

Los chaperones moleculares

F. Alba / C. Aguirre / A. Aguilera / M. Ramírez

Para las miles de proteínas que fabrican cada una de nuestras células, la vida empieza con un desafío. A partir de una larga y flexible cadena de aminoácidos una proteína debe transformarse en una molécula cuidadosamente conformada y dotada de todos los giros, vueltas y acodaduras que necesita para llevar a cabo su función. Cada proteína posee su propia secuencia de aminoácidos, y, de alguna manera, acaba por adquirir su propia y única estructura tridimensional. Es lo que se denomina la «estructura nativa» de una proteína. Sin embargo, dicha cadena puede, en principio, plegarse de miles de formas diferentes. ¿Cómo consigue, entonces, encontrar su conformación correcta y funcional?

Por el método de ensayo y error parece improbable. La edad del Universo sería corta comparada con el tiempo que necesitaría, incluso una pequeña proteína, para probar los miles de millones de posibles plegamientos hasta llegar a conseguir su estructura correcta. Mientras la cadena abierta se transforma en su forma final, plegada, se enfrenta con numerosos pasos indeseados. Los aminoácidos atraen todo tipo de moléculas, lo que puede dar lugar a la producción de enlaces químicos inapropiados. Cualquiera que haya tenido que habérselas con proteínas desplegadas («desnaturalizadas» en el argot de los bioquímicos) en un tubo de ensayo conoce muy bien estos azarosos inconvenientes: en vez de obtener moléculas proteicas completamente funcionantes podemos encontrarnos con un amasijo enmarañado y aglutinado imposible de utilizar para estudio alguno; es decir, el equivalente químico de un plato de espaguetis. Sin embargo, en las células las proteínas se pliegan correctamente, o no estaría-

mos aquí para contarlo. ¿Cuál es, pues, el truco? La respuesta a esta cuestión resulta ser una de las áreas más candentes de la bioquímica actual. Hacer que las proteínas se plieguen correctamente, y que permanezcan plegadas, fuera de su ambiente celular normal es uno de los problemas más frustrantes de la industria biotecnológica. Se puede conseguir encajar un gen de una extraña y valiosa proteína humana en una bacteria y producir con éxito grandes cantidades de dicha proteína, sólo para finalmente descubrir que sus moléculas no se pliegan dentro de las células bacterianas o que se agrupan en un amasijo inútil. Algunas veces se obtiene lo que parece ser una proteína correctamente plegada y después se comprueba que se desnatura cuando las muestras, por ejemplo, se descongelan. Tales dificultades no parece que vayan a desvanecerse, pero por lo menos empezamos a comprender por qué tiene éxito la naturaleza donde a menudo falla la biotecnología.

A finales de los 80 parecía claro que las células contenían un tipo de moléculas a las que se les dio el nombre de CHAPERONES («carabinas»), de naturaleza proteica, que ayudaban a preservar a las proteínas inmaduras de las «malas influencias», de modo que pudiesen conformarse de la manera adecuada. Este tipo de cooperación molecular siempre ha entusiasmado a los investigadores, y durante los últimos años los chaperones han sido sometidos a un intenso escrutinio por parte de bioquímicos y biólogos.

Pocos cuestionan hoy día la importancia de los chaperones para la vida y su evolución. El año pasado, por ejemplo, BURNETT y cols. (1), de la Universidad de Yale, manipularon genética-

Palabras clave: Chaperones. Chaperoninas. Proteínas. Estructura terciaria

Fecha de recepción: Junio 1995

mente la bacteria *Escherichia coli* para impedir que los genes implicados expresaran sus chaperones. Las bacterias murieron, ahogadas por grumos de proteínas incorrectamente plegadas. Sin la ayuda de los chaperones, cerca del 30% de las proteínas bacterianas fueron incapaces de plegarse de la manera correcta. Las implicaciones biotecnológicas son considerables. Por ejemplo, algunos de los problemas que tiene la producción industrial de proteínas podrían solucionarse con una combinación adecuada de chaperones. Pero antes de que esto suceda, existen cuestiones básicas que responder. ¿Cómo, por ejemplo, impiden estas moléculas que las jóvenes proteínas se extravíen? ¿Cuánto cuesta la función de los chaperones en términos físico-químicos? No sólo los biólogos, sino también los investigadores médicos están deseosos de conocer estas respuestas, porque algunas enfermedades pudieran ser el resultado de un inadecuado funcionamiento de estos chaperones.

La investigación sobre los chaperones se remonta al año 1987 en el laboratorio de JOHN ELLIS (2), un botánico de la Universidad de Warwick. ELLIS estaba estudiando la RUBISCO (ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa), un enzima de las plantas fundamental en la fotosíntesis. La forma final, plegada, de este enzima está constituida por 16 subunidades, formando una estructura molecular gigante. ELLIS descubrió que esta estructura gigante sólo podía constituirse en presencia de otra gran proteína. Esta, a su vez, no dictaba la estructura final de rubisco, sino que simplemente impedía que el enzima formase un revoltijo en el proceso de ensamblamiento, de la misma manera que los chaperones humanos («las carabinas»), en otro tiempo, impedían a las jovencitas que estableciesen «conexiones» inoportunas.

ELLIS pronto se dio cuenta de que los genes que codifican al chaperon de rubisco eran similares a los genes de una proteína en forma de donut llamada GroEL, que se produce en muchas bacterias. También existían similitudes en el comportamiento de ambas proteínas. Previamente se había demostrado que GroEL, junto con su pequeño acompañante, GroES, ayuda-

ba a ciertos virus a ensamblarse dentro de las bacterias. Los genetistas descubrieron después que el chaperon de rubisco y GroEL eran miembros de una más amplia familia de proteínas similares encontradas en animales, plantas y bacterias, que también funcionan como chaperones (2).

Se han identificado hasta ahora más de 17 clases de proteínas que actúan como chaperones moleculares. GroEL pertenece al grupo de proteínas con forma de anillo conocidas como CHAPERONINAS, que ayudan a los polipéptidos recién sintetizados a plegarse de la manera adecuada. Otros chaperones más pequeños ayudan a las proteínas a reconformarse tras atravesar las membranas celulares, proceso que requiere una desnaturalización temporal de las mismas.

¿Cómo sucede todo esto? Algunos investigadores han mezclado chaperoninas con componentes purificados de las células, de modo que pudiesen analizar los estadios que sigue una proteína desplegada hasta conseguir su forma funcional sin tener que habérselas con las complejidades de las células reales.

Gracias a estas investigaciones tenemos algunas cosas claras. Si se añade una proteína desplegada a un cóctel de chaperones y ATP (el principal suministrador energético de la célula), estas moléculas se reúnen para formar algún tipo de complejo. El pegamento lo constituye la atracción producida por los grupos hidrofóbicos de algunos aminoácidos de las proteínas. Tales grupos yacen enterrados dentro de la molécula proteica plegada, pero en su forma parcialmente desplegada estos grupos están expuestos al exterior. El complejo debe en su momento liberar a la proteína para que pueda ejecutar sus deberes en la célula, y la energía para que ello se produzca proviene de la hidrólisis o ruptura del ATP. Pero cómo sucede esto exactamente es aún una cuestión controvertida. HARTL y cols. (3) describen un escenario en el que las moléculas se reúnen para ejecutar una intrincada danza nupcial que implica a los chaperones y a las proteínas inmaduras desplegadas. En un primer paso, GroES abraza por un extremo a GroEL, de modo que

sus anillos forman una cavidad lo suficientemente grande como para albergar a una proteína. En el segundo paso, las proteínas desplegadas se introducen en el interior. Ello da lugar a la separación de GroES del complejo y al tercer paso, en el cual GroES se une al otro extremo de GroEL y la proteína se libera en la cavidad con la ayuda de la energía del ATP. Dentro de la cavidad la proteína ha podido plegarse correctamente, sin interferencias. En un estadio clave del proceso de plegamiento la proteína empaqueta sus aminoácidos hidrofóbicos en su interior y posiciona sus grupos hidrofílicos en el exterior, donde pueden entrar en contacto con moléculas de agua. Los grupos hidrofóbicos son los que atraen a los chaperones, de modo que la proteína no podrá liberarse hasta que estos grupos estén ocultos en su propia estructura. Cuando la proteína se libera, su tendencia a agregar se encuentra, evidentemente, muy reducida.

No todo el mundo está convencido de este modelo de plegamiento en el cual el chaperon juega un papel activo dirigiendo a la proteína hacia su estado plegado y funcional final mientras se encuentra atrapada dentro de la jaula del chaperon. TOOD y cols. (4), que trabajan en el departamento de investigación de la compañía química Du Pont en Delaware, cree que las proteínas desplegadas se abrazan a los chaperones sólo intermitentemente y que la mayor parte del plegamiento se realiza mientras ambos componentes están separados. Como prueba cita un reciente experimento que afecta a una forma mutante de GroEL. Este chaperon mutante puede abrazar a proteínas desplegadas pero no puede liberarlas. Cuando el chaperon mutante está presente el plegamiento se detiene abruptamente. Ello implica que el plegamiento tiene lugar cuando ambos componentes no están en contacto.

Algunos investigadores creen que los chaperones usan la energía del ATP para rescatar las proteínas atrapadas en estados de plegamiento incorrecto, dándoles a las mismas otra oportunidad. Los chaperones como GroEL actuarían más bien desplegando proteínas caprichosas que plegando a aquellas que van por

el buen camino. Tras cada hidrólisis del ATP los chaperones liberan a las proteínas rescatadas dejándolas que se plieguen espontáneamente. Si ello se realiza adecuadamente, todo irá bien. Si no es así, los chaperones estarán allí para rescatarlas de nuevo. Con suficientes intentos, la mayoría de las proteínas llegarán al final a su forma correcta.

Hay otros experimentos que parecen respaldar esta cuestión. BURSTON y cols. (5), de la Universidad de Bristol siguieron el proceso de plegamiento por espectroscopia de fluorescencia lo que permite medir la rapidez con la que GroEL cambia desde que está fuertemente unido a la proteína hasta su liberación. Sus resultados sugieren que las proteínas desplegadas son alternativamente atraídas y rechazadas por GroEL, mientras que el ATP proporciona la energía de unión. Cuanto menos plegada está la proteína, mayor el número de grupos hidrofóbicos expuestos en su superficie y más fuertemente se une a GroEL: durante dicho abrazo una proteína mal plegada puede ser desenredada y tener una segunda oportunidad. Tras sucesivos ciclos quemando ATP van quedando menos grupos hidrofóbicos en la superficie de la molécula hasta que la proteína ya no interacciona más con el chaperon. GroES coordina de algún modo los estadios finales de este proceso para asegurar que la proteína se libera completamente de GroEL. Otro apoyo experimental a este modo de actuación lo proporcionó en abril pasado PERALTA y cols. (6), de la Universidad La Trabe, en Australia. Los autores observaron lo que sucedía cuando alimentaban con chaperoninas una proteína deliberadamente mal plegada. La proteína en cuestión, la malato deshidrogenasa (MDH), fue reestructurada y acabó plegándose de la manera correcta y funcional.

Otras informaciones se están obteniendo de estudios de la estructura de las chaperoninas, especialmente con una técnica conocida como microscopia crioelectrónica, la cual permite captar complejos proteicos en el acto de chaperonear proteínas en plegamiento. En septiembre pasado se publicaron las primeras fotografías de un complejo de chaperonina y

una proteína en plegamiento, la MDH (7). Las imágenes sugieren que las proteínas desplegadas pueden situarse a la entrada de la cavidad de la chaperonina, no muy profundamente. También revelan grandes cambios de la estructura de GroEL cuando se une a GroES. Mientras tanto, BRAIG y cols. (8) han logrado cristalizar GroEL, lo que ha permitido usar la cristalografía de rayos X para determinar su forma. Si nuestro objetivo es comprender la química básica del funcionamiento de estas moléculas, debemos conocer su estructura tridimensional, dice SIGLER. Sin ello, es lo mismo que describir cómo funciona un motor de automóvil sin haberlo visto nunca. La estructura señalará el camino para un mejor conocimiento de la acción de los chaperones a nivel molecular. Una vez conocida la estructura de GroEL, los bioquímicos podrán jugar con ella para definir cómo determinados cambios afectan al comportamiento conjunto de la molécula. FENTON y cols. (9) han probado ya muchas regiones de GroEL. Los resultados indican, como los de microscopía crioelectrónica, que el borde de la cavidad de la chaperonina es el sitio de unión de las proteínas desplegadas y de GroES. Los estudios cristalográficos también muestran un sitio de unión para el ATP dentro de la cavidad cilíndrica de GroEL. Todo esto es de gran interés para los investigadores médicos, quienes esperan que los chaperones ayudarán a entender las bases moleculares de ciertas enfermedades. Por el momento la conexión entre chaperones y enfermedad es nebulosa, pero existen algunas observaciones seductoras. En la lepra, por ejemplo, se producen anticuerpos que deberían reconocer chaperones del organismo invasor, probablemente inactivándolos. Se cree que tales anticuerpos podrían volverse contra los chaperones propios, fundamentalmente chaperones similares, causando una respuesta autoinmune

en la cual el cuerpo destruye sus propios tejidos. La fibrosis quística podría aparecer como consecuencia de un problema en el plegamiento de las proteínas. Las mutaciones genéticas subyacentes a la enfermedad conducen a defectos de una proteína que juega un papel esencial en la química de la membrana de las células, especialmente las de la superficie de los pulmones. En algunos casos estas proteínas no consiguen plegarse adecuadamente, lo que ha hecho pensar a algunos investigadores que un chaperon llamado CALNEXINA pueda estar implicado en esta historia.

Los chaperones, o su deficiencia, podrían jugar algún papel en otras enfermedades donde existen intrincados plegamientos de las proteínas. Aquí se incluye la BSE (Encefalopatía espongiforme bovina) y la enfermedad de Alzheimer, en las cuales las proteínas se agrupan para formar las placas amiloides del cerebro. Hasta ahora la conexión entre las placas de Alzheimer y los chaperones no son más que especulaciones. Pero tiene sentido lógico que proteínas involucradas en «labores caseras» dentro de la célula puedan ser las encargadas de impedir la formación de las placas. Si se encuentra que una deficiencia de chaperones es la causa de tales enfermedades podría abrirse una vía para su posible tratamiento. Por ingeniería genética se podrían introducir chaperones en los pacientes. La tecnología ya existe. Parece, pues, que quedan aún algunos capítulos que escribir en la historia de estas «carabinas». ◀

F. Alba, C. Aguirre, A. Aguilera, M. Ramírez. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Granada. Área de Fisiología. Facultad de Ciencias Experimentales. Jaén.*

Bibliografía

1. BURNETT, B. P.; HORWICH, A. L., y LOW, K. B.: «A carboxy-terminal deletion impairs the assembly of Groel and confers a pleiotropic phenotype in *Escherichia Coli* K-12». *J. Bacteriol.*, 1994; 176:6980-6985.
2. ELLIS, R. J., y VAN DER VIES, S. M.: «Molecular chaperones». *Ann. Rev. Biochem.*, 1991; 60:321-347.
3. HARTL, F. U.; HILDAN, R., y LANGER, T.: «Molecular chaperones in protein-folding. The art of avoiding sticky situations». *Trends Biochem.*, 1994; 19:20-25.
4. TODD, M. J.; VIITANEN, P. V., y LORIMER, G. H.: «Dynamics of the Chaperonin ATPase Cycle. Implications for facilitated protein-folding». *Science*, 1994; 265:659-666.
5. BURSTON, S. G.; SLEIGH, R.; HALSALL, D. J.; SMITH, C. J.; HOLBROOK, J. J., y CLARKE, A. S.: «The influence of Chaperonins on protein folding. A mechanism for increasing the yield of the native form». *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992; 672:1-9.
6. PERALTA, D.; HARTMAN, D. J.; HOOGENRAAD, N. J., y HOI, P. B.: «Generation of a stable folding intermediate which can be rescued by the Chaperonins Groel and Groes». *FEBS Lett.*, 1994; 339:45-49.
7. CHEN, S.; ROSEMAN, A. M.; HUNTER, A. S.; WOOD, S. P.; BURSTON, S. G.; RANSON, A.; CLARKE, A. R., y SALLIB, H. R.: «Location of a folding protein and shape changes in Groel-Groes complexes imaged by cryoelectron microscopy». *Nature*, 1994; 371:261-264.
8. BRAG, K.; OTWINOWSKI, Z.; HEGDE, R.; BOISVERT, D. C.; JOACHIMAK, A.; HORWICH, A. L., y SIGLER, P. B.: «The crystal structure of the bacterial Chaperonin Groel at 2.8-angstrom». *Nature*, 1994; 371:578-586.
9. FENTON, W. A.; KASHI, Y.; FURTAK, K., y HORWICH, A. L.: «Residues in Chaperonin Groel required for polypeptide binding and release». *Nature*, 1994; 371:614-619.