

**REAL ACADEMIA DE CIENCIAS  
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES**

# **DE GENOMAS Y DEGRADOMAS**

**Crónica de la exploración molecular de los sistemas  
proteolíticos humanos**

**DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN  
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO POR EL  
EXCMO. SR. D. CARLOS LÓPEZ OTÍN**

**Y CONTESTACIÓN DE LA  
EXCMA. SRA. D.<sup>a</sup> MARGARITA SALAS FALGUERAS  
EL DÍA 25 DE OCTUBRE DE 2006**



**MADRID**  
Domicilio de la Academia  
Valverde, 22



ISBN: 84-87125-45-X

Depósito legal: M. 41.855-2006

---

Impreso en Realigraf, S. A. - Pedro Tezano, 26. 28039 Madrid

## ÍNDICE

### DE GENOMAS Y DEGRADOMAS

Introducción .....	7
La vida y sus moléculas .....	10
Crónicas genómicas y degradómicas .....	16
Construyendo degradomas .....	21
Proteasas: en la salud y en la enfermedad .....	32
Proteasas y cáncer .....	35
De ratones y hombres .....	45
Ante mí, el infinito .....	51
Bibliografía .....	57

### CONTESTACIÓN

Excma. Sra. D. <sup>a</sup> Margarita Salas Falgueras .....	73
---	----

*Excelentísimo Señor Presidente,  
Excelentísimos Señores Académicos,  
Queridos compañeros y amigos,  
Señoras y Señores*

Antes de comenzar mi intervención, quisiera expresar mi más profunda gratitud a los miembros de esta Real Academia, por la inmensa amabilidad que han tenido al acogerme entre ellos. Mi especial agradecimiento a la Profesora Margarita Salas, por proponer mi candidatura y aceptar pronunciar el Discurso de contestación, pero también por su magisterio y su continuo ejemplo de compromiso máximo con la investigación científica. Gracias también a los Profesores Pedro García Barreno, Jesús Avila y Luis Franco por su apoyo en esta importante etapa de mi vida científica, y por todo lo que he podido aprender de ellos a lo largo de muchos años y en ámbitos muy distintos.

Quisiera también tener un recuerdo entrañable para los que ya no están con nosotros pero permanecen absolutamente presentes: el Profesor Ángel Martín Municio, en cuyas clases aprendí los primeros fundamentos de la Bioquímica hace ya casi 30 años, y el Profesor Eladio Viñuela, nuestro querido Eladio, mi maestro en la Biología Molecular y con quien toda una generación de científicos españoles siempre mantendremos una deuda de gratitud infinita. En esta Academia vengo a ocupar una medalla nueva, lo cual me impide elaborar la obligatoria semblanza que los nuevos Académicos dedican a sus predecesores. Sin embargo, no puedo olvidar que el profesor Municio, Don Ángel para los

que fuimos sus alumnos, presidió durante casi dos décadas esta ilustre Institución que hoy me acoge. Inexorablemente, el paso del tiempo difumina nuestros recuerdos pero, a cambio, nos regala una memoria selectiva que nos permite revivir con intensidad ciertos acontecimientos esenciales que influyeron decisivamente en nuestra peripecia vital. En mi geografía de recuerdos, permanece todavía muy nítida la primera vez que supe del Profesor Municio; Don Ángel impartió la primera clase que recibí en la Universidad Complutense a la que me había trasladado desde la Universidad de Zaragoza para tratar de introducirme en los secretos de la Bioquímica. Aquella clase fue un fiel reflejo de su personalidad y de su aproximación a la Ciencia: conocimiento abrumador de la disciplina que explicaba, absoluto rigor científico en el tratamiento de todos sus aspectos y exigencia máxima con los alumnos. Después, tuve la fortuna de conocerle desde una perspectiva más cercana, y comprendí que su profundo conocimiento bioquímico derivaba de su intensa dedicación a esta disciplina; su rigor científico era el mecanismo que utilizaba para atraer a los mejores alumnos a su Departamento y, finalmente, su exigencia académica era sólo un reflejo de la exigencia que se imponía a sí mismo en todas las facetas de su vida. Su brillante paso por esta Real Academia será inolvidable para todos nosotros.

La tradición también aconseja que un Discurso de ingreso en esta docta Institución incluya unos apuntes autobiográficos. Intentaré ser muy breve en el cumplimiento de esta tradición, en parte por pudor y sobre todo para que este acto tan grato para mí, no pierda su contenido científico esencial. En esa geografía de recuerdos que antes mencioné, también permanece todavía muy nítida la figura de mi abuelo, practicante de un pueblo del Pirineo Aragonés, que me ayudó a venir al mundo en ese mismo lugar, un día de invierno de hace ya unas cuantas décadas. Él me enseñó el significado de los conceptos de Medicina y enfermedad, me mostró los primeros libros científicos y me transmitió el afán de contribuir a que el mundo fuera un poco mejor, incluso para los que no lo pretenden. Después, guiado por la idea de intentar conocer la esencia molecular de la vida,

y estimulado por el ejemplo de curiosidad intelectual y tenacidad que me legaron mis padres, me inicié en el estudio de la Bioquímica.

He pasado más de 25 años inmerso en el aprendizaje y práctica de una Ciencia que en su corta existencia ha desarrollado nuevas técnicas y nuevos conceptos que han cambiado nuestra manera de entender la vida, sus funciones y sus transformaciones. En el camino encontré a grandes maestros como Margarita Salas, Eladio Viñuela, Ángel M. Municio, José Gavilanes, Enrique Méndez, Rosalía Rodríguez, Horacio Marco, Anders Grubb y Stephen Krane quienes me animaron a perseguir el conocimiento científico con toda la profundidad que mi imaginación permitiera. Después, volví al Norte, a Asturias para unirme a Gloria e instalarme en la que iba a ser mi Universidad desde entonces.

En estos años he tenido la inmensa fortuna de alcanzar muchos de mis sueños. Pude dirigir mi investigación hacia un problema que siempre me había preocupado pero al que nunca me había enfrentado directamente: el cáncer. Con desigual suerte, pero con todas mis fuerzas, he tratado de que nuestro trabajo pudiera aportar alguna idea, por sencilla que ésta fuera, para ayudar a combatir esta enfermedad. Posteriormente, el estudio de las proteasas tumorales también nos ha permitido participar en proyectos muy gratificantes para nuestro grupo, como el de la secuenciación y anotación de distintos genomas. Desde estos trabajos, hemos podido acercarnos a explorar molecularmente otros campos tan fascinantes como el del envejecimiento o el de la evolución humana.

Durante todo este tiempo, he intentado compaginar mi labor investigadora con una labor docente que siempre me ha resultado apasionante. En las aulas he procurado que los estudiantes comprendan la trascendencia de la Bioquímica y la Biología Molecular en múltiples aspectos de nuestra vida. Después, en el laboratorio he tratado de demostrarles que la ilusión por el futuro, la emoción del conocimiento, en ningún sitio se perciben con tanta intensidad como en la investigación científica.

Asimismo, he tratado de conversar con la Naturaleza no sólo a través de la Ciencia, sino también mediante la contemplación del maravilloso paisaje asturiano. He encontrado personas que me han enseñado tanto acerca de la vida como lo que he podido aprender en los libros o en los viajes aquí y allá. A todos mi gratitud. Gracias a las Instituciones y empresas, que nos han ayudado en nuestra labor científica, y especialmente a la Obra Social Cajastur, por hacer realidad otro de mis deseos, tal vez el más difícil de cumplir: facilitar un puesto de trabajo digno, en el Hospital o en la Universidad, a un grupo de jóvenes investigadores asturianos.

Finalmente, gracias a mis compañeros del laboratorio, del Instituto de Oncología y de la Universidad de Oviedo, a los que están ahora, a los que estuvieron antes y a los que probablemente estarán más tarde; gracias a los alumnos que cada otoño nos rejuvenecen y estimulan; gracias a Gloria, Daniel y Laura, y a toda mi familia y amigos, y gracias en suma, a todos los que me han ayudado en ese afán de contribuir a la Ciencia a través del estudio apasionado e intenso de las estructuras y funciones de unas pocas macromoléculas biológicas.

## LA VIDA Y SUS MOLÉCULAS

La fascinante armonía con la que se desarrolla la aventura bioquímica de la vida comenzó a gestarse hace más de tres mil millones de años, cuando en algún lugar del planeta que hoy nos acoge, unos sistemas autorreplicativos de ribonucleótidos capaces de dirigir la síntesis de proteínas, quedaron protegidos por una primitiva estructura lipídica e iniciaron el proceso de formación de la primera célula. En medio de un profundo caos molecular, por azar o por necesidad, surgió una esperanza de vida. Todos los organismos que viven actualmente sobre la Tierra derivan de esa célula precursora que, tras experimentar con éxito procesos de replicación, división y evolución, llegó a cubrir de vegetación nuestro planeta, cambiando la composición de su at-

mósfera y convirtiéndolo finalmente en un lugar de vida inteligente.

*«Y para que ninguna región careciera de sus formas propias de vida animada, las estrellas y las formas divinas ocuparon el suelo del cielo, el mar correspondió a los peces relucientes, la tierra recibió a los animales y el aire móvil a los pájaros. Luego nació el hombre y Él le dio un rostro levantado y le ordenó que se mantuviera erguido y que elevara sus ojos al cielo». **Metamorfosis, Ovidio.***

Tras esa primera mirada, el hombre pudo ya empezar a maravillarse del mundo que lo rodeaba y lo acogía; y comenzó a percibir ciertas regularidades en su entorno y en su propia vida. Observó que la noche sucedía al día, contempló el ciclo de las estaciones, conoció la enfermedad y la muerte, y se dio cuenta de que la vida surgía constantemente hasta en los lugares más extraños e inhóspitos. Finalmente, tal vez empezó a preguntarse el porqué de todo aquello. Es entonces cuando podemos situar los orígenes del pensamiento biológico, y fueron aquellos primeros hombres, ansiosos por comprender los misterios de la Naturaleza, los pioneros de una tarea que con el devenir del tiempo sería la meta de un pequeño colectivo humano: los científicos.

Los primeros intentos de explicar el mundo estuvieron dominados por la idea de que los fenómenos naturales estaban determinados por fuerzas ocultas que provenían de espíritus superiores con emociones humanas. Pero fue transcurriendo el tiempo, el gran héroe de la Historia, y aquellos hombres primitivos fueron acumulando conocimientos, conquistaron el fuego, inventaron un lenguaje, pusieron nombre a las cosas que les rodeaban, construyeron herramientas e incluso fueron capaces de representar su propia imagen. El escenario estaba así dispuesto para que más tarde, en diferentes regiones de nuestro planeta, pueblos de rasgos distintos y culturas diversas comenzaran su conversación con la Naturaleza a través de la Ciencia.

De este incipiente diálogo, surgieron notables progresos en el conocimiento de los animales y las plantas, en la

observación de los astros y en el tratamiento de las enfermedades, progresos que se multiplicaron cuando hacia el año 600 A.C., un grupo de hombres que vivían a orillas del mar Egeo, fueron capaces de meditar más profundamente que sus antecesores sobre la naturaleza del Universo, la estructura de la materia que lo compone y las características de los seres que en él habitan. Fue entonces cuando Aristóteles, el más influyente de aquellos pensadores griegos, construyó una teoría basada en la idea de que todos los seres vivos estaban dotados de una fuerza vital misteriosa y divina, concepto que llegó a impulsar el pensamiento del hombre durante más de dos mil años. Así, se abrió un larguísimo paréntesis en el progreso del pensamiento biológico hasta que, durante los últimos años del siglo XV, la humanidad volvió a recuperar la curiosidad.

Desde Italia se difundió la nueva cultura y los hombres comenzaron a avanzar hacia la luz del Renacimiento. Una creciente sed de conocimiento invadió el espíritu de hombres como Leonardo da Vinci que dibujó y pintó, esculpió y construyó, imaginó e inventó, pero también comenzó a experimentar y a proponer leyes que permitieran entender lo que se percibía empíricamente. Tras él, muchos otros se entregaron a la conquista científica del mundo. Primero con cierto afán de aventura, explorando el planeta en busca de tierras desconocidas y especies nuevas. Después, de una forma razonada y metódica, tratando de descifrar las claves de la materia viva y de la materia inerte, aunque para ello tuvieran que abandonar los límites impuestos por sus sentidos y diseñar instrumentos que ampliaran sus posibilidades de percibir la realidad. Así, en 1610, Galileo Galilei con su telescopio abrió una ventana hacia el Universo y descubrió nuevas estrellas en la Via Láctea, los satélites de Júpiter y los anillos de Saturno. Y mientras Galileo contemplaba lo infinitamente grande, Anton van Leeuwenhoek, se aventuraba con su microscopio en los confines de lo infinitamente pequeño accediendo a un mundo pleno de vida que nadie antes había observado.

Junto a estos profetas de la modernidad, comenzaron a emerger a la luz de la Historia muchos otros nombres evo-

cadores: Copérnico, Kepler, Newton, Linneo, Vesalio, Servet, Harvey, o Lavoisier. Todos ellos lucharon contra los dogmas de su tiempo, aplicaron métodos científicos en sus estudios, propusieron nuevas leyes físicas y químicas para explicar el mundo y la vida y, en definitiva, sentaron las bases de la gran revolución científica que tendría lugar en la primera mitad del siglo XIX y que produjo un profundo cambio en la visión que el hombre tenía de si mismo y del Universo.

Así, en 1808 y de la mano de John Dalton, un científico inglés con dificultades para distinguir los colores, la Química redefinió los átomos. Gracias a la teoría atómica, se adquirió un profundo conocimiento de la materia que conforma nuestro planeta y la Química alcanzó la categoría de ciencia principal. Poco más tarde, en 1828, Wohler asestó un duro golpe al vitalismo al sintetizar urea calentando cianato amónico. La Química, esa disciplina que pretendía estudiar la materia y sus transformaciones, acabó por convertirse en un temible rival de la Naturaleza.

Acompañando a la Química en su avance, la Biología — término acuñado por Lamarck en 1802— comenzó a adquirir su verdadera dimensión cuando tras Linneo y Buffon, los naturalistas empezaron a elaborar los conceptos subyacentes a lo que hasta entonces sólo había sido una descripción sistemática de animales y plantas. Un poco más tarde, en 1839, el anatomista alemán Theodor Schwann estableció la teoría celular de la vida al afirmar que la célula era la unidad básica de todos los organismos. Finalmente, y casi al mismo tiempo, Charles Darwin se embarcaba en el «Beagle» camino de un viaje cuyas consecuencias fueron más allá de lo imaginable. A su vuelta, el orgullo humano recibió la segunda gran decepción de su dilatada historia. Al derrocamiento copernicano del geocentrismo siguió ahora una concepción de la Naturaleza en la que el hombre abandonaba el papel central de la creación.

*«Probablemente todos los seres que han vivido sobre esta tierra, han descendido de alguna única forma primordial, a la que se infundió vida por primera vez. Y mientras este planeta*

*ha ido dando vueltas de acuerdo con la ley fija de la gravedad, han evolucionado y siguen evolucionando formas sin fin, las más bellas y las más maravillosas». El origen de las especies, C. Darwin.*

Desde este momento, sólo fueron necesarios unos pocos acontecimientos adicionales como el descubrimiento por Gregor Mendel de las leyes genéticas y el posterior establecimiento de sus bases bioquímicas, para que el secreto molecular de la vida se mostrara al mundo en toda su magnitud. Sucedió, hace poco más de 50 años, en la primavera de 1953, cuando James Watson y Francis Crick propusieron la estructura en doble hélice del ADN, indicando además que *«no nos ha pasado por alto que el apareamiento específico que hemos postulado sugiere, de inmediato, un mecanismo posible de copia para el material genético»* [1]. Desde aquella primavera, pareció más razonable que nunca afirmar que el hombre es el resultado de ese proceso que comenzó hace más de tres mil millones de años cuando, en algún lugar de la Tierra, unos sistemas autorreplicativos de ribonucleótidos fueron capaces de dirigir la síntesis de proteínas.

En los últimos años, el avance de las Ciencias de la Vida ha sido vertiginoso y ha servido para profundizar extraordinariamente en nuestro grado de conocimiento acerca de los constituyentes y funciones fundamentales de los organismos vivos. En efecto, poco tiempo después del descubrimiento de la estructura en doble hélice del ADN, Ochoa, Nirenberg y Khorana descifraron el código genético, ese lenguaje universal que a todos nos une. Después, y al amparo de nuevas tecnologías de análisis biológico, el ADN se pudo aislar, fragmentar y multiplicar de manera ilimitada. Inmediatamente, se abrió la posibilidad de mezclar los ADNs de distintos organismos y comenzaron a producirse proteínas recombinantes de la clase y constitución deseadas, muchas de las cuales se utilizan hoy para tratar enfermedades como la diabetes, la artritis o diversos tipos de cáncer. Finalmente, y superadas múltiples dificultades técnicas, económicas y políticas, la Biología Molecular, a través del Proyecto Genoma Humano, dio un paso decisivo

hacia la búsqueda de las últimas claves de nuestra esencia molecular, aquella que nos hace únicos y distintos a cualquier otro ser vivo del planeta (Fig. 1).

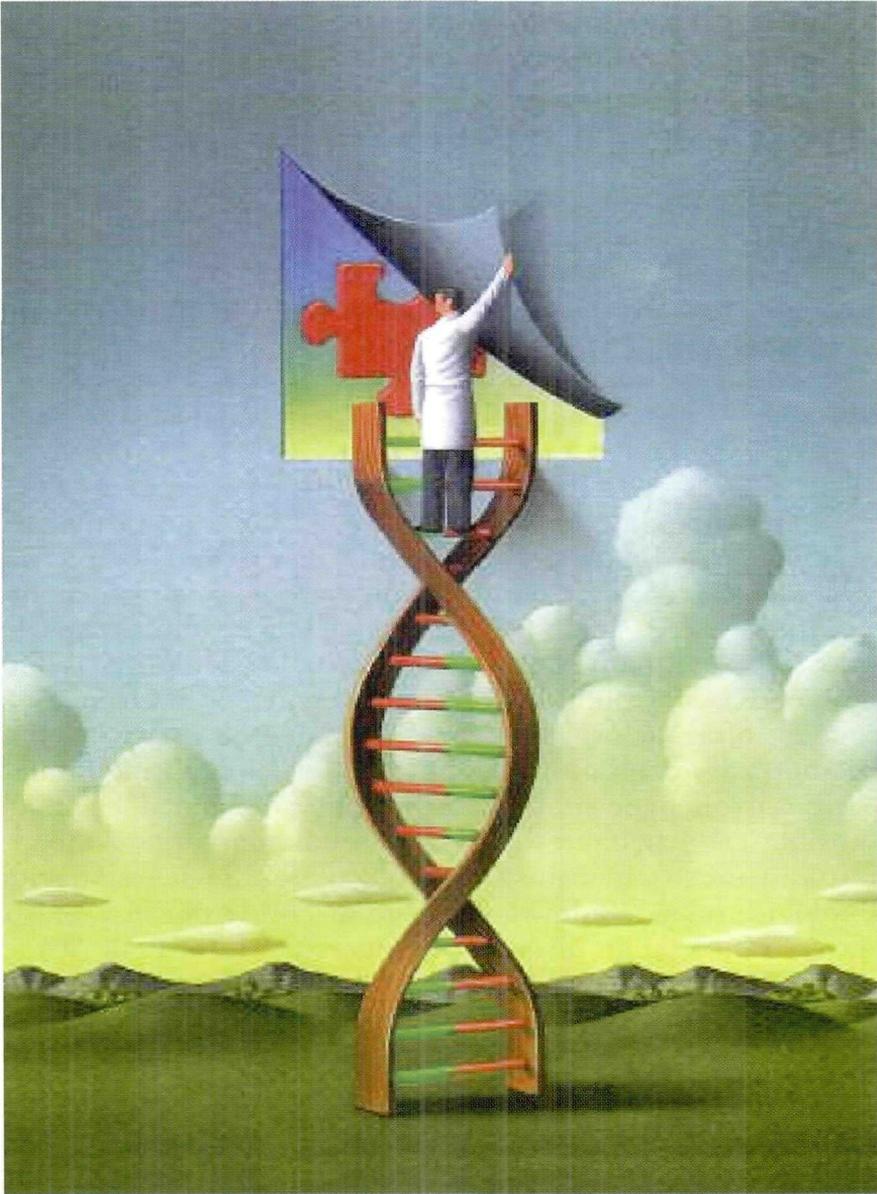


FIGURA 1. **Estructura en doble hélice del ADN.** Apoyados en esta estructura helicoidal, los biólogos moleculares han abierto una nueva ventana a la exploración biológica (*imagen modificada de RPC, Clontech, USA*).

## CRÓNICAS GENÓMICAS Y DEGRADÓMICAS

El inmenso caudal de conocimientos sobre las moléculas de la vida acumulado en las últimas décadas, cristalizó en el año 2001 con la publicación del primer borrador de la secuencia del genoma humano [2, 3]. En efecto, hoy conocemos el orden preciso de los 3.000 millones de nucleótidos que configuran nuestro material genético y la manera en la que dichos nucleótidos se organizan para construir los aproximadamente 25.000 genes que nos permiten ser lo que somos como especie y como individuos. Estudios paralelos han permitido secuenciar los genomas de otros organismos modelo entre los que merecen especial mención *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Pan troglodytes*, el chimpancé, nuestro pariente más próximo en la escala evolutiva.

Sin embargo, esta nueva Biología que trata de aproximarse al estudio de la esencia molecular de la vida a través del análisis de las estructuras, funciones y transformaciones de unos pocos tipos de macromoléculas, también nos ha mostrado alguna de las fronteras actuales de nuestro conocimiento. Así, resulta imprescindible conocer la forma en la que la información genética se regula en el espacio y en el tiempo para conseguir que miles de reacciones bioquímicas se desarrollen de manera ordenada y armónica haciendo posible cada instante de vida en cualquier organismo. El estudio de los mecanismos moleculares de la regulación biológica ha sido admirablemente discutido por el Profesor Luis Franco en su discurso de ingreso en esta Real Academia [4]. Existen múltiples puntos de regulación de los procesos biológicos, aunque desde el principio su estudio tomó dos direcciones fundamentales: la regulación metabólica y la regulación de la expresión génica, caminos que se han entrelazado hasta confluir en numerosos aspectos. El conocimiento acumulado en ambos frentes de estudio ha demostrado la diversidad y complejidad de los mecanismos que controlan la expresión de la enorme cantidad de información genética que portan todos los seres vivos. Sin embargo,

más allá de esta complejidad que a veces parece inabordable, los estudios iniciados por Jacob y Monod, y corroborados por múltiples autores en años posteriores, apuntaron a la existencia de un nivel de decisión esencial: la regulación de la transcripción [5]. El intrincado problema de la regulación biológica quedaba así planteado en términos mucho más accesibles: transcribirse o no transcribirse, ésta es la cuestión principal que deben afrontar los genes de un organismo en cada instante y en cada lugar.

Sin embargo, a medida que hemos ido progresando en la búsqueda de respuestas a esta pregunta, ha quedado patente que este mecanismo de control transcripcional no es suficiente para resolver el problema de la regulación de la expresión de la información génica. Por una parte, no basta con controlar la producción de proteínas a través de la expresión de sus genes, dado que también hay que inactivarlas o destruirlas cuando su actividad ya no es necesaria. Además, muchas proteínas se sintetizan como moléculas precursoras inactivas que deben activarse en el lugar y momento adecuados. Por ello, todos los organismos han desarrollado numerosas estrategias para tratar de regular la actividad de sus proteínas, una vez que dichas proteínas son sintetizadas. Entre todas estas estrategias, en los últimos años ha emergido el estudio de una forma de regulación que influye decisivamente en la vida y muerte de todas las células: la regulación por proteólisis [6].

Dada la extraordinaria estabilidad del enlace peptídico, la proteólisis es un fenómeno que no ocurre espontáneamente en condiciones fisiológicas, sino que debe catalizarse por un grupo de enzimas llamadas proteasas. El interés hacia este conjunto de proteínas es antiguo ya que se remonta al siglo XIX cuando, en 1836, Schwann describió la pepsina y Corvisart, en 1856, aisló la tripsina del fluido intestinal de diversos animales de experimentación. Inicialmente, las proteasas se asociaron exclusivamente a reacciones inespecíficas del catabolismo proteico y su estudio quedó circunscrito a este ámbito durante varias décadas. Sin embargo, el transcurso del tiempo y la experimentación

biológica han determinado que nuestra visión del universo proteolítico se haya expandido hasta alcanzar límites que resultarían insospechados para sus primeros exploradores. La prueba más concluyente de esta afirmación tal vez sea la reciente concesión del Premio Nobel de Química a Ciechanover, Hershko y Rose por sus contribuciones a la definición de estrategias fundamentales de regulación por proteólisis [7]. En efecto, gracias a sus trabajos y a los de otros muchos investigadores que recorrieron caminos paralelos, hoy sabemos que las proteasas, a través de cortes selectivos en sus correspondientes sustratos, ejecutan reacciones irreversibles que influyen decisivamente en múltiples procesos biológicos. Así, las denominadas reacciones de procesamiento proteolítico son esenciales en la progresión del ciclo celular, en la migración celular, en el remodelado tisular, en la angiogénesis o en la apoptosis. Además, y como consecuencia directa de estas acciones específicas, la actividad enzimática desempeñada por las proteasas resulta determinante durante el desarrollo embrionario, la fertilización, la formación de los huesos, la coagulación sanguínea, el funcionamiento del sistema inmunológico o el establecimiento de rutas neuronales.

Considerando esta multiplicidad de funciones, no resulta extraño que diversos cambios en la estructura o expresión de los enzimas proteolíticos se encuentren asociados al desarrollo de numerosos procesos patológicos incluyendo el cáncer, la artritis, la osteoporosis, las alteraciones cardiovasculares o las enfermedades neurodegenerativas. Además, debemos resaltar que muchos microorganismos, incluyendo el virus del SIDA, utilizan proteasas como factores de virulencia, por lo que de una u otra forma, estos enzimas se han convertido en dianas de intervención terapéutica y por tanto de interés preferente para el desarrollo de nuevos fármacos [8].

Numerosos estudios apuntan a que la impresionante diversidad en las funciones normales y patológicas desarrolladas por las proteasas, deriva del diseño evolutivo de multitud de enzimas con estructuras sorprendentemente

distintas. Así, sólo mirando al interior de nuestras propias células, podemos encontrar desde simples dispositivos catalíticos como el de las matrilisinas que poseen la mínima organización precisa para hidrolizar sus sustratos [9], hasta proteasas gigantes como la tripeptidilpeptidasa II [10], pasando por auténticas máquinas proteolíticas como el proteasoma, portador de elegantes y eficaces estructuras multicatalíticas [11]. En términos de especificidad, la diversidad es también la norma, de manera que algunas proteasas muestran una fidelidad ejemplar con una especificidad exquisita hacia un único sustrato, mientras otras son mucho más promiscuas y manifiestan una actividad amplia y variada frente a numerosos sustratos. En buena medida, esta especificidad se consigue por la combinación de las propiedades conferidas por los dominios catalíticos con la otorgada por los dominios auxiliares, extraordinariamente diversos en tipos y formas (Fig. 2). Finalmente, las proteasas utilizan

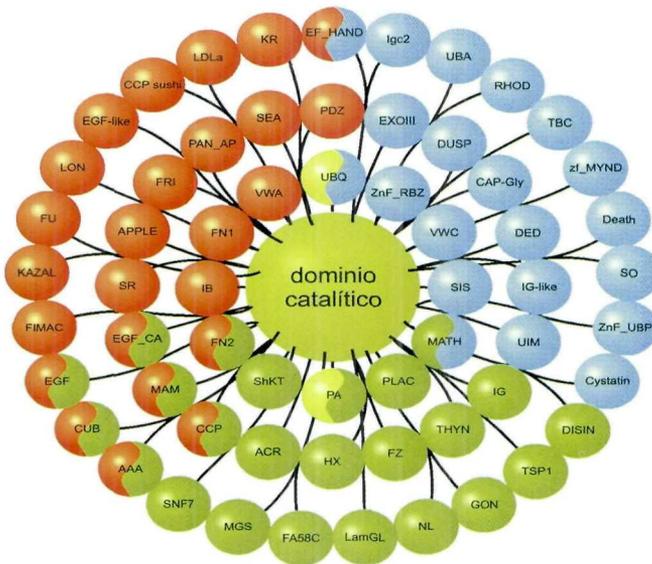


FIGURA 2. **Los dominios auxiliares de las proteasas.** Los dominios catalíticos de las proteasas se unen a una gran diversidad de dominios auxiliares, que facilitan la interacción con sus sustratos, receptores, adaptadores e inhibidores. Los códigos de los dominios auxiliares son los utilizados en la base de datos *Pfam*, y sus colores reflejan la clase catalítica de las proteasas a las que se unen: aspartil-proteasas (amarillo), cisteín-proteasas (azul), metalproteasas (verde) y serín-proteasas (rojo).

diferentes estrategias para definir su localización espacial en el interior o en el exterior de las células, y en muchas ocasiones se organizan en redes complejas que comprenden distintas proteasas, sustratos, inhibidores y receptores específicos.

En resumen, el patrón que emerge de estos estudios sobre los sistemas proteolíticos de distintos organismos, refleja un panorama de diversidad y complejidad. Dada la relevancia funcional y patológica de numerosas proteasas, en los últimos años ha habido un interés creciente hacia la identificación y caracterización estructural y funcional de todos los componentes de los sistemas proteolíticos que operan en los distintos seres vivos, desde las bacterias hasta el hombre. Recientemente, y tras más de una década de estudios sobre las proteasas asociadas a los tumores humanos, en nuestro laboratorio comenzamos a plantearnos la necesidad de abordar de manera global el análisis de la complejidad de los sistemas proteolíticos.

Como primera aproximación hacia este fin, y en colaboración con el Dr. Chris Overall de la Universidad de British Columbia en Canadá, introdujimos el concepto de degradoma, para definir el conjunto de proteasas producidas por una célula, un tejido o un organismo [12]. Posteriormente, ampliamos este concepto con la introducción de una segunda acepción del mismo término y definimos el degradoma de una proteasa como el conjunto de sustratos hidrolizados por dicho enzima. Finalmente, y en una nueva adaptación a las proteasas del lenguaje «ómico» que ahora domina muchos aspectos de la Biología, definimos la Degradómica como el conjunto de aproximaciones genómicas y proteómicas dirigidas al estudio de las estructuras y funciones de las proteasas, de los sustratos hidrolizados por ellas y de los inhibidores con capacidad de bloquear su actividad enzimática [12] (Fig. 3).

Definidos los conceptos, el siguiente objetivo pasaba necesariamente por intentar ordenar, clasificar y anotar todos los genes de proteasas. En este sentido, y apoyados en la

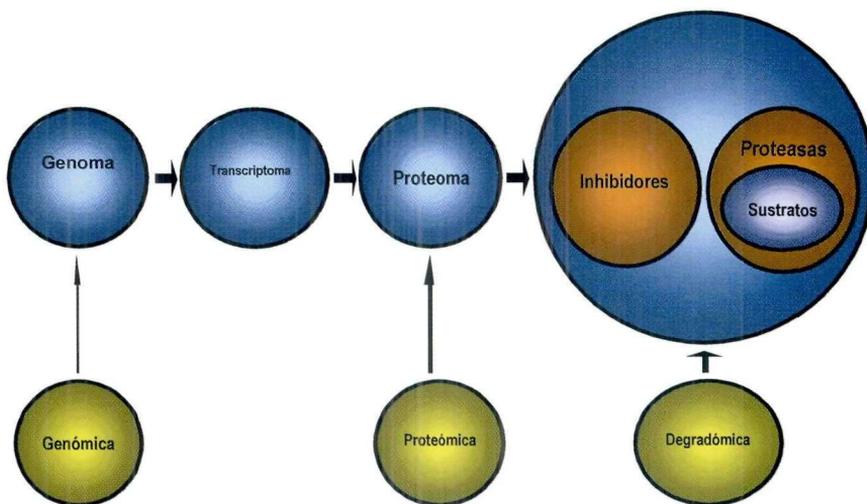


FIGURA 3. **Degradómica y degradomas.** La figura muestra las conexiones entre los análisis globales de genes (genómica), proteínas (proteómica) y proteasas (degradómica)

disponibilidad de la secuencia del genoma humano y de otros organismos como el ratón, la rata y el chimpancé, en los últimos años hemos dedicado un notable esfuerzo a la definición precisa de sus correspondientes degradomas y al posterior análisis comparativo de los mismos. A través de estas aproximaciones globales genómicas y degradómicas, hemos tratado de obtener información acerca de diferencias funcionales entre especies próximas, pero al mismo tiempo hemos pretendido extraer lecciones que nos ayuden a entender algunos aspectos de la enfermedad humana y especialmente el cáncer.

## CONSTRUYENDO DEGRADOMAS

La exploración exhaustiva de los bancos de secuencias genómicas disponibles públicamente, el análisis bioinformático de las bases de datos especializadas denominadas Merops, Interpro y Ensembl, y la evaluación de los resultados derivados de nuestro propio trabajo experimental nos permitió completar en el año 2003 la primera descripción

del degradoma humano [13] (Fig. 4). De acuerdo con estos datos, nuestro genoma posee al menos 561 genes con capacidad de codificar proteasas u homólogos de proteasas. En este número se incluyen algunos genes codificantes de proteínas funcionales, pero cuya capacidad catalítica estaría comprometida por la existencia de cambios de aminoácidos en posiciones críticas de los correspondientes centros cata-



FIGURA 4. El degradoma humano. La figura muestra la localización cromosómica de los 561 genes de proteasas anotados en el genoma humano. Los genes identificados y clonados en nuestro laboratorio aparecen sombreados en amarillo.

líticos. Estos homólogos de proteasas pueden desempeñar importantes funciones reguladoras o inhibitoras, actuando como proteínas dominantes negativas con capacidad de secuestrar sustratos en complejos no productivos, o eliminando inhibidores del medio celular, incrementando así el potencial proteolítico neto de dichas células o tejidos. Además, es digno de reseñar que durante nuestra exploración del genoma humano detectamos más de 200 pseudogenes de proteasas, incluyendo pseudogenes procesados —que han surgido por retro-transposición y mutación de ARNs de proteasas funcionales— y pseudogenes no-procesados derivados de la duplicación y acumulación de mutaciones inactivadoras en genes originalmente funcionales.

El análisis filogenético del degradoma humano demuestra que los citados 561 genes se pueden organizar en 5 clases que se distinguen por su mecanismo de catálisis (Fig. 5).

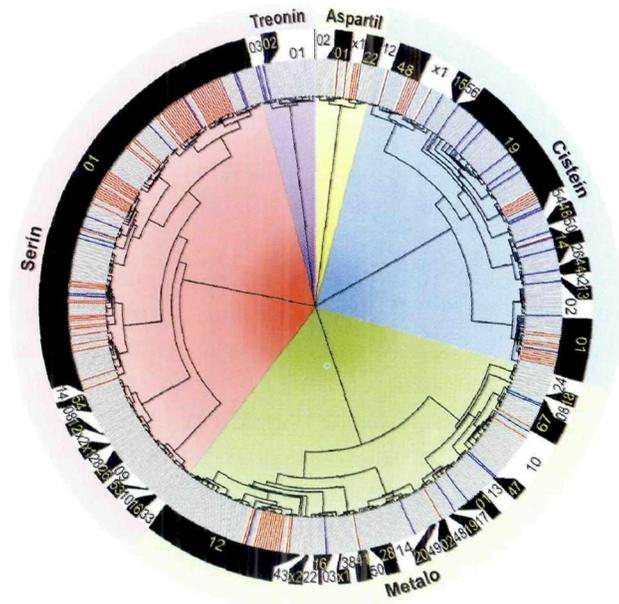


Figura 5. **Comparación de los degradomas humano y de ratón.** La figura muestra las cinco clases de proteasas humanas y de ratón, indicándose en gris las proteasas comunes a ambas especies, en azul las específicas humanas y en rojo las específicas de ratón.

Las serín-, treonín- y cisteín-proteasas contienen residuos específicos de serina, treonina y cisteína que actúan como nucleófilos y atacan directamente al grupo carbonilo del enlace peptídico que se va a hidrolizar. Por su parte, las aspartil-proteasas y las metaloproteasas polarizan una molécula de agua para que sirva de nucleófilo. En el degradoma humano, las metaloproteasas y las serín-proteasas son las clases catalíticas más abundantes con 186 y 178 miembros, seguidas de las cisteín-proteasas con 148 componentes. Por el contrario, las treonín- y las aspartil-proteasas son enzimas más especializados y mucho menos numerosos con sólo 28 y 21 miembros, respectivamente. A su vez, las 561 proteasas de las distintas clases catalíticas pueden subdividirse en 68 familias, de acuerdo con similitudes derivadas de la comparación de sus secuencias de aminoácidos.

La más amplia de las 68 familias de proteasas humanas es la denominada S1, que incluye a las serín-proteasas del tipo de la tripsina y posee más de 115 componentes. Otras familias con muchos representantes son las USPs (*ubiquitin-specific proteases*) y las ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*) con 55 y 40 miembros, respectivamente. En el extremo opuesto, hay algunas familias de proteasas como las de la separasa o la dipeptidilpeptidasa II, que sólo poseen un representante en el degradoma humano.

En cualquier caso, debemos enfatizar que el número de genes anotados dentro del degradoma humano no debe considerarse definitivo, dado que nuevos enzimas con estructuras y mecanismos catalíticos no caracterizados hasta el momento podrían llegar a describirse en el futuro. En efecto, diversos trabajos recientes avalan esta posibilidad y han permitido identificar alguna de estas proteasas atípicas ocultas en nuestro genoma. Entre los ejemplos en este sentido, derivados de la labor experimental de nuestro propio laboratorio, podemos señalar los recientes hallazgos de nuevas familias de proteasas humanas como las autofaginas —cisteín-proteasas implicadas en la muerte celular por autofagia [14, 15]— o las arqueometzinquinas, un grupo de metaloproteasas relacionadas estructural y evolutivamente con enzimas

de arqueobacterias [16]. También es reseñable la reciente identificación de diversas proteasas fúngicas pertenecientes a una nueva clase catalítica, las glutamil-proteasas [17], aunque hasta el momento no hemos encontrado ningún indicio de su presencia en el degradoma humano. Otro aspecto que debe resaltarse es el hecho de que un número significativo de las nuevas proteasas humanas identificadas en el curso de las exploraciones genómicas descritas son sólo el resultado de predicciones bioinformáticas, pero todavía carecemos de pruebas experimentales que corroboren esta posibilidad y confirmen sus propiedades catalíticas.

La disponibilidad de la secuencia completa de los genomas de organismos como el ratón, la rata y el chimpancé [18-20], nos ha permitido adquirir información adicional sobre el degradoma humano. En principio, la comparación del repertorio completo de los genes de proteasas presentes en estos organismos puede proporcionar información importante sobre aspectos evolutivos de los mamíferos. Además, los estudios genómicos comparativos pueden conducir a la identificación de elementos reguladores responsables del control de la expresión de estos genes. Finalmente, la asignación precisa de los ortólogos murinos de genes de proteasas humanas puede facilitar la creación de modelos animales experimentales que permitan examinar la función de dichas proteasas. Nuestros primeros estudios en este sentido revelaron que, sorprendentemente, el degradoma de ratones y ratas es mucho más complejo que el humano (Fig. 6). Así, los degradomas de estos mamíferos están compuestos por 641 y 626 genes, un número significativamente mayor que los 561 genes de proteasas anotados en el degradoma humano [13, 21].

El análisis detallado de las diferencias entre el degradoma humano y el de ratas y ratones ha mostrado que la mayor complejidad de los degradomas de roedores deriva fundamentalmente de la expansión de genes de proteasas implicadas en estrategias de defensa inmunológica o en procesos reproductivos. Las expansiones más significativas se encuentran en familias de serín-proteasas como las cali-

La colagenasa-1 está duplicada en rata y ratón (McolA and McolB)



La MMP26 y la MMP23A son específicas de humanos

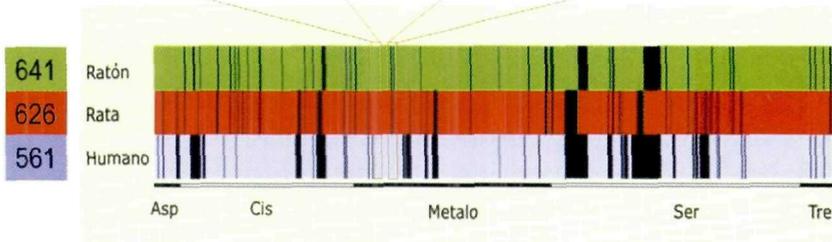


FIGURA 6. Representación en forma de código de barras de los degradomas de distintos mamíferos. La figura muestra el conjunto completo de proteasas de cada especie, distribuidas en las cinco clases catalíticas. Los genes que están ausentes o no son funcionales en alguna de las especies se indican mediante una barra negra. A modo ilustrativo, se destacan las diferencias en genes de la familia MMP de metaloproteasas.

creínas, con 26 genes en ratón, 23 en rata y 15 en humanos, o las proteasas de mastocitos con 28 genes en rata y 17 en ratón, pero sólo 4 en humanos. Otra diferencia de notable interés es la observada en las catepsinas placentarias con 10 miembros en rata y 8 en ratón, pero ausentes en el degradoma humano. Análogamente, en el genoma de roedores se detectan al menos 9 metaloproteasas testiculares de la subfamilia de las testasas, las cuales no están presentes en el degradoma humano. Estos hallazgos avalan la información derivada de otros estudios evolutivos y confirman que los cambios en los procesos reproductivos y en la respuesta inmune han constituido fuerzas decisivas en la evolución de los mamíferos [22].

El hallazgo de la notable expansión de los sistemas proteolíticos en roedores con respecto a los que poseen nues-

tras células y tejidos nos llevó a plantear la hipótesis de que los inhibidores endógenos de proteasas podrían haber experimentado procesos de expansión semejantes en el genoma de ratones y ratas. En efecto, de acuerdo con nuestros resultados [21], el genoma del ratón contiene al menos 199 genes codificantes de inhibidores de proteasas, un número similar al anotado en el genoma de la rata (183 genes), pero sensiblemente superior al presente en nuestro genoma, en el que sólo pudimos identificar 156 genes correspondientes a dichos inhibidores.

Curiosamente, un análisis preciso de las expansiones observadas en los genes de inhibidores de proteasas de roedores, demostró la existencia de un evidente paralelismo entre el incremento del número de inhibidores pertenecientes a familias como las cistatinas y las serpinas, y el de las proteasas sobre las que actúan dichos inhibidores [21]. Estos resultados apoyan la posibilidad de que la expansión de los genes codificantes de inhibidores de proteasas en los roedores ha surgido como una respuesta evolutiva para intentar compensar el incremento del potencial proteolítico celular en estos animales, incremento que deriva de la notable expansión de genes de proteasas acontecida en sus respectivos genomas (Fig. 7).

Estos estudios genómicos comparativos también nos han permitido examinar en detalle otros aspectos que pueden contribuir a enriquecer nuestra visión, bajo un prisma proteolítico, de la evolución de los mamíferos [22]. Así, y aunque la expansión de familias de genes de proteasas e inhibidores ha desempeñado un papel esencial en la evolución de los sistemas proteolíticos en roedores, la evolución de los ortólogos humanos parece haber tomado otros caminos. En efecto, diversos genes de proteasas implicadas en procesos de digestión, reproducción y respuesta inmune, que son perfectamente funcionales en ratas y ratones, han adquirido una serie de mutaciones inactivantes en el genoma humano que han conducido a su conversión en seudogenes (Tabla 1). Entre este grupo de seudogenes humanos se encuentran siete miembros de la familia ADAM de metaloproteasas,

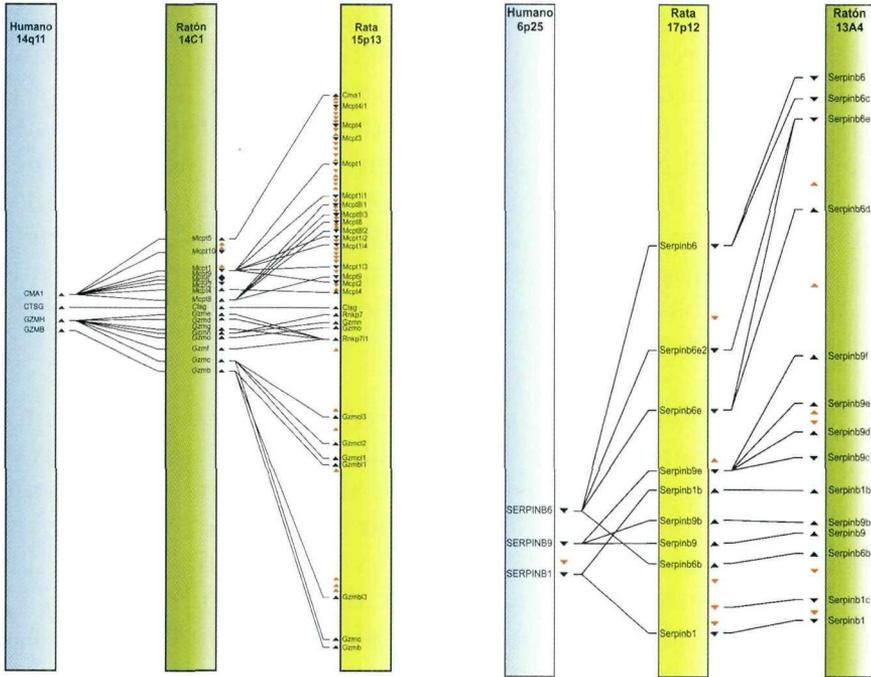


FIGURA 7. **Coexpansión de genes de proteasas e inhibidores en el genoma de ratas y ratones.** La figura muestra la localización cromosómica de diversos genes de serín-proteasas hematopoyéticas (*izquierda*) y de serpinas (*derecha*), una familia de inhibidores de serín-proteasas. La orientación y el orden de los distintos genes y pseudogenes se indican por cabezas de flecha negras y rojas, respectivamente. Las líneas conectoras indican la ortología.

incluyendo diversas fertilinas y testasas que desempeñan funciones reproductivas en roedores. Este activo proceso de pseudogenización también ha afectado a cinco componentes de una subfamilia de serín-proteasas testiculares y a otros tantos genes de proteasas implicadas en la digestión de proteínas de la dieta en estos animales.

Probablemente, la pseudogenización específica de genes de proteasas humanas podría derivar de la pérdida de función de estas proteasas en procesos fisiológicos y la subsiguiente acumulación de mutaciones en los genes correspondientes. Sin embargo, no se puede descartar la situación contraria en la que mutaciones en estos genes podían haber contribuido a provocar cambios en la fisiología humana al

interferir con procesos relacionados con la reproducción, la digestión o la defensa inmunológica, que se mantienen activos en otras especies de mamíferos.

TABLA 1. **Genes de proteasas inactivos en humanos y activos en otras especies**

Gen inactivo en humanos	Estado en otras especies	Función
ADAM-1, -3, -4, -4b, -5, -6, -25	Funcional en roedores	Reproducción
Caspasa-12	Funcional en chimpancé y roedores	Respuesta inmune
Quimosina	Funcional en roedores	Digestión
Serín-proteasa intestinal distal	Funcional en roedores	Digestión
Tripsina de vías respiratorias -2, -3	Funcional en roedores	Respuesta inmune
Serín-proteasa de implantación-2, -2L	Funcional en roedores	Reproducción
Napsina B	Funcional en chimpancé	Respuesta inmune
Elastasa pancreática	Funcional en roedores	Digestión
Serín-proteasa testicular Tesp-2, -3	Funcional en roedores	Reproducción
Serín-proteasa testicular Tessp-3,-4, -6	Funcional en roedores	Reproducción
Tripsina-10, -15	Funcional en chimpancé y roedores	Digestión

Más recientemente, la disponibilidad de la secuencia del genoma del chimpancé nos ha permitido ampliar nuestra mirada hacia el universo proteolítico y aproximarla hacia un nuevo reto: la comparación del degradoma humano con el del organismo más próximo a nuestra especie en la escala evolutiva [20]. Utilizando las estrategias de análisis bioinformático discutidas anteriormente hemos podido concluir que, en términos globales, el degradoma del chimpancé es virtualmente idéntico al humano y está compuesto por 559 genes agrupados en 68 familias distintas. Sin embargo, un análisis muy detallado de estos genes y sus correspondientes ortólogos humanos nos ha permitido observar la existencia de algunas diferencias interesantes entre los degradomas de ambas especies [20, 23]. Por ejemplo, los genes humanos EOS y GGTLA1 —codificantes de una serín-proteasa de macrófagos y una glutamiltranspeptidasa, respectivamente— no tienen equivalentes en el degradoma del chimpancé. De manera análoga, el gen HPR —codificante de una proteína relacionada con las serín-proteasas— se ha inactivado específicamente en el genoma de este primate. Por el contrario, los genes de chimpancé denominados

NAP2, CASP12 y HPP —codificantes de una aspartil proteasa, una cisteín-proteasa de la familia de las caspasas y una proteína homóloga a las serín-proteasas— se han inactivado o están ausentes en nuestro genoma. Finalmente, el gen MMP23 codificante de una metaloproteasa de matriz extracelular identificada y caracterizada en nuestro laboratorio [24], se ha duplicado específicamente en el genoma humano.

Además de estas diferencias en términos de genes adquiridos o perdidos durante el relativamente breve periodo de tiempo (5-7 millones de años) transcurrido desde que comenzó nuestra divergencia del ancestro común que compartimos con el chimpancé, el análisis comparativo de nuestros respectivos degradomas ha revelado algunas variaciones adicionales [23]. Así, de acuerdo con nuestros resultados, hay al menos 26 proteasas de chimpancé que contienen inserciones o deleciones de uno o varios residuos respecto a sus ortólogas humanas. En muchos de estos casos, los cambios afectan a unos pocos residuos y están situados en regiones repetidas que pueden ser inestables o polimórficas, lo cual contribuiría a explicar las diferencias observadas con las secuencias humanas de referencia. Sin embargo, hay al menos dos genes de proteasas (ADAMTS-20 y MMP-9) en los que las deleciones en la secuencia de chimpancé son de mayor alcance. En el primero de ellos, la deleción de dos exones completos conduce a la generación de una proteína truncada que carece de dos de los dominios trombospondina C-terminales presentes en la ADAMTS-20 humana y en otras especies [25]. En el caso del gen MMP-9, la deleción elimina una porción significativa de la región bisagra que conecta el dominio catalítico de esta metaloproteasa con el dominio hemopexina implicado en el establecimiento de interacciones con sus sustratos e inhibidores [26]. Por el momento, desconocemos la relevancia funcional de estas diferencias pero, en cualquier caso, son ejemplos que ilustran la idea de que más allá de las duplicaciones, reorganizaciones e inactivaciones génicas descritas anteriormente, otros mecanismos como pequeñas inserciones y deleciones en genes de proteasas también pueden haber desempeñado

un papel importante en la generación de diversidad entre ambas especies.

En este sentido, es igualmente de interés el hallazgo de algunas diferencias significativas en los genes codificantes de proteasas directamente responsables de diversas enfermedades hereditarias. Así, el análisis detallado de los 69 genes de proteasas descritos hasta el momento dentro de esta categoría ([www.uniovi.es/degradome](http://www.uniovi.es/degradome)), ha mostrado que todos ellos están presentes en el genoma del chimpancé. Sin embargo, en uno de estos genes —denominado PRSS1 y codificante del tripsinógeno catiónico— la forma mutada en humanos corresponde a la forma normal en el chimpancé. Así, se ha descrito recientemente que individuos portadores de la mutación N29T en PRSS1 desarrollan una forma de pancreatitis hereditaria causada por la activación inapropiada del citado tripsinógeno [27]. Curiosamente, en todos los casos analizados, el tripsinógeno del chimpancé porta un residuo de treonina en la posición 29, sin que ello provoque ningún síntoma de pancreatitis en estos animales. Este notable ejemplo de las denominadas «anomalías de Dobzhansky» constituye una prueba adicional de la utilidad de los análisis genómicos comparativos para identificar diferencias en genes asociados con enfermedades humanas e iluminar nuevos aspectos mecanísticos subyacentes a su desarrollo. En efecto, estudios recientes de nuestro laboratorio sugieren que diversos cambios en el promotor del gen del tripsinógeno del chimpancé, provocan alteraciones en su expresión con respecto a la de su ortólogo humano, compensando de esta forma las aparentes diferencias en la actividad enzimática de esta proteasa en ambas especies.

Estas observaciones derivadas del análisis del promotor del gen del tripsinógeno, nos obligan a reconocer que la mera comparación de la región codificante de los genes de proteasas humanas y los de una especie tan próxima como el chimpancé, no es suficiente para extraer claves distintivas relevantes acerca de la naturaleza humana. Así, pequeños cambios en las secuencias reguladoras de los genes

pueden ser determinantes en la evolución de las formas, funciones y capacidades características de nuestra especie. Por ello, deberemos ampliar nuestra mirada y extender estos estudios hacia el análisis detallado de los mecanismos que regulan la expresión de genes cuyas secuencias codificantes son prácticamente idénticas en humanos y chimpancés. El hipotético hallazgo de diferencias significativas en estos mecanismos, permitirá dotar de contenido experimental a la idea emergente sobre el valor de la regulación diferencial de la expresión de la información genética, como estrategia molecular decisiva en la evolución. No obstante, para progresar en estas aproximaciones, todavía deberemos conocer las secuencias de los genomas de otras especies, incluyendo los de diversos primates, y explorar los códigos epigenéticos que contribuyen a definir la lógica molecular de la regulación de la expresión génica.

En resumen, y más allá de las limitaciones reseñadas, podemos concluir que la comparación de genomas desde una perspectiva proteolítica nos ha ofrecido una excelente oportunidad para identificar los cambios genéticos responsables de alguna de las diferencias que nos separan de otras especies. Además, el elevado número de genes de proteasas, su notable diversidad y dinamismo evolutivo, y el conocimiento acumulado acerca de sus estructuras y funciones, abren la posibilidad de utilizar la información generada sobre los distintos degradomas, en futuros estudios acerca de la evolución humana y de otros organismos.

## **PROTEASAS: EN LA SALUD Y EN LA ENFERMEDAD**

La disponibilidad del catálogo detallado de proteasas codificadas en el genoma humano puede proporcionar una valiosa información para intentar definir su posible relevancia patológica e identificar aquéllas de especial interés como dianas de intervención terapéutica. Las anomalías en el funcionamiento de los sistemas proteolíticos conducen a una notable variedad de patologías humanas que podemos clasificar en dos grandes categorías: afecciones directamen-

te causadas por alteraciones en genes de proteasas y patologías derivadas de anomalías en otros componentes de los sistemas proteolíticos. A su vez, dentro del primer grupo podemos distinguir entre enfermedades hereditarias provocadas por mutaciones en genes de proteasas y enfermedades causadas por alteraciones en los patrones cuantitativos y espacio-temporales de expresión de dichos genes.

De acuerdo con nuestros datos más recientes, hasta el momento se han descrito 69 enfermedades humanas causadas por mutaciones en genes de proteasas ([www.uniovi.es/degradome](http://www.uniovi.es/degradome)). La mayor parte de dichas mutaciones se transmiten siguiendo un patrón de herencia autosómica recesiva y conducen a una pérdida de función de los correspondientes enzimas. Sin embargo, hay algunos casos muy interesantes de enfermedades genéticas de proteolisis con un patrón de herencia autosómica dominante. Entre ellas podemos citar la *cilindromatosis familiar* provocada por mutaciones en el gen de la cisteín-proteasa CYLD [28], o el *síndrome linfoproliferativo autoinmune* originado por mutaciones en el gen de la caspasa-10 [29]. Asimismo, hay situaciones en las que las mutaciones en los genes de proteasas conducen a una ganancia de función, como en la *enfermedad de Alzheimer familiar* provocada por alteraciones en las presenilinas [30], o en la *condrodisplasia hereditaria* causada por mutaciones en el gen de la colagenasa-3 [31]. Este último enzima posee además una especial relevancia en una serie de patologías humanas que pueden encuadrarse en la segunda categoría de enfermedades de proteolisis, las ocasionadas por alteraciones en los patrones de expresión de proteasas en tejidos humanos.

Esta segunda clase de enfermedades relacionadas con cambios de expresión génica en los sistemas proteolíticos es sin duda la más amplia, hasta el punto de que hoy resulta difícil encontrar un proceso patológico humano en el que no haya una o varias proteasas desarrollando una actividad proteolítica excesiva, o en una localización inadecuada, o en un momento inoportuno. En efecto, las alteraciones en los patrones espacio-temporales de expresión de las protea-

sas son un acontecimiento habitual en enfermedades tan importantes como las cardiovasculares, las neurodegenerativas, las inflamatorias o el cáncer. El análisis de los mecanismos subyacentes a las anomalías observadas en la expresión patológica de proteasas no permite hablar de una estrategia universal en este sentido. Así, son muchas las señales moleculares —incluyendo hormonas, citoquinas y factores de crecimiento— potencialmente responsables de generar los profundos cambios detectados en los patrones de expresión de proteasas, durante el desarrollo de las citadas enfermedades.

Además de estos cambios patológicos en la estructura o expresión de las proteasas humanas, las enfermedades de proteólisis también pueden derivar de alteraciones en otros componentes de los sistemas proteolíticos distintos de las propias proteasas, incluyendo sus inhibidores endógenos, sus sustratos, sus factores reguladores o sus transportadores intra- o extracelulares. Entre los ejemplos ilustrativos del primero de estos casos podemos mencionar las *serpinopatías*, generadas por mutaciones en inhibidores de serín-proteasas como la  $\alpha_1$ -antitripsina, cuya deficiencia causa una enfermedad pulmonar de gran incidencia en la población caucásica [32]. Respecto a las mutaciones en los sustratos de proteasas que impiden su correcto procesamiento proteolítico, podemos citar los casos de *enfermedad de Alzheimer familiar* originados por mutaciones en el gen APP, que provocan la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide en el cerebro de los pacientes afectados por esta enfermedad [33].

Otro ejemplo muy interesante en este sentido, y ampliamente estudiado en nuestro laboratorio en los últimos años, es el de los síndromes de envejecimiento acelerado, incluyendo la *enfermedad de Hutchinson-Gilford*, provocados por mutaciones en el gen de la prelamina A [34, 35]. Estas mutaciones impiden el correcto procesamiento proteolítico de esta proteína, mediado por la metaloproteasa FACE-1/Zmpste24, y conducen a la acumulación de una proteína anómala —denominada progerina— en la membrana nuclear y posteriormente, a las profundas alteraciones celular-

res que subyacen al desarrollo de estos devastadores síndromes progeroides.

Entre las enfermedades provocadas por mutaciones en factores reguladores de proteasas podemos mencionar la hemofilia A, causada por cambios en el factor VIII de la coagulación que provocan una disminución en la actividad del factor IX, una serín-proteasa que requiere del factor VIII para el desarrollo correcto de su actividad proteolítica [36]. Otro ejemplo en este sentido, estudiado también en nuestro laboratorio, es el de las mutaciones en el factor de transcripción Cbfa1, que provocan graves enfermedades óseas derivadas de la pérdida de la actividad reguladora de esta proteína sobre genes diana como el de la colagenasa-3 [37]. Finalmente, dentro del grupo de patologías humanas provocadas por anomalías en los sistemas de transporte de proteasas, podemos citar la enfermedad hematológica provocada por mutaciones en el gen ERGIC53, que codifica una proteína implicada en el transporte intracelular de proteasas lisosomales como la catepsina Z [38].

En resumen, los ejemplos escogidos pretenden ilustrar la complejidad de las enfermedades de proteólisis, complejidad que surge fundamentalmente del elevado número de proteasas que pueden ser dianas moleculares de estas alteraciones y de la variabilidad de los mecanismos bioquímicos que subyacen a dichas anomalías. En cualquier caso, es en el cáncer donde podemos percibir con mayor amplitud la relevancia y diversidad de funciones que desempeñan los enzimas proteolíticos en la patología humana.

## PROTEASAS Y CÁNCER

Hace casi 2.500 años, Hipócrates, uno de los primeros observadores curiosos de los procesos tumorales, adscribió la capacidad invasiva y destructora de los tumores a un desajuste entre los cuatro humores que compondrían el cuerpo humano. Siguiendo su razonamiento, este desajuste conduciría a un exceso local de uno de ellos denominado

*bilis negra* (Fig. 8). Años más tarde, Galeno extendió esta teoría y propuso que la *bilis negra* se concentraba en las regiones de invasión tumoral. Unos cuantos siglos después, cuando los bioquímicos comenzaron a determinar la composición molecular de esa *bilis negra* descrita por Hipócrates y Galeno, se obtuvieron los primeros indicios de que dicho humor maligno estaría constituido mayoritariamente por proteasas. Hace aproximadamente 15 años, cuando nuestro laboratorio inició la exploración del universo proteolítico humano cuya crónica se describe en estas páginas, la hipótesis que impulsó nuestro trabajo en este campo no fue muy distinta a la formulada por estos pioneros de la Medicina: las proteasas, tras acumularse en las zonas de invasividad tumoral y mediante su notable capacidad de destrucción tisular, podrían desempeñar un papel fundamental en la progresión del cáncer.



FIGURA 8. De Hipócrates y Galeno a la Biología Molecular del cáncer. La figura representa la evolución en los conceptos derivados del estudio de los tumores malignos.

El cáncer es una enfermedad cuya capacidad para hacernos sentir vulnerables parece aumentar cada día. Sin embargo, no estamos ante una patología reciente, basta recordar su origen para convencernos de ello. En efecto, tras la formación de las primeras células hace más de tres mil

millones de años, la vida en nuestro planeta transcurrió en un ámbito exclusivamente unicelular basado en estrategias eficaces de autoperpetuación clónica de dichas células primitivas. Milenio tras milenio, la vida unicelular dominó la Tierra hasta que hace unos 800 millones de años, una de estas células primigenias compartió con éxito su vida con otras semejantes, iniciando el proceso que las condujo a construir organismos multicelulares. Fue también en ese momento cuando comenzaron a gestarse las primeras vías que más tarde conducirían al cáncer. La adquisición de la pluricelularidad fue un indudable logro evolutivo al que debemos nuestra propia vida, pues engendró valiosas estrategias de reproducción, supervivencia, organización y comunicación, que acabaron con millones de años de existencia exclusiva de organismos unicelulares.

Sin embargo, el proceso de generación de seres pluricelulares dejó necesariamente algunas deficiencias moleculares que nos proporcionaron ventajas evolutivas, pero que simultáneamente nos abocaron a la posibilidad de desarrollar procesos tumorales. El cáncer surge cuando una sola de los billones de células que construyen nuestro cuerpo se transforma, pierde su sentido altruista y se multiplica sin control hasta llegar a destruir al organismo al que hasta entonces contribuyó a modelar. El cáncer representa, por tanto, el retorno al caos biológico del que surgimos, la pérdida de esa armonía bioquímica que hace posible cada instante que nos regala la vida, y en definitiva, es el precio que debemos pagar por nuestra naturaleza de seres pluricelularmente complejos.

Entre las deficiencias mecánicas intrínsecas a nuestra propia naturaleza pluricelular podemos señalar en primer lugar la falta de fidelidad en los mecanismos de replicación y reparación del ADN. Esta capacidad de cometer errores durante la copia de nuestro material genético, aun siendo prácticamente irrelevante en términos cuantitativos, ha sido un motor decisivo en la evolución de las especies y ha proporcionado la base para la adquisición de la variabilidad individual en cada una de ellas. Sin embargo, esta pequeña

frecuencia de error también conlleva la posibilidad de que alguna de nuestras células pueda llegar a adquirir las mutaciones que acompañan al proceso de transformación maligna. Así, una situación evolutivamente ventajosa nos coloca en una ruta general de predisposición al cáncer. La vida pluricelular también implicó la necesidad de adquirir una compleja red de mecanismos de comunicación y señalización inter- e intracelulares. Cada célula se encuentra en contacto con otras células semejantes o distintas, con las que se debe comunicar mediante una red de señales químicas y físicas cuya complejidad sólo ahora empieza a vislumbrarse. Tal complejidad nos sitúa ante la posibilidad constante de sufrir alteraciones en alguna de las citadas vías y, no en vano, muchos procesos tumorales van acompañados de una pérdida de control en los sistemas de señalización y comunicación celulares. Finalmente, el mantenimiento en nuestros órganos y tejidos de un cierto número de células —incluyendo las células troncales adultas— con gran potencial proliferativo o invasivo, representa otro grave riesgo de la pluricelularidad. Estas células son necesarias para afrontar procesos fisiológicos de tanta trascendencia como el propio desarrollo embrionario, y participan en procesos esenciales para el mantenimiento y defensa del organismo como la respuesta inflamatoria o la cicatrización de heridas. La pérdida de los controles que mantienen la función de estas células en unos límites apropiados, conlleva la adquisición de las propiedades mitogénicas e invasivas consustanciales a las células transformadas que conforman los tumores malignos.

Afortunadamente, nuestro progreso evolutivo también nos ha proporcionado una serie de mecanismos biológicos para tratar de minimizar el potencial tumoral derivado de estas deficiencias surgidas de la pluricelularidad. Entre ellos podemos citar la capacidad replicativa finita de las células, la cuantiosa inversión en sistemas de reparación del daño genético, los programas de apoptosis o la eficacia de nuestro sistema inmune antitumoral. Pese a ello, es una realidad el hecho de que los organismos pluricelulares desarrollan tumores malignos, y en el caso de nuestra especie, con una

frecuencia que ha venido aumentando en las últimas décadas. ¿Por qué sucede esto? Muy probablemente porque hemos ido adquiriendo una gran capacidad de interferir con nuestra propia naturaleza biológica a través de cambios en la dieta, exposición a agentes cancerígenos, o simplemente, por un incremento notable en la esperanza de vida en buena parte de las sociedades actuales [39].

En suma, el cáncer es un proceso muy antiguo que surge como consecuencia inevitable de nuestra propia evolución. Aunque sólo podemos aventurar los mecanismos moleculares que generaron los primeros tumores, parece claro que el cáncer nos ha acompañado desde el principio de nuestra historia como especie. Más aún, los paleopatólogos han encontrado indicios de tumores óseos malignos en vértebras de dinosaurios del periodo Mesozoico, avalando la idea de la antigüedad de los procesos tumorales [40]. También desde el principio, la búsqueda de soluciones frente al problema del cáncer ha sido amplia y diversa. Así, la cirugía, y después la quimioterapia y la radioterapia, aportaron respuestas precisas y evitaron que las palabras cáncer y muerte fuesen términos inseparables dentro de la misma ecuación, de forma que hoy muchos tumores malignos pueden curarse. Sin embargo, todos tenemos la triste certeza de que la curación de otros tumores nos obliga necesariamente a la exploración de soluciones adicionales.

Hace poco más de tres décadas, destacados científicos intuyeron que la Biología Molecular también podía aportar nuevas respuestas al problema del cáncer [41]. En efecto, los avances en esta disciplina han contribuido a desvelar secretos importantes de los procesos tumorales y nos han mostrado que, esencialmente, el cáncer es el resultado de la acumulación de daño genético o epigenético en oncogenes, genes supresores tumorales y genes de mantenimiento de la integridad del ADN. También hemos aprendido que este daño se hereda de nuestros progenitores en un pequeño porcentaje de casos, pero que en la mayoría de las ocasiones se adquiere a lo largo de la vida por agresiones externas como las radiaciones solares, el tabaco, algunos virus, o

simplemente por azar. Además, varias décadas de investigación molecular en Biología tumoral nos han enseñado que, tras la impresionante variabilidad clínica y biológica de los tumores malignos, hay una serie de características bioquímicas adquiridas por las células transformadas y compartidas por la mayoría de los tumores [41]. Entre ellas podemos citar la adquisición de mecanismos autónomos de proliferación, la insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento celular, la generación de estrategias de resistencia a la apoptosis, la superación de la barrera de la mortalidad por reactivación de enzimas como la telomerasa, o el desarrollo de programas de angiogénesis que aporten el oxígeno y los nutrientes requeridos para la progresión tumoral.

Sin embargo, pese a los innegables avances en la lucha contra el cáncer, nuestro conocimiento es todavía muy limitado en todo lo referente a la última de las características comunes a los tumores malignos: su capacidad de generar metástasis. En efecto, una vez que las células tumorales alcanzan el torrente sanguíneo y se extienden por el cuerpo, la progresión tumoral se torna prácticamente irreversible (Fig. 9). Por ello, uno de los objetivos prioritarios en la investigación actual sobre el cáncer es la elucidación de los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de metástasis, la manifestación más extrema del caos biológico subyacente a la transformación maligna [42].

El proceso de formación de metástasis es el resultado de una compleja cascada de acontecimientos entre los que se incluyen la interacción de las células tumorales con componentes específicos de la matriz extracelular, la destrucción local de esa matriz y, finalmente, la migración activa de dichas células a sitios distantes. Los detalles precisos de los mecanismos subyacentes a cada una de estas tres fases del proceso metastásico no se conocen todavía. Sin embargo, múltiples estudios han permitido progresar notablemente en el conocimiento de la segunda de estas etapas, consistente en la degradación de la matriz extracelular adyacente a las células tumorales, para posibilitar su posterior migración y diseminación [43]. De acuerdo con nuestras hipótesis

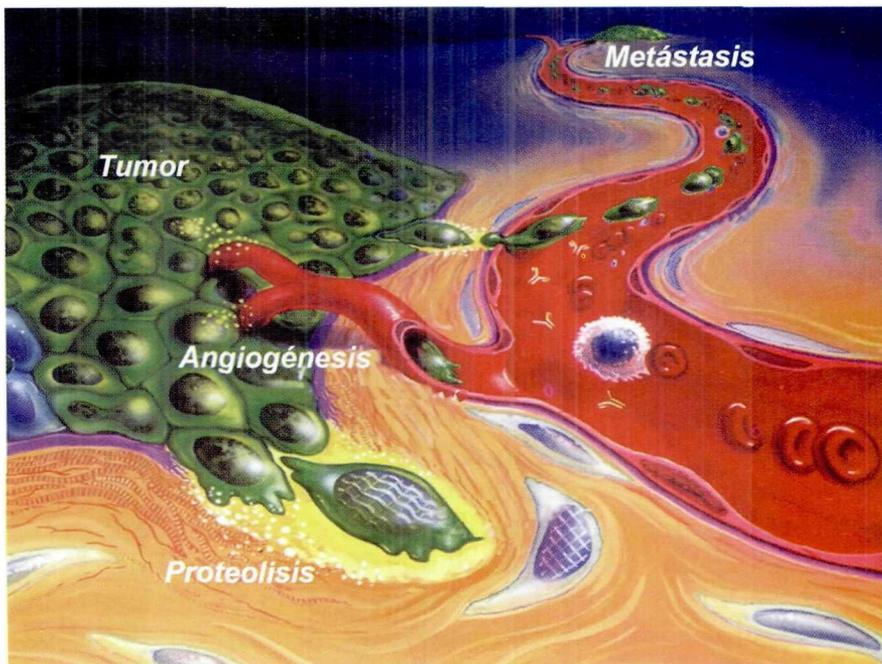


FIGURA 9. **Invasión tumoral y metástasis.** Las células tumorales abandonan el tumor primario y atraviesan la matriz extracelular, alcanzando el torrente sanguíneo y generando metástasis en lugares distantes del organismo (imagen modificada de Research Products Catalog, CN Biosciences, USA).

y las de otros autores, sería precisamente en este proceso destructivo en el que se encuadraría fundamentalmente la acción de las proteasas, que de esta forma desempeñarían un papel decisivo en el aspecto más letal del cáncer: la formación de metástasis.

Basándonos en estas ideas, en nuestro laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, iniciamos en 1992 un trabajo sistemático dirigido a la búsqueda de nuevas proteasas humanas asociadas a procesos tumorales y al estudio de sus posibles funciones en la progresión del cáncer. La labor experimental realizada en torno a este problema, aplicando diversas estrategias que han ido evolucionando paralelamente al progreso técnico de la Biología Molecular, nos ha permitido la identificación y caracterización estructural y funcional de más de 60 nuevas proteasas

humanas, aisladas en su mayor parte por su sobreexpresión en distintos tumores, o dada su participación en procesos de remodelación tisular que guardan un cierto paralelismo con los procesos tumorales [9, 14, 24, 25, 44-65]. Entre estas nuevas proteasas humanas se incluyen cisteín-proteasas como la bleomicín-hidrolasa, las autofaginas, las catepsinas O, L2, F y Z, y numerosas USPs (USP-23 a USP-45); serín-proteasas como la matriptasa-2 y las poliserasas; y metalo-proteasas como las denominadas colagenasa-3, MT4-MMP, MT5-MMP, MT6-MMP, MMP-19, enamelisina, MMP-23, matrilisina-2, FACE-1, FACE-2, ADAM-23, ADAMTSs (ADAMTS-12 a ADAMTS-20), aminopeptidasa O, ovastacina, o la nueva familia de las arqueometzinquinas. Paralelamente, hemos tratado de identificar nuevos inhibidores endógenos de proteasas que pudieran bloquear la actividad de las proteasas asociadas a tumores, con el hallazgo del TIMP-3 (*tissue inhibitor of metalloproteinases-3*) y la cistatina D, los cuales son inhibidores específicos de metaloproteasas y cisteín-proteasas [66, 67].

Tras la identificación de estas nuevas proteínas humanas, nuestro trabajo ha estado centrado en una amplia caracterización bioquímica y funcional de las mismas, que pueda servir como base para definir sus posibles implicaciones en la progresión del cáncer. Asimismo, hemos realizado estudios dirigidos a analizar los mecanismos que regulan su expresión en condiciones normales y patológicas [68-84]. El estudio de estos mecanismos reguladores nos ha proporcionado algunas claves acerca de la etiopatogenia de las enfermedades neoplásicas y de otros procesos —como la artritis y diversas patologías inflamatorias— en los que también se sobreexpresan estos enzimas [85-89].

Entre las nuevas proteasas humanas descubiertas en nuestro laboratorio debe destacarse especialmente el hallazgo de la colagenasa-3, que se ha convertido en una diana preferente de intervención terapéutica, no sólo en procesos tumorales, sino también en enfermedades óseas y artríticas [90-93]. En efecto, la sobreexpresión dirigida de esta proteasa en diversos tejidos de animales transgénicos es sufi-

ciente para acelerar la progresión tumoral o para favorecer el inicio y el desarrollo de diversos procesos artríticos, estableciendo así la relación causal necesaria para definir la relevancia de una determinada proteína como diana terapéutica [94, 95].

Estos estudios básicos han servido como punto de partida para el desarrollo de nuevas líneas de investigación por parte de otros grupos y compañías farmacéuticas interesadas en diseñar inhibidores capaces de bloquear la acción proteolítica de estas enzimas, y muy especialmente, la que lleva a cabo la colagenasa-3 frente a un gran número de sustratos incluyendo colágenos fibrilares y diversas proteínas de la matriz extracelular [96-98]. Alguno de los inhibidores sintéticos frente a esta metaloproteinasa se han introducido ya en ensayos clínicos y tal vez en el futuro puedan llegar a formar parte de nuevas estrategias de terapia combinada para el tratamiento de enfermedades como el cáncer o la artritis (Fig. 10).



**Fig. 10.** Estructura de la colagenasa-3 humana. La molécula lleva unido un inhibidor sintético denominado RS 130830, que es específico frente a dicha proteasa.

Por otra parte, debemos reseñar que aunque la relevancia patológica de los genes de proteasas e inhibidores clonados en nuestro laboratorio deriva en gran medida de las notables alteraciones en sus patrones cuantitativos y espacio-temporales de expresión durante el desarrollo del cáncer, deficiencias en alguno de estos nuevos genes causan distintas patologías hereditarias humanas. Así, mutaciones en los genes de colagenasa-3, FACE-1, ADAMTS-13 y TIMP-3, provocan enfermedades como la condrodisplasia-SEMD, la dermatopatía restrictiva y otros síndromes progeroides, la púrpura trombótica trombocitopénica y la distrofia de Sorsby [31, 99-103].

Además, los estudios bioquímicos llevados a cabo con las diversas proteasas identificadas por nuestro grupo de investigación, han demostrado que algunas de ellas tienen funciones que van más allá de su participación en la destrucción de tejidos. Por ejemplo, la bleomicín-hidrolasa provoca fenómenos de resistencia a la quimioterapia, al destruir fármacos como la bleomicina utilizados en el tratamiento del cáncer [47]. Otras proteasas como la denominada FACE-2 (*farnesylated-proteins converting enzyme-2*) activan oncoproteínas que estimulan la proliferación incontrolada de las células tumorales [56], mientras que las denominadas MT5-MMP y MT6-MMP, activan en la superficie de las células a otras proteasas para que sean éstas quienes participen en el desarrollo del proceso tumoral [52, 55].

Entre todas estas nuevas proteínas identificadas en nuestro laboratorio, tal vez la que ha alcanzado mayor relevancia es la anteriormente citada colagenasa-3, que posee un gran potencial proteolítico y es capaz de degradar múltiples proteínas, convirtiéndose en un notable instrumento destructor asociado a la progresión de muchos tumores [90, 104]. Esta proteína es producida por carcinomas de laringe, de piel, del aparato digestivo y del tracto genital femenino, así como por condrosarcomas y carcinomas de mama, en los cuales descubrimos esta proteasa y donde acontece un fenómeno de notable trascendencia conceptual. En efecto, la colagenasa-3 no se produce en las propias células tumo-

rales, sino en las células normales inmediatamente adyacentes al tumor. De este modo, las células tumorales envían señales moleculares a las células normales, que las conminan a producir una proteína que va a ser causa de su propia destrucción, facilitando el avance de las células tumorales [71, 105]. Este ejemplo ilustra la complejidad del proceso carcinogénico y muestra una de las múltiples estrategias que los tumores malignos utilizan para conseguir desarrollar sus programas de destrucción tisular.

Por último, debemos señalar que los primeros estudios clínicos realizados con proteasas como la colagenasa-3 han demostrado que su presencia se asocia a lesiones invasivas y de mal pronóstico, por lo que su detección puede ayudar a predecir la evolución tumoral e instaurar estrategias terapéuticas más adecuadas [90]. Sin embargo, estas observaciones correlativas no son suficientes para adscribir un papel central a una proteasa en el conjunto de los mecanismos de progresión tumoral. Se impone, por tanto, la necesidad de recorrer el camino que separa una correlación de una relación causal, y para ello contamos con un vehículo fundamental: los modelos animales creados por manipulación genética.

## DE RATONES Y HOMBRES

Los modelos animales complementan, de forma decisiva y por ahora insustituible, las aproximaciones descriptivas en la investigación biomédica. Más allá de la relevancia de los estudios genómicos comparativos discutidos anteriormente, varias especies animales han prestado servicios de valor incalculable a la biomedicina: la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, herramienta esencial de los genetistas del desarrollo; el minimalista nematodo *Caenorhabditis elegans*; la rata, animal predilecto de los fisiólogos; el pequeño pez cebra, *Danio rerio*; pollos, cobayas, conejos, perros, monos, y por supuesto el ratón, *Mus musculus*. En los últimos años, dos tipos de modelos animales derivados de la manipulación genética de ratones, los denominados

ratones transgénicos y ratones *knockout*, nos han proporcionado una nueva vía de aproximación al conocimiento de las bases moleculares subyacentes al desarrollo de múltiples enfermedades humanas, incluyendo el cáncer.

El primer mamífero manipulado genéticamente que mostró una alteración fenotípica evidente fue un ratón creado en 1982, en cuyo genoma se había introducido el gen de la hormona de crecimiento de rata y que, como consecuencia de la superproducción de dicha hormona, alcanzaba un peso varias veces superior al normal [106]. Desde esa fecha, se han generado centenares de estirpes de ratones que expresan versiones normales o mutadas de genes humanos o animales. El método más comúnmente utilizado con este fin es la micro-inyección pronuclear. El gen que se pretende añadir a la dotación genética del organismo receptor se introduce en un plásmido tras un promotor que dirija su expresión a los tejidos de interés. El ADN del plásmido resultante se microinyecta en el pronúcleo masculino de óvulos recién fecundados, que a continuación son implantados en los oviductos de hembras pseudopreñadas. El ADN microinyectado se integrará al azar en el genoma y se transmitirá a la descendencia del animal desarrollado a partir del óvulo en el que se ha incorporado dicho ADN [107].

Por otra parte, la eliminación dirigida de un gen concreto constituye una de las aproximaciones más informativas para esclarecer su función biológica [108, 109]. La herramienta esencial para la aplicación de esta técnica deriva del empleo de las células embrionarias troncales (células ES), aisladas a partir de embriones murinos en las etapas iniciales de su desarrollo. Las células ES pueden ser manipuladas genéticamente *in vitro* con relativa facilidad, por lo que el primer paso del proceso de generación de un ratón *knockout* consiste en la eliminación de una de las dos copias de dicho gen en las células ES. Para ello, se elabora un vector director que contiene secuencias de ADN idénticas a las del gen que se desea eliminar, pero con una parte esencial reemplazada por un marcador de selección, general-

mente un gen de resistencia a un antibiótico. Cuando este vector es introducido en las células ES, en algunas de ellas se produce la recombinación homóloga dando lugar al reemplazamiento de una porción del gen diana por el marcador de selección. Las células en las que haya acontecido este fenómeno generarán clones que podrán ser seleccionados en presencia del antibiótico correspondiente, cultivados *in vitro* y utilizados para microinyectar blastocistos y obtener los esperados ratones quiméricos. Si las células microinyectadas se incorporan a la línea germinal, la mitad de los descendientes del animal quimérico heredarán un cromosoma con el gen alterado. Posteriormente, mediante cruzamientos de estos animales heterocigotos será posible obtener animales homocigotos, con las dos copias mutadas [108, 109].

Siguiendo estas aproximaciones, sin duda complejas pero también extraordinariamente informativas, numerosos laboratorios han desarrollado una serie de modelos animales para el estudio funcional de proteasas en condiciones normales y patológicas, incluyendo el cáncer. Estos modelos pueden clasificarse en dos tipos: ratones transgénicos que sobreexpresan proteasas humanas en tejidos concretos, y ratones *knockout* deficientes en una cierta proteasa de potencial relevancia en el cáncer. Con el primer tipo de modelos murinos, se pretende examinar la hipótesis de que la sobreexpresión de una determinada proteasa puede ser suficiente para facilitar la progresión tumoral. En nuestro laboratorio, hemos generado algunas estirpes de animales transgénicos que nos han permitido corroborar estas hipótesis. Así, la sobreexpresión de colagenasa-3 humana en la glándula mamaria de ratones transgénicos favorece de manera abrumadora el crecimiento de tumores inducidos en dichos ratones mediante carcinógenos químicos [94]. Estos resultados, junto con los obtenidos en experimentos análogos realizados con otras proteasas por diversos grupos, representan un avance importante en el conocimiento de los mecanismos moleculares asociados al desarrollo de los procesos tumorales, pero además proporcionan un modelo válido para el ensayo de fármacos capaces de bloquear

la actividad de dichas proteasas, fármacos que puedan ser trasladados posteriormente a la práctica clínica [26].

Por otra parte, los experimentos basados en la generación de modelos murinos deficientes en proteasas específicas pretenden afrontar el problema desde una perspectiva opuesta y examinar la hipótesis de que la ausencia de una determinada proteasa puede ser suficiente para dificultar la progresión del cáncer. Hasta el momento, los resultados de los trabajos llevados a cabo en este sentido por distintos grupos han permitido concluir que ratones deficientes en proteasas como la estromalisina-1, la gelatinasa A o la MMP-19 muestran una menor susceptibilidad al desarrollo o progresión tumorales [110-112]. Sin embargo, en algunas ocasiones, la deficiencia en una única proteasa puede llegar a generar anomalías importantes que impiden la realización de experimentos de susceptibilidad al cáncer. Este es el caso de los ratones deficientes en la metaloproteasa FACE-1/*Zmpste24*, creados recientemente en nuestro laboratorio [113]. Nuestro interés en esta proteasa surgió tras una serie de estudios preliminares que sugerían su implicación en la activación de oncoproteínas de la familia Ras. Para nuestra sorpresa, observamos que la inactivación del gen de esta proteasa provocaba un notable retraso en el crecimiento de los ratones mutantes, seguido de un llamativo envejecimiento acelerado que, finalmente, conducía a la muerte prematura de dichos ratones. El análisis histopatológico de los animales mutantes reveló numerosas alteraciones incluyendo distrofia muscular, lipodistrofia y cardiomiopatía dilatada. Estas anomalías son semejantes a las padecidas por los ratones deficientes en el gen LMNA —que codifica las laminas nucleares A y C—, y a las que sufren los pacientes con laminopatías [114, 115]. Ello nos llevó a postular que los ratones carentes de FACE-1 podían ser incapaces de producir lamina A madura. Efectivamente, los experimentos llevados a cabo para evaluar esta hipótesis nos han permitido demostrar que las células de dichos ratones mutantes acumulan prelamina A, generando una serie de aberraciones nucleares que, finalmente, desencadenan las múltiples manifestaciones patológicas observadas [113] (Fig. 11).

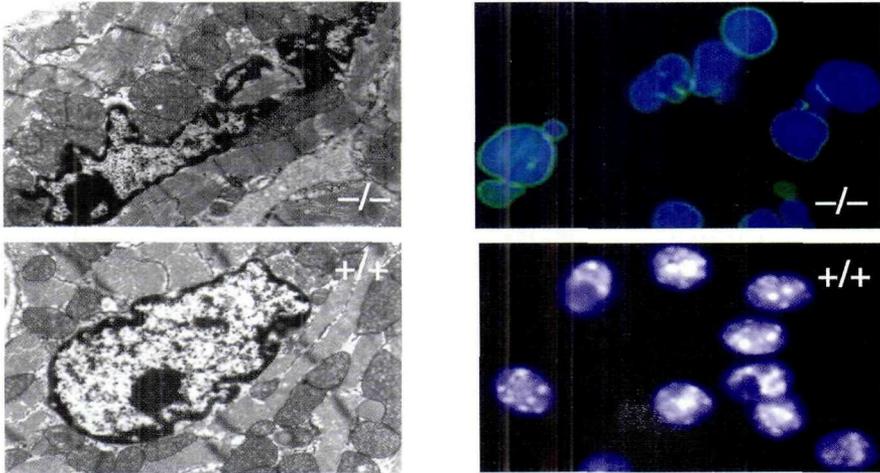
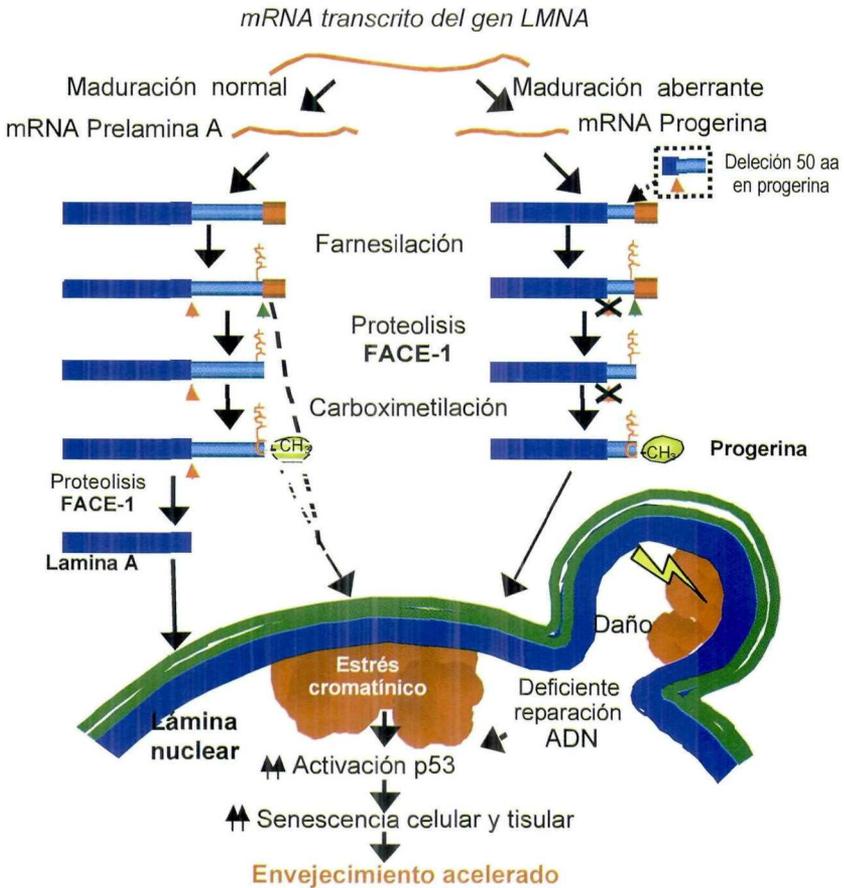


FIGURA 11. **Anomalías nucleares en células de ratones deficientes en la proteasa FACE-1.** Los paneles izquierdos muestran micrografías electrónicas de miocardiocitos de ratones normales (+/+) y carentes de FACE-1 (-/-); a la derecha se muestra el análisis mediante inmunofluorescencia de fibroblastos de ambos tipos de ratones.

El trabajo con estos ratones deficientes en la metaloproteasa FACE-1 ha adquirido una dimensión adicional tras el hallazgo por varios grupos de que mutaciones en el gen de esta proteasa o en el de su sustrato lamina A, causan diversos síndromes de envejecimiento prematuro en humanos [34, 35, 99, 100, 103]. Curiosamente, estudios muy recientes con los ratones FACE-1<sup>-/-</sup> han revelado que el extraordinario envejecimiento acelerado que muestran estos animales se asocia a una marcada inestabilidad genómica y a la activación crónica de rutas de supresión tumoral, como la mediada por p53 [116-118] (Fig. 12). Estos estudios avalan el concepto de *pleiotropía antagónica* entre envejecimiento y supresión tumoral, concepto formulado inicialmente para la proteína p53 y extendido recientemente a la función de otros supresores tumorales como p16 [119-124]. Además, hemos demostrado que el dramático fenotipo de envejecimiento prematuro de los ratones deficientes en FACE-1 puede rescatarse mediante estrategias de manipulación genética dirigidas a disminuir los niveles de prelamina A acumulada en sus células. Estos resultados han abierto por primera vez la posibilidad de instaurar estrategias terapéu-

ticas similares, en pacientes afectados por estas devastadoras enfermedades [117, 125-128]. Finalmente, el reciente hallazgo de que las células normales también poseen la capacidad de producir la forma anómala de prelamina A denominada progerina, ha reforzado la idea de que los síndromes de envejecimiento acelerado pueden proporcionar claves importantes acerca de los mecanismos moleculares que subyacen al envejecimiento normal [129].



**FIGURA 12. Mecanismos de envejecimiento acelerado asociados a deficiencias en el sistema lamina A/FACE-1.** La lamina A se sintetiza como un precursor que sufre sucesivas modificaciones post-traduccionales incluyendo reacciones de farnesilación y proteólisis mediada por FACE-1. Las células con mutaciones en el sustrato o en la proteasa acumulan progerina u otras formas farnesiladas inmaduras de prelamina A que causan alteraciones en la envuelta nuclear. Finalmente, estas alteraciones activan rutas de señalización que conducen al envejecimiento acelerado.

Por otra parte, y también en relación con la generación de modelos animales de proteasas asociadas al cáncer, estudios recientes de nuestro laboratorio con ratones deficientes en metaloproteasas de matriz extracelular, nos han permitido demostrar que en algunas situaciones y de manera sorprendente, las proteasas desempeñan funciones protectoras frente a la progresión del cáncer [130]. Este es el caso de la colagenasa-2 o MMP-8, que ejerce una potente acción antitumoral basada en su capacidad de regular la respuesta inflamatoria inducida por carcinógenos químicos u otros estímulos [131-133]. Estos resultados pueden contribuir a explicar la baja eficacia de los primeros inhibidores de metaloproteasas utilizados para tratar pacientes con cáncer y obligan a la definición precisa del degradoma tumoral: el conjunto de proteasas producidas por un tumor concreto en un momento específico de su desarrollo [26].

En resumen, la generación de modelos animales nos ha permitido explorar nuevos aspectos de enfermedades complejas como el cáncer, y en ocasiones nos ha facilitado el descubrimiento de aspectos insospechados de las mismas, incluyendo conexiones moleculares con otros procesos como el envejecimiento o el hallazgo de nuevos mecanismos endógenos de protección antitumoral. Además, los trabajos dirigidos a «humanizar» estos modelos animales de manera que el desarrollo de enfermedades en los mismos se asemeje lo máximo posible a lo que acontece en nuestro organismo [134, 135], multiplicarán sus aplicaciones al estudio de la relevancia funcional y patológica de las proteasas. Finalmente, es posible que estos nuevos modelos animales «humanizados, condicionales e inducibles» que anuncia el futuro, contribuyan a definir con mayor precisión el valor de los enzimas proteolíticos como dianas terapéuticas en el cáncer o en otras enfermedades.

## ANTE MÍ, EL INFINITO...

En los últimos años, la labor experimental realizada por numerosos grupos de investigación ha contribuido a enri-

quecer notablemente nuestra visión del mundo proteolítico y sus implicaciones en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Así, hemos constatado que tras una reacción química común, la hidrólisis de un enlace peptídico, se oculta un panorama en el que la complejidad y la diversidad son las notas dominantes. Las exploraciones genómicas nos han proporcionado una primera idea acerca de las dimensiones reales de esta complejidad, al mostrarnos que nuestro degradoma puede ofrecer más de 500 soluciones moleculares distintas para resolver el problema de la proteólisis. Después, hemos dirigido nuestra atención hacia los genomas y degradomas de otros organismos para compararlos con los nuestros y tratar de extraer algunas lecciones acerca de las funciones que se han ido adquiriendo, modificando o incluso perdiendo, a medida que nuestra especie fue ascendiendo peldaños en la escala evolutiva.

Curiosamente, la comparación de los enormes genomas de los mamíferos bajo un minimalista prisma proteolítico, nos ha proporcionado claves inesperadas acerca de algunos mecanismos moleculares generales implicados en la evolución humana. En efecto, el hecho de que los degradomas de ratas y ratones sean considerablemente más complejos que el humano, junto con los numerosos procesos de pseudogenización observados en genes humanos de proteasas con funciones inmunológicas o reproductivas, avalan la idea de que el concepto de «*menos es más*» —formulado por el arquitecto Mies van der Rohe— también puede tener sentido en Biología. Además, la comparación de nuestro degradoma con el del chimpancé nos ha permitido corroborar y extender alguno de estos hallazgos referidos a la evolución diferencial de genes de proteasas defensivas y reproductivas. Así, en el futuro, estas comparaciones degradómicas tal vez nos ayuden a progresar en nuestro afán de responder, al menos en términos moleculares, a una pregunta esencial: ¿qué nos hace humanos?

La difícil navegación a través de la complejidad proteolítica se ha visto facilitada por el desarrollo de diversas técnicas y aproximaciones experimentales que nos han ofreci-

do nuevas y fascinantes perspectivas. Entre todas ellas, la generación de modelos animales de ganancia o pérdida de función proteolítica nos ha proporcionado ideas innovadoras acerca de las funciones que desempeñan las proteasas en múltiples procesos biológicos, desde el desarrollo embrionario hasta la muerte celular por apoptosis. La labor experimental en el campo de la proteólisis también ha contribuido decisivamente a modificar nuestra percepción acerca de la implicación de las proteasas en las enfermedades humanas y fundamentalmente en el cáncer. En efecto, tras la confirmación de que la *bilis negra* descrita por Hipócrates y Galeno, estaría constituida mayoritariamente por proteasas que se concentran en las zonas de invasividad tumoral, nuestra visión del problema se ha ampliado rápidamente. Así, hemos pasado de considerar a las proteasas como ejecutoras de acciones destructoras inespecíficas, a definir su participación en múltiples procesos específicos y sutilmente regulados dentro de la progresión del cáncer, desde el control de la proliferación celular hasta el desarrollo de la angiogénesis tumoral.

En cualquier caso, no podemos olvidar que tras esta información biológica básica sobre las estructuras y funciones de las proteasas, subyace el deseo de encontrar respuestas clínicas para los procesos patológicos que cursan con destrucción tisular, incluyendo el cáncer. La resolución de la estructura tridimensional de las distintas proteasas asociadas al cáncer o a otras patologías, el diseño de *chips* genéticos que permitan el análisis global de los cambios en la actividad proteolítica durante la progresión de estas enfermedades, la elucidación de los mecanismos responsables de su producción descontrolada en dichos procesos patológicos, y la creación de animales transgénicos en los que se puedan examinar los efectos de nuevos fármacos antitumorales, constituyen aspectos que dirigirán los estudios del futuro próximo en este campo. En último término, estos trabajos podrían conducir al diseño de inhibidores específicos que contribuyan a afrontar con mayores esperanzas 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 consecuencias tantas veces irreparables para los pacientes con cáncer.

Afortunadamente, el progreso también ha sido notable en el estudio de las enfermedades de proteólisis causadas por deficiencias en la función de proteasas, y no por un exceso en su actividad como suele acontecer en el cáncer. Así, en muchos casos se han identificado los genes responsables de dichas patologías y se han definido los mecanismos moleculares subyacentes a su desarrollo. En algunas situaciones —incluyendo diversas enfermedades de la coagulación sanguínea— esta información ya se ha trasladado a la práctica clínica a través del empleo de proteasas recombinantes que sustituyan al enzima mutante o ausente [136]. Por otra parte, en los casos de algunas enfermedades de proteólisis caracterizadas más recientemente, los estudios moleculares y mecanísticos han abierto por primera vez la posibilidad de proponer aproximaciones terapéuticas para patologías hasta el momento incurables, entre las que podemos mencionar los dramáticos síndromes de envejecimiento prematuro causados por alteraciones en el sistema FACE-1/lamina A [117, 125, 126].

Sin embargo, pese a estos importantes avances en el estudio de los sistemas proteolíticos, es evidente que nuestro conocimiento es aún muy limitado en múltiples aspectos. En primer lugar, tenemos que asumir que todavía no se han identificado todos los componentes de dichos sistemas, con lo cual las dimensiones del espacio proteolítico deberán ampliarse para acomodar a aquellas hipotéticas proteasas que por lo inusual de sus estructuras y mecanismos catalíticos permanecen ocultas a las miradas informática y humana. Además, en muchos casos no se han podido definir las funciones biológicas y los sustratos *in vivo* de una serie de proteasas cuya existencia se ha predicho mediante experimentos *in silico* y se ha corroborado a través de aproximaciones *in vitro*. En el estudio de estas proteasas funcionalmente huérfanas debemos estar preparados para reconocer lo inesperado y aceptar lo paradójico, como el reciente y sorprendente hallazgo de proteasas de matriz extracelular

con funciones protectoras frente a la progresión tumoral. En esta búsqueda de la función desconocida, sin duda encontrarán su aplicación al campo de las proteasas, técnicas de gran potencial como las de interferencia por ARN, desarrolladas originalmente por A. Fire y C. Mello, y llamadas a proporcionar un nuevo impulso a la experimentación en Biología Molecular.

Asimismo, necesitaremos introducir aproximaciones genómicas más eficaces para determinar las bases moleculares del creciente número de enfermedades genéticas humanas relacionadas con proteasas e identificar los polimorfismos capaces de conferir susceptibilidad o resistencia a enfermedades complejas. Los recientes hallazgos de variantes polimórficas en las metaloproteasas ADAM-33 y ACE (*angiotensin-converting enzyme*), asociadas a un incremento significativo del riesgo de padecer asma o diversas enfermedades renales, neurológicas y cardiovasculares, marcan el camino a seguir en este terreno [137, 138].

Además, será preciso analizar los mecanismos que regulan el funcionamiento de los sistemas proteolíticos y sus interacciones con otras redes celulares de información, comunicación y señalización. Estos estudios permitirán acercar la investigación en proteasas a la nueva Biología de Sistemas, que reconoce que un organismo es mucho más que una gigantesca secuencia de nucleótidos o una amplia colección de genes, y aspira a entender de manera global la forma en la que las moléculas biológicas interactúan entre sí para ejecutar con absoluta precisión y eficacia los miles de reacciones bioquímicas que permiten cada instante de vida en cada organismo [139, 140].

Paralelamente, resultará prioritario el desarrollo de nuevas tecnologías de análisis global de funciones proteolíticas y la introducción de estrategias de visualización *in vivo* de actividades proteolíticas que faciliten el estudio individual de proteasas naturalmente inmersas en la extraordinaria complejidad molecular de las muestras biológicas [141, 142]. Por último, la resolución de la estructura tridimensio-

nal de las proteasas de interés terapéutico a través de nuevos procedimientos de difracción de rayos X o mediante la utilización de métodos de modelado molecular o predicciones *ab-initio*, proporcionará recursos importantes para el diseño racional de una nueva generación de inhibidores más selectivos y eficaces que los disponibles en la actualidad [143].

La adecuada combinación de estas aproximaciones tal vez ofrezca nuevas respuestas a las múltiples cuestiones en torno a un grupo de proteínas que influyen decisivamente en la supervivencia y muerte celular de todos los organismos: los que derivan de aquella primitiva célula que hace más de tres mil millones de años, en algún lugar del planeta que hoy nos acoge, experimentó con éxito procesos de replicación, división y evolución, e inició la aventura bioquímica de la vida.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] WATSON, J.D. y CRICK, F.H., Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738 (1953).
- [2] LANDER, E.S., LINTON, L.M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M.C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J. y cols. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921 (2001).
- [3] VENTER, J.C., ADAMS, M.D., MYERS, E.W., LI, P.W., MURAL, R.J., SUTTON, G.G., SMITH, H.O., YANDELL, M., EVANS, C.A., HOLT, R.A., GOCAYNE, J.D., AMANATIDES, P., BALLEW, R.M., HUSON, D.H., WORTMAN, J.R. y cols. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351 (2001).
- [4] FRANCO, L., El rostro humano de la Ciencia: reflexiones en torno a la regulación biológica., en *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* (2003).
- [5] JACOB, F. y MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356 (1961).
- [6] EHRMANN, M. y CLAUSEN, T. Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu. Rev. Genet.* 38: 709-724 (2004).
- [7] CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 79-87 (2005).
- [8] TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Rev. Drug Discov.* 5: 785-799 (2006).
- [9] URÍA, J.A. y LÓPEZ-OTÍN, C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res.* 60: 4745-4751 (2000).
- [10] GEIER, E., PFEIFER, G., WILM, M., LUCCHIARI-HARTZ, M., BAUMEISTER, W., EICHMANN, K. y NIEDERMANN, G. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 283: 978-981 (1999).
- [11] PICKART, C.M. y COHEN, R.E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 177-187 (2004).

- [12] LÓPEZ-OTÍN, C. Y OVERALL, C.M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 509-519 (2002).
- [13] PUENTE, X.S., SÁNCHEZ, L.M., OVERALL, C.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Rev. Genet.* 4: 544-558 (2003).
- [14] MARINO, G., URÍA, J.A., PUENTE, X.S., QUESADA, V., BORDALLO, J. Y LOPEZ-OTIN, C. Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *J Biol Chem* 278: 3671-3678 (2003).
- [15] MARIÑO, G. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 1439-1454 (2004).
- [16] DÍAZ-PERALES, A., QUESADA, V., PEINADO, J.R., UGALDE, A.P., ALVAREZ, J., SUÁREZ, M.F., GOMIS-RÜTH, F.X. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Identification and characterization of human archaemetzincin-1 and -2, two novel members of a family of metalloproteases widely distributed in Archaea. *J. Biol. Chem.* 280: 30367-30375 (2005).
- [17] KATAOKA, Y., TAKADA, K., OYAMA, H., TSUNEMI, M., JAMES, M.N. Y ODA, K. Catalytic residues and substrate specificity of scytalidoglutamic peptidase, the first member of the eqolisin in family (G1) of peptidases. *FEBS Lett.* 579: 2991-2994 (2005).
- [18] WATERSTON, R.H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J., ABRIL, J.F., AGARWAL, P., AGARWALA, R., AINSCOUGH, R., ALEXANDERSSON, M., AN, P., ANTONARAKIS, S.E., ATTWOOD, J., BAERTSCH, R., BAILEY, J., BARLOW, K. Y COLS. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562 (2002).
- [19] GIBBS, R.A., WEINSTOCK, G.M., METZKER, M.L., MUZNY, D.M., SODERGREN, E.J., SCHERER, S., SCOTT, G., STEFFEN, D., WORLEY, K.C., BURCH, P.E., OKWUONU, G., HINES, S., LEWIS, L., DERAMO, C., DELGADO, O. Y COLS. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493-521 (2004).
- [20] THE CHIMPANZEE SEQUENCE AND ANALYSIS CONSORTIUM. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 437: 69-87 (2005).
- [21] PUENTE, X.S. Y LÓPEZ-OTÍN, C. A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res.* 14: 609-622 (2004).

- [22] PUENTE, X.S., SÁNCHEZ, L.M., GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A., VELASCO, G. Y LÓPEZ-OTÍN, C. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 331-334 (2005).
- [23] PUENTE, X.S., GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A., ORDÓÑEZ, G.R., HILLIER, L.W. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Comparative genomic analysis of human and chimpanzee proteases. *Genomics* 86: 638-647. (2005).
- [24] VELASCO, G., PENDÁS, A.M., FUEYO, A., KNAUPER, V., MURPHY, G. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J. Biol. Chem.* 274: 4570-4576 (1999).
- [25] LLAMAZARES, M., CAL, S., QUESADA, V. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain. *J. Biol. Chem.* 278: 13382-13389 (2003).
- [26] OVERALL, C.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature Rev. Cancer* 2: 657-672 (2002).
- [27] PFUTZER, R., MYERS, E., APPLEBAUM-SHAPIRO, S., FINCH, R., ELLIS, I., NEOPTOLEMOS, J., KANT, J.A. Y WHITCOMB, D.C. Novel cationic trypsinogen (PRSS1) N29T and R122C mutations cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut* 50: 271-272 (2002).
- [28] BIGNELL, G.R., WARREN, W., SEAL, S., TAKAHASHI, M., RAPLEY, E., BARFOOT, R., GREEN, H., BROWN, C., BIGGS, P.J., LAKHANI, S.R., JONES, C., HANSEN, J., BLAIR, E., HOFMANN, B., SIEBERT, R. Y COLS. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nature Genet.* 25: 160-165 (2000).
- [29] WANG, J., ZHENG, L., LOBITO, A., CHAN, F.K., DALE, J., SNELLER, M., YAO, X., PUCK, J.M., STRAUS, S.E. Y LENARDO, M.J. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98: 47-58 (1999).
- [30] MARJAUX, E., HARTMANN, D. Y DE STROOPER, B. Presenilins in memory, Alzheimer's disease, and therapy. *Neuron* 42: 189-192 (2004).

- [31] KENNEDY, A.M., INADA, M., KRANE, S.M., CHRISTIE, P.T., HARDING, B., LÓPEZ-OTÍN, C., SÁNCHEZ, L.M., PANNETT, A.A., DEARLOVE, A., HARTLEY, C., BYRNE, M.H., REED, A.A., NESBIT, M.A., WHYTE, M.P. Y THAKKER, R.V. MMP13 mutation causes spondyloepimetaphyseal dysplasia, Missouri type (SEMD(MO)). *J. Clin. Invest.* 115: 2832-2842 (2005).
- [32] LOMAS, D.A., BELORGEY, D., MALLYA, M., MIRANDA, E., KINGHORN, K.J., SHARP, L.K., PHILLIPS, R.L., PAGE, R., ROBERTSON, A.S. Y CROWTHER, D.C. Molecular mousetraps and the serpinopathies. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 321-330 (2005).
- [33] GANDY, S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 115: 1121-1129 (2005).
- [34] DE SANDRE-GIOVANNOLI, A., BERNARD, R., CAU, P., NAVARRO, C., AMIEL, J., BOCCACCIO, I., LYONNET, S., STEWART, C.L., MUNNICH, A., LE MERRER, M. Y LEVY, N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300: 2055 (2003).
- [35] ERIKSSON, M., BROWN, W.T., GORDON, L.B., GLYNN, M.W., SINGER, J., SCOTT, L., ERDOS, M.R., ROBBINS, C.M., MOSES, T.Y., BERGLUND, P., DUTRA, A., PAK, E., DURKIN, S., CSOKA, A.B., BOEHNKE, M. Y COLS. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423: 293-298 (2003).
- [36] GRAW, J., BRACKMANN, H.H., OLDENBURG, J., SCHNEPPENHEIM, R., SPANNAGL, M. Y SCHWAAB, R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nature Rev. Genet.* 6: 488-501 (2005).
- [37] JIMÉNEZ, M.J., BALBÍN, M., LÓPEZ, J.M., ÁLVAREZ, J., KOMORI, T. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4431-4442 (1999).
- [38] APPENZELLER-HERZOG, C., NYFELER, B., BURKHARD, P., SANTAMARÍA, I., LÓPEZ-OTÍN, C. Y HAURI, H.P. Carbohydrate- and conformation-dependent cargo capture for ER-exit. *Mol. Biol. Cell* 16: 1258-1267 (2005).
- [39] DEPINHO, R.A. The age of cancer. *Nature* 408: 248-254 (2000).
- [40] ROTHSCHILD, B.M., WITZKE, B.J. Y HERSHKOVITZ, I. Metastatic cancer in the Jurassic. *Lancet* 354: 398 (1999).
- [41] HANAHAN, D. Y WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70 (2000).

- [42] STEEG, P.S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Med.* 12: 895-904 (2006).
- [43] LUDWIG, T. Local proteolytic activity in tumor cell invasion and metastasis. *Bioessays* 27: 1181-1191 (2005).
- [44] FREIJE, J.M., DÍEZ-ITZA, I., BALBÍN, M., SÁNCHEZ, L.M., BLASCO, R., TOLIVIA, J. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J. Biol. Chem.* 269: 16766-16773 (1994).
- [45] VELASCO, G., FERRANDO, A.A., PUENTE, X.S., SÁNCHEZ, L.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *J. Biol. Chem.* 269: 27136-27142 (1994).
- [46] PUENTE, X.S., PENDÁS, A.M., LLANO, E., VELASCO, G. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res.* 56: 944-949 (1996).
- [47] FERRANDO, A.A., VELASCO, G., CAMPO, E. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Cloning and expression analysis of human bleomycin hydrolase, a cysteine proteinase involved in chemotherapy resistance. *Cancer Res.* 56: 1746-1750 (1996).
- [48] PENDÁS, A.M., KNAUPER, V., PUENTE, X.S., LLANO, E., MATTEI, M.G., APTE, S., MURPHY, G. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 272: 4281-4286 (1997).
- [49] LLANO, E., PENDÁS, A.M., KNAUPER, V., SORSA, T., SALO, T., SALIDO, E., MURPHY, G., SIMMER, J.P., BARTLETT, J.D. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry* 36: 15101-15108 (1997).
- [50] SANTAMARÍA, I., VELASCO, G., CAZORLA, M., FUEYO, A., CAMPO, E. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 58: 1624-1630 (1998).
- [51] SANTAMARÍA, I., VELASCO, G., PENDÁS, A.M., FUEYO, A. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J. Biol. Chem.* 273: 16816-16823 (1998).

- [52] LLANO, E., PENDÁS, A.M., FREIJE, J.P., NAKANO, A., KNAUPER, V., MURPHY, G. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res.* 59: 2570-2576 (1999).
- [53] SANTAMARÍA, I., VELASCO, G., PENDÁS, A.M., PAZ, A. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Molecular cloning and structural and functional characterization of human cathepsin F, a new cysteine proteinase of the papain family with a long propeptide domain. *J. Biol. Chem.* 274: 13800-13809 (1999).
- [54] CAL, S., FREIJE, J.M., LÓPEZ, J.M., TAKADA, Y. Y LÓPEZ-OTÍN, C. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 11: 1457-1469 (2000).
- [55] VELASCO, G., CAL, S., MERLOS-SUÁREZ, A., FERRANDO, A.A., ÁLVAREZ, S., NAKANO, A., ARRIBAS, J. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res.* 60: 877-882 (2000).
- [56] FREIJE, J.M., BLAY, P., PENDÁS, A.M., CADIÑANOS, J., CRESPO, P. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Identification and chromosomal location of two human genes encoding enzymes potentially involved in proteolytic maturation of farnesylated proteins. *Genomics* 58: 270-280 (1999).
- [57] CAL, S., ARGÜELLES, J.M., FERNÁNDEZ, P.L. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Identification, characterization, and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats. *J. Biol. Chem.* 276: 17932-17940 (2001).
- [58] CAL, S., OBAYA, A.J., LLAMAZARES, M., GARABAYA, C., QUESADA, V. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 283: 49-62 (2002).
- [59] VELASCO, G., CAL, S., QUESADA, V., SÁNCHEZ, L.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 277: 37637-37646 (2002).
- [60] DÍAZ-PERALES, A., QUESADA, V., SÁNCHEZ, L.M., UGALDE, A.P., SUÁREZ, M.F., FUEYO, A. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Identification of

- human aminopeptidase O, a novel metalloprotease with structural similarity to aminopeptidase B and leukotriene A4 hydrolase. *J. Biol. Chem.* 280: 14310-14317 (2005).
- [61] QUESADA, V., DÍAZ-PERALES, A., GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A., GARABAYA, C., CAL, S. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314: 54-62 (2004).
- [62] QUESADA, V., SÁNCHEZ, L.M., ÁLVAREZ, J. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Identification and characterization of human and mouse ovastacin: a novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish. *J. Biol. Chem.* 279: 26627-26634 (2004).
- [63] CAL, S., QUESADA, V., GARABAYA, C. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Polyserase-I, a human polyprotease with the ability to generate independent serine protease domains from a single translation product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 9185-9190 (2003).
- [64] CAL, S., QUESADA, V., LLAMAZARES, M., DÍAZ-PERALES, A., GARABAYA, C. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Human polyserase-2, a novel enzyme with three tandem serine protease domains in a single polypeptide chain. *J. Biol. Chem.* 280: 1953-1961 (2005).
- [65] CAL, S., PEINADO, J.R., LLAMAZARES, M., QUESADA, V., MONCADA-PAZOS, A., GARABAYA, C. Y LOPEZ-OTIN, C. Identification and characterization of human polyserase-3, a novel protein with tandem serine-protease domains in the same polypeptide chain. *BMC Biochem.* 7: 9 (2006).
- [66] URÍA, J.A., FERRANDO, A.A., VELASCO, G., FREIJE, J.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *Cancer Res.* 54: 2091-2094 (1994).
- [67] FREIJE, J.P., ABRAHAMSON, M., OLAFSSON, I., VELASCO, G., GRUBB, A. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Structure and expression of the gene encoding cystatin D, a novel human cysteine proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 266: 20538-20543 (1991).
- [68] LÓPEZ-OTÍN, C. Y DIAMANDIS, E.P. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. *Endocr. Rev.* 19: 365-396 (1998).
- [69] BALBÍN, M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Hormonal regulation of the human pepsinogen C gene in breast cancer cells. Identification of a cis-acting element mediating its induction by androgens, glucocorticoids, and progesterone. *J. Biol. Chem.* 271: 15175-15181 (1996).

- [70] VIZOSO, F., SÁNCHEZ, L.M., DÍEZ-ITZA, I., MERINO, A.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Pepsinogen C is a new prognostic marker in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 13: 54-61 (1995).
- [71] URÍA, J.A., STAHL-BACKDAHL, M., SEIKI, M., FUEYO, A. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res.* 57: 4882-4888 (1997).
- [72] URÍA, J.A., VELASCO, G., SANTAMARÍA, I., FERRANDO, A. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Prostate-specific membrane antigen in breast carcinoma. *Lancet* 349: 1601 (1997).
- [73] URÍA, J.A., JIMÉNEZ, M.G., BALBÍN, M., FREIJE, J.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 273: 9769-9777 (1998).
- [74] CAZORLA, M., HERNÁNDEZ, L., NADAL, A., BALBÍN, M., LÓPEZ, J.M., VIZOSO, F., FERNÁNDEZ, P.L., IWATA, K., CARDESA, A., LÓPEZ-OTÍN, C. Y CAMPO, E. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J. Pathol.* 186: 144-150 (1998).
- [75] URÍA, J.A., BALBÍN, M., LÓPEZ, J.M., ÁLVAREZ, J., VIZOSO, F., TAKIGAWA, M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *Am. J. Pathol.* 153: 91-101 (1998).
- [76] JOHANSSON, N., VAALAMO, M., GRENMAN, S., HIETANEN, S., KLEMI, P., SAARIALHO-KERE, U. Y KAHARI, V.M. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* 154: 469-480 (1999).
- [77] BARMINA, O.Y., WALLING, H.W., FIACCO, G.J., FREIJE, J.M., LÓPEZ-OTÍN, C., JEFFREY, J.J. Y PARTRIDGE, N.C. Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. *J. Biol. Chem.* 274: 30087-30093 (1999).
- [78] RAVANTI, L., HEINO, J., LÓPEZ-OTÍN, C. Y KAHARI, V.M. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 2446-2455 (1999).
- [79] JOHANSSON, N., ALA-AHO, R., UITTO, V., GRENMAN, R., FUSENIG, N.E., LÓPEZ-OTÍN, C. Y KAHARI, V.M. Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed

- keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Sci.* 113: 227-235 (2000).
- [80] ALA-AHO, R., JOHANSSON, N., GRENMAN, R., FUSENIG, N.E., LÓPEZ-OTÍN, C. Y KAHARI, V.M. Inhibition of collagenase-3 (MMP-13) expression in transformed human keratinocytes by interferon-gamma is associated with activation of extracellular signal-regulated kinase-1,2 and STAT1. *Oncogene* 19: 248-257 (2000).
- [81] ZARAGOZA, C., SORIA, E., LÓPEZ, E., BROWNING, D., BALBÍN, M., LÓPEZ-OTÍN, C. Y LAMAS, S. Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 62: 927-935 (2002).
- [82] SABEH, F., OTA, I., HOLMBECK, K., BIRKEDAL-HANSEN, H., SOLOWAY, P., BALBÍN, M., LÓPEZ-OTÍN, C., SHAPIRO, S., INADA, M., KRANE, S., ALLEN, E., CHUNG, D. Y WEISS, S.J. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J. Cell Biol.* 167: 769-781 (2004).
- [83] JIMÉNEZ, M.J., BALBÍN, M., ALVAREZ, J., KOMORI, T., BIANCO, P., HOLMBECK, K., BIRKEDAL-HANSEN, H., LÓPEZ, J.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. A regulatory cascade involving retinoic acid, Cbfa1, and matrix metalloproteinases is coupled to the development of a process of perichondrial invasion and osteogenic differentiation during bone formation. *J. Cell Biol.* 155: 1333-1344 (2001).
- [84] UITTO, V.J., AIROLA, K., VAALAMO, M., JOHANSSON, N., PUTNINS, E.E., FIRTH, J.D., SALONEN, J., LÓPEZ-OTÍN, C., SAARIALHO-KERE, U. Y KAHARI, V.M. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am. J. Pathol.* 152: 1489-1499 (1998).
- [85] IMAI, S., KONTTINEN, Y.T., JUMPPANEN, M., LINDY, O., CEPONIS, A., KEMPPINEN, P., SORSA, T., SANTAVIRTA, S., XU, J.W. Y LÓPEZ-OTÍN, C. High levels of expression of collagenase-3 (MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction. *J. Bone Joint Surg. Br.* 80: 701-710 (1998).
- [86] KONTTINEN, Y.T., AINOLA, M., VALLEALA, H., MA, J., IDA, H., MANDELIN, J., KINNE, R.W., SANTAVIRTA, S., SORSA, T., LÓPEZ-OTÍN, C. Y TAKAGI, M. Analysis of 16 different matrix metalloproteinase-

ses (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58: 691-697 (1999).

- [87] KONTTINEN, Y.T., SALO, T., HANEMAAIJER, R., VALLEALA, H., SORSA, T., SUTINEN, M., CEPONIS, A., XU, J.W., SANTAVIRTA, S., TERONEN, O. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Collagenase-3 (MMP-13) and its activators in rheumatoid arthritis: localization in the pannus-hard tissue junction and inhibition by alendronate. *Matrix Biol.* 18: 401-412 (1999).
- [88] LINDY, O., KONTTINEN, Y.T., SORSA, T., DING, Y., SANTAVIRTA, S., CEPONIS, A. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 40: 1391-1399 (1997).
- [89] CHABOTTAUX, V., SOUNNI, N.E., PENNINGTON, C.J., ENGLISH, W.R., VAN DEN BRULE, F., BLACHER, S., GILLES, C., MUNAUT, C., MAQUOI, E., LÓPEZ-OTÍN, C., MURPHY, G., EDWARDS, D.R., FOIDART, J.M. Y NOEL, A. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res.* 66: 5165-5172 (2006).
- [90] PENDÁS, A.M., URÍA, J.A., JIMÉNEZ, M.G., BALBÍN, M., FREIJE, J.P. Y LÓPEZ-OTÍN, C. An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clin. Chim. Acta* 291: 137-155 (2000).
- [91] INADA, M., WANG, Y., BYRNE, M.H., RAHMAN, M.U., MIYAUURA, C., LÓPEZ-OTÍN, C. Y KRANE, S.M. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 17192-17197 (2004).
- [92] HU, Y., XIANG, J.S., DIGRANDI, M.J., DU, X., IPEK, M., LAAKSO, L.M., LI, J., LI, W., RUSH, T.S., SCHMID, J., SKOTNICKI, J.S., TAM, S., THOMASON, J.R., WANG, Q. Y LEVIN, J.I. Potent, selective, and orally bioavailable matrix metalloproteinase-13 inhibitors for the treatment of osteoarthritis. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 6629-6644 (2005).
- [93] WERNICKE, D., SEYFERT, C., GROMNICA-IHLE, E. Y STIEHL, P. The expression of collagenase 3 (MMP-13) mRNA in the synovial tissue is associated with histopathologic type II synovitis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 39: 307-313 (2006).
- [94] FOLGUERAS, A.R., PENDÁS, A.M., SÁNCHEZ, L.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to

- improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 411-424 (2004).
- [95] NEUHOLD, L.A., KILLAR, L., ZHAO, W., SUNG, M.L., WARNER, L., KULIK, J., TURNER, J., WU, W., BILLINGHURST, C., MEIJERS, T., POOLE, A.R., BABIJ, P. Y DEGENNARO, L.J. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J. Clin. Invest.* 107: 35-44 (2001).
- [96] KNAUPER, V., LÓPEZ-OTÍN, C., SMITH, B., KNIGHT, G. Y MURPHY, G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J. Biol. Chem.* 271: 1544-1550 (1996).
- [97] KNAUPER, V., COWELL, S., SMITH, B., LÓPEZ-OTÍN, C., O'SHEA, M., MORRIS, H., ZARDI, L. Y MURPHY, G. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J. Biol. Chem.* 272: 7608-7616 (1997).
- [98] KNAUPER, V., WILL, H., LÓPEZ-OTÍN, C., SMITH, B., ATKINSON, S.J., STANTON, H., HEMBRY, R.M. Y MURPHY, G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J. Biol. Chem.* 271: 17124-17131 (1996).
- [99] NAVARRO, C.L., CADIÑANOS, J., SANDRE-GIOVANNOLI, A.D., BERNARD, R., COURRIER, S., BOCCACCIO, I., BOYER, A., KLEIJER, W.J., WAGNER, A., GIULIANO, F., BEEMER, F.A., FREIJE, J.M., CAU, P., HENNEKAM, R.C., LÓPEZ-OTÍN, C. Y COLS. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors. *Hum. Mol. Genet.* 14: 1503-1513 (2005).
- [100] AGARWAL, A.K., FRYNS, J.P., AUCHUS, R.J. Y GARG, A. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 12: 1995-2001 (2003).
- [101] LEVY, G.G., NICHOLS, W.C., LIAN, E.C., FOROUD, T., McCLINTICK, J.N., MCGEE, B.M., YANG, A.Y., SIEMIENIAK, D.R., STARK, K.R., GRUPPO, R., SARODE, R., SHURIN, S.B., CHANDRASEKARAN, V., STABLER, S.P., SABIO, H. Y COLS. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 413: 488-494 (2001).
- [102] JACOBSON, S.G., CIDECIYAN, A.V., BENNETT, J., KINGSLEY, R.M., SHEFFIELD, V.C. Y STONE, E.M. Novel mutation in the TIMP3

- gene causes Sorsby fundus dystrophy. *Arch. Ophthalmol.* 120: 376-379 (2002).
- [103] SHACKLETON, S., SMALLWOOD, D.T., CLAYTON, P., WILSON, L.C., AGARWAL, A.K., GARG, A. Y TREMBATH, R.C. Compound heterozygous ZMPSTE24 mutations reduce prelamin A processing and result in a severe progeroid phenotype. *J. Med. Genet.* 42: e36 (2005).
- [104] FREIJE, J.M., BALBÍN, M., PENDÁS, A.M., SÁNCHEZ, L.M., PUENTE, X.S. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 532: 91-107 (2003).
- [105] NIELSEN, B.S., RANK, F., LÓPEZ, J.M., BALBÍN, M., VIZOSO, F., LUND, L.R., DANO, K. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. *Cancer Res.* 61: 7091-7100 (2001).
- [106] PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L., HAMMER, R.E., TRUMBAUER, M.E., ROSENFELD, M.G., BIRNBERG, N.C. Y EVANS, R.M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615 (1982).
- [107] PALMITER, R.D. Y BRINSTER, R.L. Transgenic mice. *Cell* 41: 343-345 (1985).
- [108] BRONSON, S.K. Y SMITHIES, O. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269: 27155-27158 (1994).
- [109] CAPECCHI, M.R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Rev. Genet.* 6: 507-512 (2005).
- [110] ITOH, T., TANIOKA, M., YOSHIDA, H., YOSHIOKA, T., NISHIMOTO, H. Y ITOHARA, S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* 58: 1048-1051 (1998).
- [111] STERNLICHT, M.D., LOCHTER, A., SYMPSON, C.J., HUEY, B., ROUGIER, J.P., GRAY, J.W., PINKEL, D., BISSELL, M.J. Y WERB, Z. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98: 137-146 (1999).
- [112] PENDÁS, A.M., FOLGUERAS, A.R., LLANO, E., CATERINA, J., FERRARD, F., RODRÍGUEZ, F., ASTUDILLO, A., NOËL, A., BIRKEDAL-HANSEN, H. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Diet-induced obesity and reduced skin cancer susceptibility in matrix metalloproteinase 19-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 24: 5304-5313 (2004).

- [113] PENDÁS, A.M., ZHOU, Z., CADIÑANOS, J., FREIJE, J.M., WANG, J., HULTENBY, K., ASTUDILLO, A., WERNESON, A., RODRÍGUEZ, F., TRYGGVASON, K. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Defective prelamins A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Nature Genet.* 31: 94-99 (2002).
- [114] SULLIVAN, T., ESCALANTE-ALCALDE, D., BHATT, H., ANVER, M., BHAT, N., NAGASHIMA, K., STEWART, C.L. Y BURKE, B. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 147: 913-920 (1999).
- [115] BROERS, J.L., RAMAEKERS, F.C., BONNE, G., YAOU, R.B. Y HUTCHINSON, C.J. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol. Rev.* 86: 967-1008 (2006).
- [116] LIU, B., WANG, J., CHAN, K.M., TJIA, W.M., DENG, W., GUAN, X., HUANG, J.D., LI, K.M., CHAU, P.Y., CHEN, D.J., PEI, D., PENDÁS, A.M., CADIÑANOS, J., LÓPEZ-OTÍN, C., TSE, H.F. Y COLS. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nature Med.* 11: 780-785 (2005).
- [117] VARELA, I., CADIÑANOS, J., PENDÁS, A.M., GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A., FOLGUERAS, A.R., SÁNCHEZ, L.M., ZHOU, Z., RODRÍGUEZ, F.J., STEWART, C.L., VEGA, J.A., TRYGGVASON, K., FREIJE, J.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Accelerated ageing in mice deficient in *Zmpste24* protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437: 564-568 (2005).
- [118] CADIÑANOS, J., VARELA, I., LÓPEZ-OTÍN, C. Y FREIJE, J.M. From immature lamin to premature aging: molecular pathways and therapeutic opportunities. *Cell Cycle* 4: 1732-1735 (2005).
- [119] DONEHOWER, L.A. p53: guardian and suppressor of longevity? *Exp. Gerontol.* 40: 7-9 (2005).
- [120] CAMPISI, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513-522 (2005).
- [121] BEAUSEJOUR, C.M. Y CAMPISI, J. Ageing: Balancing regeneration and cancer. *Nature* 443: 404-405 (2006).
- [122] JANZEN, V., FORKERT, R., FLEMING, H.E., SAITO, Y., WARING, M.T., DOMBKOWSKI, D.M., CHENG, T., DEPINHO, R.A., SHARPLESS, N.E. Y SCADDEN, D.T. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16(INK4a). *Nature* 443: 421-426 (2006).

- [123] MOLOFSKY, A.V., SLUTSKY, S.G., JOSEPH, N.M., HE, S., PARDAL, R., KRISHNAMURTHY, J., SHARPLESS, N.E. Y MORRISON, S.J. Increasing p16(INK4a) expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443: 448-452 (2006).
- [124] KRISHNAMURTHY, J., RAMSEY, M.R., LIGON, K.L., TORRICE, C., KOH, A., BONNER-WEIR, S. Y SHARPLESS, N.E. p16(INK4a) induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 443: 453-457 (2006).
- [125] RAMÍREZ, C.L., CADIÑANOS, J., VARELA, I., FREIJE, J.M. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Human progeroid syndromes, aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old questions *Cell Mol. Life Sci.* (2006) en prensa.
- [126] CAPELL, B.C., ERDOS, M.R., MADIGAN, J.P., FIORDALISI, J.J., VARGA, R., CONNEELY, K.N., GORDON, L.B., DER, C.J., COX, A.D. Y COLLINS, F.S. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 12879-12884 (2005).
- [127] RUSINOL, A.E. Y SINENSKY, M.S. Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *J. Cell Sci.* 119: 3265-3272 (2006).
- [128] YANG, S.H., META, M., QIAO, X., FROST, D., BAUCH, J., COFFINIER, C., MAJUMDAR, S., BERGO, M.O., YOUNG, S.G. Y FONG, L.G. A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *J. Clin. Invest.* 116: 2115-2121 (2006).
- [129] SCAFFIDI, P. Y MISTELI, T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312: 1059-1063 (2006).
- [130] BALBÍN, M., FUEYO, A., TESTER, A.M., PENDÁS, A.M., PITIOT, A.S., ASTUDILLO, A., OVERALL, C.M., SHAPIRO, S.D. Y LÓPEZ-OTÍN, C. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nature Genet.* 35: 252-257 (2003).
- [131] GUEDERS, M.M., BALBÍN, M., ROCKS, N., FOIDART, J.M., GOSSET, P., LOUIS, R., SHAPIRO, S., LÓPEZ-OTÍN, C., NOEL, A. Y CATALDO, D.D. Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocytic allergen-induced airway inflammation. *J. Immunol.* 175: 2589-2597 (2005).
- [132] VAN LINT, P., WIELOCKX, B., PUIMEGE, L., NOEL, A., LÓPEZ-OTÍN, C. Y LIBERT, C. Resistance of collagenase-2 (matrix metallo-

- proteinase-8)-deficient mice to TNF-induced lethal hepatitis. *J. Immunol.* 175: 7642-7649 (2005).
- [133] OWEN, C.A., HU, Z., LÓPEZ-OTÍN, C. Y SHAPIRO, S.D. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J. Immunol.* 172: 7791-7803 (2004).
- [134] GREEN, J.E. Y HUDSON, T. The promise of genetically engineered mice for cancer prevention studies. *Nature Rev. Cancer* 5: 184-198 (2005).
- [135] SHARPLESS, N.E. Y DEPINHO, R.A. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nature Rev. Drug Discov.* 5: 741-754 (2006).
- [136] FRANCHINI, M. Recombinant factor VIIa: a review on its clinical use. *Int. J. Hematol.* 83: 126-138 (2006).
- [137] BLAKEY, J., HALAPI, E., BJORNSDOTTIR, U.S., WHEATLEY, A., KRISTINSSON, S., UPMANYU, R., STEFANSSON, K., HAKONARSON, H. Y HALL, I.P. Contribution of ADAM33 polymorphisms to the population risk of asthma. *Thorax* 60: 274-276 (2005).
- [138] SAYED-TABATABAEI, F.A., OOSTRA, B.A., ISAACS, A., VAN DUJIN, C.M. Y WITTEMAN, J.C. ACE polymorphisms. *Circ. Res.* 98: 1123-1133 (2006).
- [139] OVERALL, C.M. Y DEAN, R.A. Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 69-75 (2006).
- [140] ALOY, P. Y RUSSELL, R.B. Structural systems biology: modelling protein interactions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 188-197 (2006).
- [141] OVERALL, C.M., TAM, E.M., KAPPELHOFF, R., CONNOR, A., EWART, T., MORRISON, C.J., PUENTE, X., LÓPEZ-OTÍN, C. Y SETH, A. Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *Biol. Chem.* 385: 493-504 (2004).
- [142] SLOANE, B.F., SAMENI, M., PODGORSKI, I., CAVALLO-MEDVED, D. Y MOIN, K. Functional imaging of tumor proteolysis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46: 301-315 (2006).
- [143] OVERALL, C.M. Y KLEIFELD, O. Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *Br. J. Cancer* 94: 941-946 (2006).

**DISCURSO DE CONTESTACIÓN**  
**DE LA**  
**EXCMA. Sra. D.<sup>a</sup> MARGARITA SALAS**  
**FALGUERAS**

Excmo. Sr. Presidente,  
Excmos. Sres. Académicos,  
Señoras y Señores

Tengo el grato honor de dar la bienvenida al Excmo. Sr. D. Carlos López Otín, en nombre de los miembros de esta Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Quiero, en primer lugar, expresar mi profundo agradecimiento a esta Real Academia por haberme confiado este cometido en el que resumiré los méritos que nos llevaron a elegir a Carlos López Otín Académico de número de la misma. Es para mí una satisfacción muy especial el que se me haya confiado esta misión ya que me cabe el privilegio de que Carlos López Otín fue un alumno aventajado de la asignatura de Genética Molecular que yo impartía en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid. Además, Carlos López Otín fue estudiante postdoctoral de Eladio Viñuela habiendo sido previamente estudiante de doctorado de Enrique Méndez, a su vez el primer doctorando de Eladio a nuestra vuelta a España. Es para mí un orgullo decir que Carlos López Otín, a su temprana edad, ha alcanzado las cotas más altas de reconocimiento científico, no sólo a nivel nacional, sino también a nivel internacional,

Carlos López Otín nació en Sabiñánigo, en la provincia de Huesca. En 1980 se licenció en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, obteniendo el grado de Doctor en 1984 en la misma Facultad. Durante su etapa de doctorado, bajo la dirección del Dr. Enrique Méndez en el Hospital Ramón y Cajal, participó en

la determinación de la estructura de la proteína humana  $\alpha$ 1-microglobulina proponiendo su función como proteína transportadora de sustancias lipofílicas. Asimismo, determinó la estructura de las proteínas antitumorales restrictocina y mitogilina. Durante su fase de doctorado, Carlos López Otín realizó una estancia en la Universidad de Lund en Suecia bajo la dirección del Dr. Anders Grubb, donde estableció la naturaleza de los complejos formados por la  $\alpha$ 1-microglobulina con otras proteínas plasmáticas como la IgA y la albúmina, introduciéndose en el aprendizaje de técnicas inmunológicas para el estudio de proteínas plasmáticas. Una vez finalizada su Tesis Doctoral, Carlos López Otín se incorporó al grupo dirigido por Eladio Viñuela en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa para participar en un proyecto relacionado con el estudio del virus de la peste porcina africana. Su contribución consistió en la identificación y clonación de los genes de las proteínas estructurales del virus y en el desarrollo de un procedimiento de diagnóstico de la enfermedad, basado en la utilización de proteínas virales recombinantes.

En 1987, fue nombrado Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo y en 1993, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la misma Universidad. En 1988, realizó una estancia en el Departamento de Patología de la Universidad de Nueva York donde se introdujo en el campo de la genética y la patología molecular humanas, participando en el estudio de los mecanismos moleculares responsables de las hemorragias cerebrales hereditarias. Fruto de este trabajo fue el hallazgo de una mutación en el gen de la cistatina C causante de una de las formas de dicha enfermedad. Más recientemente, en 2001 fue Profesor Visitante del Dana Farber Cancer Institute de la Universidad de Harvard, donde participó en estudios dirigidos a la generación y análisis fenotípico de nuevos modelos animales para el estudio de los procesos tumorales.

El trabajo reciente del Profesor López Otín en la Universidad de Oviedo se ha centrado en el análisis de la implicación de las proteasas en diversos procesos patológicos,

especialmente en el cáncer. Los estudios realizados en este sentido han conducido a la identificación y caracterización estructural y funcional de más de 60 nuevas proteasas humanas, aisladas en su mayor parte como consecuencia de su sobreexpresión en distintos tipos de tumores, o debido a su participación en procesos de remodelación tisular que guardan un cierto paralelismo con los procesos tumorales. Entre estas proteasas se incluyen cisteín-proteasas, serín-proteasas y metaloproteasas. Paralelamente, el grupo de Carlos López Otín ha tratado de identificar nuevos inhibidores endógenos de proteasas que pudieran bloquear la actividad de las proteasas asociadas a tumores, con el hallazgo del TIMP-3 y la cistatina D, inhibidores específicos de metaloproteasas y cisteín-proteasas, respectivamente. Tras la identificación de estas nuevas proteínas humanas, su trabajo ha estado centrado en una amplia caracterización bioquímica y funcional de las mismas, con objeto de definir sus posibles implicaciones en la progresión del cáncer o en otras enfermedades. Asimismo, ha realizado estudios dirigidos a analizar los mecanismos que regulan su expresión en condiciones normales y patológicas. El estudio de estos mecanismos reguladores ha proporcionado algunas claves acerca de la etiopatogenia de las enfermedades neoplásicas, y de otros procesos como la artritis en los que también se sobreexpresan estas enzimas.

Entre las proteínas descubiertas en el laboratorio del Profesor López Otín cabe destacar el hallazgo de la colagenasa-3, que se ha convertido en una diana preferente de intervención terapéutica, no sólo en procesos tumorales, sino también en procesos artríticos. En efecto, experimentos llevados a cabo en su laboratorio así como en otros grupos, han demostrado que la sobreexpresión dirigida de esta proteasa en animales transgénicos es suficiente para acelerar la progresión tumoral o para favorecer el inicio y el desarrollo de procesos artríticos. Por otra parte, aunque la relevancia patológica de las nuevas proteasas e inhibidores humanos identificados en su laboratorio deriva en gran medida de las alteraciones en sus patrones espacio-temporales de expresión durante el desarrollo del cáncer y otras

enfermedades, deficiencias en alguno de estos nuevos genes causan distintas enfermedades hereditarias humanas. Así, mutaciones en los genes de colagenasa-3, FACE-1, ADAMTS-13, y TIMP-3, generan condrodisplasia, diversos síndromes progeroides, púrpura trombótica trombocitopénica y distrofia de Sorsby, respectivamente.

Recientemente, el grupo del Profesor López Otín ha iniciado nuevas aproximaciones al estudio de las proteasas incluyendo la generación de modelos animales que implican sobreexpresión o eliminación de enzimas proteolíticos. Estas estrategias pueden conducir a una mejor comprensión de la participación de estas enzimas en el desarrollo del cáncer y tal vez proporcionar nuevas ideas acerca de las funciones que desarrollan las proteasas en procesos fisiológicos. Como ejemplo, su trabajo de generación y análisis de animales deficientes en la metaloproteasa FACE-1/Zmpste24, sobreexpresada en carcinomas humanos, ha conducido al hallazgo de su papel central en la formación de la envuelta nuclear. Asimismo, este trabajo ha permitido acceder a una nueva visión de las alteraciones moleculares subyacentes a una serie de enfermedades humanas graves, incluyendo diversas formas de distrofia muscular y cardiomiopatías congénitas. El trabajo con estos ratones ha adquirido una dimensión adicional tras el hallazgo de que mutaciones en el gen de esta proteasa o en el de su sustrato lamina A, causan diversos síndromes de envejecimiento acelerado en humanos.

Curiosamente, en estudios muy recientes con los ratones *Face1*<sup>-/-</sup> se ha observado que el extraordinario envejecimiento acelerado que muestran estos animales se asocia a una marcada inestabilidad genómica y a la activación crónica de rutas de supresión tumoral como las mediadas por p53, avalando así la idea de la pleiotropía antagónica entre el envejecimiento y la supresión tumoral. Además, ha demostrado que el dramático fenotipo de envejecimiento prematuro de estos ratones puede rescatarse mediante estrategias de manipulación genética dirigidas a disminuir los niveles de prelamina A acumulada en sus células. Estos

trabajos recientes, que han dado lugar a publicaciones en las más prestigiosas revistas como *Nature*, *Nature Genetics* y *Nature Medicine*, son un claro ejemplo de la necesidad de mantener la actividad enzimática de las proteasas en sus justos niveles. Un exceso de las mismas puede favorecer procesos de destrucción tisular como los que acompañan al cáncer, y una deficiencia proteolítica puede conducir al desarrollo de otras patologías que también comprometen la vida de los pacientes. Estas ideas han sido la base de la propuesta por parte del Profesor López Otín, en colaboración con el Dr. Chris Overall, de una aproximación global al estudio de las proteasas a través de la introducción de nuevos conceptos como los de Degradoma, conjunto de proteasas producidas por una célula, un tejido o un organismo, o Degradómica, conjunto de aproximaciones genómicas y proteómicas dirigidas al estudio de las estructuras y funciones de proteasas, de sus sustratos y de sus inhibidores, así como el desarrollo de nuevas metodologías que doten de contenido experimental a estos conceptos globales. Estas ideas han quedado recogidas en tres artículos que ha publicado recientemente en *Nature Reviews*. Es interesante señalar que el genoma humano posee al menos 561 proteasas u homólogos de proteasas siendo este número esencialmente el mismo que el del genoma del chimpancé, nuestro pariente más próximo en la escala evolutiva, donde el grupo del Profesor López Otín ha identificado 559 genes de proteasas. Curiosamente, el ratón y la rata contienen 641 y 626 genes de proteasas, respectivamente, un número significativamente mayor al del degradoma humano. Se ha podido demostrar que la mayor complejidad del degradoma de dichos roedores respecto al humano se debe fundamentalmente a la expansión de genes de proteasas implicadas en defensa inmunológica o en procesos reproductivos. También cabe destacar que los genomas del ratón y de la rata tienen un mayor número de inhibidores de proteasas que el genoma humano, lo que está de acuerdo con la expansión de los sistemas proteolíticos indicados antes. La necesidad del empleo de inhibidores específicos frente a las proteasas tumorales ha quedado de manifiesto tras su hallazgo de

que algunas proteasas como la colagenasa-2 desempeñan una función protectora frente a la progresión tumoral, a través de su capacidad de regular la respuesta inflamatoria antitumoral. Este trabajo, publicado en *Nature Genetics* en 2003, le ha permitido proponer la existencia de un nuevo mecanismo antitumoral mediado por proteasas y proporcionar una explicación a los pobres resultados clínicos obtenidos con la primera generación de inhibidores de proteasas utilizados en pacientes con cáncer. Por último, su experiencia en el análisis genómico de proteasas y sus inhibidores le ha permitido colaborar con los grupos de secuenciación y análisis de distintos Proyectos Genoma, incluyendo los genomas de la rata y el chimpancé, dando lugar a dos trabajos recientemente publicados en *Nature*.

Como resumen, podemos indicar que los trabajos realizados por el grupo dirigido por el Profesor López Otín han quedado reflejados en más de 200 publicaciones en revistas internacionales del máximo prestigio como *Nature*, *Nature Medicine*, *Nature Genetics*, *Nature Reviews*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *Blood*, *J. Clinical Investigation*, *The Lancet*, *Mol. Cell. Biol.*, etc, en los campos de la Bioquímica y Biología Molecular, en Biología Celular y en Oncología así como 17 capítulos de libros. También cabe destacar que, de acuerdo con información recientemente obtenida del ISI, los trabajos de Carlos López Otín han sido citados hasta el momento más de 9.000 veces. Asimismo, se han generado 9 patentes derivadas de su trabajo, destacando la patente conjunta de la Universidad de Oviedo con la empresa Bristol-Myers para desarrollar inhibidores basados en un nuevo mecanismo de adhesión de células tumorales descrito en su laboratorio. El trabajo de Carlos López Otín ha sido reconocido también a través de su participación en Congresos Nacionales e Internacionales con un total de 125 Conferencias entre las que cabe destacar varias Conferencias Plenarias e Inaugurales en Congresos Internacionales. Además, en los últimos 5 años ha impartido conferencias de divulgación científica en más de 25 Institutos de Enseñanza Secundaria, Casas de Cultura y Centros Sociales. Asimismo, ha dirigido 15 Tesis Doctora-

les, todas con la máxima calificación, 12 de ellas habiendo obtenido el Premio Extraordinario de Doctorado.

Carlos López Otín ha sido galardonado con importantes premios, entre ellos el I Premio Nacional de Oncología de la Fundación Echevarne, el Premio Europeo FEBS, el Dupont de Ciencias de la Vida, el de la Fundación Carmen y Severo Ochoa, el Francisco Cobos de Investigación Biomédica, la Medalla de Plata del Principado de Asturias, el Premio Rey Jaime I de Investigación y, muy recientemente, el Premio Lilly de Investigación Preclínica. Es miembro de importantes instituciones, como la Academia Europaea, la American Association for Cancer Research y el Patronato de la Fundación Carmen y Severo Ochoa, y es Académico de Número de la Real Academia de Medicina de Asturias y León. Por otra parte, es miembro del Comité Asesor de diversas instituciones científicas, siendo asesor científico de la empresa Celera para la anotación del genoma humano. Ha sido Presidente de la Asociación Española contra el Cáncer y Coordinador Nacional de Biología Molecular y Celular de la Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva.

Pero además de su ingente labor investigadora Carlos López Otín imparte docencia en las Facultades de Medicina, Ciencias Químicas y Ciencias Biológicas de la Universidad de Oviedo teniendo a su cargo asignaturas de los ciclos primero y segundo así como asignaturas de doctorado en los programas de Biología Funcional y Oncología, con un total de más de 150 horas lectivas por curso académico.

No quisiera finalizar sin dedicar una mención especial a la familia de Carlos: Gloria Velasco, su mujer, profesora e investigadora como él, con quien comparte su dedicación y entusiasmo por la investigación; Daniel, su hijo mayor, quien cursa el segundo año en la Facultad de Medicina, pero que sobresale por su afición a la ornitología y su gran conocimiento de ella; y Laura, la pequeña, quien todavía no ha desvelado cuáles son sus intereses futuros. Quiero dejar constancia aquí de mi gran cariño y aprecio a toda la familia.

Finalmente, en nombre de los miembros de esta Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y en el mío propio quiero dar la bienvenida a Carlos López Otín a esta casa, deseándole una agradable estancia entre nosotros y una fructífera colaboración en las tareas de esta Real Academia.

Muchas gracias.

La impresión de este discurso ha sido financiada por

