

Las desagregasas: herramientas moleculares contra los efectos del estrés y de las enfermedades neurodegenerativas

Jorge Nieto Sotelo

Las células constantemente están expuestas al estrés, ya sea de origen ambiental, como pueden ser las temperaturas elevadas y la irradiación, o de origen intracelular, como el estrés oxidativo generado por las reacciones metabólicas, patológicas o agentes químicos. Estas condiciones de estrés provocan la desnaturación de las proteínas y su agregación, con los consecuentes daño y/o muerte celular. Las células poseen mecanismos que les permiten percibir y responder al estrés, mediante la activación de rutas de transducción de señales y de factores de transcripción que estimulan la expresión de genes que, a su vez, codifican proteínas que restablecen la estructura y función de otras proteínas. Estas respuestas son sumamente importantes para que se restablezca el crecimiento y el desarrollo, así como para proteger al organismo de enfermedades

cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington, Parkinson, etc., y de enfermedades provocadas por priones.¹ Numerosos estudios han encontrado una correlación entre la respuesta al estrés y la longevidad. Las desagregasas son una familia de proteínas muy peculiares que tienen la capacidad de disolver los agregados de proteínas que se acumulan cuando la célula es expuesta, ya sea a temperaturas elevadas o a agentes químicos que causan su agregación. Esta función es sumamente importante, pues le permite a la célula reutilizar las proteínas dañadas por el estrés. El conocimiento de los mecanismos de acción de las desagregasas, de su estructura, y de las interacciones con sus proteínas-blancas o clientes tendrá implicaciones muy importantes en la biología, en la agricultura, en la medicina y en la biotecnología.



9
3
2

¹ Los priones son proteínas con conformaciones anormales, resistentes a las proteasas y que causan ciertas enfermedades neurodegenerativas en los mamíferos. Toda la evidencia acumulada a la fecha indica que la transmisión de las enfermedades causadas por priones no requiere de ácidos nucleicos. La infección depende de la habilidad del prión de convertir proteínas no-priónicas, codificadas por el mismo gen, a la conformación priónica.

Relevancia de la estructura tridimensional de las proteínas, cómo se adquiere durante su síntesis y se recupera si se altera

Las proteínas son macromoléculas sumamente importantes para la célula pues tienen funciones enzimáticas, estructurales, de transporte, de locomoción, de respuesta inmune, de señalización, de regulación de la expresión genética, etc. Este tipo de moléculas están constituidas por distintas combinaciones de veinte aminoácidos diferentes unidos entre sí por enlaces peptídicos que forman largas cadenas. Cada tipo de proteína está constituida por una secuencia única de aminoácidos. Las cadenas polipeptídicas se pliegan en un espacio tridimensional, adquiriendo estructuras bien definidas que pueden ser reconocidas a distintos niveles. La estructura *primaria* de una proteína no es más que la simple secuencia de los aminoácidos que la constituyen. La estructura *secundaria* consta de las repeticiones periódicas de aminoácidos vecinos dentro de la estructura lineal de la secuencia; esta pequeña “ventana” permite reconocer, entre otras, hélices y plegamientos tipo β . La estructura *terciaria* es el arreglo de todos los aminoácidos en el espacio, lo que permite que aminoácidos muy alejados entre sí dentro de la secuencia primaria, puedan mantener contactos o situarse a distancias muy pequeñas. Finalmente, la estructura *cuaternaria* nos permite definir las interacciones que puedan tener las diferentes cadenas polipeptídicas (subunidades) para formar un complejo proteínico. Gracias al trabajo del laboratorio de Christian B. Anfinsen, quien recibió el Premio Nobel de Química en 1972 por sus estudios de la renaturalización de la ribonucleasa y otras nucleasas, se comenzó a entender cómo es que una proteína desnaturalizada por completo adquiría nuevamente su conformación nativa. Anfinsen postuló la “hipótesis termodinámica” para explicar cómo las proteínas adquirirían su conformación nativa (Anfinsen, 1973). Esta hipótesis postulaba que la estructura tridimensional de una proteína nativa, en su ambiente fisiológico normal (solvente, pH, fuerza iónica, presencia

de otros componentes como iones metálicos o grupos prostéticos, temperatura, etc.), es aquella en la cual la energía libre de Gibbs del sistema completo es mínima. En otras palabras, la conformación nativa estaba determinada por la totalidad de las interacciones de sus átomos y, por lo tanto, por la secuencia de sus aminoácidos componentes. Esta hipótesis considera que en la secuencia primaria de cada proteína reside toda la información necesaria para que éstas adquieran su conformación correcta siempre y cuando se encuentren en su medio fisiológico “normal”, sobre el que la selección natural ha actuado.

Para darnos una idea de la gran cantidad de conformaciones posibles que puede adquirir en el espacio una proteína, pongamos el ejemplo de una proteína de cien aminoácidos de longitud. Para los estándares de las proteínas celulares, ésta es una proteína muy pequeña, pues su peso es de alrededor de 11 kilodaltones (kDa). En el otro extremo del espectro de tamaños de las proteínas tenemos a las de 2000 aminoácidos de longitud (unos 220 kDa) o aún mayores. Si consideramos que en cada posición de la secuencia pudiesen existir dos enlaces giratorios, y que cada enlace pudiese tener dos o tres orientaciones posibles, podríamos suponer la existencia de 4^{100} a 9^{100} conformaciones posibles en solución para la proteína de 11 kDa. Para el caso de la proteína de 220 kDa, las conformaciones posibles serían de 4^{2000} a 9^{2000} . La renaturalización *in vitro* de la nucleasa de *Staphylococcus aureus* (de 149 aminoácidos de longitud) requiere únicamente de 250 milisegundos. Esta observación hizo pensar a Anfinsen y colaboradores que la renaturalización de una proteína sigue “rutas” que son iniciadas por nucleadores dentro de su secuencia. Además, demostraron que es muy importante que ciertas regiones de una proteína cooperen para que ésta adquiera su conformación nativa.

Si bien es cierto que la ribonucleasa y otras nucleasas se distinguen de otras proteínas por la facilidad con la que pueden renaturalizarse, después de haber sido desnaturalizadas con agentes químicos como la urea, o con calor, la

gran mayoría de las proteínas demoran mucho tiempo en hacerlo *in vitro*, o nunca lo logran en su ambiente fisiológico “normal”, o si lo logran *in vitro* no lo pueden lograr *in vivo*.

Las chaperonas y su importancia para el plegamiento correcto de las proteínas

Las ideas de la “hipótesis termodinámica” permanecieron vigentes durante toda la década de los ochenta. Sin embargo, en 1986 John Ellis y colaboradores demostraron que el ensamblaje de ciertas proteínas oligoméricas requiere de la acción de *chaperonas proteínicas* (Musgrove y Ellis, 1986). Sus observaciones resucitaron y extendieron el concepto de chaperona propuesto ocho años antes (Laskey *et al.*, 1978). A raíz del trabajo de Musgrove y Ellis de 1986 se ha encontrado que la gran mayoría de las proteínas requieren de la ayuda de otras para adquirir su conformación nativa *in vivo*. A este tipo de proteínas, como ya se mencionó, se les ha dado el nombre de *chaperonas* y su función es la de facilitar el ensamblaje o el desensamblaje no-covalente de las estructuras con contenido proteínico *in vivo*. Otra característica de las chaperonas es que no son componentes permanentes de sus sustratos una vez que éstos llevan a cabo sus funciones biológicas normales (Ellis, 1997). Las funciones de ensamblaje de las chaperonas consisten en plegar a las cadenas polipeptídicas durante y una vez terminada su síntesis en los ribosomas, en plegar a otras proteínas después de que han atravesado compartimentos membranales, y en asociar polipéptidos plegados entre sí o con otras macromoléculas para formar complejos oligoméricos. Las funciones de desensamblaje consisten en desplegar parcialmente y en disociar las subunidades de ciertas proteínas cuando llevan a cabo sus funciones y en reparar o degradar a las proteínas cuando se desnaturalizan parcialmente debido a mutaciones o a su exposición al estrés ambiental, como las altas temperaturas o la anoxia. Todo lo anterior permite sugerir que las chaperonas

afectan tanto a la estructura terciaria como a la estructura cuaternaria de las proteínas.

La síntesis de algunas de chaperonas aumenta en respuesta al estrés. Sin embargo, no todas las chaperonas son inducidas por el estrés. El estrés puede causar la desnaturalización o la agregación de las proteínas; de allí que la función de las chaperonas se torne relevante cuando la célula enfrenta condiciones de estrés. Cuando las células son chocadas con calor, u otros estreses, se induce la síntesis de varias familias de proteínas que tienen función de chaperona, entre las que se encuentran: Hsp100/ClpB, Hsp90, Hsp70, Hsp60, y las Hsp pequeñas (sHsp). No obstante, se debe aclarar que no todas las proteínas de estrés son chaperonas.

Pero, ¿cuál es el origen del término chaperona molecular? Como ya se mencionó, el término de chaperona molecular lo acuñaron por primera vez Ron Laskey y colaboradores en 1978 para describir las propiedades de la nucleoplasmina (Laskey *et al.*, 1978). La nucleoplasmina es una proteína que abunda en los núcleos de los huevos y de los oocitos de la rana *Xenopus laevis*, en donde ayuda a ensamblar a las histonas y al ADN en las partículas nucleosomales. A pesar de su importancia en el armado de los nucleosomas, la nucleoplasmina no forma parte de ellos, ni posee la información estérica necesaria para el ensamblaje nucleosomal. Esta información reside en las histonas mismas. La nucleoplasmina se une de manera transitoria y no-covalente a los aminoácidos básicos de la superficie de las histonas a través de sus cadenas laterales ácidas, reduciendo de esta manera la alta densidad de carga positiva de las histonas. La disminución de la carga positiva previene la agregación no específica y rápida entre las histonas y el ADN, que ocurriría en condiciones fisiológicas en ausencia de la nucleoplasmina. El papel inhibitorio y transitorio de la nucleoplasmina permite que el autoensamblaje de las proteínas con el ADN predomine sobre las interacciones incorrectas generadas por la alta densidad de cargas opuestas. Debido a que la nucleoplasmina actúa de manera transitoria

y negativa, Laskey y colaboradores hicieron la analogía con las chaperonas humanas, cuya misión es la de prevenir las interacciones incorrectas de las jovencitas. De allí que a la actividad de la nucleoplasmina se le haya asignado el nombre de chaperona molecular.

Pero entonces, ¿el requerimiento de las chaperonas para el plegado de las proteínas implica que Anfinsen estaba equivocado? De ninguna manera. Los estudios de Anfinsen demostraron claramente que en la estructura primaria de las proteínas existe un código para el ensamblaje de su estructura nativa. Sin embargo, este código no basta para que la mayoría de las proteínas puedan ensamblarse correctamente *in vivo* (a concentraciones fisiológicas del orden de 340 mg/ml, como es el caso del interior de una célula de *Escherichia coli*). Los experimentos de Anfinsen se llevaron a cabo a concentraciones proteínicas mucho menores, que reducían al mínimo las interacciones moleculares entre las proteínas. La importancia de las chaperonas reside en el hecho de que previenen o revierten los procesos de aglomeración o agregación de las proteínas cuando se encuentran en las concentraciones elevadas, típicas de las células vivas. Por lo tanto, las chaperonas se necesitan para que el ensamblaje se haga de manera eficiente bajo las condiciones altamente densas del ambiente celular. La agregación de las proteínas ocurre porque durante su plegamiento se forman confómeros intermediarios que exponen grupos hidrofóbicos en su superficie (el estado de “glóbulo fundido” o *molten globule state*). Debido a la alta densidad de proteínas en el ambiente celular, su actividad termodinámica aumenta hasta en dos o tres órdenes de magnitud. La mayoría de las chaperonas se unen a las superficies hidrofóbicas de las proteínas que están en proceso de plegamiento o que han sido desnaturalizadas impidiendo su agregación. No todas las chaperonas previenen interacciones entre regiones hidrofóbicas. Recordemos que la nucleoplasmina previene interacciones electrostáticas incorrectas entre las histonas y el ADN. Por lo tanto, desde un punto de vista más general, las chaperonas previenen

las interacciones incorrectas entre las superficies de las macromoléculas.

Las chaperoninas (complejos entre anillos oligoméricos compuestos por GroEL y GroES en bacterias o por Hsp60 y Hsp10 en las mitocondrias y en los plástidos de los eucariotes) secuestran en su interior a los polipéptidos parcialmente plegados en cavidades a las que se les ha dado el nombre de “jaulas de Anfinsen” (Ellis, 1997). En el citoplasma de los eucariotes existen otras chaperoninas que reciben distintos nombres: TCP-1 (*T complex protein-1*) CCT (*chaperonin containing TCP-1*) o TriC (*TCP-1 ring complex*) (Wang *et al.*, 2004). Todo lo anterior implica que el plegamiento de un buen número de proteínas sucede en el interior de las “jaulas de Anfinsen”.

Otra clase de chaperonas de eucariotes está constituido por Hsp70 (DnaK en procariotes) que, a diferencia de las chaperoninas, actúa como monómero. Los distintos miembros de la familia de Hsp70 se ubican en todos los compartimentos celulares, principalmente en el citoplasma, en la mitocondria, en los plástidos y en el retículo endoplásmico. A diferencia de las chaperoninas, estas proteínas son monoméricas y se unen a las superficies hidrofóbicas de las cadenas nascentes de los polipéptidos, protegiéndolos de sí mismos y de otras cadenas, hasta que han crecido al tamaño suficiente como para plegarse en dominios. Al igual que las chaperoninas, las Hsp70 no funcionan solas. La co-chaperona Hsp40 (DnaJ en procariotes) se une al complejo Hsp70-ATP-polipéptido sustrato, aumentando la hidrólisis del ATP y funcionando como proteína activadora de Hsp70. En consecuencia, el polipéptido sustrato se disocia del complejo Hsp70-ADP, lo cual promueve un nuevo ciclo de unión a otro complejo Hsp70-ATP, en caso de que el polipéptido sustrato no haya adquirido su conformación nativa. La regeneración del complejo Hsp70-ATP, a partir de Hsp70-ADP, requiere de un intercambiador de nucleótidos entre los que se han identificado a Bag-1, a Fes1 y a HspBP1 (GrpE en los procariotes, en las mitocondrias y en los plástidos) (Wang *et al.*, 2004).

Si bien las chaperoninas y la maquinaria de chaperonas asociadas a Hsp70 son bastante promiscuas, en cuanto al reconocimiento de sus sustratos, existe un buen número de chaperonas cuyo sustrato es sumamente específico. La familia de Hsp90 es un caso intermedio, ya que tienen un espectro reducido de sustratos guardando preferencias hacia componentes de la transducción de señales, como los receptores esteroidales y las cinasas de proteínas. Hsp90 funciona asociada a un complejo proteínico llamado CCH (heterocomplejo de chaperonas citoplásmicas). El CCH está formado por Hsp90, Hsp70, Hip (proteína que interactúa con Hsp70), Hop (proteína organizadora de Hsp70/Hsp90), un homólogo de DnaJ, la prolil-isomerasa y p23.

Es importante señalar que la actividad de todas las familias de chaperonas, a excepción de las sHsp, requiere de la hidrólisis del ATP, lo que implica que el plegamiento adecuado de las proteínas y su renaturalización requieren de un gasto energético considerable.

Los agregados moleculares y las desagregasas

La agregación de las proteínas es muy fácil de provocar *in vitro*, sin embargo no fue sino hasta 1983 cuando se demostró que también se pueden acumular *in vivo* bajo las condiciones fisiológicas de la célula. Lutz Nover y colegas notaron que las células expuestas al choque de calor (células de jitomate) acumulan gránulos en su citoplasma (Nover *et al.*, 1983). Posteriormente demostraron que estos gránulos están formados por ARN y proteínas. ¿Pero, qué pasa cuando las condiciones de estrés son tan severas que las proteínas se agregan o cuando las distintas maquinarias de chaperonas son insuficientes

para prevenir la agregación bajo condiciones óptimas de crecimiento? En estas circunstancias la célula necesita de un tipo de chaperona muy diferente: las desagregasas. Las desagregasas son una familia de proteínas cuya función fue descrita en 1994 (Schirmer *et al.*, 1996) y cuya actividad bioquímica es muy diferente a la de las chaperonas o chaperoninas anteriormente mencionadas. El primer cADN que codifica a una desagregasa fue sintetizado a partir de ARN poli-adenilado aislado de plántulas de maíz chocadas con calor (Nieto-Sotelo, 1988); aunque en ese entonces no era claro que la proteína codificada por este cADN tenía la actividad de desagregasa. En 1990 Susan Lindquist y colaboradores clonaron el gen *HSP104* de la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*), demostrando que su función era muy importante para que la célula llevara a cabo la termotolerancia inducida² (Sánchez y Lindquist, 1990). En trabajos posteriores, demostraron que la levadura requiere de *HSP104* para resistir su exposición al etanol, al arsenito y al frío. También observaron que la levadura forma agregados proteínicos visibles al microscopio electrónico cuando las levaduras se exponen a 50°C, ya sea que se aclimaten o no se aclimaten previamente. Observaron que las células aclimatadas requerían de *HSP104* para poder remover a los agregados proteínicos, así como para reactivar a la luciferasa *in vivo*, la cual también formaba agregados cuando la célula se chocaba con calor (Parsell *et al.*, 1994). Posteriormente se demostró, mediante ensayos *in vitro*, la actividad de desagregasa de Hsp104 (Glover y Lindquist, 1998).

Los genes que codifican a las proteínas Hsp104 se encuentran en distintos grupos de organismos: en las bacterias, en los hongos, en las plantas y en los protozoarios (Schirmer

² La termotolerancia inducida se refiere a la capacidad de las células de resistir la exposición a un choque de calor muy elevado durante lapsos cortos (por ejemplo de 20 a 60 minutos a 50°C) siempre y cuando sean aclimatadas previamente a una temperatura moderadamente caliente (por ejemplo 39°C durante 30 a 60 minutos). Si la célula no pasa por un proceso de aclimatación se muere. Bajo ciertas circunstancias las células pueden resistir choques de calor muy elevados (50°C) sin previa aclimatación, se dice entonces que su termotolerancia basal es muy elevada.

et al., 1996). En las bacterias recibe el nombre de ClpB, en los hongos Hsp104 y en las plantas el de Hsp101 y genéricamente se refiere a ellos como ClpB/Hsp100. Sorprendentemente, no es posible detectar genes homólogos a ClpB/Hsp100 en los vertebrados o en los invertebrados. Es posible que el ancestro común a todos los metazoarios perdió éste gen o que su secuencia primaria divergió tan rápido durante la evolución de los metazoarios que ya no es posible detectar su presencia en este tipo de genomas con el uso de algoritmos convencionales tipo *Blast*. En las plantas, Hsp101 también es un factor crucial para la termotolerancia inducida (Nieto-Sotelo *et al.*, 2002). Se ha visto que Hsp101 se acumula en el citoplasma y en el núcleo celulares (Nieto-Sotelo *et al.*, 2002). Durante el desarrollo de las semillas, Hsp101 se acumula en el embrión en grandes cantidades, pero los mutantes nulos en *HSP101*, tanto de maíz como de *Arabidopsis*, no tienen problema alguno en el desarrollo de sus semillas o en su germinación (Hong y Vierling, 2001, Nieto-Sotelo *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* existen tres genes que codifican proteínas tipo ClpB/Hsp100: ClpB1 (At1g74310), ClpB3 (At5g15450) y ClpB4 (At2g25140). Únicamente ClpB1, que se ubica en el citoplasma/núcleo, es requerido para la termotolerancia inducida. ClpB3 se localiza en el cloroplasto y su función es esencial para el desarrollo de este organelo bajo condiciones normales de crecimiento. ClpB4 se localiza en la mitocondria y su mutación no tiene un fenotipo aparente (Lee *et al.*, 2007).

Mecanismo de acción de las proteínas ClpB/Hsp100

El análisis comparativo de las secuencias primarias de las ClpB/Hsp100 permite ubicarlas como miembros de la familia de proteínas Clp/Hsp100 (Schirmer *et al.*, 1996). El nombre de la familia deriva de ClpA, el primer miembro conocido de esta familia. ClpA es la subunidad reguladora de la proteasa dependiente de ATP de *E. coli* que proteoliza a la caseína (*caseinolytic*

protease, Clp). La unión de ClpA a ClpP, la subunidad catalítica, promueve la catálisis. Se han descrito dos grupos de proteínas Clp/Hsp100: el de la clase 1 y el de la clase 2. Las proteínas de la clase 1 contienen dos dominios de unión a nucleótidos (NBD), mientras que las de la clase 2 únicamente poseen un NBD. Las proteínas de la clase 1 claramente se pueden subdividir en cuatro subfamilias en función de la longitud del espaciador que separa a los dos NBD: ClpA, ClpB, ClpC y ClpD. Las proteínas tipo ClpA tienen un espaciador muy corto: de unos 54 amino ácidos. Las proteínas ClpB contienen el espaciador más largo (de 172 a 207 amino ácidos), mientras que el de las proteínas ClpC y ClpD es intermedio en tamaño (101 a 118 amino ácidos). Además, las proteínas ClpC y ClpD poseen secuencias en sus extremos N-terminales que les permiten ser translocadas a los plástidos en las plantas. La clase 2 está formada por las subfamilias ClpM, ClpN, ClpX y ClpY. La actividad de solubilizar proteínas agregadas únicamente se ha observado en las proteínas ClpB y ClpC. Las otras proteínas Clp tienen diversas funciones: las ClpA y ClpX son subunidades regulatorias de la proteasa ClpP, aumentando su actividad proteolítica y determinando su espectro de substratos. Aunque se ha observado que ClpA y ClpX también desagregan agregados, su asociación con ClpP provoca la proteólisis de sus proteínas blanco. Se cree que la función desagregasa de ClpA y ClpX es utilizada para que sus proteínas blanco sean presentadas ante la proteasa ClpP en conformaciones accesibles para su degradación. De manera similar, ClpY también se asocia a la proteasa ClpQ, facilitándole el desplegado de sus proteínas blanco.

Las proteínas ClpB/Hsp100 forman partículas hexaméricas y requieren de esta conformación cuaternaria para su funcionamiento. En *S. cerevisiae*, el ensamblaje de Hsp104 en hexámeros depende de la presencia de nucleótidos de adenina (ADP o ATP). Su hexamerización depende de la habilidad del NBD-2 para unir nucleótidos, ya que mutaciones que inhabilitan su unión al ATP monomerizan a la proteína perdiendo ésta su actividad de des-



Figura 1.

Modelo del anillo hexamérico de dos capas de la proteína ClpB de *Escherichia coli* unida a AMPPNP. Los *coiled-coils* de la región media (espaciador) de cada una de las subunidades se muestran en verde proyectándose hacia el exterior del anillo. Cada *coiled-coil* está compuesto por cuatro hélices anfipáticas. En rojo se muestran los amino ácidos expuestos de la hélice 3 del *coiled-coil*. A la izquierda se muestra la vista superior en la que fácilmente se pueden distinguir los seis *coiled-coils* del hexámero. A la derecha se muestra una vista de perfil del anillo en la que se distinguen las dos capas del anillo hexamérico. La capa superior está compuesta por los NBD-1 y la inferior por los NBD-2, de modo que cada subunidad está alineada con su NBD-1 exactamente arriba de su NBD-2. Los nucleótidos se unen en la interfase de cada par de subunidades adyacentes. Figura tomada de Haslberger *et al.*, 2007.

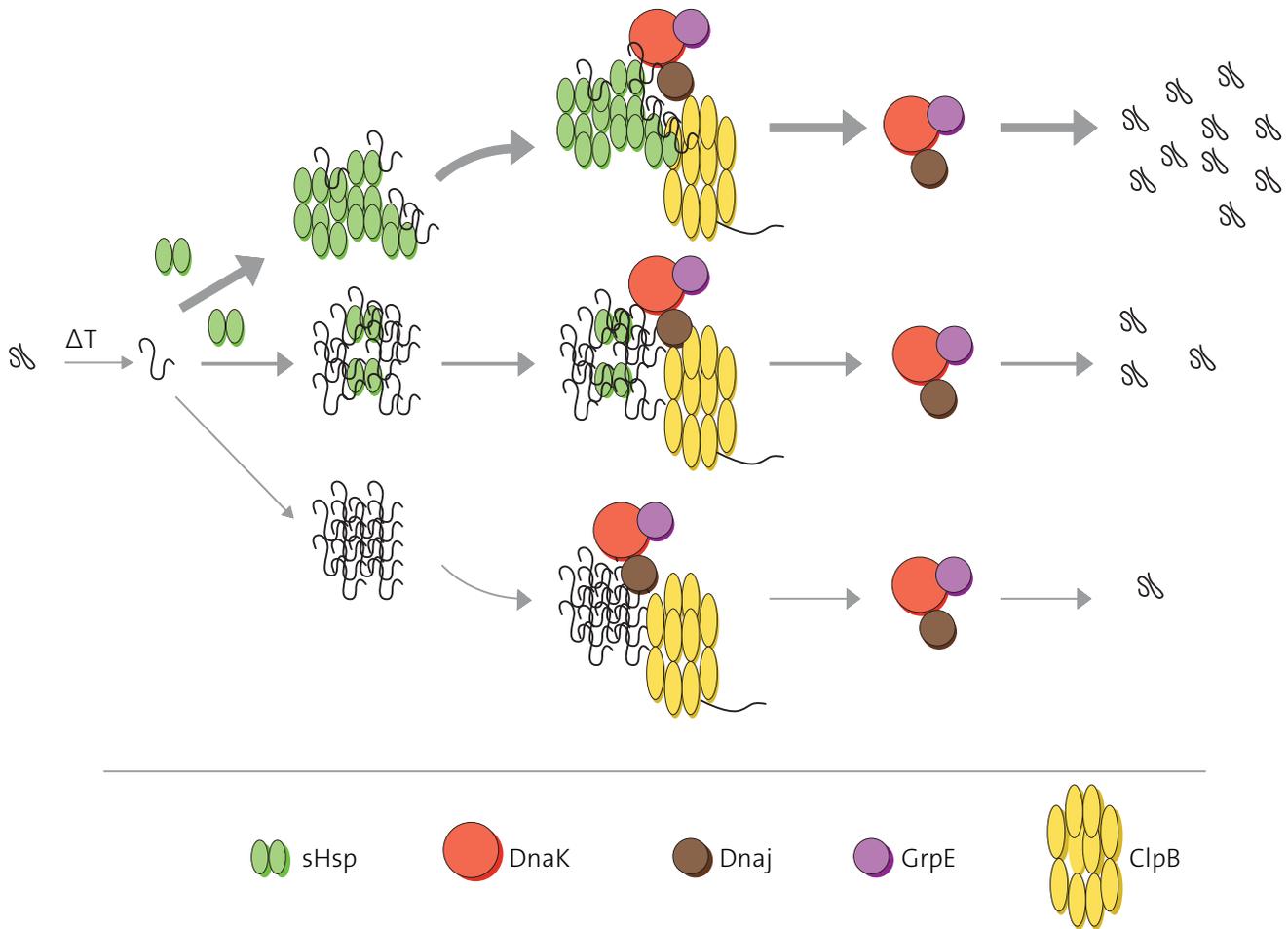


Figura 2.

Modelo de solubilización de agregados proteínicos dependiente del sistema ClpB y chaperonas accesorias. Cuando una proteína es fuertemente desnaturalizada, forma agregados que pueden ser atrapados o no por las sHsp. El complejo DnaK/Dnaj/GrpE facilita la desagregación llevada a cabo por ClpB, por cuyo poro central pasan los péptidos desplegados que son plegados a su conformación nativa por DnaK/Dnaj/GrpE. Dependiendo del grado de asociación de las sHsp a los agregados, la resolubilización de los agregados puede ser muy eficiente (arriba), regular (en medio) o pobre (abajo).

agregasa. Todas las proteínas de las subfamilias ClpB y ClpC tienen una alta probabilidad de formar un *coiled-coil*³ en la región media o espaciador (Nieto-Sotelo *et al.*, 1999). Recientemente se dedujo la estructura de la ClpB de la arqueobacteria *Thermus thermophilus* (Lee *et al.*, 2003) y se propuso que forma un anillo hexamérico con dos capas o niveles que tiene forma de rehilete y en donde la región media (espaciador) forma el *coiled-coil* predicho (figura 1). Debido a que la región media de las proteínas de la subfamilia ClpB las distingue de las otras subfamilias y a que todos los miembros conocidos de esta subfamilia son proteínas de choque de calor (Hsp), que pueden resolubilizar agregados, se ha especulado que esta región sea la clave para entender cómo es que las ClpB llevan a cabo su función (Nieto-Sotelo *et al.*, 1999, Kedzierska *et al.*, 2003 y Zárte, 2003). Dos estudios diferentes han comprobado que el *coiled-coil* es muy importante para la hexamerización y la actividad biológica tanto de Hsp104 de *S. cerevisiae* (Zárte, 2003) como de ClpB de *E. coli* (Kedzierska *et al.*, 2003). Se ha postulado que las ClpB/Hsp100 son mecano-enzimas que aprovechan la energía de la hidrólisis del ATP para llevar a cabo cambios conformacionales que posiblemente ayudan a desagregar los agregados. Para el caso de Hsp104, se ha visto que los péptidos-sustrato se unen al extremo C-terminal, lo que induce la activación de la actividad de ATPasa del NBD-2 el cual, a su vez, provoca un cambio conformacional en la región media. Finalmente, este movimiento activa la ATPasa del NBD-1. Ciertas mutaciones de la región media causan que esta comunicación entre dominios se congele, lo que sugiere que su función es la de transdu-

cir señales de un extremo a otro de la molécula (Cashikar *et al.*, 2002).

Pero ¿cómo desagregan las ClpB/Hsp100 a los agregados proteínicos? Hasta 1998 fue posible demostrar la actividad de desagregasa de Hsp104 mediante una combinación de ensayos *in vitro*. Se observó que la proteína Hsp104 desagrega a otras proteínas pero no lo hace sola: trabaja en combinación con Hsp70, Hsp40 (Glover y Lindquist, 1998) y Hsp26, una Hsp pequeña (sHsp) (Cashikar *et al.*, 2005). De igual forma, se ha visto que ClpB de *E. coli* requiere del complejo DnaK/DnaJ/GrpE para reactivar a los agregados proteínicos además de las sHsp, IbpA e IbpB (Mogk *et al.*, 2003). Un modelo reciente en *S. cerevisiae* propone que el grado de asociación de las sHsp (Hsp26) a los agregados determina la facilidad con la que éstos son solubilizados (Cashikar *et al.*, 2005). Cuando la concentración de Hsp26 es baja, forma complejos con las proteínas desnaturalizadas de mayor tamaño y, posiblemente, más apretados. A altas concentraciones, Hsp26 forma agregados de menor tamaño que son reactivados con mayor eficacia por el complejo Hsp104/Hsp70/Hsp40. La solubilización de las proteínas agregadas se cree que ocurre mediante un mecanismo similar al de pasar el hilo de una madeja a través del ojo de una aguja (Haslberger *et al.*, 2007). Esto implica que las ClpB desenhebran el hilo (desagregan a la proteína agregada) y lo pasan a través del ojo de la aguja (translocan a la proteína a través del poro central del hexámero ClpB de manera dependiente de la hidrólisis del ATP). Se ha visto que DnaK ayuda a ClpB a extraer a los polipéptidos de los agregados. Una vez que se ha desplegado totalmente el polipéptido, pasa a través del poro de ClpB

³ Los *coiled-coils* (espirales enrolladas) son estructuras super-secundarias de las proteínas en las cuales varias (de dos y hasta cinco) hélices-alfa del tipo anfipático forman un haz donde se tuercen entre sí formando super-hélices. Si la dirección de las hélices es la misma, se les llama paralelos, si es contraria, son antiparalelos. Originalmente fueron descritos en proteínas fibrosas como las queratinas, la miosina y la tropomiosina. Sin embargo, muchas otras proteínas globulares también forman *coiled-coils* que les permiten llevar a cabo interacciones intra o inter-moleculares específicas. Los *coiled-coils* contienen estructuras repetidas muy simples en donde la subunidad básica es una héptada (siete amino ácidos con la secuencia: *a, b, c, d, e, f y g*). Dentro de la héptada las posiciones *a* y *d* están ocupadas por amino ácidos hidrofóbicos y las restantes generalmente por hidrofílicos, lo cual le imprime el carácter anfipático a la hélice-alfa. Las interacciones entre las hélices-alfa se dan a través de los amino ácidos hidrofóbicos, aunque también pueden ser importantes las posiciones *e* y *g*, ocupadas por amino ácidos hidrofílicos.

y finalmente la maquinaria DnaK/DnaJ/GrpE se encarga de plegarla a su conformación nativa (figura 2) (Haslberger *et al.*, 2007).

Otras funciones biológicas de las ClpB/Hsp100

Además de su papel en la termotolerancia inducida, se ha visto que Hsp104 de *S. cerevisiae* juega un papel muy importante en la propagación de los priones [PSI⁺] de esta levadura (Chernoff *et al.*, 1995). El factor [PSI⁺] es un elemento no mendeliano que se encuentra en ciertas cepas de laboratorio de la levadura y cuyo producto, Sup35, actúa como supresor de la terminación de la traducción. En las células [PSI⁺], Sup35 se encuentra agregado en estructuras similares a las de los β -amiloides. En células [psi⁻], Sup35 es soluble y sensible a proteasas. Cuando Sup35 se encuentra formando agregados en células [PSI⁺] promueve la agregación de las moléculas de Sup35 recién sintetizadas. En células deletas de *HSP104*, o en células que sobre-expresan *HSP104*, el factor [PSI⁺] es eliminado y Sup35 se solubiliza nuevamente. Dado que la resolución de Sup35 se promueve mediante la delección de *HSP104*, se sugiere que su interacción es más compleja que la que tiene Hsp104 con los agregados proteínicos inducidos por el estrés.

También se ha postulado que la Hsp101 del tabaco facilita el aumento en la eficiencia de la traducción de los mRNA del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Wells *et al.*, 1998). Hsp101 se une a la región omega del extremo 5' no traducido del ARN del TMV. En un sistema heterólogo (*S. cerevisiae*), se ha observado que el aumento

en la eficiencia de la traducción conferido por la región omega del TMV es dependiente de Hsp101 del tabaco. Sin embargo, recientemente se ha visto que las plantas de tabaco carentes de *HSP101* e infectadas con TMV son igualmente susceptibles a la infección, lo cual pone en duda el papel de Hsp101 en el control de la traducción de estos mensajeros virales (Carr *et al.*, 2006).

En plántulas de maíz se ha visto que la delección del gen *HSP101* provoca un aumento en la tasa de crecimiento de la raíz primaria (Nieto-Sotelo *et al.*, 2002) y del tallo en plantas adultas crecidas en ambientes moderadamente cálidos (T máx. diaria de 40°C) (Luz María Martínez y Jorge Nieto-Sotelo, datos no publicados). Así mismo, se ha visto que el choque de calor induce la emergencia de raíces adventicias⁴ en el nodo coleoptilar de las plántulas de maíz (figura 3) y que *HSP101* juega un papel negativo en esta respuesta, ya que en plántulas mutantes *hsp101-m5::Mu1* la producción de este tipo de raíces es más abundante y no requiere de calor (López-Frías, 2006 y López-Frías *et al.*, datos no publicados).

Las desagregasas y sus usos potenciales

La recuperación de la actividad de las proteínas agregadas es sin duda una vía muy importante y alterna a su eliminación por proteólisis. El entendimiento de los mecanismos de la desagregación y solubilización de los agregados proteínicos, acumulados ya sea por el estrés o por deficiencias de la maquinaria celular, permite vislumbrar un enorme potencial de aplicaciones en la agricultura, en la biotecnología y en

⁴ Las raíces adventicias tienen un origen post-embionario y surgen de los tejidos del tallo. Al igual que las raíces de origen embionario (raíz primaria y seminales), les permiten a las plantas absorber los minerales y el agua y les ayudan a apuntarse al suelo. Las raíces adventicias se forman normalmente varias semanas después de la germinación y surgen tanto de los nodos subterráneos como de los aéreos. En la literatura en inglés se distinguen dos tipos: si son subterráneas se les llama *crown roots*, si son aéreas se conocen como *brace roots*. Otros nombres son *prop roots* y *shoot-borne roots*. Durante los primeros días después de la germinación, el sistema radicular embionario es el más importante. Unas semanas después, el sistema de raíces post-embionarias se convierte en el más importante para la planta. Normalmente una planta de maíz produce cerca de 70 raíces adventicias. Muy poco se sabe acerca de los factores que disparan la iniciación de las raíces adventicias, aunque se ha observado que son el resultado de programas de desarrollo y de respuesta a señales ambientales. El nodo coleoptilar es el primer nodo que se distingue en el coleoptilo (tallo) durante la primera semana de crecimiento de una plántula de maíz (figura 3).

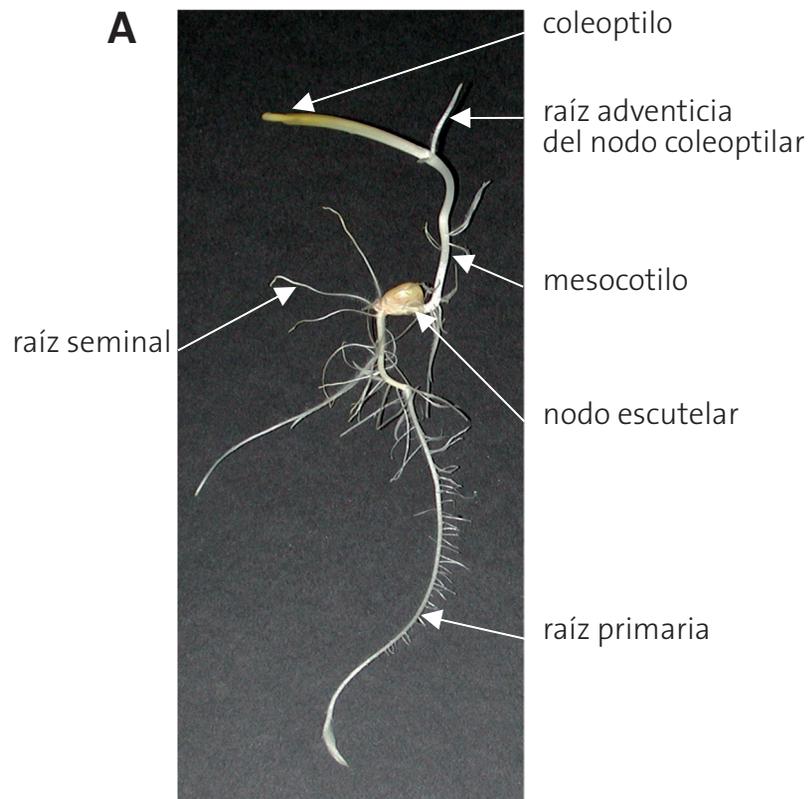


Figura 3.

Raíces adventicias en plantas jóvenes y adultas de maíz. A) Imagen de una plántula de 7 días sometida a un choque de calor de 40°C durante 1 hora 84 horas después de haber sido imbibido el grano. En condiciones similares, las plántulas testigo, que no recibieron el choque de calor, no desarrollaron raíces adventicias en el nodo coleoptilar (no mostradas). B) Imagen de las raíces adventicias aéreas de un maíz adulto de 3 meses de edad crecido en el campo. Nótese en el individuo central los tres nodos desde donde emergen las raíces adventicias.

la terapéutica médica. A continuación presento tres ejemplos concretos:

Existe un buen número de genes que se podrían utilizar para mejorar la tolerancia al estrés abiótico en las plantas. Hsp101, así como otras chaperonas y factores de transcripción de genes de estrés, se han contemplado como buenos candidatos (Sung *et al.*, 2003).

La utilidad de las desagregasas en la producción de proteínas recombinantes activas debería ser considerada seriamente, ya que frecuentemente las proteínas producidas en sistemas heterólogos (bacterias, hongos, insectos, etc.) suelen acumularse en cuerpos de inclusión, lo que impide en muchos casos su utilización. La reactivación *in vivo* de proteínas acumuladas en cuerpos de inclusión ciertamente representa una ventaja sobre los métodos químicos (p. ejem., urea) que no reactivan a todas las proteínas. Recientemente se demostró que la sobre-expresión de *IbpA* e *IbpB* reduce la degradación de cuerpos de inclusión y que su reactivación *in vivo* en *E. coli* depende de ClpB y DnaK (LeThanh *et al.*, 2005).

Varias enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, Huntington, etc.) provocan la acumulación de agregados proteínicos en las células cerebrales. Se cree que la agregación de este tipo de proteínas (parkina, β -amiloide, huntingtina, etc.) es una de las causas de este tipo de enfermedades. Recientemente se demostró que la sobre-expresión de Hsp104 de *S. cerevisiae*, en ratones transgénicos, redujo la formación de agregados de huntingtina y aumentó la longevidad de los animales en un 20% (Vacher *et al.*, 2005).

¿A dónde vamos con el estudio de la termotolerancia y de las desagregasas?

En el laboratorio llevamos a cabo estudios de investigación básica para entender cómo es que los organismos vivos se aclimatan al estrés de calor y a otros estreses abióticos en dos sistemas diferentes: las plantas (maíz, *Arabidopsis*, agave) y la levadura *S. cerevisiae*. En las plantas nos interesa estudiar las funciones de

Hsp101 durante su desarrollo, así como la regulación de la expresión de Hsp101 a nivel de traducción. En la levadura *S. cerevisiae* estudiamos cómo se regula la transcripción de los genes de estrés durante su crecimiento y desarrollo. También nos interesa entender las relaciones estructura/función de la proteína Hsp104 de *S. cerevisiae*.

¿Cómo reduce Hsp101 la emergencia de raíces adventicias del nodo coleoptilar en las plántulas de maíz? Para definir su mecanismo de acción en este proceso, contemplamos tanto el análisis genético como el proteómico. Planeamos obtener supresores del mutante *hsp101-m5::Mu1* que no produzcan raíces adventicias del nodo coleoptilar en respuesta a un choque de calor. El conocimiento genómico del maíz y del arroz será de gran ayuda para mapear e identificar a los genes supresores. El análisis proteómico nos permitirá someter a prueba la hipótesis de que Hsp101 desagrega a un inhibidor de la formación de raíces adventicias del nodo coleoptilar. Para esto compararemos a los agregados presentes en el nodo coleoptilar de plántulas *hsp101-m5::Mu1* y silvestres. Esperamos identificar una proteína presente en agregados del mutante *hsp101-m5::Mu1*, pero no en los del silvestre.

En colaboración con el grupo de la doctora Estela Sánchez de la Facultad de Química de la UNAM, hemos observado que el ARN mensajero de *HSP101* de maíz contiene secuencias IRES (sitio de entrada interno del ribosoma) en su 5' UTR. Estas secuencias le permiten ser traducido de manera independiente del *cap* (Dinkova *et al.*, 2005). Esto es muy importante, ya que se sabe que la traducción dependiente de *cap* se daña durante el choque de calor, sin embargo los ARN mensajeros de los genes de choque de calor se traducen eficientemente durante estas condiciones. Nos interesa identificar a los factores que permiten la traducción del mRNA *HSP101* de maíz a través de su IRES. Para esto, contemplamos el tamizado genético de mutantes de *Arabidopsis* que no puedan expresar al gen de la luciferasa de manera dependiente del 5'UTR del mRNA de *HSP101* del maíz.

En *S. cerevisiae* hemos observado que, cuando se bloquea a la vía de transducción de señales de la cinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA), las células se vuelven muy tolerantes al estrés y al mismo tiempo modifican la estructura de su pared celular, su metabolismo y su tasa de crecimiento (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Hemos encontrado que la PKA inhibe la actividad de dos factores de transcripción de los genes de estrés: Hsf1 y Skn7 (Martínez-Anaya *et al.*, 2007). ¿Cuáles son las proteínas que median la represión que ejerce la PKA sobre Hsf1? Para esto proseguimos enfoques genéticos y proteómicos. Identificaremos a mutantes que no induzcan la actividad de un gen reportero que contiene secuencias reconocidas por Hsf1. Paralelamente, identificaremos a proteínas que interactúen físicamente con Hsf1 por medio de análisis proteómicos. ¿Cómo ejerce la PKA de *S. cerevisiae* la retroinhibición de la expresión de elementos río arriba de su ruta de transducción? En particular estudiamos cómo es que la expresión de *SDC25*, que codifica al activador más río arriba de la vía, es inhibida por la PKA. ¿Qué papel juega el *coiled-coil* de Hsp104 en la actividad de desagregasa? Hemos generado mutaciones puntuales en cada una de las cuatro hélices que componen el *coiled-coil* de Hsp104, encontrando que la disrupción de esta estructura inactiva a la proteína (Zárate, 2003). Nos interesa descifrar la dinámica de las interacciones que puedan llevar a cabo las hélices del *coiled-coil* con la maquinaria de chaperonas (sHsp, Hsp70/Hsp40) y con los agregados. ●

Bibliografía

- Anfinsen, C. B., "Principles that govern the folding of protein chains", en *Science*, 181, 1973.
- Carr, T. *et al.*, "Tobamovirus infection is independent of HSP101 mRNA induction and protein expression", en *Virus Research*, 121, 2006.
- Cashikar, A. G. *et al.*, "Defining a pathway of communication from the C-terminal peptide binding domain to the N-terminal ATPase domain in a AAA protein", en *Molecular Cell*, 9, 2002.
- Cashikar, A. G., M. Duennwald y S. L. Lindquist, "A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104", en *Journal of Biological Chemistry*, 280, 2005.
- Chernoff, Y. O. *et al.*, "Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]", en *Science*, 268, 1995.
- Dinkova, T. D. *et al.*, "Cap-independent translation of maize Hsp101", en *The Plant Journal*, 41, 2005.
- Ellis, R. J., "Do molecular chaperones have to be proteins?", en *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 238, 1997.
- Folch-Mallol, J. L. *et al.*, "New roles for *CDC25* in growth control, galactose regulation, and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*", en *Microbiology (U.K.)*, 150, 2004.
- Glover, J. R. y S. Lindquist, "Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins", en *Cell*, 94, 1998.
- Haslberger, T. *et al.*, "M domains couple the ClpB threading motor with the DnaK chaperone activity", en *Molecular Cell*, 25, 2007.
- Hong, S. W. y E. Vierling, "Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress", en *The Plant Journal*, 27, 2001.
- Kedzierska, S. *et al.*, "Structure and function of the middle domain of ClpB from *Escherichia coli*", en *Biochemistry*, 42, 2003.
- Laskey, R. A. *et al.*, "Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA", en *Nature*, 275, 1978.
- Lee, S. *et al.*, "The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state", en *Cell*, 115, 2003.
- Lee, U. *et al.*, "The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development", en *The Plant Journal*, 49, 2007.
- LeThanh, H., P. Neubauer y F. Hoffmann, "The small heat shock proteins IbpA and IbpB reduce stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies", en *Microbial Cell Factories*, 4, 2005.
- López-Frías, G., *Efecto del calor y el papel de Hsp101 en la producción de raíces adventicias en el maíz*, tesis licenciatura biología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2006.
- Martínez-Anaya, C. *et al.*, "Regulation of Skn7 and Hsf1 activities by PKA under optimal growth conditions and in response to heat-shock in *Saccharomyces cerevisiae*", manuscrito sometido a *Genetics*, 2007.
- Mogk, A. *et al.*, "Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation", en *Molecular Microbiology*, 50, 2003.
- Musgrove, J. E. y R. J. Ellis, "The Rubisco large subunit binding protein", en *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 313, 1986.

- Nieto-Sotelo, J., "The heat shock responses in maize: biochemical and molecular studies", tesis de doctorado, Washington University, 1988.
- Nieto-Sotelo, J. *et al.*, "Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, *HSP101*, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue", en *Gene*, 230, 1999.
- _____, "Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth", en *The Plant Cell*, 14, 2002.
- Nover, L., K. D. Scharf y D. Neumann, "Formation of cytoplasmic granules in tomato cell cultures and leaves", en *Molecular and Cellular Biology*, 3, 1983.
- Parsell, D. W. *et al.*, "Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104", en *Nature*, 372, 1994.
- Sánchez, Y. y S. L. Lindquist, "*HSP104* required for induced thermotolerance", en *Science*, 248, 1990.
- Schirmer, E. C. *et al.*, "HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions", en *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 1996.
- Sung, D. Y. *et al.*, "Acquired tolerance to temperature extremes", en *Trends in Plant Science*, 8, 2003.
- Vacher, C., L. García-Oroz y D. C. Rubinsztein, "Overexpression of yeast hsp104 reduces polyglutamine aggregation and prolongs survival of a transgenic mouse model of Huntington's disease", en *Human Molecular Genetics*, 14, 2005.
- Wang, W. *et al.*, "Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response", en *Trends in Plant Science*, 9, 2004.
- Wells, D. R. *et al.*, "*HSP101* functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status", en *Genes and Development*, 12, 1998.
- Zárate, F., "El papel de la región media en la actividad biológica de la proteína Hsp104 de *Saccharomyces cerevisiae*", tesis maestría ciencias bioquímicas UNAM, 2003.