígenos o incluso de dominios completos de anticuerpos. Mediante sucesivos ciclos en los que los microorganismos se ponen en contacto con el antígeno frente al cual queremos obtener los anticuerpos monoclonales podemos seleccionar aquellos microorganismos que expresen las moléculas que reconocen el antígeno. Generalmente se emplea un esquema similar a una cromatografía donde el antígeno queda inmovilizado sobre un soporte. Los microorganismos que expresen moléculas que reconozcan el antígeno quedarán unidos al soporte. Posteriormente se recuperan los microorganismos obteniendo así las secuencias génicas que codifican péptidos que reconocen el antígeno. Recientes estudios han comprobado que la obtención de anticuerpos neutralizantes varía según el microorganismo en el que se induce la expresión. Este es el caso de estudios realizados para la obtención de anticuerpos neutralizantes frente al virus HIV-1. En este caso al emplear levaduras como vector de expresión se obtuvieron además del grupo de anticuerpos obtenidos previamente en experimentos con bacteriófagos un grupo igualmente numeroso de anticuerpos neutralizantes nuevos. Este cambio en la expresión de anticuerpos neutralizantes según el microorganismo empleado sugiere que la eficiencia del plegamiento del anticuerpo, los procesos de maduración post-traduccional y la accesibilidad del epítipo pueden influir en el reconocimiento del antígeno.

Los anticuerpos monoclonales humanos frente al coronavirus del síndrome respiratorio severo agudo (SARS-CoV: Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus) y frente al virus de la rabia se consiguieron obtener utilizando otro método diferente. En este caso se emplearon ratones transgénicos a los que se les había introducido el gen que codifica una IgG humana que reemplazaba al gen original del ratón. Tras la inmunización del ratón con el antígeno deseado se aislaban los linfocitos B del bazo para someterlos a un proceso de producción de anticuerpos monoclonales basado en la generación de un hibridoma y la posterior selección de aquellos hibridomas que reconocían el antígeno. Otro método para obtener anticuerpos monoclonales se basa en el empleo de linfocitos B memoria procedentes de pacientes infectados por el virus. En este caso la inmortalización de los linfocitos se lleva a cabo empleando el virus de Epstein-Barr y de agentes activadores de linfocitos B memoria policlonales como los oligonucleótidos CpG. Una vez inmortalizados se seleccionan aquellos linfocitos B productores de anticuerpos reactivos frente al antígeno de interés. Esta técnica se ha empleado para obtener anticuerpos monoclonales neutralizantes frente a los virus H5N1 de la gripe aviar y el virus SARS-CoV

La humanización de anticuerpos monoclonales de ratón aún se emplea para generar anticuerpos monoclonales humanos. Esta técnica se emplea especialmente cuando los anticuerpos de ratón presentan características antivirales interesantes o cuando los de humano son difíciles de conseguir. La humanización de un anticuerpo de ratón se consigue transfiriendo los residuos de la región CDR (Complementary Determining Region) de la región variable a una molécula de anticuerpo monoclonal humano, obteniéndose finalmente una molécula de anticuerpo monoclonal humano con los residuos de la región CDR procedentes del anticuerpo de ratón. Con la humanización del anticuerpo se consigue conservar la afinidad y la especificidad de unión del anticuerpo de ratón evitando el riesgo de inmunogenicidad, ya que se trata de un anticuerpo humano.

Mecanismos y modelos para la neutralización de virus

La neutralización de un virus por un anticuerpo in vivo es un proceso complejo que implica la interacción del anticuerpo con otras moléculas y células del organismo. La mayoría de los anticuerpos con actividad neutralizante in vitro también

presentan actividad in vivo. Puesto que la acción de estos anticuerpos en la defensa del organismo es un proceso muy complejo, avances en el conocimiento del proceso permitirán un mejor diseño de estrategias antivirales.

Los anticuerpos que tienen capacidad de neutralización de virus interfieren en alguno de los pasos comunes de la infección viral. A pesar de la gran diversidad de virus, se puede definir un proceso de entrada del virus en la célula común a todos ellos. Este proceso comienza con el reconocimiento y unión del virus a un receptor en la membrana de la célula que va a infectar. Una vez que el virus entra en la célula libera su material genético en el citoplasma. En los virus con envuelta lipídica la fusión de la envuelta viral con la membrana celular es un paso crucial en el proceso de entrada. En los virus sin envuelta la entrada se produce gracias a la lisis parcial de la membrana celular o a la generación de una estructura similar a un poro. Sea cual sea el mecanismo de entrada en todos ellos es crucial un cambio conformacional en las proteínas de entrada de los virus. Este cambio conformacional necesita del reconocimiento del receptor celular por parte de proteínas de superficie del virus, la unión con un correceptor y la exposición de distintas proteínas al ambiente ácido presente en la ruta endocítica. Los anticuerpos monoclonales pueden inhibir la infección viral actuando a cualquier nivel en este proceso. Recientemente se han conseguido anticuerpos monoclonales que actúan sobre cada uno de los niveles de este proceso (Véase animación):

- Bloqueando la proteína de superficie del virus que reconoce al receptor celular. Este es el caso de los anticuerpos neutralizantes anti-gp120 que se unen específicamente a la zona de unión a CD4 de la proteína gp120 del virus HIV-1
- Bloqueando el receptor celular como los anticuerpos frente a CD4 (receptor para el HIV-1)
- Bloqueando el correceptor como los anticuerpos desarrollados frente a los correceptores CCR5 y CXCR4 del virus HIV-1
- Impidiendo la fusión del virus con la célula aunque se haya producido el reconocimiento y la unión al receptor y correceptor. Se han conseguido anticuerpos que bloquean el cambio conformacional de la proteína gp41 de HIV-1 necesarios para la fusión de la envoltura vírica y la membrana celular. En el proceso de entrada del virus HIV-1 es crucial el cambio conformacional que sufre la gp41 para realizar la fusión de membranas. Este cambio conformacional es promovido tras el reconocimiento y unión de gp120 a CD4 y posteriormente a CCR5 o a CXCR4
- En caso de virus que entren en la célula vía endocitosis se han conseguido anticuerpos que impiden los cambios conformacionales necesarios para la fusión de la envoltura vírica con la membrana del endosoma y la liberación de las partículas víricas hacia el citoplasma celular. Un ejemplo son los anticuerpos que bloquean el cambio conformacional de la hemaglutinina del virus de la gripe en el interior del endosoma.
- Los anticuerpos monoclonales también pueden actuar bloqueando la liberación de la progenie vírica hacia el exterior de la célula infectada para expandir la infección hacia otras células. De este modo actúan los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la neuraminidasa de superficie del virión A de la gripe que impiden que los viriones salgan de la célula infectada.

Existen varios modelos que intentan explicar los procesos de neutralización de los virus por parte de anticuerpos. El modelo más sencillo, conocido como modelo “multi-hit”, propone que la neutralización del virus se lleva a cabo por la unión de numerosas moléculas de anticuerpos que lo envuelven e inactivan, de modo que existe una relación lineal entre el tamaño del virus y la cantidad de moléculas de anticuerpos necesarias para la neutralización. Es importante señalar que se puede producir un incremento en la infección viral si el número de moléculas de anticuerpos que rodean al virus no es lo suficientemente elevado como para promover la neutralización, ya que la unión del anticuerpo al virus puede favorecer la entrada del virus en células como monocitos y macrófagos que tienen receptores para el dominio constante del anticuerpo. Otro modelo, conocido como “modelo de unión al sitio crítico” propone que en el proceso de neutralización no influye tanto el número de moléculas de anticuerpos que rodean al virus sino la unión de estas moléculas a determinados sitios que se consideran clave para la infección vírica. Aún no existe acuerdo acerca de los mecanismos de neutralización por parte de los anticuerpos y es posible que el proceso varíe según el tipo de virus.

Aclaramiento de los virus y de las células infectadas mediado por el sistema inmune

La unión de los anticuerpos a la superficie viral puede provocar la activación del complemento sobre la superficie del virus produciéndose finalmente la lisis del virus o favoreciendo la fagocitosis por parte de los fagocitos que expresan el receptor de la molécula del complemento C3b. La unión de los anticuerpos puede también favorecer la opsonización de las partículas víricas que finalmente serán fagocitadas por los fagocitos vía receptor de la fracción constante de la inmunoglobulina.

Las células infectadas por virus expresan proteínas del virus en su superficie que pueden también ser reconocidas por anticuerpos. La unión de los anticuerpos promueve la citotoxicidad por células NK (Natural Killer) que puede producir la

lisis de las células infectadas.

Actualmente se trata de aplicar la tecnología de anticuerpos monoclonales no solo directamente contra virus o células infectadas sino contra inhibidores de la respuesta inmune frente a virus. Este es el caso de los anticuerpos frente al receptor de TNF (Tumor Necrosis Factor). Este receptor se expresa en varios tipos de células T incluyendo células T reguladoras y efectoras y puede disminuir la actividad de las células T efectoras en respuesta a antígenos virales. Se han obtenido anticuerpos monoclonales frente a este receptor que impiden la replicación del virus bloqueando la acción inhibitoria que ejerce sobre las células T efectoras. Los anticuerpos monoclonales tienen un gran potencial en la modulación de la respuesta inmune frente a virus pero es necesario llevar a cabo estudios apropiados y conocer en profundidad el proceso antes de plantear y diseñar terapias empleando estas moléculas ya que pueden producir efectos muy globales difíciles de predecir.

Desarrollo comercial de anticuerpos monoclonales

En la tabla se recogen los anticuerpos monoclonales que se encuentran actualmente bajo estudio como fármacos. En el desarrollo de un anticuerpo monoclonal con efecto antiviral es importante distinguir tres tipos de virus:

- Virus que producen daños graves en los tejidos a los que infectan. Las infecciones por este tipo de virus deben ser tratadas rápidamente para la supervivencia del hospedador. A este tipo de virus se les conoce como virus citopáticos agudos.
- Virus que pueden permanecer latentes durante un tiempo y que al reactivarse se comportan de modo similar a los anteriores. Son los “virus citopáticos con reactivación latente” y un ejemplo es el virus del Herpes.
- Virus que apenas presentan efectos citopáticos pudiendo permanecer en el hospedador durante toda su vida.

Actualmente se encuentran en desarrollo anticuerpos monoclonales frente a virus de los tres tipos. Por ahora el único aprobado por la FDA (US Food and Drug Administration) es el palivizumab. Se trata de un anticuerpo frente a la glicoproteína F del virus RSV (Respiratory Syncytial Virus) o virus respiratorio sincitial que es un virus citopático. El palivizumab se emplea como medida profiláctica en grupos de niños de alto riesgo. Más ejemplos de anticuerpos monoclonales frente a virus citopáticos quedan recogidos en la tabla.

En la tabla también se recoge información sobre anticuerpos dirigidos frente a virus citopáticos con reactivación latente como el citomegalovirus, el virus de la varicela zoster y el virus Epstein-Barr. Los estudios del uso del fármaco Rituximab (anticuerpo frente a CD20) para el tratamiento de la infección por virus de Epstein-Barr se encuentran en fase 2. El uso de este mismo anticuerpo para el tratamiento de la artritis reumatoide y del linfoma no Hodgkin ya está aprobado.

El desarrollo de anticuerpos frente a virus del tercer grupo (apenas citopáticos) es el más extenso centrándose principalmente en el desarrollo de anticuerpos frente al virus HIV-1 y el virus de la hepatitis C. El anticuerpo que se encuentra en un estado más avanzado de desarrollo es el TNX-355 que actúa frente a CD4 y se encuentra en fase 2 de los ensayos clínicos frente al HIV-1. Este anticuerpo y dos más que actúan frente al receptor CCR5 son del subtipo IgG4. La fracción constante de IgG4 interacciona débilmente con las moléculas del complemento y con los receptores para la fracción constante expresados en distintas células del sistema inmune. El uso de IgG4 permitiría bloquear la unión del virus HIV-1 sin provocar la eliminación de las células que expresan CD4 o CCR5 por medio de los mecanismos descritos previamente en el apartado de “Aclaramiento de los virus y de las células infectadas mediado por el sistema inmune”.

Investigación sobre anticuerpos monoclonales frente a virus de humanos en laboratorios de investigación

Actualmente hay un gran interés en el desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a virus de humanos. En todo el mundo podemos encontrar más de 30 laboratorios de investigación trabajando en más de 20 virus diferentes para el desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a virus humanos. La mayor parte de esta investigación se centra en el aislamiento y caracterización de anticuerpos neutralizantes frente a proteínas de la envuelta. En muchos casos los anticuerpos descubiertos se emplean en investigación para entender mejor los mecanismos de entrada del virus y su neutralización, aunque también pueden ser empleados para detectar y caracterizar epítomos neutralizantes en las proteínas de la envuelta.

Cócteles de anticuerpos monoclonales

Estudios con virus de la hepatitis B y con el virus respiratorio sincitial han demostrado los efectos sinérgicos o aditivos de emplear varios anticuerpos monoclonales neutralizantes a modo de cóctel. Empleando este tipo de aproximación se eliminan algunos riesgos derivados de emplear un sólo anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, según el modelo “multi-hit” de la neutralización de las partículas víricas es crucial que se alcance una densidad crítica de anticuerpos neutralizantes rodeando la partícula vírica. En muchas ocasiones es muy difícil conseguir esta densidad empleando anticuerpos frente a un sólo epítomo mientras que se puede conseguir más fácilmente empleando un cóctel de anticuerpos frente a varios epítomos.

En muchos casos puede ocurrir que el epítomo frente al que va dirigido el anticuerpo monoclonal no se encuentre conservado en todas las cepas del virus, e incluso si se encuentra conservado puede ocurrir que el virus sufra mutaciones puntuales que le permitan escapar a la acción del anticuerpo. Empleando cócteles de varios anticuerpos monoclonales dirigidos a varios epítomos podemos asegurar la acción antiviral aunque ocurra alguna de estas variaciones.

Un cóctel de anticuerpos monoclonales frente al virus de la rabia se encuentra actualmente en fase I. Se trata de un cóctel frente a los epítomos CR57 y CR4098. Los anticuerpos monoclonales que actúan frente a cada uno de los epítomos también actúan frente a los mutantes del epítomo complementario. De hecho, tras numerosos estudios de neutralización, aún no se han conseguido aislar virus tras el tratamiento *in vitro* con este cóctel.

Terapias con anticuerpos monoclonales antivíricos en biodefensa y epidemias víricas

Una de las principales ventajas de la terapia antiviral basada en anticuerpos monoclonales es la larga vida media que presentan los sueros empleados. En varios estudios con animales se ha demostrado la eficacia del tratamiento contra la infección cuando se aplicaba una sola dosis antes de la infección (a modo de profilaxis) o tras el inicio de la infección. La posibilidad de desarrollar terapias donde sólo se requiere la aplicación de una dosis de fármaco sería muy útil en el tratamiento de enfermedades respiratorias citopáticas como la gripe aviar por el virus H5N1 o el síndrome respiratorio agudo severo causado por el coronavirus SARS-CoV.

La inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales también podría ser empleada frente a epidemias víricas. En el caso de una epidemia causada por un virus respiratorio se podrían desarrollar estrategias de acción que comenzasen por el tratamiento de individuos de alto riesgo con el objetivo de proporcionarles protección inmediata frente al virus mientras

generan una respuesta antiviral propia o reciben otro tratamiento antiviral. Otras estrategias para controlar la epidemia, como la inmunización de todos los individuos que viven en el área próxima al lugar de inicio, se podrían aplicar para reducir la transmisión del virus.

Conclusiones

El rápido desarrollo de tecnologías de cribado y aislamiento de anticuerpos está permitiendo un gran avance en el desarrollo de anticuerpos monoclonales con acción antiviral. Combinando este tipo de técnicas con tecnologías de mutagénesis y tecnologías de modelado in silico de las propiedades de unión y afinidad de los anticuerpos a desarrollar se pueden conseguir resultados aún mejores de los que se han conseguido hasta el momento.

Los principales objetivos que se intentan alcanzar en esta nueva etapa del desarrollo de la terapia antiviral empleando anticuerpos monoclonales son el desarrollo de anticuerpos monoclonales con mayores capacidades neutralizantes frente a una mayor diversidad de cepas y la modulación de la respuesta inmune adaptada a cada tipo de infección viral mediante la ingeniería de los distintos dominios de los anticuerpos.

Bibliografía

- [The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics.](#)

(Ver página Web)

Temas

Elementos móviles en el genoma humano



Resumen

Los principales elementos móviles del genoma humano son los transposones que son unidades genéticas móviles con una amplia diversidad en su estructura y en los mecanismos de transposición que utilizan. Los elementos transponibles son muy abundantes en el genoma humano y representan una fuerza importante en la modificación de genes y genomas a lo largo de la evolución.

Se distinguen tres tipos de elementos móviles:

- Los de clase I o retrotransposones. En su proceso de transposición primero se transcriben generando ARN que luego la transcriptasa inversa copia a ADN. Este ADN se reinserta en el genoma en una nueva localización.
- Transposones ADN o de clase II. Son fragmentos de ADN que se mueven de un lugar a otro del genoma mediante un mecanismo de “cortar y pegar” que no requiere la síntesis de un intermediario de ARN.
- Transposones clase III. Son minitransposones que se comportan como elementos móviles. Un ejemplo de este tipo son los elementos conocidos con las siglas MITE “Miniature Inverted-repeats Transposable Elements”

Los transposones pueden moverse por el genoma gracias a la acción de la enzima transposasa. Los transposones que codifican una enzima transposasa en su propia secuencia se conocen como elementos autónomos frente a aquellos que no la incluyen que se conocen como elementos no autónomos.

Lejos de ser ADN inservible, recientes estudios atribuyen a los elementos móviles gran importancia en aspectos tan cruciales como la organización estructural del genoma o la introducción de la plasticidad genómica necesaria para mejorar la adaptación al medio.

Concepto

Actualmente se piensa que los elementos transponibles son elementos génicos antiguos que pudieron aparecer incluso antes de la separación entre eucariotas y procariotas. Su presencia en la mayoría de los genomas de procariotas y de eucariotas demuestra su persistencia evolutiva. A los elementos transponibles se les supone un origen muy antiguo relacionado con los virus, incluso anterior a la separación de procariotas y eucariotas. Provocan diversos efectos, influyendo profundamente en la organización, integridad y evolución del genoma hospedador así como en su transcriptoma ya que pueden ejercer acciones reguladoras de la transcripción. Los transposones son agentes mutagénicos ya que pueden causar mutaciones al insertarse. Pueden insertarse en un gen funcional, en exones, en intrones o en el ADN que flanquea los genes pudiendo causar la inhibición, destrucción o alteración de la actividad de dichos genes. La abundancia de los distintos tipos de elementos móviles varía en gran medida según el genoma. En el genoma humano predominan los retrotransposones que pueden llegar a constituir el 40 % del genoma. Existe una tremenda variación en la abundancia relativa de los transposones de ADN frente a los retrotransposones (en humanos hay una mayor abundancia de retrotransposones) entre diferentes especies.

Existen tres clases principales de transposones:

- Los transposones de clase I o retrotransposones. Muchos presentan largas repeticiones terminales (LTRs: Long Terminal Repeats) de hasta 1000 pares de bases cada una. Suponen el 40 % del genoma humano. Existen dos grandes grupos de retrotransposones en humanos: las secuencias LINE (Long Interspersed Nuclear Elements) y las SINE (Short Interspersed Nuclear Elements). La mayoría de los retrotransposones presentes en el genoma humano son de tipo LINE que incluyen en su secuencia un gen que codifica una transcriptasa inversa. Presentan una gran diversidad en su secuencia que permite utilizarlas como “fingerprint” (huella dactilar) de especie. Los elementos LINE pueden jugar un importante papel en la regulación de la transcripción de numerosos genes. Las secuencias SINE son otro tipo de retrotransposones de secuencia más corta (de unas 100 a 400 pares de bases). Los elementos SINE son transcritos por la ARN polimerasa III y en el genoma humano representan el 11 % del genoma.
- Transposones de ADN o de clase II. Este tipo de transposones se mueve en el genoma mediante un proceso de “cortar y pegar” llevado a cabo por transposasas que pueden estar codificadas por el propio transposón o por genes no incluidos en ese transposón. La transposasa reconoce y se une a ambos extremos del transposón. Estos extremos son secuencias idénticas invertidas llamadas TIRs (Terminal Inverted Repeats). La transposasa corta el ADN de forma específica en una secuencia diana originando extremos cohesivos de modo similar a algunas enzimas de restricción. A continuación el transposón se une al ADN del hospedador, creando dos sitios idénticos repetidos en cada extremo del transposón. A menudo los transposones pierden el gen de la transposasa convirtiéndose en elementos no autónomos. Estos elementos no autónomos a veces utilizan las transposasas de otros elementos móviles que conservan la transposasa para moverse a una nueva localización. En eucariotas se pueden clasificar en tres grupos principales: (i) aquellos que se escinden de la doble cadena de ADN y se reinsertan en otro lugar del genoma mediante el mecanismo de “cortar y pegar” (ii) los helitrones que usan un mecanismo de tipo círculo rodante (rolling circle) para su replicación (iii) y los transposones llamados “Mavericks” que parecen replicarse empleando una ADN polimerasa codificada en su propia secuencia. Los Mavericks son transposones gigantes con TIRs muy largos. Tienen la capacidad de codificar una ADN polimerasa de tipo b y otras proteínas.

- Los transposones de clase III o MITEs. Son transposones cortos que se caracterizan por su alto número de copias y homogeneidad en tamaño. Son secuencias de unas 400 pares de bases flanqueadas por repeticiones invertidas de 15 pares de bases. Son demasiado cortas para codificar una proteína, por lo que existen varias hipótesis sobre su origen y forma de multiplicación. La homogeneidad estructural de la familia MITE indica que estas familias surgen por amplificación de una sola copia o unas cuantas copias a partir de un progenitor común (otro transposón). Sin embargo es difícil conectar directamente una determinada familia de MITEs con un transposón autónomo presente dentro del mismo genoma. En muchos estudios la similitud entre la familia MITE y el supuesto elemento autónomo más cercano se limita a la región TIR. Una hipótesis sobre su forma de movilización se basa en la existencia de transposones más grandes con actividad enzimática propia y con capacidad de reconocer las repeticiones invertidas de los MITE. La acumulación de familias MITE a lo largo del tiempo crea un reservorio de elementos listos para una movilización cruzada accidental por nuevos transposones autónomos emergentes, disparando nuevas olas de amplificación de MITEs y aumentando el material genético del hospedador.

La mayoría de los transposones se mueven a través del genoma por mecanismos no replicativos e incrementan su número de copias a través de mecanismos indirectos que dependen de la maquinaria del hospedador.

Los transposones, de cualquiera de las tres clases, pueden presentar secuencias que codifican una gran variedad de productos. Sólo en algunas ocasiones, por medio de mecanismos evolutivos, algunas de las proteínas codificadas por los transposones quedarán integradas en el genoma del hospedador como elementos útiles y regulables. También gracias a mecanismos evolutivos, los transposones se han convertido en una diana natural para una serie de mecanismos de silenciamiento como la interferencia por ARN (ARNi) o mecanismos epigenéticos que impiden que se movilicen. Estos sistemas de defensa intracelular también operan frente a retrotransposones y virus.

Existen otros sistemas de vigilancia de transposones como es el caso concreto de la proteína centromérica CENP-B. Esta proteína, del mismo modo que sus ortólogos en diversas especies, se encarga de localizar y reclutar enzimas desacetilasas que silencian a un tipo de retrotransposones, los Tf2. Los retrotransposones Tf2 se agrupan a lo largo del genoma en unas estructuras discretas organizadas por la CENP-B y otras proteínas que se llaman cuerpos Tf. La proteína CENP-B es un caso de proteína codificada por un transposon que se ha integrado funcionalmente en el genoma del hospedador. CENP-B deriva de transposasas pertenecientes a transposones ADN cuya función se piensa era impedir la movilidad de los retrotransposones en lo que se podría llamar competición entre transposones. La proteína humana CENP-B tiene varias funciones además de la vigilancia de los retrotransposones. Se encarga de facilitar la formación del centrómero mediante la unión a pequeñas secuencias repetidas de ADN satélite dentro del centrómero. La CENP-B también se une a muchos promotores de genes que, en otro tiempo, podrían haber contenido elementos transponibles en sus secuencias. Así las secuencias de los elementos transponibles podrían verse como módulos reguladores versátiles que potencian la capacidad de las células de modular la red de regulación génica.

Los transposones de la clase II o de ADN pueden influir en la trayectoria evolutiva de sus hospedadores de tres maneras distintas:

- Alterando genes funcionales al insertarse bien en la región codificadora o en la reguladora
- Induciendo la reorganización cromosómica
- Como fuente de material genético que, por mutaciones u otros mecanismos, permite la aparición tanto de nuevos genes como de nuevas secuencias reguladoras

A diferencia de la mayoría de los retrotransposones, muchos transposones ADN del tipo cortar y pegar exhiben una marcada preferencia para la inserción dentro o en la vecindad de genes lo que les confiere una capacidad potencial para generar una diversidad alélica en poblaciones naturales o alterar la regulación de genes. Otra importante propiedad es la de crear mutaciones inestables con fenotipos reversibles. Muchas veces esto se debe a la escisión imperfecta espontánea

del transposón, que puede alterar el gen provocando pequeñas deleciones o inserciones. La generación de nuevos alelos y la creación de circuitos de regulación es una de las fuerzas principales que subyace en la diversificación de especies. La capacidad de los transposones de ADN de provocar diversidad alélica a nivel evolutivo es difícil de demostrar aunque en el laboratorio se ha conseguido un amplio rango de alteraciones de genes y fenotipos causados por escisión de transposones.

Los transposones participan activamente en la organización del genoma en dominios cromosómicos caracterizados por distintas marcas epigenéticas y distinta actividad transcripcional. Estas marcas son heredables y normalmente estables, pero pueden estar sujetas a cambios dinámicos en respuesta a factores ambientales y estrés genético. Las reorganizaciones a gran escala inducidas por transposasas se consideran una clase particular de eventos de recombinación que influyen en la plasticidad genómica pudiendo provocar desde inversiones o duplicaciones hasta deleciones de hasta cien kilobases.

Una de las mayores contribuciones de los elementos transponibles a la evolución del genoma del hospedador es proporcionar una fuente de material genético para crear nuevos genes y nuevas funciones. Los elementos transponibles tienen numerosas propiedades que los predisponen para ser integrados por el genoma del hospedador para ganar ventajas funcionales. Esta contribución es difícil de cuantificar ya que no es fácil trabajar a la escala de tiempo a la que ocurren todos estos procesos y no existen métodos que determinen con exactitud la antigüedad de una posible integración de un elemento transponible. El reciclado de los dominios de unión a transposasas para construir factores de transcripción es un tema actualmente sometido a debate. No es de extrañar que, debido al largo tiempo evolutivo de convivencia, las transposasas hayan establecido interacciones con distintos elementos del hospedador. Un ejemplo de proteína codificada por un transposón que se ha integrado funcionalmente en el genoma es la proteína CENP-B (Ver arriba). Hay también indicios que involucran a las transposasas en el control del ciclo celular, la recombinación y otros aspectos de la dinámica cromosómica.

En la generación de anticuerpos existen dos elementos esenciales para la recombinación genética: (i) las proteínas RAG1 y RAG2 que interaccionan para formar la recombinasa responsable de la unión y recombinación génica de los segmentos VDJ y (ii) la señal de recombinación de secuencia (RSS:Recombination Signal Sequence) que flanquea los segmentos VDJ que codificarán, tras la reorganización génica, la región variable de las inmunoglobulinas. Existen evidencias que relacionan estos elementos con las transposasas de eucariotas. Así, por ejemplo, las transposasas tienen un mecanismo de recombinación similar al empleado por RAG1/2 y también se ha detectado similitud estructural entre las secuencias RSS y las secuencias TIRS de los transposones.

Bibliografía

- [Host genome surveillance for retrotransposons by transposon-derived proteins](#)
- [DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes](#)

(Ver página Web)



Proteolisis intracelular (Proteasoma)

Resumen

Uno de los medios que emplean las células para controlar la función de las proteínas es regular su concentración controlando el balance entre síntesis y degradación. El proteasoma es el sistema más importante de degradación de proteínas. Es un complejo de proteínas de 2500 KDa (26S) presente en la mayoría de los seres vivos. Para que una proteína sea reconocida y degradada en el proteasoma es necesario un marcaje previo con ubiquitina. La ubiquitinación de proteínas es un mecanismo de etiquetado, como lo son la fosforilación o la glicosilación. Las proteínas ubiquitinadas sufren degradación en el proteasoma 26S. Existen también un grupo de enzimas (DUBs) que eliminan las ubiquitinas del sustrato. El proteasoma puede degradar proteínas mal formadas o que precisan un recambio por antigüedad. El proteasoma cobra especial importancia en la degradación de proteínas de vida media muy corta como las ciclinas del ciclo celular, las proteínas que participan en la cascada de señalización intracelular en respuesta a señales externas o las que participan en la reparación del daño en el ADN. Debido a la gran cantidad de procesos en los que participan el proteasoma y el sistema de marcaje por ubiquitinación la repercusión de sus alteraciones puede tener un gran alcance. Alteraciones en elementos del proteasoma parecen relacionarse con Parkinson y con algunos tumores.

Concepto

En la célula eucariota existen dos vías importantes de degradación de proteínas: la ruta vacuolar y la ruta citoplásmica. En la ruta vacuolar participan los lisosomas, los endosomas y el retículo. La ruta citoplásmica está mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma. La ruta citoplásmica es fundamental en la regulación de proteínas de vida media corta.

El proteosoma es un complejo proteico de 2500 KDa. Está estructurado en tres subunidades:

- Una subunidad 20S que es la partícula núcleo de 670 KDa, con actividad catalítica
- Dos subunidades 19S con actividad reguladora

La subunidad 20S tiene forma de barril y es un complejo de cuatro anillos apilados (véase la animación). Cada anillo está compuesto de siete proteínas. Estos anillos son idénticos dos a dos, los dos externos y los dos centrales, a los anillos externos se les llama anillos alfa y a los centrales anillos beta. El sitio activo encargado de romper el enlace peptídico se encuentra en el interior de la cavidad de la subunidad 20S entre los dos anillos beta. Los anillos alfa forman un pequeño canal que permanece cerrado, las subunidades reguladoras 19S permiten la apertura de este canal y la entrada del sustrato al proteasoma.

Las subunidades reguladoras 19S son un complejo de cerca de 1000 kDa formado por, al menos, 19 proteínas. Las subunidades 19S se pueden unir a los dos extremos de la subunidad 20S formando el proteasoma 26S. Cada subunidad 19S se puede dividir en dos subunidades: la base y la tapa. La base se localiza próxima a la subunidad 20S y contiene seis ATPasas tipo AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities) y cuatro subunidades no ATPasa llamadas Rpn1, Rpn2, Rpn10 y Rpn13. Se piensa que las seis ATPasas forman un anillo con capacidad de linealizar proteínas permitiendo su paso por el estrecho canal formado por la subunidad 20S. Recientes estudios indican que aunque exista una gran similitud entre estas ATPasas sus funciones no son equivalentes. Algunas ATPasas abren el poro, otras reconocen a la ubiquitina y otras se unen a receptores de ubiquitina que tienen un dominio específico. La tapa está compuesta por ocho componentes. Seis de ellos tienen un dominio PCI (Proteasome, CSN, eIF3), de función desconocida, y dos tienen el dominio MPN (Mpr1/Pad1 N-terminal) con actividad metaloproteasa que elimina la ubiquitina del sustrato.

El proteasoma puede ser regulado mediante distintas vías. Rpn4 es una proteína capaz de estimular la inducción concertada de los genes que codifican el proteasoma. Según las necesidades celulares se puede inducir la expresión de todos los genes o solamente la inducción de algunos de los genes que codifican el proteasoma.

El gen que codifica Rnp4 está sujeto a una compleja regulación en la que participan varios factores de transcripción para poder responder a los distintos estímulos y tipos de estrés celular que puedan requerir un aumento en los niveles de proteasoma. Se ha comprobado que las regiones cercanas al promotor del gen Rnp4 son reconocidas por factores de choque térmico (Hsf1), por dos factores de transcripción asociados a resistencia a fármacos (Pdr1 y Pdr3) y por el factor de transcripción Yap1 relacionado con la respuesta al estrés oxidativo, entre otros. La proteína Rnp4 también actúa sobre los promotores de más de 20 genes relacionados con diversas funciones tales como la ubiquitinación, el metabolismo del ARN, la función vacuolar y la utilización de glucosa. La propia proteína Rnp4 tiene una vida media muy corta siendo su principal vía de degradación independiente de ubiquitina, aunque también puede ser degradada vía ubiquitina estableciéndose una retroalimentación negativa en el mecanismo de síntesis del proteasoma.

En la célula también existen mecanismos de regulación de los proteasomas ya sintetizados. De hecho la célula es capaz de inducir la formación de configuraciones alternativas del proteasoma con propiedades que pueden ser útiles bajo ciertas condiciones celulares. Por ejemplo, el interferón gamma induce la síntesis de las proteínas LMP2, LMP7 y MECL1 que formarán parte de las 7 subunidades de proteína que componen cada anillo beta. El proteasoma que contiene estas proteínas en sus anillos beta es el implicado en el procesamiento de antígeno para su posterior presentación vía MHC de clase I.

Para que una proteína sea reconocida y procesada en el proteasoma es necesario que se encuentre marcada con ubiquitina. El proceso de ubiquitinación de una proteína requiere la participación de tres tipos de enzimas:

- La enzima activadora de ubiquitina E1
- La enzima conjugadora de ubiquitina E2
- La ubiquitina ligasa E3

Gracias a la acción de estas tres enzimas el grupo carboxilo de la glicina del extremo carboxilo terminal de la ubiquitina forma un enlace con el grupo epsilon amino de un residuo de lisina del sustrato. Hay gran número de enzimas implicadas en ubiquitinación. Actualmente se cree que la especificidad de la ubiquitinación radica en el reconocimiento de los sustratos por las enzimas de tipo E, principalmente por la E3 ligasa. Se estima que en el proteoma humano existen 16 enzimas del tipo E1, 53 del tipo E2 y 527 del E3. Muchas líneas de investigación sugieren que el destino de la proteína marcada dependerá de la longitud y de la topología de la cadena de ubiquitinas que lleve.

Se puede considerar la ubiquitinación como un mecanismo de señalización celular. La ubiquitinación juega un importante papel en la regulación de la vida media de proteínas implicadas en la señalización intracelular, particularmente en la regulación de los receptores acoplados a proteínas G y de las propias proteínas G. Se ha observado en algunos casos que el proceso de activación por ligando de los receptores acoplados a proteína G provoca la ubiquitinación en alguno de los elementos que participan en la transducción de la señal como la subunidad alfa de la proteína G o el propio receptor.

El sistema proteasoma-ubiquitina es fundamental en el correcto mantenimiento de los niveles adecuados de las distintas proteínas celulares. Fallos en este sistema pueden contribuir a la aparición de enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer, la fibrosis quística o el mieloma múltiple. Debido a la desestabilización en la concentración de proteínas supresoras de tumores o de oncoproteínas importantes en la regulación del ciclo celular las alteraciones en el proteasoma pueden ocasionar la transformación de células normales en células cancerosas. En varios estudios se relaciona niveles bajos de la proteína supresora de tumores p27 y una sobreexpresión de Skp2. Skp2 es un tipo de enzima E3 que reconoce y ubiquitina a p27. En el desarrollo de muchos tipos de cánceres se han detectado niveles bajos de p27.

Algunos virus con periodos de infección largos tienen mecanismos para interferir en la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma. Por ejemplo, los citomegalovirus impiden la presentación antigénica vía MHC de clase I actuando sobre el proteasoma. El citomegalovirus codifica las proteínas US2 y US11 que se pueden unir a moléculas MHC promoviendo su ubiquitinación y su posterior degradación. De este modo el citomegalovirus evita la presentación antigénica.

Debido a la gran participación del sistema ubiquitina-proteasoma en la fisiología de la célula este sistema supone una diana terapéutica potencial en muchas patologías. Actualmente muchos fármacos que actúan sobre el proteasoma se encuentran bajo estudio como el Bortezomib. El Bortezomib inhibe la actividad del proteasoma al unirse de forma reversible a una treonina del sitio activo de la subunidad 20S. La interacción del Bortezomib con el proteasoma favorece la apoptosis afectando a un grupo importante de proteínas reguladoras incluyendo p53, NF-kappaB y Bax que es un inhibidor proapoptótico de Bcl-2. Dos ensayos clínicos que se encuentran en fase 2 han demostrado que el Bortezomib suministrado sólo o combinado con dexametasona, es eficaz en pacientes que sufren recaídas de mieloma múltiple. Y en un ensayo en fase 3 se comprobó que el Bortezomib era más eficaz y seguro que la dexametasona.

Bibliografía

- [The emerging role of targeted therapy for hematologic malignancies: update on bortezomib and tipifarnib.](#)
- [Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection.](#)
- [Seven-transmembrane receptors and ubiquitination.](#)
- [A proteasome for all occasions.](#)

- [Dissecting the ubiquitin pathway by mass spectrometry.](#)

(Ver página Web)

Telómeros

Resumen



El telómero es una región de ADN no codificante que se encuentra en los extremos de los cromosomas lineales. La longitud del telómero varía según la especie y el cromosoma. En la especie humana el ADN telomérico (ADNt) está formado por la repetición en tándem de la secuencia telomérica “TTAGGG/AATCCC” que se encuentra repetida unas 2000 veces. Los telómeros están implicados en numerosas funciones celulares relacionadas con la estabilidad de los cromosomas y la división celular. Estructuralmente, el ADN de los telómeros tiene una región de doble hebra y una zona, en el extremo 3', que carece de hebra complementaria. Las dos hebras del telómero son asimétricas en cuanto a composición y tamaño. La hebra del extremo 3' es rica en G y la hebra del extremo 5' es rica en C.

En los cromosomas lineales la ADN polimerasa no puede copiar las últimas bases del extremo 3' del telómero ya que necesita espacio en la hebra molde para la introducción del cebador. Como consecuencia de este impedimento, en cada ciclo de replicación del ADN los cromosomas lineales sufren un pequeño acortamiento. Si este acortamiento es excesivo puede verse afectada la integridad del cromosoma. La enzima telomerasa lleva a cabo la elongación de los telómeros que permite la conservación del tamaño de los telómeros tras los ciclos de replicación. La telomerasa es una ribozima que lleva consigo un molde de ARN que emplea para sintetizar ADN telomérico en el extremo 3' del cromosoma.

Cuando una línea celular no tiene una telomerasa activa, los telómeros de los cromosomas se van acortando de unos 50 a 200 pares de bases en cada división. Si el acortamiento alcanza un nivel crítico se induce la senescencia de las células de esa línea celular. En definitiva los telómeros se pueden considerar como estructuras dinámicas que actúan a modo de reloj celular. Su longitud está en relación con el tiempo de vida y depende de varios factores como la velocidad de degradación de los telómeros y la velocidad y el tiempo de actuación de la telomerasa en cada cromosoma.

Concepto

Los telómeros se relacionan con las siguientes funciones celulares:

- Mantenimiento de la estabilidad cromosómica formando estructuras que evitan la fusión de cromosomas o la actuación de mecanismos degradativos, evitando así la muerte celular y la pérdida de genes importantes para la vida de la célula.
- La mitosis. La longitud de los telómeros es uno de los parámetros que determinan el número de divisiones de una célula y por tanto la duración de su vida.
- La meiosis ya que facilitan el reconocimiento de cromosomas homólogos.
- La activación o desactivación de la telomerasa influye en el desarrollo y el envejecimiento de los tejidos de un organismo.
- La telomerasa juega un importante papel en alteraciones fisiológicas como el desarrollo de carcinogénesis o la infección por el VIH.

Al ADN telomérico se asocian de forma específica un conjunto de proteínas, además de las histonas, cuyas funciones aún no se conocen con exactitud. Algunas de estas proteínas conectan el estado del telómero con la regulación de rutas metabólicas. La pérdida funcional de estas proteínas puede causar graves trastornos. A continuación se describen algunas de estas proteínas:

- Los factores TRF1 y TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 1 and 2) se asocian a la zona de doble hebra del telómero y están implicados en el control de la longitud del telómero y en la formación y mantenimiento de estructuras protectoras de los telómeros
- Proteínas de protección telomérica (POT1) que se asocian a la región monohebra. La proteína POT1 además de proteger la monohebra puede mediar la acción de TRF1 sobre la longitud del telómero.
- La proteína RAP1 (Repressor Activator Protein) que es capaz de interactuar con TRF2 y parece ser un regulador negativo de la longitud del telómero.
- Helicasas “Bloom” y “Werner” (BLM y WRN). Interaccionan con las proteínas descritas anteriormente y, aunque sus acciones aún no se conocen con exactitud, alteraciones en estas proteínas parecen estar relacionadas con enfermedades que implican inestabilidad genética.

Varios estudios han demostrado que la proteínas que se asocian al telómero son capaces de formar estructuras protectoras en el telómero como el “t-loop” o los “G-cuadrupletes”. El “t-loop” es un lazo en el extremo final del telómero que se forma al introducirse el extremo monohebra 3’ en la región de doble hebra del telómero. Los G-cuadrupletes son pliegues que permiten la interacción de varias guaninas de la propia hebra y que se estabilizan gracias a la interacción con un catión monovalente como el K⁺ o el Na⁺. La topoisomerasa I es la enzima que forma estas estructuras de G-cuadruplete en humanos.

La telomerasa es una ribozima compleja formada por varias subunidades. Su núcleo principal está compuesto por la subunidad catalítica llamada hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) de naturaleza proteica y con actividad de transcriptasa inversa, y la subunidad de ARN llamada hTR (human Telomerase RNA) que tiene una estructura secundaria específica y hace de molde para la síntesis de ADN telomérico. En el ensamblaje de la telomerasa participan la Hsp90 (Heat shock protein 90) y la p23. La actividad de la telomerasa está determinada por el tipo de tejido y el momento del desarrollo. Por ejemplo en tejidos de adultos con intensa renovación como células endoteliales y el endometrio existe una alta actividad telomerasa. En linfocitos B o T se induce su actividad cuando son activados. En las células del blastocito se aprecia un alto nivel de telomerasa en casi todos los tejidos que desaparece después del nacimiento.

Se ha observado que la telomerasa está activa en más del 85 % de los tejidos cancerosos ya que el mantenimiento del telómero es fundamental para la proliferación continuada de las células cancerosas. La detección de niveles elevados de telomerasa se ha usado para el diagnóstico precoz del cáncer. Inhibidores de la telomerasa se han utilizado como agentes antitumorales con alto grado de selectividad. Mutaciones en hTERT y hTR se han asociado a enfermedades que afectan a la médula espinal y a otros síndromes con una serie de síntomas comunes como el envejecimiento prematuro, la susceptibilidad al cáncer, la sensibilidad al daño del ADN y los telómeros críticamente cortos. Un ejemplo es el síndrome “Nijmegen breakage” (NBS).

La telomerasa es una importante potencial diana terapéutica para procesos tumorales. También ha suscitado gran interés como herramienta para potenciar la supervivencia de células de cultivos celulares para su uso en ingeniería tisular. La introducción de hTERT es suficiente para originar actividad telomerasa en células que no la tienen. Se han conseguido un gran número de líneas celulares diferentes de este modo.

La mayoría de las estrategias terapéuticas que actúan sobre el telómero o la telomerasa se encuentran aún en fase de investigación en el laboratorio.

La terapia con ARN interferente es un efectivo método de inhibición de la expresión de un gen determinado en células humanas. Se han realizado experimentos de transfección con fragmentos de ARN de 21 nucleótidos cuya diana era el ARN mensajero de la subunidad catalítica de telomerasa, logrando una reducción de la actividad telomerasa en una variedad de líneas celulares de carcinomas o sarcomas. Por ejemplo, experimentos realizados con siRNA (short-interfering RNA) complementario a hTERT y a hTR en cáncer de colon demuestran un descenso de la actividad telomerasa de hasta 35 %.

Otra enfermedad donde el papel de la telomerasa es relevante es el SIDA donde se aprecia un déficit en la actividad telomerasa. En personas con infección crónica de VIH una gran proporción de las células T CD8+ muestran características de senescencia replicativa. La senescencia replicativa es un estado final de la enfermedad caracterizado por una inhibición irreversible del ciclo celular, múltiples cambios genéticos y funcionales y un acortamiento de los telómeros. Estas características disminuyen la capacidad proliferativa de los linfocitos ante una estimulación antigénica y permite el avance del SIDA. Estudios *in vitro* demostraron que la inducción de la expresión de hTERT aumentaba de forma apreciable la capacidad para inhibir la replicación del virus VIH-1 y promovía la producción de IFN-gamma y TNF-alfa en respuesta a una estimulación con derivados peptídicos del VIH. De esta forma, la inducción de la actividad de la telomerasa puede dar lugar a nuevas formas de inmunoterapia, particularmente durante los últimos estados de enfermedad cuando la actividad citotóxica de las células T CD8+ está muy disminuida. Estudios con células derivadas de individuos infectados muestran que un incremento de la longevidad de la célula y de la estabilización de la longitud del telómero previene del incremento de inhibidores del ciclo celular, aumenta la producción de citoquinas asociadas a respuesta inmune antiviral y retrasa la pérdida de la expresión de CD28.

La actividad telomerasa también se puede regular modulando la actividad de las proteínas que intervienen en su ensamblaje, como la Hsp90 y la p23. La inhibición de la Hsp90 además de impedir la formación del complejo produce la degradación de hTERT. Existen inhibidores de la telomerasa como la geldanamicina y la novobiocina.

Otro tipo de moléculas estudiadas como posibles fármacos actúan estabilizando la estructura G cuadrupletes. Algunos ejemplos de este tipo de moléculas son el "BRACO-19", la "3,6,9-trisubstituted acridine" y la telomestatina. La telomestatina inhibe la interacción de POT1 con los G-cuadrupletes del telómero. En estudios recientes se comprobó que células tratadas con telomestatina mostraban un fuerte descenso en los niveles de POT1 unido a los telómeros, produciéndose una desprotección del telómero y un incremento en su tasa de degradación. También se comprobó que la sobreexpresión de POT1 permite, no obstante, la resistencia al tratamiento con telomestatina

Bibliografía

- [Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference.](#)
- [The human telomere and its relationship to human disease, therapy, and tissue engineering.](#)
- [Genetic manipulation of telomerase in HIV-specific CD8+ T cells: enhanced antiviral functions accompany the increased proliferative potential and telomere length stabilization.](#)

(Ver página Web)

Glosario

Receptores

Definición



Los receptores son proteínas transmembrana. Principalmente se localizan en la membrana plasmática aunque también se han encontrado receptores en las membranas de los orgánulos. Su función principal es reconocer elementos extracelulares como ligandos que no pueden atravesar las membranas (hormonas, neurotransmisores, antígenos) u otros receptores presentes en membranas de células vecinas o de patógenos. Como consecuencia de esta interacción a menudo sufren un cambio conformacional que afecta a la actividad de su dominio intracitoplasmático en un proceso conocido como transducción de señales.

Los receptores localizados en la membrana plasmática se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- Canales abiertos por ligando. Al reconocer el ligando sufren un cambio conformacional que supone la apertura del canal permitiendo el paso de distintas moléculas. El tipo de moléculas que pasen a través del canal dependerá de la especificidad del mismo. Algunos canales permiten el paso exclusivo de una molécula o ión, otros permiten el paso de un grupo de moléculas parecidas. Este tipo de receptores son muy importantes en la sinapsis donde el neurotransmisor liberado en el terminal axónico es el ligando de receptores de este tipo situados en la membrana de la célula post-sináptica. Este tipo de receptores pertenecen a una misma familia de proteínas transmembrana y son similares en secuencia y estructura.
- Receptores acoplados a proteínas G: La unión del ligando provoca la separación de las subunidades de la proteína G, que se encuentra asociada al receptor en el lado citoplasmático. Las subunidades de la proteína G van a actuar sobre otras proteínas de membrana (canales iónicos o enzimas principalmente) generando un segundo mensajero. Estos receptores pertenecen a una familia de proteínas transmembrana caracterizadas por tener siete pasos transmembrana. Este grupo de receptores son la diana de muchos fármacos.
- Receptores asociados a enzimas. La mayoría de estos receptores sólo tienen un paso transmembrana. Pueden presentar la actividad catalítica en el dominio citoplasmático o estar asociados a una enzima.

[\(Ver página Web\)](#)

Repeticiones Alu

Definición

Las repeticiones Alu son las secuencias repetitivas móviles más abundantes del genoma humano. Son secuencias cortas, de unos 300 pares de bases, ricas en guanina y citosina. Las secuencias Alu juegan un papel muy importante en la estabilidad genómica y en el control epigenético de la expresión génica. Estudios recientes confirman la importancia de estas secuencias en el control de la expresión génica probando que moléculas de ARN transcritas a partir de estas secuencias pueden estar implicadas en la regulación de la expresión génica durante el proceso de choque térmico actuando sobre la ARN polimerasa II.

En el genoma humano podemos llegar a encontrar una secuencia Alu cada 3 kilobases. Cada secuencia Alu está formada por dos repeticiones de una secuencia de unos 120 pares de bases a las que se les llama monómeros. Flanqueando los monómeros encontramos unas repeticiones directas de menor tamaño (de 6 a 18 pares de bases) y en el extremo de cada monómero se encuentra una zona rica en adenina en una hebra y de timina en la hebra complementaria. La secuencia de ambos monómeros generalmente es igual salvo en un fragmento de unos 32 pares de bases que está ausente en uno de los monómeros.

Las secuencias Alu son retrotransposones. Normalmente se insertan en regiones ricas en adenina y timina a través de un intermediario de ARN que es copiado a ADN gracias a la acción de la transcriptasa inversa. Al introducirse en una nueva región de ADN pueden alterar la expresión de un gen si se introducen en su región codificante o en su promotor. Además, la inserción de la nueva copia de la repetición Alu introduce una secuencia consenso que es reconocida en el proceso de maduración del ARN como punto de corte de intrones en 3'. Al introducir un nuevo sitio de corte puede afectar a la maduración del ARN mensajero y a la síntesis de la proteína. Recientemente se han descrito procesos de reordenamiento génico mediados por este tipo de secuencias que provocan la aparición de distintos tipos de tumores, generalmente hereditarios. Por ejemplo, en una forma hereditaria del cáncer colorrectal sin poliposis y del cáncer de endometrio se han detectado dos secuencias Alu situadas en intrones del gen MLH1 que producen una recombinación que provoca una delección y un reordenamiento del gen.

Las secuencias Alu participan también en la regulación epigenética de la expresión génica. Las citosinas de estas repeticiones puede ser metiladas alterando así el grado de empaquetamiento del ADN. En procesos como el envejecimiento y el cáncer se aprecia una desmetilación significativa de los elementos Alu. Este cambio en el patrón de metilación se asocia con inestabilidad genómica y con reactivación de genes. En un estudio publicado recientemente se identifican y comparan los distintos elementos Alu desmetilados en células epiteliales de colon normales y tumorales. Otro estudio reciente corrobora la importancia de estas secuencias en el control de la expresión génica. En este estudio se demuestra que transcritos de secuencias Alu de humanos pueden participar en el control de la expresión génica durante el choque térmico actuando sobre la ARN polimerasa II de un modo que hasta ahora sólo se había descrito para proteínas que actúan como factores de transcripción.

(Ver página Web)



Potenciación a largo plazo

Definición



En algunas zonas del hipocampo relacionadas con la memoria y el aprendizaje las neuronas son capaces de establecer un tipo distinto de sinapsis que necesita la expresión de un tipo especial de receptores de membrana. Ante un estímulo continuado las neuronas que poseen receptores NMDA para el neurotransmisor glutamato se hacen más sensibles a los estímulos recibidos sintetizando proteínas que aumentan el tamaño y la durabilidad de las placas sinápticas. A este fenómeno se le llama “long-term potentiation” (LTP) o potenciación a largo plazo y es una de las bases moleculares de la memoria.

Varios estudios realizados en ratas y ratones han permitido identificar un conjunto de neuronas del hipocampo imprescindibles para la memorización. También se ha comprobado que, a diferencia de otras regiones del cerebro, en el hipocampo existen células madre capaces de generar nuevas neuronas que establezcan conexiones sinápticas más sensibles al fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP) para nuevos recuerdos.

La implicación de los receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), que interactúan principalmente con glutamato, en el fenómeno de LTP se pudo comprobar en estudios en los que se impedía el proceso de LTP tras administrar ácido APV (Amino-5-PhosphonoValeric acid). El ácido APV bloquea la acción de los receptores NMDA. En estado de reposo las neuronas del hipocampo tienen dos tipos de receptores que unen glutamato. Unos se abren inmediatamente al reconocer y unirse al glutamato permitiendo la entrada de Na^+ que produce la despolarización de la célula postsináptica. El otro tipo de receptor, el NMDA, que se encuentra bloqueado por Mg^{++} en estado de reposo, sólo se abre si el estímulo es prolongado e intenso (una hora o más). Ante un estímulo prolongado se libera el Mg^{++} y se produce la apertura de estos receptores NMDA y entra Ca^{++} hacia el interior de la neurona postsináptica. Es fundamental que se den las dos condiciones para la entrada del Ca^{++} , la unión de glutamato a NMDA y el desbloqueo del canal por un estímulo prolongado. La entrada de calcio a la neurona provoca la activación de la enzima CaMK-II (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II : protein quinasa-II dependiente de calcio y calmodulina). Esta enzima es clave en el proceso ya que se ha visto que ratones mutantes para esta enzima no pueden realizar la LTP. Esta quinasa fosforila una serie de proteínas entre las que se encuentran los receptores de membrana de tipo AMPA (alpha-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid receptor) que también unen glutamato. Los receptores AMPA permiten el paso de iones Na^+ produciendo una despolarización parcial que hace a la neurona postsináptica más sensible a nuevos estímulos nerviosos. También existen evidencias de regulación de la actividad transcripcional mediada por CaMK-II, incluyendo un incremento en la transcripción de receptores AMPA y de elementos que hacen aumentar el tamaño de las placas sinápticas.

En la LTP se distinguen dos fases. En una primera fase no se detecta actividad transcripcional mientras que en la fase tardía, con los canales de los receptores NMDA abiertos, sí se detecta actividad transcripcional y traducción de mensajeros. Los cambios inducidos pueden persistir horas e incluso días. No obstante, la formación de receptores AMPA, que son clave para el proceso, requiere una estimulación continuada.

[\(Ver página Web\)](#)

Oncogen

Definición

Los oncogenes son las versiones mutadas de los protooncogenes. Los protooncogenes son genes involucrados directa o indirectamente en la proliferación celular que al alterarse, convirtiéndose en oncogenes, pueden provocar la transformación de una célula normal en célula cancerosa. Las alteraciones genéticas que se producen en las células cancerosas dotan a estas células de una capacidad de división incontrolada e ilimitada y de la capacidad de vivir y colonizar tejidos diferentes del original. Para que una célula se convierta en cancerosa se necesita la acumulación de varias mutaciones y su transmisión a las células hijas. No basta con la activación de un solo oncogén.

Los oncogenes estimulan la proliferación celular evitando los mecanismos de control de la división celular. Otro grupo de genes que se alteran en el desarrollo del cáncer son los genes supresores de tumores que codifican proteínas inhibidoras del ciclo celular. La pérdida de la función supresora de este tipo de genes suele requerir la alteración de los dos alelos que codifican la proteína inhibidora. Distintos factores pueden favorecer la formación de células tumorales actuando bien sobre los oncogenes o sobre los genes supresores de tumores alterando el mecanismo molecular de la célula normal. Factores internos como mutaciones somáticas y predisposición genética y factores externos como virus oncogénicos, radiación ionizante (Luz ultravioleta, rayos X, isótopos radiactivos) y agentes químicos pueden ser la causa desencadenante de un proceso tumoral.

[\(Ver página Web\)](#)



Ligando

Definición



En términos muy generales se puede definir un ligando como una molécula capaz de ser reconocida por otra provocando una respuesta biológica. Por ejemplo, podemos encontrar ligandos como las hormonas implicados en la señalización intercelular, o ligandos que actúan como reguladores de la actividad enzimática uniéndose a las enzimas que modulan. En la transmisión de información biológica mediante el reconocimiento molecular se podría decir que el ligando es el agente pasivo. En el reconocimiento molecular intervienen tanto la topología de las moléculas como sus características físico-químicas que permiten la formación de enlaces no covalentes reversibles. La actividad que desencadena el reconocimiento de un ligando puede variar desde la apertura o cierre de un canal iónico a la regulación de la acción de una enzima o el inicio de una cascada de señalización intracelular.

El reconocimiento de ligandos por receptores de membrana es un evento clave en la señalización celular. La unión del ligando a su receptor generalmente provoca un cambio conformacional del receptor que puede favorecer la apertura de un canal iónico (como ocurre en la sinapsis) o la síntesis de un segundo mensajero al favorecer una reacción enzimática (como ocurre en las cascadas de señalización intracelular). Las hormonas son un ejemplo de ligandos que necesitan de la unión a

un receptor de membrana para completar el proceso de transmisión de información entre células.

El término ligando también se emplea para designar las pequeñas moléculas que se unen a enzimas de forma no covalente regulando su actividad. A diferencia de los sustratos y los cofactores los ligandos no participan en la reacción. Existen casos en que el ligando y el sustrato de una enzima pueden ser la misma molécula. Este es el caso de la enzima fosfofructokinasa (PFK) que usa el ATP como sustrato a bajas concentraciones y, en cambio, a altas concentraciones el ATP actúa como ligando uniéndose a otra región de la enzima provocando la inhibición de su actividad.

[\(Ver página Web\)](#)

Noticias

Nuevas proteínas involucradas en la respuesta al daño en el ADN

Fuente: [ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage.](#)



La respuesta al daño en el ADN es fundamental para la supervivencia de la célula. El reconocimiento del daño y los procesos de señalización que desencadena son los primeros pasos y son llevados a cabo por distintos sensores que detectan

la lesión en el ADN y por quinasas que inician la señalización en la célula. Un reciente estudio publicado en Science identifica 700 nuevas dianas para las quinasas ATM y ATR, muy importantes en este proceso.

Las células se encuentran continuamente en contacto con agentes mutagénicos capaces de causar daños en el ADN. A pesar de esta exposición continuada la información codificada en el ADN presenta una gran integridad, en parte gracias a una compleja red de señalización celular conocida como red de respuesta al daño en el ADN. Con el fin de mantener la integridad del ADN se deben integrar procesos como la detección del daño en el ADN, la regulación del ciclo celular y la reparación del ADN. El primer paso en la localización del daño es el reclutamiento de quinasas específicas por los distintos sensores del daño en el ADN. Las principales quinasas implicadas en la transducción de la señal en la respuesta al daño en el ADN son la quinasa ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) y la ATR (ATM and Rad3-related).

El estudio llevado a cabo para determinar los sustratos de ambas quinasas se basó en la determinación de péptidos fosforilados en respuesta a una radiación ionizante, un potente agente mutagénico. Para ello se tomaron placas con 68 sueros específicos para sustratos conocidos de estas enzimas y posteriormente se analizaron los péptidos unidos por los sueros encontrándose unas 700 dianas nuevas. Dominios como el BRCT y el FHA capaces de unir péptidos fosforilados, se encuentran en un gran número de proteínas implicadas en la respuesta al daño en el ADN.

Muchas de las proteínas identificadas se agrupaban en conjuntos ya conocidos de proteínas que interaccionan entre sí. Se encontraron proteínas pertenecientes a módulos implicados en la replicación del ADN como la subunidad catalítica de la ADN polimerasa épsilon y las polimerasas PolI y PolQ que pertenecen al grupo de polimerasas llamadas “translesion” o “bypass” porque son capaces de copiar un ADN molde dañado. Otras proteínas diana de las quinasas ATM y ATR pertenecían a módulos implicados en la reparación del ADN y en el control del ciclo celular.

Una vez identificadas las nuevas dianas para las quinasas el siguiente paso en el estudio fue comprobar si este grupo de moléculas representaba un conjunto característico de los sustratos de ambas enzimas y si se trataba de miembros importantes del proceso de respuesta al daño en el ADN. Para ello se llevó a cabo una estrategia de silenciamiento génico empleando la tecnología de interferencia de ARN (ARNi). Se tomaron 37 dianas de las 700 descubiertas y se eliminó su actividad empleando moléculas de siRNA (Small Interfering RNA) en células de osteosarcoma humano y se analizaron seis tests diferentes de funciones implicadas en la respuesta al daño en el ADN. Se comprobó que más del 90% de las dianas tenían que ver con la respuesta al daño en el ADN ya que al menos mostraban funcionalidades alteradas en alguno de los tests.

Este estudio de proteómica a gran escala ha permitido identificar nuevas proteínas que se fosforilan en respuesta al daño en el ADN. El conjunto detectado de unas 700 proteínas ha permitido descubrir nuevos módulos de la altamente interconectada red de proteínas que dirige la respuesta al daño en el ADN y que es esencial para la supervivencia de la célula.

[\(Ver página Web\)](#)

Eventos

Tercer congreso GTCBio sobre proteínas kinasas en descubrimiento de fármacos

(Más Información)

Durante el 5 y el 6 de Mayo se celebrará en San Diego (California, Estados Unidos) el tercer congreso organizado por GTCBio sobre proteínas kinasas en el descubrimiento de fármacos. Se tratarán temas como las nuevas tecnologías en el cribado e identificación de nuevas dianas e inhibidores de proteínas kinasas y las dianas e inhibidores de las kinasas en oncología o enfermedades inflamatorias entre otros

(Ver página Web)



Del 22 al 25 de Septiembre se celebra en Filadelfia (Estados Unidos) el tercer congreso internacional sobre diagnóstico molecular en el desarrollo de terapia contra el cáncer

(Más Información)

El congreso contará con sesiones educativas en las que se tratarán temas como proteómica e investigación en ácidos nucleicos. También se celebrarán sesiones más especializadas donde se expondrán temas como alteraciones en las rutas de señalización y respuestas a tratamiento o clasificación molecular de tumores entre otros.

(Ver página Web)



Del 28 al 31 de Mayo se celebra en Boston (Estados Unidos) un congreso sobre la epigenética en el cáncer

(Más Información)

Durante el congreso se tratarán temas como las rutas en la epigenómica del cáncer, mecanismos epigenéticos presentes en el cáncer y métodos de análisis epigenéticos entre otros

(Ver página Web)



Del 10 al 11 de Julio se celebra en Boston (EEUU) el segundo congreso anual sobre detección, desarrollo y validación de biomarcadores



(Más Información)

El evento, organizado por GTCBio, tratará temas como el descubrimiento y desarrollo de nuevos biomarcadores, los biomarcadores en los ensayos clínicos y tendencias y tecnologías en auge en biomarcadores entre otros.

[\(Ver página Web\)](#)

Del 17 al 19 de Septiembre se celebra en Granada BioSpain 2008, cuarto congreso internacional sobre biotecnología.



(Más Información)

BioSpain 2008 se celebrará en Granada del 17 al 19 de Septiembre. Se trata de un congreso donde se analiza el estado actual del sector biotecnológico. El establecimiento de relaciones comerciales y el desarrollo del sector biotecnológico español son objetivos clave en este congreso.

[\(Ver página Web\)](#)