

Presentación del Dr. Vladimir Filimonov en el Palacio de la Madraza de Granada el 12 de Diciembre de 2011

Buenas tardes, quisiera ante todo mostrar mi satisfacción por tener la oportunidad de impartir una conferencia sobre la colaboración entre el Instituto de Proteínas de Moscú y la UGR en un lugar tan emblemático como este salón del Palacio de la Madraza y, naturalmente, agradecer a la UGR, y en particular al Prof. Agatángelo Soler, la invitación para participar en este acto.

Esta historia comenzó en el año 1967 con la fundación del Instituto de Proteínas en la ciudad de Pushchino a unos 100 Km. al sur de Moscú. El instituto pertenecía a la Academia de Ciencias de la URSS y la misma ciudad fue construida como el Centro de los Estudios Biológicos de dicha Academia.

Tanto el Instituto como el Centro pertenecen ahora a la Academia de Ciencias de la Federación Rusa. Estos días el Centro reúne nueve Institutos y una Universidad pequeña donde trabaja la mitad de la población de Pushchino, la cual se calcula en unos 20 mil habitantes aproximadamente.

El Instituto de Proteína (IP) fue fundado por dos investigadores rusos: los doctores Alexander Spirin y el ya fallecido Olég Ptitsyn. Estos dos científicos, todavía bastante jóvenes en el año 1967, dirigían dos líneas principales de investigación fundamental: biosíntesis de proteínas (Prof. Spirin) y el plegamiento de las proteínas para dar la estructura ordenada (Prof. Ptitsyn). El Prof. Spirin, por entonces Director de IP, fue nombrado Doctor Honoris Causa por la Universidad de Granada en el año 1972 gracias a su colaboración y amistad con el Dr. Federico Mayor Zaragoza, por entonces Rector de la UGR.

Estos dos procesos, biosíntesis y plegamiento de proteínas, constituyen dos etapas terminales del dogma central de la moderna Biología Molecular, formulada en los finales de los años 50:

Según este dogma toda la información sobre las estructuras primarias (las secuencias de aminoácidos) de las proteínas de cualquier organismo esta escrita en las cadenas muy largas de ADN. Cuando es necesario, la célula produce unas copias de un fragmento de ADN (de un gen). Estas copias se llaman los ARN mensajeros y contienen la información sobre la estructura primaria de una o unas proteínas. Estas moléculas poliméricas están unidas a unas maquinas moleculares, los ribosomas, las cuales trasladan la información contenida en el ARN a la secuencias de aminoácidos de las proteínas. Posteriormente, las cadenas polipeptídicas se pliegan de forma espontánea formando unas estructuras altamente ordenadas y en muchos casos globulares.

En este estado final, con su estructura plegada única, las proteínas pueden ejercer muchas funciones dentro o fuera de las células.

Tanto la biosíntesis como el plegamiento de las proteínas son procesos muy complicados y vienen siendo investigados por decenas de los laboratorios en todo el mundo. Con el paso del tiempo aparecieron algunos nuevos campos de investigación en IP.

Líneas de investigación actuales:

- Mecanismos de biosíntesis de proteínas y su regulación.
- Estructura y función de las proteínas y sus complejos con ácidos nucleicos.
- Estudios teóricos y experimentales del plegamiento de proteínas y de la estabilidad de sus estructuras. Bioinformática y proteómica.
- Estudios del citoesqueleto y de la movilidad de células.
- Desarrollos en biotecnología y biomedicina. Síntesis extracelular de proteínas y ácidos nucleicos.

En la naturaleza las proteínas tienen una gran variedad de funciones. La mayoría de ellas son enzimas o biocatalizadores.

Los catalizadores son sustancias que aceleran las reacciones químicas sin consumirse ellos mismos. Son absolutamente imprescindibles para los seres vivos y, también, para muchas tecnologías químicas. De hecho, si todas las reacciones químicas o bioquímicas se realizaran sin problemas y rápidamente según sus ganancias energéticas todo el mundo llegaría muy pronto al equilibrio, es decir, a un mundo muerto como una roca. Lo que hacen las enzimas es acelerar de forma selectiva unas reacciones o unos procesos necesarios en ese momento para una célula viva o, incluso, para un organismo. Así, algunos organismos utilizan la energía solar para transformar unas sustancias químicas en otras que pueden ser luego utilizadas por ellos mismos u otros organismos para su supervivencia y reproducción. Esta reserva de energía química sería similar a un gran embalse en el que las enzimas serían los análogos de los operadores de la multitud de las puertas de salida de agua y que las abren siempre que se requiera realizar un cierto trabajo o proceso.

Las proteínas también sirven como:

- Módulos estructurales
- Reguladores de procesos
- Transporte
- Protectoras o para defensa de las células o del organismo
- “Máquinas” que transforman la energía química en mecánica o eléctrica
- Otras “máquinas” que funcionan como “bombas” o puertas selectivas
- Almacenes de reserva (como las proteínas de la leche o los huevos)
- Y muchas otras funciones.

Pero para cumplir con sus funciones las cadenas polipeptídicas tienen que adquirir su estructura funcional, en otras palabras, transformarse de una forma desordenada en otra u otras ordenadas o plegadas. En las siguientes diapositivas están presentes las cadenas

polipeptídicas diseñadas para mostrar los 20 residuos o restos básicos que constituyen las cadenas de casi todas las proteínas.

Unos aminoácidos, como la alanina, se encuentran en las proteínas con mayor frecuencia, mientras que otros, como el triptófano, son menos frecuentes. Casi la mitad de los residuos son hidrofóbicos por su dificultad para disolverse en agua. Otros grupos, al contrario, son hidrofílicos, y entre ellos se pueden distinguir los que no están cargados y otros que llevan carga negativa o positiva. Algunos grupos son muy activos y pueden formar varios tipos de enlaces químicos y otros, como la mayoría de los grupos hidrofóbicos, son muy inertes. Toda esa variedad de grupos se encuentran en las cadenas polipeptídicas en una cantidad casi infinita de combinaciones, lo que produce una variedad enorme de proteínas.

Como he dicho antes, la cadena polipeptídica sale del ribosoma con la estructura desordenada, tal y como se ve en la siguiente diapositiva

Así se puede presentar una de las estructuras (conformaciones) múltiples que puede fácilmente adquirir la cadena polipeptídica de una proteína bastante pequeña después de su salida del ribosoma. Se trata aquí de la secuencia de un pequeño dominio (parte de una proteína) denominado SH3 y sobre cuya función hablaremos más tarde.

Esta estructura es muy flexible y no está bien ordenada en el espacio, pero se puede transformar rápidamente (unas milésimas del segundo) en una conformación fija y parecida a un cristal aperiódico.

En esta estructura, que se llama nativa, la mayoría de los átomos ocupan posiciones fijas con respecto a sus vecinos, aunque están vibrando con frecuencias bastante altas alrededor de esas posiciones fijas (dinámica).

Las proteínas adquieren esta conformación nativa o plegada cuando están en un medio acuoso, pues las interacciones del agua con los restos de aminoácidos juegan un papel fundamental para que la cadena polipeptídica adquiera dicha conformación.

Otra forma de presentar esta conformación aparece en la diapositiva siguiente, en la que se muestra la superficie de dicha proteína y en la que se ve que las moléculas pequeñas como el agua no pueden penetrar fácilmente en el centro de la proteína globular.

Para hablar del plegamiento habría que decir unas palabras sobre la necesidad de conocer la estructura plegada de la proteína bajo investigación. Hay dos métodos básicos para determinar las estructuras nativas de las proteínas (resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X) que se utilizan cuando la estructura no se conoce de antemano. De hecho, existe un banco de datos estructurales que se llama PDB y que contiene ya decenas de miles de estructuras conocidas. También hay programas de ordenador que permiten visualizar, analizar y modificar estas estructuras. En el IP hemos hecho muchos estudios estructurales de proteínas.

Ya sabemos que las cadenas polipeptídicas pueden plegarse de forma espontánea formando una estructura única y bien ordenada, cuya energía es inferior a la forma desplegada (diríamos que el sistema tiende a un mínimo de energía).

¿Pero cuáles son las fuerzas que dirigen este proceso de plegamiento? Esta es una investigación central para la mitad del Instituto de Proteínas y también para el grupo de Prof. Mateo en UGR.

Unos 50 años atrás un ganador del Premio Nóbel, Prof. Anfinsen, demostró que las proteínas pequeñas pueden plegarse en su estructura nativa después de ser desplegadas en solución por la temperatura o por algunos agentes químicos. A partir de esta observación se creó uno de los dogmas centrales de biología molecular:

la información sobre la estructura nativa y ordenada está escrita en la misma secuencia de los aminoácidos en la cadena polipeptídica.

Puesto que esta cadena puede plegarse y desplegarse con el cambio de la temperatura de forma rápida y reversible, la estructura nativa debe corresponder a un mínimo de energía de Gibbs. Además, se ha descubierto que las proteínas pequeñas pueden existir solo en dos estados: plegado y desplegado.

Es aquí donde dentro de los estudios biofísicos surge la termodinámica, una ciencia clásica desarrollada ya en el siglo XIX, en la que la energía de Gibbs es una función fundamental.

¿Pero, qué es la energía de Gibbs?

Se trata de un parámetro energético cuyo valor determina si un proceso o una reacción ocurren en un sentido u otro (por ejemplo, paso de la estructura plegada a la desplegada en una proteína, o viceversa, y en donde dicha función tiende a adquirir el valor mínimo posible, al igual que agua siempre corre a un lugar mas bajo para minimizar su energía potencial. Uno de los parámetros que influye decisivamente en el valor de la energía de Gibbs es el calor que se desarrolla en el proceso (que en termodinámica denominamos entalpía cuando la presión no varía en dicho proceso). Este calor, o entalpía, es una de las funciones termodinámicas que pueden determinarse experimentalmente de forma directa por medio de los calorímetros.

Los calorímetros existen desde el siglo XVIII (Lavoisier), pero para poder investigar el proceso de plegamiento de proteínas o sus interacciones débiles con otras moléculas hubo que diseñar nuevos aparatos de muy alta sensibilidad: los que puedan medir microcalorías y de ahí el nombre de microcalorímetros. La razón para esta alta sensibilidad y la necesidad de estos sofisticados instrumentos está en que las proteínas suelen ser muy caras y difíciles de purificar y al estar en disoluciones muy diluidas ocasionan calores muy pequeños que los calorímetros convencionales no pueden detectar. Estos aparatos fueron diseñados y construidos en el Instituto de Proteínas en los pasados años setenta por nuestro grupo, dirigido entonces por el Prof. Piotr Privalov.

En la siguiente diapositiva estoy yo junto con el aparato de diseño “casero”, que sirvió como prototipo del primer microcalorímetro ruso comercial.

Con estos aparatos (porque hubo una serie de ellos) pudimos obtener algunos resultados originales e importantes, de forma que nuestro grupo de investigación se hizo un líder mundial no solo en el desarrollo de la instrumentación, sino también en los estudios fundamentales en este campo. Por eso empezamos tener muchos contactos internacionales y, entre ellos, surgió precisamente un contacto español, con el grupo del Prof. Cortijo en la Universidad de Granada. El motivo estuvo en que un científico joven de este grupo, el Dr. Pedro Luis Mateo, acababa de volver de su estancia posdoctoral en EE.UU. donde había trabajado en la Universidad Yale (EEUU) en el laboratorio del conocido biotermodinámico Prof. Julian Sturtevant.

Después de regresar de los EE.UU. en el año 79, el Dr. Mateo decidió a unirse a nuestro grupo de termodinámica en el Instituto de Proteínas y pasó con nosotros un año entero (1980/81) trabajando en el laboratorio, mientras sufría el duro y frío invierno de Rusia central. Durante su estancia conoció tanto al entonces embajador de España en Moscú, D. Juan Antonio Samaranch, como otras gentes de la comunidad española en Moscú, en tiempos, no olvidemos, de lo que fue la Unión Soviética, por lo cual en esos tiempos dicha comunidad era muy pequeña. El Dr. Mateo también participó en 1981 en el Congreso de Biocalorimetría celebrado en Tbilisi, capital de la actual República de Georgia. Por otra parte, una de las personas más importantes en la ciencia biológica de Rusia en los años 80 fue el Académico Yuri Ovchinnikov, Vicepresidente de la Academia de Ciencias Rusa, Director del instituto de Química Bioorgánica en Moscú y Presidente de la Sociedad de la Amistad entre Rusia y España. Con la participación de Pedro Mateo y del propio Dr. Ovchinnikov se organizó una visita a Pushchino del Sr. Samaranch y, además, una exhibición de vídeos y de sus objetos del arte en nuestro Instituto, durante lo que fue una semana de cultura española en el Instituto. Algunas fotos de su visita se ven en las diapositivas siguientes.

De estos contactos iniciales surgió la colaboración entre los dos grupos de forma que en Noviembre del año 81 el Prof. Privalov y yo hicimos una visita de un mes a España. Quizás esta fue la primera visita oficial de un grupo científico Ruso a la España democrática. Durante ese mes visitamos varios laboratorios en Madrid, Barcelona, Sevilla y, por su puesto, en Granada. Además trajimos con nosotros el calorímetro DASM-1, por entonces y con diferencia el mejor microcalorímetro del mundo, como un regalo de la Academia de Ciencias Rusa y lo instalamos en el Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias.

A partir de entonces los estudios termodinámicos continuaron en ambos grupos, con varios artículos publicados por el Dr. Mateo, el Dr. Privalov y otros científicos rusos. Estos resultados fueron presentados además en las conferencias internacionales organizadas cada año en países diferentes. En el año 81 llegó el turno de Rusia y dos años después a España.

En Rusia la citada conferencia internacional de biocalorimetría tuvo tres destinos, Moscú, Pushchino y Tbilisi, la capital de la República de Georgia. En las diapositivas siguientes se presentan fotos del evento.

Por otra parte, los Drs Cortijo y Mateo organizaron el Simposio Internacional de Biotermodinámica, celebrado en Granada en otoño de 1983, al que naturalmente también asistimos algunos científicos rusos. Precisamente, y días antes de dicho Simposio, el Prof. Ovchinnikov fue nombrado Doctor Honoris Causa por la Universidad de Granada, con motivo del cuál pronunció una conferencia en el Hospital Real sobre la cooperación científica entre ambos países y, en particular, la Universidad de Granada.

Posteriormente, el grupo del Dr Mateo organizó el Primer Congreso Hispano-Soviético de Biofísica, celebrado en Granada en 1987, que tendría su respuesta el 1991 en el segundo Congreso celebrado en Kiev, así como en Moscú y Puschino.

No obstante, con la emblemática caída del muro de Berlín y el final de la Unión Soviética, la ciencia en Rusia entró lamentablemente en un difícil proceso por falta de financiación. Baste como ejemplo el que el Prof. Privalov, acompañado por una parte del grupo de biotermodinámica, se fue a EEUU en 1991, donde actualmente ocupa la posición del profesor en la Johns Hopkins University, mientras que yo, en esos años, preferí permanecer en Rusia, en el Instituto de Proteínas, con mi propio grupo trabajando en el desarrollo del método de biosíntesis extracelular de proteínas.

En el año 92 la situación económica y política en Rusia se hizo muy difícil y yo entonces acepté la invitación de mi colega y también amigo, el Dr. Pedro Luis Mateo, para venir a Granada y trabajar un año o dos en el contexto de un proyecto europeo que acababa de conseguir. En esos momentos en el grupo de Pedro había pocos investigadores senior y quiero pensar que mi presencia le ayudó mucho a organizar la investigación, así como en la tutela y formación de los jóvenes licenciados y doctores del grupo, hoy excelentes profesionales.

Bueno, estos uno o dos años del proyecto europeo se prolongaron luego hasta doce años (!), es decir, hasta 2004, años que yo pasé en Granada con mucho gusto, muchos resultados y muchas y buenas publicaciones.

Permítaseme ahora regresar a la ciencia en el contexto de esta larga y fructífera colaboración científica entre el Instituto de proteínas y el grupo de Pedro en la UGR.

Como ya dije antes, los microcalorímetros fueron diseñados para medir los muy pequeños calores que absorben las soluciones de proteínas en el proceso de despegamiento inducido por el aumento de la temperatura. En otras palabras, el calorímetro nos permite obtener directamente este calor, o entalpía, así como la capacidad calorífica de la proteína en disolución, y obtener a partir de estos valores otras importantes funciones termodinámicas, como la citada energía de Gibbs o la entropía, que proporciona una idea de la ordenación y estructuración de la molécula. Los valores de todas estas funciones admiten, naturalmente una interpretación en términos estructurales y de las fuerzas que tienen lugar dentro de la macromolécula.

De hecho, los cambios de estas funciones corresponden a la suma de las acciones de las fuerzas débiles que dirigen tanto el plegamiento de las proteínas, como sus interacciones funcionales.

Las fuerzas principales que intervienen en estos procesos surgen de los denominados efectos hidrofóbico y hidrofílico.

¿De qué se trata? Pues, así como a unas sustancias químicas les gusta disolverse en agua, otras no pueden prácticamente disolverse. Por ejemplo, si tomáis una gota de aceite y la ponéis en agua va a flotar en la superficie sin mezclarse con el agua, es decir, sin disolverse. Esto es porque que las moléculas de las sustancias presentes en el aceite son hidrofóbicas, como también lo son la tercera parte de los aminoácidos naturales. Por otra parte, los ácidos, como el ácido acético del vinagre, se disuelven fácilmente en agua hasta concentraciones muy elevadas. Estas moléculas y residuos se llaman hidrofílicos. Durante el plegamiento la cadena polipeptídica de la proteína prefiere aislar los grupos hidrofóbicos de agua, mientras que los hidrofílicos quedan en la superficie de los glóbulos.

También hay otros factores estructurales de importancia en la estabilidad de la estructura plegada de la proteína.

Como etapa previa a la formación de la estructura plegada, la cadena polipeptídica suele formar las denominadas estructuras secundarias, tales como las hélices alfa y las laminas beta. Estas estructuras se mantienen gracias a otras interacciones débiles como son los enlaces de hidrogeno. En las diapositivas siguientes tenemos un ejemplo cómo la secuencia de aminoácidos en estos elementos de estructura secundaria pueden influir en la estabilidad de la estructura global de una pequeña proteína.

Después de analizar muchos datos termodinámicos sobre la estabilidad de las hélices alfa, un científico español, el Dr. Luis Serrano, ha desarrollado un algoritmo para predecir el efecto de los cambios puntuales en una hélice alfa sobre su estabilidad. Este algoritmo se llama AGADIR y lo hemos usado, junto con otros grupos españoles y el propio Luis Serrano, para modificar un pequeño dominio, es decir, una parte de una proteína que se pliega por sí misma, como es el dominio de activación de la procarboxypeptidasa.

Así, hicimos una predicción acerca de dónde y cómo hay que cambiar los aminoácidos de la cadena para conseguir un efecto estabilizador. Luego estos cambios (mutaciones) se introdujeron con los métodos de la ingeniería genética e investigamos tres versiones mutantes de la proteína así modificada, mostrando cómo el algoritmo AGADIR es útil para diseñar proteínas con estructuras más estables.

Este es solo un ejemplo de los muchos estudios en los que yo participé junto con mis colegas y alumnos españoles durante mi estancia en Granada. Participé también en varios proyectos europeos y españoles, como los dos proyectos INTAS de la UE para la colaboración específica entre los grupos del IP y de la UGR, teniendo la oportunidad de asistir a multitud de reuniones científicas en diversas universidades y laboratorios europeos mostrando los resultados obtenidos de esta fructífera colaboración entre ambos equipos. Además durante esos años fui director o codirector de 5 tesis doctorales en la Universidad de Granada.

Aparte del caso citado acerca del aumento de la estabilidad de una proteína, la cuestión sería para qué más puede servir toda esta información termodinámica que hemos acumulado en nuestros laboratorios.

Primero. ¿Podríamos predecir la estructura plegada de una proteína a partir de su secuencia de los aminoácidos? Por ejemplo, imaginemos el diseño de una proteína que no existe en la naturaleza, lo que se llama diseño de novo de una especie quimérica. Hoy día existen ya varios programas de ordenador para hacer este trabajo basándose en la idea de que la estructura plegada debe corresponder a un mínimo de la energía de Gibbs. Estos programas hacen unos cálculos muy complejos con un éxito todavía relativo porque no todos los parámetros se conocen con la precisión necesaria.

Segundo. ¿Hasta qué punto se puede cambiar de una manera dirigida y racional la estabilidad u otras cualidades de una proteína de interés con fines biotecnológicos? Este es evidentemente un campo de gran importancia tecnológica y de gran actividad en nuestros grupos y, por supuesto, en muchos otros en el mundo.

Tercero. Puesto que las interacciones débiles que dirigen el plegamiento son las mismas que las que determinan las interacciones funcionales de las proteínas con otras moléculas, la misma información y método termodinámico podrían utilizarse para diseñar agentes que pueden mejorar o inhibir, según se requiera, las actividades de las proteínas, lo que abre la puerta al diseño racional de fármacos y medicamentos

Veamos un último ejemplo. El dominio SH3, del cual ya hablé antes, se encuentra en muchas ocasiones incluido en proteínas bastante grandes llamadas quinasas, que funcionan como reguladores de la actividad de otras proteínas por unión selectiva a otras moléculas. Como se ve en la diapositiva una quinasa típica consta de cuatro dominios, en donde uno de ellos es un SH3. Cuando en la solución no hay un péptido con la secuencia adecuada para unirse de forma específica al SH3, éste queda pegado a los dominios funcionales y esta

interacción no permite a la quinasa desarrollar su función. Hoy día estamos en disposición de diseñar un ligando apropiado de forma que pueda unirse al dominio SH3 con suficiente afinidad como para permitir así que la quinasa funcione, lo que abre la posibilidad del citado diseño racional de fármacos.

Otra aplicación de este conocimiento y metodología biotermodinámica estaría en la comprensión y racionalización de cómo y por qué se forman las denominadas fibras amiloides durante el proceso de plegamiento/desplegamiento de las proteínas y cuya incidencia en enfermedades como el Alzheimer es bien conocida. En estos campos, investigación sobre el reconocimiento molecular para el diseño racional de medicamentos, como serían las vacunas, o el estudio citado sobre fibras amiloides, se viene trabajando en los grupos de investigación tanto del IP como en el de la UGR.

Eso es todo. Muchas gracias por su atención.