



EL PREMIO NOBEL DE MEDICINA 1997

El día 6 de Octubre de 1997 el comité Nobel del Instituto Karolinska, en Estocolmo, Suecia, otorgó el Premio Nobel en Fisiología y Medicina, correspondiente al año 1997 a Stanley B. Prusiner, por su descubrimiento de «Los priones: un principio biológico de infección».

El premio Nobel de 1997 en Fisiología o Medicina se le confiere al científico americano Stanley Prusiner por su descubrimiento pionero de un género **completamente nuevo y novel** de agentes que causan enfermedad y más importante, todavía, por la elucidación de los principios básicos de su **realmente nuevo mecanismo de acción**. Stanley Prusiner ha añadido los priones a la bien conocida lista de agentes infecciosos (bacterias, virus, hongos, parásitos).

Ciertas proteínas celulares, normalmente inocuas, tienen la habilidad, bastante peculiar, de que cuando tienen una configuración anormal, inducen a la correspondiente proteína normal a que asuma la misma configuración anormal. Estas proteínas pueden iniciar una reacción en cadena que lleva a la acumulación progresiva de proteínas configuradas anormalmente. Estas proteínas se llaman «priones» (una palabra construida alrededor de la noción de «partículas proteínicas infecciosas»). Mutaciones, en seres humanos y en animales resultan en

proteínas con una tendencia aumentada para generar «espontáneamente» la pequeña cantidad de la proteína prión (PrP) con la configuración anormal para comenzar el proceso patológico. La enfermedad y la capacidad de transmisión pueden ocurrir si se ingiere la proteína (por ejemplo en la comida).

Los priones son causa de un grupo de enfermedades degenerativas, tanto humanas como de animales y que hoy se clasifican juntas alrededor de la noción de que su etiología y patogenicidad incluye modificación de la proteína prión. Estas enfermedades priónicas se manifiestan como genéticas, infecciosas y esporádicas. En los cerebros de los enfermos, algunas regiones tienen una apariencia característica, porosa y esponjosa, lo cual evidencia muerte neuronal extensa. Individuos afectados presentan síntomas neurológicos como control muscular alterado, pérdida de agudeza mental y de memoria y por último insomnio. Los descubrimientos del profesor Prusiner nos dan luces y sirven de base para entender los mecanismos responsables de otras demencias y también establece la posibilidad de desarrollar drogas y tratamientos nuevos.

Las enfermedades causadas por priones incluyen scrapie, en ovejas y cabras, encefalopatía espongiforme bovina (la enfermedad de las vacas locas) y en gatos, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), el famoso

kuru (con su propio premio nobel), el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) y la insomnia humana familiar fatal. También se han identificado enfermedades en minks, mulas, venados y alces.

Hasta hace poco, los científicos creían que las enfermedades mencionadas eran causadas por virus lentos que contenían ácidos nucleicos; la literatura científica está llena de tales afirmaciones. El dogma sostenía que un agente infeccioso necesitaba DNA o RNA para invadir un organismo con éxito (por aquello de la reproducción). A pesar de investigaciones hechas por Alpers en la década de 1960 las que demostraban que métodos utilizados para inactivar ácidos nucleicos, radiación ultravioleta o ionizante, no afectaban la habilidad del agente del scrapie para infectar a las ovejas.

Las enfermedades pueden ser transmitidas entre especies diferentes (lo cual es ya una indicación de la enorme conservación evolutiva del gene y la proteína prión, conservación demostrada por genética molecular). La emergencia de la enfermedad de las vacas locas se pudo ascribir al uso de tejido derivado de ovejas, usado como suplemento en la comida de las vacas. La enfermedad de las vacas fue transmitida a seres humanos; y en estos la transmisión ha ocurrido debido al uso de hormona de crecimiento preparada a partir de glándulas pituitarias y por transplantes de cornea contaminados

y también por mal uso de instrumentos quirúrgicos. Se ha descrito recientemente un ensayo basado en la detección de la proteína neuronal 14-3-3 en fluido cerebrospinal de pacientes con CJD.

A principios de la década de 1970, el profesor Stanley Prusiner, neurólogo afiliado a la Universidad de California en San Francisco, expandió y fortificó la investigación de priones y se le debe dar crédito por el descubrimiento y la definición de los priones. En particular desarrolló una cepa de hamster (en donde el ensayo de la patología es mucho más rápido que en otros animales) susceptible al agente del scrapie y de los cerebros de estos aisló el agente infeccioso desconocido. Prusiner demostró, con métodos de la física y de la química, que la partícula infecciosa no tenía DNA ni RNA, luego descubrió que el agente infeccioso contenía proteína como componente primario pues proteasas, detergentes y fenol (agentes que modifican drásticamente a las proteínas) causaban inactivación de las partículas infecciosas.

¿Dónde se encuentra localizado el gene que especifica el prion? Quizás el gene se asocia a la proteína misma como en un virus? En 1984 Prusiner y sus colaboradores aislaron una sonda adecuada y demostraron subsecuentemente que el gene prion estaba presente en todos los animales ensayados, incluyendo al hombre. Este hallazgo suscitó más preguntas y más controversias. La solución se hizo evidente cuando la proteína prion, PrP, se podía doblar en dos configuraciones distintas y estables, una que resultaba en la enfermedad (PrP^{Sc}) y la otra normal. Después se demostró que PrP^{Sc} puede iniciar una reacción en cadena que convierte a PrP en PrP^{Sc}, esta última es muy

estable, y es resistente a proteólisis, solventes orgánicos y temperaturas mayores que los 100°C. Mutaciones en el gene prion causan las enfermedades hereditarias del cerebro mencionadas antes.

Prusiner publicó sus hallazgos implicando como agente infeccioso del scrapie a las partículas proteínicas infecciosas (priones). Sus resultados fueron mirados con suspicacia y rechazados con críticas por científicos que seguían sosteniendo la idea de que una proteína sola (la cual no se puede reproducir) no es suficiente para causar infección. Desde entonces hasta hoy, investigaciones extensas, en el laboratorio de Prusiner y en otros laboratorios, no han encontrado evidencia de ácido nucleico dentro de la partícula y se ha llegado a la conclusión, quizás con mucho dolor de parte de algunos científicos, de que los priones son compuestos primariamente de proteína.

Entre tanto se ha obtenido mucho conocimiento acerca de los priones y de las enfermedades que ellos causan. Se ha descubierto un gene prion (un gene que especifica la proteína de los priones) en todos los animales estudiados, incluyendo al hombre. El gene humano ha sido aislado, clonado y secuenciado. La evidencia indica que la proteína prion normal (PrP^C, de proteína prion celular) es un componente muy conservado en las membranas neurales de muchas especies; la conservación es tan grande que el gene de la oveja difiere del gene bovino en solo 7 posiciones. La similaridad le da credibilidad a la noción de transmisibilidad entre especies, aunque este modelo tiene varias restricciones. Por ejemplo, algunas enfermedades priónicas se transmiten de una especie a otra,

como la transmisión de CJD de hombres a ratones; otras enfermedades no se transmiten tan fácilmente. Ocurre además variedad en los modos de infección, algunos infectan «espontáneamente» mientras otros necesitan inducción autocatalítica por la presencia de un prion mutante. Hoy día, y gracias a los trabajos del profesor Prusiner se puede afirmar que un cambio conformacional representa la diferencia mayor entre la proteína prion del scrapie (PrP^{Sc}) y su isoforma celular normal (PrP^C).

El evento fundamental en las enfermedades priónicas parece ser un cambio conformacional en PrP. No se han podido identificar modificaciones químicas postraduccionales. PrP^C contiene alrededor del 45% de su secuencia en hélice α y contiene virtualmente nada de hoja plegada β . No se conoce el mecanismo que convierte PrP^C en PrP^{Sc}, pero la conversión resulta en una proteína con cerca al 30% hélice α y cerca al 45% hoja plegada β .

BIBLIOGRAFÍA

1. **Prusiner SB.** Molecular biology of prion N^odiseases. *Science* 1991; 252: 1515-1522.
2. **Prusiner SB.** The prion diseases. *Sci Am* 1995; 272: 48-57.
3. **Prusiner SB.** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136-144.
4. **Alper T, Haig DA, Clarke MC.** The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 22: 278-284.
5. **Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC.** Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 1967; 214: 764-766.
6. **Prusiner SB, Glenner GG, et al.** Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983; 35: 349-358.
7. **Prusiner SB.** Scrapie prions. *Annu Rev Microbiol* 1989; 43: 345-374.
8. **Pan KM, Prusiner SB et al.** Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *USA. Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 10962-10966.

Tobias Mojica Ph.D. Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia.

SE OBSERVAN MOLÉCULAS SINGULARES DEL DNA

La noción de que algún día, quizás pronto, todas las preguntas acerca del DNA habrán sido formuladas y respondidas, está en el aire. Ningún consuelo para los que llevamos casi 40 años observando el DNA. En esta vena de llegar a saberlo todo acerca del DNA están los experimentos de Stefan Wennmalm, Lars Edman, y Rudolf Rigler del Departamento de Biofísica Médica del Instituto Karolinska de Estocolmo acerca de las fluctuaciones conformacionales de moléculas singulares de DNA.

Las moléculas de DNA se marcan con un colorante fluorescente y se miden las vidas medias de la fluorescencia lo cual da una idea directa de la existencia de diferentes conformaciones en la molécula del DNA, moléculas singulares ni más ni menos. Las fluctuaciones conformacionales observadas por espectroscopia de correlación fluorescente dan lugar a un comportamiento de relajación (es decir, relajación de la estructura del DNA) que se describe exponencialmente y el cual indica la presencia de una distribución de las tasas de transición entre las dos conformaciones. No se sabe, todavía, si la distribución es inhomogénea, en la cual cada molécula contribuye con su propia tasa de reacción a la distribución global, o por el contrario, es una distribución homogénea, en la cual la tasa de reacción de cada molécula depende del tiempo. La sonda usada para estudiar las fluctuaciones conformacionales fue un oligonucleótido de 217 pares de bases marcado con tetrametilrodamina. Las moléculas se pegan a una superficie cubierta de estraptavidina y en estas condiciones las fluctuaciones de la fluorescencia indican directamente las transiciones entre dos estados conformacionales.

Notablemente las fluctuaciones típicamente observadas para moléculas singulares se parecen mucho a las que se ven en canales iónicos singulares en membranas celulares.

La observación y medida de moléculas singulares nos trae más cerca a la noción de que algún día se sabrá todo acerca del DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 94, 1997: 10641-10646

Tobías Mojica Ph.D. Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia.

LA ALTA TASA DE MUTACIÓN ESPONTÁNEA Y SU IMPACTO EN LA SALUD DEL HOMBRE

La alta tasa de mutación en humanos que terminan en situación nucleotídica se correlaciona estrechamente con el sexo y con la edad de tal manera que las mutaciones puntuales de este tipo se presentan más frecuentemente en los hombres y en particular en los de mayor edad; aunque muy seguramente el mayor número de divisiones de las células de la línea germinal masculina contribuyen a este aumento. Este proceso no responde totalmente por el gran impacto que el paso del tiempo tiene sobre la línea germinal del varón. En *Drosophila* sp la tasa de mutación que causa efectos deletéreos mínimos se calcula que está alrededor de una mutación nueva por cigoto; en el hombre se calcula debe ser mayor, pues la cantidad de DNA y el número de genes es definitivamente más grande; sin embargo para que la especie pueda enfrentar retos mutacionales tan enormes debe adoptar proceso: de selección severos. El Doctor James F. Crow del laboratorio de Genética de la Universidad de Wisconsin, realiza

una revisión importante de tales aspectos y su impacto en la salud pública, en la que propone un proceso de "muerte genética" para los genes mutantes en un proceso de cuasi-truncamiento que permitiría un aceptable control del severo proceso mutacional en el hombre.

Crow JF. PNAS. Vol 94, 1997:8380-8386

Carlos Enrique Molano Montes M.D. Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia.

TIPIFICACIÓN DE DNA EN TREINTA SEGUNDOS

Dieter Schmalzing y colaboradores, del Instituto Whitehead para la Investigación Biomédica y del Laboratorio de identificación por DNA de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos, reportan un método de genotipificación basado en el análisis de segmentos repetitivos cortos (Short Tandem Repeats) ó STR's previamente amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. En su ensayo utilizan los loci CSF1PO, TPOX, THO1 y vWa para cuyo análisis tardan menos de dos minutos.

su desarrollo tecnológico lo logran a través de un dispositivo de electroforesis que posee un microcanal de 26 mm de largo x 100 micras de diámetro relleno con gel de policarilamida que opera bajo condiciones denaturalizantes. Este proceso es fácilmente automatizable lo que brindará en el futuro una reducción importante de los costos de los procesos de identificación por DNA.

Schmalzing D, et al. PNAS. Vol 94, 1997: 10273-10278

Carlos Enrique Molano Montes M.D. Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia

SENSORES DE ENERGÍA PARA LA AEROTAXIS EN *ESCHERICHIA COLI*

El oxígeno es esencial para la generación eficiente de energía celular en condiciones de aerobiosis. También es una causa de toxicidad debido a la producción de radicales superóxido e hidroxilo. No es pues sorprendente que las células motiles han desarrollado estrategias para buscar ambientes con concentraciones óptimas de oxígeno. El fenómeno se llama aerotaxis y fue originalmente descrito hace más de un siglo. Las bases moleculares de la aerotaxis y de la quimotaxis han sido estudiadas desde la década de los años 60. Un foco central de estudio ha sido el mecanismo por medio del cual las células detectan gradientes de oxígeno y transducen señales que dirigen la migración durante la aerotaxis. Recientemente dos grupos de investigadores identificaron, independientemente, un sensor novel llamado "Aer" y uno de los dos grupos ascribió una nueva función al quimorreceptor de serina, "Tsr".

Aer fue identificado por Rebbapragada y sus cols y por Bibikov y sus cols como producto de un ORF (marco abierto de lectura) descubierto por el grupo que maneja el proyecto de secuenciamiento de todo el genoma de *Escherichia coli*. La proteína inferida es de 506 aminoácidos y tiene las características básicas que se le han adscrito al sensor/transductor de la aerotaxis. La secuencia contiene : una región hidrofóbica que podría anclar la proteína a la membrana; un dominio homólogo a dominios sensores de oxígeno y un dominio homólogo a dominios de transmisión de señales. Se infería la existencia de este último dominio por la observación de que la aerotaxis necesita los

componentes de fosfotransferencia especificado por los genes cheW, cheA y cheY, que comprenden el camino metabólico de transducción quimotáctica de señales. Es por lo menos interesante que si Aer es tan fácilmente identificable por los motivos de su secuencia, no haya sido descubierto antes.

La identificación del gene aer sirvió de base para hacer ensayos para examinar su papel en aerotaxis. Células con aer defectuoso disminuían su aerotaxis con quimotaxis normal; la aerotaxis era restaurada introduciendo aer normal portado en un plásmido, pero Rebbapragada postula la existencia de un transductor adicional para la aerotaxis ya que la aerotaxis nunca es eliminada completamente. La aerotaxis es eliminada completamente en un mutante doble que incluye aer y tsr (el gene que especifica el quimorreceptor/transductor de serina). Se postula la independencia, en función, de Aer y Tsr.

La identificación de aer abre nuevas direcciones de investigación. Indudablemente veremos como Aer funciona en la aerotaxis y como las bacterias mantienen niveles óptimos de energía. La existencia de motivos sensores similares en Aer y en otras proteínas sugiere la posibilidad de que el mecanismo molecular usado por Aer puede representar una estrategia común usada por las células de todos los organismos para «saber» su estado energético intracelular.

- Rebbapragada A, Johnson MS, Harding GP, Zuccarelli AJ, Fletcher HM, Zhulin IB & Taylor BL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94: 10541-10546.
- Bibikov SI, Biran R, Rudd KE & Parkinson JS. J. Bacteriol. 1997; 179: 4075-40798.

Tobias Mojica Ph.D. Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia.

CÉLULAS FETALES EN LA CIRCULACIÓN MATERNA

El diagnóstico prenatal de las anomalías genéticas en etapas tempranas del embarazo es de mayor trascendencia en el manejo de las gestaciones de alto riesgo. Los métodos de diagnóstico para enfermedades hereditarias, usando células fetales en la circulación sanguínea materna, ofrecen una alternativa de mínimo riesgo en comparación con la amniocentesis o la toma de muestra de velloidad coriónica; sin embargo uno de los mayores obstáculos en este tipo de análisis es la dificultad para obtener células fetales nucleadas de la circulación materna ya que la proporción de estas es muy bajas 1/100.000 o menos.

Satoshi Sohda y sus colaboradores, del departamento de obstetricia y ginecología, del departamento de inmunología y del de genética médica de la Universidad de Tsukuba en Japón proponen una metodología basada en la identificación por inmunofluorescencia (Fluorescence Activated Cell Sorting ó FACS) de las células fetales nucleadas y su separación subsiguiente.

Los resultados de su análisis indican una mejora importante en la concentración de células fetales nucleadas en las muestras de sangre periférica materna pero dejan entrever la necesidad de refinar la técnica empleada sobre todo en la fase de identificación inmunológica de las células fetales.

Sohda S, et al, Prenatal Diagnosis. Vol 17, 1997; 8:743-752.

Carlos Enrique Molano Montes M.D. Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia.