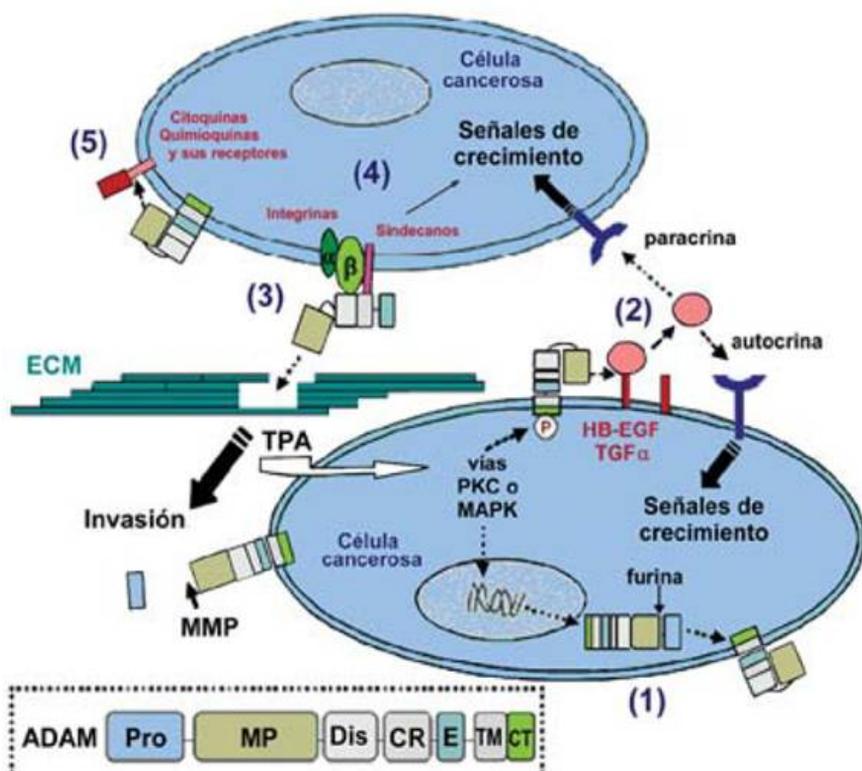




# RANF

An. R. Acad. Nac. Farm.  
Vol. 76. n. 1 2010  
ISSN 1697-4271  
Publicación electrónica  
trimestral





## **Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer**

**María Cascales Angosto<sup>\*</sup>, Juan Ángel Álvarez-Gómez**

Recibido el 28 de septiembre de 2009.

### **RESUMEN**

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) están implicadas en procesos fisiológicos y patológicos e intervienen en la rotura de la matriz extracelular (ECM). Las MMP constituyen una familia de endopeptidasas neutras dependientes de zinc, capaces de degradar los componentes esenciales de la matriz. Los inhibidores tisulares endógenos de las MMP (TIMP), una clase de inhibidores de las MMP, reducen la degradación proteolítica excesiva de la ECM. La degradación de la ECM es crucial para el crecimiento tumoral maligno, invasión, metástasis y angiogénesis. Se han descrito cambios en las MMP y sus inhibidores durante la carcinogénesis y también que unas y otros regulan las vías señalizadoras mediante la rotura de otros sustratos que los de la matriz, tales como citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Como ciertas MMP limitan el crecimiento tumoral, su identificación e intervención terapéutica en combinación con la quimioterapia convencional ha de proporcionar un medio para la terapia del cáncer.

**Palabras clave:** Metaloproteinasas; Matriz Extracelular; Cáncer; Metástasis; Terapia anti-cáncer.

## ABSTRACT

### **Metalloproteinases, extracellular matrix and cancer**

The extracellular matrix metalloproteinases (MMP) are involved in physiological and pathological processes, through the cleavage of extracellular matrix (ECM) and non-matrix substrates. MMP are a family of zinc-dependent neutral endopeptidases capable of degrading essentially all matrix components. Endogenous tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP), one kind of MMP inhibitors, reduce the excessive proteolytic ECM degradation. Degradation of ECM is crucial for malignant tumor growth, invasion, metastasis and angiogenesis. A variety of reports describe the correlated changes in MMP and TIMP during the formation of cancer, and also that MMP and TIMP may act as regulators of signaling pathways through the cleavage of non-matrix substrates, including cytokines, chemokines, and growth factors. As certain MMP limit tumor growth, identification of proper MMP in combination with conventional chemotherapy is expected to provide a feasible approach for cancer therapy.

**Keywords:** Metalloproteinases; Extracellular matrix; Cancer; Metastasis; Anti-cancer therapy.

## 1. INTRODUCCIÓN

La matriz extracelular (ECM) está formada por gran cantidad de componentes que se clasifican en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina). Tal variedad de componentes se encuentran interconectados y requiere una familia de proteasas denominadas metaloproteinasas de la ECM (MMP), cuya misión es degradar las proteínas integrantes de dicha ECM en su medioambiente inmediato y activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión. La interacción de la célula con la ECM desencadena cascadas de señalización que promueven la diferenciación, migración y movilización celular, esenciales para el mantenimiento de la homeostasis (1-5).

Gross y Lapiere (6) demostraron en 1962 la existencia de enzimas difusibles que degradaban geles de colágeno fibrilar nativo. Desde

entonces se han ido identificando las MMP, que se caracterizan por depender del  $Zn^{+2}$  para su actividad catalítica, por su potente capacidad para degradar proteínas estructurales de la ECM y por su secuencia evolutiva específica (7). Las MMP son proteasas extracelulares requeridas en numerosos procesos relacionados con el desarrollo, la regeneración y la enfermedad (8). La degradación de proteínas extracelulares es esencial para que cualquier célula individual pueda interactuar con su ambiente circundante y para que los organismos multicelulares funcionen y se desarrollen. Las MMP también degradan moléculas de la superficie celular y otras proteínas pericelulares, reguladoras del comportamiento celular en diversas vías.

Al poseer capacidad de alterar el destino celular e intervenir en el desarrollo, las MMP están sometidas a un estricto control. Fue en 1971 (9) cuando se demostró que las MMP se sintetizaban como zimógenos inactivos que requerían ser activados por proteólisis y también la existencia de inhibidores titulares (TIMP) de su actividad (10). Desde entonces se han descubierto muchas características de estas proteasas, desde la transcripción de activadores e inhibidores endógenos de su actividad catalítica, a factores que influyen en su secreción, localización en la superficie celular y su propia degradación y eliminación.

## **2. FAMILIA DE LAS METALOPROTEINASAS. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN**

Se han descrito 25 miembros de la familia MMP, que se clasifican en cinco subfamilias: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, metaloproteasas de membrana (MT-MMP) y otras MMP (11, 12). Todas ellas difieren en su estructura y especificidad de sustrato, pero su acción combinada es capaz de conducir a la degradación de la práctica totalidad de los componentes macromoleculares de la ECM. Este hecho, junto con su capacidad de actuar a pH fisiológico, convierte a estas enzimas en candidatos que participan en la destrucción tisular que acompaña al cáncer. Los primeros estudios fueron los realizados por Liotta *et al.* (13), quienes detectaron la presencia de potentes actividades colagenolíticas en tumores epiteliales y mesenquimales, y observaron que las células metastásicas de un carci-

noma murino tenían mayor capacidad para degradar el colágeno que las células del tumor primario. También describieron la producción de colagenasas por líneas celulares de osteosarcomas y carcinomas mamarios humanos, cuya actividad se inhibía por una proteína de cartílago, tejido raramente invadido por las células neoplásicas. Estos estudios aportaron las primeras pruebas de interés terapéutico para el bloqueo de la diseminación tumoral. Desde ese momento, numerosos estudios abordaron la identificación estructural y funcional de las diferentes MMP responsables de las actividades proteolíticas detectadas durante la progresión tumoral. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el problema era más complejo de lo esperado y que el número de proteasas asociadas al cáncer era mucho mayor que el previsto. Así, la práctica totalidad de las MMP descritas hasta el momento, se han asociado directa o indirectamente a los procesos tumorales, aunque son las gelatinasas A y B, las estromelisin-1 y -3, las colagenasas-1 y -3 y la MT1-MMP, las que parecen estar más involucradas en la progresión tumoral. No hay que olvidar que proteasas pertenecientes a otros tipos catalíticos, como las activadoras del plasminógeno o las catepsinas, y las heparanasas, cooperan con las MMP en el proceso de invasión y metástasis (14). En cualquier caso, y a la luz de los conocimientos actuales, se puede decir que no hay ninguna proteasa que sea responsable por sí sola de las propiedades invasivas y metastásicas de los distintos tipos de tumores. Los tumores utilizan distintas proteasas o combinaciones de ellas, como instrumentos imprescindibles en su aventura colonizadora de otros territorios corporales (14).

En un primer momento, las 25 diferentes MMP codificadas por sus respectivos genes, se clasificaron en función de la especificidad del sustrato (colagenasas, gelatinasas, estromelisin-1 y -3 y matrilisin-1) (8, 9), pero actualmente la clasificación se hace en función de su estructura. La estructura básica de las MMP presenta una serie de dominios: un péptido señal, un propéptido y un dominio catalítico carboxiterminal que une zinc. Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes: un dominio tipo hemopexina que media la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos, o un dominio transmembrana en el caso de las MMP asociadas a la membrana plasmática (MT-MMP, *membrane type MMP*) (8) (Tabla 1 y Figura 1). Así, en la clasificación se distinguen ocho grupos estruc-

turales: cinco de MMP secretadas y tres MT-MMP. Muchos de los eventos señalizadores extracelulares ocurren en o cerca de la membrana celular y se regulan por hidrólisis pericelular. Las MT-MMP se unen covalentemente a la membrana celular, y las MMP secretadas pueden localizarse en la membrana celular uniéndose a las integrinas, a CD44, o mediante interacciones con proteoglicanos heparán sulfato y colágeno tipo IV, asociados a la superficie celular.

De los 25 homólogos de las MMP identificados en vertebrados, 22 de ellos corresponden a humanos. Cada MMP posee una secuencia señalizadora N-terminal o *predominio*, un propeptido o *prodominio* que mantiene al enzima latente hasta que se elimina por proteólisis, y un *dominio catalítico* que contiene la región conservada de unión al  $Zn^{2+}$ . El dominio catalítico indica la especificidad del sitio de rotura mediante huecos de especificidad que se unen a residuos de aminoácidos adyacentes. Con excepción de la MMP7 (matrilisina), MMP26 (endometasa/matrilisina 2) y MMP23, las restantes MMP poseen un dominio hemopexina conectado con el dominio catalítico por una bisagra o región de unión H. Las MMP7 y MMP26 carecen de estos dominios, mientras que la MMP23 posee, en lugar del dominio hemopexina, un dominio rico en cisteína/prolina y otro dominio del tipo del receptor de la IL-1. El dominio hemopexina, cuando está presente, ejerce influencia sobre la unión al TIMP, a ciertos sustratos y a algunas actividades proteolíticas. La actividad colagenolítica requiere la unión y orientación de la fibrilla de colágeno, el desenrolamiento local de su estructura helicoidal triple y la rotura secuencial de la cadena, porque la hendidura catalítica es demasiado estrecha para acomodarse a la hélice triple completa. La región bisagra es variable en longitud y composición entre las varias MMP y ejerce influencia también en la especificidad del sustrato. Las MMP2 y MMP9 (gelatinasas A y B), se distinguen por la inserción de tres repeticiones ricas en cisteína en el dominio catalítico. Estos insertos se parecen a las repeticiones de unión al colágeno tipo II de la fibronectina y se requieren para unirse y romper colágeno y elastina. Por último, las MMP tipo membrana (MT-MMP), tienen un dominio transmembrana sencillo, un corto dominio C-terminal citoplasmático (MMP 14, 15, 16 y 24) y una región C-terminal hidrofóbica glicosfosfatidilinositol (GPI), que actúa como señal de anclaje a la membrana. Estos dominios juegan un papel esencial en la localización de

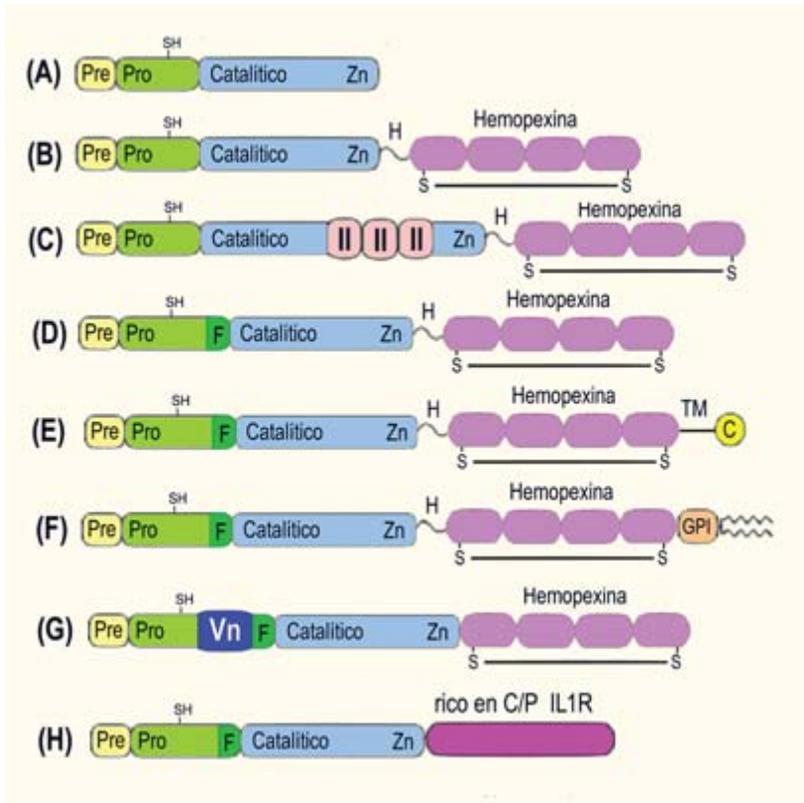
diversos eventos proteolíticos en regiones específicas de la superficie celular (Figura 1).

Tabla 1. **Metaloproteinasas de vertebrados** (8).

<b>MMP</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Organización de dominios*</b>
MMP1	Colagenasa-1	B
MMP2	Gelatinasa A	C
MMP3	Estromelisina-1	B
MMP7	Matrilisin	A
MMP8	Colagenasa-2	B
MMP9	Gelatinasa B	C
MMP10	Estromelisina-2	B
MMP11	Estromelisina-3	D
MMP12	Macrófago metaloelastasa	B
MMP13	Colagenasa-3	B
MMP14	MT1-MMP	E
MMP15	MT2-MMP	E
MMP16	MT3-MMP	E
MMP17	MT4-MMP	F
MMP18	Colagensa-4 ( <i>Xenopus</i> )	B
MMP19	RASI-1	B
MMP20	Enamelisin	B
MMP21	SMMP ( <i>Xenopus</i> )	G
MMP22	CMMP (pollo)	B
MMP23	—	H
MMP24	MT5-MMP	E
MMP25	MT6-MMP	F
MMP26	Endometasa Matrilisin-2	A
MMP27	—	B
MMP28	Epilisin	D

\* Ver Figura 1 para la disposición de los dominios.

La familia *ADAM* (*desintegrina* y *metaloproteinasa*) comprende proteínas multifuncionales de membrana, similares a las metaloproteinasas del veneno de serpientes. En su estructura muestran una organización de dominios compleja que consiste en una secuencia señalizadora, dominio metaloproteinasa, dominio tipo desintegrina,



**Figura 1. Estructura de las MMP.** (A) Dominios mínimos de las MMP (MMP7/ matrilisina, MMP26/endometasa). (B) MMP que contienen sólo un dominio hemopexina (MMP1/colagenasa1, MMP8/colagenasa 2, MMP13/colagenasa 3, MMP18/colagenasa 4, MMP3/estromelisina 1, MMP10/ estromelisina 2, MMP12/metaloelastasa, MMP19/RASI 1, MMP20/enamelisina, MMP22/CMMP, MMP27). (C) MMP que se unen a gelatina (MMP2/gelatinasa A, MMP9/gelatinasa B). (D) MMP secretadas activadas por furina (MMP11/estromelisina 3, MMP28/epilisina). (E) MMP transmembrana (MMP14/MT1-MMP, MMP15/MT2-MMP, MMP16/MT3-MMP, MMP24/MT5-MMP). (F) MMP ligadas a GPI (MMP17/MT4-MMP, MMP25/MT6-MMP). (G) MMP con un dominio inserto similar a la vitronectina (MMP21/XMMP). (H) MMP con un dominio rico en cisteína/prolina receptor IL-1 (MPP23). Pre, secuencia señalizadora; Pro, propéptido con un zinc libre que se une al tiol (SH); F, sitio susceptible a la furina; Zn, sitio catalítico de unión al Zn; II, insertos de fibronectina que se unen al colágeno, H, región bisagra; TM, dominio transmembrana; C, cola citoplasmática; GPI dominio de anclaje del glicosfosfatidil inositol; C/P, cisteína/prolina; IL-1R, receptor de la IL-1; Vn, dominio similar a la vitronectina. El dominio hemopexina contiene cuatro repeticiones con un enlace disulfuro entre la primera y la última (8).

región rica en cisteína, dominio tipo receptor del factor de crecimiento epidérmico, región transmembrana y dominio citoplasmático (15, 16). Se han descrito ya 25 ADAM en tejidos humanos y en un principio se asociaron a la espermatogénesis, unión y fusión del espermatozoide al huevo. Más tarde se implicaron en la neurogénesis, modulación de la migración y adhesión de las células tumorales, activación de vías señalizadoras y liberación de las citoquinas y factores de crecimiento unidos a membrana. Algunas ADAM se sobreexpresan en tumores malignos de origen diverso y su actividad se puede bloquear por inhibidores endógenos y sintéticos de las proteasas (MMPI). Las ADAMTS son proteasas relacionadas con ADAM que contienen varias repeticiones de trombospondina tipo I (TS) en su región C-terminal, pero carecen del dominio transmembrana presente en ADAM. Se han identificado 18 ADAMTS en tejidos humanos y se ha detectado que ejercen funciones específicas en procesos normales y patológicos (Figura 2).



**Figura 2. Estructuras de una desintegrina y metaloproteínasa (ADAM) y de ADAM con motivos trombospondina (ADAMTS).** Los miembros de la familia de genes ADAM se clasifican como subgrupos de miembros anclados (ADAM) y de tipo secretado (ADAMTS). CR, dominio rico en cisteína; CT, dominio citosólico; Dis, dominio desintegrina; E, dominio tipo factor de crecimiento epidérmico; MP, dominio metaloproteínasa; Pro, dominio propéptido; SP, dominio espaciador; TM, dominio transmembrana; TS, dominio trombospondina (15).

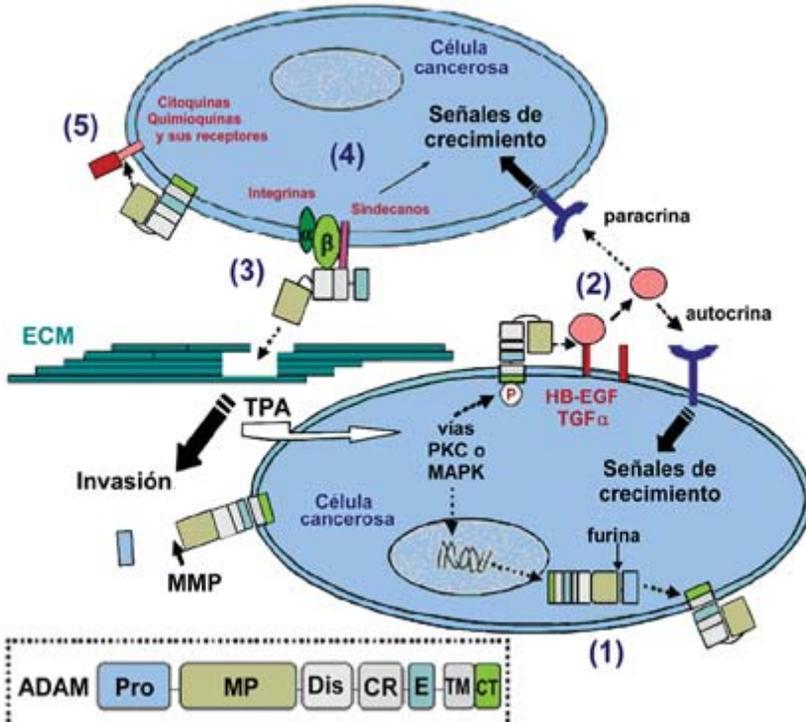
Las *proproteína convertasas* son una familia de serina proteasas implicadas en el procesamiento endoproteolítico de la vía secretora. Entre sus sustratos están precursores de factores de crecimiento, neuropéptidos, hormonas peptídicas y otras proteasas. Las convertasas son también importantes en el procesamiento de las glucoproteínas de la envuelta de muchos retrovirus, entre ellas la del HIV. Las *proproteínas convertasas* muestran una similitud en su secuencia

con la proteasa kex2 (quexina) de levadura, y con la serina proteasa subtilina de bacterias. Es por eso que estos enzimas se han denominado proproteína convertasas tipo subtilina (SPC), habiéndose identificado siete en tejidos humanos (SPC 1-7). Contienen una secuencia señalizadora, un propéptido aminoterminal, un dominio catalítico tipo subtilina y una región conservada de 150 aminoácidos denominada dominio «P» o dominio «homo B» que parece estabilizar el dominio catalítico. En el terminal carboxílico algunos miembros contienen una región rica en cisteína, un dominio transmembrana tipo I implicado en el anclaje a la superficie celular, y un dominio citoplasmático de longitud variable. Todas las SPC reconocen motivos dibásicos RXK/RR e hidrolizan el enlace peptídico al final de estos motivos. Entre las diversas SPC humanas, la furina (SPC1) es un enzima importante en oncología debido a su capacidad para participar en la activación de diferentes proteasas asociadas con tumores, MMP, ADAM y ADAMTS. La furina y los enzimas tipo furina se han encontrado sobreexpresados en tejidos malignos (17).

La Figura 3 resume la información obtenida sobre la implicación de las ADAM en el cáncer: 1. ADAM se sintetiza como proADAM inactivo y se activa por acción de la furina o de las MMP. 2. ADAM participa en la liberación de los factores de crecimiento TGF $\alpha$  y HB-EGF, y este proceso puede alterar la señalización en la superficie de las células cancerosas, lo que da lugar a una proliferación celular intensificada por mecanismos autocrinos y paracrinos. Además, la actividad proteolítica de ADAM puede ser regulada por señalización celular mediante las vías PKC y MAPK. 3. ADAM funciona como molécula de adhesión que se une a integrinas o sindecanos por su dominio desintegrina y su dominio rico en cisteína, que ayuda a la célula a digerir los sustratos. 4. ADAM regula indirectamente las señales de proliferación celular a través de las integrinas. 5. El papel de ADAM en el cáncer y en la metástasis se relaciona con su actividad proteínasa y con otras moléculas ancladas en la membrana, que pueden ser citoquinas, quimioquinas y sus receptores (15).

Al igual que las MMP, las ADAM pueden romper moléculas de la MEC y eso facilita que las células tumorales puedan invadir y adherirse a nuevos tejidos para establecer sitios secundarios de crecimiento. No obstante, existen aún muchas preguntas sin resolver respecto a la regulación y función de las ADAM. Experimentos con

ratones transgénicos que sobreexpresan ADAM, han de ayudar a determinar el papel de ADAM en la carcinogénesis y en la progresión del cáncer *in vivo*.



**Figura 3. Vías mediadas por ADAM implicadas en la progresión del cáncer.**

1. ProADAM se activa por la furina o las MMP. 2. La actividad de ADAM se estimula por factores externos, como el 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA), y libera ligandos de la superficie celular como el HP-EGF y el TGF $\alpha$ . En este proceso pueden intervenir la PKC y la MAPK. Los factores de crecimiento solubles, HP-EGF, activan al receptor del factor de crecimiento epidérmico de manera autocrina y paracrina. 3. La interacción del dominio desintegrina y el dominio rico en cisteína de ADAM con integrinas o síndecanos ayuda a romper sustratos de la ECM. 4. ADAM modula las interacciones ECM-integrina, que pueden indirectamente promover señales de proliferación mediante las integrinas. 5. ADAM procesa otras moléculas ancladas en la membrana, quimioquinas, citoquinas y sus receptores, que se relacionan con la proliferación y progresión del cáncer. CR, dominio rico en cisteína; CT, dominio citosólico; Dis, dominio desintegrina; E, dominio factor de crecimiento epidérmico; MP, dominio metaloproteinasas; Pro, dominio propéptido; TM, dominio transmembrana (15).

### **3. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS METALOPROTEINASAS**

La actividad proteolítica de las MMP se regula a tres niveles: transcripción, activación del proenzima e inactivación (Figura 4) (11, 12, 18). Otros mecanismos se encuentran también implicados: estabilidad del mRNA, eficiencia traduccional, compartimentación y secreción enzimática, reclutamiento en la membrana celular, selección de sustrato, su liberación, oligomerización, incorporación, internalización celular y finalmente autólisis. Estos mecanismos operan coordinadamente para asegurar que la expresión y actividad de las MMP se circunscriban a aquellos sitios y condiciones en los que es necesaria su actividad. Sin embargo, los tumores malignos han generado estrategias para evadir estos mecanismos reguladores lo cual conduce a la actividad proteolítica incontrolada que acompaña al cáncer, la invasión y la metástasis (16, 19).

#### **3.1. Transcripción**

La transcripción se regula de manera independiente y cada célula muestra un fenotipo proteolítico en respuesta a los estímulos. Existen varios mecanismos mediante los que las células regulan la transcripción de las MMP: regulación por citoquinas, señalización y factores nucleares y polimorfismos de un solo nucleótido (20).

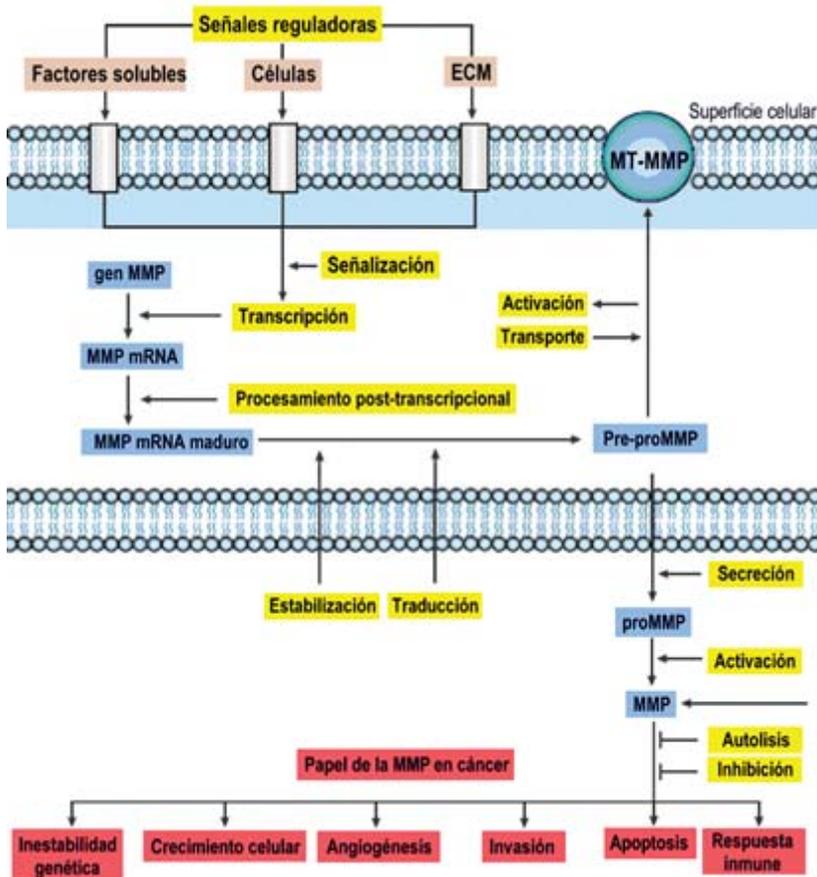
##### *3.1.1. Regulación por citoquinas*

Muchas MMP no se expresan en condiciones normales, pero su transcripción puede ser inducida por citoquinas, factores de crecimiento y productos de oncogenes, que son liberados por el estroma, por las células infiltradas del sistema inmune o por las mismas células tumorales. Otras condiciones, tales como alteraciones en la forma celular o estrés mecánico, pueden también inducir la transcripción. Sin embargo, no se ha identificado ningún factor que sea responsable exclusivo de la sobreexpresión de las MMP en tumores, aunque se sabe que se encuentran implicados el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la interleuquina 1 (IL-1). La transcripción de

las MMP puede ser activada o reprimida por diferentes agentes, dependiendo del tipo de célula tumoral. Algunos factores como el factor transformante de crecimiento beta (TGF $\beta$ ) o los retinoides, funcionan como reguladores de la transcripción de las MMP en células normales y tumorales. Cuando se trata de dirigir la terapia cancerosa a las MMP, es importante reconocer que estas proteasas se expresan principalmente en fibroblastos del estroma, en células vasculares o en células inflamatorias que infiltran los tumores (21).

### 3.1.2. *Regulación por transducción de señales y factores nucleares*

Las vías de transducción de señales que median la activación transcripcional de las MMP son también diversas. Hay que citar las vías de la p38 quinasa activada por mitógenos (MAPK, ERK1 y ERK2), que estimulan o inhiben la expresión de las MMP dependiendo del tipo celular. Sin embargo, muchas señales extracelulares y vías de transducción de señales convergen en el factor de transcripción AP-1 y su sitio de unión se encuentra en la región promotora de la mayor parte de los genes *MMP*. AP1 consiste en miembros de la familia de oncoproteínas FOS y JUN, que proporcionan un mecanismo general para la *trans*-activación de la expresión de las MMP en tumores malignos. Otros factores nucleares controlan la expresión de las MMP. Estos son, la familia de oncoproteínas ETS, que se unen a sitios PEA3 presentes en los promotores de los genes *MMP*; el factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), que induce la expresión de las MMP-1, 3, 9, 13 y 14; los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT), que median los efectos de los interferones (IFN) sobre la expresión de los genes *MMP*; el factor 4 de las células T (TCF4) y la proteína dedo de zinc asociada a CAS (CIZ), que activa la expresión de las MMP-1, 3 y 7; la proteína p53, que modula la transcripción de MMP-1, 2 y 13; y el factor A1 de unión al núcleo (CBFA1), que forma parte de la cascada reguladora que controla la expresión de las MMP en células normales y tumorales. Se han identificado también, en los promotores de varios genes *MMP*, elementos reguladores negativos, tales como el elemento inhibidor del TGF $\beta$  (TIE) o el elemento rico en AG (AGRE) (21, 22).



**Figura 4. Regulación de la expresión y actividad de las MMP.** Señales reguladoras, tales como factores solubles, contactos célula-matriz o célula-célula, interactúan con receptores específicos en la superficie celular, e inician una cascada de eventos que conduce a la generación de MMP funcionales localizadas en la superficie celular (MT-MMP) o secretadas al medio extracelular como proMMP. Las proMMP se activan de manera diferente. Las MMP activas están implicadas en procesos que promueven el desarrollo del cáncer (en rojo), como inestabilidad genética, crecimiento celular, angiogénesis e invasión. También intervienen en la inducción de la apoptosis y la respuesta inmune antitumoral del hospedador. La autólisis o los inhibidores de las MMP interfieren con la inducción de estos efectos celulares. Las etapas de la regulación de MMP en las que puede actuar la terapia se muestran en amarillo e incluyen respuestas celulares a señales reguladoras, señalización, inducción de la transcripción procesamientos post transcripcionales, transporte, activación y secreción de las MMP (18).

### 3.1.3. Regulación por polimorfismos de un solo nucleótido

Otro mecanismo implicado en la variabilidad de la expresión de los genes *MMP* deriva de la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido en el promotor de los genes *MMP*, que altera la interacción de los factores *trans*-activadores de la transcripción y los elementos *cis* en el promotor, lo que incrementa la susceptibilidad a varios tipos de cáncer, como los carcinomas de ovario y mama (23).

## 3.2. Activación de las pro-MMP

### 3.2.1. Bases estructurales de la activación

Las MMP, al igual que otras proteasas, se sintetizan como zimógenos inactivos en estado latente, debido a que el prodominio enmascara el sitio activo al prevenir la hidratación del ión  $Zn^{2+}$  en dicho sitio, y está mantenido por el SH de una cisteína desapareada cercana al extremo C-terminal del dominio propéptido. Este grupo SH actúa como cuarto ligando para el ión  $Zn^{2+}$  del sitio activo y la activación que este «interruptor» cisteína  $Zn^{2+}$  se abre por eliminación proteolítica del dominio propéptido o por perturbación ectópica de la interacción cisteína  $Zn^{2+}$ . Una vez desplazado, el grupo SH se reemplaza por una molécula de agua y el enlace peptídico puede entonces romperse. El sitio para la rotura del proMMP-2 por la MT1-MMP que inicia la activación, se encuentra en un bucle expuesto en la superficie, dentro del prodominio, que es probable que esté también presente en otras MMP y que funcione como «cebo» para activar proteasas como las plasmina, chimasa y triptasa. Después de la rotura inicial, la estructura del prodominio se despliega parcialmente y expone sitios adicionales para posteriores roturas por enzimas activos como la MMP-3, o por rotura autolítica en *trans*. La unión a un ligando o a un sustrato puede también conducir a la separación del propéptido y a la activación de la proteasa. El requerimiento de una segunda MMP para llevar a cabo la rotura final de activación en la fenilalanina o tirosina en posición 80 u 81, respectivamente, ha sido un avance conceptual en la investigación de las MPP. Diferencias en el sitio activo, subsitio S12 y secuencias del propéptido de la MMP generan especificidad para activar las proteasas. Las MMP-1, son el mejor ejemplo de MMP que re-

quiere la rotura por MMP-3 para su activación. Esto no puede ser debido a una reacción autocatalítica, ya que el hueco poco profundo del subsitio S12 de MMP-1, no puede acomodar el grueso de las cadenas laterales tales como la fenilalanina aminoterminal del enzima activo procesado correctamente. Otras MMP, como las MMP-2, poseen un hueco profundo que puede acomodar a la Tir 81, de manera que la activación pueda completarse de forma autocatalítica en *trans* por otra MMP-2 activa, que ha de estar anclada en la superficie celular (24).

### 3.2.2. *Compartimentos activadores*

Varias MMP, las MT-MMP y las MMP-3, ejercen un importante papel activador sobre otras proMMP, que lo ejercen ellas mismas una vez que han sido activadas por otras proteasas, como las serina proteasas furina y plasmima. Así que, en casi todos los casos el proceso de activación de las MMP requiere la presencia de otras proteasas, que actúen directa o indirectamente en los circuitos proteolíticos. La activación de las MMP tiene lugar a veces en el espacio inmediato pericelular, en sitios con elevada afinidad para los respectivos precursores enzimáticos, como ocurre en la activación de proMMP-2 por las MT1-MMP y MT2-MMP. Sin embargo, la unión de MMP a las moléculas de la matriz unidas a la superficie celular puede proteger de la activación proteolítica, como ocurre cuando se une el proMMP-2 al colágeno unido a la integrina. El mecanismo de activación del proMMP-2, mediado por las MT-MMP es muy complejo e implica la formación de un agrupamiento multiproteico en la superficie celular que incluye la presencia de TIMP-2, que une el dominio C-terminal de la hemopexina del proMMP-2 a la molécula de MT1-MMP. Las integrinas pueden también formar parte de este complejo y estar implicadas en la activación pericelular de las MMP específicas. Al contrario que estos mecanismos extracelulares o pericelulares de activación de los proMMP, un subgrupo de estas proteasas, entre las que se incluyen las MT-MMP, MMP-11, MMP-23 y MMP-28, se activan dentro de la célula por proproteína convertasas del tipo furina, aunque la furina puede ser también efectiva en la activación de la MT-MMP en la superficie celular. No sorprende que diferentes enzimas activadores de las proMMP puedan alterarse durante la progresión tumoral y que

diferentes tumores sobreexpresen enzimas activadores, en especial las MT-MMP, como parte de una estrategia para localizar en la superficie celular alguna actividad degradativa requerida para el desarrollo del cáncer (24).

### 3.3. Inhibición de las metaloproteinasas

#### 3.3.1. *Inhibidores tisulares de las MMP (TIMP)*

La actividad de las MMP se bloquea por inhibidores generales, como la macroglobulina  $\alpha_2$ , presentes en plasma y fluidos tisulares, y por inhibidores más específicos, los TIMP. Se han identificado cuatro TIMP humanos, los cuales están anclados en la ECM o secretados en el espacio extracelular. Los TIMP se unen a las MMP de manera no covalente en complejos estequiométricos 1:1. El equilibrio neto entre las actividades inhibidor y proteasa determina el potencial proteolítico de los tumores y la disminución de los niveles de TIMP se relaciona con la tumorigenesis. No obstante, existen muchos ejemplos en los cuales la expresión de TIMP se eleva durante la progresión tumoral, lo cual sería de esperar que redujera el potencial tumorigénico. Esto puede ser una respuesta protectora del estroma del hospedador (25, 26).

#### 3.3.2. *Otros inhibidores endógenos de las MMP*

Existen varias proteínas endógenas también inhibidoras de las MMP, y algunas contienen dominios que son homólogos a los dominios inhibidores de TIMP. RECK (proteína rica en cisteína, que induce la reversión con motivos Kazal), es un inhibidor de las MMP de la superficie celular y un regulador clave de la integridad de la ECM y de la angiogénesis. Este es también el caso del TFPI2 (*tissue-factor pathway-inhibitor-2*), una serina proteasa que puede funcionar como inhibidora de las MMP. El C-terminal del procolágeno intensificador de la proteasa (PCPE), libera un fragmento C-terminal similar al dominio inhibidor de los TIMP, que posee actividad inhibidora de las MMP. De igual manera los inhibidores crípticos de las MMP pueden estar escondidos en los dominios NC1 (canstatina) del

colágeno tipo IV o en el dominio de unión a la laminina de la agrina, los cuales son similares en su estructura a los TIMP. Los objetivos fisiológicos de estos inhibidores putativos no están claros como tampoco su relevancia en cáncer (27).

Las MMP se encuentran reguladas, a nivel transcripcional y post-transcripcional (estabilización del mRNA, glicosilaciones), y su transcripción se induce en respuesta a las citoquinas, factores de crecimiento, agentes químicos, estrés oxidativo y estrés físico, oncogenes e interacciones con la ECM. Con estas herramientas se ejerce una estricta regulación de las MMP restringiéndose su acción a determinados procesos fisiológicos, como el desarrollo embrionario, reproducción y remodelación tisular. Por el contrario, muchos estados patológicos, entre ellos el cáncer, se asocian a una desregulación de las MMP (18).

#### **4. METALOPROTEINASAS Y METÁSTASIS**

La ECM juega un papel en el soporte estructural, señalización celular y respuesta a factores de crecimiento, que puede ser fisiológico y patológico. La manipulación de la ECM en los tejidos vascular y cardíaco es relevante respecto al envejecimiento vascular, ectasia y/o formación de aneurismas, aterosclerosis y enfermedades específicas de la matriz vascular o cardíaca (27). La composición de la matriz vascular depende del equilibrio entre actividad e inhibición de las MMP y existe potencial terapéutico para manipular sus actividades con inhibidores exógenos. El cambio del microambiente tisular mediante la degradación de la ECM, el procesamiento de los factores de crecimiento y la activación de las moléculas de adhesión, son esenciales para la proliferación y progresión de las células cancerosas. Las MMP juegan un papel central en estos procesos y en muchos tejidos cancerosos se detecta elevada expresión y activación de las MMP (14).

Una característica de los tumores malignos es su capacidad de invadir tejidos y generar metástasis. Los enzimas proteolíticos por su capacidad de degradar las proteínas de la ECM son importantes componentes de este proceso. Así que una guía paradigmática de los últimos años ha sido que la degradación de las estructuras titulares por las proteasas de las células tumorales, proporciona acceso a los

sistemas vascular y linfático y facilita la diseminación del cáncer. La secuencia del genoma humano ha revelado la existencia de más de 500 genes que codifican proteasas, estando gran número de ellas asociadas a tumores. Entre éstas, las MMP que procesan, a su vez, mediadores bioactivos, han sido el tema de muchos estudios comprometidos con pruebas clínicas para combatir el cáncer. Aunque se ha demostrado que los inhibidores de las MMP son agentes prometedores anti cáncer, los resultados hasta ahora conseguidos no han proporcionado los resultados esperados, lo cual ha hecho que se replanteen nuevas evaluaciones de las estrategias inhibitoras de las MMP (28).

Un tumor se inicia con eventos puntuales en una célula sana que forma parte de un tejido, la cual va a ir desarrollando una serie de características típicas del fenotipo tumoral: proliferación en ausencia de señales de crecimiento; insensibilidad a las señales de parada de la proliferación; escape de la apoptosis; capacidad de replicación ilimitada; activación de la angiogénesis, invasión de los tejidos y metástasis (29). Uno de los acontecimientos clave en la «malignización» del tumor es la degradación de la ECM. Tanto para el crecimiento del tumor como para la invasión del tejido, las células neoplásicas deben degradar los distintos componentes de la matriz en la que están embebidas. Igualmente, la degradación de la ECM es fundamental para la angiogenesis, o formación de vasos sanguíneos a partir de la red sanguínea preexistente (30). En el cáncer, además de las razones estructurales relacionadas con el crecimiento de la masa tumoral y la invasión de los tejidos, la acción degradativa de las MMP sobre la ECM juega un papel muy importante porque es capaz de alterar las uniones célula-ECM y célula-célula, liberar, activar o desactivar moléculas señalizadoras autocrinas o paracrinas y activar o inactivar los receptores de la superficie celular. En general, el papel de las MMP es crear un ambiente favorable para el desarrollo del tumor, microambiente que promueve la «malignización». Por este motivo, se estudian terapias antineoplásicas sobre la base de modificar la acción de las MMP. Existen muchas referencias en este sentido que generan ratones transgénicos y suprimidos (*knock-out*) en los genes que codifican las MMP, los cuales se usan como modelo en los estudios de desarrollo neoplásico, para identificar las mejores dianas de uso terapéutico. Por poner algún ejemplo, se ha visto que

el ratón suprimido en el gen *Mmp2* (*Mmp2*<sup>-/-</sup>), presenta menor crecimiento tumoral y una disminución de la carcinogénesis pancreática; el ratón *Mmp9*<sup>-/-</sup> presenta una disminución de la carcinogénesis de piel y páncreas, y menor desarrollo de invasividad y metástasis. El problema con este tipo de metodología es que existe una gran variedad de MMP, con lo que el bloqueo de una de ellas no suele ser suficiente para frenar su acción. Aún así, se obtienen resultados muy interesantes para su aplicación terapéutica. Las estrategias que se están usando para la inhibición de las MMP en terapia antineoplásica se describen a continuación.

#### **4.1. Interceptar la transcripción de las MMP para impedir su síntesis**

Esto puede conseguirse de tres maneras: bloqueando la acción de factores extracelulares (la propia molécula o su receptor); bloqueando las rutas de transmisión de señales (MAPK, p38 quinasa, Ras o TGF- $\beta$ ), y bloqueando los factores de transcripción que controlan los promotores de las MMP (AP-1, NF $\kappa$ B) (31).

#### **4.2. Impedir la activación de las proMMP**

Existen algunas MMP que juegan un papel muy importante en la activación de otras MMP, como es el caso de MT1-MMP: al bloquear la MT1-MMP se evita la activación de la cascada proteolítica. Existen, además, inhibidores directos de las MMP, como la trombospondina-1, que se une a la proMMP2 y la pro-MMP9 impidiendo su activación. En este apartado se incluyen también las endostatinas y angiostatinas.

#### **4.3. Inhibir la acción de las MMP activas**

Pueden emplearse varios métodos como el uso de los TIMP, aunque con este método aparecen problemas debido a que estas moléculas presentan otras funciones aparte de la inhibición de las MMP y, además, suelen tener un amplio espectro de acción. También pueden utilizarse los inhibidores sintéticos de las MMP (MMPI) (25).

Aunque parece que se han llegado a conseguir métodos bastante eficientes para atajar el crecimiento tumoral, las pruebas clínicas no siempre han tenido éxito que cabía esperar. Esto se debe a que este tipo de pruebas suele hacerse en pacientes con tumores en fases muy avanzadas, en los que la vascularización del tumor está ya plenamente establecida, con lo que la inhibición de la angiogénesis, por medio del bloqueo de las MMP, no sirve de mucho. Hay que pensar que las MMP realizan su papel más importante en las fases tempranas, con lo que la mayoría de las veces se están usando los tratamientos fuera de contexto. Además, hay que considerar otro aspecto importante y es que existen algunas MMP que tienen acción antiangiogénica. Este es el caso de las ADAMTS, subgrupo de MMP con actividad desintegrina y que por presentar en su molécula dominios del tipo trombospondina, algunos de sus miembros son capaces de bloquear la activación de la angiogénesis inducida por el VEGF (39). Se dan muchos casos en los que las MMP liberan factores antiangiogénicos por degradación de los componentes de la ECM, como es el caso de las MMP2 y MMP9, que están muy implicadas en la progresión tumoral, y que intervienen en la hidrólisis de plasminógeno para liberar angiostatina, un potente antiangiogénico. Otras, como la MMP8, están muy implicadas en procesos inflamatorios, de manera que los ratones suprimidos para su gen presentan una respuesta inflamatoria anómala que propiciaría un ambiente favorable para el desarrollo de los tumores (32, 33).

¿Significa todo esto que los procedimientos terapéuticos anteriormente mencionados no son válidos? No se trata de eso, simplemente hay que estudiar en profundidad todos los procesos en los que intervienen las MMP, así como establecer en qué fase del desarrollo tumoral está actuando cada una de ellas. De esta forma, y aplicando un diagnóstico preciso y exacto del tumor, estos tratamientos podrán dar mejores resultados en un futuro esperemos que no muy lejano.

## 5. DIANAS TERAPÉUTICAS

Las investigaciones realizadas en los últimos años han contribuido a enriquecer de manera notable el conocimiento de la implicación de las proteasas en el cáncer. Tras esta información ha surgido el deseo de encontrar inhibidores de la actividad proteolítica asocia-

da con la progresión de tumores malignos. El problema se puede abordar desde numerosos puntos de vista, y se están ya diseñando estrategias que tratan de actuar sobre las rutas de síntesis y secreción de las diversas proteasas o sobre sus mecanismos de activación. Sin embargo, la inmensa mayoría de los esfuerzos en este sentido están siendo dirigidos hacia la búsqueda de inhibidores directos de las proteasas, cuya importancia ha sido apreciada por la propia naturaleza al dotar a los organismos de una amplia batería de inhibidores endógenos capaces de hacer frente a una actividad proteolítica excesiva, como la que acontece durante la progresión tumoral. Existen inhibidores específicos de las distintas familias de proteasas, entre los que podemos mencionar las serpinas que bloquean la actividad de las serina-proteasas, las cistatinas que actúan sobre las cisteína-proteasas, o los TIMP. La importancia de estos últimos ha quedado de manifiesto en recientes investigaciones, que han demostrado que su sobreexpresión es capaz de bloquear la invasión tumoral en distintos modelos *in vitro* e *in vivo*. Estas observaciones han estimulado las investigaciones dirigidas al diseño de inhibidores sintéticos, cuyas estructuras derivan de la información obtenida sobre los mecanismos utilizados por los propios inhibidores endógenos para el bloqueo de las MMP tumorales.

El gran número de inhibidores de las MMP sintetizados son, en su mayoría, derivados pseudopeptídicos basados en la estructura del colágeno alrededor del sitio de hidrólisis por las colagenasas, que poseen un grupo quelante capaz de inactivar la metaloproteasa correspondiente. Alguno de estos inhibidores, como Marimastato (British-Biotech), AG3340 (Agouron/Hoffman-La Roche), D2163 (Chiroscience), BMS-275291 (Bristol Myers-Squibb), Ro31-9790 (Roche) o CGS-27023<sup>a</sup> (Novartis), se utilizan ya en ensayos clínicos para el tratamiento de distintos tumores. No obstante, el diseño de terapias antitumorales basadas en el empleo de inhibidores de proteasas ofrece todavía limitaciones por la diversidad de enzimas proteolíticos asociados a los procesos tumorales y la dificultad de dirigir la terapia a las células apropiadas, evitando los efectos secundarios no deseados sobre células normales. Por eso, la tendencia actual es diseñar inhibidores específicos para las distintas MMP, con mejores propiedades farmacológicas, que puedan ser incorporados a las estrategias de terapia combinada anti-cáncer (34).

La búsqueda de soluciones al problema del cáncer ha sido en los últimos tiempos, amplia y diversa. La cirugía, y después la quimioterapia y la radioterapia, han aportado respuestas precisas e incluso han llegado a evitar que cáncer y muerte fuesen inseparables. Los avances en biología molecular han desvelado secretos importantes de los procesos tumorales y han mostrado que el cáncer es el resultado del acumulo de daño genético en oncogenes, genes supresores y genes de mantenimiento de la integridad del DNA. Sin embargo, pese a estos avances, nuestro conocimiento es aún limitado especialmente en lo referente a la característica más letal de los tumores malignos, su capacidad de generar metástasis. En efecto, una vez que las células tumorales alcanzan el torrente circulatorio y se diseminan por el organismo, la progresión tumoral se torna prácticamente irreversible. Por eso, uno de los objetivos prioritarios es la caracterización de los mecanismos moleculares que conducen a la metástasis. La metástasis es el resultado de una compleja cascada de acontecimientos, que comprende: la interacción de las células tumorales con componentes específicos de la ECM; la destrucción local de esa matriz y finalmente, la migración de las células tumorales a sitios distantes. Se desconocen muchos detalles de los mecanismos implicados en cada una de estas tres fases, no obstante, los esfuerzos realizados han permitido progresar de manera notable en su conocimiento. La degradación de la ECM en contacto con el tumor, a través de la acción concertada de una variedad de enzimas proteolíticas, permite a las células tumorales su migración y diseminación. El mundo proteolítico ha verificado en los últimos diez años una vertiginosa expansión y en la actualidad se estima que el 2% de nuestro patrimonio genético posee información para sintetizar proteasas (33, 34).

## 6. PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

La expresión aberrante de las MMP contribuye a la patogénesis de gran variedad de enfermedades, lo que hace insistir en la necesidad de profundizar en los mecanismos que regulan dicha expresión. El estado «abierto» o relajado de la cromatina es un requisito previo para que se expresen los genes *MMP*, los cuales se pueden inducir mediante múltiples vías señalizadoras, que conducen a un incremento en la

actividad de AP-1, PEA3 y otros factores de transcripción (22, 23). El diálogo entre los factores de transcripción y los elementos *cis*, origina la expresión diferencial de los genes *MMP*, pero aún no se conoce cómo se consigue la regulación de la expresión de estos genes específicos de células/tejidos. De hecho, la mayoría de las células tumorales en cultivo expresan *MMP*, pero se ha demostrado, que es en el estroma, y no en las células cancerosas, donde se expresan estas colagenasas. El argumento es que las células cancerosas son una fuente de citoquinas y factores de crecimiento que son los que inducen la expresión de las *MMP* en las células del estroma. Esta hipótesis, sin embargo, no sirve para explicar por qué la expresión de las *MMP* es silente en cánceres que acarrean oncogenes activos (*Ras/Src*) inductores de la expresión de *MMP*, o genes supresores inactivos que no reprimen la expresión. Esta paradoja tiene al menos dos explicaciones: (i) que la menor estabilidad del mRNA en células tumorales origine señales indetectables, o (ii) que la estructura compacta o «cerrada» de la cromatina, impida el acceso de los factores de transcripción al promotor de las *MMP* (22, 23).

De hecho, se ha descrito que una proteína asociada a la metástasis (MTA1), condensa la estructura de la cromatina cercandando o rodeando el gen *MMP-9* y reprimiendo su transcripción, lo que explica la carencia de expresión de este gen en células tumorales de cáncer mamario. En resumen, aunque hoy se conoce mucho respecto a la identificación de elementos *cis* y sus correspondientes *trans*-activadores en la regulación de la expresión de las *MMP*, se tienen grandes deficiencias en el conocimiento del control epigenético de este grupo de enzimas y de los mecanismos que controlan la especificidad celular y tisular. La percepción actual del problema se ha ampliado, y ha pasado de considerar a las proteasas como ejecutoras de acciones inespecíficas, a definir su participación en múltiples procesos sutilmente regulados dentro de la progresión tumoral. Hoy debemos contemplar este fenómeno como una destrucción programada cuyo fin último es la generación de metástasis. La resolución de la estructura tridimensional de las distintas proteasas asociadas al cáncer, el conocimiento de los mecanismos responsables de su expresión en las células tumorales o en las células estromales adyacentes, y la creación de nuevos modelos animales de ganancia o pérdida de actividad proteolítica, constituyen hoy un desafío del

futuro próximo en este campo. En último término, estos estudios podrán llegar a diseñar inhibidores específicos que contribuirán a afrontar con mayor esperanza el principal problema asociado al desarrollo de los tumores malignos, su capacidad para destruir las barreras tisulares e iniciar un viaje invasivo y colonizador de irreparables consecuencias para los pacientes con cáncer.

## 7. AGRADECIMIENTOS

A M.<sup>a</sup> Pilar Iniesta Serrano por su inestimable ayuda en la revisión del manuscrito, y a Adoración Urrea Salazar por la búsqueda de la bibliografía y el ajuste electrónico de las figuras.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cascales Angosto, M. (2008) Matriz extracelular y proteasas. En: *Bases celulares y moleculares de la regeneración hepática* (autora Cascales, M.). Instituto de España. Madrid, pp. 71-108.
2. Boticario Boticario, C. & Cascales Angosto, M. (2008) Metaloproteinasas de la matriz extracelular y cancer. En: *Innovaciones en cáncer* (autoras Boticario, C. & Cascales, M.). UNED. Madrid, pp. 415-439.
3. Yan, C. & Boyd, D. D. (2007) Metalloproteinase gene expression. *J. Cell Physiol.* 211: 19-26.
4. Roycik, M. D.; Fang, X. & Sang, O. X. (2009) A fresh prospect of extracellular hydrolytic enzymes and their substrates. *Curr. Pharm. Des.* 15: 1295-1308.
5. Murphy, G. & Nagase, H. (2008) Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med.* 29: 290-308.
6. Gross, J. & Lapiere, C. M. (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 45: 1014-1022.
7. Bauer, E. A.; Stricklin, G. F.; Jeffrey, J. J. & Eisen, A. Z. (1975) Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64: 232-240.
8. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 463-516.
9. Harper, E. & Bloch, K. J. (1971) The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry.* 10: 3055-3041.
10. Fingleton, B. (2007) Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr. Pharm. Des.* 13: 333-346.
11. Overall, C. M. & López-Otín, C. (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nature Rev. Cancer.* 2: 657-672.

12. Folgueras, A. R.; Pendas, A. M.; Sánchez, L. M. & López-Otín, C. (2004) Metalloproteinases in cancer: from new function to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 411-424.
13. Liotta, L. A.; Tryggvason, K.; Garbosa, S., Hart, I. *et al.* (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature.* 284: 67-68.
14. Deruyina, E. & Quigley, J. (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 9-34.
15. Mochizuki, S. & Okada, Y. (2007) ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 98: 621-628.
16. Edwards, D. R.; Handsley, M. M. & Pennington, C. J. (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29: 258-289.
17. Steiner, D. F. (1998) The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 31-39.
18. López-Otín, C. & Bond, J. S. (2008) Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 283: 31433-31437.
19. López-Otín, C. & Matrisian, L. (2007) Emerging roles of proteases in tumor progression. *Nature Rev. Cancer.* 7: 800-808.
20. Huang, S. C.; Sheu, B. C.; Chang, W. C.; Chaeg, C. Y.; Wang, P. H. & Lin, S. (2009) Extracellular matrix proteases - Cytokine regulation role in cancer and pregnancy. *Front. Biosci.* 14: 1571-1588.
21. Puente, X. S.; Sánchez, L. M.; Gutiérrez-Fernández, A.; Velasco, G. & López-Otín, C. (2005) A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 331-334.
22. Nakamoto, T.; Yamagata, T., Sakai, T., *et al.* (2000) CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell Biol.* 20: 1649-1658.
23. Ye, S. (2000) Polymorphisms in matrix metalloproteinase gene promoters: implications in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol* 19: 623-629.
24. López-Otín, C. & Overall, C. M. (2002) Protease degradomics a new challenge for proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 509-519.
25. Coussens, L. M.; Fingleton, B. & Matrisian, L. M. (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science.* 295: 2387-2392.
26. Fingleton, B. (2003) Matriz metalloproteinases inhibitors for cancer therapy: the current situation and future prospects. *Expert Opin. Ther. Targets.* 7: 385-397.
27. Handsley, M. M. & Edwards, D. R. (2005) Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer.* 115: 849-860.
28. Fridman, R. (2006) Metalloproteinases and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 7-8.
29. Hanahan, D. & Weinberg, R. (2000) The hallmark of cancer. *Cell.* 100: 57-70.
30. Bergers, G. & Benjamin, L. E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 401-410.

31. Fanjul-Fernández, M.; Folgueras, A. R.; Cabrera, S. & López-Otín, C. (2009) Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta*. Jul 23. [Epub ahead of print].
32. Gutiérrez-Fernández, A.; Fueyo, A.; Folgueras, A. R. & López-Otín, C. (2008) Matrix Metalloproteinase-8 Functions as a Metastasis Suppressor through Modulation of Tumor Cell Adhesion and Invasion. *Cancer Res.* 68: 2755-2763.
33. Gueders, M. M.; Balbin, M.; Rocks, N.; Foidart, J. M. *et al.* (2005) Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocyte allergen-induced airway inflammation. *J. Immunol.* 175: 2589-2597.
34. Affara, N. I.; Andreu, P. & Coussens, L. M. (2009) Delineating protease functions during cancer development. *Methods Mol. Bio.* 539: 1-32.

\* **Información de contacto:**

Dra. María Cascales Angosto.

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Email: [mcascales@insde.es](mailto:mcascales@insde.es)

**Abreviaturas:** **ADAM**, desintegrina y metaloproteínasa (unida a membrana). **ADAMTS**, ADAM con motivos trombospondina (no unida a membrana). **AGRE**, elemento rico en AG. **AP-1**, factor de transcripción; **CBFA1**, factor A1 de unión al núcleo. **CIZ**, proteína dedo de zinc asociada a CAS. **ECM**, matriz extracelular. **ERK1 y ERK2**, quinasas reguladas por señales extracelulares. **Furina**, proproteína convertasa tipo subtilina (SPC1), serina proteasa. **IFN**, interferón. **HP-EGF**, factor de crecimiento epidérmico unido a la heparina. **IL-1**, interleuquina 1. **MMP**, metaloproteínasas de la matriz extracelular. **MTA1**, proteína asociada a la metástasis. **MT-MMP**, metaloproteasas de membrana. **NFκB**, factor nuclear kappa B. **PEA3**, proteína 3 de unión al intensificador A del poliovirus. **Plasmina**, serina proteasa. **p38**, proteína quinasa. **p53**, proteína supresora de tumores. **ProMMP**, precursor de las MMP. **SPC**, proproteína convertasa tipo subtilina, serina proteasa. **STAT**, transductor de señales y activador de la transcripción. **TCF4**, factor 4 de las células T. **TFPI2**, *tissue-factor pathway-inhibitor-2*. **TGFα y TGFβ**, factores de crecimiento transformantes alfa y beta; **TIE**, elemento inhibidor del TGFβ. **TNFα**, factor de necrosis tumoral alfa. **TIMP**, inhibidor titular de las MMP. **Trombospondina**, glicoproteína trimérica de 420 kDa, que forma parte de ADAMTS. **VEGF**, factor de crecimiento endotelial vascular.

# **El premio Nobel 2009 en Fisiología o Medicina: Telómeros y telomerasa: de la investigación citogenética básica a la aplicación clínica. El premio Nobel 2009 en Química: Estructura atómica del ribosoma: estructura y función en el corazón de la genética**

**Juan-Ramón Lacadena Calero**

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Como ya viene siendo habitual, la Real Academia Nacional de Farmacia se reúne en Sesión Científica pública para conmemorar la concesión el presente año 2009 de los Premios Nobel en Fisiología o Medicina y en Química que tienen que ver con los intereses científicos de la Institución.

## **1. EL PREMIO NOBEL 2009 DE FISIOLOGÍA O MEDICINA: TELÓMEROS Y TELOMERASA: DE LA INVESTIGACIÓN CITOGENÉTICA BÁSICA A LA APLICACIÓN CLÍNICA**

Como científico que he dedicado más de treinta años de mi vida a la investigación citogenética en el campo del «comportamiento cromosómico» —entendiendo por comportamiento cromosómico «cualquier cambio fisiológico, estructural o dinámico que experimentan los cromosomas en cualquier tipo de célula (somática o germinal) tanto en períodos de división (mitosis o meiosis) como en interfase»— ha supuesto una satisfacción que el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2009 otorgado por la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska haya recaído en un tema citogenético básico como es la estructura del cromosoma eucariótico (los telómeros y el mecanismo molecular que

los mantiene, la telomerasa) en las personas de tres científicos: Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider y Jack W. Szostak, premiados por el descubrimiento de «cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa». Los tres habían recibido en 2006 el premio Albert Lasker en Investigación Médica Básica, confirmando, una vez más, que los premios Albert Lasker son una antesala de los premios Nobel.

Frente al concepto clásico de la Genética como «la ciencia que estudia la herencia y la variación en los seres vivos» (Bateson, 1906), hace años que propuse yo la definición de la Genética como «la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión» (1). De ahí se deduce que el objeto de la Genética son los genes y que el contenido formal trate de dar respuestas adecuadas a las siguientes preguntas: ¿qué son los genes?, ¿cómo se organizan y transmiten?, ¿cómo y cuándo se expresan?, ¿cómo cambian?, ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo? (2, 3).

En este contexto, recordemos que el cromosoma se puede definir como «el material hereditario organizado cuya estructura adquiere complejidad creciente en la evolución, pasando de simples moléculas desnudas de ácidos nucleicos en algunos procariontes a asociaciones complejas de ácidos nucleicos con proteínas histonas y no histonas como componentes químicos mayoritarios en eucariontes. La función del cromosoma es conservar, transmitir y expresar la información genética que lleva» (1). Partiendo de esta definición y en paralelismo con la definición conceptual de la Genética, la Citogenética se puede definir como «la ciencia que estudia el cromosoma (el material hereditario organizado) bajo cualquier nivel o dimensión» (4).

Como he hecho en otras ocasiones similares, cuando me enteré por los medios de comunicación cuál era el tema de investigación galardonado y quiénes los científicos premiados, fui a comprobar en los libros de texto de los que soy autor —en este caso, el de «Citogenética» (4)— cómo había tratado el tema correspondiente y pude comprobar que en el Capítulo 4 referente a la «Estructura interna del cromosoma eucariótico: diferenciaciones estructurales y su función», dedico cinco páginas (págs. 103-107) a los telómeros y la telomerasa, incluyendo casi una veintena de referencias en las que aparecen alguno de los tres galardonados (Blackburn, Greider o Szos-

tak). Por ello, permítaseme recoger aquí lo que en 1996, en el texto aludido (4), decía al respecto:

Los télómeros son los extremos de los brazos cromosómicos; su denominación se debe a Muller (5)... Desde el punto de vista molecular, los télómeros —complejos de ADN terminal y proteínas— son estructuras especiales de ADN con funciones específicas esenciales para el normal comportamiento de los cromosomas eucarióticos lineales. Estas funciones incluyen su estabilidad (que no se puedan fusionar los extremos cromosómicos entre sí ni sean atacables por exonucleasas) y capacidad de replicación (6).

Dadas las características moleculares de la síntesis del ADN (semiconservativa, dirección 5'→3', semidiscontinua) surgió el problema de cómo explicar la replicación de una molécula lineal de ADN sin que se produjera pérdida de secuencias terminales (las correspondientes al ARN primer). De hecho, se propusieron varios modelos basados en la estructura palindrómica del ADN telomérico que resultaron ser incorrectos. Incluso, el propio Szostak, galardonado con el premio Nobel, propuso alguna modificación aunque manteniendo la estructura palindrómica (7).

Los primeros y fundamentales estudios sobre la estructura del ADN telomérico y su comportamiento durante la replicación mediante la actividad de una enzima específica —la *telomerasa*— fueron realizados principalmente por Elisabeth H. Blackburn y colaboradores (ver revisiones en 8-11).

El aislamiento del ADN telomérico de eucariontes inferiores (ciliados, flagelados, levaduras, etc.) demostró que cada télómero consta de varios centenares de pares de bases originados por la repetición de una secuencia del tipo 5'(T/A)<sub>m</sub>G<sub>n</sub>3'/3'(A/T)<sub>m</sub>C<sub>n</sub>5' (donde m = 1-4, n = 1-8), con la particularidad de que hay un extremo monocatenario 3' de 12-16 bases rico en G porque existen varias copias de la secuencia 5'(T/A)<sub>m</sub>G<sub>n</sub>3' sin las bases complementarias correspondientes (8). Posteriormente se comprobó que dicho modelo se ajustaba también a eucariontes superiores, tanto animales (vertebrados, insectos, etc.) como vegetales. Por ejemplo, en la especie humana se demostró que la secuencia que se repite en la hélice «rica en G» del ADN es 5'TTAGGG3' (12). La longitud total del ADN telomérico en los cromosomas de vertebrados es mayor que la de los

eucariontes inferiores (miles de pb frente a varios cientos). De cualquier manera resulta sorprendente la similitud del ADN telomérico de especies tan diversas como las que se indican a continuación aunque, por otro lado, no es ilógica dada la igualdad de la función a realizar:

Organismos	Secuencia repetida (hélice rica en G)
<i>Tetrahymena</i>	5'TTGGGG3'
<i>Paramecium</i>	5'TT(T/G)GGG3'
<i>Oxytricha</i>	5'TTTTGGGG3'
<i>Plasmodium</i>	5'TT(T/C)AGGG3'
<i>Trypanosoma</i>	5'TTAGGG3'
<i>Dictyostelium</i>	5'TG <sub>1-8</sub> G3'
<i>Arabidopsis</i>	5'TTTAGGG3'
<i>Homo</i>	5'TTAGGG3'

Resulta interesante señalar la posibilidad de que las hélices ricas en G originen estructuras de ADN cuadruplexo al formarse cuartetos de guanina unidos mediante enlaces de tipo Hoogsteen que pueden tener una significación funcional como, por ejemplo, preservar a los extremos cromosómicos de una posible degradación enzimática. De hecho se ha demostrado que una proteína telomérica de *Oxytricha* promueve la formación de los cuartetos de guanina. También se ha demostrado que la secuencia telomérica humana 5'CCCTAA3' de la hélice «rica en C» puede producir una estructura cuadruplexa del ADN por apareamiento de la citosina con la citosina protonada.

Hay que señalar también que se ha detectado la existencia de proteínas teloméricas (10, 11). Las únicas proteínas que se interaccionan de forma específica con el ADN telomérico son la telomerasa y las proteínas teloméricas. De éstas algunas se unen al ADN dúplex telomérico y otras a la terminación monocatenaria 3'. El complejo proteína-ADN telomérico está yuxtapuesto, pero no sobrepuesto, al ADN cromosómico con estructura nucleosomal.

Simultáneamente a los trabajos de Blackburn, Jack W. Sostak comprobó que estructuras lineales de ADN (minicromosomas) eran degradadas muy rápidamente al ser introducidas en células de leva-

dura, pero que, sin embargo, cuando las secuencias de Blackburn eran añadidas a los minicromosomas de Szostak y se introducían en células de levadura, ambos investigadores comprobaron que las secuencias de ADN telomérico protegían a los minicromosomas de la degradación (13).

¿Y qué decir de la telomerasa? Durante la replicación del ADN telomérico, la hélice «rica en G» es sintetizada por una enzima específica —la *telomerasa*— que es una ribonucleoproteína cuyo componente ARN contiene una secuencia complementaria a la de la secuencia repetida telomérica, pudiendo actuar como una terminal transferasa (ver revisiones en 14 y 15). La existencia de la actividad telomerasa *in vitro* fue demostrada primero por las galardonadas Carol W. Greider y Blackburn (16-18) en extractos acelulares de cilios y por Morin (19) en humanos. El componente ARN de la telomerasa de *Tetrahymena* tiene 159b con la secuencia 5'CAACCCCAA3' entre las posiciones 43 a 51 que parece ser el molde para la repetición 5'TTGGGG3' del telómero (18). Por su parte, Romero y Blackburn mostraron que el ARN de la telomerasa tiene una estructura secundaria conservada (20).

En el presente contexto es interesante señalar que en organismos en los que se produce la fragmentación de los cromosomas dentro de su programa de desarrollo es evidente la necesidad de actuación de la telomerasa para «cicatrizarse» los extremos de los nuevos cromosomas construyendo las terminaciones teloméricas. Este proceso fue analizado por Yu y Blackburn (21) en *Tetrahymena*. Asimismo, en organismos que experimentan el fenómeno de *disminución cromatínica* (fragmentación cromosómica) como *Ascaris lumbricoides* se ha demostrado la creación de nuevos telómeros por acción de la telomerasa (22).

Dado que la ausencia en las células de la enzima telomerasa podría repercutir en la viabilidad de las mismas, Szostak y Greider relacionaron la falta de actividad telomerasa con procesos de envejecimiento y muerte celulares (23, 24) así como la actividad extemporánea con la inmortalidad de las células en los procesos cancerosos (25).

Por ello, además del interés que tiene desde el punto de vista de la investigación citogenética básica el premio Nobel de este año, no hay que olvidar su aplicación clínica en temas de cáncer y envejeci-

miento. Precisamente de eso nos hablará la Dra. María A. Blasco que trabajó bajo la dirección de la laureada Nobel 2009 Carol W. Greider y cuyo tema de investigación trata, precisamente, sobre los telómeros y la telomerasa y el papel que juegan en el envejecimiento y el cáncer. Durante su estancia en Cold Spring Harbor Laboratory (1993-1997) trabajando con Carol W. Greider, la Doctora Blasco clonó uno de los genes de la telomerasa en mamíferos y generó el primer ratón *knockout* para la telomerasa, demostrando que la actividad telomerasa es necesaria para prevenir el envejecimiento del organismo (26). Entre 1995 y 2000 publicó más de media docena de artículos en colaboración con la galardonada. Asimismo, la Doctora Blasco ha investigado el papel de la telomerasa en la obtención de células troncales pluripotentes inducidas (iPS) (27).

No puedo terminar este breve comentario al Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2009 sin hacer referencia al caso especial del galardonado Doctor Jack W. Szostak. Cuando se consulta en su página web cuáles son sus líneas de investigación actuales, uno se encuentra con que nada tienen que ver con los cromosomas ni con los telómeros, sino con el origen de la vida: 1) explorar la replicación del ácido nucleico prebiótico, y 2) explorar la biofísica de nuestro sistema de vesículas replicantes, ambos enfoques para tratar de comprender cómo en el origen de la vida pudo producirse la encapsulación de un ácido nucleico capaz de replicar espontáneamente. Una vez conseguido el sistema se tratará de estudiar qué fuerzas evolutivas entran en juego que favorezcan el valor adaptativo (*fitness*) de la célula artificial; es decir, la clave de la ventaja selectiva a nivel celular (28-31).

De hecho, fue a partir de las investigaciones de Cech y Altman, galardonados con el Premios Nobel 1989 en Química, quienes demostraron la capacidad catalítica del ARN, cuando Szostak decidió cambiar el rumbo de sus investigaciones planteándose la posibilidad de que el ARN existiera mucho antes que el ADN y las proteínas puesto que podría ser capaz de catalizar su propia replicación. En 1991, Szostak y sus colaboradores dieron un giro de 180° en sus investigaciones centrando su trabajo en el estudio de la evolución en el tubo de ensayo de moléculas funcionales de ARN y otras moléculas. Para ello pusieron a punto la técnica de «selección *in vitro*» para estudiar la evolución de moléculas biológicas para funciones prede-

terminadas, como la capacidad de catalizar una reacción química específica o unirse a una molécula diana.

En los ensayos que he realizado sobre la Historia de la Genética a la luz de los premios Nobel (2, 32) (apartado 3.5. ¿Cuál es el destino de los genes?) decía que:

«Desde el punto de vista genético y biológico, no cabe la menor duda de que el papel de los genes en la evolución —su destino en el espacio y en el tiempo— es un tema importante. Sin embargo, en la historia genética de los premios Nobel —que es el objeto del presente estudio— no ha habido ninguno que tuviera que ver con el tema.

(...) Otro tanto podríamos decir de las investigaciones en torno al origen de la vida, desde el punto de vista de la evolución química (síntesis prebiótica) o de la evolución del “mundo del ARN” y del “mundo de las ribonucleoproteínas” que llevó al “mundo del ADN” y a la aparición del *progenote* como precursor de los *urcariotas*, las *eubacterias* y las *arqueobacterias*.

(...) Posiblemente, el descubrimiento de la actividad catalítica del ARN por los premios Nobel Altman y Cech, antes citados, pueda representar la espada que rompió el nudo gordiano. Un dato experimental adicional que, de alguna manera, confirmaría las especulaciones en torno al tema fue aportado por Doudna y Szostak (1989) (33), quienes demostraron que un derivado de la ribozima de Cech tenía propiedades de replicasa, catalizando la unión de múltiples oligonucleótidos alineados sobre un molde externo».

Sería de desear que Jack W. Szostak pudiera recibir en el futuro otro premio Nobel por sus estudios sobre el origen de la vida. En el contenido formal de la Genética que consiste en dar respuesta a las preguntas sobre los genes: ¿qué son?, ¿cómo se organizan y transmiten?, ¿cómo y cuándo se expresan?, ¿cómo cambian?, ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo?, solamente las investigaciones encaminadas a responder a la última cuestión no han sido galardonadas todavía con algún premio Nobel. Ojalá Szostak sea acreedor del galardón Nobel y rellene ese vacío (véase el Cuadro 4 en la referencia 2 y el Cuadro 3.1 en la referencia 32). Yo, particularmente, me siento satisfecho de que mi intuición me llevara a relacionar hace ya catorce años a Szostak con los premios Nobel y el origen de la vida (2).

## 2. BIBLIOGRAFÍA

1. Lacadena, J. R. (1981) *Genética* (3.<sup>a</sup> ed.) Prólogo, pág. VIII, AGESA, Madrid.
2. Lacadena, J. R. (1995) Historia «nobelada» de la Genética: Concepto y método. Discurso de Ingreso en la Real Academia de Farmacia, Madrid, págs. 7-76.
3. Lacadena, J. R. (1999) *Genética General: Conceptos fundamentales*, Editorial Síntesis, S. A., Madrid, 623 págs.
4. Lacadena, J. R. (1996) *Citogenética*. Editorial Complutense, S. A., Madrid, 931 págs.
5. Muller, H. J. (1938) The remaking chromosomes. *Collet. Net.* 13: 181-195.
6. Szostak, J. W.; Murray, A. W.; Claus, T. & Dunn, B. (1984) Telomeres and artificial chromosomes in yeast. *Chromosomes Today.* 8: 59-68.
7. Szostak, J. W. (1982) Replication and resolution of telomeres in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47: 1187-1194.
8. Blackburn, E. H. & Szostak, J. W. (1984) The molecular structure of centromeres and telomeres. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 163-194.
9. Szostak, J. W. (1989) The beginning of the ends. *Nature.* 337: 303-304.
10. Blackburn, E. H. (1991) Structure and function of telomeres. *Nature.* 350: 569-573.
11. Blackburn, E. H. (1991) Telomeres. *Trends in Biochemistry.* 16: 378-381.
12. Moyzis, R. K. *et al.* (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85: 6622-6626.
13. Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell.* 29: 245-255.
14. Blackburn, E. H. (1992) Telomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 113-129.
15. Lee, M. S.; Gallagher, R. C.; Bradley, J. & Blackburn, E. H. (1993) *In vivo* and *in vitro* studies of telomeres and telomerase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 707-718.
16. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 43: 405-413.
17. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. (1987) The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell.* 51: 887-898.
18. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature.* 337: 331-337.
19. Morin, G. B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAAGGG repeats. *Cell.* 59: 521-529.
20. Romero, D. P. & Blackburn, E. H. (1991) A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell.* 67: 343-353.
21. Yu, G.-L. & Blackburn, E. H. (1991) Developmental programmed healing of chromosome by telomerase in Tetrahymena. *Cell.* 67: 823-832.
22. Müller, F.; Wicky, C.; Spicher, A. & Tobler, H. (1991) New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lubricoides*. *Cell.* 67: 815-822.

23. Lundblad, V. & Szostak, J. W. (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*. 57: 633-643.
24. Greider, C. W. (1990) Telomeres, telomerase and senescence. *BioEssays*. 12: 363.
25. Greider, C. W. (1993) Telomerase and telomerase-length regulation: Lessons from small eukaryotes to mammals. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 719-723.
26. Blasco, M. A.; Lee, H. W.; Hande, M. P.; Samper, E.; Lansdorp, P. M.; DePinho, R. A. & Greider, C. W. (1997): Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. 91: 25-34.
27. Marion, R. M.; Strati, K.; Li, H.; Tejera, A.; Schoeftner, S.; Ortega, S.; Serrano, M. & Blasco, M. A. (2009) Telomeres acquire embryonic stem cells characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 4: 141-154.
28. Hanczyc, M. M.; Fujikawa, S. M. & Szostak, J. W. (2003) Experimental models of primitive division. *Science*. 302: 618-622.
29. Chen, I. A.; Roberts, R. W. & Szostak, J. W. (2004) The emergence of competition between model protocells. *Science*. 305: 1474-1476.
30. Mansy, S. S.; Schrum, J. P.; Krishnamurthy, M.; Tobé, S.; Treco, D. & Szostak, J. W. (2008) Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell. *Nature*. 454: 122-125.
31. Zhu, T. F. & Szostak, J. W. (2009) A robust pathway for protocell growth and division under plausible prebiotic conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 5705-5713.
32. Lacadena, J. R. (2007) Conmemorando los 100 años del término «Genética» (1905-2005): Una historia «nobelada» de la Genética. Conferencia plenaria, Congreso de la Sociedad Española de Genética, Almería, 2005, Secretariado de Publicaciones, Universidad de León, VII + 109 págs.
33. Doudna, J. A. & Szostak, J. W. (1989) RNA-catalysed synthesis of complementary-strand RNA. *Nature*. 339: 519-522.

### **3. EL PREMIO NOBEL 2009 EN QUÍMICA: ESTRUCTURA ATÓMICA DEL RIBOSOMA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN EN EL CORAZÓN DE LA GENÉTICA**

«Aventurando una predicción, no sería de extrañar que los estudios sobre otro de los tres procesos esenciales en la transmisión de la información genética, la traducción del ARNm por los ribosomas, se vean reconocidos, en un futuro no muy distante, con el Premio Nobel. La estructura del ribosoma, una gigantesca maquinaria molecular que entronca directamente con el mundo prebiótico, ha sido desvelada (de nuevo mediante cristalografía de rayos-X, pero también con aportaciones de microscopía electrónica y bioquímicas) en los albo-

res del nuevo siglo, incluyendo diversos estados funcionales y en interacción con ARNm, ARNt, cofactores proteicos y antibióticos de gran interés farmacológico». Estas palabras proféticas fueron pronunciadas hace tres años en esta misma sala por boca del doctor Rafael Giraldo Suárez (1) cuando esta Real Academia Nacional de Farmacia celebró la sesión científica conmemorativa del premio Nobel en Química 2006, concedido a Roger Kornberg «por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica». Además, el Doctor Giraldo recogía al respecto en su bibliografía seis referencias de las que cuatro de ellas pertenecían a trabajos seminales de los grupos de investigación de los doctores Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz y Ada E. Yonath, galardonados este año por la Real Academia Sueca de Ciencias con el Premio Nobel en Química 2009 «por los estudios de la estructura y función del ribosoma» y que hoy conmemoramos en esta sesión científica. Quizá algún otro científico reunía también méritos para haber sido premiado (por ejemplo, H. F. Noller), pero la norma que limita a un máximo de tres los galardonados con cada premio (de no ser colectivo) lo ha dejado fuera.

Parafraseando el título de una conocida novela de García Márquez, para el Doctor Giraldo ésta es la «crónica de un premio anunciado». Tan «cantado» estaba el premio que el documento «Scientific background on the Nobel Prize in Chemistry 2009» de la Real Academia de Ciencias de Suecia, que hace una revisión científica del tema de investigación galardonado firmado por Måns Ehrenberg (2) estaba fechado en Uppsala el 30 de septiembre, siete días antes de hacerse público el premio. Si además se tiene en cuenta el tiempo que el autor necesitó para elaborar dicha revisión, uno se puede preguntar desde cuándo tenía tomada su decisión la Academia de Ciencias.

En términos generales, el «dogma central de la biología molecular» (3) establece que la información genética contenida en el ADN en forma de secuencia de bases nitrogenadas, capaz de autoconservarse (*replicación*, ADN polimerasa), es transcrita (*transcripción*, ARN polimerasa-ADN dependiente o transcriptasa) al ARN mensajero y traducido este mensaje a proteínas (*traducción*). En el presente contexto hay que señalar que los tres procesos han sido objeto de sendos premios Nobel: Arthur Kornberg en 1959, por su descubrimiento del mecanismo de replicación del ADN (ADN polimerasa); Roger D. Kornberg en 2006, por el estudio de la base molecular de la transcripción,

y en 2009, Ramakrishnan, Steitz y Yonath, por sus estudios sobre la estructura y función de los ribosomas en la traducción.

Como resaltaba la propia institución Nobel al hacer público el premio, el ADN y el ARN son moléculas portadoras de la información genética, pero con ellas solas no habría vida porque son las proteínas las que construyen y controlan la vida. Es en los ribosomas donde se produce la síntesis de las proteínas.

El ribosoma bacteriano (70S) es una ribonucleoproteína que consta de dos subunidades, grande (50S, 1.500.000 Da) y pequeña (30S, 800.000 Da). La subunidad grande (50S) está constituida por unas 33 proteínas diferentes y por dos moléculas de ARN (ARNr 23S, 2.900b y ARNr 5S, 120 b) y la subunidad pequeña (30S) está formada por 20 proteínas y una molécula de ARN (ARNr 16S, 1.600 b). Ambas subunidades están separadas hasta que se unen al iniciarse el proceso de traducción, al término del cual vuelven a disociarse. Desde el punto de vista funcional, en el ribosoma hay tres sedes de unión al ARNt: la sede A (aminoacil) de entrada del complejo de transferencia que lleva el aminoácido correspondiente a un nuevo codón; sede P (peptidil) donde se realiza el enlace peptídico entre el último aminoácido de la cadena peptidil-ARNt<sub>n-1</sub> y el nuevo aminoácido recién incorporado en el aminoacil-ARNt<sub>n</sub>, y la sede E (exit, salida) por donde se libera el ARNt<sub>n-1</sub>.

Resumidamente, además de los ribosomas, los elementos que intervienen en el proceso de traducción en los procariontes son los aminoácidos y los ARN transferentes correspondientes (ARNt, unas 80 b, extremo CCA 3' donde se une el aminoácido, anticodón) a los que se unen por un enlace éster en el extremo 3' gracias a las aminoacil-ARNt sintetetas formando los complejos de transferencia (aminoacil-ARNt), el ARN mensajero (ARNm) con la secuencia líder Shine-Dalgarno de iniciación y codones de iniciación (AUG) y terminación (UAA, UAG, UGA) además de los codones intermedios que codifican para los diferentes aminoácidos que habrán de formar la cadena polipeptídica sintetizada, factores de iniciación (IF1, IF2 GTPasa, IF3), factores de elongación (EF-T<sub>s</sub>, EF-T<sub>u</sub> GTPasa, EF-G GTPasa o translocasa), actividad peptidil transferasa, factores de liberación (RF<sub>1</sub>, RF<sub>2</sub>), factores de disociación, fuentes de energía (ATP, GTP) y Mg<sup>++</sup>.

La dirección de lectura del ARNm es  $5' \rightarrow 3'$  y la de síntesis del polipéptido  $\text{NH}_2 \rightarrow \text{COOH}$ . Las etapas del proceso de traducción son: iniciación, elongación y terminación. El ribosoma cataliza dos procesos químicos que implican la formación de enlaces covalentes, a saber: la formación del enlace peptídico entre los sucesivos aminoácidos que se van incorporando en la síntesis del polipéptido (fase de elongación) y la hidrólisis del enlace éster en la fase de terminación de la síntesis.

En Biología, el binomio estructura-función implica que cuando existe una determinada estructura es para realizar una cierta función y, recíprocamente, para que se lleve a cabo una función es necesaria una estructura adecuada. Por eso, esta breve introducción al tema lleva como título «Estructura atómica del ribosoma: estructura y función en el corazón de la Genética». Además, el conocimiento de ese dualismo estructura-función del ribosoma tiene una aplicación clínica muy importante porque muchos de los antibióticos que se utilizan hoy en día actúan bloqueando alguna de las funciones específicas de los ribosomas bacterianos impidiendo su funcionamiento normal y, en consecuencia, curando las enfermedades provocadas por las infecciones bacterianas.

Como señala el informe de la Real Academia de Ciencias de Suecia (2), durante décadas fue desconocida la manera en que el ribosoma realizaba los mencionados mecanismos químicos de estas etapas de reacción covalente. Hubo que esperar a la posibilidad de estudiar en alta resolución las estructuras cristalinas de las subunidades ribosomales, los complejos funcionales del ribosoma y el propio ribosoma en su totalidad (70S).

Fue la Doctora Ada E. Yonath quien abrió el camino, logrando en los primeros años de la década de los ochenta la cristalización y análisis tridimensional de la subunidad grande (50S) de la bacteria termófila *Geobacillus stearothermophilus* (4, 5). No obstante, en estos y otros trabajos de la década los cristales obtenidos difractaban a una resolución en torno a los 10 Å que todavía no permitía la construcción de un modelo atómico detallado. Tendrían que pasar todavía 10 años hasta que los grupos de los otros dos galardonados Thomas Steitz (6-8) y Venkatraman Ramakrishnan (9, 10) llegaban a unos niveles de resolución de 5 Å, 4 Å e inferiores a 3 Å. Obvia-

mente, también el grupo de Yonath alcanzó el nivel de resolución adecuado (11, 12).

Una vez conocida la estructura de las subunidades ribosómicas, el paso siguiente fue analizar los mecanismos que aseguraban la exactitud de la selección de los ARNt (es decir, de los respectivos complejos de transferencia) y la realización del enlace peptídico durante la fase de elongación. El mecanismo de interacción codón-anticodón en la subunidad 30S, que asegura la exactitud del proceso de lectura por el ribosoma del mensaje genético contenido en el ARN mensajero fue analizado por Ramakrishnan y colaboradores (13-15).

En cuanto Steitz y colaboradores (8) obtuvieron la estructura de la subunidad 50S en alta resolución (4.5 Å) se planteó el estudio de los mecanismos mediante los que el ribosoma cataliza la formación del enlace peptídico transfiriendo el péptido naciente (peptidil-ARNt) de la sede P a la sede A (aminoacil-ARNt) (16). En 2004, otros grupos de investigación hicieron importantes contribuciones demostrando, por un lado, la dependencia de la temperatura de la tasa de transferencia (17) y, por otro lado, la demostración cuantitativa de la naturaleza esencial del grupo 2'-OH de A76 del peptidil-ARNt con el componente peptidil unido al O3' de A76 (18).

Basándose en los datos estructurales previamente conocidos y utilizando métodos computacionales moleculares, Trobo y Åkvist (19, 20) propusieron un modelo del mecanismo de formación del enlace peptídico en el ribosoma: el grupo  $\alpha$ -amino del aminoacil-ARNt en la sede A ataca al enlace éster del peptidil-ARNt en la sede P.

Como señala Ehrenberg en su revisión Nobel (2), el modelo estructural de la subunidad 50S descubierto por Steitz y colaboradores —con la publicación en 2005 de su «joya de la corona» (21)— fue la base fundamental para clarificar cómo el ribosoma cataliza la formación de los enlaces peptídicos en la etapa de elongación de la cadena polipeptídica.

Otros aspectos importantes en el proceso de la síntesis de proteínas, como son el papel de los factores de liberación (RF1 y RF2) que leen los codones de terminación (UAA, UAG, UGA), fueron analizados en 2008 por los grupos de Noller y de Ramakrishnan estudiando con alta resolución las estructuras de los complejos correspondien-

tes del ribosoma 70S con el factor RF1 (22) y RF2 (23, 24). Asimismo, por un lado, el grupo de Steitz analizó el comportamiento de LepA, que es una GTPasa que cataliza la translocación inversa tanto en el ARNt como en el ARNm y, por otro lado, al analizar en alta resolución la estructura del complejo ribosoma-factor EF-P sugirieron que dicho factor podría facilitar la colocación del complejo de transferencia fMet-ARNt para la rápida formación del primer enlace peptídico una vez iniciado el proceso de traducción (25).

En 2006, el grupo de Ramakrishnan analizó las interacciones del ARNt y ARNm con el ribosoma 70S en la fase de pre-translocación (26) y, finalmente, en 2009, demostraron que las proteínas L27 y L16 de la subunidad 50S del ribosoma estabilizan los extremos CCA de las dos moléculas de ARNt que participan en la reacción peptidil-transferasa, sugiriendo que ambas proteínas intervienen en el mecanismo catalítico de la formación del enlace peptídico (27). En otras palabras, que aunque el ARNt y el ARNr actúan como los principales catalizadores de la formación del enlace peptídico, no se puede descartar que proteínas ribosomales puedan jugar también un papel importante.

La revisión de Ehrenberg (2) terminaba con el siguiente colofón:

«Al principio se creía que la proteína ribosomal llevaba a cabo las acciones catalíticas del ribosoma. Luego se pensó que el catalizador era el ARN ribosomal. Ahora sabemos que la formación del enlace peptídico en el ribosoma bacteriano y quizá en los ribosomas de todos los organismos está catalizado por el ARN y por la proteína ribosomal, así como por el grupo 2'-OH del sustrato peptidil-ARNt en la sede P del ribosoma. [Desde el punto de vista evolutivo] esta triada catalítica puede reflejar un punto de partida más complejo de la ruta hacia el actual mundo de las proteínas que un puro mundo del ARN».

Este colofón de matiz evolutivo en torno al papel del ARN en el origen de la vida nos lleva a recordar el comentario que he hecho en la primera parte de mi intervención en relación con Jack W. Szostak, galardonado con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina. Por ello, me permito recoger aquí las palabras que incluí en un cierto pasaje de mi discurso de ingreso en esta Real Academia de Farmacia (28):

«Aunque nuestro conocimiento de la transición prebiótica al “mundo del ARN” está plagado de incertidumbres por falta de datos experimentales, es hora de situar la evolución del ARN en el contexto de la química que le precedió y de la biología que le siguió (29). Por ello pienso que, en términos de evolución del aparato genético, habría que gritar, parafraseando la antigua fórmula de proclamación de los reyes en la monarquía francesa: el ADN ha muerto, ¡viva el ARN!»

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

1. Giraldo, R. (2007) Roger Kornberg y la RNAPol II: El mecanismo de síntesis del ácido ribonucleico desvelado al medio siglo de Severo Ochoa y su polinucleótido fosforilasa. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73(1): 125-140.
2. Ehrenberg, M. (2009) Structure and function of the ribosome, *Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2009, The Royal Swedish Academy of Sciences*, 22 págs.
3. Crick, F. H. C. (1970) Central dogma of Molecular Biology. *Nature.* 227: 561-563.
4. Yonath, A.; Mussig, J.; Tesche, B.; Lorenz, S.; Erdmann, V. A. & Wittmann, H. G. (1980) Crystallization of the large ribosomal subunits from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. Int.* 1: 428-435.
5. Yonath, A.; Bartunik, H. D.; Bartels, K. S. & Wittmann, H. G. (1984) Some x-ray diffraction patterns from single crystals of the large ribosomal subunit from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.* 177: 201-206.
6. Ban, N.; Freeborn, B.; Nissen, P.; Penezek, P.; Grassucci, R. A.; Sweet, R.; Frank, J.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (1998) A 9Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell.* 93: 1105-1115.
7. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Capel, M.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5Å-resolution map of 50S ribosomal subunit. *Nature.* 400: 841-847.
8. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science.* 289: 902-920.
9. Clemons, W. M. Jr.; May, J. L.; Wimberly, B. T.; McCutcheon, J. P.; Capel, M. S. & Ramakrishnan, V. (1999) Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature.* 400: 833-840.
10. Wimberly, B. T.; Brodersen, C. E.; Clemons, W. M.; Morgan-Warren, R. J.; Carter, A. P.; Vonrhein, C.; Hartsch, T. & Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature.* 407: 327-339.
11. Schluenzen, F.; Tocilj, A.; Zarivach, R.; Harms, J.; Gluehmann, M.; Janell, D.; Bashan, A.; Bartels, H.; Agmon, I.; Franceschi, F. & Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Ångstroms resolution. *Cell.* 102: 615-623.

12. Harms, J.; Schluenzen, F.; Zarivach, R.; Bashan, A.; Gat, S.; Agmon, I.; Bartels, H.; Franceschi, F. & Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*. 107: 679-688.
13. Ogle, J. M.; Brodersen, D. E.; Clemons, W. M. Jr.; Tarry, M. J.; Carter, A. P. & Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*. 292: 897-902.
14. Ogle, J. M.; Murphy, F. V.; Tarry, M. J. & Ramakrishnan, V. (2002) Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell*. 111: 721-732.
15. Ogle, J. M. & Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 129-177.
16. Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 256: 920-930.
17. Sievers, A.; Beringer, M.; Rodnina, M. V. & Wolfenden, R. (2004) The ribosome as an entropy trap. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 7897-7901.
18. Weinger, J. S.; Parnell, K. M.; Dorner, S.; Green, R. & Strobel, S. A. (2004) Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:1101-1106.
19. Trobo, S. & Åqvist, J. (2005) Mechanism of peptide bond synthesis on the ribosome. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 12395-12400.
20. Trobo, S. & Åqvist, J. (2006) Analysis of predictions for the catalytic mechanism of ribosomal peptidyl transfer. *Biochemistry*. 45: 7049-7056.
21. Schmeing, T. M.; Huang, K. S.; Kitchen, D. E.; Strobel, S. A. & Steitz, T. A. (2005) Structural insights into the roles of water and the 2' hydroxyl of the P site tRNA in the peptidyl transferase reaction. *Mol. Cell*. 20: 437-448.
22. Laurberg, M.; Asahara, H.; Korostelev, A.; Zhu, J.; Trakhanov, S. & Noller, H. F. (2008) Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature*. 454: 852-857.
23. Weixlbaumer, A.; Hin, H.; Neibauer, C.; Voorhees, R. M.; Petry, S.; Kelley, A. C. & Ramakrishnan, V. (2008) Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome. *Science*. 322: 953-956.
24. Korostelev, A.; Asahara, H.; Lancaster, L.; Laurberg, M.; Hirschi, A.; Zhu, J.; Trakhanov, S.; Scott, W. G. & Noller, H. F. (2008) Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105: 19684-19689.
25. Blaha, G.; Stanley, R. E. & Steitz, T. A. (2009) Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science*. 325: 966-970.
26. Selmer, M.; Dunham, C. M.; Murphy, F. V.; Weixlbaumer, A.; Petry, S.; Kelley, A. C.; Weir, J. R. & Ramakrishnan, V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. 313: 1935-1942.
27. Voorhees, R. M.; Weixlbaumer, A.; Loakes, D.; Kelley, A. C. & Ramakrishnan, V. (2009) Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 528-533.

28. Lacadena, J. R. (1995) Historia «nobelada» de la Genética: Concepto y método. *Discurso de Ingreso en la Real Academia de Farmacia*, Madrid, págs. 7-76.
29. Joyce, G. F. (1989) RNA evolution and the origins of life. *Nature*. 338: 217-224.

## 5. EPÍLOGO

Un año más, tengo que terminar mi intervención mostrando mi orgullo de pertenecer a un ámbito del conocimiento científico como es la Genética, merecedora del más alto reconocimiento, como son los premios Nobel. Así pues, repitiendo y actualizando lo que he venido diciendo en otras ocasiones, hoy, en 2009, como sucediera en años anteriores, podemos estar orgullosos, los amantes de la Genética, porque ya son 38 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 84 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 38 premios considerados, 29 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, ocho a la Química y uno de la Paz y, a su vez, de los 84 científicos galardonados, 65 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 18 de Química y uno de la Paz. Por cierto que, de estos 84 científicos, ¡solamente siete de ellos son mujeres!: Barbara McClintock (1983), Christiane Nüsslein-Volhard (1995), Linda S. Buck (2004), Françoise Barré-Sinoussi (2008), Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider y Ada E. Yonath (2009), lo cual supone algo más del 8 por 100.

Finalmente, me gustaría destacar que en lo que va de década se ha premiado la investigación genética en ocho ocasiones: 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, «por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular»), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, «por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada»), 2004 (Axel y Buck, «por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo»), 2006 (Fire y Mello, «por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena»), 2006 (Kornberg, «por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica»), 2007 (Capecchi, Evans y Smithies, «por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias»), 2008 (zur Hausen, «por su descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical»; Barré-Sinoussi y Mon-

tagnier, «por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana»), 2008 (Shimomura, Chalfie y Tsien, «por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP»), 2009 (Blackburn, Greider y Szostack, «por el descubrimiento de cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa») y 2009 (Ramakrishnan, Steitz y Yonath, «por los estudios de la estructura y función del ribosoma»). Sin duda, es una década prodigiosa para la Genética como una Alicia en el «País de las maravillas moleculares», que diría Lewis Carroll (pseudónimo del escritor británico Charles Lutwidge Dodgson, matemático y sacerdote anglicano). En 1995 inicié con mi discurso de ingreso en esta Real Academia (1) la historia «nobelada» de la Genética, que tuve la oportunidad de actualizar doce años después, en 2007 (2), y que, al paso que vamos, ya se me está quedando viejo.

Finalmente, permítaseme hacer alguna profecía (que saben que me gusta hacerlas), repitiendo la que hice el año pasado en las presentes circunstancias: que, antes o después, los grandes pioneros de la Genómica (¿Venter, Collins?) y la Reprogramación celular (¿Wilmot, Gurdon, Yamanaka, Thomson?) serán galardonados con el premio Nobel. ¡Ojalá tengamos ocasión de recordar estas palabras mías en una ulterior sesión científica de esta Real Academia Nacional de Farmacia!

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lacadena, J. R. (1995) Historia «nobelada» de la Genética: Concepto y método. *Discurso de Ingreso en la Real Academia de Farmacia*, Madrid, págs. 7-76.
2. Lacadena, J. R. (2007) Conmemorando los 100 años del término «Genética» (1905-2005): Una historia «nobelada» de la Genética. *Conferencia plenaria, Congreso de la Sociedad Española de Genética*, Almería, 2005. Secretariado de Publicaciones, Universidad de León. VII + 109 págs.

# **El Ying y el Yang de los telómeros: cáncer y envejecimiento**

**María A. Blasco**

Directora del Programa de Oncología Molecular del CNIO.  
Vicedirectora de Investigación Básica del CNIO.  
Jefa de Grupo de Telómeros y Telomerasa.

## **1. PAPEL DE LA TELOMERASA EN LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS**

### **1.1. Telómeros**

Los telómeros son unos complejos ribonucleoproteicos situados en los extremos de los cromosomas esenciales para la protección del cromosoma y la estabilidad genómica. Los telómeros consisten de repeticiones en tándem de DNA de una secuencia rica en bases G (TTAGGG en todos los vertebrados) a los que se une un complejo de seis proteínas conocido como «shelterina», que incluye al heterodímero Pot1-TPP1 y a las proteínas de unión al telómero TRF1 y TRF2», así como a sus factores de interacción Rap1 y Tin2 (1).

La cromatina telomérica está enriquecida en las marcas epigenéticas características de la heterocromatina constitutiva, como son la trimetilación de histonas y la hipermetilación del DNA, que actúan como reguladores negativos de la longitud telomérica (2). La cromatina telomérica protege de la degradación al extremo 3' protuberante de cadena sencilla (cadena G protuberante) de los telómeros y evita que estos extremos sean reconocidos y procesados como daño en el DNA (roturas en la doble hebra).

El acortamiento de los telómeros por debajo de un umbral de longitud y/o la funcionalidad alterada de las proteínas de unión a los telómeros resulta en una pérdida de la protección telomérica condu-

cente a fusiones cromosómicas de extremo con extremo y a otras reordenaciones cromosómicas, a la parada del ciclo celular y/o la apoptosis. Otras funciones de los telómeros son el silenciamiento transcripcional de genes situados cerca del telómero (silenciamiento telomérico) así como la segregación adecuada durante la mitosis.

## 1.2. Telomerasa

Durante la división celular los telómeros pierden progresivamente las repeticiones TTAGGG como consecuencia de la replicación incompleta de los cromosomas lineales por las DNA-polimerasas, el llamado «problema de la replicación de los extremos». Existe una actividad enzimática, denominada telomerasa, que es capaz de compensar la pérdida de repeticiones teloméricas, asociadas a división celular, mediante la adición de novo de repeticiones TTAGGG a los extremos de los cromosomas (3). La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico compuesto por una subunidad catalítica con actividad de transcriptasa en reverso (Tert), un componente de RNA (Terc) que sirve como molde para la síntesis de DNA y la proteína diskarina (Dkc1) que se encarga del ensamblaje entre Tert y Terc. La telomerasa tiene actividad transcriptasa reversa y tiene la capacidad de compensar el acortamiento telomérico mediante la síntesis de repeticiones teloméricas (TTAGGG) en los extremos de los cromosomas, utilizando el componente Terc como molde.

La expresión de la telomerasa se encuentra restringida al desarrollo embrionario, así como a los compartimentos de las células madre adultas (4). Sin embargo, la actividad telomerasa en estos tejidos no es suficiente para prevenir el acortamiento telomérico con la edad.

Las mutaciones tanto en los diferentes componentes de la telomerasa (Tert, Terc y Dkc1), así como en alguno de los componentes de «shelterina» (TRF1 y Tin2) se han asociado genéticamente a ciertas enfermedades humanas raras como diskaratosi congénita, anemia aplásica y la fibrosis pulmonar (5-8). Estas enfermedades están asociadas a la disfunción telomérica y por tanto se caracterizan por presentar fallos en la capacidad regenerativa tisular (como de la médula ósea) e hiperpigmentación severa de la piel.

### 1.3. Modelo de ratón deficiente en telomerasa

La generación de un modelo de ratón deficiente en telomerasa (ratones *knock-out* para *Terc*) permitió demostrar por vez primera que la telomerasa mantiene los telómeros en los organismos y que tiene un impacto directo tanto en cáncer como en envejecimiento. Así, las células deficientes en telomerasa muestran un acortamiento acelerado de los telómeros que conduce a fusiones cromosómicas de extremo con extremo (9-12). Los ratones deficientes en telomerasa poseen una vida media más corta que se reduce a medida que transcurren las generaciones. Además, desarrollan prematuramente ciertas patologías asociadas a la edad y su comienzo se puede «anticipar» en las generaciones siguientes (al igual que las enfermedades humanas de disfunción telomérica). Por último, los ratones deficientes en telomerasa muestran resistencia al cáncer, validando a la telomerasa como una prometedor diana para terapias antitumorales (13).

### 1.4. Telomerasa en las células madres adultas

El modelo de ratón deficiente en telomerasa nos ha permitido también establecer el impacto que tiene la telomerasa en la funcionalidad de las células madre adultas: ésta está impedida en los ratones con telómeros críticamente cortos (como es el caso en la generación G3 del *knock-out* en telomerasa). La movilización de las células madre de la epidermis de estos ratones en respuesta a estímulos mitogénicos es notoriamente menor que la de los ratones silvestres (14). Esta movilización disminuida anticipa una mayor resistencia al cáncer y unos fenotipos de envejecimiento en los ratones deficientes en telomerasa. Un punto de control dependiente de p53 en la ruta de señalización del daño en el DNA es el responsable de que se encuentre impedida la contribución de las células madre a la regeneración epitelial en los ratones deficientes en telomerasa ya que la abrogación de p53 en estos ratones (ratones doblemente deficientes en telomerasa y p53) rescata las deficiencias observadas en las respuestas al tratamiento con estímulos mitogénicos: la longitud del folículo piloso y el grosor de la epidermis interfolicular son mayores en los ratones doblemente deficientes que en los ratones sólo deficientes en telomerasa (15).

### **1.5. Papel de los telómeros en cáncer y envejecimiento: un modelo**

Hemos propuesto un modelo basado en las células madre para explicar el papel que desempeñan los telómeros en los procesos de cáncer y de envejecimiento. Los compartimentos (nichos) donde se albergan las células madre están enriquecidos en células con los telómeros más largos. En los ratones jóvenes o adultos, se pueden reparar las lesiones tisulares mediante la activación de las células madre que se movilizan desde sus nichos hacia la lesión. Durante este proceso el acortamiento telomérico concomitante a la división celular en las células madre se contrarresta mediante la telomerasa. A medida que los ratones van envejeciendo los telómeros de las células madre también se van acortando progresivamente y cuando los ratones son viejos los telómeros de las células madre se reducen a una longitud crítica y son reconocidos como daño en el DNA. Por tanto, se activa una respuesta de señalización de daño en el DNA mediada por p53 que impide que las células madre se movilicen desde sus nichos incapacitando la regeneración y provocando el envejecimiento de los tejidos. La adquisición de mutaciones que reactivan la telomerasa en combinación con mutaciones en supresores tumorales y/o oncogénicas resultan en la aparición de tumores. Así, en estas condiciones, los telómeros de las células madre no se acortan y se instauraría un régimen de movilización constante provocando la aparición y crecimiento de tumores (16).

## **2. EXTENSIÓN DE LA LONGEVIDAD MEDIANTE LA TELOMERASA**

Tanto la vida media como la vida máxima se reducen en las generaciones sucesivas de los ratones deficientes en telomerasa. Esta disminución en la longevidad con el aumento de las generaciones de ratones deficientes en telomerasa se correlaciona con un acortamiento progresivo en la longitud telomérica. La telomerasa es, por tanto, un factor determinante en la longevidad de los ratones.

Nos preguntamos qué efecto causaría en la longevidad de los ratones la sobreexpresión de la telomerasa, resultaría en una exten-

sión de la longevidad y en qué medida. Para poder responder adecuadamente a la pregunta anterior es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones previas al abordaje experimental. Por un lado, la ausencia de telomerasa resulta en un envejecimiento prematuro y también en una menor aparición de cáncer, y, por otro lado, en los ratones en los que se sobreexpresa la telomerasa en los epitelios se había observado una atenuación en los fenotipos de envejecimiento pero también una mayor incidencia de cáncer. Para contrarrestar el efecto pernicioso de promoción de la tumorigénesis generamos un ratón en el que la sobreexpresión constitutiva de la telomerasa se produce en un contexto genético de resistencia aumentada al cáncer mediante la sobreexpresión de los supresores tumorales p53, p16 y p19ARF, el ratón SUPER-M. En los ratones SUPER-M se disociarían los efectos de la telomerasa en cáncer y en envejecimiento y permitir evaluar el papel de la telomerasa en el envejecimiento y estado de forma de los ratones.

## **2.1. Ratones SUPER-M**

La caracterización de los ratones SUPER-M mostró que en éstos la aparición de cáncer está sensiblemente retardada, mientras que en los ratones silvestres se detectaban cánceres a las 110 semanas de vida (y antes en los que sobreexpresan telomerasa) en los ratones SUPER-M los tumores aparecían a las 145 semanas (17).

La edad de aparición de lesiones degenerativas también está retardada en los ratones SUPER-M. En estos ratones los síntomas de envejecimiento también están atenuados, por ejemplo, los niveles de grasa subcutánea en los ratones jóvenes y los viejos son muy similares mientras que en los ratones silvestres el espesor de la capa de grasa subcutánea de los viejos es siete veces menor que la de los jóvenes. Asimismo, los ratones SUPER-M presentan un menor envejecimiento de la piel, tienen mejor piel y pelaje a edades avanzadas que los ratones silvestres.

El envejecimiento orgánico de los ratones SUPER-M es también menor, así el estado de forma neuromuscular está mejorado tanto en los ratones jóvenes como en los viejos. Todos los ratones SUPER-M superaron con éxito el ensayo de coordinación neuromuscular, mien-

tras que en los ratones silvestres no todos los jóvenes pasaron con éxito el ensayo anterior y más de la mitad de los viejos no superaron la prueba. La tolerancia a la glucosa también está mejorada en los ratones SUPER-M, es tres veces mejor en éstos que en los ratones silvestres. La longitud de los telómeros de los ratones SUPER-M es mayor que la de los silvestres y esta diferencia es muy acusada en los ratones viejos. Asimismo, los ratones SUPER-M viejos presentan niveles de daño en el DNA telomérico menores que los observados en los ratones silvestres viejos.

Por último, constatamos que la telomerasa extiende el periodo de vida en los ratones SUPER-M. Así, la vida media de los ratones SUPER-M es un 40 por 100 superior a la de los silvestres. Además, cuando se toman en cuenta únicamente aquellos ratones que no han desarrollado cáncer, la vida media se incrementa hasta un 50 por 100. Es de destacar que hasta la fecha los mejores resultados de aumento de la longevidad, conseguidos mediante restricción calórica, alcanzaban una extensión del 30 por 100. Por tanto, la sobreexpresión de la telomerasa en condiciones de resistencia al cáncer es el mejor efector anti-envejecimiento descrito hasta ahora.

### **3. REJUVENECIMIENTO DE LOS TELÓMEROS DURANTE LA GENERACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS (CMPI o IPS)**

La obtención de células madre pluripotentes a partir de células diferenciadas constituye un objetivo primordial en el desarrollo de terapias celulares individualizadas. Estas células proporcionarían una fuente ilimitada de células capaces de generar todo tipo de tejidos con la ventaja de que al proceder del mismo individuo se evitaría el rechazo en las terapias de trasplante. La primera estrategia desarrollada para la reprogramación nuclear se basaba en el trasplante nuclear procedente de una célula somática en oocitos enucleados (18). Recientemente, se ha logrado generar células madre pluripotentes inducidas (CMPi) a partir de células diferenciadas mediante la introducción de cuatro factores de transcripción, Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (19, 20). Este último, no obstante, se ha demostrado ser dispensable en la obtención de CMPi.

Como se ha mencionado anteriormente, los telómeros se acortan a medida que aumenta la edad, contribuyendo así al envejecimiento de los órganos mediante la limitación de la capacidad proliferativa de las células madres adultas. Aunque la actividad telomerasa está aumentada en las CMPi, tanto de humanos como de ratones, se desconocía si los telómeros se re-alargaban y si la cromatina telomérica adquiriría las mismas características que en las células madre embrionarias (CME).

La reprogramación de la cromatina telomérica puede acontecer en varios contextos: que telomerasa no sea necesaria para el alargamiento de los telómeros, que haya una cooperación entre la telomerasa y los mecanismos basados en recombinación o que, por último, el alargamiento de los telómeros durante la reprogramación dependa completamente de la actividad telomerasa (21). Hemos mostrado que los telómeros de las CMPi se alargan dramáticamente con respecto a los de las células parentales diferenciadas. Dicho alargamiento se produce independientemente de la presencia o no de cMyc. Además, la obtención de CMPi fue igual de eficiente cuando las células de partida provenían tanto de individuos viejos como de los jóvenes. Demostramos pues que los telómeros rejuvenecen de forma eficiente durante la reprogramación nuclear. Este alargamiento de los telómeros continúa pos-reprogramación hasta alcanzar la longitud de los telómeros de las CME. El hecho de que los telómeros no se alargasen en la reprogramación de células deficientes en telomerasa claramente demuestra que el alargamiento telomérico es mediado exclusivamente por la actividad telomerasa.

Hemos mostrado también que los telómeros de las CMPi adquieren las marcas epigenéticas de los telómeros de las CME, entre ellas una densidad baja de histonas H3K9 y H4K20 trimetiladas y que en las CMPi se produce una pérdida de silenciamiento telomérico y un aumento en la abundancia de los TERRA (transcritos teloméricos) (21).

La eficiencia de reprogramación en células derivadas de generaciones crecientes de ratones deficientes en telomerasa muestran una disminución dramática en la eficiencia de generación de CMPi, defecto que se anula mediante la reintroducción de la telomerasa. Asimismo, hemos observado que para la generación de CMPi se necesita un mí-

nimo de longitud telomérica. De hecho, cuando se emplean células provenientes de la generación G3 de ratones deficientes en telomerasa la reprogramación se ve impedida, indicando la existencia de un umbral de longitud telomérica mínima para la obtención de CMPi.

#### **4. p53 ES UN FACTOR CLAVE QUE LIMITA LA REPROGRAMACIÓN**

El hecho de que las células con los telómeros cortos no son susceptibles de reprogramación, probablemente indica la existencia de unas «barreras de reprogramación» que abortan la reprogramación de células subóptimas con telómeros desprotegidos o disfuncionales. Una hipótesis plausible se basa en que la baja eficiencia de reprogramación se debía a la presencia de lesiones en el DNA de las células de partida. Hemos demostrado que p53 es un factor clave que limita la reprogramación de células subóptimas, aquéllas que portan diferentes tipos de daño en el DNA, como son los telómeros cortos, las deficiencias en los sistemas de reparación del DNA (células deficientes en ATM y 53BP1), o el daño en el DNA inflingido exógenamente (células irradiadas).

La reprogramación en presencia de daño preexistente, pero tolerado, en el DNA se aborta mediante la activación de la respuesta al daño en el DNA (DDR) y la apoptosis dependientes de p53. La abrogación de p53 permite una reprogramación eficiente en células que portan un daño persistente en el DNA y aberraciones cromosómicas. Hemos observado que durante la reprogramación las células aumentan su intolerancia a los diferentes tipos de daño en el DNA y que p53 es crítica para evitar la generación de CMPi a partir de células parentales subóptimas (22). Por último, dado que ciertos factores de reprogramación promueven la tumorigénesis *in vivo*, es tentador proponer que la DDR observada en los cultivos de células deficientes en p53 pudiera ser equivalente a la DDR inducida por oncogenes que acontece en el contexto de la transformación maligna. En ambas situaciones, reprogramación y transformación, p53 es crítica para controlar la diseminación de las células dañadas.

Nuestros resultados destacan la importancia de la biología de los telómeros en la generación y la funcionalidad de las CMPi, y tienen

implicaciones importantes en la translación clínica de la tecnología de las CMPi, particularmente en pacientes aquejados de telopatías.

## **5. IMPORTANCIA EN CÁNCER Y ENVEJECIMIENTO DE LA CANCELACIÓN DE LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA (DDR) EN LOS EXTREMOS DE LOS CROMOSOMAS**

### **5.1. El complejo de «shelterina»**

Las repeticiones TTAGGG de los extremos de los cromosomas de los mamíferos se asocian con un complejo multiproteico formado por seis proteínas denominado «shelterina». La «shelterina» capacita a las células para diferenciar los extremos naturales de sus cromosomas de las roturas en el DNA, reprime las reacciones de reparación del DNA, y regula el mantenimiento telomérico basado en telomerasa. Los seis componentes de la «shelterina» localizan específicamente en los telómeros, abundan en el telómero a lo largo de todo el ciclo celular y no funcionan en ningún otro lugar del núcleo celular. Adicionalmente, los telómeros también contienen un elevado número de proteínas que no forman parte de la «shelterina» y que, al contrario que las proteínas de «shelterina», también desempeñan funciones no teloméricas.

La especificidad de la «shelterina» por el DNA telomérico se debe al reconocimiento de las repeticiones TTAGGG por parte de tres de sus componentes: TRF1 y TRF2 se unen a la región bicatenaria del DNA telomérico, mientras que Pot1 se une a las repeticiones TTAGGG de la cadena G protuberante. TRF1 y TRF2 reclutan a los otros cuatro componentes de la «shelterina»: Tin2 (un factor que interacciona con TRF1 y TRF2), Rap1, TPP1 y Pot1. Estas dos últimas forman un heterodímero. La «shelterina» forma un complejo estable en ausencia de DNA telomérico.

En las enfermedades raras diskeratosis congénita y anemia aplásica, se han descrito mutaciones en Tin2 y variantes genéticas de TRF1. Estas patologías tienen como rasgo distintivo el cursar con anomalías epiteliales como la hiperpigmentación cutánea, la distrofia de las uñas o la leucoplaquia oral.

## 6. MODELOS DE RATÓN DE DELECCIÓN CONDICIONAL DE LAS PROTEÍNAS DE «SHELTERINA»

### 6.1. Ratones TRF1<sup>ΔΔ</sup>

La delección convencional de TRF1 en ratones produce una letalidad embrionaria muy temprana en el estadio de blastocisto y por este motivo la caracterización del papel de TRF1 en las células diferenciadas había permanecido inabordable.

Para poder estudiar el papel de TRF1 en la biología de los telómeros y en las enfermedades en el contexto de un organismo mamífero hemos generado células y ratones en los que TRF1 ha sido delecionada de forma condicional y específica de epitelio estratificado (ratones TRF1<sup>ΔΔ</sup>K5-Cre) (23). La delección de TRF1 en fibroblastos embrionarios de ratón no produce cambios en la longitud telomérica. Por el contrario, resulta en una rápida inducción de senescencia celular dependiente de p53/RB que es concomitante con la acumulación de abundantes focos de daño en el DNA telomérico. Este daño activa la fosforilación de ATM/ATR y sus efectores aguas abajo las quinasas CHK1 y CHK2, resultando en una parada en el ciclo celular. Las células deficientes en TRF1 muestran también abundantes fusiones teloméricas de extremo con extremo que involucran tanto cromosomas como cromátidas hermanas. Asimismo, se observan abundantes señales multiteloméricas que indican un alto grado de fragilidad cromosómica consecuencia de problemas replicativos en el DNA telomérico (23, 24). Estos resultados demuestran que TRF1 tiene una función protectora frente a las actividades de la respuesta al daño en el DNA (DDR) y facilita la replicación del DNA telomérico.

#### 6.1.1. *Consecuencias de la delección de TRF1 en las células madre adultas*

En consonancia con una disfuncionalidad telomérica severa, los ratones TRF1<sup>ΔΔ</sup>K5-Cre mueren perinatalmente y muestran una aparición temprana de ciertas patologías, entre las que se encuentran hiperqueratosis, incapacidad proliferativa de las células de la capa basilar (grosor y estratificación de piel reducidos) e hiperpigmenta-

ción cutánea. Cabe resaltar también la aparición de lesiones displásicas en epitelios del paladar, del esófago, del estómago no glandular, de la lengua y de la piel. Estas patologías están asociadas al daño en el DNA instigado por la disfuncionalidad telomérica, que induce la activación de las rutas de p53/p21 y p16, que resulta en una parada del ciclo celular *in vivo*. Esta parada en el ciclo celular se manifiesta en una dramática alteración en las propiedades de troncalidad de las células madre epiteliales. Así, el desarrollo morfológico de los folículos pilosos y de las glándulas sebáceas se encuentra totalmente impedido (23).

#### 6.1.2. *Efecto de la abrogación de p53 en los ratones deficientes en TRF1*

Hemos generado ratones que además de ser deficientes en TRF1 carecen de p53, los ratones p53<sup>-/-</sup>/TRF1<sup>ΔΔ</sup>K5-Cre. En éstos, la abrogación de p53 rescata la supervivencia perinatal (los p53<sup>-/-</sup>/TRF1<sup>ΔΔ</sup>K5-Cre alcanzan los cuatro meses de edad), y la funcionalidad de las células madre de la epidermis, pues en los ratones p53<sup>-/-</sup>/TRF1<sup>ΔΔ</sup>K5-Cre crece el pelo y se pierde la hiperpigmentación cutánea (23).

La deficiencia en p53, sin embargo, produce anormalidades epiteliales como la distrofia de uñas y la leucoplaquia oral, que son similares a ciertas patologías características de enfermedades humanas asociadas con mutaciones en componentes de la «shelterina» y/o la telomerasa.

La carencia de p53 también conduce en los ratones p53<sup>-/-</sup>/TRF1<sup>ΔΔ</sup>K5-Cre al desarrollo de carcinomas de células escamosas espontáneos, lo que demuestra que TRF1 actúa como un supresor de tumores mediante la prevención de la inestabilidad genómica.

Nuestros resultados demuestran que la disfuncionalidad de una única proteína telomérica es suficiente para producir un daño telomérico severo y una pérdida de la protección telomérica en ausencia de acortamiento telomérico resultante en un envejecimiento tisular prematuro, la adquisición de aberraciones cromosómicas y el desarrollo de lesiones neoplásicas.

## 6.2. Relevancia de los modelos de ratón deficientes en los componentes de «shelterina»

El modelo anterior es de relevancia porque constituye el primer modelo murino para el envejecimiento inducido por disfunción telomérica en ausencia de un acortamiento telomérico crítico. Este modelo muestra que la desprotección del telómero y una fragilidad telomérica incrementada tienen un impacto en cáncer y envejecimiento en ausencia de acortamiento telomérico. Sugiere también una nueva clase de «telopatías» inducidas por la disfuncionalidad telomérica en presencia de telómeros largos.

En el futuro será de especial interés y relevancia el estudio de la reprogramación en CMPi a partir de células diferenciadas que carecen de alguno de los componentes del complejo de «shelterina». La generación de quimeras a partir de estas CMPi permitirá profundizar en la elucidación de los mecanismos moleculares subyacentes al proceso de reprogramación nuclear.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. de Lange, T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 19: 2100-2110.
2. Blasco, M. A. (2007) The Epigenetic Regulation of Mammalian Telomeres. *Nature Reviews Genetics.* 8: 299-309.
3. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. (1985) Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts. *Cell.* 43: 405-413.
4. Blasco, M. A. (2005) Telomeres and human disease: aging, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics.* 6: 611-622.
5. Armanios, M. Y.; Chen, J. J.; Cogan, J. D.; Alder, J. K.; Ingersoll, R. G.; Markin, C.; Lawson, W. E.; Xie, M.; Vulto, I.; Phillips, J. A. 3rd, Lansdorp, P. M.; Greider, C. W. & Loyd, J. E. (2007) Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 356: 1317-1326.
6. Mitchell, J. R.; Wood, E. & Collins, K. (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature.* 402: 551-555.
7. Tsakiri, K. D.; Cronkhite, J. T.; Kuan, P. J.; Xing, C.; Raghu, G.; Weissler, J. C.; Rosenblatt, R. L.; Shay, J. W. & Garcia, C. K. (2007) Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 7552-7557.
8. Vulliamy, T.; Marrone, A.; Goldman, F.; Dearlove, A.; Bessler, M.; Mason, P. J. & Dokal, I. (2001) The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature.* 413: 432-435.

9. Blasco, M. A.; Funk, W.; Villaponteau, B. & Greider, C. W. (1995) Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA component. *Science*. 269: 1267-1270.
10. Blasco, M. A.; Lee, H.-W.; Hande, P.; Samper, E.; Lansdorp, P.; DePinho, R. A. & Greider, C. W. (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. 91: 25-34.
11. Lee, H.-W.; Blasco, M. A.; Gottlieb, G. J.; Greider, C. W. & DePinho, R. A. (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*. 392: 569-574.
12. Herrera, E.; Samper, E. & Blasco, M. A. (1999) Telomere shortening in mTR<sup>-/-</sup> embryos is associated with a failure to close the neural tube. *EMBO J*. 18: 1172-1181.
13. González-Suárez, E.; Samper, E.; Flores, J. M. & Blasco, M. A. (2000) Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nature Genetics*. 26: 114-117.
14. Flores, I.; Cayuela, M. L. & Blasco, M. A. (2005) Effects of Telomerase and Telomere Length on Epidermal Stem Cell Behavior. *Science*. 309: 1253-1256.
15. Flores, I. & Blasco, M. A. (2009) A p53-dependent response limits epidermal stem cell functionality and organismal size in mice with short telomeres. *PLoS One*. 4(3): e4934.
16. Serrano, M. & Blasco, M. A. (2007). Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 715-722.
17. Tomás-Loba, A.; Flores, I.; Fernández-Marcos, P.; Cayuela, M. L.; Maraver, A.; Tejera, A.; Borrás, C.; Matheu, A.; Klatt, P.; Flores, J. M.; Viña, J.; Serrano, M. & Blasco, M. A. (2008) Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer resistant mice. *Cell*. 35: 609-622.
18. Campbell, K. H.; McWhir, J.; Ritchie, W. A. & Wilmut, I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. 380: 64-66.
19. Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663-676.
20. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K. & Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131: 861-872.
21. Marión, R. M.; Strati, K.; Li, H.; Tejera, A.; Schoeftner, S.; Ortega, S.; Serrano, M. & Blasco, M. A. (2009) Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 4: 141-154.
22. Marión, R. M.; Strati, K.; Li, H.; Murga, M.; Blanco, R.; Ortega, S.; Fernández-Capetillo, O.; Serrano, M. & Blasco, M. A. (2009) A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*. 460: 1149-1153.
23. Martínez, P.; Thanasoula, M.; Muñoz, P.; Liao, C.; Tejera, A.; McNeese, C.; Flores, J. M.; Fernández-Capetillo, O.; Tarsounas, M. & Blasco, M. A. (2009) Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev*. 23: 2060-2075.

24. Sfeir, A.; Kosiyatrakul, S. T.; Hockemeyer, D.; MacRae, S. L.; Karlseder, J.; Schildkraut, C. L. & de Lange, T. (2009) Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell*. 138: 90-103.

\* **Información de contacto:**

Dra. María A. Blasco.

Jefa de Grupo de Telómeros y Telomerasa.

Directora del Programa de Oncología Molecular.

Vicedirectora de Investigación Básica.

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

C/ Melchor Fernández Almagro, 3. 28029 Madrid.

e-mail: [mblasco@cniio.es](mailto:mblasco@cniio.es)

## **Nobel de Química 2009: estructura atómica de la maquinaria celular para sintetizar proteínas**

**Carlos Fernández Tornero \***

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

### **RESUMEN**

El Premio Nobel de Química de 2009 ha sido otorgado a Venkattraman Ramakrishnan (MRC Laboratory of Molecular Biology, Reino Unido), Thomas Steitz (Yale University, Estados Unidos) y Ada Yonath (Weizmann Institute of Science, Israel) por sus estudios sobre la estructura y función del ribosoma, la máquina macromolecular que lleva a cabo la síntesis de proteínas dentro de la célula. Los científicos, en un extraordinario esfuerzo de más de veinte años, aplicaron la cristalografía de rayos X para determinar la estructura atómica de este enorme complejo macromolecular, de forma aislada y en asociación con los principales componentes que intervienen en el proceso de síntesis proteica. Los modelos resultantes han sido esenciales para entender los mecanismos que subyacen a dicho proceso, en particular cómo el ribosoma es capaz de descifrar el ARN de mensajero (que porta la información genética contenida en el ADN), cómo procede la catálisis del enlace peptídico, y el modo en que varios antibióticos nos defienden de las infecciones bacterianas.

**Palabras clave:** Ribosoma; Traducción; Síntesis de proteínas; Cristalografía de rayos X; Antibióticos.

## ABSTRACT

### **Nobel Prize in Chemistry 2009: atomic structure of the cellular machinery for protein synthesis**

The 2009 Nobel Prize in Chemistry has been awarded to Venkatraman Ramakrishnan (MRC Laboratory of Molecular Biology, United Kingdom), Thomas Steitz (Yale University, United States) and Ada Yonath (Weizmann Institute of Science, Israel) for their studies in the structure and function of the ribosome, a macromolecular machine that carries out protein synthesis within the cell. The scientists, in an incredible *tour de force* that took over twenty years, applied X-ray crystallography in order to determine the atomic structure of this large macromolecular complex, alone and in association with the major components in the protein synthesis process. The resulting models have been essential to understand the mechanisms underlying this process, in particular how the ribosome is able to decode messenger RNA (which carries the genetic information stored in DNA), how peptide bond catalysis proceeds, and the way in which several antibiotics protect us from bacterial infections.

**Keywords:** Ribosome; Translation; Protein synthesis; X-ray crystallography; Antibiotics.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ribosoma es sin duda uno de los complejos macromoleculares más importantes de la célula. Junto con la ARN polimerasa, otra máquina macromolecular esencial para la vida, lleva a cabo el paso de la información genética contenida en el ADN hasta las proteínas, que son las encargadas de realizar las diferentes funciones celulares. Este proceso de transferencia de información que, dada su relevancia, es conocido como Dogma Central de la Biología Molecular (1), ocurre en dos etapas. En la primera, la ARN polimerasa transcribe el mensaje genético contenido en la doble cadena de ADN a una molécula similar pero de cadena sencilla denominada ARN mensajero (ARNm). Durante la segunda, el ribosoma traduce la informa-

ción contenida en el ARNm a proteínas, mediante polimerización de los aminoácidos a través de la catálisis del enlace peptídico.

Hace tan sólo tres años, Roger Kornberg, hijo de otro eminente científico que compartiera el Premio Nobel de Medicina con Severo Ochoa en 1959, fue galardonado con el Nobel de Química por la determinación de la estructura atómica del primer componente del dogma, la ARN polimerasa II de *Saccharomyces cerevisiae*, empleando la técnica de cristalografía de rayos X. Con el Nobel de este año, otorgado a Venkatraman Ramakrishnan, Thomas Steitz y Ada Yonath por la determinación de la estructura atómica del ribosoma bacteriano mediante la misma técnica, se cierra una de las páginas más apasionantes de la investigación en el campo de la Biología Molecular.

## **2. LA CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X ES UN MÉTODO ESENCIAL PARA LA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS MACROMOLÉCULAS**

La cristalografía de rayos X permite determinar la disposición espacial de los átomos dentro de un cristal. De manera esquemática consta de tres etapas fundamentales. La primera, también a menudo la más complicada, consiste en la obtención de un cristal tridimensional. Resulta esencial que los cristales posean un elevado grado de orden interno, pues esto determina que la estructura final tenga un nivel de detalle máximo, la llamada resolución atómica, que está por debajo de unos 3,5 ångströms (Å). En la segunda el cristal es expuesto a un haz de rayos X, lo que produce imágenes de difracción. La tercera consiste básicamente en una serie de cálculos matemáticos que permiten determinar, a partir de dichas imágenes, la estructura atómica del cristal.

Su aplicación al estudio de las macromoléculas data de los años cincuenta, cuando hizo posible determinar las estructuras atómicas del ADN (2) y de algunas proteínas globulares (3, 4). En 1962 ambos trabajos fueron reconocidos con sendos Premios Nobel, en Medicina y Química, respectivamente. Desde entonces se han determinado varias decenas de miles de estructuras macromoleculares mediante la aplicación de esta técnica. En algunos casos, como el centro de reacción fotosintético, la ATPasa, los canales iónicos o la ya mencio-

nada ARN polimerasa, ha merecido la concesión del Premio Nobel de Química al haber hecho posible la comprensión de procesos biológicos clave.

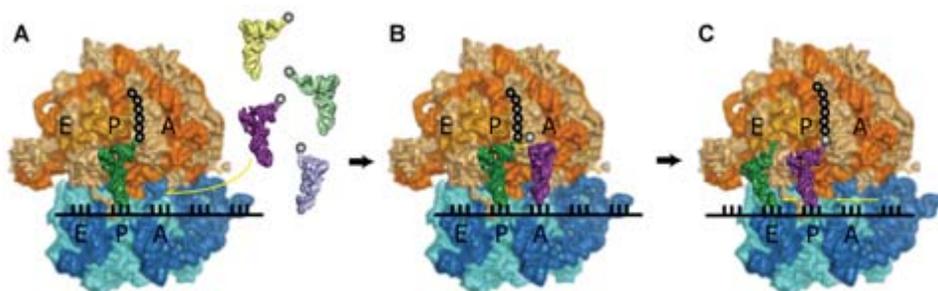
La relevancia de la cristalografía de rayos X radica en que produce fotografías tridimensionales al más alto grado de detalle (la resolución atómica) de una determinada macromolécula. Esto permite integrar toda la información bioquímica conocida hasta entonces en una distribución espacial, ayudando así a comprender mejor la función de dicha macromolécula. En el caso además de que se trate de un estudio con interés biomédico, las estructuras atómicas pueden servir de base para el diseño racional de compuestos orgánicos capaces de modificar su actividad y que, en ocasiones, terminan por convertirse en fármacos eficaces contra una determinada enfermedad.

### **3. EL RIBOSOMA ES UNA MÁQUINA NANOSCÓPICA PARA SINTETIZAR PROTEÍNAS**

El ribosoma es una ribonucleoproteína de gran tamaño, con una masa que alcanza los 2,5 MDa en el caso de las bacterias y unos 4 MDa en las células eucarióticas. Consta de dos subunidades de tamaño diferente que poseen funciones distintas, correspondiendo la catálisis del enlace peptídico a la más grande y la descodificación del código contenido en el ARNm a la pequeña. En las bacterias, la subunidad grande (que recibe el nombre de 50S) consta de unas 30 proteínas y de dos cadenas de ARN ribosómico (ARNr) que comprenden unos 3.000 nucleótidos, mientras que la pequeña (llamada 30S) contiene una sola cadena de ARNr de unos 1.500 nucleótidos y unas 20 proteínas. El ribosoma bacteriano completo se conoce con el nombre de 70S.

Para sintetizar las proteínas, el ribosoma se basa en el molde que le proporciona la ARN polimerasa durante la etapa de transcripción, es decir, el ARNm. Se trata de una molécula lineal compuesta por nucleótidos que sólo pueden ser leídos por el ribosoma en grupos de tres, denominados codones (Figura 1). Los sustratos que emplea el ribosoma son los ARN de transferencia (ARNt), moléculas en forma de L que portan los aminoácidos individuales en uno de sus ex-

tremos y, en el otro, contienen una secuencia de tres nucleótidos complementarios a los codones, llamada anticodón. La secuencia de nucleótidos del anticodón determina el aminoácido que es transportado por un determinado ARNt. El ribosoma presenta tres sitios de unión diferentes para los ARNt. El sitio P (o del peptidilo) aloja al ARNt que porta la cadena polipeptídica en curso de síntesis. El sitio A (o del aminoacilo) recibe al ARNt que trae el nuevo aminoácido para ser incorporado a la cadena polipeptídica tras la catálisis. El sitio E (o de salida) alojará al ARNt vacío que se genera tras cada ciclo de catálisis.



**Figura 1. Las tres etapas fundamentales del proceso de elongación: descodificación (A), catálisis (B) y traslocación (C).** El ribosoma está representado con las subunidades 50S y 30S en naranja y azul, respectivamente (en ambos casos el ARNr se ha coloreado más claro y las proteínas más oscuras). El ARNm se muestra como una línea recta negra, y sus nucleótidos se han apilado artificialmente en grupos de tres para destacar los codones. Los aminoácidos aparecen como círculos grises, bien unidos directamente a un extremo de los ARNt (moléculas con forma de L) o bien formando la cadena polipeptídica. Las flechas amarillas indican los movimientos más importantes que ocurren en cada una de las etapas (selección del ARNt correcto, transferencia del peptidilo y deslizamiento del molde y los sustratos).

Se pueden distinguir tres etapas fundamentales en la síntesis proteica: iniciación, en la que se ensamblan las dos subunidades del ribosoma con el ARNm y el primer ARNt; elongación, en la que se produce la polimerización de la cadena polipeptídica; y terminación, en la que se libera la proteína recién sintetizada y se reciclan los componentes del ribosoma. La elongación es un proceso repetitivo en el que cada ciclo, que corresponde a la adición de un aminoácido, consta a su vez de tres pasos (Figura 1). El primero, conocido con

el nombre de descodificación del ARNm, se lleva a cabo en la subunidad 30S y consiste en la elección del ARNt correcto entre los muchos posibles, por apareamiento de su anticodón con el codón colocado en el sitio A. El segundo es la catálisis del enlace peptídico, que ocurre en la subunidad 50S y conlleva la transferencia del peptidilo desde el ARNt del sitio P al ARNt del sitio A. El tercero es la traslocación de los sustratos y el molde a lo largo del ribosoma, por la que el ARNt vacío del sitio P pasa al sitio E, el ARNt del sitio A que ahora porta la cadena polipeptídica pasa al sitio P, y un nuevo codón entra en el sitio A, quedando preparado para un nuevo ciclo de adición de aminoácido.

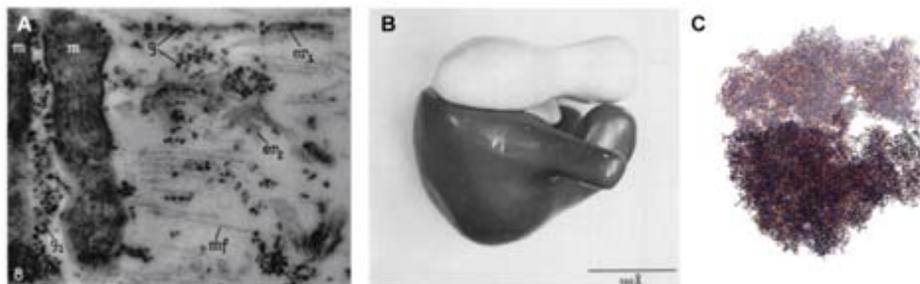
#### **4. UNA CIERTA PERSPECTIVA HISTÓRICA**

La secuencia de acontecimientos que han desembocado en la concesión del Premio Nobel de Química de este año no es sólo interesante en sí misma, sino que también nos ayuda a comprender la evolución de la cristalografía de rayos X durante los últimos cincuenta años y su impacto en el campo de la Biología Molecular.

Los ribosomas fueron visualizados por primera vez a mediados de los cincuenta por Palade (5) utilizando la técnica de microscopía electrónica (ME) sobre células enteras sombreadas con tinción negativa (Figura 2A), por lo que recibió el Premio Nobel de Medicina en 1974.

Los avances técnicos en ME y el desarrollo de métodos computacionales de proyección inversa permitieron a Lake conseguir la primera estructura tridimensional del ribosoma bacteriano años más tarde (6). Esta estructura fue obtenida a partir de reconstrucciones independientes de cada subunidad del ribosoma, seguida de una composición del ribosoma completo a partir de ellas. Aunque la resolución era todavía muy limitada, sí que resultaba posible distinguir ciertos detalles en ambas subunidades (Figura 2B).

Fue en esa misma década cuando se iniciaron los primeros trabajos encaminados a la obtención de la estructura atómica del ribosoma. Al tratarse de un ensamblaje macromolecular de gran tamaño y sin simetría, no estaba claro si sería posible conseguir cristales tridimensionales que difractaran a alta resolución. Este primer esco-



**Figura 2. Evolución histórica de la caracterización estructural del ribosoma.**

**A)** Primera imagen de ME de tinción negativa de los ribosomas, que se observan como puntos negros dentro de la célula (extraída de la referencia 5). **B)** Primera estructura tridimensional del ribosoma bacteriano obtenida mediante ME, con subunidades las 50S y 30S coloreadas en negro y blanco, respectivamente (extraída de la referencia 6). **C)** Estructura atómica del ribosoma bacteriano a 2.8 Å de resolución obtenida mediante cristalografía de rayos X (7) a una escala similar a B). Los átomos de N, O y S aparecen en azul, rojo y verde, respectivamente, mientras que los de C se han coloreado en negro para la subunidad 50S y gris claro para 30S.

llo fue salvado por el laboratorio de Yonath durante la década de los ochenta, logrando producir cristales de calidad creciente de las subunidades 50S y 30S, que a principios de los años noventa ya difractaban a resolución atómica. Además, este grupo consiguió en la misma época obtener cristales del ribosoma bacteriano completo, aunque todavía con capacidad de difracción limitada (8).

Sin embargo, hubo que esperar casi otra década para que el desarrollo de métodos avanzados de colección de datos de difracción y de determinación estructural (ver más arriba) permitiera obtener la estructura atómica de ambas subunidades de forma aislada. En primer lugar se determinó la estructura atómica de 50S de la arqueobacteria *Haloarcola marismuorti* en el equipo de Steitz, mediante un laborioso proceso de cálculo de las fases a resoluciones crecientes hasta llegar a la estructura atómica (9). Ese mismo año y de forma independiente, los laboratorios de Ramakrishnan y Yonath obtuvieron la estructura de la subunidad 30S de la bacteria *Thermus thermophilus* (10, 11). El año siguiente, Yonath determinó la estructura atómica de 50S de la eubacteria *Deinococcus radiodurans*, que ha resultado crucial para el estudio del mecanismo de acción de algunos antibióticos (12).

La estructura del ribosoma bacteriano completo, aunque a resolución intermedia, fue determinada por primera vez en 2001 en el laboratorio de Harry Noller, científico que de no estar limitado el reparto del Nobel a tres personas habría sin duda pertenecido al grupo de galardonados (13). Fue precisamente un investigador formado en su laboratorio quien cuatro años más tarde obtuviese por fin la estructura atómica de 70S vacío (14), es decir, en ausencia de molde y sustratos. El equipo de Ramakrishnan cristalizó y determinó la estructura atómica del ribosoma de *Thermus thermophilus* en presencia de ARNm y ARNt a una resolución de 2,8 Å (7), que representa la descripción más completa y detallada de que disponemos de esta enorme máquina macromolecular (Figura 2C).

## **5. LO QUE LAS ESTRUCTURAS ATÓMICAS NOS HAN DESVELADO SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIBOSOMA**

### **5.1. Descodificación del ARN mensajero**

Durante el proceso de iniciación, la acción coordinada de tres proteínas independientes llamadas factores de iniciación permite el ensamblaje de los cuatro componentes necesarios para comenzar el proceso de traducción. En primer lugar, el ARNm se une a la subunidad 30S por apareamiento de la secuencia Shine-Dalgarno, con lo que el primer codón (AUG) queda posicionado en el sitio P de dicha subunidad. Entonces los factores de iniciación colocan el primer ARNt, que porta siempre el aminoácido formil-metionina, de forma que su anticodón aparece con el codón de iniciación en el sitio P. Por último, se acopla la subunidad 50S y se liberan los factores de iniciación, quedando el ribosoma listo para comenzar la fase de elongación de la cadena polipeptídica.

En ese punto el segundo codón del ARNm se encuentra en el sitio A de la subunidad 30S. El ribosoma debe entonces tener la capacidad de seleccionar el ARNt adecuado, es decir, el que posee un anticodón complementario al codón en el sitio A, para que el siguiente aminoácido añadido a la cadena polipeptídica sea el correcto. Si este proceso, conocido con el nombre de descodificación, no fuera realizado con alta fidelidad, las proteínas producidas po-

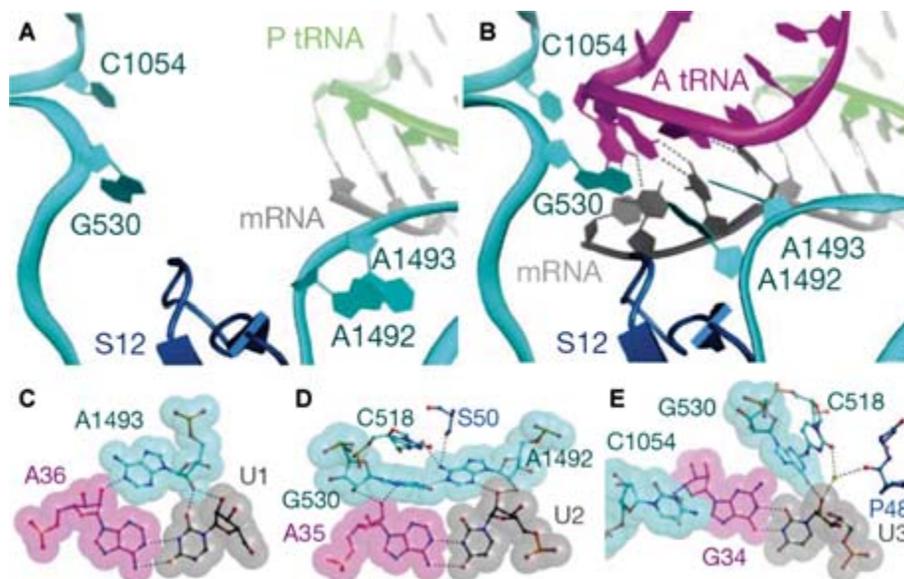
drían contener mutaciones, lo que tendría graves consecuencias para la vida de la célula. El problema dista de resultar sencillo, pues existen unos 50 ARNt diferentes en la célula bacteriana, que portan los 20 aminoácidos distintos que constituyen las proteínas.

Las estructuras atómicas de la subunidad 30S con el sitio A vacío y ocupado por un ARNt correctamente apareado con el ARNm, determinadas en el grupo de Ramakrishnan, han mostrado cómo se produce el proceso de descodificación (15). Al comparar ambas estructuras (Figura 3A-B) se observa que tres bases nitrogenadas del ARNr de 30S, concretamente G530, A1492 y A1493, cambian drásticamente su conformación cuando el ARNt correcto aparece con el codón situado en el sitio A de la subunidad 30S. Sólo en este caso, es decir, cuando se han formado los puentes de hidrógeno Watson-Crick entre los nucleótidos de codón y anticodón, las tres bases anteriores crean una nueva red de puentes de hidrógeno que de alguna manera fijan al ARNt en el sitio A y no le permiten disociarse del ribosoma. Dicha red se ve reforzada, aunque su contribución sea menor, por tres residuos de la proteína S12.

Cabe destacar que los puentes de hidrógeno formados en las posiciones 1 y 2 del par codón/anticodón dependen exclusivamente de que se produzca un apareamiento correcto en los nucleótidos de estas posiciones, mientras que los puentes de hidrógeno establecidos en posición 3 permiten una cierta incorrección en el apareamiento (Figura 3C-E). Esto explica de manera simple el conocido hecho de la redundancia del código genético, por el que 20 aminoácidos están conjugados con unos 50 ARNt diferentes.

Cuando el ARNt que llega al sitio A no es el correcto, la red de puentes de hidrógeno creada por G530, A1492 y A1493 no puede formarse, y por tanto, dicho ARNt no quedará fijado y se disociará fácilmente del ribosoma. Por tanto, el simple cambio conformacional de tres bases nitrogenadas (y otros tantos residuos en la proteína S12) constituye el fundamento que permite la fidelidad del ribosoma, hecho sorprendente si se tiene en cuenta que este complejo macromolecular está compuesto por unos 4.500 nucleótidos y alrededor de 50 proteínas.

La secuencia de acontecimientos que siguen al proceso de descodificación ha sido minuciosamente descrita en un reciente trabajo



**Figura 3. Proceso de descodificación. A-B)** Las tres bases descodificadoras A1492, A1493 y G530 cambian drásticamente su conformación al unirse el aminoacil-ARNt correcto en el sitio A. El ARNr está coloreado en azul claro, la proteína S12 en azul oscuro, el ARNm en gris, el peptidil-ARNt del sitio P en verde y el aminoacil-ARNt en morado. **C-E)** Red de puentes de hidrógeno (representados con líneas de puntos) que se establece entre el par codón/anticodón y las bases descodificadoras de la subunidad 30S, que es más estricta en los casos de las posiciones 1 y 2 (C, D) que en el caso de la posición 3 (E). Figura extraída de Schmeing & Ramakrishnan (16), a lo que se debe la nomenclatura en inglés.

(aparecido el mismo mes en el que se anunció la concesión del Nobel) del laboratorio de Ramakrishnan (17). El ARNt, que llega al ribosoma en un complejo ternario con el factor de elongación EF-Tu y una molécula de GTP, sufre una distorsión en su estructura al quedar fijado por las tres bases nitrogenadas descodificadoras. Esto provoca un importante cambio conformacional en EF-Tu que conduce a la hidrólisis de la molécula de GTP, con lo que EF-Tu se separa del ribosoma. El ARNt, liberado entonces de la distorsión provocada durante la descodificación, recupera su estructura de mínima energía de forma espontánea. Como consecuencia de dicho proceso, que se conoce con el nombre de *acomodación*, su extremo aminoacil pasa a ocupar el sitio A de 50S en el sitio activo del ribosoma, quedando así preparado para la catálisis.

## 5.2. Catálisis del enlace peptídico

La formación del enlace peptídico, una de las reacciones más importantes de la Biología Molecular, ocurre en el sitio activo del ribosoma y permite añadir un aminoácido a la cadena polipeptídica que se está sintetizando para dar lugar a una proteína. La reacción consiste en un ataque nucleofílico del átomo de N en el grupo amino libre del aminoácido que porta el ARNt del sitio A, sobre el átomo de C del grupo carbonilo del último aminoácido de la cadena polipeptídica que está conjugado mediante enlace éster con el ARNt del sitio P. Como consecuencia, la cadena polipeptídica (o peptidilo) pasa del ARNt del sitio P al del sitio A, alargándose en un aminoácido y quedando el primer ARNt vacío.

Aunque el fundamento químico de la reacción se conocía desde los años setenta, el papel catalítico del ribosoma, que en la célula permite llevar a cabo dicha reacción a una velocidad aproximada de 20 aminoácidos por segundo, era un misterio. Entre otros, el debate se centraba en si su poder catalítico residía en su ARNr, lo que implicaría que se trata de una ribozima y, por tanto, sustentaría la hipótesis de la existencia de un mundo del ARN previo al mundo de las proteínas que conocemos en la actualidad.

Las estructuras atómicas de la subunidad 50S vacía y en complejo con diversos análogos de los sustratos, intermedios y productos de reacción obtenidas en el laboratorio de Steitz han permitido comprender cómo ocurre la catálisis del enlace peptídico con un elevado nivel de detalle (18-20). La reacción se lleva a cabo en el llamado Centro de Transferencia del Peptidilo (PTC, en sus siglas inglesas), que se encuentra en el corazón de la subunidad 50S, protegido del disolvente por la subunidad 30S, y en donde existen dos surcos que corresponden con los sitios A y P (Figura 4A-B). Los últimos tres nucleótidos de los ARNt (un triplete que siempre es CCA) son reconocidos por nucleótidos complementarios del ARNr de 50S, con los que aparean. Esto provoca un cambio conformacional en 50S que coloca los sustratos en una posición óptima para el ataque nucleofílico (Figura 4C).

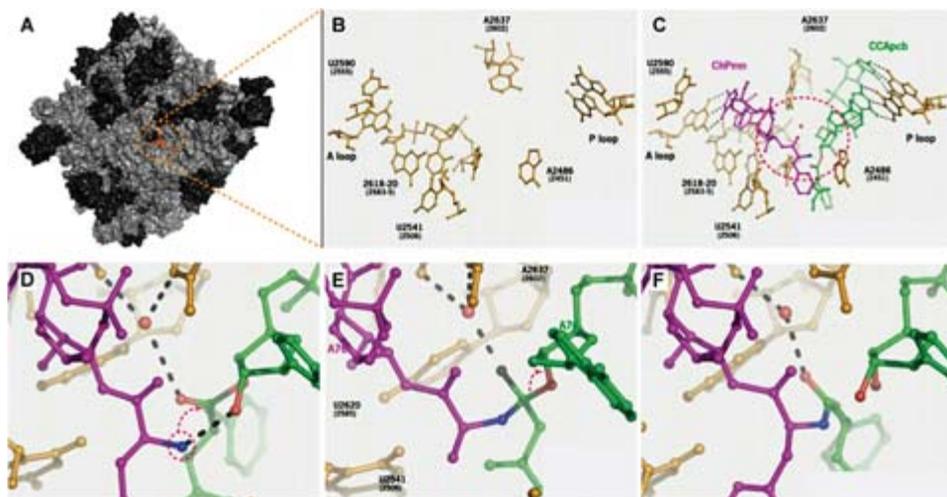
El átomo de N en el grupo amino libre del aminoácido que porta el ARNt del sitio A (en morado) es parcialmente desprotonado por

el grupo hidroxilo en posición 2' del último nucleótido del ARNt en el sitio P (en verde), quedando así con una cierta carga negativa que lo convierte en nucleófilo. A su vez, una molécula de agua colocada en un lugar estratégico por el ARNr de 50S, de manera indirecta, empobrece en electrones el átomo de C del grupo carbonilo del último aminoácido de la cadena polipeptídica que está conjugado mediante enlace éster con el ARNt del sitio P, convirtiéndolo en un electrófilo (Figura 4D). El ataque propiamente dicho, se produce entonces de forma espontánea (Figura 4E), dando lugar a la transferencia de la cadena polipeptídica del ARNt del sitio P al del sitio A y quedando el primero vacío (Figura 4F).

Estos resultados, combinados con diversos estudios enzimáticos (21), han permitido concluir que la principal fuerza catalítica del ribosoma es la colocación de los sustratos en una posición y orientación idóneas para que se produzca la reacción, no participando de modo directo en la catálisis. Esto, unido al reciente trabajo del laboratorio de Ramakrishnan en el que se demuestra la participación de ciertos residuos de las proteínas L12 y L16 en el posicionamiento de los ARNt (22), sugiere que la idea de que el ribosoma es una ribozima debe ser tomada con cautela.

La siguiente etapa es la traslocación del molde (ARNm) y los ARNt en los sitios P y A a lo largo del ribosoma, pasando a ocupar éstos los sitios E y P, respectivamente, y quedando el nuevo codón preparado para comenzar un nuevo ciclo de adición de aminoácido a la cadena polipeptídica. Un reciente trabajo (aparecido el mismo mes en el que se anunció la concesión del Premio Nobel) del laboratorio de Ramakrishnan (23) explica el mecanismo de este proceso, que ocurre con la ayuda del factor de elongación EF-G y liberación de energía.

La repetición de los tres pasos que constituyen la elongación (descodificación, catálisis del enlace peptídico y traslocación) tiene como consecuencia la formación de la cadena polipeptídica. Dicha cadena debe atravesar un túnel de salida que recorre de parte a parte la subunidad 50S y que tiene forma tubular, por lo que no es posible el plegamiento de la proteína en su interior (9). Sin embargo este túnel posee propiedades dinámicas para el control del avance de la cadena polipeptídica y, por tanto, interviene en el control del proceso de traducción (24).



**Figura 4. Serie de estructuras que explican la catálisis del enlace peptídico.** **A)** Subunidad 50S que muestra la localización del PTC, en naranja, en el fondo de un túnel en dicha subunidad, coloreada en gris para el ARNr y negro para las proteínas. **B)** Detalle del PTC vacío con los nucleótidos más importantes en modelo de varillas. Se distinguen dos surcos que corresponden a los sitios de unión A (izquierda) y P (derecha) de los ARNt. **C)** Estructura de 50S con los análogos de los sustratos aminoacil-ARNt (morado) y peptidil-ARNt (verde) posicionados en la orientación adecuada para que se lleve a cabo el ataque nucleofílico. **D)** Detalle del área rodeada por una línea de puntos roja en el panel anterior (C). Se destacan el nucleófilo con un círculo rojo y los puentes de hidrógeno que asisten la catálisis mediante líneas punteadas negras. El ataque nucleofílico se simboliza con una flecha roja. **E)** Estructura de 50S en complejo con un análogo del intermediario de la reacción. **F)** Estructura de 50S en complejo con un análogo del producto de la catálisis. Los paneles B-F han sido extraídos de un video preparado en el laboratorio de Steitz ([http://www.youtube.com/watch?v=OaQan400K\\_Q](http://www.youtube.com/watch?v=OaQan400K_Q)).

### 5.3. Terminación

La elongación de la cadena polipeptídica continúa hasta que un codón de terminación alcanza el sitio A en la subunidad 30S. El codon de terminación es reconocido por un factor de terminación de clase I (RF1 o RF2), que se une al ribosoma en conformación extendida como han mostrado las estructuras cristalográficas obtenidas en los laboratorios de Noller y Ramakrishnan (25, 26). En dicha conformación, el motivo de tres aminoácidos conservados (GGQ) se inserta en el sitio activo del ribosoma y lleva a cabo la catálisis de

liberación del peptidilo. Tras la unión del RF, una base nitrogenada del ARNr de 50S que en otras condiciones protege el enlace éster entre el peptidilo y el ARNt del sitio P se desplaza exponiendo dicho enlace. La glutamina del motivo conservado en el RF participa de algún modo en el ataque nucleofílico que conduce a la liberación del polipéptido del ribosoma. Otros factores de terminación (RF3 y RRF) participan en el reciclado de los componentes de la maquinaria de traducción antes de que pueda llevarse a cabo la síntesis de una nueva molécula de proteína.

#### 5.4. Mecanismo de acción de los antibióticos

Por último, las estructuras cristalográficas han conseguido explicar el bloqueo de la función del ribosoma que realizan diversos antibióticos. Aproximadamente la mitad de los antibióticos empleados hoy día en el tratamiento de infecciones bacterianas tienen como diana el ribosoma. Sin embargo, debido principalmente a la presión selectiva impuesta por su uso inadecuado, la resistencia a la mayoría de ellos está adquiriendo proporciones preocupantes. Por esta razón, las estructuras atómicas del complejo entre el ribosoma y los distintos antibióticos constituyen una excelente base para el diseño racional de nuevos antibióticos.

Más de una docena de antibióticos han sido cristalizados en complejo con el ribosoma y, en general, puede decirse que tienen como diana los puntos esenciales en donde se realizan las diversas actividades individuales que constituyen la traducción. En la subunidad 30S cabe destacar los aminoácidos que interfieren con el proceso de descodificación (como los aminoglicósidos), mientras que en la subunidad 50S podemos destacar aquéllos que bloquean el sitio activo (como los *anfénicoles* o las pleuromutilinas) y los que bloquean el canal de salida (macrólidos). A continuación se discuten ejemplos de cada uno de estos grupos.

La paromomicina es un antibiótico del grupo de los aminoglicósidos que consiste en una serie de cuatro de anillos de azúcares aminados. La estructura de su complejo con la subunidad 30S muestra que se une al ARNr en una zona que contiene nucleótidos no conservados entre el ribosoma bacteriano y el eucariota, explicando

su selectividad (27). La unión de la paromomicina provoca un desequilibrio en el centro de descodificación de 30S, pues hace que las tres bases descodificadoras (ver más arriba) adopten de forma permanente una conformación prácticamente idéntica a la que tomarían cuando hay un apareamiento codón/anticodón correcto. Esto provoca que el ribosoma no sea capaz de distinguir si el ARNt del sitio A es correcto y, por tanto, que las proteínas sintetizadas incorporen mutaciones, lo que conduce a la muerte celular.

Las pleuromutilinas son un grupo de antibióticos de uso reciente que contienen un anillo de catorce miembros compartiendo un enlace con otro de cinco. Las estructuras de sus complejos con la subunidad 50S de una eubacteria, determinadas en el laboratorio de Yonath (28), demuestran que interaccionan con el sitio activo del ribosoma (PTC) impidiendo la catálisis del enlace peptídico y, por tanto, la síntesis de proteínas. Las pleuromutilinas se unen mediante un mecanismo de *induced-fit* aprovechando la flexibilidad de dos bases conservadas, al mismo tiempo que crean numerosos contactos en los que intervienen nucleótidos lejanos poco conservados, lo que les confiere selectividad hacia el ribosoma bacteriano.

Los macrólidos constituyen un grupo de antibióticos de amplio uso en la actualidad que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de 14 a 16 carbonos. Diversos macrólidos han sido cristalizados en complejo con la subunidad 50S por el grupo de Yonath (revisado en referencia 29). En las estructuras derivadas se observa que todos se unen al canal de salida de la cadena polipeptídica, bloqueando el paso de la misma y por tanto deteniendo la progresión de la síntesis proteica. En el sitio de unión destacan dos residuos de adenina no conservados (en el ARNr eucariota se trata de guanina), que confieren selectividad a estos antibióticos.

En la actualidad, estas y otras estructuras están siendo empleadas con la finalidad de diseñar nuevos fármacos que nos permitan luchar contra las cada vez más difíciles de atacar infecciones bacterianas.

## 6. CONCLUSIÓN: LO QUE AÚN NOS QUEDA POR DESCUBRIR

En este documento he pretendido resumir los hallazgos más importantes que han conducido a la concesión del Premio Nobel de Química en 2009, al habernos desvelado, al nivel de detalle atómico, numerosos misterios acerca de cómo el ribosoma lleva a cabo la síntesis de proteínas. Recomiendo al lector interesado el visionado de un excelente video, preparado en el laboratorio de Ramakrishnan, que integra la mayor parte de la información estructural sobre dicho proceso biológico de que se dispone: [http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/ribo/homepage/movies/translation\\_bacterial.wmv](http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/ribo/homepage/movies/translation_bacterial.wmv).

Sin embargo existen todavía algunas etapas del proceso de traducción, como la iniciación y la terminación, que sería interesante comprender mejor. Además, las estructuras atómicas resueltas hasta el momento corresponden a ribosomas bacterianos, por lo que todas las miradas se dirigen ahora hacia el ribosoma eucariota, más complejo y dinámico. No cabe duda de que la cristalografía de rayos X seguirá constituyendo una herramienta esencial en esta dirección, pero no debemos olvidar que la microscopía electrónica está alcanzando niveles de detalle cada vez más elevados, y hoy día existen ejemplos de estructuras atómicas obtenidas mediante su aplicación. Puesto que esta técnica permite abordar procesos de mayor dinamismo y complejidad, resulta lógico pensar que su combinación con la cristalografía de rayos X nos proporcionará una visión más completa sobre los fascinantes mecanismos que subyacen al proceso de la síntesis proteica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Crick, F. (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature*. 227: 561-563.
2. Watson, J. D. & Crick, F. H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 171: 737-738.
3. Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H. & Phillips, D. C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*. 181: 662-666.
4. Perutz, M. F.; Rossmann, M. G.; Cullis, A. F.; Muirhead, H.; Will, G. & North, A. C. (1960) Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*. 185: 416-422.

5. Palade, G. E. (1955) A small particulate component of the cytoplasm. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1: 59-68.
6. Lake, J. A. (1976) Ribosomal structure determined by electron microscopy of *E. coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *Journal of Molecular Biology*. 105: 131-159.
7. Selmer, M.; Dunham, C. M.; Murphy, F. V. 4th, Weixlbaumer, A.; Petry, S.; Kelley, A. C.; Weir, J. R. & Ramakrishnan V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. 313: 1935-1942.
8. Berkovitch-Yellin, Z.; Bennett, W. S. & Yonath, A. (1992) Aspects in Structural Studies on Ribosomes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 27: 403-444.
9. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 289: 905-920.
10. Wimberly, B. T.; Brodersen, D. E.; Clemons, W. M. Jr.; Morgan-Warren, R. J.; Carter, A. P.; Vonrhein, C.; Hartsch, T. & Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 407: 327-339.
11. Schlutzen, F.; Tocilj, A.; Zarivach, R.; Harms, J.; Gluehmann, M.; Janell, D.; Bashan, A.; Bartels, H.; Agmon, I.; Franceschi, F. & Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell*. 102: 615-623.
12. Harms, J.; Schlutzen, F.; Zarivach, R.; Bashan, A.; Gat, S.; Agmon, I.; Bartels, H.; Franceschi, F. & Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*. 107: 679-688.
13. Yusupov, M. M.; Yusupova, G. Z.; Baucom, A.; Lieberman, K.; Earnest, T. N.; Cate, J. H. & Noller, H. F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*. 292: 883-896.
14. Schuwirth, B. S.; Borovinskaya, M. A.; Hau, C. W.; Zhang, W.; Vila-Sanjurjo, A.; Holton, J. M. & Cate, J. H. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*. 310: 827-834.
15. Ogle, J. M.; Brodersen, D. E.; Clemons, W. M. Jr.; Tarry, M. J.; Carter, A. P. & Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*. 292: 897-902.
16. Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 461: 1234-1242.
17. Schmeing, T. M.; Voorhees, R. M.; Kelley, A. C.; Gao, Y. G.; Murphy, F. V. 4th, Weir, J. R. & Ramakrishnan, V. (2009) The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. *Science*. 326: 688-694.
18. Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 289: 920-930.
19. Hansen, J. L.; Schmeing, T. M.; Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2002) Structural insights into peptide bond formation. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 99: 11670-11675.
20. Schmeing, T. M.; Huang, K. S.; Kitchen, D. E.; Strobel, S. A. & Steitz, T. A. (2005) Structural insights into the roles of water and the 2' hydroxyl of the P site tRNA in the peptidyl transferase reaction. *Molecular Cell*. 20: 437-448.

21. Rodnina, M. V.; Beringer, M. & Wintermeyer, W. (2007) How ribosomes make peptide bonds. *Trends in Biochemical Science*. 32: 20-26.
22. Voorhees, R. M.; Weixlbaumer, A.; Loakes, D.; Kelley, A. C. & Ramakrishnan, V. (2009) Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nature Structural and Molecular Biology*. 16: 528-533.
23. Gao, Y. G.; Selmer, M.; Dunham, C. M.; Weixlbaumer, A.; Kelley, A. C. & Ramakrishnan V. (2009) The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science*. 326: 694-699.
24. Berisio, R.; Schlutzen, F.; Harms, J.; Bashan, A.; Auerbach, T.; Baram, D. & Yonath, A. (2003) Structural insight into the role of the ribosomal tunnel in cellular regulation. *Nature Structural Biology*. 10: 366-370.
25. Laurberg, M.; Asahara, H.; Korostelev, A.; Zhu, J.; Trakhanov, S. & Noller, H. F. (2008) Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature*. 454: 852-857.
26. Weixlbaumer, A.; Jin, H.; Neubauer, C.; Voorhees, R. M.; Petry, S.; Kelley, A. C. & Ramakrishnan, V. (2008) Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome. *Science*. 322, 953-956.
27. Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T. & Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*. 407: 340-348.
28. Davidovich, C.; Bashan, A.; Auerbach-Nevo, T.; Yaggie, R. D.; Gontarek, R. R. & Yonath, A. (2007) Induced-fit tightens pleuromutilins binding to ribosomes and remote interactions enable their selectivity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 104: 4291-4296.
29. Yonath (2005) Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism, and cellular regulation. *Annual Reviews Biochemistry*. 74: 649-679.

\* **Información de contacto:**

Dr. Carlos Fernández Tornero.  
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.  
C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madrid.  
e-mail: [cftornero@cib.csic.es](mailto:cftornero@cib.csic.es)

## Cross-talk between glutamate and nucleotide receptors in cerebellar granule neurons in culture

Elvira Salas<sup>1, 3</sup>, David León Navarro<sup>1, 2</sup>,  
Jesús Sánchez-Nogueiro<sup>1</sup>, Patricia Marín-García<sup>1</sup>,  
María Teresa Miras-Portugal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology IV.  
Faculty of Veterinary. Complutense University of Madrid. Spain.

<sup>2</sup> Biochemistry Area. Chemistry Faculty. Castilla La Mancha University.  
Spain.

<sup>3</sup> Department of Biochemistry. Medicine Faculty. Costa Rica University.  
Costa Rica.

Recibido el 18 de septiembre de 2009.

### ABSTRACT

ATP elicits Ca<sup>2+</sup> transients in cultured cerebellar granule neurons acting through specific ionotropic (P2X) and metabotropic (P2Y) purinergic receptors. In these neurons, application of L-Glutamate (L-Glu) immediately before ATP induced a prolonged reduction of ATP-mediated responses that remains at least 5 minutes after L-Glu wash out. alpha-amino-3-hydro-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid (AMPA), *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and 3,5-dihydroxyphenyl-glycine (DHPG), selective agonists of ionotropic non-NMDA, NMDA and Group I metabotropic glutamate receptors respectively, mimicked Glu-induced attenuating effects. The activity of calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) seems to be involved, at least at long term, because inhibitors of CaMKII, 1-[*N*,*O*-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-*N*-methyl-L-tyrosyl]-4phenylpiperazine

(KN-62) and N-[2-[[[3-(4'-chlorophenyl)-2-propenyl]methylamino]methyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4'-methoxybenzenesulfonamide (KN-93), abolished the inhibitory effect of L-Glu on ATP-mediated responses. However, it is likely that other protein kinases could be involved in the cross-talk process between both groups of receptors at short term. Therefore, these results demonstrate that the activation of glutamate receptors is able to modulate nucleotide responses in cerebellar granule neurons.

**Keywords:** Interaction; P2 receptors; Glutamate Receptors; Calcium-calmodulin-kinase II.

## RESUMEN

### Interacción entre receptores de glutamato y receptores de nucleótidos en neuronas granulares de cerebelo en cultivo

El ATP induce un incremento de  $Ca^{2+}$  en neuronas granulares de cerebelo en cultivo actuando a través de receptores purinérgicos específicos ionotrópicos (P2X) y metabotrópicos (P2Y). En estas neuronas, la aplicación de L-Glutamato (L-Glu) inmediatamente antes del ATP induce una prolongada disminución de las respuestas mediadas por ATP que se mantiene al menos durante cinco minutos tras el lavado del L-Glu. Los agonistas selectivos de los receptores ionotrópicos de glutamato no-NMDA, NMDA y del Grupo I, el ácido alfa-amino-3-hidro-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), el *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y el 3,5-dihidroxifenil-glicina (DHPG), respectivamente, mimetizan los efectos atenuantes inducidos por el glutamato. La actividad de la proteína calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII) parece estar implicada en este proceso, al menos a largo plazo, puesto que los inhibidores de la CaMKII, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4fenilpiperazine (KN-62) y N-[2-[[[3-(4'-clorofenil)-2-propenil]metilamino]metil]fenil]-N-(2-hidroxietyl)-4'-metoxibenzeno-sulfonamida (KN-93), revierten el efecto inhibitorio del L-Glu sobre las respuestas mediadas por ATP. Sin embargo, es probable que puedan estar implicadas otras proteínas quinasa en los procesos de interacción entre ambos grupos de receptores a corto plazo. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la activación de los receptores de

glutamato son capaces de modular las respuestas a nucleótidos en neuronas granulares de cerebelo.

**Palabras clave:** Interacción; Receptores P2; Receptores de Glutamato; Calcio-calmodulina-quinasa II.

## 1. INTRODUCTION

Cerebellar granule neurons have a critical role in cerebellar function coordinating afferent input to and motor output from the cerebellum. Thus, granule cells receive excitatory glutamatergic contacts from mossy fibres and they, in turn, contact synaptically with the dendrites of Purkinje neurons via parallel fibres. Excitatory synaptic transmission between mossy fibres and granule neurons is mediated by L-Glu (1). The actions of L-Glu are mediated by a group of receptors named glutamate receptors which have been subclassified into ionotropic glutamate receptors (NMDA and non NMDA) and metabotropic glutamate receptors that includes Group I, II and III. Cerebellar granule cells express both  $\text{Ca}^{2+}$  permeable NMDA and non-NMDA glutamate receptors (2). Furthermore, group I metabotropic glutamate receptor involved in the glutamate activation of phospholipase C (PLC) and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization have also been described in granule cells growth *in vitro* (3). Recently, we have shown the presence and expression of functional nucleotide receptors in highly purified cultures of cerebellar granule neurons (4-8). The family of nucleotide receptor includes ionotropic receptors, P2X, which form ligand gated cation channels and mediate fast excitatory responses; and metabotropic nucleotide receptors, P2Y, which belong to the G-protein-coupled receptor superfamily (9, 10).

As our understanding of cellular signalling pathways has advanced, it has become increasingly apparent that, far from regulating linear transduction pathways, receptor activation can result in much more complex patterns of signalling within cells. Thus, the activation of neurotransmitter receptors by their own transmitter has been shown to be modulated by distinct receptors when they are also activated by their own transmitter. This mechanism, generally termed cross talk, provides a fast and efficient

way to adapt transmitter signalling to change functional needs. Previous works have shown a close interaction between nucleotidic receptors and acetylcholine (ACh) nicotinic receptors or GABA receptors (11-14), which was paralleled by a co-release of ATP and ACh or GABA from central terminals and spinal cord (15, 16). Co-release of ATP with L-Glu from nerve terminals (17), raised the possibility of interaction between glutamate and nucleotide receptors. This was further supported by double immunofluorescence experiments with confocal laser microscopy which revealed co-localization at the membrane level between the P2Y<sub>4</sub> and NMDA receptors, in both homologous (cerebellar granule neurons) and heterologous (HEK-293) cellular systems (18).

In the present work we have analyzed the possible cross-talk mechanism between glutamate and nucleotide receptors. Results obtained suggest that L-Glu evoked a prolonged depression of subsequent ATP-evoked calcium rises in granule neurons in a process in which calcium-calmodulin dependent protein kinase II seems to be involved.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Cerebellar granule neurons in culture**

All experiments carried out at the Universidad Complutense of Madrid followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

Cerebellar cultures from three Wistar rat pups (7 days old) were prepared following procedures described previously (19).

### **2.2. Calcium imaging**

9 days *in vitro* (div) cerebellar granule neurons attached to glass coverslips were washed, under normal K<sup>+</sup> conditions, with Locke's solution (in mM: NaCl, 140; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; glucose, 5.5; HEPES, 10; pH 7.4) and loaded with 7.5 μM Fura-2 AM (Molecular Probes; Eugene, OR, USA) for 45 min

at 37° C. The coverslip was placed in a small superfusion chamber in the stage of a NIKON TE-200 microscope and were superfused with different nucleotide and glutamate receptors agonists, such as adenosine triphosphate (ATP), L-Glu, alpha-amino-3-hydro-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid (AMPA), *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and 3,5-dihydroxyphenyl-glycine (DHPG), all of them obtained from Sigma (St. Louis, MI, USA). When the role of CaMKII on cross-talk was studied, granule neurons were preincubated with the CaMKII antagonists, 1-[*N,O*-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-*N*-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine (KN-62) and *N*-[2-[[[3-(4'-chlorophenyl)-2-propenyl]methylamino]methyl]phenyl]-*N*-(2-hydroxyethyl)-4'-methoxybenzenesulfonamide (KN-93) (both obtained from Tocris; Bristol, UK), for 20 minutes before to start the stimulations, in order to assay a full blockade of CaMKII.

A pulse of 30 mM KCl was applied at the end of each experiment to confirm the functionality and viability of the neurons under study.

The images were obtained using microscope 40 X lens and setting the incoming light at 340 and 380 nm. Images were captured using an ORCA-ER C 47 42-80 camera from Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan) controlled by MetaFluor 6.2r6 PC software (Universal Imaging, Cambridge, UK). Time course data represent the average fluorescence intensity in circular regions located in each soma.

### **2.3. Immunocytochemical studies and fluorescence quantification**

9 div cerebellar granule neurons were fixed for 15 min with 4% PFA (Sigma) in PBS (w/v). After several washes in PBS, cells were incubated for 1 h in PBS containing 5% donkey serum (v/v), 3% BSA (w/v) and 0.1% Triton X-100 (v/v). After that, neurons were incubated with the primary antibodies as follows: anti-vesicular glutamate transporter-1 (VGLUT1) at 1/1000 dilution and anti-vesicular glutamate transporter-2 (VGLUT2) at 1/500 dilution (both antibodies were obtained from Synaptic Systems; Goettingen, Germany). As secondary antibody we used TRITC-goat anti-rabbit IgG, at 1/500 dilution (Sigma). We used as a presynaptic marker an anti-synaptophysin primary antibody, 1/500 (Sigma), revealed with a FITC-goat anti-mouse IgG 1/500 as secondary antibody (Sigma).

For the immunocytochemical detection of P2X7 and P2Y<sub>1</sub>, cells were incubated with primary antibodies that recognized the specified rat proteins: rabbit anti-P2X7 (1/100) and rabbit anti-P2Y<sub>1</sub> (1/100) (Chemicon International, Temecula, CA, USA); mouse anti-synaptophysin (1/500). As secondary antibodies were used: goat anti-mouse IgG fluorescein conjugated (1/500), goat anti-rabbit IgG rhodamine conjugated (1/500).

Immunocytochemical detection of phospho-CaMKII and total CaMKII in granule neurons stimulated with L-Glu (100 μM, 5 min) was carried out following procedures described previously (6). Primary antibodies used in this work recognized the specified rat proteins: rabbit anti-phospho-CaM-kinase II a/b (Thr286/287) (1/100) (Upstate Charlottesville, VA, USA) and mouse anti-b-CaM-kinase II (1/100) (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA).

In all cases, incubations with primary and secondary antibodies were done at 37 °C for 1 h. In every experiment incubation with the control antigen was made following the manufacturer's instructions. Controls were performed following the same immunocytochemical procedure but replacing primary antibodies by the same volume of PBS-BSA solution.

Immunofluorescence images were captured digitally using a Kappa DX2 camera controlled by Kappa Image Base Control software. For each culture, acquisition parameters were adjusted in order to prevent brightest fluorescence from saturating the mean intensity of granule neuron. These conditions were maintained with the subsequent images. Three or four images under specific conditions were captured in each one of the cultures. Fluorescence quantification was performed as previously described (6).

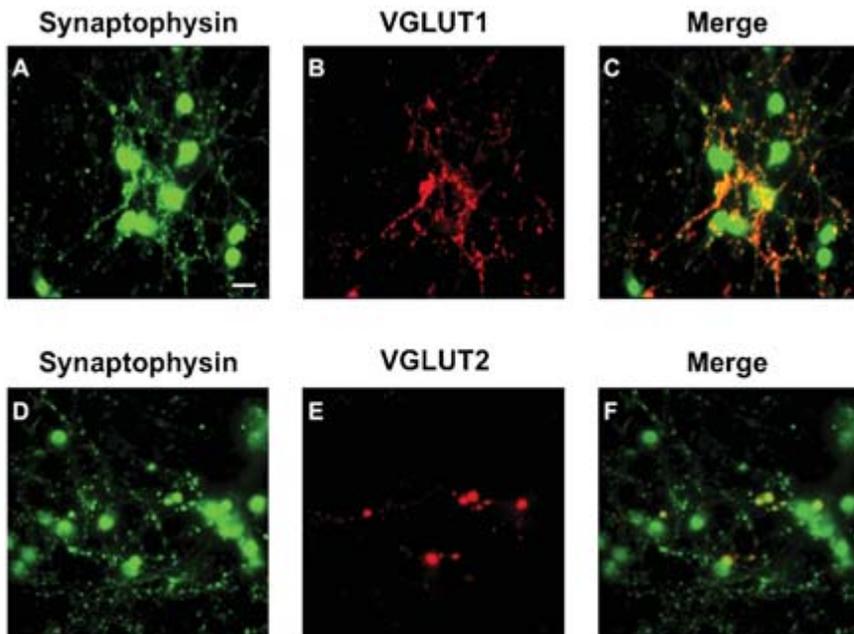
#### **2.4. Statistical analysis**

Data are presented as mean ± SEM, and differences were tested by one-way ANOVA with Bonferroni's post test using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 3. RESULTS

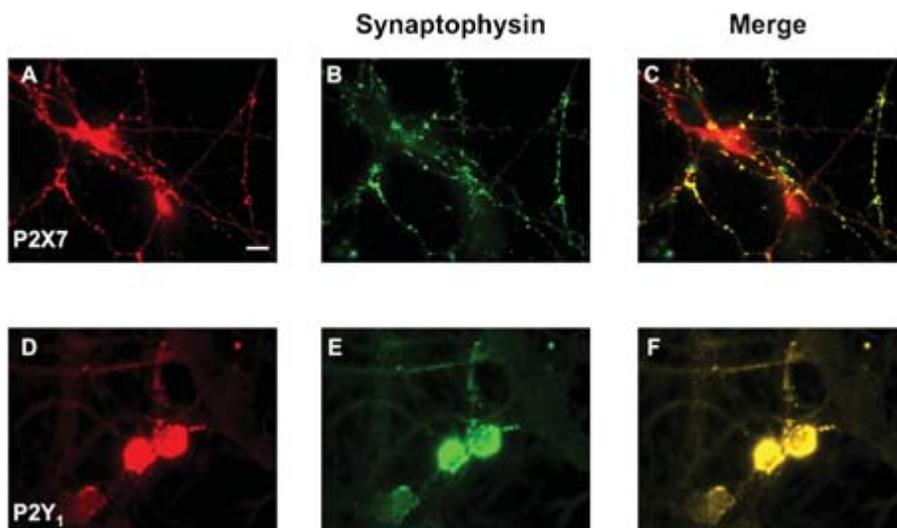
#### 3.1. General characteristics of cultured granule neurons

Cerebellar granule neurons were cultured following protocol described by Hervás and co-workers (4). Thus, in our culture conditions, no cells exhibited the glial marker protein GFAP (not shown), but all contained the neuronal vesicular marker synaptophysin and exhibited a glutamatergic nature since they were labelled with antibodies to the vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2 (Figure 1). Furthermore, granule neurons exhibited a good response to  $K^+$  ions (100%), and most cells to 100  $\mu$ M L-Glu (90-95%). The prominent calcium entrance response induced by  $K^+$  ions was an additional control to demonstrate the neuronal nature of the single cell under study.



**Figure 1. Immunodetection of VGLUT1 and VGLUT2 in 9 div cerebellar granule neurons.** **A, D)** Immunostaining of granule neurons with the presynaptic marker synaptophysin (green). **B, E)** Detection of VGLUT1 and VGLUT2 (red), respectively, in granule neurons. **C)** Co-localization of synaptophysin and VGLUT1, showed in yellow. **D)** Idem for synaptophysin and VGLUT2. Scale bar: 10  $\mu$ m.

Immunocytochemical studies also demonstrate the presence of ionotropic (such as P2X7, Figure 2A) and metabotropic (such as P2Y<sub>1</sub>, Figure 2D) purinergic receptors in rat cultured cerebellar granule neurons. However, these cells showed different calcium responses to ATP. To determine the dose-response relations, neurons were challenged with several concentrations of ATP. Results, expressed as a percentage of cells responding per total number of cells tested for each concentration, have shown the following values: a) 1  $\mu$ M ATP, 10%; b) 100  $\mu$ M ATP, 30%; c) 200  $\mu$ M ATP, 50% (not shown). It is necessary to consider that we are only measuring responses to added nucleotides, not to the hydrolysis products (mainly adenosine) that could appear due to ectonucleotidases action. The continuous superfusion of the cell chamber avoids concentration of any hydrolytic product in the extracellular medium.



**Figure 2. Immunocytochemical location of purinergic receptors in fibres and somas of 9 div cerebellar granule neurons.** In red is shown the presence of ionotropic P2X7 (A) and metabotropic P2Y<sub>1</sub> (D) receptors. The immunolocalization of the presynaptic marker synaptophysin is shown in green (B, E). The colocalization of synaptophysin and P2X7 and P2Y<sub>1</sub> subunits is shown in yellow (C, F, respectively). Scale bar: 5  $\mu$ m.

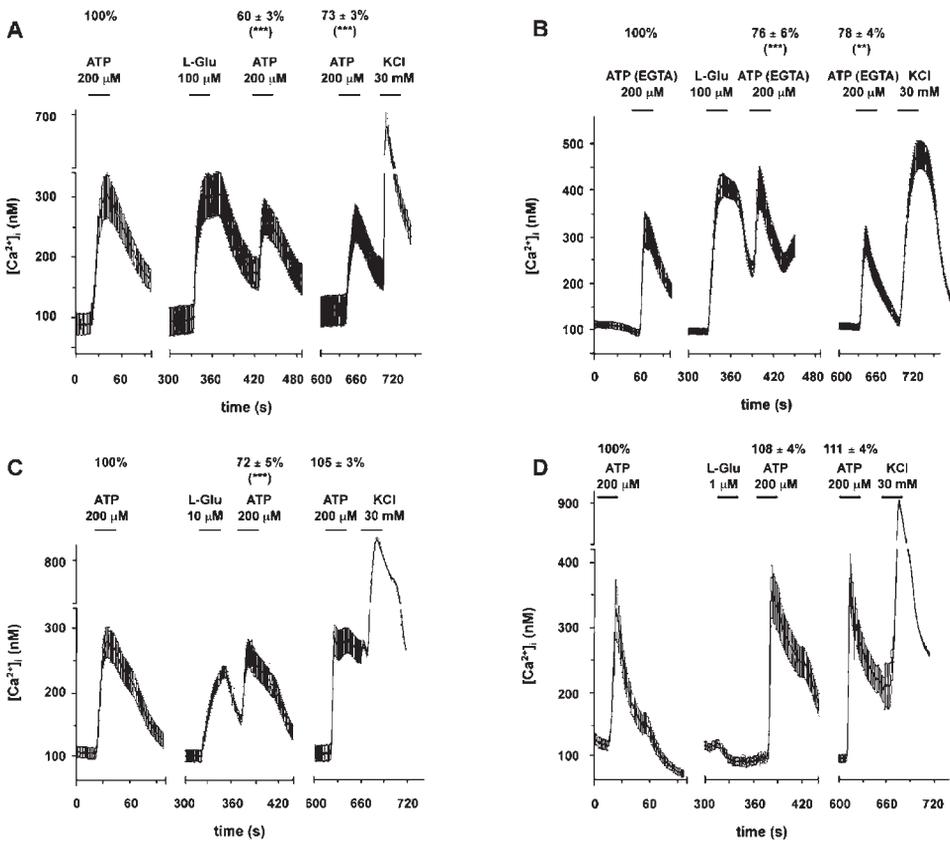
### 3.2. Activation of glutamate receptors decreases the ATP-induced intracellular calcium increase

Using doses of ATP to which 50% of the cells responded, we investigated by microfluorimetric experiments whether the calcium entrance mediated by glutamate receptor could modify the  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by ATP. To perform this study granule neurons were stimulated first with 200  $\mu$ M ATP, followed by a second double pulse of 100  $\mu$ M L-Glu and 200  $\mu$ M ATP, and afterwards by 200  $\mu$ M ATP in a third pulse. Before each ATP pulse, the preparation was always washed with the Locke's solution for five minutes. As it is shown in Figure 3A, the mean calcium increase induced by the first application of 200  $\mu$ M ATP was  $209 \pm 38$  nM ( $n = 33$  neurons), once Grynkiewicz's equation (20) had been applied. Similarly, when granule neurons were challenged with 100  $\mu$ M L-Glu, the mean calcium increase observed was  $210 \pm 34$  nM ( $n = 33$  neurons). However, when L-Glu (100  $\mu$ M) was applied immediately before ATP (200  $\mu$ M), ATP-calcium transients were significantly reduced to a value that was  $60 \pm 3\%$  of their initial value ( $p < 0.001$ ,  $n = 33$  neurons). In these neurons, ATP-mediated responses remained depressed 5 min after L-Glu (100  $\mu$ M) application (by  $73 \pm 3\%$ ;  $p < 0.001$ ,  $n = 33$  neurons).

In order to investigate the possible inhibitory effect of L-Glu on metabotropic P2Y receptor activation, ATP (200  $\mu$ M) was assayed in a virtually  $Ca^{2+}$ -free medium ( $[Ca^{2+}] \sim 50$  nM) by using a  $Ca^{2+}$  chelator mixture of 5 mM EGTA/5.5 mM Tris (21). As Figure 3B shows, in the presence of EGTA, individual granule neurons responded to ATP which confirmed the presence of functional P2Y receptor, accordingly with previous results (4). When ATP (EGTA)-mediated responses were analysed after L-Glu stimulation, a significant reduction could be detected in both times assayed (0 min,  $76 \pm 6\%$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 34$  neurons; 5 min,  $78 \pm 4\%$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 34$ ).

The effect of L-Glu on ATP-mediated responses was concentration dependent. Thus, when granule neurons were challenged with L-Glu 10  $\mu$ M, the second peak of calcium induced by ATP declined to a value that was  $72 \pm 5\%$  of their initial peak amplitude ( $p < 0.01$ ,  $n = 126$  neurons). However, ATP-mediated response was fully recovered five minutes after granule neurons were stimulated with

10  $\mu\text{M}$  L-Glu ( $105 \pm 3\%$ ,  $p > 0.05$ ,  $n = 126$  neurons) (Figure 3C). As it can be observed in Figure 3D no calcium increases in response to 1  $\mu\text{M}$  L-Glu were detected in neither of cells studied ( $n = 132$  somas). Besides, ATP-mediated responses did not undergo any significant variations after exposition to 1  $\mu\text{M}$  L-Glu. The pooled average data compared with the first ATP-induced current were  $108 \pm 4\%$  ( $p > 0.05$ ,  $n = 132$  neurons) and  $111 \pm 4\%$  ( $p > 0.05$ ,  $n = 132$  neurons).



**Figure 3. Cross-talk between ATP and L-Glu responses in somas of 9 div cultured granule neurons.** Effects of several concentrations of L-Glu (100, 10 and 1  $\mu\text{M}$ ) on ATP-mediated responses measured in presence (**A**, **C**, **D**) or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (**B**). ATP-induced currents were studied 30 s and 5 min after L-Glu application and were compared with the first ATP-response for each neuron. Statistical significance was calculated by anova test: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ , significantly different from first ATP-mediated response.

### **3.3. Both NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors reduce the ATP-induced intracellular calcium increase**

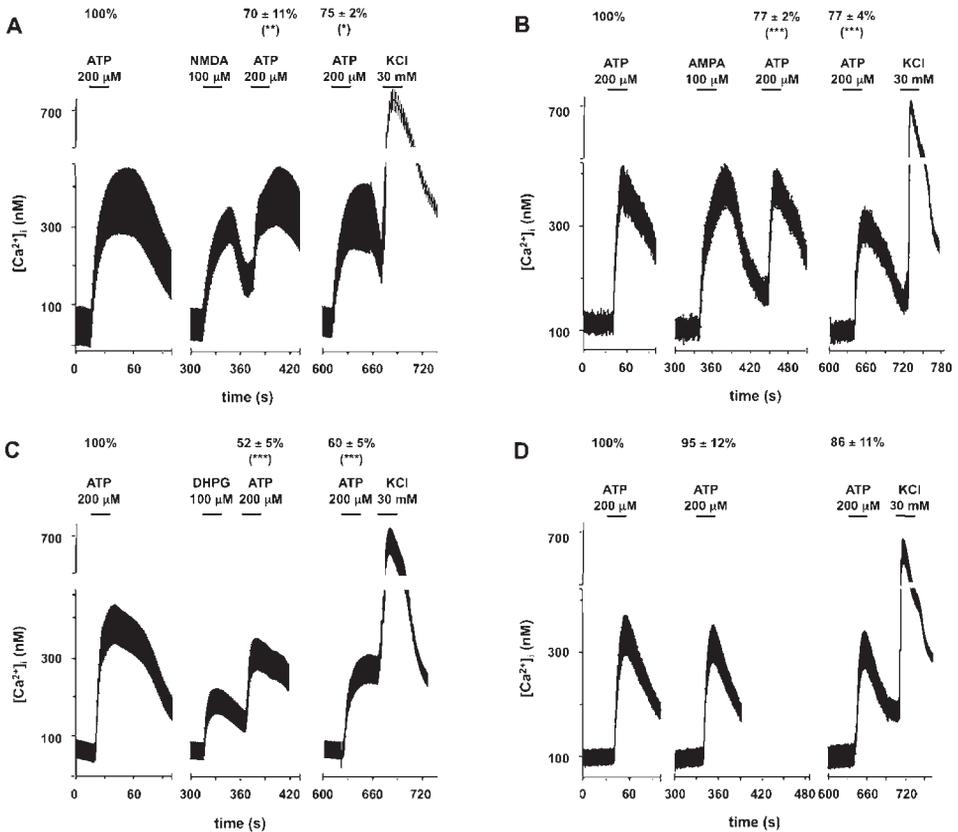
L-Glu acts as a mixed agonist for all classes of ionotropic glutamate receptor. To investigate the glutamate receptor involved in the L-Glu inhibitory effects on nucleotide receptors, we tested the actions of AMPA, NMDA and non-NMDA receptors agonists respectively, on ATP-induced responses. NMDA (100  $\mu\text{M}$ ) applied immediately before ATP (200  $\mu\text{M}$ ) increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by itself ( $214 \pm 20$  nM;  $n = 70$  neurons) and significantly suppressed the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase induced by ATP (Figure 4A). The pooled average depression compared with the control ATP-induced response were  $70 \pm 11\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 70$  neurons) and  $75 \pm 2\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 70$  neurons) at 0 and 5 min, respectively. Similar results were observed when AMPA (100  $\mu\text{M}$ ) was assayed (Figure 4B). Thus, AMPA was also able to increase  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by itself ( $254 \pm 29$  nM;  $n = 57$  neurons) and to depress ATP-induced currents in a similar extent at both times studied ( $77 \pm 2\%$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 57$  neurons at 0 min and  $77 \pm 4\%$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 57$  neurons at 5 min).

### **3.4. Group I mGluR activation decrease ATP-induced responses**

Previous works have shown the presence of functional Group I mGluR in cerebellar granule neurons (3) where it is probably that they are involved in synaptic plasticity (22). The possible participation of Group I mGluR in the L-Glu inhibitory effects on nucleotide receptors was studied using 100  $\mu\text{M}$  DHPG as specific agonist (23). As it is shown in Figure 4C, DHPG (100  $\mu\text{M}$ ) increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $133 \pm 58$  nM) and also significantly decreased ATP-induced responses to a value that was  $52 \pm 5\%$  of their initial value ( $p < 0.001$ ,  $n = 50$  neurons). This loss of responsiveness remained 5 min after DHPG (100  $\mu\text{M}$ ) application ( $60 \pm 5\%$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 50$  neurons).

### 3.5. The inhibitory effect of glutamate on ATP-mediated responses is not associated to P2 receptor desensitization

Since different P2X and P2Y receptors can undergo a decline in current amplitude in response to repeated applications of ATP (24, 25), we investigated if this desensitization process could be involved



**Figure 4. Effects of 100 μM NMDA (A), 100 μM AMPA (B) and 100 μM DHPG (C) on ATP-mediated responses in somas of 9 div cultured granule neurons.** ATP-induced currents were studied 30 s and 5 min after glutamate receptor agonist application and were compared with the first ATP-response for each neuron. Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2-loaded granule neurons following repetitive stimulation with 200 μM ATP (D). \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  significantly different from first ATP-mediated response.

in the decrease of ATP-mediated responses observed after L-Glu exposition. Thus, granule neurons were stimulated with 200  $\mu$ M ATP three times at 5 min-intervals. Although both second and third peaks of calcium resulted slightly reduced compared to the first one ( $95 \pm 12\%$  and  $86 \pm 11\%$ , respectively), statistical analyses did not reveal any significant differences between them (Figure 4D).

### 3.6. CaMKII is involved in the cross-talk between glutamate and nucleotide receptors

In order to find a possible mechanism in the cross-talk between glutamate and nucleotide receptors, we searched within the different receptors sequences for possible phosphorylation consensus sequences by protein kinases. Prediction of possible phosphorylation sites were carried out by using computer programs such as GPS 1.10 (26), Scansite 2.0 and ExPASy (27, 28). Thus, GPS (cut-off value 2.5) and Scansite (low stringency) analyses identified different residues in both P2X and P2Y receptors susceptible to be phosphorylated by CaMKII, whereas ExPASy checked that these residues faced the cytoplasm (Table 1).

Table 1. **Sequences for possible phosphorylation consensus sequences by protein kinases.** Prediction of possible phosphorylation sites were carried out by using computer programs such as GPS 1.10, Scansite 2.0 and ExPASy.

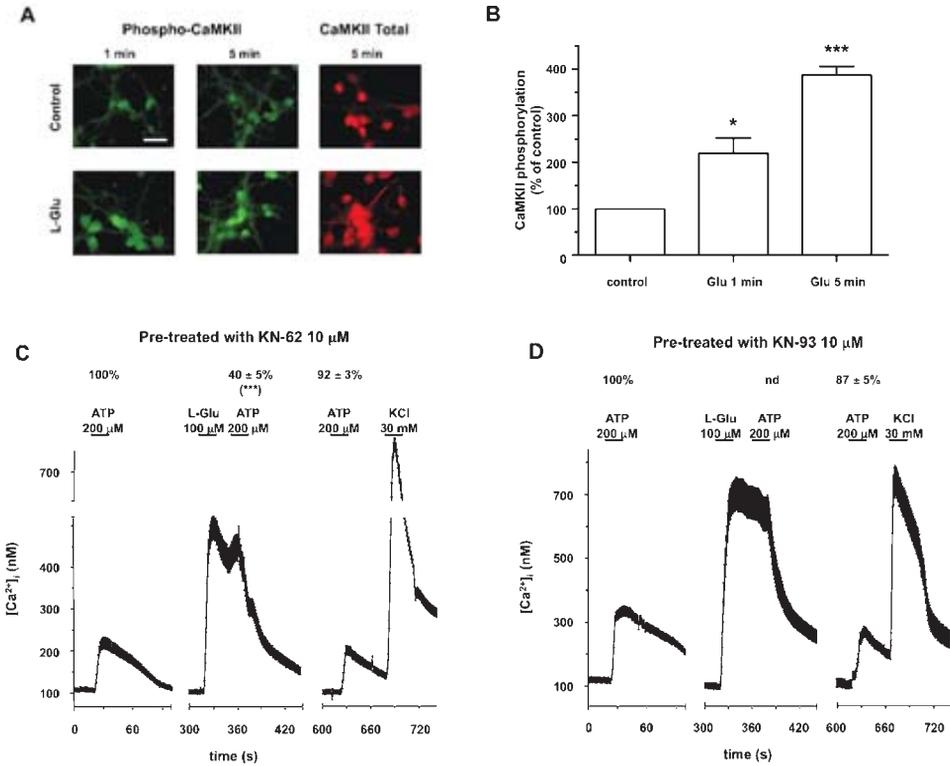
Receptor	Site	Sequence	GPS	Scansite	ExPASy
			Score		Cytoplasmatic
<b>P2X2</b>	Ser-431	PRPCSISAL	4.35	0.56	348-472
<b>P2X3</b>	Thr-382	SDQATVEKQ		0.54	339-397
	Thr-388	EKQSTDSGA	3.64	0.58	
<b>P2X7</b>	Ser-560	WRFVSQDMA	3.81	0.54	356-595
	Ser-23	TRIQSVNYG	3.27	0.59	1-25
<b>P2Y<sub>1</sub></b>	Ser-258	LRRKSIYLV	3.08	0.55	239-265
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	Ser-351	RKDLSSSD	3.68	0.49	309-374
<b>P2Y<sub>6</sub></b>	Thr-59	RRTLTRSAV	3.38	0.60	49-62

Additionally, we investigated if calcium entry after glutamate receptor activation was able to induce the phosphorylation of CaMKII. Results showed that L-Glu (100  $\mu\text{M}$ ) was able to induce an important increase in CaMKII phosphorylation in granule neurons, at both experimental times, 1 and 5 min ( $219 \pm 33\%$  and  $387 \pm 19\%$ , respectively) (Figure 5A and 5B). As a control, immunostaining studies—with the antibody that recognizes both non-phosphorylated and phosphorylated forms of CaMKII— showed no differences in the labelling intensity between control and L-Glu-stimulated cells, as was expected for total enzyme detection (Figure 5A).

Then, we used the selective CaMKII antagonists, KN-62 (10  $\mu\text{M}$ ) and KN-93 (10  $\mu\text{M}$ ). The effective inhibitory concentration values of both antagonists have been reported to be 1  $\mu\text{M}$  (29, 30) with no significant effect observed at concentrations 100  $\mu\text{M}$  on activities of other kinases, such as MLCK, PKC, or cAMP-dependent protein kinase. As it can be observed in the Figures 5C and 5D, when ATP-mediated responses were measured five minutes after L-Glu (100  $\mu\text{M}$ ) exposition in granule neurons pre-treated with KN-62 and KN-93, the inhibitory effects of L-Glu on ATP-induced currents were abolished. The pooled average data compared with the first ATP-induced current were: KN-62,  $92 \pm 3\%$  ( $p > 0.05$ ,  $n = 67$  neurons); KN-93,  $87 \pm 5\%$  ( $p > 0.05$ ,  $n = 45$  neurons). However, neither KN-62 nor KN-93 was able to abolish the inhibitory effect of L-Glu on ATP-mediated responses measured immediately after L-Glu exposition.

#### 4. DISCUSSION

The present study confirms the existence of a negative cross-talk between nucleotide receptors activated by ATP and glutamate receptors on granule neurons growth in culture. The relevance of these results relies not only because it demonstrates a new type of interaction between receptors with different structure and function but also because it allows to speculate the presence of a similar interaction between both group of receptors in other brain regions, such as hippocampus and cortex, where ATP-containing synaptic vesicles can coexist with L-Glu-containing ones and, therefore, release of both neurotransmitters can occur simultaneously (31).



**Figure 5. Effect of L-Glu on CaMKII phosphorylation at Thr286/287 9 div cerebellar granule cells.** Neurons were stimulated with L-Glu 100  $\mu$ M for 1 and 5 min, fixed with PFA and treated with antibodies that recognized either phospho-CaM-Kinase II a/b (Thr286/287) or the total CaMKII (**A**). (**B**) Respectively, the quantification of fluorescence obtained in cellular somas. Bars indicate the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated by anova test: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*,  $p < 0.05$ . (**C**, **D**) Effect of L-Glu (100  $\mu$ M) on ATP-mediated responses measured in somas after pre-treatment with KN-62 10  $\mu$ M (**C**) and KN-93 10  $\mu$ M (**D**). ATP-induced currents were studied 30 s and 5 min after L-Glu application and were compared with the first ATP-response for each neuron. Statistical significance was calculated by anova test: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; significantly different from first ATP-mediated response; nd, not significantly different from first ATP-mediated response. Scale bar: 30  $\mu$ m.

We have used in this study cerebellar granule neurons which express both glutamate and nucleotide receptors (2-4). With these cells we measured the functional response by monitoring the agonist-induced  $Ca^{2+}$  release in microfluorimetric experiments. Accordingly with previous works, granule cells showed a heterogeneous pattern

of calcium responses to ATP (4, 8). Although we have not investigate the inhibitory effect of L-Glu on individual nucleotide receptors, results obtained have clearly shown that all ATP responses, including both ionotropic and metabotropic nucleotide receptors, undergo a significant decrease after L-Glu addition, suggesting, therefore, that inhibition of ATP-mediated responses evoked by L-Glu was a general phenomenous and not associated to a specific group of nucleotide receptor. The inhibitory effect of L-Glu on ATP-mediated responses was dose-dependent. Thus, 100  $\mu$ M and 10  $\mu$ M L-Glu caused a strong/medium effect on ATP-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  rises whereas 1  $\mu$ M L-Glu did not affect responses induced by ATP. These data suggest, therefore, that L-Glu concentrations play an important role in the interaction between both groups of receptors. The possibility that L-Glu inhibited ATP-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  rises by a direct action on nucleotide receptors was excluded when different agonists of glutamate receptors were tested and data showed that they were also able to depress ATP currents.

In the present work glutamate receptor agonist not only acutely depresses ATP-elicited calcium rises, but also induces a depression in ATP responsiveness that remains even after 5 minutes the agonist gone. By using selective agonists of ionotropic glutamate receptor, NMDA and AMPA, and Group I-mGluR, DHPG, we could investigate the individual contribution of each receptor to the cross-talk process. Thus, both ionotropic agonists, NMDA and AMPA, caused a similar decrease on ATP-mediated responses whereas the inhibitory effect of DHPG was slightly higher. Another interesting point treated was if the loss of ATP responsiveness observed after L-Glu exposure could be due to desensitization of nucleotide receptor and not by a cross-talk process between both groups of receptors. In that sense, previous works have shown that different P2X and P2Y receptors can undergo a decline in current amplitude in response to repeated applications of ATP (24, 25). Results obtained have allowed excluding this possibility since the amplitude of the ATP-mediated response remains unchanged in granule neurons challenged three consecutives times with ATP. Therefore, these results demonstrate that L-Glu through binding ionotropic (both NMDA and non-NMDA receptors) and metabotropic glutamate receptor (Group I) caused a prolonged heterologous desensitization in nucleotide receptors.

Once demonstrated that glutamate modulates nucleotide receptors signalling in cerebellar granule neurons, the main question was to understand the biochemical components involved in their interaction. Several evidences suggested that CaMKII could participate in the cross-talk process. Thus, P2X2, P2X3, P2X4, P2X7 and P2Y<sub>1</sub>, which distribution in somatic regions from granule neurons have been previously shown (4, 6), posses sequences susceptible to be phosphorylated by CaMKII. Furthermore, a large number of proteins have been described as being associated with P2X7 (32). One of these proteins is a-actinin, which also interacts with CaMKII and may be a way to locate CaMKII near its substrates (33). Concerning to metabotropic P2Y receptor, a previous report has shown that endocytosis of the P2Y<sub>1</sub> receptor is controlled by the activity of CaMKII (25). Finally, CaMKII is phosphorylated in response to glutamate receptor activation. Based on these data, it is probably that CaMKII was involved in the cross-talk mechanism between glutamate and nucleotide receptors. To verify the phosphorylation hypothesis, we analyzed the effect of CaMKII antagonists, KN-62 and KN-93. The reversion of the long-term L-Glu-inhibitory effects on nucleotide receptor response, by inhibiting the CaMKII, confirmed the role of this protein kinase on the reported effect. However, it is interesting to note that the immediate inhibitory effects induced by L-Glu were not abolished by CaMKII antagonist suggesting the involvement of other kinases. It should be noticed that although KN-62 has been described as antagonist of human P2X7 receptor (34) the differences in the amino acid sequence of the first 335 residues between human and rat P2X7 receptor have been described to change completely the sensitivity to KN-62. Thus, in HEK 293 cells stably transfected with rat P2X7 receptor KN-62 did not antagonize neither ATP activation of cation currents nor ethidium influx induced by ATP (35). In any case, we have additionally verified the lack of antagonism of KN-62 on P2X7 receptor in microfluorimetric experiments where the extracellular Ca<sup>2+</sup> entrance induced by BzATP was not decreased in the presence of KN-62 (data not shown).

Multiple temporarily regulated mechanisms are used to modulate the efficiency of synaptic transmission; in the present work we have described a new one which involves glutamate and nucleotide

receptors and that result in a prolonged inhibitory effect of  $[Ca^{2+}]_i$  increase. In the mechanism involved for this control is participating the CaMKII, although other kinases seem to be involved, at least at short term. Additional work will be necessary to investigate the possibility of glutamate/ATP receptors interaction in cortex and hippocampus where release of both neurotransmitters can occur simultaneously.

## 5. REFERENCES

1. Bastian, A. J.; Mugnaini, E. & Thach, W. T. (1999) Cerebellum. In *Fundamental Neuroscience*, Ed. Zigmond, M. J.; Bloom, F. E.; Landis, S. C.; Roberts, J. L. & Squire, L. R. Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 973-992.
2. Garthwaite, J. & Brodbelt, A. R. (1990) Glutamate as the principal mossy fibre transmitter in rat cerebellum: pharmacological evidence. *Eur. J. Neurosci.* 2: 177-180.
3. Masgrau, R.; Servitja, J. M.; Young, K. W.; Pardo, R.; Sarri, E.; Nahorski, S. R. & Picatoste, F. (2001) Characterization of the metabotropic glutamate receptors mediating phospholipase C activation and calcium release in cerebellar granule cells: calcium-dependence of the phospholipase C response. *Eur. J. Neurosci.* 13: 248-256.
4. Hervás, C.; Pérez-Sen, R. & Miras-Portugal, M. T. (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 73: 384-399.
5. Sánchez-Nogueiro, J.; Marín-García, P. & Miras-Portugal, M. T. (2005) Characterization of a functional P2X<sub>7</sub>-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X<sub>7</sub> knockout mice. *FEBS Lett.* 579: 3783-3788.
6. León, D.; Hervás, C. & Miras-Portugal, M. T. (2006) P2Y<sub>1</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* 23: 2999-3013.
7. León, D.; Sánchez-Nogueiro, J.; Marín-García, P. & Miras-Portugal, M. T. (2008) Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X<sub>7</sub> receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.* 52: 1148-1159.
8. Sánchez-Nogueiro, J.; Marín-García, P.; León, D.; León-Otegui, M.; Salas, E.; Gómez-Villafuertes, R.; Gualix, J. & Miras-Portugal, M. T. (2009) Axodendritic fibres of mouse cerebellar granule neurons exhibit a diversity of functional P2X receptors. *Neurochem. Int.* 55: 671-682.
9. Volonté, C.; Amadio, S.; D'Ambrosi, N.; Colpi, M. & Burnstock, G. (2006) P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol. Therap.* 112: 264-280.
10. Miras-Portugal, M. T.; Marín-García, P.; Carrasquero, L. M. G.; Delicado, E. G.; Díaz-Hernández, M.; Díaz-Hernández, J. I.; Díez-Zaera, M.; Fideu, M. D.; Gómez-Villafuertes, R.; Gualix, J.; León, D.; León-Otegui, M.; Ortega, F.; Pérez-

- Sen, R.; Salas, E. & Sánchez-Nogueiro, J. (2007) Physiological role of extracellular nucleotides at the central nervous system: signalling through P2X and P2Y receptors. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73: 1127-1157.
11. Gómez-Villafuertes, R.; Gualix, J. & Miras-Portugal, M. T. (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J. Neurochem.* 77: 84-93.
  12. Gualix, J.; Gómez-Villafuertes, R.; Díaz-Hernández, M. & Miras-Portugal, M. T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminal from rat midbrain. *J. Neurochem.* 87: 160-171.
  13. Díaz-Hernández, M.; Sánchez-Nogueiro, J. & Miras-Portugal, M. T. (2006) Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotides and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J. Mol. Neurosci.* 30: 177-180.
  14. Rodrigues, R. J.; Almeida, T.; de Mendonca, A. & Cunha, R. A. (2006) Interaction between P2X and nicotinic acetylcholine receptors in glutamate nerve terminals of the rat hippocampus. *J. Mol. Neurosci.* 30: 173-176.
  15. Silinsky, E. M. & Redman, R. S. (1996) Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. *J. Physiol.* 492 (Pt 3): 815-822.
  16. Jo, Y. H. & Schlichter, R. (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature Neurosci.* 2: 241-245.
  17. North, R. A. & Verkhatsky, A. (2006) Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflugers Arch.* 452: 479-485.
  18. Cavaliere, F.; Amadio, S.; Angelini, D. F.; Sancesario, G.; Bernardi, G. & Volonté, C. (2004) Role of the metabotropic P2Y(4) receptor during hypoglycemia: cross talk with the ionotropic NMDAR1 receptor. *Exp. Cell Res.* 300: 149-158.
  19. Marín-García, P.; Sánchez-Nogueiro, J. & León, D. (2007) Glutamate determinations using Amplex Red Glutamic Acid Assay are affected by P2X agonist BzATP. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73: 441-452.
  20. Grynkiewicz, G.; Poeni, M. & Tsien, R. Y. (1985) A new generation of fluorescent calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
  21. Portzehl, H.; Caldwell, P. C. & Rueegg, J. C. (1964) The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia squinado* on the internal concentration of free calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 79: 581-591.
  22. D'Angelo, E.; Rossi, P.; Armano, S. & Taglietti, V. (1999) Evidence for NMDA and mGlu receptor-dependent long-term potentiation of mossy fiber-granule cell transmission in rat cerebellum. *J. Neurophysiol.* 81: 277-287.
  23. Ito, I.; Kohda, A.; Tanabe, S.; Hirose, E.; Hayashi, M.; Mitsunaga, S. & Sugiyama, H. (1992) 3,5-Dihydroxyphenyl-glycine: a potent agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport.* 3: 1013-1016.

24. Fountain, S. J. & North, R. A. (2006) A C-terminal lysine that controls human P2X<sub>4</sub> receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 281: 15044-15049.
25. Tulapurkar, M. E.; Zundorf, G. & Reiser, G. (2006) Internalization and desensitization of a green fluorescent protein-tagged P2Y nucleotide receptor are differently controlled by inhibition of calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.* 96: 624-634.
26. Xue, Y.; Zhou, F.; Zhu, M.; Ahmed, K.; Chen, G. & Yao, X. (2005) GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Res.* 33: W184-187.
27. Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D. & Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3788.
28. Obenauer, J. C.; Cantley, L. C. & Yaffe, M. B. (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 31: 3635-3641.
29. Tokumitsu, H.; Chijiwa, T.; Hagiwara, M.; Mizutani, A.; Terasawa, M. & Hidaka, H. (1990) KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 265: 4315-4320.
30. Sumi, M.; Kiuchi, K.; Ishikawa, T.; Ishii, A.; Hagiwara, M.; Nagatsu, T. & Hidaka, H. (1991) The newly synthesized selective Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 968-975.
31. Pankratov, Y.; Lalo, U.; Verkhratsky, A. & North, R. A. (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452: 589-597.
32. Kim, M.; Jiang, L. H.; Wilson, H. L.; North, R. A. & Surprenant, A. (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X<sub>7</sub> receptor signalling complex. *EMBO J.* 20: 6347-6358.
33. Colbran, R. J. (2004) Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 378: 1-16.
34. Gargett, C. E. & Wiley, J. S. (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Brit. J. Pharmacol.* 120: 1483-1490.
35. Humphreys, B. D.; Virginio, C.; Surprenant, A.; Rice, J. & Dubyak, G. R. (1998) Isoquinolines as antagonists of the P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol. Pharmacol.* 54: 22-32.

**\* Información de contacto:**

Dra. María Teresa Miras-Portugal.

Department of Biochemistry and Molecular Biology IV. Faculty of Veterinary.  
Complutense University of Madrid, Spain.

Avda. Complutense, s/n. 28040, Madrid. Spain.

Tel.: +34 91 394 38 94. Fax: +34 91 394 39 09

Email: [mtmiras@vet.ucm.es](mailto:mtmiras@vet.ucm.es)

## **Beta-cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: Role of a liver-pancreatic endocrine axis**

**Óscar Escribano<sup>1,2</sup>, Almudena Gómez-Hernández<sup>1,2</sup>,  
Manuel Benito de las Heras<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II.  
Faculty of Pharmacy. Complutense University of Madrid. Spain.

<sup>2</sup> CIBER of Diabetes and Related Metabolic Diseases (CIBERDEM).  
ISCIII. Spain.

Recibido el 2 de noviembre de 2009.

### **ABSTRACT**

Type 2 diabetes results from a combination of insulin resistance and impaired insulin secretion. To directly address the effects of hepatic insulin resistance in adult animals, we developed an inducible liver-specific IR knockout mouse (iLIRKO). Using this approach, we were able to induce variable IR deletion in a tissue-specific manner (liver mosaicism). These mice demonstrate progressive hepatic and extra hepatic insulin resistance, without liver dysfunction. Initially there is hyperinsulinemia and increased beta-cell mass in parallel to IR deletion by the liver. Our results with iLIRKO demonstrate a cause and effect relationship between progressive insulin resistance and the fold-increase of plasma insulin levels and beta-cell mass. Ultimately the beta cells undergo a failure in the insulin secretion that leads to uncontrolled diabetes. In this context, iLIRKO mice induced IGF-1 in parallel to IR (IR) deletion in the liver. This resulted in an increase of circulating IGF-1.

Concurrently, there was a huge increase of IR-A in the hyperplastic beta cells. More importantly, as assessed in mouse beta-cell lines, IR-A, but not IR-B, confers a proliferative capability to beta-cells in response to insulin or IGF-1 that may account for beta-cell hyperplasia induced by liver insulin resistance in iLIRKO mice. Thus, our results in iLIRKO mice suggest a liver-pancreatic endocrine axis, IGF-1 being a liver factor that might contribute together with insulin to compensatory pancreatic islet hyperplasia through IR-A.

**Keywords:** Diabetes; IGF-1; Signalling; Mouse; Proliferation.

## RESUMEN

### **Hiperplasia de célula beta inducida por resistencia hepática a insulina: Papel de un eje hepato-pancreático**

La diabetes tipo 2 es el resultado de una combinación de resistencia a insulina y un defecto en la secreción de la misma. Para determinar el papel de la resistencia a la insulina hepática en animales adultos, nuestro grupo generó un ratón para el receptor de insulina en hígado de forma inducible (iLIRKO). Utilizando esta tecnología fuimos capaces de obtener ratones con distinto grado de delección del receptor de insulina hepático. Estos ratones mostraron una resistencia progresiva a la insulina inicialmente hepática pero que se extendió a tejidos extrahepáticos. Además, no se observó ningún tipo de patología hepática. Inicialmente se observó un incremento en los niveles de insulina circulantes y un aumento de la masa de célula beta pancreática que fue proporcional al grado de delección del receptor de insulina en hígado. Finalmente, tiene lugar un fallo en la secreción de insulina por parte de la célula beta pancreática. En este contexto, el hígado de los animales iLIRKO es capaz de sintetizar IGF-1 de forma proporcional al grado de delección del receptor de insulina en hígado. Además, tuvo lugar un importante incremento en la expresión de la isoforma A del receptor de insulina (IR-A) en las células beta. Más importante, como demostramos en células beta inmortalizadas, IR-A pero no IR-B confiere una gran capacidad proliferativa a las células beta en respuesta tanto a insulina como IGF-1, lo que puede explicar, al menos en parte, los

mecanismos involucrados en la hiperplasia de la célula beta pancreática desarrollada por los ratones iLIRKO.

**Palabras clave:** Diabetes; IGF-1; Señalización; Ratón; Proliferación.

## 1. INTRODUCTION

Type 2 diabetes results from a combination of insulin resistance and impaired insulin secretion. While it is not clear the primary defect in type 2 diabetes, insulin resistance is the most relevant pathophysiological feature in the prediabetic state (1, 2). Rodent studies have shown that insulin insensitivity in both classical and non-classical insulin target tissues can play a role in the control of glucose homeostasis (3). Several mouse models have been developed to study the role of insulin resistance in various tissues (4). While total whole body insulin resistance produced by generalized deletion of the IR does not produce any major effect in mouse development, these mice died one week after birth from severe ketosis (5, 6). Combined restoration of IR function in brain, liver, and pancreatic  $\beta$  cells rescues IR knockout mice from neonatal death, prevents diabetes in a majority of animals, and normalizes adipose tissue content, lifespan and reproductive function (7).

In a serie of studies using tissue-specific conditional knockout of IR, the liver, brain and beta cell have also been implicated as the key sites of insulin resistance in the development of type 2 diabetes (8-10). The liver-specific IR knockout (LIRKO) showed that hepatic insulin resistance is the most important in development of impaired glucose tolerance and fasting hyperglycemia. In addition, these mice also developed marked beta-cell hyperplasia and hyperinsulinemia and decreased insulin clearance. With aging, however, the diabetic state regressed, suggesting some form of compensatory mechanism, possibly linked with the development of liver damage related to appearance of hyperplastic nodules that might have altered glucose production by the liver, leading to regression of the diabetic state with aging (8). To better address the role of this important tissue in the pathogenesis of type 2 diabetes in the adult, we developed LIRKO mice in an inducible manner (iLIRKO).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals

IR<sup>(loxP/loxP)</sup> C57Bl/6 mice were created by homologous recombination using an IR gene targeting vector with lox P sites flanking exon 4 as previously described (11). Transgenic mice expressing a *Cre* recombinase transgene under the control of the Mx1 promoter/enhancer were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA). The IR<sup>(loxP/loxP)</sup> mice were crossed with Mx-Cre mice to obtain inducible LIRKO (iLIRKO) mice. After the suckling period, iLIRKO mice were injected intraperitoneally with poly-Inositic-poly-Cytidilic acid (500 mg/injection) to induce the interferon alpha response and the consequent Mx1 promoter activation as previously described (12). All animal experimentation described in this manuscript was conducted according with accepted standards of human animal care published by the National Institutes of Health.

### 2.2. Genotyping of the IR<sup>(loxP/loxP)</sup> transgenic mice

Genotyping of the mice was performed by PCR. Tail DNA (100-200 ng) was amplified 30 cycles (40 seconds, 94° C; 40 seconds, 60° C; and 1 minute, 75° C) on a thermal cycler. Two primers flanking the *loxP* site behind exon 4 of the IR were used: the forward primer (5'-GATGTGCACCCCATGTCTG-3') and the reverse primer (5'-CTGAATAGCTGAGACCACAG-3'). A 320-bp band was obtained for the floxed allele or a 280-bp band for the wild-type allele.

### 2.3. Genotyping of the Mx1-Cre transgenic mice

Mice were genotyped by PCR. Tail DNA (100-200 ng) was amplified 35 cycles (1 minute, 94° C; 1 minute, 60° C; and 1 minute, 72° C) on a thermal cycler. To amplify the Mx1-Cre transgene (PCR product, 269 bp), primers SF-4 (5'-GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG-3') and 69R (5'-GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG-3') were used.

## 2.4. Western blot analysis

Tissues were homogenized as described (11). Western blot analyses of insulin signaling proteins were performed as described (13). The antibodies used were anti-IR $\beta$  (Ab-4) from Oncogene (San Diego, CA), anti-PEPCK antibody was kindly provided by Dr. DK. Granner (Vanderbilt University, TN), Anti-Glucokinase antibody was a generous gift of Dr. S. Lenzen (Hannover Medical School, Germany), anti-FAS antibody was purchased from BD Transduction Laboratories (San Diego, CA) anti- $\beta$ -actin antibody was from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO). Anti-IGF-1 antibody was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-phospho-p70-S6-Kinase (Thr421/Ser424), anti-phospho-p44/p42-MAPK (Thr202/Tyr204), anti-phospho-Akt (Ser473) antibodies were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA). For *in vivo* insulin signaling studies, mice were intraperitoneally injected with 1 U/kg body weight of human insulin (Novo Nordisk, Denmark). After 10 minutes, the tissues were removed and frozen in liquid nitrogen. Densitometric analysis of the autoradiograms was performed using a GS-710 Imaging Densitometer and the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, CA).

## 2.5. Analytical procedures

Insulin levels in serum were measured by radioimmunoassay (RIA) using mouse insulin as a standard (Linco Research, MO). IGF-1 levels in serum were measured by RIA using mouse IGF-1 as a standard (Diagnostic Systems Laboratories, TX). Glucose tolerance and insulin tolerance tests were performed as previously described (14).

## 2.6. Histological analysis

The immunohistochemical analysis of pancreata was performed as described (14).  $\beta$  cell mass was evaluated by point counting morphometry (15, 16). Staining of liver sections with hematoxylin/eosin, periodic Acid-Schiff (PAS) and Masson reagents was performed using standard techniques.

## **2.7. Real-time quantitative PCR for IR isoforms**

The pancreatic islets were isolated from 6-month-old control and iLIRKO mice as previously described (10). IR isoforms expression in isolated islets was analyzed by qPCR, using Taqman probes (Applied Biosystems, NJ). The comparative threshold cycle (Ct) method was used to calculate the relative expression. For gene expression quantification, the target genes values were normalized to the expression of the endogenous reference (18S). Thus, the amount of target, normalized to 18S and relative to the control is given by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [ $\Delta Ct = Ct (\text{Target gene}) - Ct (18S)$ ;  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ for any sample} - \Delta Ct \text{ for the control}$ ].

## **2.8. Reconstitution of IRKO immortalized beta cells with IR A or B isoforms b retroviral infection**

IRKO beta cells were generated in our laboratory as previously described (17). From these cells we reconstituted and characterized the expression of the IR-A (Rec A) and IR-B (Rec B) generating new cell lines as previously described (18).

## **2.9. Measurement of glucose uptake in beta cells**

Cells were cultured to 80% confluence in 10% FBS-DMEM and then serum and glucose starved for 4-6 h. After that, 10 nM Insulin or 10 nM IGF-1 were added to the wells for 30 min. Glucose uptake was measured by incubating cells with 2-deoxy-D-[1-<sup>3</sup>H]glucose for the last 10 min, in triplicate dishes from six independent experiments as previously described (19).

## **2.10. Cell viability assays**

Cells were plated in 12-multiwell plates and cultured in 10% FBS-DMEM until 40-50% of confluence was reached. Then cells were serum starved for 4 h, and then treated with 10nM Insulin, 10 nM IGF-1 or both during 24 hours. Then, the cells were washed with PBS and stained with violet crystal as described (17).

### **2.11. Proliferation studies in isolated pancreatic islets and cultured cells**

DNA synthesis in isolated islets was estimated by determining BrdU incorporation by using the Cell Proliferation ELISA kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany). In cultured beta cells the DNA synthesis was estimated by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation as previously described (20).

### **2.12. Statistical analysis**

All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were carried out using a two-tailed Student's unpaired *t* test, and the null hypothesis was rejected at the 0.05 level.

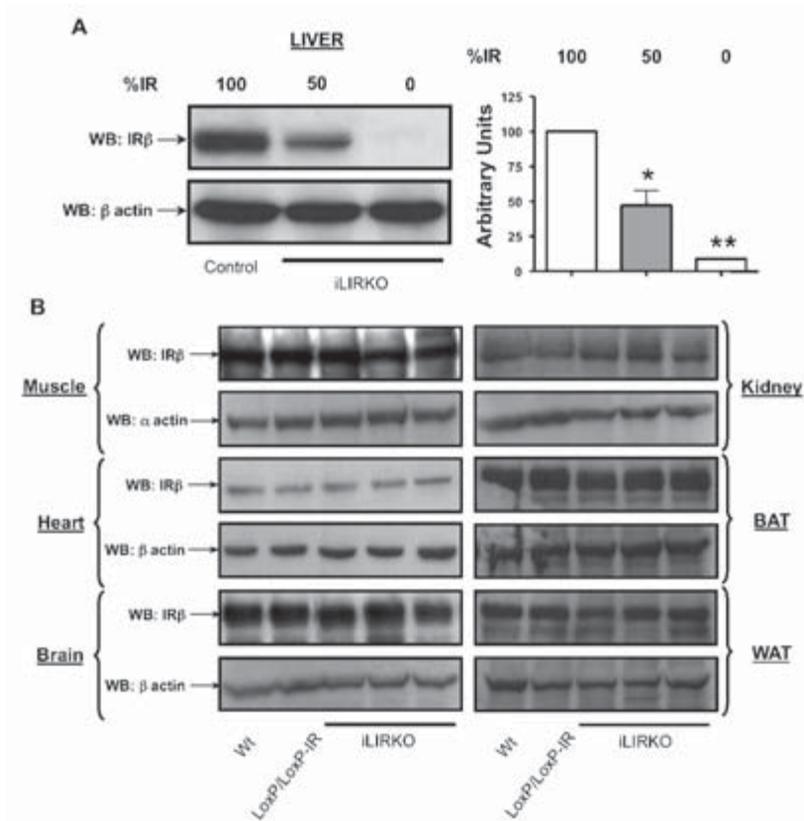
## **3. RESULTS**

### **3.1. Progressive liver-specific IR deletion without liver dysfunction**

The iLIRKO mice were generated as described in Materials and Methods. These mice showed variable IR deletion and were grouped into three groups (50, 25 and 0% of the normal receptor complement). Ablation of IR was tissue-specific, none of other tissues studied were affected (Figure 1).

A critical issue in constitutive LIRKO was the appearance of some liver dysfunction. However, hematoxylin-eosin staining in liver sections revealed no dysplastic or hyperplastic nodules in 6 month- and 12 month-old iLIRKO mice as compared with their respective controls. In addition, Masson staining showed no increase in collagen infiltration or fibrosis in iLIRKO mice (Figure 2, upper panels). Regarding enzymes of hepatic glucose metabolism, we found two kind of evidence as compared with constitutive LIRKO mice. Thus, late IR deletion in iLIRKO mice resulted in reduced glucokinase (GK) protein expression and a dramatic loss of glycogen liver content, as shown by PAS-staining of liver sections, as previously

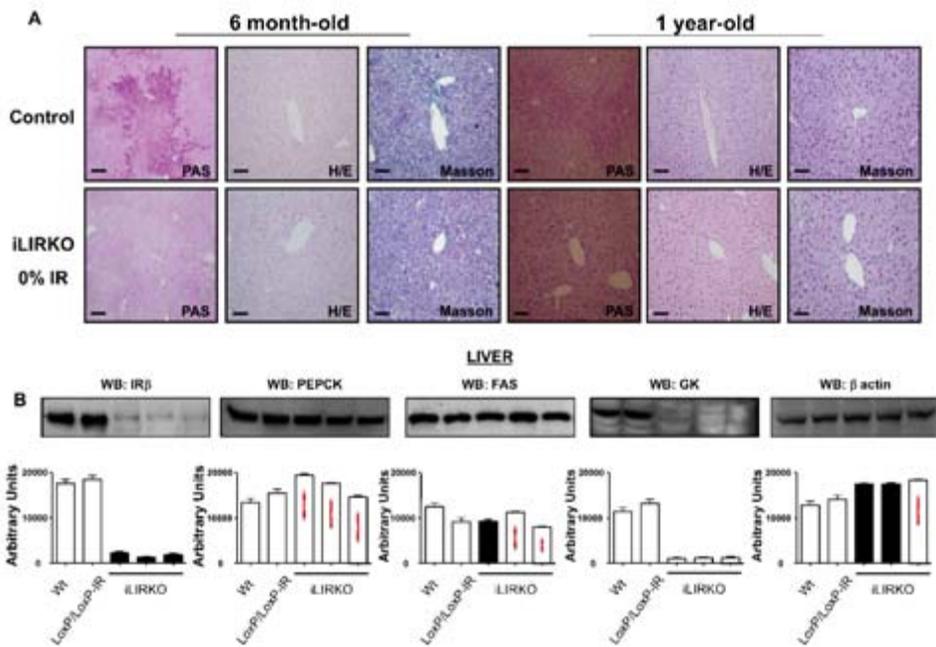
reported in early insulin IR deletion (8). However, no effect was observed on phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) or fatty acid synthase (FAS) gene expression in 6 month-old iLIRKO mice as compared with controls (Figure 2, lower panels).



**Figure 1. Induction of Liver-Specific IR Knockout.** **A)** (Upper panel) Liver protein extracts from 6-month-old Control and iLIRKO mice were analyzed by Western blot. (Lower panel) The autoradiograms corresponding to four independent experiments were quantitated by scanning densitometry. **B)** Protein extracts of several tissues from 6-month-old Wt, IR<sup>(loxP/loxP)</sup> and iLIRKO mice were analyzed by Western blot. A representative experiment out of four is shown. Results are expressed as mean +/- SEM. \*\*P < 0.005; \*P < 0.05; iLIRKO vs. Control.

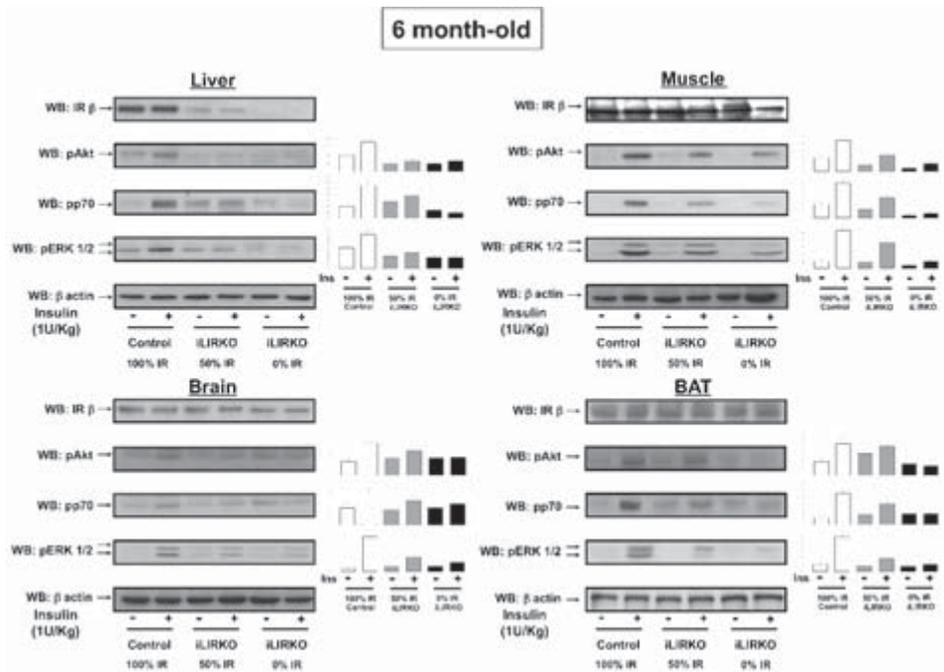
### 3.2. Progressive insulin resistance and glucose intolerance in inducible LIRKO

At 6 months of age iLIRKO mice demonstrated defects in insulin signaling proportional to the lost of IR expression. Thus, in the group with 50% of IR expression, there was a marked decreased in Akt, ERKs and p70-S6-kinase activation while in the group with complete IR deletion; there was a virtual absence of insulin activation of these enzymes. Interestingly, despite the fact that there was no IR lost in other tissues (Figure 1, panel B), there was a progressive impairment of insulin signaling in other peripheral tissues. Thus, there was progressive insulin impairment on Akt, ERKs and p70-S6-kinase signaling from 50 to 0% IR expression left by the liver, in brain,



**Figure 2. Liver Histology and Metabolic Gene Expression in iLIRKO mice.** **A)** Periodic Acid-Schiff reagent (PAS), Hematoxylin/Eosin and Masson staining of liver sections from random-fed, 6-month- and 1-year-old male control (upper panel) and iLIRKO (lower panel) mice. A representative experiment out of four is shown. Magnification 20X. **B)** Protein liver extracts from 6-month-old Wt, IR<sup>(loxP/loxP)</sup> and iLIRKO mice were analyzed by Western blot. A representative experiment out of five is shown. Histograms show the densitometric analysis.

skeletal muscle or brown adipose tissue (BAT) (Figure 3). Insulin signaling in both the liver and these extra hepatic tissues was similarly impaired in 1 year-old iLIRKO mice, (Figure 4). These results indicate that iLIRKO mouse develops primary insulin resistance in the liver, and this is associated with secondary insulin resistance in extra hepatic tissues which persists throughout the animal life.

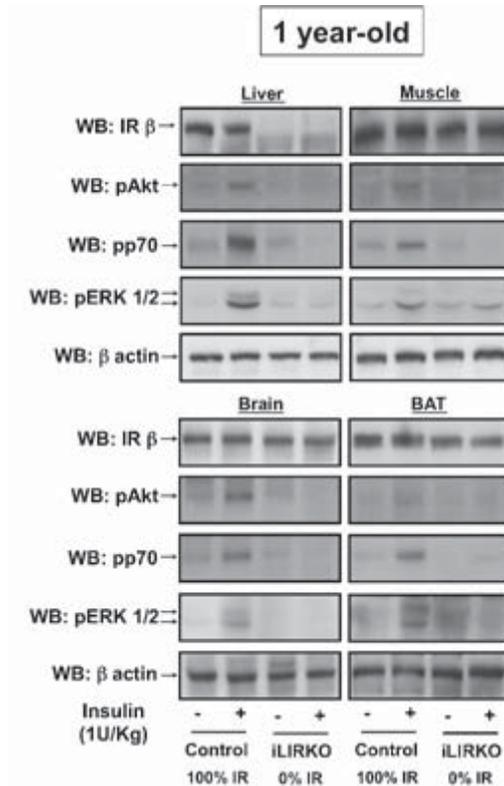


**Figure 3. iLIRKO Shows Insulin Resistance in the Liver and Extra Hepatic Tissues.** *In vivo* insulin signaling studies were performed in 6-month-old Control and iLIRKO mice by intraperitoneal injection of 1 U/kg body weight of human insulin. After 10 minutes, the tissues were removed and analyzed by Western blot. A representative experiment out of four is shown. Histograms show the densitometric analysis.

Post-weaning IR deletion induced progressive insulin resistance in iLIRKO mice from 2- to 6-month-old and this persisted at 1 year of age (Figure 5, upper panels). More importantly, the mice with no IR expression showed progressive glucose intolerance, and even developed fasting hyperglycemia at 1 year of age (Figure 5, lower panels).

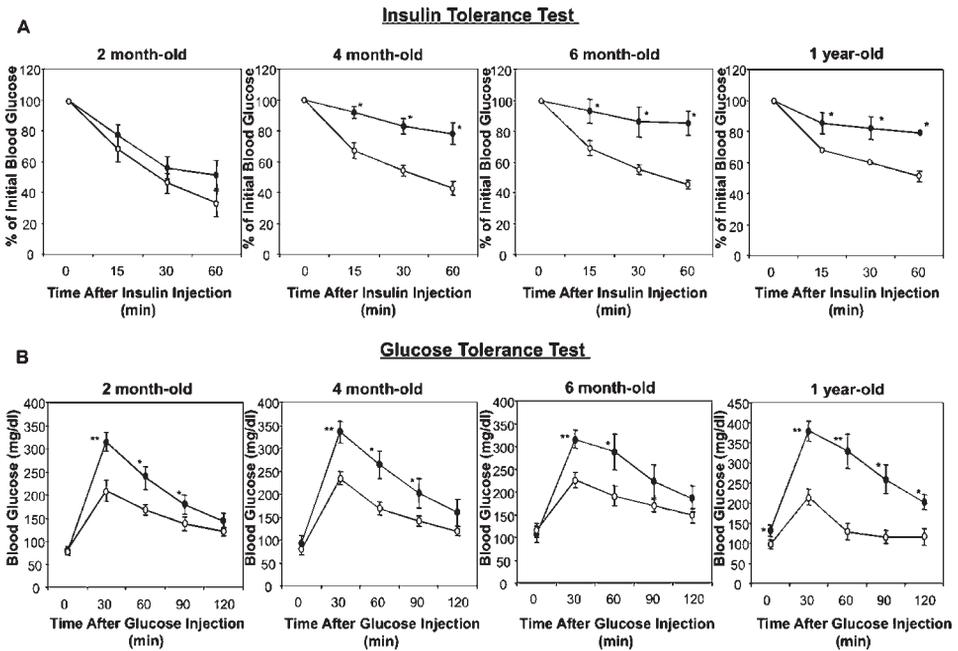
### 3.3. Progressive beta-cell hyperplasia and failure of insulin secretion with aging

iLIRKO showed progressive beta-cell hyperplasia as compared with controls. More importantly, the level of hyperplasia was correlated to the level of IR expression remaining in the liver (Figure 6, panel B). The iLIRKO mice also developed progressive hyperinsulinemia as compared with controls and paralleled with the level of IR deletion by the liver (Figure 6, panel B). This beta-cell expansion persisted throughout life as shown in Figure 6, panel D. In parallel, plas-



**Figure 4. Generalized Insulin Resistance persists in aged iLIRKO.** *In vivo* insulin signaling studies were performed in 1-year-old Control and iLIRKO mice by intraperitoneal injection of 1 U/kg body weight of human insulin. After 10 minutes, the tissues were removed and analyzed by Western blot. A representative experiment out of four is shown. Histograms show the densitometric analysis.

ma insulin increased by 2.5-fold in 1-year-old mice as compared with their controls (Figure 6, panel D), however, this increase was much lower than those at 6 months of age (3-fold, panel D), suggesting a failure in insulin secretion with aging.



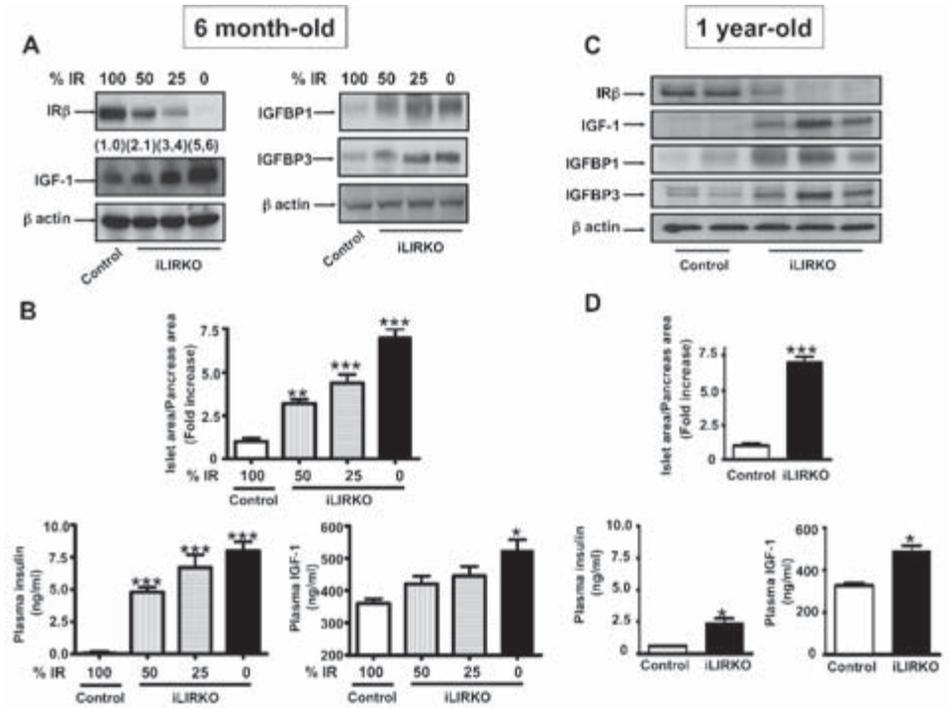
**Figure 5. Progressive Insulin Resistance and Glucose Intolerance in iLIRKO mice.** **A)** Insulin tolerance tests were performed on random-fed, 2-, 4-, 6-month- and 1-year-old male Control (white circles) and iLIRKO (black circles) mice. Animals were injected intraperitoneally with 1 U/kg body weight of human insulin. Blood glucose was measured immediately before injection and 15, 30, and 60 min after the injection. Results expressed as percentage of initial blood glucose concentration are means  $\pm$  SEM (n = 10-20). **B)** Glucose tolerance tests were performed on 2-, 4-, 6-month- and 1-year-old Control (white circles) and iLIRKO (black circles) mice that had been fasted for 16 h. Animals were injected intraperitoneally with 2 g/kg body weight of glucose. Blood glucose was measured immediately before injection and 30, 60, 90 and 120 min after the injection. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 10-20). \*\*P < 0.005; \*P < 0.05; iLIRKO vs. Control.

### **3.4. Progressive hepatic expression and plasma concentration of IGF-1 in iLIRKO mice**

Previous studies have suggested the presence of a circulating islet growth factor in insulin resistant states, independent of glucose and obesity (21). To address this important issue, we conducted western blot analysis with anti-IGF-1 antibody in the liver. Thus, iLIRKO induced expression depending on the level of IR deletion by the liver (Figure 6, panel A). In parallel, iLIRKO mice induced IGFBP1 and IGFBP3 also depending on the level of IR deletion by the liver. These data were confirmed in 1 year-old mice (Figure 6, panel C). Noteworthy, iLIRKO mice bearing no liver IR expression significantly induced plasma IGF-1 in 6 month- and 1 year-old mice as compared with controls (Figure 6, panels B and D respectively).

### **3.5. Increase of IR-A in pancreatic islets: beta cell lines expressing IR-A, but not IR-B, show increased proliferation in response to insulin or IGF-1**

The IR expression in pancreatic islets was significantly increased in iLIRKO mice (Figure 7, panel A). More importantly, the percentage of IR-A from total IR dramatically increased in these mice (Figure 7, panel A). In order to investigate a possible role of this change in the pattern of expression of the IR isoforms in the beta-cell hyperplasia, we performed experiments of BrdU incorporation in pancreatic islets of 6-month-old control and iLIRKO mice in presence of 10 nM insulin or 10 nM IGF-1. The results showed that the islets of iLIRKO mice were significantly more sensitive to the IGF-1-induced proliferation than those control islets. Previous data indicated that IR-A was 2-fold more sensitive than IR-B in response to insulin regarding glycogen synthesis and also mitogenesis (22). To assess those results in mouse beta cells, we have generated beta cell lines bearing IR (IRLoxP), lacking IR (IRKO), expressing exclusively IR-A (Rec A), or alternatively expressing IR-B (Rec B) (Figure 7, panel C). Moreover, the generated cell lines were completely functional as assessed by IR and IGF-1R phosphorylation experiments (Figure 7, panel D). The lack of IR significantly decreased basal glucose uptake in beta cells. Reconstitution with IR-A, but not with IR-B, restored basal glucose



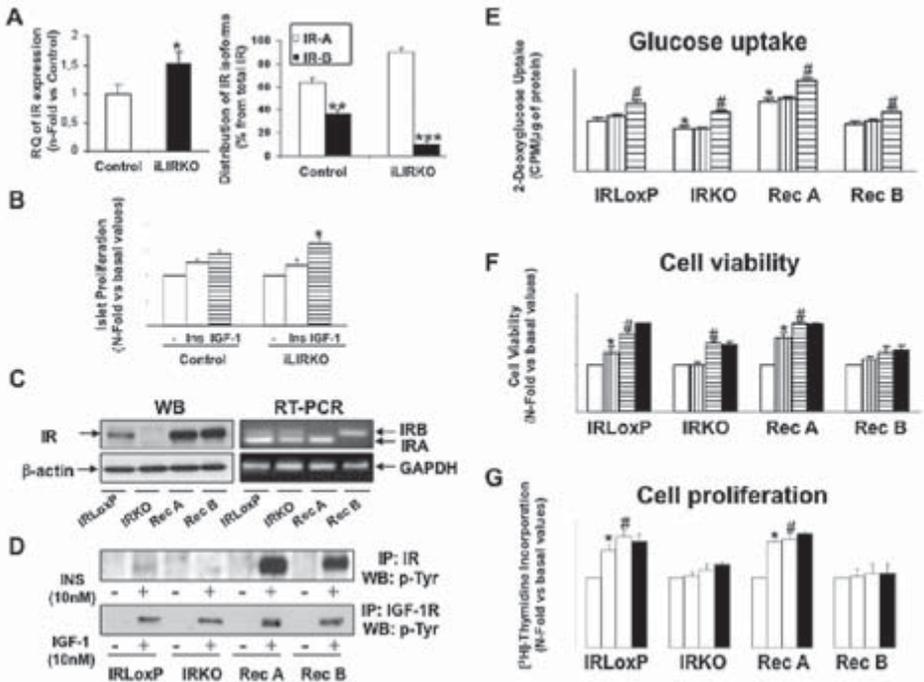
**Figure 6. Progressive IGF-1 Liver Expression, Beta-Cell Hyperplasia and Insulin Secretion Defect with Aging in iLIRKO.** **A)** Liver extracts from 6-month-old Control and iLIRKO mice with different IR deletion were analyzed by Western blot. The autoradiograms of IGF-1 were quantified by scanning densitometry from four independent experiments. **B)** (Upper panel) Beta cell mass was determined in 6-month-old Control (white bars) and iLIRKO mice with different grade of IR deletion. Results were shown as fold increase of Control beta cell mass. Data shown are from five independent experiments. (Lower-Left panel) Plasma insulin content was measured in 6-month-old male Control (white bars) and iLIRKO mice with different grade of IR deletion. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4). (Lower-Right panel) Plasma IGF-1 content was measured in 6-month-old male Control (white bars) and iLIRKO mice with different grade of IR deletion by RIA. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4). **C)** Liver extracts from 1-year-old Control and iLIRKO mice were analyzed by Western blot. A representative experiment out of four is shown. **D)** (Upper panel) Beta cell mass was evaluated by point counting morphometry in 1-year-old Control and iLIRKO mice. Results were shown as fold increase of Control beta cell mass. (Lower-Left panel) Plasma insulin content was measured in 1-year-old male Control and iLIRKO mice by RIA. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4). (Lower-Right panel) Plasma IGF-1 content was measured in 1-year-old male Control and iLIRKO mice by RIA. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=4). \*P < 0.05; \*\*P < 0.005; \*\*\*P < 0.001 iLIRKO vs Control.

uptake to levels higher than those observed in control cells (Figure 7, panel E). In addition, insulin or IGF-1 enhanced cell viability in control cells. In the same way, IGF-1 induced cell viability in beta cells lacking IR. Rec A but not Rec B cells, increased cell viability in response to either insulin or IGF-1 (Figure 7, panel F). More importantly, insulin or IGF-1 increased proliferation, as estimated by thymidine incorporation, in control beta cells. However, beta cells lacking IR did not respond to IGF-1. Finally, insulin and IGF-1 induced proliferation in Rec A but not in Rec B cells (Figure 7, panel G).

#### 4. DISCUSSION

Insulin promotes both metabolism and growth in the liver. Constitutive ablation of IR in liver resulted in both metabolic changes and a reduction in liver size by about 50% (8). Likewise, mice in which there is variable IR deletion (cellular mosaicism) exhibit different degrees of growth retardation and metabolic abnormalities depending on the extent of IR deletion (23). Those findings suggest that insulin regulates growth independently of metabolism and that the IR number is an important determinant of the insulin action specificity. Using the approach to generate LIRKO mice in an inducible manner, we were able to induce variable IR deletion (liver mosaicism). As a result, iLIRKO induced progressive insulin resistance and glucose intolerance without growth retardation. Under our experimental conditions, the insulin-induced effect on growth and metabolic regulation are mutually independent. Thus, while the late IR deletion gave rise to irreversible insulin resistance and progressive glucose intolerance for over one year, no liver damage was observed.

Previous tissue specific knockout and tissue specific reconstitution studies concluded that the progression of insulin resistance to diabetes with fasting hyperglycemia requires defects in tissues other than liver (7, 8). More importantly, acute IR deletion by the liver although impaired insulin signaling did not induce insulin resistance or hyperinsulinemia (24). Our results show that liver-specific disruption of IR could produce impaired hepatic and extra hepatic



**Figure 7. Increase of IR-A in pancreatic islets: Rec A but not Rec B cells show increased proliferation in response to insulin or IGF-1.** **A)** mRNA levels of IR and the isoforms distribution were analyzed by qPCR in 6-month-old Control and iLIRKO mice. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4). \*P < 0.05; \*\*P < 0.005; \*\*\*P < 0.001 iLIRKO vs Control. **B)** Pancreatic islets proliferation was assessed by BrdU incorporation in 6-month-old Control and iLIRKO mice. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4). \*P < 0.05. **C)** IR expression was analyzed by Western Blot and RT-PCR in IRLoxP, IRKO, Rec A and Rec B beta cells. A representative experiment out of four is shown. **D)** Functional assessment of IR reconstitution was carried out by phosphorylation experiments. **E)** Glucose uptake induced by Insulin (vertical striped bars) or IGF-1 (horizontal striped bars) was measured in each cell line. Statistical significance was carried out by Student's t test by comparison of IRKO and Rec A with IRLoxP beta cells respectively (\*, P < 0.05). **F)** Cell viability was measured in each cell line by violet crystal staining after a 24h treatment with 10 nM Insulin (vertical striped bars), 10 nM IGF-1 (horizontal striped bars) or both (black bars). Statistical significance was carried out by Student's t test by comparison of basal conditions with insulin-stimulated conditions of each cell line (\*, P < 0.05) or basal conditions with IGF-1-stimulated conditions of each cell line (#, P < 0.05). **G)** Cell proliferation was measured in each cell line by Thymidine incorporation after a 24h treatment with 10 nM Insulin (vertical striped bars), 10 nM IGF-1 (horizontal striped bars) or both (black bars). Statistical significance was carried out by Student's t test by comparison of basal conditions with insulin-stimulated conditions of each cell line (\*, P < 0.05) or basal conditions with IGF-1-stimulated conditions of each cell line (#, P < 0.05).

insulin signaling and that the severity of this resistance depends on the level of IR deletion; iLIRKO mice suffer early insulin resistance, as a primary defect, directly related to the ablation of IR, but also have impaired insulin signaling in extra hepatic tissues. Thus, iLIRKO mice induce late insulin resistance, as a secondary effect. Given the fact that IR expression in those tissues was not affected, this effect may be likely due to IR desensitisation due to prolonged hyperinsulinemia. Our results demonstrate that a primary defect in the liver triggers a secondary insulin resistance in extra hepatic tissues. Accordingly, the progression to diabetes only requires defects in the liver as observed in iLIRKO mice.

Insulin resistance is associated with hyperinsulinemia and leads to beta-cell hyperplasia. Thus, early IR deletion by the liver in constitutive LIRKO induced beta-cell hyperplasia (8). However, in mice in which was created muscle-specific insulin resistance by conditional inactivation of the IR (MIRKO mice, 11), no islet hyperplasia was found in response to the isolated muscle insulin resistance. More importantly, insulin levels are elevated in most states of insulin resistance, including the LIRKO mouse, but are not elevated in MIRKO mouse. Our results with iLIRKO demonstrate a direct relationship between the level of IR deletion by the liver and the fold-increase of plasma insulin levels and also beta-cell mass. Finally, constitutive LIRKO developed hypersecretion of insulin for more than one year. However, in iLIRKO mice compensatory hyperinsulinemia in 1 year-old mice was much lower than in 6 month-old mice. Thus, a failure in the beta cells insulin secretion seems to occur, given the fact of the inhibition of the insulin clearance by the liver, the major site of insulin degradation in an IR-dependent manner (25). More importantly, iLIRKO suggests that owing to severe insulin resistance and prolonged hypersecretion of insulin, the beta cells ultimately undergo a failure in insulin secretion.

Previous evidence demonstrated that insulin signaling is essential for beta-cell growth (10, 26). Just recently, IR double null allele in the liver and in the beta cells failed to induce beta-cell hyperplasia in response to severe insulin resistance. In fact, the persistence of robust hyperplasia in six month-old hypoglycemic LIRKO mice supports the concept of a glucose-independent circulating islet growth factor (27). In this context, iLIRKO mice induced IGF-1

expression in parallel to IR deletion in the liver. This resulted in a persistent increase of plasma IGF-1, consistent with the fact that the liver is the main source of circulating IGF-1 (28). Previous data demonstrated that IGF-1R in the beta-cell is not crucial for islet  $\beta$ -cell mass growth, but participates in control of differentiated function (29). In fact, we have found a relationship among beta-cell hyperplasia, hyperinsulinemia and an increase of genes related to beta-cell proliferation and differentiation in iLIRKO mice. Thus, IGF-1 signaling might be involved in the induction of genes related to glucose-stimulated insulin secretion among others. However, IGFBPs regulates the IGF-1 systemic effect in a complex manner (30). More importantly, iLIRKO mice induced IGFBP1 in parallel to IGF-1 depending on the level of IR deletion by the liver. These results are entirely consistent with the insulin-mediated effect on the IGFBP1 gene expression by the liver cells (31). IGFBP1, which is mainly produced by the liver in the adult mice, inhibits IGF-dependent cellular growth *in vivo* (30, 32, 33). In addition, adult transgenic mice showed glucose intolerance and fasting hyperglycemia and hyperinsulinemia. However, the hyperinsulinemia observed in IGFBP1 transgenic mice can not be attributable to insulin resistance alone (34, 35). In fact, adult transgenic mice showed larger and more numerous beta-cell islets and also an increased beta-cell proliferation (36). Finally, iLIRKO mice showed an increase in the IR expression in the pancreatic islets. More importantly, an increase in the proportion of IR-A versus IR-B in the total percentage of IR was observed in pancreatic islets from iLIRKO mice. On this regard, it was previously reported that IGF-2 and also IGF-1 showed a high affinity to IR-A (37). In addition, BrdU incorporation experiments performed in pancreatic islets isolated from 6-month-old control and iLIRKO mice revealed that the islets from iLIRKO mice were significantly more sensitive to the IGF-1-induced proliferation. Moreover, as assessed in mouse beta-cell lines, occurrence mostly of IR-A in pancreatic islets from iLIRKO mice might imply firstly, an increase in the rate of glucose uptake, a mitogenic signal in beta cells independently of insulin (17) and secondly, an enhanced proliferation in response to either insulin or IGF-1. Taking together, IR-A, but not IR-B, confers a proliferative capability to beta-cells in response to insulin or IGF-1 that may account for beta-cell hyperplasia induced by liver insulin resistance in iLIRKO mice.

In conclusion, our results showed that a defect in the liver leads to an overall insulin resistance. Given the fact that insulin resistance states course with compensatory beta-cell hyperplasia, iLIRKO studies have pointed out a cause and effect relationship between progressive insulin resistance and beta-cell hyperplasia. Ultimately, the beta cells could undergo a failure in the insulin secretion that leads to uncontrolled diabetes. Thus, in these mice, isolated hepatic insulin resistance is sufficient to recapitulate the progressive pathogenesis of type 2 diabetes. In this context, iLIRKO mice induced IGF-1 expression in parallel to IR deletion in the liver. This resulted in a persistent increase of circulating IGF-1. Concurrently, there was a huge increase of IR-A in the total percentage of IR in the hyperplastic pancreatic islets from iLIRKO mice. Thus, our results in iLIRKO mice suggest a liver-pancreatic endocrine axis, IGF-1 being a liver factor that might contribute to compensatory beta-cell hyperplasia through IR-A.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants SAF2005/00014 and SAF2007/60058, from Ministerio de Educación y Ciencia and Red Temática de Investigación Cooperativa en Diabetes RD06/0015/0005, from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain. We gratefully acknowledge the technical expertise of Dr. J. A. López García-Asenjo, Surgery Pathology Branch, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain.

## 6. REFERENCES

1. Kahn, C. R. (1994) Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type 2 diabetes. *Diabetes*. 43: 1066-1084.
2. Kahn, C. R. (1995) Diabetes. Causes of insulin resistance. *Nature*. 373: 384-385.
3. Nandi, A.; Kitamura, Y.; Kahn, C. R. & Accili, D. (2004) Mouse models of insulin resistance. *Physiol. Rev.* 84: 623-647.
4. Kitamura, T.; Kahn, C. R. & Accili, A. (2003) IR knockout mice. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 313-332.
5. Accili, D.; Drago, J.; Lee, E. J.; Johnson, M. D.; Cool, M. H.; Salvatore, P.; Asico, L. D.; José, P. A.; Taylor, S. I. & Westphal, H. D. (1996) Early neonatal

- death in mice homozygous for a null allele of the IR gene. *Nat. Genet.* 12: 106-109.
6. Joshi I, R. L.; Lamothe, B.; Cordonnier, N.; Mesbah, K.; Monthieux, E.; Jami, J. & Buchini I, D. (1996) Targeted disruption of the IR gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J.* 15: 1542-1547.
  7. Okamoto, H.; Nakae, J.; Kitamura, T.; Park, B. C.; Dragatsis, I. & Accili, D. (2004) Transgenic rescue of IR-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 114: 214-223.
  8. Michael, M. D.; Kulkarni, R. N.; Postic, C.; Previs, S. F.; Shulman, G. I.; Magnuson, M. A. & Kahn, C. R. (2000) Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell.* 6: 87-97.
  9. Bruning, J. C.; Gautam, D.; Burks, D. J.; Gillete, J.; Schubert, M.; Orban, P. C.; Klein, R.; Krone, W.; Muller-Wieland, D. & Kahn C. R. (2000) Role of brain IR in control of body weight and reproduction. *Science.* 289: 2122-2155.
  10. Kulkarni, R. N.; Bruning, J. C.; Winnay, J. N.; Postic, C.; Magnuson, M. A. & Kahn, C. R. (1999) Tissue-specific knockout of the IR in pancreatic b cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell.* 96: 329-339.
  11. Bruning, J. C.; Michael, M. D.; Winnay, J. N.; Hayashi, T.; Horsch, D.; Accili, D.; Goodyear, L. J. & Kahn, C. R. (1998) A muscle-specific IR knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell.* 2: 559-569.
  12. Kühn, R.; Schwenk, F.; Aguet, M. & Rajewsky, K. (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science.* 269: 1427-1429.
  13. Valverde, A. M.; Lorenzo, M.; Pons, S.; White, M. F. & Benito, M. (1998) IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/IGF-1 pathways in fetal brown adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 12: 688-697.
  14. Guerra, C.; Navarro, P.; Valverde, A. M.; Arribas, M.; Bruning, J.; Kozak, L. P.; Kahn, C. R. & Benito, M. (2001) Brown adipose tissue-specific IR knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 108: 1205-1213.
  15. Weibel, E. R. (1979) *Practical Research Design and Research Design and Methods for Biological Morphometry.* London Academic Press, London.
  16. Bonner-Weir, S.; Deery, D.; Leahy, J. L. & Weir, G. C. (1989) Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes.* 38: 49-53.
  17. Guillén, C.; Navarro, P.; Robledo, M.; Valverde, A. M. & Benito, M. (2006) Differential mitogenic signaling in IR-deficient fetal pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* 147: 1959-1968.
  18. Nevado, C.; Benito, M. & Valverde, A. M. (2008) Role of IR and Balance in IR Isoforms A and B in Regulation of Apoptosis in Simian Virus 40-immortalized Neonatal Hepatocytes. *Mol. Cell Biol.* 19: 1185-1198.
  19. Escribano, O.; Arribas, M.; Valverde, A. M. & Benito, M. (2007) IRS-3 mediates insulin-induced glucose uptake in differentiated IRS-2(-/-) brown adipocytes. *Mol. Cell Endocrinol.* 30: 1-9.

20. Escribano, O.; Fernández-Moreno, M. D.; Zueco, J. A.; Menor, C.; Fueyo, J.; Ropero, R. M.; Díaz-Laviada, I.; Román, I. D. & Guijarro, L. G. (2003) Insulin receptor substrate-4 signaling in quiescent rat hepatocytes and in regenerating rat liver. *Hepatology*. 37: 1461-1469.
21. Flier, S. N.; Kulkarni, R. N. & Kahn, C. R. (2001) Evidence for a circulating islet cell growth factor in insulin-resistant status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 7475-7480.
22. McClain, D. A. (1991) Different ligand affinities of the two human IR splice variants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol. Endocrinol.* 5: 734-739.
23. Kitamura, T.; Kitamura, Y.; Nakae, J.; Giordano, A.; Cinti, S.; Kkahn, C. R.; Efstratiadis, A. & Accili, D. (2004) Mosaic analysis of IR function. *J. Clin. Invest.* 113: 209-219.
24. Buettner, C.; Patel, R.; Muse, E. D.; Bhanot, S.; Monia, B. P.; McKay, R.; Obici, S. & Rossetti, L. (2005) Severe impairment in liver insulin signaling fails to alter hepatic insulin action in conscious mice. *J. Clin. Invest.* 115: 1306-1313.
25. Duckworth, W. C.; Bennett, R. G. & Hamel, F. G. (1998) Insulin degradation: Progress and potential. *Endocrine Reviews*. 19: 608-624.
26. Withers, D. J.; Gutiérrez, J. S.; Towery, H.; Burks, D. J.; Ren, J. M.; Previs, S.; Zhang, Y.; Bernal, D.; Pons, S.; Shulman, G. I.; Bonner-Weir, S. & White, M. F. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 391: 900-904.
27. Okada, T.; Liew, C. W.; Hu, J.; Hinault, C.; Michael, M. D.; Krutzfeld, J.; Yin, C.; Holzember, M.; Stoffel, M. & Kulkarni, R. N. (2007) Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 8977-8982.
28. Yakar, S.; Rosen, C. J.; Beamer, W. G.; Ackert-Bicknell, C. L.; Wu, Y.; Liu, J. L.; Ooi, G. T.; Setser, J.; Frystyk, J.; Boisclair, Y. R. & Leroith, D. (2002) Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J. Clin. Invest.* 110: 771-781.
29. Kulkarni, R. N.; Holzenberger, M.; Shih, D. Q.; Ozcan, U.; Stoffel, M.; Magnuson, M. A. & Kahn, C. R. (2002)  $\beta$ -cell-specific deletion of the IGF1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter  $\beta$ -cell mass. *Nature Genetics* 31: 111-115.
30. Schneider, M. R.; Lahm, H.; Wu, M.; Hoefflich, A. & Wolf, E. (2000) Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins. *FASEB J.* 14: 629-640.
31. Guo, S.; Rena, G.; Cichy, S.; He, X.; Cohen, P. & Unterman, T. (1999) Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J. Biol. Chem.* 274: 17184-17192.
32. Gay, E.; Seurin, D.; Babajko, S.; Doublier, S.; Cazillis, M. & Binoux, M. (1997) Liver-specific expression of human insulin-like growth factor binding protein-

- 1 in transgenic mice: repercussions on reproduction, ante- and perinatal mortality and postnatal growth. *Endocrinology*. 138: 2937-2947.
33. Rajkumar, K.; Barron, F.; Lewitt, M. S. & Murphy, L. J. (1995) Growth retardation and hyperglycemia in insulin like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *Endocrinology*. 136, 4029-4034.
  34. Rajkumar, K.; Dheen, S. T. & Murphy, L. J. (1996) Hyperglycemia and impaired glucose tolerance in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *Am. J. Physiol.* 270: E565-E571.
  35. Rajkumar, K.; Krsek, M.; Dheen, S. T. & Murphy, L. J. (1996) Impaired glucose homeostasis in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 98: 1818-1825.
  36. Dheen, S. T.; Rajkumar, K. & Murphy, L. J. (1997) Islet cell proliferation and apoptosis in insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice. *J. Endocrinol.* 155: 551-558.
  37. Denley, A.; Bonython, E. R.; Booker, G. W.; Cosgrove, L. J.; Forbes, B. E.; Ward, C. W. & Wallace, J. C. (2004) Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol. Endocrinol.* 18: 2502-2512.

\* **Información de contacto:**

Dr. Manuel Benito de las Heras.

Department of Biochemistry and Molecular Biology II. Faculty of Pharmacy.

Complutense University of Madrid, Spain.

Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid.

Telf.: +34 91 394 17 77. Fax: +34 91 394 17 79

Email: [benito@farm.ucm.es](mailto:benito@farm.ucm.es)

**Abbreviations:** **iLIRKO**, Inducible Liver-specific IR KnockOut mouse. **IGF-I**, Insulin-like Growth Factor type I. **PEPCK**, Phosphoenol pyruvate carboxykinase. **FAS**, Fatty acid synthase. **GK**, Glucokinase. **IR**, Insulin Receptor. **IR-A**, insulin receptor A isoform. **IR-B**, insulin receptor B isoform. **BAT**, brown adipose tissue. **WAT**, white adipose tissue.

## Aplicación de la topología molecular para la predicción de la actividad anti-VIH-1 de un grupo de compuestos análogos del aciclovir y ganciclovir

**Ramón García-Doménech<sup>\*</sup>, Mayra C. Montealegre, Edwige G. Nagham, Nancy Sandoval, Manuel Santana, Jorge Gálvez**

<sup>\*</sup> Departamento de Química Física, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia

Avda. V. A. Estellés, s/n, 46100-Burjassot, Valencia, Spain.

Recibido el 27 de julio de 2009

### RESUMEN

Usando el análisis de regresión multilíneal, se ha propuesto un modelo topológico-matemático de predicción de la actividad anti-VIH-1 para un grupo de compuestos análogos al aciclovir y ganciclovir. La caracterización estructural de cada compuesto se ha conseguido a través de índices topológicos. El modelo seleccionado para la predicción de la concentración eficaz 50 está formado por cuatro variables ( $R^2 = 0.8762$  y  $Q^2 = 0.8216$ ). La validación del modelo se ha hecho a través de los test de crovalidación, validación interna y aleatoriedad. Los resultados obtenidos confirman la capacidad de predicción de la propiedad estudiada.

**Palabras clave:** Topología molecular; Análisis de regresión multilíneal; Relaciones cuantitativas estructura-actividad; Actividad anti-VIH-1; Análogos del aciclovir y ganciclovir.

## ABSTRACT

### Application of the molecular topology to the prediction of anti-HIV-1 activity by acyclovir and ganciclovir analogs

By using multilinear regression analysis, a topological-mathematical model has been built to predict the anti-HIV-1 activity for a group of acyclovir and ganciclovir analogs. The structural depiction was performed by using topological indices and one model with four variables for the prediction of  $EC_{50}$  ( $R^2 = 0.8762$  and  $Q^2 = 0.8216$ ) was selected. The model was checked by cross-validation, internal validation and randomization test. The results confirm its capability to predict the property analyzed.

**Keywords:** Molecular topology; Multilinear regression analysis; Quantitative structure-activity relationships; anti-HIV-1 activity; acyclovir and ganciclovir analogs.

## 1. INTRODUCCIÓN

El SIDA es la enfermedad que se desarrolla como consecuencia de la destrucción progresiva del sistema inmunitario (de las defensas del organismo), producida por un virus descubierto en 1983 y denominado Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

La palabra SIDA proviene de las iniciales de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, que consiste en la incapacidad del sistema inmunitario para hacer frente a las infecciones y otros procesos patológicos. Existen dos subtipos de virus de inmunodeficiencia, el VIH-1 y el VIH-2.

En la actualidad el SIDA sigue siendo un gran problema de salud pública con una prevalencia global de 33,2 millones de casos y una incidencia de 2,5 millones de casos, de acuerdo con los datos más recientes en 2007 de ONUSIDA/OMS sobre la pandemia (1).

Existen alrededor de quince fármacos que se están utilizando en el tratamiento de la infección por el VIH. El tratamiento incluye la combinación de varios fármacos anti-retrovirales que evitan el deterioro inmunológico y suprimen la replicación viral (2).

La administración de estos fármacos anti-retrovirales ha permitido alargar considerablemente la supervivencia de los sujetos seropositivos, de manera que la enfermedad se ha convertido en un proceso crónico. La terapia anti-retroviral es compleja y supone la administración de al menos tres fármacos (triple terapia) con un elevado número de tomas y de comprimidos por día, lo que acarrea la existencia de efectos adversos e interacciones con otros fármacos. Todo ello hace que se siga investigando con el objetivo de encontrar nuevos fármacos más seguros y eficaces.

El aciclovir y el ganciclovir son dos antivíricos muy efectivos frente al virus del herpes simples y de la varicela zoster. Estos compuestos también han mostrado cierta actividad como agentes anti-VIH-1. Ante la posibilidad de poder constituir una nueva diana terapéutica, Almerico *et al.* han investigado recientemente la actividad anti-VIH-1 para un grupo de compuestos sintetizados análogos al aciclovir y ganciclovir, realizando posteriormente estudios encaminados a buscar las correspondientes relaciones estructura-actividad (3).

Para la búsqueda de modelos de predicción, la topología molecular ha demostrado ser una herramienta útil y eficaz. A través de ella, cada compuesto viene identificado por un conjunto de descriptores topológicos, los cuales caracterizan estructuralmente a esa molécula y pueden utilizarse en la búsqueda de modelos topológicos-matemáticos para la selección y diseño de nuevos compuestos activos en diferentes áreas terapéuticas (4-10).

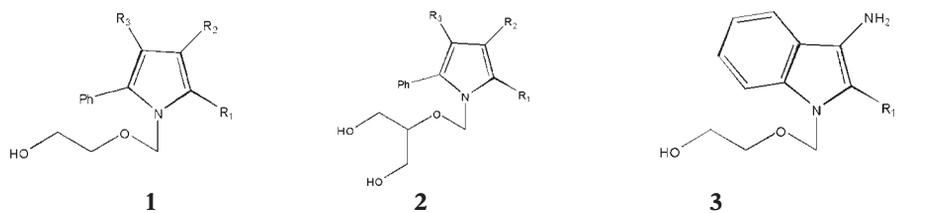
En este trabajo se estudia la actividad anti-VIH-1 de un grupo de compuestos análogos al aciclovir y ganciclovir para la búsqueda de un modelo de predicción de dicha actividad usando la topología molecular y el análisis de regresión multilínea.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Compuestos y actividad biológica estudiada**

Para este estudio se seleccionaron un grupo de 30 compuestos derivados del aciclovir y ganciclovir, cuyas estructuras aparecen reflejadas en la Tabla 1. Los valores experimentales de actividad para cada compuesto vienen cuantificados a través de la concentración eficaz 50,  $CE_{50}$  expresada en unidades de concentración micromolar (3).

Tabla 1. Estructura química de cada uno de los compuestos estudiados, así como los valores de actividad [ $CE_{50}$  ( $\mu\text{M}$ )] experimental, su transformación logarítmica,  $pCE_{50} = \text{Log}1/CE_{50}$ , y valores calculados a partir del modelo topológico seleccionado,  $pCE_{50}\text{calc}$ , y a través de la crovalidación,  $pCE_{50}(\text{cv})^c$



compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	EC50 <sup>a</sup> ( $\mu\text{M}$ )	pEC <sub>50</sub> exp	pEC <sub>50</sub> calc <sup>b</sup>	pEC <sub>50</sub> (cv) <sup>c</sup>
1a	Me	COOEt	Cl	11.1	4.954	4.847	4.806
1b	Me	COOEt	NO <sub>2</sub>	33.3	4.477	4.657	4.705
1c	Ph	H	NO <sub>2</sub>	4.5	5.342	5.273	5.259
1d	Ph	Br	Br	5.3	5.279	5.297	5.300
1e	Ph	COOEt	Br	6.3	5.204	5.054	5.046
1f	Ph	COOEt	NO <sub>2</sub>	16.7	4.778	4.707	4.696
1g	Ph	CN	NO <sub>2</sub>	33.3	4.477	4.580	4.589
1h	Ph	Ph	Br	1.5	5.819	5.635	5.600
1i	Ph	Ph	NO <sub>2</sub>	3.7	5.431	5.472	5.479
1k	Ph	CN	NH <sub>2</sub>	33.3	4.477	4.573	4.589
1l	Ph	Ph	NH <sub>2</sub>	4.2	5.380	5.330	5.326
1m	Ph	COOH	NO <sub>2</sub>	33.3	4.477	4.506	4.510
1n	Ph	PH	N <sub>3</sub>	6.7	5.176	5.266	5.289
2a	Ph	Ph	Br	3.0	5.518	5.709	5.762
2b	Ph	Ph	NO <sub>2</sub>	4.5	5.342	5.526	5.559
2c	Ph	CN	Br	20.0	4.699	4.931	4.958
2d	Ph	CN	NO <sub>2</sub>	20.0	4.699	4.617	4.610
2e	Ph	COOEt	Br	12.5	4.903	5.107	5.129
2f	Ph	COOEt	NO <sub>2</sub>	16.7	4.778	4.751	4.746
2g	Me	COOEt	NO <sub>2</sub>	20.0	4.699	4.642	4.635
2h	Ph	CN	NH <sub>2</sub>	20.0	4.699	4.623	4.609
2i	Ph	Ph	NH <sub>2</sub>	1.5	5.819	5.404	5.344
2j	Ph	COOEt	NH <sub>2</sub>	20.0	4.699	4.797	4.809
2k	Ph	COOEt	NH <sub>2</sub>	20.0	4.699	4.700	4.701
2l	Ph	Ph	N <sub>3</sub>	5.0	5.301	5.310	5.312
2m	Ph	CN	N <sub>3</sub>	20.0	4.699	4.600	4.591
2n	Ph	COOEt	N <sub>3</sub>	20.0	4.699	4.644	4.626
2o	Me	COOEt	N <sub>3</sub>	20.0	4.699	4.602	4.577
3h	Ph			11.1	4.954	5.103	5.227
3i	2-Pyr			5.0	5.301	5.217	5.166

<sup>a</sup> obtenidos de la referencia (3)

<sup>b</sup> obtenidos a partir de la Eq. 1.

<sup>c</sup> obtenidos del análisis de crovalidación realizado con la Eq. 1.

## 2.2. Descriptores topológicos utilizados

La caracterización topológica de cada molécula se realiza a través del correspondiente grafo molecular, en donde cada vértice representa a un átomo y cada eje a las conexiones existentes entre ellos. A partir del grafo se construye la matriz topológica cuyos elementos adquieren valores nulos o no, en función de las conexiones existentes entre dichos elementos en el grafo. El tratamiento posterior de la matriz topológica conduce a los índices de conectividad que caracterizan a ese grafo de una manera rápida y sencilla.

En este trabajo se han utilizado un grupo de descriptores bien conocidos tales como: índices de conectividad tipo Randić-Kier-Hall hasta orden cuarto ( ${}^m\chi_t$ ,  ${}^m\chi_t^v$ ) (11, 12), índices de carga topológica, ICT, hasta orden quinto ( $J_m$ ,  $G_m$ ,  $J_m^v$ ,  $G_m^v$ ) (13), cocientes y diferencias entre índices de conectividad de valencia y de no valencia ( ${}^mC_t = {}^m\chi_t / {}^m\chi_t^v$  and  ${}^mD_t = {}^m\chi_t - {}^m\chi_t^v$ ), así como el índice de Wiener (14) y otros índices tales como N (número de átomos en la molécula diferentes al hidrógeno), PRn (pares de ramificaciones separados por una distancia n), Vn (número de vértices con valencia n) y la longitud topológica de la molécula L (distancia topológica mínima que separan a los átomos más alejados entre sí). En total, cada compuesto fue caracterizado con una serie de 62 índices. Todos los descriptores usados en este trabajo han sido obtenidos a través del programa Desmol11 (disponible vía e-mail) (15).

## 2.3. Algoritmo QSAR: Análisis de regresión multilínea

El estudio de regresión multilínea se ha realizado con ayuda del programa BMDP 9R (16), utilizando los índices topológicos como variables independientes y la concentración eficaz 50,  $CE_{50}$ , como variable dependiente.

El estudio estadístico de la función seleccionada se hace atendiendo al número de casos utilizados N, el porcentaje de la varianza explicada  $R^2$ , el error estándar de estimación, EEE, el valor F de Fisher-Snedecor y la significación estadística p.

La calidad predictiva y la robustez del modelo de predicción seleccionado debe de someterse a un test de validación. Las estrate-

gias que se suelen adoptar son (17): *a*) Crosvalidación; *b*) validación interna dividiendo la serie de compuestos estudiada en un grupo de entrenamiento y un grupo test; *c*) validación externa con un grupo test no usado en la búsqueda de la función de predicción; *d*) análisis de aleatoriedad y estabilidad. En este trabajo utilizaremos las estrategias (a, b y d) como criterio de validación.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Partiendo del trabajo desarrollado recientemente por Almerico *et al.* (3) en el que realizaron un estudio QSAR con un grupo formado por 30 compuestos análogos al aciclovir y ganciclovir y sus correspondientes datos de actividad anti-VIH-1, se utilizó el análisis de regresión multilíneal para la búsqueda del modelo de predicción de actividad usando la concentración eficaz 50 en su transformación logarítmica,  $pCE_{50} = \text{Log}1/CE_{50}$  como variable dependiente y el con-

Tabla 2. Análisis de regresión multilíneal realizado con  $pCE_{50}$  y diferentes números de variables

Variables	$r^2$	SEE
$J_3^v$	0.5558	0.2677
$^1\chi^v, G_2$	0.7818	0.1910
$2\chi^v, G_2, L$	0.8324	0.1704
$^1\chi^v, G_2, G_5^v, J_4^v$	<b>0.8762</b>	<b>0.1495</b>
$J_2, J_4^v, J_5^v, ^4D_{pc}, L$	0.8884	0.1449

#### Ecuación de predicción seleccionada

	Coefficiente	Std. Err.	p
Intercept	3.807	0.445	0.0000
$^1\chi^v$	0.437	0.044	0.0000
$G_2$	-0.316	0.042	0.0000
$G_5^v$	-0.433	0.105	0.0004
$J_4^v$	15.020	3.744	0.0005
N = 30	$R^2 = 0.8762$	$Q^2 = 0.8216$	
$F(4,25) = 44.3$	$p < 0.00000$	$EEE = 0.14493$	

junto de 62 descriptores calculados para cada compuesto como variables independientes.

La Tabla 2 recoge los resultados estadísticos obtenidos en función del número de variables seleccionadas. La agrupación de variables que mejor correlaciona la actividad anti-VIH-1 es la formada por cuatro descriptores ( $R^2 = 0.8762$  y  $EEE = 0.145$ ). Todos ellos son estadísticamente significativos con valores de  $p \leq 0.0005$ . La incorporación de nuevas variables apenas modifican los parámetros anteriores.

La ecuación seleccionada fue:

$$pCE_{50} = 3.807 + 0.437 \ ^1\chi^v - 0.316G_2 - 0.433G_5^v + 15.020J_4^v \quad \text{Eq. 1}$$

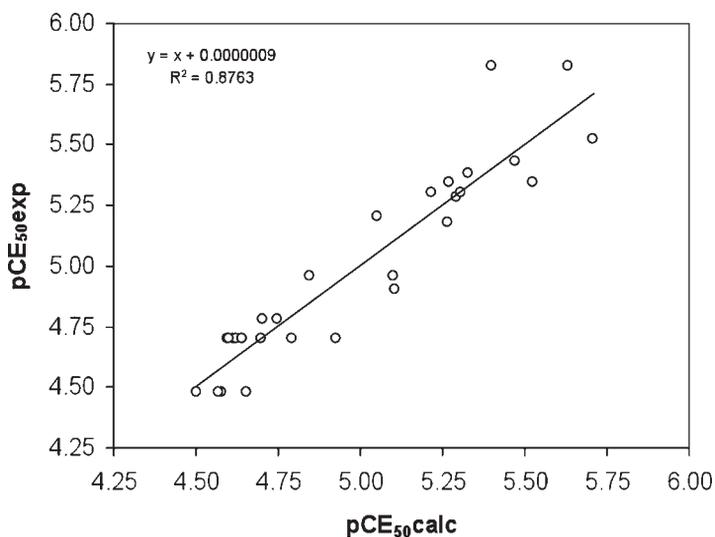
$$N = 30 \quad R^2 = 0.8762 \quad EEE = 0.145 \quad Q^2 = 0.8216 \quad F(4,25) = 44.3 \\ p < 0.00001$$

Los índices topológicos que aparecen en la ecuación evalúan por una parte las transferencias de carga intramolecular,  $G_2$ ,  $G_5^v$  y  $J_4^v$ , así como la ramificación y el ensamblaje topológico,  $^1\chi^v$ .

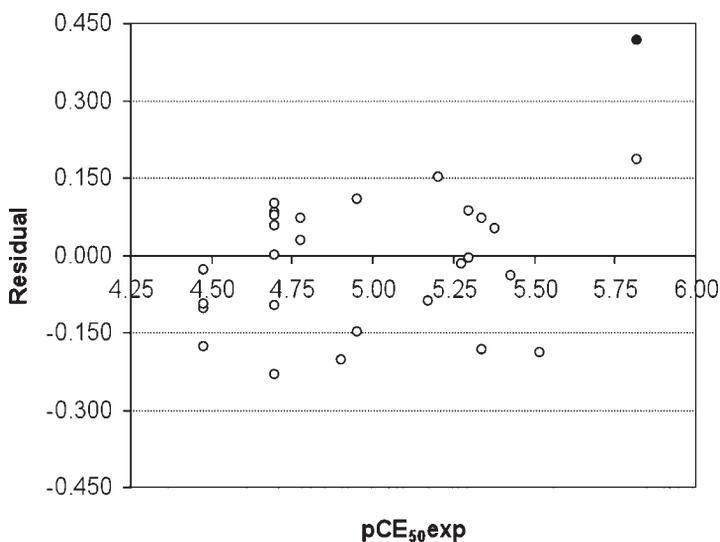
El modelo seleccionado es capaz de explicar más del 87% de la varianza de la propiedad correlacionada ( $R^2 = 0.8762$ ) con un error estándar de estimación inferior al 11% de la variabilidad en la que se mueve la propiedad ( $EEE = 0.145$ ).

La Tabla 1, columna 7, y las Figuras 1 y 2 muestran los resultados de predicción obtenidos para cada compuesto. Todos ellos, a excepción del compuesto 2i (punto negro marcado en la Figura 2), presentan residuales inferiores a  $\pm 2EEE$ , lo cual es indicativo de la bondad y calidad de la ecuación seleccionada.

El primer estudio de validación de la Eq. 1 fue una crossvalidación interna. Para ello se elimina un caso del grupo y se realiza el análisis de regresión utilizando los N-1 restantes compuestos y prediciendo el valor de la propiedad del compuesto eliminado. El proceso se repite tantas veces como compuestos forme el grupo. El valor del coeficiente de predicción  $Q^2$  nos informará sobre la calidad de la función seleccionada ( $Q^2$  ha de tomar un valor superior a 0.5 para poder considerar predictiva la función obtenida) (18). El coeficiente de predicción obtenido fue de  $Q^2 = 0.8216$ , ligeramente



**Figura 1.** Representación gráfica de  $pCE_{50}$  experimental y  $pCE_{50}$  calculado para cada compuesto a partir de la función topológica de predicción seleccionada.



**Figura 2.** Representación gráfica de los residuales ( $pCE_{50}exp - pCE_{50}calc$ ) frente a  $pCE_{50}$  experimental obtenidos para cada compuesto a partir de la función topológica de predicción seleccionada, Eq. 1.

inferior a la varianza de la ecuación seleccionada ( $R^2 = 0.8762$ ) y muy por encima del valor mínimo exigido ( $Q^2 > 0.5000$ ).

Los valores de pCE50 predichos en la crosvalidación para cada compuesto aparecen en la columna 8 de la Tabla 1. Los resultados son similares a los mostrados en la columna 7.

En una segunda etapa se realizó una validación interna dividiendo el grupo de compuestos estudiado en cinco subgrupos (A-E) conteniendo cada subgrupo aproximadamente el 20% de los compuestos analizados: serie A (1d, 1l, 2a, 2f, 2k, 3h); serie B (1e, 1k, 2b, 2g, 2l, 3i); serie C (1c, 1h, 1n, 2e, 2j, 2o); serie D (1b, 1g, 1m, 2d, 2i, 2n) y serie E (1a, 1f, 1l, 2c, 2h, 2m). Cuatro de los cinco subgrupos (A, B, C y D), (A, B, C y E), (A, B, D y E), (A, C, D y E) y (B, C, D y E) se utilizarán como grupo de entrenamiento, mientras que el subgrupo restante hará de grupo test. La ecuación de regresión obtenida con cada grupo de entrenamiento, usando los mismos descriptores, se utiliza para predecir la actividad de los compuestos del correspondiente grupo test.

La Tabla 3 muestra los valores de  $R^2$  y  $R^2_{\text{pred}}$  para cada grupo de entrenamiento y test analizado. La variabilidad de  $R^2$  y  $R^2_{\text{pred}}$  es pequeña para cada análisis y el valor promedio obtenido tanto para  $R^2$  como para  $R^2_{\text{pred}}$  ( $R^2 = 0.8813$  y  $R^2_{\text{pred}} = 0.8676$ ) es similar al de la función seleccionada,  $R^2 = 0.8762$ .

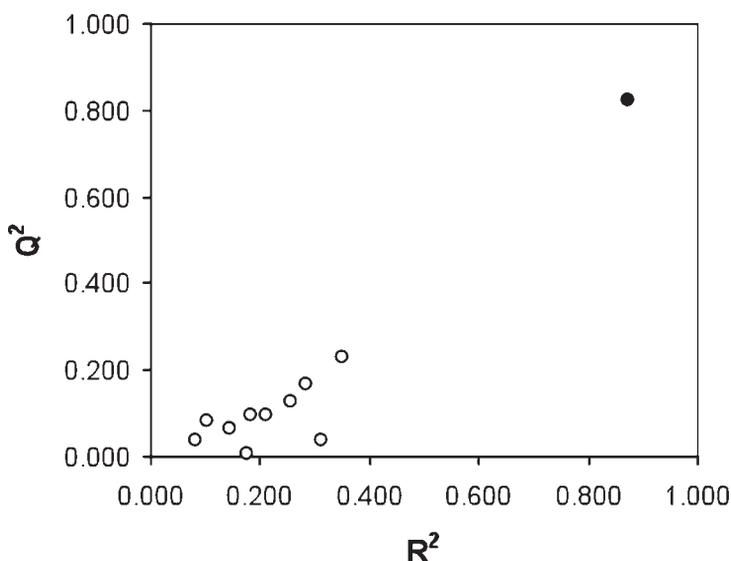
En una tercera etapa se realizó un análisis de aleatoriedad de la función topológica seleccionada. En este caso es aconsejable hacer-

Tabla 3. **Resultados del estudio de validación interna realizado al modelo de predicción seleccionado.**

Series entrenamiento	Serie test	$R^2$ (entrenamiento)	$R^2_{\text{pred}}$ (test)
A, B, C, D y E	—	0,8762	—
B, C, D y E	A	0,8770	0,9386
A, C, D y E	B	0,8740	0,8814
A, B, D y E	C	0,8739	0,8569
A, B, C, y E	D	0,9016	0,8892
A, B, C, y D	E	0,8853	0,7720
<b>Promedio</b>		<b>0,8813</b>	<b>0,8676</b>

lo, ya que la propiedad correlacionada se mueve en un estrecho margen de valores ( $pCE_{50\max} = 5.819$  y  $pCE_{50\min} = 4.477$ ). El análisis consiste en intercambiar aleatoriamente el valor de  $pCE_{50}$  entre los compuestos y regresionar utilizando los mismos descriptores de la Eq. 1. El proceso se repite varias veces (diez en nuestro caso), calculándose para cada uno los valores de  $R^2$  y  $Q^2$ .

La Figura 3 recoge los resultados obtenidos. Como era de esperar, la regresión obtenida en todos los casos, excepto cuando cada compuesto tiene asignado su valor real de  $pEC_{50}$ , es muy baja.



**Figura 3.** Estudio de aleatoriedad realizado con la función de predicción seleccionada.

Los resultados obtenidos en los tres test de validación realizados nos lleva a concluir que la función topológica de predicción de la actividad anti-VIH-1 para el grupo de compuestos estudiado es robusta y estable, pudiéndose utilizar en la predicción de esta propiedad para otros compuestos estructuralmente análogos a los estudiados.

Por último indicar que si comparamos los resultados obtenidos por nosotros con los de Almerico *et al.* (utilizando parámetros fisi-

coquímicos y topológicos obtenidos con los programas TSAR 3.2, VAMP 6.0 y ASP 3.2) (3) se observa una significativa diferencia: La mejor regresión obtenida por Almerico *et al.* fue usando seis variables ( $R^2 = 0.782$ ,  $EEE = 0.20$  y  $Q^2 = 0.667$ ), mientras que la nuestra, con cuatro variables y utilizando sólo descriptores topológicos, fue superior ( $R^2 = 0.8762$ ,  $EEE = 0.145$  y  $Q^2 = 0.8216$ ). Si a ello unimos la sencillez y rapidez de cálculo de los descriptores utilizados nos lleva a concluir que la topología es una herramienta de gran utilidad en la búsqueda de modelos de predicción QSAR.

#### 4. CONCLUSIONES

El principal objetivo de este trabajo ha sido la selección de un modelo matemático de predicción de la actividad anti-VIH-1 para un grupo de compuestos análogos al aciclovir y ganciclovir. Para ello se ha utilizado la topología molecular como herramienta para caracterizar la estructura de cada molécula de una forma rápida y sencilla. A partir del análisis de regresión multilínea y utilizando sólo descriptores topológicos, se ha propuesto un modelo topológico-matemático que permite la predicción de la actividad trabajando con la concentración eficaz 50. El modelo contiene cuatro variables capaces de explicar el 87,6% de la varianza de la propiedad estudiada.

La calidad de la ecuación de predicción seleccionada ha sido validada a través de una crovalidación, test interno y test de aleatoriedad. Los resultados indican una alta robustez.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda del Master Internacional en Enfermedades Parasitarias Tropicales de la Universitat de Valencia (curso 2008/2009).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr61/es/index.html>.
2. Llibre, J. M.; Falco, V.; Tural, C.; Negro, E.; Pineda, J. A.; Muñoz, J.; Ortega, E.; Videla, S.; Sirera, G.; Martínez, E.; Miralles, C.; Iribarren, J.; Galindo, M. J.; Domingo, P.; D'Arminio-Monforte, A.; Miró, J. M. & Clotet, B. (2009) The changing face of HIV/AIDS in treated patients. *Current HIV Research*. 7(4): 365-77.
3. Almerico, A. M.; Tutone, M. & Lauria, A. (2009) A QSAR study investigating the potential anti-HIV-1 effect of some Acyclovir and Ganciclovir analogs. *ARKIVOC*. (viii): 85-94.
4. Gálvez, J.; García-Doménech, R.; de Julián-Ortiz, J. V. & Soler, R. (1995) Topological Approach to Drug Design. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 35(5): 272-284.
5. Gozalbes, R.; Brun-Pascuad, M.; García-Doménech, R.; Gálvez, J.; Girard, P. M.; Ddoucet, J. P. & Derouin, F. (2000) Anti-Toxoplasma activities of 24 uinolones and Fluoroquinolones *in vitro*: Prediction of activity by molecular topology and virtual computational techniques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(10): 2771-2776.
6. Julián-Ortiz, J. V.; Gálvez, J.; Muñoz-Collado, C.; García-Doménech, R. & Gimeno-Cardona, C. (1999) Virtual combinatorial syntheses and computational screening of new potential anti-herpes compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*. 42(17): 3308-3314.
7. Duart, M. J.; Antón-Fos, G. M.; Alemán, P. A.; Gay-Roig, J. B.; González-Rosende, M. E.; Gálvez, J. & García-Doménech, R. (2005) New potential antihistaminic compounds. Virtual combinatorial chemistry, computational screening, real synthesis, and pharmacological evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48(4): 1260-1264.
8. García-Doménech, R.; Gálvez, J.; Julián-Ortiz, J. V. & Pogliani, L. (2008) Some new trends in chemical graph theory. *Chemical Reviews*. 108(3): 1127-1169.
9. Mahmoudi, N.; García-Doménech, R.; Gálvez, J.; Farhati, M.; Franetich, J.-F.; Sauerwein, R.; Hannoun, L.; Derouin, F.; Danis, M. & Mazier, D. (2008) New active drugs against liver stages of Plasmodium predicted by molecular topology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(4): 1215-1220.
10. García-Doménech, R.; Domingo-Puig, C. & Esteve-Martínez, M. A. (2008) Aplicación de la topología molecular en la búsqueda de nuevos agentes activos frente a Leishmania. *Anales de la Real Academia de Farmacia*. 74(3): 345-367.
11. Kier, L. B.; Murray, W. J.; Randic, M. & Hall, L. H. (1975) Molecular connectivity V: connectivity series concept applied to density. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 65(8): 1226-1230.
12. Kier, L. B. & Hall, L. H. (1982) General definition of valence delta-values for molecular connectivity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 72(10): 1170-1173.
13. Gálvez, J.; García-Doménech, R.; Salabert, M. T. & Soler, R. (1994) New Topological Descriptors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 34(3): 520-525.

14. Wiener, H. J. (1947) Structural determination of paraffin boiling points. *Journal of the American Chemical Society*. 69(1): 17-20.
15. DESMOL11 Software. Unidad de Investigación de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular. Facultad de Farmacia Universitat de València, España.
16. Dixon, W. J. (1990) BMDP Statistical software manual. Vols. I, II. Dixon, W. J. Eds. University of California Press, Berkeley, California.
17. Roy, P. P.; Leonard, J. T. & Roy, K. (2008) Exploring the impact of size of training sets for the development of predictive QSAR models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 90(1): 31-42.
18. Allen, D. M. (1974) The relationship between variable selection and data augmentation and a method for prediction. *Technometrics*. 16(1): 125-127.

**\* Información de contacto:**

Dr. Ramón García-Doménech.

Dept. Química Física, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia.

Avda. V. A. Estellés, s/n.

46100-Burjassot, Valencia, Spain.

Telf.: +34 963 544 291.

Email: [ramon.garcia@uv.es](mailto:ramon.garcia@uv.es)

## **Sesión Inaugural del Curso Académico 2010 Orden del Día**

1. Salutación de la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excm. Señora Doña María Teresa Miras Portugal.
2. Memoria de Secretaría, comprensiva de la labor Académica en el año 2009 por el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio Villarejo.
3. Lectura del discurso reglamentario por el Excmo. Señor Don José Miñones Trillo, Académico de Número, titulado «Anecdotario de los primeros años de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela (siglo XIX): un recuerdo a sus profesores y alumnos distinguidos».
4. Entrega de los Premios del Concurso Científico 2009.
5. Clausura del acto.

## SESIÓN INAUGURAL CURSO 2010

### Crónica de la Sesión Inaugural del Curso Académico 2010



**Mesa de la Presidencia (de izda. a dcha.):** Don Manuel Díaz-Rubio García, Don Salustiano del Campo Urbano, Doña María Teresa Miras Portugal, Don Miguel Ángel Alario Franco y Don Antonio Doadrio Villarejo.

El 21 de enero de 2010, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la inauguración de su Curso Académico en un acto que revistió de gran solemnidad. Presidieron el acto la Excm. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia. Junto a ella, el Presidente del Instituto de España, Excmo. Señor Don Salustiano del Campo Urbano; el Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmo. Señor Don Miguel Ángel Alario Franco; el Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Excmo. Señor Don Manuel Díaz-Rubio García, y el Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Señor Don Antonio Luis Doadrio Villarejo.

De acuerdo con el Orden del Día, la Presidenta de la RANF hizo la salutación primero y explicó los éxitos obtenidos por la Academia en 2009. El Académico Secretario leyó la Memoria de Actividades Académicas correspondientes al año 2009, en la que destacó el alto nivel científico alcanzado en las sesiones científicas de la Academia, que fueron un total de 41 durante el curso pasado; las 14 publicaciones y los dos convenios firmados con el Instituto Tomás Pascual y la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, además de las tomas de posesión de académicos; la del Premio Nobel, Profesor Neher y la del Profesor Elguero como Académicos de Honor y la del Profesor Puerto como Académico de Número, además de otras seis de Académicos Correspondientes extranjeros. A continuación, el Excmo. Señor Don José Miñones Trillo leyó el preceptivo discurso inaugural del Curso sobre «Anecdotario de los primeros años de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela (siglo XIX): un recuerdo a sus profesores y alumnos distinguidos».

Posteriormente, se entregaron dos medallas Carracido de oro, la máxima distinción de la Academia, a las viudas de nuestros Académicos de Número fallecidos, Excmos. Señores Don Antonio Doadrio López y Don Juan Manuel Reol Tejada, y otra de plata a Don Daniel Pacheco, Secretario del Ateneo de Madrid.

Seguidamente se entregaron los Premios de Investigación, respectivamente, Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia, Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, Premio Alcalíber (desierto), Premio Cinfa, Premio Normon, Premio Faes Farma, Premio Juan Abelló, Premio Carlos del Castillo Leiva y Premio Antonio Doadrio López, a los jóvenes investigadores que los jurados eligieron merecedores.

El acto contó con una masiva asistencia y la presencia, entre otras personalidades de Don Miquel Ylla-Català, Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña; Don Isaac Arias Santos, Presidente de la Academia de Galicia; Don Alberto Ramos Comenzana, Presidente de la Academia Iberoamericana de Farmacia.

Clausuró el acto la Presidenta de esta Real Corporación, declarando inaugurado el Curso Académico 2010 en nombre de S. M. el Rey.

## **Discurso de Apertura del Curso 2010 de la Real Academia Nacional de Farmacia**

**Excma. Señora Doña María Teresa Miras Portugal**

Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excelentísimas señoras y Excelentísimos señores Académicos, señoras y señores.

Se ha cumplido ya el primer mandato de tres años como Presidenta de esta Real Institución. Ha sido un gran honor y un privilegio servir a la Real Academia Nacional de Farmacia. Pero mi labor no ha sido en solitario, ha sido una labor de equipo con los miembros de la Junta de Gobierno y todos y cada uno de los académicos que integran nuestra Institución, a todos ellos, a todos ustedes, mi agradecimiento y mi afecto.

Agradecimiento que hago extensivo a todo el personal de la Academia, pues son ellos los que con su diligencia y buen hacer permiten el funcionamiento diario de una Academia que realiza un amplia y exigente actividad.

En palabras de Don Francisco de Quevedo, salidas de su afiladísima pluma y su humor bastante corrosivo, y cito: *Cuando decimos que todo tiempo pasado fue mejor, condenamos el porvenir sin conocerlo.*

Así pues, al inicio de este nuevo curso y año 2010, agradezco de nuevo la confianza que han depositado en mi persona al haberme reelegido tan generosamente para el segundo mandato, que es además el último según nuestros estatutos. Ahora más que nunca, necesito seguir contando con su ayuda y su consejo, para no defraudarles y que Nuestra Real Academia ocupe el puesto relevante que le corresponde en la información, difusión y formación de un espíritu crítico y riguroso de las ciencias de la farmacia y afines y su trasvase a la sociedad.

Permítanme en esta sesión solemne de apertura que les transmita el afecto y los buenos deseos de que se cumplan los planes de cooperación entre nuestra Academia y la Academie National de Pharmacie de France, a cuya sesión solemne de apertura fuimos invitados el día 13 de enero de este año, por la anterior Presidenta Mme. Monique Adolphe, quien también fue la primera mujer en Francia presidenta de una Academia Nacional, y por parte del actual Presidente en este año 2010, el Profesor François Chast. Entre nuestros retos en el próximo futuro está la conexión institucional con otras academias europeas y los primeros pasos ya han sido dados.

Como en años anteriores, muchos han sido los eventos científicos que han tenido lugar en nuestra Academia a lo largo del año 2009 y el señor Secretario dará lectura en su memoria. Permítanme solamente destacar mi agradecimiento a todos aquellos que han conseguido con su participación, organización e intervenciones, que nuestra Academia se haya convertido en lugar de referencia en nuestro país, donde la ciencia más actual en el área de la vida y la salud, permita el encuentro amable y estimulante de aquellos que sienten curiosidad y se preocupan por el avance del conocimiento.

A lo largo del pasado año 2009 se han sucedido una serie de descubrimientos con grandes repercusiones para las ciencias de la vida y como si el destino quisiera hacernos un guiño en el bicentenario del nacimiento de Darwin y el 150 de la publicación de su obra *ON THE ORIGIN OF SPECIES*, hemos asistido a un hecho singular que ha aportado una nueva visión de la evolución humana, el descubrimiento en Etiopía del esqueleto de ARDI, hembra de *Ardipithecus ramidus*, de 4,4 millones de años. Como recordarán Lucy, que fue anteriormente descubierta, era una hembra de 3,2 millones de años. Como ven se cumple lo de la mayor longevidad en las hembras de nuestro linaje. Pues bien, la pequeña Ardi es un antepasado en el linaje de los humanos, pero no en el de los chimpancés, siendo estos descendientes de otro linaje divergente con un antepasado común, lo que demuestra que una vez separados, la evolución, aun manteniendo grandes similitudes en los genes, organiza variaciones morfológicas de gran dinamismo y sigue adelante. El reto será conocer cuáles son los elementos del genoma que permiten esa plasticidad morfológica, ya que con idénticos elementos construimos una ermita o una catedral gótica. La ciencia evolutiva seguirá siendo apasionante

y necesaria para desarrollar buenos modelos de estudios de acción farmacológica en animales.

Si en años anteriores la farmacogenómica se convertía y sigue siendo una aliada necesaria en el desarrollo de fármacos y la optimización de su empleo, dando lugar al nacimiento de una nueva ciencia, actualmente el avance en el análisis comparativo de genomas debido a su menor coste ha permitido culminar el esfuerzo del estudio para conocer en detalle los genes asociados con la diabetes en más de 30.000 personas y la presencia o no de la enfermedad. Esto hará posible nuevas aplicaciones para conocer predisposiciones en otras enfermedades multigénicas. Las dianas farmacológicas serán más fácilmente así identificadas y el desarrollo de fármacos específicos será uno de los resultados previsibles en un futuro.

Similares esfuerzos se han hecho en el estudio de genomas de diferentes tipos de cáncer y la posibilidad de fabricar secuencias específicas de RNA interferentes para cada individuo. Los RNA interferentes y microRNA tienen cada vez más posibilidades de utilización en pacientes y los retos de su administración están haciendo avanzar de modo veloz la nanotecnología farmacéutica, en donde nuestros científicos se están consolidando en situaciones punteras.

Siguiendo en el mundo de los genes, la terapia génica, después de un largo paréntesis, ha dado este año un paso adelante permitiendo solventar los problemas derivados del empleo de virus y su potencialidad cancerosa, consiguiendo entre otros logros y por primera vez, insertar el enzima necesario para la visión en la Amaurosis congénita de Leber, consiguiendo que los pacientes, todos ellos niños ciegos, fueran sensibles a la luz.

Otra de las áreas que es especialmente querida para muchos de nuestros académicos y jóvenes estudiantes aquí presentes, ya que todos hemos estudiado la botánica, ha sido la secuenciación de los genomas de varias plantas: incluido el más reciente de la soja. Se abre la puerta al conocimiento de las propiedades de plantas esenciales no solamente en la nutrición, sino también de productoras de fármacos o precursores farmacológicos de gran interés que son obtenidos de las plantas desde tiempo inmemorial.

Entre otras buenas noticias está la reprogramación celular para inducir células pluripotentes, con proteínas específicas, obviando los

virus, que permitirá un mayor desarrollo de la terapia tisular y celular regenerativa, para cuya aplicación nuestros jóvenes deberán de estar preparados, pues requerirá de nueva metodología y tecnologías punteras, y que sin duda constituirán en un futuro próximo una nueva especialidad hospitalaria.

También están los primeros, aunque modestos, logros en la vacuna del SIDA, de lo cual tenemos información de primera mano en nuestra Academia.

Y entre las muy buenas noticias está el hecho de que la gripe tipo A/H1N1 no se convirtió en la terrible pandemia esperada, tal vez, porque la alarma incrementó la vigilancia y la higiene. El problema es que ahora muchos países occidentales, entre ellos el nuestro, no saben cómo darle salida a las vacunas, que en mi opinión es el menor de los males, pero siempre tenemos que quejarnos de algo.

Aunque el hecho de tener un nuevo virus tan fácil de contagiarse y susceptible de mutar y recombinarse no es reconfortante y es una seria advertencia para proseguir con ahínco los estudios sobre los reservorios naturales de estos virus que siempre han acompañado a la humanidad.

¡Y qué pasa con la crisis! Pues bien, la crisis no puede suponer una parálisis en el conocimiento. Los grandes logros que he citado no serán nada si no se desarrollan a término. No podemos dejar que la crisis retrase el conocimiento, o lo paralice en las diversas áreas de ciencias de la vida y la salud. El estudio y la investigación es lo que hace la diferencia entre los países desarrollados y los dependientes. Debemos ser creativos y optimizar al máximo los recursos y nuestra Academia debe de ayudar en esa optimización haciéndose eco de los problemas que atañen a nuestras facultades y laboratorios. Necesitamos crear ilusión y darle alas al espíritu científico. Para salir de las muchas crisis que nos esperan y conseguir optimizar nuestros recursos, que son sobre todo humanos, necesitamos seguir estimulando las vocaciones docentes e investigadoras en ciencias de la vida y la salud y nuestra Academia puede y debe dar ese ejemplo tan necesario en nuestro país. Recordemos que es muy fácil ir hacia atrás y solucionar las cosas con curanderos imponiendo las manos y diciendo frases extrañas, lo que no es nada nuevo en occidente, y me gustaría recordar a Shakespeare en una de sus obras.

Dice el brujo y curandero, y cito: *Tengo el poder de invocar a los espíritus de las profundidades. Responde el Rey: Yo también y lo mismo puede hacer cualquier hombre, pero, ¿acaso nos responden?*

Permítanme que finalice y que exprese mis mejores deseos para este año 2010:

Que sigamos reuniendo en nuestro foro a los que disfrutan con la ciencia, que contemos con la ayuda y esfuerzo de científicos tan relevantes como los que nos han deleitado en el pasado. Que nos encontremos a gusto, y que nuestra Academia sea considerada como la casa común de todos los interesados por las ciencias farmacéuticas y afines y tengamos la suerte de ver entre nosotros y agradecer la presencia de los buenos amigos.

Muchas gracias.

M.<sup>a</sup> TERESA MIRAS PORTUGAL  
*Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia*



## **MEMORIA DE SECRETARÍA. CURSO 2009**

### **Memoria Anual de Secretaría correspondiente al año 2009**

**Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo**

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

Como es reglamentario, la Real Academia Nacional de Farmacia inicia oficialmente sus actividades correspondientes al Curso 2009 con la Solemne Sesión Inaugural, en este caso celebrada el 15 de enero, con la presidencia de la Excmo. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Academia, y con el Presidente del Instituto de España, Excmo. Señor Don Salustiano del Campo Urbano; el Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmo. Señor Don Alberto Galindo Tixaire; el Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Excmo. Señor Don Manuel Díaz-Rubio García, y el Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Señor Don Antonio Luis Doadrio Villarejo. Asistieron también los Presidentes de las Academias de Farmacia de Cataluña, Iberoamericana, de Galicia, y el Subdirector General de Investigación y Tecnología del INIA (Ministerio de Ciencia e Innovación).

El discurso inaugural estuvo a cargo de la Excmo. Señora Doña María del Carmen Francés Causapé, que trató sobre «Consideraciones sobre creencias, farmacia y terapéutica».

De nuevo, durante el año pasado, ha tenido lugar la incorporación de nuevos miembros a nuestra Corporación.

El Excmo. Señor Don Francisco Javier Puerto Sarmiento tomó posesión el 26 de febrero en Sesión Solemne de la medalla número 8, en un evento presidido por la Presidenta de la Corporación, Doña María Teresa Miras Portugal; el Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Física y Naturales, Don Alberto Galindo Tixaire; el Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina,



Don Manuel Díaz-Rubio García; y el Senador Don Luis Peral Guerra. El Doctor Puerto leyó el discurso de ingreso: «La Triaca Magna», que fue contestado por el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio, Secretario de la Academia. El Profesor Puerto nació en Madrid en 1950, es Doctor en Farmacia, Catedrático de Historia de la Farmacia y Director del Museo de la Farmacia Hispana en la Univer-

sidad Complutense. Especializado en la Historia de la Farmacia y de la Ciencia, ha participado en dieciséis programas de investigación y dirigido otros diez sobre la Ciencia, la Farmacia española y el medicamento durante el Renacimiento y la Ilustración. Novelista y humanista, ha escrito numerosos libros y artículos en revistas nacionales y extranjeras.



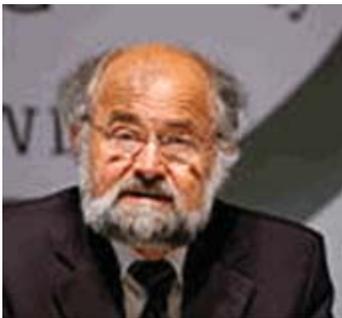
Se produjeron también dos tomas de posesión de Académicos de Honor. El Excmo. Señor Don José Elguero Bertolini, ex Presidente del CSIC, tomó posesión el 19 de febrero, con su preceptivo discurso de ingreso, que versó sobre: «La farmacia y la química: Un país, dos culturas», y que fue contestado por la Académica de Número, Excm. Señora Doña Carmen Avendaño. El Profesor Elguero nació en Madrid en 1934. Es licenciado y

doctor en Ciencias Químicas por las Universidades de Montpellier y Madrid. Finalizada la licenciatura en la Universidad de Madrid se incorporó al Instituto de Química Orgánica del Centre National de la Recherche Scientifique en Marsella, en el que trabajó durante dos décadas. Durante ese período se doctoró en Ciencias Químicas por las Universidades de Montpellier (1961) y Madrid (1977). En 1979 se incorporó al Instituto de Química Médica del CSIC. Sus áreas de especialización son: química heterocíclica, las espectroscopias, química teórica y química orgánica física. Es autor de más de mil artículos en publicaciones de su especialidad, y miembro del Consejo Asesor de doce revistas científicas. Ha colaborado asimismo en numerosas actividades de divulgación desde diversas tribunas especializadas en dicha actividad. Ha participado en organismos relacionados con la actividad científica y educativa: Presidente del Consejo

Social de la Universidad Autónoma de Madrid (1986-1990), Presidente del Consejo Científico Asesor de la Comunidad de Madrid (1990-1995), Vocal de la Junta de Gobierno del CSIC. Es además Patrono de la Fundación Residencia de Estudiantes y de la Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid. Es miembro de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (2004). Su actividad científica ha sido reconocida con los siguientes premios: «Schutzenberger» de la Société Chimique de Francia (1968); Medalla de Oro de la Real Sociedad Española de Química (1984); Solvay de la CEOE (1988); Nacional de Investigación Científica «Ramón y Cajal» (1993); Medalla de Oro de la Universidad de Marsella (Francia); Premio «Miguel Catalán» de la Comunidad Autónoma de Madrid (2005); Medalla de Plata del CSIC (2006). Además ha recibido numerosos doctorados honoris causa: Universidad Autónoma de Madrid (1999), Universidad de Castilla-La Mancha, Universidad de Alcalá de Henares (2000), Universidad de Zaragoza, Universidad Politécnica de San Petersburgo (Rusia) y Universidad de Marsella (Francia). Está en posesión de la Encomienda de la Orden Civil de Alfonso X El Sabio.

A su vez, el Premio Nobel de Fisiología y Medicina, Erwin Neher, tomó posesión el 30 de abril. El evento fue presentado por el Excmo. Señor Don Juan Tamargo, Académico de Número, médico especialista en Farmacología Clínica y Catedrático de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

El Profesor Doctor Erwin Neher, que es Director of the Department Membranbiophysik at the Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen (Alemania), disertó sobre «Pharmacology of Synaptic Transmission: An electrophysiologist's view» y dedicó



su conferencia a transportar su percepción de algunos avances en el mundo farmacéutico durante los cuarenta años pasados, en concreto sobre la biología molecular y genética. Nació en Landsberg am Lech, Alemania, en 1944. Estudió Física en la Universidad Técnica de Múnich y Medicina en la Universidad de Göttingen. En Estados Unidos se especializó en Fisiología. Trabajó como investigador

en las universidades de Wisconsin y Yale. El Doctor Erwin Neher investiga los principios biofísicos y moleculares del flujo de información entre neuronas, clave para entender las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. En los años setenta, Neher y Sakmann desarrollaron técnicas, llamadas Patch-clamp, que permiten medir el flujo de iones a través de los canales de membranas celulares. Recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1991 junto a Bert Sakmann.

Cerrada aún las admisiones de académicos correspondientes, se produjeron tres tomas de posesión de académicos correspondientes extranjeros. Cronológicamente, primero la del Doctor Dominique Aunis, con la lectura de su discurso: «Interactions between neuroendocrine and immune systems: from basic to clinical aspects», presentado por la Excma. Señora Doña María Teresa Miras Portugal en nombre de la Academia. El Doctor Aunis es director de la Unidad Inserm U575 del Centro de Neuroquímica de Strasbourg, en Francia. En segundo lugar, la del Profesor Doctor Álvaro Pascual-Leone, que pronunció su conferencia titulada: «La modulación de redes neurales específicas en humanos», y que fue presentado por el Excmo. Señor Don Guillermo Giménez Gallego, Académico de Número. El Doctor Pascual-Leone nació en Valencia, y tiene doble nacionalidad, española y estadounidense; es catedrático de neurología de la Escuela Médica de Harvard, afiliado a ella desde 1997. Además es el director del Centro para el estímulo no-invasor del cerebro (Center for Noninvasive Brain Stimulation) y director asociado del Centro de Investigación Clínico General del Centro Médico de Beth Israel Deaconess en Boston. El Doctor Pascual-Leone obtuvo un M. D. y un PhD. en Neurofisiología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Freiburg Albert Ludwigs en Alemania. También enseñó en la Universidad de Minnesota y en Institutos Nacionales de la salud de los Estados Unidos. En el 2000 gana el prestigioso premio Daniel D. Federman Outstanding Clinical Educator Award. Actualmente vive en Wayland, Massachusetts, con su esposa Elizabeth y sus tres hijos. Finalmente, lo hizo el Profesor Jurgen Schrader, Director del Instituto de Fisiología en la Facultad de Medicina de la Universidad Heinrich Heine de Dusseldorf, Alemania, con su discurso de ingreso titulado: «Role of extracellular adenosine in immunomodulation: imaging and novel therapies». Le presentó, en nombre de la Corpo-

ración, la Académica de Número y Presidenta, Excma. Señora Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal.

Otros tres académicos correspondientes extranjeros tomaron posesión en tierra argentina, dentro de los actos programados en el III Encuentro de Academias Iberoamericanas, celebrado durante el mes de mayo en Buenos Aires. Los Doctores Modesto Rubio, Marcelo Nacucchio y Alberto A. Boveris tomaron posesión el 13 de mayo, en la sede de la Academia Nacional de Medicina de Argentina, recibiendo sus medallas de manos de nuestra Presidenta.

Además, el 18 de junio, la Asamblea General de la Real Academia Nacional de Farmacia eligió a la Excma. Señora Doña M.<sup>a</sup> José Alonso Fernández, nuevo miembro de número en la medalla número 26. La Doctora Alonso es Catedrática de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Vicerrectora de Investigación de la Universidad de Santiago de Compostela.



Afortunadamente, el curso pasado no tuvimos que lamentar pérdida alguna de académicos, aunque sí celebramos una sesión de homenaje necrológica a quien fue nuestro Presidente de Honor, el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, deleite de la Farmacia española, en una emotiva sesión del 5 de marzo, con la intervención de los Excmos. Señores Académicos de Número, Don César Nombela Cano: «Juan Manuel Reol, una época de la farmacia española»; Don Víctor Jiménez Torres: «Juan Manuel Reol en la cercanía». Don Antonio L. Doadrio Villarejo: «Juan Manuel Reol, el Académico», y la Excma. Señora Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal: «Don Juan Manuel: un líder para una época».

La actividad científica de la Academia, un año más, ha sido extensa y de acreditado nivel. Se han celebrado un total de 41 Sesiones Científicas semanales, distribuidas en seis Tomas de Posesión, quince conferencias, siete Mesas Redondas, una sesión necrológica, dos presentaciones de monografías de la Academia, tres Tertulias Científicas, tres Jornadas Científicas, un homenaje científico y la presen-

tación de nuestros nuevos portales web, además de la Sesión Inaugural y la tradicional sesión conmemorativa de los Premios Nobel.



**Imagen 1. Firma del convenio con el Instituto Tomás Pascual y el COF de Madrid.**



**Imagen 2. Firma del convenio con la SEFH.**

El servicio a la Sociedad, santo y seña de esta Real Academia Nacional de Farmacia, tuvo sus más amplias expresiones el pasado curso con las firmas de dos importantes convenios de colaboración científica. Cronológicamente, el primero conjuntamente con el Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, y el segundo con la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. El primero, que tuvo una gran repercusión en la prensa nacional, tiene el objetivo de realizar jornadas en la Real Academia Nacional de Farmacia sobre temas sanitarios, especialmente orientados al campo de la nutrición, y dirigidos a colegiados farmacéuticos y científicos interesados en el tema. Firmaron el acuerdo: Doña María Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia; Don Alberto

García Romero, Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, y Don Ricardo Martí Fluxá, Presidente del Instituto Tomás Pascual Sanz. Este convenio fue gestionado e impulsado por nuestro Académico de Número, Excmo. Señor Don Bernabé Sanz Pérez. El segundo, con la Sociedad de Farmacia Hospitalaria, servirá para contribuir a mejorar la trascendencia social de la labor desarrollada por ambas instituciones, compartiendo medios y desarrollando programas de forma conjunta. Se fomentará el desarrollo de proyectos conjuntos de divulgación de la investigación científica, lo que se traducirá en la puesta en marcha de, al menos, las siguientes actividades: *a)* Edición conjunta de folletos y material divulgativo dirigido a pacientes; *b)* Organización conjunta de al menos una Jornada Científica al año, la cual versará sobre la materia de interés público

y actualidad que de común acuerdo se establezca. La misma contará con la presencia de destacados ponentes propuestos por ambas Instituciones; y c) Promover en común mecanismos de colaboración con la Industria Farmacéutica. Firmaron, por parte de la Real Academia Nacional de Farmacia, su Presidenta, Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal y por la de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria su Presidente, Don José Luis Poveda Andrés.

En cumplimiento de estos convenios, se organizaron tres jornadas científicas con el Instituto Tomás Pascual y el COF de Madrid sobre «El consejo nutricional para las personas mayores», otra de «Dietas mágicas, mitos y realidades» y una última sobre «La recomendación de hábitos de vida saludable y el ejercicio físico desde la Oficina de Farmacia», y una excepcional mesa redonda sobre «Seguridad del paciente oncológico con la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria», que con una visión interdisciplinar suscitó un gran interés y fue ampliamente divulgada por la prensa sanitaria. En ella intervinieron Don Daniel Almenar Cubells, Jefe de Servicio de Oncología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia, dando la visión del oncólogo; Don N. Víctor Jiménez Torres, Académico de Número de la RANF, Catedrático de la Universidad de Valencia y Jefe de Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia, con su visión del farmacéutico; Doña Adela Máñez Máñez, enfermera del Hospital Universitario La Fe de Valencia, con la visión de la enfermera; Doña Marta Esteban Benavides, coordinadora de la Sección de Normativa del Diario Médico, que nos ofreció su visión del periodista, y Don Francisco de Asís Silla, Magistrado de Instrucción de Valencia con la del Magistrado.

En el año de Darwin no podía faltar una sesión conmemorativa, que celebramos el 29 de octubre, con una tertulia científica y una mesa redonda, además de una conferencia dictada por el Doctor Jesús Pintor Just, Académico Correspondiente, titulada: «Lo que a Darwin le hubiese gustado saber sobre la evolución del órgano visual».

Especial relevancia tuvieron las mesas redondas sobre drogadicción, y la dedicada al plan de estudios de Bolonia, con la intervención del Decano de la Facultad de Farmacia de la UCM, Rafael

Lozano y organizada por nuestro Académico de Número, Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. De esta última, el periódico *5 Días*, nos dedica un artículo el 27 de noviembre.

Como otros años, destacados científicos y profesionales sanitarios impartieron conferencias. Nombres ilustres como los del Profesor Doctor Antonio Vicente Ferrer Montiel, Catedrático de Universidad, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Subdirector IBMC-UMH, Instituto de Biología Molecular y Celular, en la Universidad Miguel Hernández (Alicante); la Profesora Doctora Mercedes Salaices Sánchez, Catedrática de Universidad, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, UAM; el Doctor Pedro Alonso, Premio Príncipe de Asturias de Cooperación Internacional; el Doctor Pedro Guillén García, Director y médico cirujano de la Clínica CEMTRO de Madrid y Catedrático de Traumatología del Deporte de la Universidad de Murcia; y el Doctor José López-Barneo, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, CSIC, Universidad de Sevilla, que se suman a otras impartidas por nuestros también ilustres académicos.

Como es habitual, también en el curso 2009 se han impartido en la Corporación dos Cursos del Tercer Ciclo, patrocinado por el Ministerio de Educación y coordinado por el Instituto de España, sobre «Bases moleculares del estrés oxidativo», coordinado por la Doctora María Cascales, y «Aspectos biológicos, farmacológicos y toxicológicos de los iones metálicos», por el Doctor Doadrio.

El curso pasado hicimos un gran esfuerzo en el capítulo de publicaciones, a pesar del recorte presupuestario oficial originado por la crisis económica, pero apoyados por diversas fundaciones, como la Fundación Caja Madrid, la Fundación Casares Gil, la Fundación Ramón Areces y la Vodafone, pudiendo así editar cuatro números de los Anales y otros dos extraordinarios, dedicados al «Balneario de Alicún de las Torres, de la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales», y otro sobre «La Farmacia española en la Guerra de la Independencia». Pero sobre todo, destacamos la publicación de cinco monografías, numeradas de la 24 a 27 y denominadas: «Redes de señalización y estrategias terapéuticas»; «José Celestino Mutis en el bicentenario de su fallecimiento»; «Avances en Neurociencia: Neuro-

transmisores y patologías nerviosas»; «Células madre y terapia regenerativa» y «Nanotecnología farmacéutica».

Además, editamos dos publicaciones especiales, la primera titulada: «En el 250 aniversario del nacimiento de Vicente Cervantes (1758-1829). Relaciones científicas y culturales entre España y América durante la Ilustración», y la segunda: «Homenaje a José Celestino Mutis», como resultado de los homenajes que realizamos a estos ilustres personajes en 2008.

La Fundación Casares Gil, como es habitual, vuelve a estar presente en estas actividades de la RANF, destacando el patronazgo de todas estas monografías y la publicación del número 7 de la colección *Lecturas Singulares*: «El dilema de muchos españoles en 1808: Ser leales a Fernando VII o colaboracionistas con José I», del Excmo. Señor Don José Antonio Cabezas Fernández del Campo.

En nuestro deseo de abrirnos más a la Sociedad, la Junta de Gobierno, a propuesta de su Secretario, acordó en marzo la contratación de una empresa especializada en medios de comunicación. Desde entonces, y también con el esfuerzo personal de nuestros académicos, hemos estado presentes habitualmente en medios periódicos sanitarios, en prensa nacional, en radio y en televisión, destacando nuestra participación en el reportaje que Telemadrid dedicó a las Reales Academias en el programa «Mi cámara y yo», emitido en junio; las entrevistas en Radio 5 concedidas por las académicas Flora de Pablo y María Cascales y la de Intereconomía Radio por el Doctor Doadrio; las de nuestra Presidenta en *La Razón*, y *ABC* y las notas de prensa, tanto escrita como digital, que desde marzo de 2009 se publican ya con carácter habitual en el *Diario Médico*, *El Farmacéutico*, *El Mundo*, *El País*, *El Confidencial*, *Gentedigital*, *Actualidad Universitaria*, *Diario de Navarra*, *La Voz de Galicia*, *Diario del Alto Aragón*, *El Imparcial*, *Cinco Días*, *Diario Vasco*, *Xornal*, *AZ Prensa*, *OFFARM* y en blogs de noticias y portales de Internet, como Prnoticias, Prsalud, Portalfarma o Imfarmacias, entre otros.

En el capítulo de obras hemos restaurado el patio interior de nuestro edificio, que estaba muy deteriorado, saneando todas las bajantes y pozos, con lo que se ha solucionado el problema de humedades que afectaba a nuestra biblioteca, debido a las malas condiciones en que estaban aquéllos. Asimismo, hemos restaurado y

acondicionado una sala en la tercera planta para exposiciones, acomodando en primer lugar el legado ukiyo-e, del que dimos cuenta en la memoria de 2008.

Debido a todas estas inversiones, nuestra Academia no ha podido hacer importantes contribuciones económicas en 2009 en su expansión informática como en otros años, pero que sí se ha realizado debido al continuado esfuerzo individual y al de la comisión de informática que me honro en presidir. Así, nuestro bibliotecario (en 2009) y secretario de dicha comisión, Excmo. Señor Don Antonio Martínez, ha proseguido con la digitalización de los libros singulares de nuestra biblioteca, dentro del proyecto de conexión con el sistema internacional de Bibliotecas Virtuales en Internet de Digibis, consiguiendo una subvención de 40.000 € concedida en concurso público por el Ministerio de Cultura, que garantiza la continuidad futura de esta labor.

Nuestra página web ha visto incrementada su presencia y peso en Internet, pasando de un *page rank* de Google de 4 a 6 de 10, igual al de Caja Madrid, por poner un ejemplo significativo.

Y es que, nuestra web se ha hecho mayor y de una sola web con 480 páginas web, 190 imágenes y 85 Mb de información, cuando se estrenó en 2003, ha pasado a tener cinco portales con 245.832 archivos, diez motores de bases de datos con más de 30.000 entradas y 80 GB de información. Este impresionante desarrollo se ha gestado durante el curso 2009, publicándose en septiembre los cinco nuevos portales, diseñados, programados, publicados y mantenidos por el Secretario de la Academia y Director de los servicios informáticos, Profesor Doadrio. Los cinco portales los denominamos: 1.º Portal RANF, que es el principal, y contiene toda la información de la Academia y sus académicos, bien estructurada en bases de datos con todos los criterios de búsqueda necesarios para encontrar la información que deseemos y que fue valorada en el número de OFFARM de septiembre de 2009, mereciendo una calificación de 9/10. 2.º Portal de noticias, con todas las notas de prensa que generamos en un moderno portal de noticias RSS. 3.º Portal de publicaciones, que contiene todas nuestras publicaciones, Anales, Monografías, Lecturas Singulares, discursos de recepción e inauguración de cursos académicos desde 1932, y otras obras donadas o con permiso del Ins-

tituto de España, en formato PDF y en el caso de los Anales también en HTML, dentro del proyecto Open Journal System, para su lectura y descarga directa y libre por Internet. 4.º Portal Multimedia, con todas nuestras sesiones en vídeo diferido, diapositivas en *slideshow* para ir las pasando mientras vemos el vídeo, fotos del acto, resumen de la sesión y biografías de los ponentes, en una espectacular presentación, que estamos actualmente afinando. Y 5.º Portal de la red social de enfermedades olvidadas, para ayudar a los más necesitados y promover la colaboración entre distintos grupos que investiguen sobre el tema, tanto nacionales como extranjeros, especialmente de Iberoamérica. Es un portal bilingüe español-inglés, con posibilidad de escribir y contestar artículos y noticias, estableciendo una relación virtual, además de poder crear blogs personales, foros y grupos con intereses comunes. Este proyecto, promovido por nuestro académico de número, Doctor Monge, va a tener apoyo a través de un proyecto de la IUPAC.

Además, durante el año 2009, la empresa DIGIBIS terminó de programar nuestro portal de la biblioteca, transfiriendo los archivos del antiguo programa ABSYS, empezando así el proyecto de biblioteca virtual internacional.

Durante el año 2009 se han producido elecciones en los cargos de Presidente, siendo reelegida la Excm. Señora Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal y de bibliotecario, por cese reglamentario en sus dos mandatos, del Excmo. Señor Don Antonio Martínez Fernández, al cual la Junta General, la Junta de Gobierno, y el que suscribe en nombre de la Academia, le dan las gracias por su esfuerzo, entusiasmo y dedicación en una importante y meritoria labor que entronca a nuestra Academia con las bibliotecas virtuales en Internet. Para sucederle en el cargo, fue elegido el Excmo. Señor Don Javier Puerto Sarmiento, Catedrático de Historia de la Farmacia, del que esperamos que desde su seguridad vital y serenidad reflexiva nos realice otra gran labor.

Asimismo, la Junta General reunida en sesión extraordinaria el 26 de marzo, y por decisión unánime, nombra al Excmo. Señor Don Julio Rodríguez Villanueva, Presidente de Honor de nuestra Institución, para suceder en el cargo al Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, quien lo ocupó hasta su fallecimiento. El Doc-



tor Rodríguez Villanueva fue Director de esta Real Academia durante el periodo 1998-2000. Nació en Villamayor-Piloña (Asturias), el 27 de abril de 1928. Es Doctor en Farmacia por la Universidad de Madrid y en Bioquímica por la de Cambridge. Fue Profesor de Investigación y Consejero de Número del CSIC, Catedrático de Microbiología y Rector de la Universidad de Salamanca, entre otros numerosos cargos, premios y condecoraciones.

También en Juntas Generales Extraordinarias, celebradas el 17 de diciembre, se acordaron conceder dos medallas Carracido a título póstumo y en su categoría de oro a nuestros Académicos de Número Excmos. Señores Don Antonio Doadrio López y Don Juan Manuel Reol Tejada y otra en su categoría de plata a Don Daniel Pacheco, Secretario del Ateneo de Madrid, por sus excepcionales servicios a la Farmacia.

Como años anteriores, organizaciones científicas y profesionales, han enriquecido nuestras actividades con su presencia en nuestra Institución. El 27 de enero se entregaron los VIII Premios de la Asociación Española de Derecho Farmacéutico (ASEDEF), de la que la Princesa de Asturias, Doña Letizia Ortiz, es Presidenta de Honor. La Asociación Española de Farmacéuticos de Letras y Artes (AEFLA), celebró en nuestra Sede el 21 de abril, la tradicional entrega de galardones que concede anualmente esta asociación. El 3 de noviembre, con motivo de la presentación en la sede de esta Academia del libro homenaje al Excmo. Señor Don Pedro García Barreno, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid y Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y de la Real Academia Española, titulado: «Paz y bien. La biomedicina en España», tuvo lugar una sesión en la que intervinieron los Excmos./a. Señores/as: Doña Margarita Salas, Académica de Número de las Reales Academias de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y de la Española; Don Jesús Ávila, Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; Don Joan J. Guinovart, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia; Don Francisco Moreno, Director de Transferencia Tecnológica de la Fundación Marcelino Botín; Don Rafael Benjumea

Cabeza de Vaca, Director General de la Fundación Marcelino Botín, y Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia. El 11 de noviembre hubo una Jornada Científica sobre «Estrategias de innovación en la investigación de medicamentos», contando con la presencia del Director del Instituto de Salud Carlos III, José Jerónimo Navas Palacios, y durante los días 23 y 24 de noviembre, la conferencia final del proyecto Europeo del VI programa marco (FP6), que recibe el acrónimo UPDATE, Understanding and Providing a Developmental Approach to Technology Education (Entendiendo y proporcionando un acercamiento al desarrollo de la educación en el área de las tecnologías). Este proyecto europeo trata de conocer qué motivos hacen que las mujeres prefieran dedicarse a estudios relacionados con áreas biosanitarias en lugar de especializarse en carreras más técnicas como las ingenierías. En él han concurrido 16 grupos diferentes de toda Europa, representando a diez países diferentes de la CEE. La representación española ha sido liderada por el Doctor Jesús Pintor, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Nuestra Academia también está abierta para colaborar en otros foros, fuera de su sede. De esta manera, el Profesor Doadrio, impartió una conferencia sobre el calentamiento global en el Ateneo de Madrid; las Académicas María Cascales Angosto y Flora de Pablo Dávila organizaron un curso de gran éxito sobre «Células madre y terapia regenerativa» en la sede del Instituto de España, al igual que el Curso de Avances en Neurociencias, coordinado por la Excm. Señora Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal, Presidenta de esta Corporación. Asimismo, la Doctora María Cascales Angosto participó, el 12 de noviembre, en la IV Jornada Farmacéutica en la Universidad Autónoma de Hidalgo (México), por invitación especial del Director del Instituto de Ciencias de la Salud de dicha Universidad. La Doctora Cascales versó sobre el tema: «¿Envejecen las células madre?» Además, en esa jornada, se presentó el libro «Los antioxidantes y las enfermedades crónico-degenerativas», en el cual la Doctora Cascales escribió tres capítulos. El Doctor Alberto Giráldez participó en la III Reunión Científica Regional de ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science), celebrada en Montevideo (Uruguay) y en las XVIII Jornadas de la Sociedad Española de Garantía de Calidad en Investigación Biológica (SEGCIB), en la ciudad de San

Sebastián. Finalmente, el Doctor Bartolomé Ribas Ozonas impartió una conferencia en la sede de la Real Academia Nacional de Medicina, sobre «Metalotioneína y elementos minerales en la osteoporosis» en la conmemoración del «Día Mundial de la OMS de la Osteoporosis».

Los días 11 al 14 de mayo se celebró en Buenos Aires (Argentina) el III Encuentro Iberoamericano de Academias de Farmacia (AIAF). El Encuentro resultó de gran calidad; en la primera sesión, en la que hablaron los Presidentes de las Academias participantes, hubo un emotivo recuerdo para quien fue nuestro Presidente de Honor, Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, que se transformó en un sentido homenaje expresado en los más diversos acentos de la lengua castellana. También se recordó con todo cariño a Don Ernesto Fernández Bernardo, quien fue Presidente de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile.

Honores para nuestra Academia y nuestros académicos han sido concedidos durante el año 2009. En cuanto a la Academia, nos ha sido dado un Premio a las mejores iniciativas de la Farmacia 2008, por el documento de consenso sobre atención farmacéutica, que nos entregó el Correo Farmacéutico en 2009.

A la Doctora María Cascales Angosto le fue concedida la medalla de oro al mérito en el trabajo y resultó nombrada hija predilecta de Cartagena, al igual que lo fue de la ciudad de Burgos a título póstumo, Don Juan Manuel Reol Tejada. La Doctora Doña M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé ha sido galardonada con la Schelenz Plakette, en el Congreso Internacional de Historia de la Farmacia, celebrado en Viena (Austria). La Doctora Carmen Peña fue elegida Presidenta del Consejo General de Colegios Farmacéuticos. El Doctor Benito del Castillo, entre otros honores, Presidente Honorario del Comité Organizador del Congreso de COIFFA (Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia) y Visitante distinguido de la Ciudad de Cajamarca (Perú), Miembro de Número (Honorario extranjero) de la Academia Boliviana de Historia de la Medicina, Capítulo Chuquisaca, Benefactor de la Facultad de Ciencias Químico-Farmacéuticas y Bioquímicas de la «Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca», Sucre (Bolivia), Organizador y Expositor del Curso Internacional de Formación Continua en el Área

de Farmacia, Sucre (Bolivia), Reconocimiento de la Carrera de Farmacia de la Universidad Autónoma «Gabriel René Moreno», Facultad de Ciencias de la Salud Humana, Santa Cruz de la Sierra (Bolivia), Medalla Mariscal Andrés de Santa Cruz en Grado de Servicio por la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz (Bolivia) y Redactor y Firmante de la Declaración de Sucre, para la creación de la Federación de Carreras y Facultades de Farmacia de Bolivia, fue investido doctor «honoris causa» por la Universidad de Coimbra. Esta Universidad es una institución portuguesa de enseñanza superior. Su antecedente inmediato es el Estudo Geral fundado en 1290 en Lisboa y transferido a Coimbra en 1308 por el rey Dionisio (Dinis) el Labrador, sólo un siglo más tarde de la fundación de la nación portuguesa. Hoy en día, la Universidad de Coimbra cuenta con ocho facultades (Letras, Derecho, Ciencias y Economía, Psicología y Ciencias de la Educación, Ciencias del Deporte y Educación Física) y cerca de 22.000 alumnos. El Doctor del Castillo es Decano honorario de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y Catedrático de Técnicas Instrumentales. El Doctor Mayor Zaragoza fue distinguido con la Distinción Oficial del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Gipuzkoa y nuestra presidenta fue elegida Académica de Honor de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina, fundada en 1856. El Excmo. Señor Don Francisco González de Posada, Académico Correspondiente de esta Institución, tomó posesión de su plaza de Académico de Honor de la Real Academia de Medicina de Santa Cruz de Tenerife. El acto tuvo lugar el 3 de marzo en el Colegio Oficial de Médicos de esa ciudad. Le presentó el Académico Don Enrique González González. En la última reunión de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP), celebrada el 18 de junio, en el Centro Cultural «Matadero» en Huesca, se conmemoró su 50 aniversario y se celebró un acto académico conmemorativo de esta fundación y de homenaje a varios de los socios de honor de la sociedad, entre ellos al Doctor Gaspar González González, fundador, socio número 1 de la SEEP y expresidente. El Profesor Gaspar González es Doctor en Veterinaria y Académico de Número de las Reales Academias Nacional de Farmacia y de Doctores de España.

La Sociedad Alemana de Historia de la Farmacia celebró, el 2 de mayo, un Symposium en honor del Profesor Wolf-Dieter Müller-



**Imagen 3. Homenaje a Müller-Jhancke (derecha). Izquierda: M.ª Carmen Francés.**

Jhancke, Académico Correspondiente, festejando así su 65 cumpleaños. Los actos programados tuvieron lugar en el Aula Magna de la Universidad Ruprecht-Karls de Heidelberg, entregándole como recuerdo la obra «Pharmazie in Geschichte und Gegenwart» en la que diversos historiadores de la Cultura, la Ciencia, la Medicina y la Farmacia habían colaborado con sus trabajos, bajo la coordinación de los Profesores Christoph Friedrich, de la Universidad de Marburg y Director del Instituto Alemán de Historia de la Farmacia, y Joachim Telle, de la Universidad de Heidelberg. La Doctora M.ª del Carmen Francés Causapé, Académica de Número, estuvo presente en este acto acompañando al homenajeado. El Excmo. Señor Don José Luis Vila Jato, Académico de Número de esta Corporación, fue elegido el 30 de junio Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña.



Destacamos también la concesión del I Premio Nacional Cortes de Cádiz de Botánica Celestino Mutis al Excmo. Señor Don Salvador Rivas Martínez, Académico Decano de la Real Academia Nacional de Farmacia. Este reconocimiento nació con el deseo de perpetuar la memoria del ilustre naturalista gaditano José Celestino Mutis, eminente botánico de reconocimiento mundial, con motivo de la conmemoración del bicentenario de su muerte durante el pasado año. El Ayuntamiento de Cádiz, la Real Academia Nacional de Farmacia y la Real Academia Hispanoamericana de Cádiz pusieron en marcha esta primera edición del Premio Iberoamericano de Botánica, con la finalidad de premiar un trabajo original e inédito sobre esta rama de la Ciencia. Al premio optaron especialistas españoles e iberoamericanos propuestos por las Reales Academias, Centros de Investigación, Universidades, Instituciones Socio-sanitarias y colegios profesionales. El Premio le fue entregado el 20 de marzo en el Ayuntamiento

de Cádiz de mano del Presidente de las Cortes Españolas Don José Bono y en presencia de la Alcaldesa de Cádiz Doña Teófila Martínez. La *laudatio* corrió a cargo del Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Para todos ellos nuestra más calurosa felicitación por las distinciones que les han sido concedidas.

Finalmente, reseñar que durante el curso 2009, la comisión de reglamento terminó la confección de un nuevo reglamento interno, que fue aprobado definitivamente en la Junta General del 17 de diciembre, dotando así a nuestra Academia de un moderna herramienta que nos abrirá, sin duda, las puertas de un mundo tan competitivo como en el que nos ha tocado vivir.

Por último, tenemos que hacer constar nuestro agradecimiento al Ministerio de Educación por las subvenciones concedidas en el Curso 2009, que nos han permitido acometer las actividades programadas. También deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Fundación Ramón Areces, a todos los patrocinadores del Concurso Científico, y a los Patronos y miembros de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia que contribuyen a la actividad científica de nuestra Corporación y a nuestro Académico de Número, Excmo. Señor Don Juan Abelló Gallo, por su continuado patronazgo. Agradecemos especialmente la importante donación realizada por nuestra vicepresidenta, Excma. Señora Doña Ana Pascual-Leone Pascual y su familia, para nuestra biblioteca y museo, destacando un polarógrafo de gran valor y una antigua orla.

Una vez más, esta Real Academia Nacional de Farmacia ha comparecido para dar cuenta pública de sus actividades, de las que yo, el Secretario, doy fe.

ANTONIO L. DOADRIO VILLAREJO  
*Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia*

Nuestra Académica de Número, Excma. Señora Doña María Cascales Angosto, ha sido galardonada con la Medalla de Oro al Mérito en el Trabajo. La Doctora Cascales es una investigadora de nuestro tiempo, una mujer de actualidad en su materia, que sin duda pasará a la historia por sus importantes aportaciones en el campo de la Farmacia y la Bioquímica. Una parte importante de sus investigaciones, dedicadas al estudio del metabolismo de aminoácidos en tejidos normales y tumorales, han aportado grandes logros en diferentes campos de la Bioquímica y la Farmacia. Entre ellos, sus avances excepcionales en el estudio del fosfoglicerato mutasa, encontrando uno de los cofactores más fundamentales en el mecanismo de oxigenación de la hemoglobina, que ha permitido avanzar notablemente en el campo de la Hematología. Sus estudios en Bioquímica Patológica experimental, fundamentalmente en hepatotoxicidad experimental, han permitido descubrir numerosos agentes biológicos provocadores de severas patologías hepáticas y de hepocarcinomas, así como fármacos que posibilitan hacer frente a algunas de estas enfermedades.

\* \* \*

El pleno del Ayuntamiento de Cartagena ha aprobado, el 23 de noviembre, la concesión del título de hija predilecta de la ciudad a María Cascales Angosto. Esta cartagenera, nacida en 1934, fue la primera mujer española en acceder a una academia científica, la de Farmacia, disciplina de la cual es doctora además de investigadora del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

\* \* \*

Durante los días 23 y 24 de noviembre se ha celebrado en la sede de la Real Academia Nacional de Farmacia la conferencia final del proyecto Europeo del VI programa marco (FP6), que recibe el acrónimo UPDATE, Understanding and Providing a Developmental Approach to Technology Education (Entendiendo y proporcionando un acercamiento al desarrollo de la educación en el área de las tecnologías). Este proyecto europeo trata de conocer qué motivos hacen que las mujeres prefieran dedicarse a estudios relacionados con áreas bio-

sanitarias en lugar de especializarse en carreras más técnicas como las ingenierías. En él han concurrido dieciséis grupos diferentes de toda Europa, representando a diez países diferentes de la CEE. La representación española ha sido liderada por el Doctor Jesús Pintor, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, que se ha encargado, junto con su colaborador Basilio Colligris, de organizar estos dos días de intenso trabajo en nuestra Corporación. Éstos comenzaron con la inauguración del evento por la Presidenta de la RANF, Doctora María Teresa Miras-Portugal, seguido por sendas sesiones de mañana y tarde de comunicaciones orales, en las que se comunicaron las principales conclusiones obtenidas a lo largo de los tres años de vigencia del proyecto. Acompañando a las sesiones orales se han desarrollado igualmente una sesión de paneles donde se han podido abordar aspectos particulares y detallados de los objetivos del proyecto.

\* \* \*

En Junta General celebrada el 17 de diciembre, la Excm. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, fue reelegida Presidenta de nuestra Corporación por un periodo de otros tres años.

El Excmo. Señor Don Javier Puerto Sarmiento ha sido elegido nuevo bibliotecario de nuestra Corporación el 17 de diciembre.

\* \* \*

El Pleno de la Academia celebrado el 17 de diciembre, acordó conceder dos medallas Carracido en su categoría de oro, la máxima distinción de nuestra Institución a título póstumo, a los que fueran Académicos de Número de nuestra Corporación, Excmos. Señores Don Antonio Doadrio López y Don Juan Manuel Reol Tejada. Ambos fueron personalidades destacadas de la Farmacia en la última mitad del siglo XX; el primero en la docencia universitaria y en la investigación farmacéutica, y el segundo en la Administración pública y en la Industria farmacéutica. Se hace así un homenaje a la dedicación y sacrificio de dos personas comprometidas en el desarrollo de la profesión farmacéutica.

\* \* \*

El Pleno de la Academia decidió otorgarle una medalla Carracido en su categoría de plata a Don Daniel Pacheco, licenciado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y fundador de la sección de Farmacia del Ateneo de Madrid (1987), departamento que preside desde entonces. Sus compañeros le han reelegido anualmente en el cargo desde hace dos décadas. El año 1988 creó la Cátedra José Rodríguez Carracido y en la actualidad, entre otras muchas ocupaciones, coordina las Tertulias de Rebotica del Ateneo madrileño, tarea que compagina con la coordinación científica de la revista científica y literaria de esta institución. La estrecha vinculación de Pacheco con el Ateneo se manifiesta asimismo en los varios cargos que ha asumido en las distintas juntas directivas del centro. En la actualidad desempeña el cargo de secretario primero, actividad que compagina con sus labores como farmacéutico comunitario.

\* \* \*

Nuestra Presidenta, la Excm. Señora Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal ha sido elegida Académica de Honor de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina, fundada en 1856.

\* \* \*

El miércoles día 13 de enero de 2010 se celebró en el salón de Actos de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Biológicas de París, la sesión solemne de comienzo del curso 2010 en la Academia Nacional de Farmacia de Francia. Al acto asistió la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia de España, Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal. Desde la Real Academia Nacional de Farmacia de España queremos dar las gracias a la Academia Nacional de Farmacia por su amabilidad y trato exquisito para con nuestra Presidenta, que han permitido diseñar nuevas vías de cooperación y desarrollo bilateral y también en el marco de la Unión Europea.

\* \* \*

Del 15 al 18 de febrero se celebró en la sede del Instituto de España el curso de «Acción de las hormonas a nivel cerebral», coor-

dinado por la Excma. Señora Doña Ana Pascual-Leone Pascual, vicepresidente de la Academia.

\* \* \*

El pasado 22 de enero, en Granada, y en la Solemne Sesión de Inauguración de Actividades Académicas de la Academia Iberoamericana de Farmacia, ingresó como Académico Correspondiente, el Doctor José de Vicente González, con el discurso: *Las Boticas de las Órdenes Religiosas Españolas*. El Doctor de Vicente es Académico correspondiente de nuestra Corporación; Doctor en Veterinaria y licenciado en Farmacia y en Ciencias Biológicas, pertenece al Cuerpo de Sanidad Nacional y al de Farmacia Militar con el grado de Coronel, ostenta diversas diplomaturas y títulos de especialista; ha escrito varios libros sobre boticas nacionales y extranjeras, es crítico de arte y está en posesión de numerosas condecoraciones.

\* \* \*

### **Sesiones científicas conjuntas de la RANF, el COF de Madrid y el Instituto Tomás Pascual**

El 16 de marzo se celebró en nuestra sede una Jornada organizada por la Real Academia Nacional de Farmacia, el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y el Instituto Tomás Pascual para la Nutrición y la Salud, sobre Fisiopatología, avances en el tratamiento nutricional e influencia del estilo de vida en la resistencia a la insulina. El acto fue presidido por la presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, Doña María Teresa Miras Portugal, y por el Presidente de la Fundación Tomás Pascual, Don Ricardo Martí Fluxá. En el curso se impartieron dos charlas que estuvieron a cargo del Doctor Manuel Portero Otín, profesor del Departamento de Medicina Experimental de la Universidad de Lleida y cuyo título fue: *Resistencia a la insulina: de la fisiología a la patología*, y del Doctor José Carlos Enrique Casasola, también del Departamento de Medicina Experimental de la Universidad de Lleida y cuya charla se tituló: *Avances en el tratamiento nutricional e influencia del estilo de vida en insulinoresistencia*. El curso

contó con gran asistencia de público, fundamentalmente profesionales de la farmacia.

\* \* \*

Nuestro Académico de Honor, Joan Massagué, ha sido galardonado con el prestigioso Premio Fundación BBVA «Fronteras del Conocimiento» en la categoría de Biomedicina. Se trata de la primera edición de este premio, a cuya entrega el 27 de enero, asistieron destacados representantes de la comunidad científica y de las altas instituciones del Estado.

\* \* \*

Los Doctores Benito del Castillo y Francisco Javier Puerto, ambos Catedráticos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y miembros de la Real Academia Nacional de Farmacia, han publicado la obra «La mujer en la publicidad farmacéutica durante la primera mitad del siglo XX». Con el apoyo económico de la farmacéutica Sanofi Pasteur MSD, en él se recogen 225 imágenes tanto de carteles, postales, cromos o estampitas diseñados el pasado siglo dirigidas a publicitar los productos farmacéuticos de la época. A lo largo de 17 capítulos, el libro expone imágenes «a veces bellas, a veces pobres y siempre sugerentes» en las que se mezcla «el interés por la Farmacia, por la salud, por el arte popular, por la literatura y por la imaginación». Las imágenes expuestas están precedidas de una presentación firmada por los doctores del Castillo y Puerto en la que se explica el contenido del libro desde un punto de vista histórico y reflexivo, pero siempre de forma clara y amena.

\* \* \*

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) es una organización sin ánimo de lucro, un modelo alternativo de investigación y desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las llamadas enfermedades olvidadas. Nacida en el año 2003, es fruto de la unión estratégica de siete organizaciones internacionales [cinco instituciones públicas: la Fundación Oswaldo Cruz de Brasil, el Consejo

de Investigación Médica de India, el Instituto de Investigación Médica de Kenia, el Ministerio de Salud de Malasia y el Instituto Pasteur de Francia; una organización humanitaria: Médicos Sin Fronteras (MSF) y la organización internacional de investigación UNDP/Banco Mundial/Programa Especial de la OMS para la Investigación y Formación en Enfermedades Tropicales (TDR), que actúa como observador permanente de esta iniciativa]. Recientemente DFNDi ha llevado a cabo una serie de iniciativas importantes, reseñadas en el noticiario de DFNDi del 19 de marzo pasado: Firma de un convenio de colaboración entre DNDi y las organizaciones catalanas: Centro para Investigación en Salud Internacional y la Fundación Clinic de Investigación Biomédica. Convenio con Pfizer para acceso a nuevos compuestos con posible actividad frente a tres enfermedades olvidadas (Enfermedad del Sueño, Leishmaniosis visceral y Enfermedad de Chagas).

