

Premio Nobel de Medicina 1997: Stanley B. Prusiner. Reconocimiento académico de la existencia de los priones

A los 55 años de edad, Stanley B. Prusiner ha recibido el Premio Nobel de Medicina 1997. El Instituto Karolinska, en Estocolmo, le confirió esa distinción por "su descubrimiento de los priones, un nuevo principio biológico de infección". Los priones y las encefalopatías espongiformes de esa etiología ya habían sido tema de dos editoriales^{1,2} publicados por Medicina (Buenos Aires), el último hace pocos meses. En toda forma, se hace ahora pertinente mencionar los más relevantes descubrimientos que en su progresivo curso continuaron fundamentando la vigencia del término "prion", introducido por Prusiner³ para así enfatizar la naturaleza proteinácea e infecciosa del agente causal de algunas enfermedades neurodegenerativas animales (scrapie y encefalopatía espongiforme bovina, entre otras) y humanas (kuru, Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Sträussler-Scheinker e insomnio familiar fatal). La primera aproximación de Prusiner al enigma etiológico que planteaban las encefalopatías espongiformes data de 1972 cuando, como médico residente en neurología de la Universidad de California en San Francisco, se enfrentó a una paciente con enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Consecutivamente, dejó la medicina asistencial por la investigación para seguir desempeñándose en la misma institución; allí y en la Universidad de Berkeley, es además profesor de neurología, virología y bioquímica.

En sus estudios iniciales, Prusiner y el equipo bajo su dirección se focalizaron en el scrapie, prototipo de ese grupo de enfermedades del SNC que para entonces se atribuían a hipotéticos virus lentos. Sin embargo, y según recuerda Vogel⁴, ya en 1960 se habían adelantado otras posibilidades, desde que Alper, biólogo del Hammersmith Hospital, en Londres, había constatado que tejidos cerebrales de oveja con scrapie retenían su infectividad luego de sometidos a radiaciones ionizantes y ultravioletas que habrían destruido toda traza de ADN o ARN; concomitantemente, Griffith, un médico del Bedford College, también en Londres, había sugerido que quizás una proteína, al plegarse en una forma diferente a la habitual, fuera capaz de catalizar ese mismo proceso en otras proteínas.

A comienzos de la década del 80 y después de desarrollada una metodología que permitía una mejor purificación de tejidos cerebrales infectados por scrapie, Prusiner y sus colaboradores⁵ pudieron determinar que los procedimientos que modifican o hidrolizan las proteínas no disminuían la infectividad; sorprendentemente, dicha infectividad tampoco mostraba evidencias de depender de un polinucleótido. Al año siguiente comprobaron que esa proteína prion asociada al scrapie (PrP^{Sc}) era relativamente resistente a la degradación por proteasas⁶ y que, por extracción con detergentes, polimerizaba en filamentos amiloides⁷.

Una vez establecido que los priones estaban compuestos principalmente, si no exclusivamente, por PrP^{Sc}, Prusiner y su equipo⁸ descubrieron que esa proteína, cuyo PM era de 27-30 kDa, derivaba de otra mayor (33-35 kDa), la que a su vez fue denominada PrP^C por estar presente tanto en cerebros normales como infectados. La PrP^C, codificada por un gen cromosomal y sintetizada en el retículo endoplásmico, es luego modificada en el aparato de Golgi y transportada a la superficie celular, a la que liga por un inositol glicofosfolípidico de anclaje; en contraste, la PrP^{Sc} tiende a acumularse en vesículas intracitoplasmáticas, y es resultado de una lenta síntesis mediada a nivel de post-traduccion^{9, 10}. Muchas evidencias, ordenadamente consideradas por Prusiner en una revisión del tema¹¹, sostienen la hipótesis de que PrP^{Sc} es el componente esencial de la partícula infecciosa; hasta ahora, todos los intentos por encontrar un segundo componente en la constitución del prion han sido infructuosos.

En años recientes, el empleo del ratón transgénico ha permitido establecer que la PrP^C es más eficientemente convertida en PrP^{Sc} si existe identidad entre las secuencias de ambas isoformas; más aún, ese modelo experimental ha suministrado evidencias genéticas de interacciones homofílicas entre PrP^{Sc} del inóculo y PrP^C sintetizada por el huésped¹². En base a que la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} implica un cambio de conformación con disminución del contenido de hélices- α y aumento de la can-

tividad de láminas- β , Prusiner ha propuesto¹³ que eventuales fluctuaciones en la estructura de PrP^c fueran las responsables de la generación de un monómero parcialmente desplegado, cuyo destino oscilaría entre la degradación, o la reversión a PrP^c, o la formación de PrP^{Sc}. En cuanto a la génesis de las diversas formas de las enfermedades por priones, las infecciosas resultarían del ingreso de priones exógenos que habrían de desempeñarse como templados para promover la conversión del intermediario en PrP^{Sc}, en tanto que en las hereditarias, las mutaciones en el gen PrP desestabilizarían la PrP^c para así promover su conversión; finalmente, las raras ocasiones en que ocurriera una suficiente acumulación del monómero intermediario, se darían las condiciones para la producción de PrP^{Sc} y la consiguiente emergencia de una enfermedad a forma esporádica.

En investigaciones orientadas a precisar las características de la barrera responsable de que la transmisión de priones de una especie a otra se acompañe de una prolongación del período de incubación, Prusiner y colaboradores¹⁴ recurrieron a ratones capaces de expresar transgenes PrP tanto humanos como quiméricos, y así se posibilitó el descubrimiento de un tercer componente en la interacción PrP^c/PrP^{Sc}. Ese componente, de probable naturaleza proteica y provisoriamente designado proteína X, liga a PrP^c facilitando la formación de PrP^{Sc}. Esa proteína X representaría un blanco terapéutico atractivo, sobre todo si se lograra modificar su papel de chaperón molecular en la conversión estructural de PrP^c en PrP^{Sc}; otra posibilidad interesante sería la estabilización de las hélices- α de PrP^c, mediante su ligado a un fármaco que tuviera ese efecto¹⁵.

Un mayor conocimiento de los mecanismos involucrados en el desplegamiento y replegamiento de las isoformas de PrP, es indudable que no sólo permitirá interferir en la patogenia de las enfermedades por priones, sino también considerar diferentes perspectivas en referencia a etiología y tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas más comunes, tales como Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica. Una nueva área de la investigación biomédica, sustentada tanto en la biología celular y molecular como en la química y estructura de proteínas, está siendo desarrollada en torno a una revolucionaria hipótesis que suscitó y seguirá suscitando polémicas, ya que hasta ahora nadie ha sido capaz de inducir enfermedad por inoculación experimental de una proteína prion sintetizada en el tubo de ensayo, y por tanto libre de toda contaminación por posible virus u otro tipo de partícula. En toda forma, hay coincidencia en que, sea cual fuere el desencadenante de la generación del prion, es indiscutible que ese tipo de agente infeccioso no registra antecedentes en la biología ortodoxa. Aun aceptando que restan muchas incógnitas por resolver, el Premio Nobel de Medicina 1997, esta vez conferido a un único investigador (no se daba el caso desde 1987, y ello sólo ha ocurrido en 10 ocasiones durante los últimos 50 años), ha reconocido la transcendencia de una línea de trabajo que hace poco más de 25 años fuera iniciada por Prusiner¹, una vez que pudo disponer de un protocolo efectivo para la obtención de fracciones parcialmente purificadas de tejidos cerebrales de hamsters inoculados con scrapie.

María I. Berría

Departamento de Microbiología,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

1. Berría MI. Acerca de los llamados priones. *Medicina (Buenos Aires)* 1990; 50: 563-5.
2. Berría MI. Encefalopatía espongiforme bovina vs enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 503-6.
3. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136-44.
4. Vogel G. Prusiner recognized for once-heretical prion theory. *Science* 1997; 278: 214.
5. Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 1982; 21: 6942-50.
6. McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prions. *Cell* 1983; 35: 57-62.
7. Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bedheim, PE, Groth DF, et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983; 35: 349-58.
8. Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 2310-4.
9. Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics

- of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 1990; 10: 743-52.
10. Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB. Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 851-63.
 11. Prusiner SB. Biology and genetics of prion diseases. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 655-86.
 12. Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan K-M, Groth D, Mirenda C, et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 1990; 63: 673-86.
 13. Cohen FE, Pan K-M, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. *Science* 1994; 264: 530-1.
 14. Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 1995; 83: 79-90.
 15. Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 1997; 278: 245-251.

Evolution is not a clean designer. Indeed, as François Jacob, the French molecular biologist, has written. "Evolution is a tinkerer". It builds, mainly in a series of smallish steps, and on what was there before. It is opportunistic. If a new device works, in however odd a manner, evolution will try to promote it. This means that changes and improvements that can be added to the existing structures with relative ease are more likely to be selected, so the final design may not be a clean one but rather a messy accumulation of interacting gadgets. Surprisingly, such a system often works better than a more straightforward mechanism that is designed to do the job in a more direct manner.

La evolución no es un diseñador prolijo. En verdad, como dijo François Jacob, el biólogo molecular francés, "La evolución es una remendona". Construye principalmente en una serie de pequeñísimos pasos, y lo hace sobre lo que ya estaba ahí, antes. Es oportunista. Si algo nuevo anda, aunque sea de manera extraña, la evolución lo promoverá. Esto significa que cambios y mejoras se pueden agregar a las estructuras ya existentes con relativa facilidad, y así, el diseño final puede ser desprolijo, una acumulación de aparatos que interactúan unos con otros. Sorprendentemente, tales sistemas a menudo trabajan mejor que mecanismos diseñados para efectuar el mismo trabajo de manera más directa.

Francis Crick

The astonishing hypothesis, New York: Touchstone, 1994

Citomegalovirus: subversión celular con repercusión sobre la membrana plasmática

La citomegalia es el aspecto más sobresaliente de la infección por citomegalovirus humano (CMVH), y es un modelo conveniente para estudiar los efectos patológicos de infecciones virales sobre la membrana plasmática, ya que el aumento de tamaño experimentado por las células infectadas, implica que deben incorporar nueva membrana.

La membrana plasmática es una barrera importante que los virus deben franquear para llegar hasta la maquinaria celular, alojada en el citoplasma, y eventualmente lograr replicarse. El aumento de la permeabilidad de la membrana es producido en muchos casos por proteínas especificadas por el genoma viral (vioporinas), con actividades que recuerdan a las de los ionóforos, o las de toxinas que afectan estructuras de la membrana¹. Esto es particularmente cierto en el caso de los virus desnudos, que liberan su progenie por lisis de la membrana de la célula infectada. Los virus envueltos, como CMVH, que adquieren su envoltura al madurar por brotación a través de membranas celulares, necesitan la integridad de las mismas para completar la formación de la progenie infectante. Sin embargo, la estructura y función de la membrana son profundamente alteradas por la infección. Una idea de la magnitud y variedad de los cambios que tienen lugar entre el momento en que CMVH se une a su receptor para penetrar en la célula, y aquel en que se detectan viriones de su progenie en el medio extracelular, se refleja en la siguiente secuencia:

a) Durante la primera hora a partir del contacto con CMVH y mucho antes que comience la síntesis de proteínas especificadas por el virus, se produce la desfosforilación de algunas proteínas celulares por acción de fosfatasas de origen celular y viral, asociadas con el virión, ya que si antes de infectar se incubaba la suspensión de CMVH con ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasas tipo I y 2A, dicha desfosforilación de proteínas no ocurre². Se registra también hidrólisis de fosfatidil inositol difosfato, que provoca incrementos transitorios de la concentración citoplasmática de inositol 3-fosfato y diacil glicerol, y cambios en la homeostasis de calcio. La concentración citoplasmática de calcio libre (iónico) aumenta en forma transitoria durante esta primera hora, por liberación de calcio desde depósitos intracelulares³, y por entrada de calcio desde el medio extracelular. La entrada de calcio, al menos en parte, está mediada por canales de calcio, ya que el verapamilo inhibe esa respuesta⁴.

b) Entre las 3 y las 8 horas se producen despolimerización de microtúbulos, alteraciones mitocondriales, y condensación de los nucleolos. También comienzan a aparecer las inclusiones citoplasmáticas y las inclusiones nucleares tempranas.

c) Ya de 5 a 12 horas las células sufren cambios morfológicos por modificaciones del citoesqueleto⁴. La célula infectada pierde su arquitectura normal y se redondea, marcando el comienzo de la denominada "respuesta contráctil". Estos cambios están relacionados con incremento de la captación de calcio, y el consiguiente aumento de la concentración total de calcio intracelular⁵. La captación de calcio aumenta transitoriamente entre las 9 y las 12 horas luego de la infección con CMVH, mientras que el contenido total de calcio celular comienza a aumentar después de las 24 horas de la infección⁶. Se produce un aumento de la concentración citoplasmática de AMP cíclico (cAMP). En este tiempo, todavía un 90% del total de la síntesis de proteínas celulares es especificado por el genoma celular, aunque alrededor de las 10 horas aparece el ARN temprano viral y comienza la síntesis de proteínas virales tempranas.

d) A las 12 o 14 horas aparecen las primeras proteínas virales; entre ellas, un péptido que tiene un peso molecular aproximado de 68 K_{Da}, con actividad de proteinquinasa. Se produce aumento de la concentración citoplasmática de GMP cíclico (cGMP).

e) Hacia las 20 horas comienza la maduración de las inclusiones nucleares tempranas, aparecen la polimerasa de ADN viral y el ADN viral. Paralelamente se produce incremento de ARN celular (nuclear y ribosomal). En la membrana plasmática desaparece por completo la actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje, que era demostrable en un 30% de células no infectadas;

paralelamente, aumenta la actividad de los canales de potasio del tipo *delayed rectifier*, en células no infectadas, es posible detectar estos canales en un 8% de las células estudiadas, mientras que la infección hace que el porcentaje de células en las que se puede detectar este canal aumente hasta el 20%⁷.

f) Llega el final de la etapa de contracción celular; alrededor de las 24 horas comienza una fase denominada de "relajamiento". El tamaño aparente de la célula es similar al de células no infectadas pero la forma original no se recupera. Comienza el agrandamiento celular. El volumen celular (medido como el aumento del espacio intracelular de urea marcada con ^{14}C), es significativamente más grande que el de fibroblastos no infectados⁸. La captación de Rb^+ insensible a ouabaína, que indica la entrada de potasio por mecanismos de transporte diferentes a la bomba de sodio, disminuye significativamente en las células infectadas⁴. El agregado de trifosfato de adenosina (ATP) o de arginina-vasopresina (AVP) en el medio extracelular produce aumento de la concentración de calcio libre en el citoplasma, por liberación de calcio desde depósitos intracelulares. Durante este período, CMVH modifica la respuesta a estos agonistas; mientras las células no infectadas responden en un 80 o 90% a AVP y sólo en un 15% a ATP extracelular, las células infectadas responden en un 80-90% a ATP extracelular, y solamente un 10% a AVP con aumento de calcio libre en el citoplasma⁹. Aproximadamente un 50 o un 60% de la síntesis total de proteínas efectuada por la célula, es especificada por el genoma viral⁶.

g) Hacia las 48 horas se puede demostrar agrandamiento celular manifiesto. Aparecen las primeras nucleocápsides y las inclusiones nucleares tardías; se detectan viriones intracelulares, marcando así el fin del eclipse viral. A nivel de la membrana plasmática se produce un aumento significativo del número de copias de la bomba de sodio presentes en la membrana plasmática⁸, y se puede detectar actividad del canal de potasio de tipo *delayed rectifier* en el 100% de las células⁷.

h) Finalmente, a las 72 o 76 horas se produce un segundo pico de concentración de cAMP. El volumen celular aumenta alrededor de 4 veces⁸, mientras que el número de copias de la bomba de sodio en la membrana llega a ser 3 veces mayor que en células no infectadas. El aumento del número de bombas de sodio se debe posiblemente a la mayor concentración de sodio en el citoplasma⁶, y es causado por partículas infectantes, ya que si el inóculo viral es inactivado por exposición a la luz ultravioleta, el aumento del número de bombas de sodio no se produce. Paralelamente, disminuye el número de copias funcionales del triple cotransportador de Na, K y Cl^{10} .

Por otra parte, los mecanismos de regulación del pH intracelular de los fibroblastos humanos son alterados por la infección con CMVH. Existe reducción manifiesta de la capacidad buffer del citoplasma, posiblemente debida a alteraciones de la composición de las proteínas celulares. También hay cambio en la modalidad de la respuesta del intercambiador Na^+/H^+ a estímulos hiperosmóticos, con reducción de la afinidad aparente por sodio y aumento de la velocidad máxima de transporte. Al elevar la osmolaridad de las soluciones externas, en las células infectadas se manifiesta una respuesta de alcalinización del citoplasma que es bloqueada por análogos de amilorida, lo que sugiere que es mediada por el intercambiador Na^+/H^+ . Se observa además disminución de la afinidad aparente por sodio exterior del intercambiador Na^+/H^+ en células infectadas, que puede reflejar un cambio genuino de la afinidad por uno de los iones transportados inducido por CMVH, o alternativamente, ser el resultado de cambios en otras propiedades cinéticas, como cambio en el gradiente de concentración de sodio en células infectadas. Otro transportador inhibido en forma dramática por la infección, es un sistema de carga de equivalentes de ácido acoplado con salida de sodio, insensible a los inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ (amilorida y sus análogos), que se puede poner en evidencia con fibroblastos humanos en cultivo, al incubarlos en soluciones libres de sodio^{11, 14}.

i) Aparecen los viriones extracelulares.

Cabe concluir, entonces, que las investigaciones llevadas a cabo en recientes años sobre la infección por CMVH revelan un panorama en el que múltiples mecanismos son activados para provocar una respuesta, similar en algunos aspectos a la actividad celular observada por acción de factores de crecimiento. El virus se vale de mecanismos y sistemas enzimáticos celulares no sólo para sintetizar sus propias proteínas, sino que también los usa para causar una verdadera subversión, una de cuyas consecuencias es el cambio de las propiedades de los mecanismos de transporte localizados en la membrana plasmática. Los mismos, ya sean de transporte activo, transportadores (*carriers*) o canales, constituyen la puerta de entrada y salida de iones y nutrientes, y son los encargados de regular sus concentraciones en el citoplasma y organelas. El desarrollo de citomegalia

constituye así una respuesta de adaptación; el virus cambia el medio intracelular volviéndolo apto para replicarse eficientemente. En apoyo de esta hipótesis se puede mencionar que no se detecta progenie viral hasta que comienza el agrandamiento celular, a pesar que la síntesis de ADN viral se inicia mucho antes⁶. El esclarecimiento de las respuestas celulares a la infección por CMV también podría ser de importancia en casos en los que el virus no induce por completo a la cascada de cambios morfológicos y fisiológicos descritos en el curso de la infección productiva, sino que por el contrario, ocurre restricción de la replicación con formación de infección abortiva, infección persistente y/o eventualmente, neoplasia.

Aníbal A. Altamirano

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires

1. Carrasco L. Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv Virus Res* 1995; 45: 61-112.
2. Michelson S, Turowski P, Picard L, Goris J, Landini MP, Topilko A, et al. Human cytomegalovirus carries serine/threonine protein phosphatases PP1 and a host-cell derived PP2A. *J Virol* 1996; 70: 1415-23.
3. Keay S, Baldwin BR, Smith MW, Wasserman SS, Goldman WF. Increases in $[Ca^{2+}]_i$ mediated by the 92.5 kDa putative cell membrane receptor for HCMV gp86. *Am J Physiol* 1995; 269: C111-C21.
4. Nokta M, Fons MP, Eaton DC, Albrecht T. Cytomegalovirus: sodium entry and development in cytomegaly in human fibroblasts. *Virology* 1988; 164: 411-19.
5. Nokta M, Eaton DC, Steinsland OS, Albrecht T. Ca^{2+} responses in cytomegalovirus-infected fibroblasts of human origin. *Virology* 1987; 157: 259-67.
6. Albrecht T, Boldogh I, Fons MP, Lee CH, AbuBakar S, Russell JM, et al. Cell activation responses to cytomegalovirus infection. Relationship to the phasing of HCMV replication and to the induction of cellular damage. *Subcell Biochem* 1989; 15: 157-202.
7. Bakhramov A, Boriskina YS, Booth JC, Bolton TB. Activation and deactivation of membrane currents in human fibroblasts following infection with human cytomegalovirus. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1265 (2-3): 143-51.
8. Altamirano AA, Fons MP, Russell JM, Cragoe Jr EJ, Albrecht T. Human cytomegalovirus infection increases the number of ouabain-binding sites in human fibroblasts. *Virology* 1994; 199: 151-9.
9. Himpens B, Proot P, Neyts J, De Smedt H, De Clercq E, Casteels R. Human cytomegalovirus modulates the Ca^{2+} response to vasopressin and ATP in fibroblast cultures. *Cell Ca* 1995; 18: 111-9.
10. Crowe WE, Altamirano AA, Russell JM. Does $[Cl^-]_i$ modulate the volume-sensitive response of the Na^+/H^+ exchanger? *J Gen Physiol* 1994; 104: 52a.
11. Crowe WE, Altamirano AA, Russell JC, Russell JM. pH regulation in human cytomegalovirus (HCMV)-infected fibroblasts: evidence for Cl^-/HCO_3^- -exchange. *FASEB J* 1994; 8: A23.
12. Crowe WE, Altamirano AA, Russell JC, Russell JM. Does human cytomegalovirus (HCMV) infection of MRC-5 fibroblasts result in reduced Na^+/H^+ exchanger activity? *Biophys J* 1995; 68: A309.
13. Altamirano AA, Crowe WE, Russell JM. Shrinkage-induced intracellular alkalinization in fibroblasts caused by human cytomegalovirus infection. *Biophys J* 1994; 66: A338.
14. Crowe WE, Altamirano AA, Russell JM. Human cytomegalovirus infection enhances osmotic stimulation of Na^+/H^+ exchange in human fibroblasts. *Am J Physiol* 1997; 273: C1739-48.