

PROTEÍNAS EXTREMAS¹

Gina Rodríguez y Alejandro Caro

A principios de los años sesenta, mientras se observaban células de las glándulas salivares de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Moss&, 1962), se notó que, cuando estas células se calentaban se inducía la formación de unos abultamientos, localizados en áreas del DNA (Figura 1), al tiempo que se incrementaba la concentración de ciertas familias de proteínas. Así se reportó, por primera vez, la respuesta del *shock térmico*.

Las proteínas del *shock térmico*

Cuando un organismo se encuentra en un ambiente de estrés genera ciertas reacciones, entre las cuales se encuentra la respuesta del *shock térmico*, en la cual se producen una serie de proteínas denominadas *proteínas de shock térmico* o HSP (*Heat Shock Proteins*). Ellas –con respecto a su función y estructura- se encuentran entre las proteínas más conservadas en la historia evolutiva de los organismos, pues cumplen un papel similar en todos los organismos ya sean archaea, bacterias, levaduras, plantas o animales.

El estrés

Un incremento en alrededor de 5°C a la temperatura normal de la célula desata la rápida síntesis de HSP. Se ha comprobado

que si se somete una célula a este estrés, en pocos minutos, entre el 15 y el 25 por ciento de las proteínas intracelulares son HSP. Aun cuando las proteínas reciben su nombre de acuerdo con la forma en que fueron descubiertas, esto no implica que la respuesta al choque térmico sea su única función. El frío, la pérdida del equilibrio osmótico, toxinas, presión extrema, pH extremo y metales pesados, entre otros tipos de estrés, pueden desencadenar una respuesta de *shock térmico*. Las condiciones estresantes para un organismo particular son aquellas que se salen de las fluctuaciones normales para las funciones de ese organismo.

Por ejemplo, las plantas de la resurrección que son especies desérticas que parecen resucitar luego de morir, generan un tipo de HSP -llamadas pequeñas proteínas de *shock térmico* o sHSP, - *small Heat Shock Proteins* - en sus tejidos vegetativos durante el estrés de escasez de agua. Esta reacción, se piensa, contribuye a la tolerancia a la desecación. Los embriones del camarón de la salmuera, *Artemia*, conocida como *seamonkey*, uno de los crustáceos que más tolera la falta de oxígeno, contiene grandes cantidades de una HSP que, se cree, estabiliza las proteínas durante largos períodos sin oxígeno. Algunos ejemplares de ciempiés, *Lithobius*, que se encuentran cerca de fundidores metalúrgicos, poseen niveles

¹ <http://ciencias.uniandes.edu.co/pdf/proteinas.pdf>

de HSP70 más altos que los colectados en áreas no contaminadas con metales. La hormiga del desierto, *Cataglyphis*, posee una síntesis de HSP que continúa a temperaturas por encima de 45°C, en cambio la hormiga forestal, *Fórmica polyctena*, que vive en climas templados a temperaturas por encima de 39°C, inhibe la síntesis de HSP. Es más, las hormigas del desierto, *Cataglyphis*, elevan voluntariamente su temperatura a más de 50°C para escapar de predadores, y se ha encontrado que los niveles de HSP70 se incrementan antes de someterse a estas altas temperaturas.

Cuando el factor estresante es eliminado, las células continúan normalmente con su metabolismo. Si por el contrario el estrés continúa aumentando, la función protectora de las HSP se ve diezmada y el organismo detiene su producción y activa el programa de muerte celular autoinducida.

Las proteínas son moléculas gigantes compuestas por aminoácidos enlazados que se pliegan para formar una estructura tridimensional, llamada conformación terciaria, que está relacionada con su función específica. El estrés genera cambios en la conformación terciaria de las proteínas, desplegándolas, exponiendo al agua a sus aminoácidos hidrofóbicos - adversos al agua-y causando la pérdida de su función. Este proceso se denomina denaturación de la proteína. Entre proteínas denaturadas ocurren interacciones hidrofóbicas que hacen que se atraigan entre sí y se agreguen. Las HSP parecen ayudar a la célula con las proteínas denaturadas, ya sea uniéndose a ellas para evitar su agregación, marcándolas para luego degradarlas, o manteniéndolas desplegadas en un estado competente, para que una vez terminado el estrés puedan volver a plegarse y recuperar su función normal. En el estado competente la proteína no puede llevar a cabo su función, ya que no se encuentra

plegada en su forma tridimensional; pero todos los aminoácidos que la componen siguen unidos en su estructura primaria, listos para ser plegados de nuevo.

Chaperonas moleculares

Se ha visto que muchas HSP están siempre presentes en la célula, aunque cuando hay estrés sus niveles suben. Se cree que su función principal es asistir el plegamiento de algunas proteínas recién sintetizadas - algunas se pliegan espontáneamente-, por lo que se les denomina *chaperonas moleculares*. Estas chaperonas no forman parte de la estructura final de la proteína funcional, sólo se unen a ella para asistir en su plegamiento, ensamblaje y translocación a otra parte de la célula donde la proteína cumple su función. Hay dos hechos que evidencian que las chaperonas asisten el plegamiento de las proteínas: primero, ciertas proteínas recién sintetizadas están transitoriamente asociadas a moléculas chaperonas, y segundo, se ha observado a las chaperonas asistir en el plegamiento de las proteínas *in vitro*.

Se cree también, que los distintos grupos de HSP trabajan coordinados. Por ejemplo, una proteína como la rodanasa, cuando se denatura, se une a la HSP70 y ésta previene su agregación manteniéndola en el estado competente hasta que se una a la proteína HSP60 (Figura 3) que es la que media el paso del estado competente a la estructura plegada funcional. Los cambios de una proteína pueden comprometer a varias chaperonas, dependiendo de su propia estructura y de la disponibilidad de las chaperonas.

Composición de las sHSP de organismos según la temperatura de su hábitat

El estudio de la composición de las HSP puede ser muy útil para comprender los mecanismos de protección utilizados por distintas células contra ciertos tipos de estrés,

lo que podría tener una aplicación clínica o industrial. La Industria de las enzimas que poseen organismos que viven en condiciones extremas, llamados extremófilos, ha tenido un auge especial en las últimas décadas, por su aplicabilidad en procesos industriales en condiciones extremas.

Nuestro estudio se centró en las proteínas de *shock térmico* entre extremófilos, específicamente las llamadas pequeñas proteínas de *shock térmico* o sHSP. El objetivo fue mostrar estadísticamente que ellas difieren significativamente en sus contenidos de ciertos aminoácidos claves para su estabilidad en altas temperaturas, según la temperatura del hábitat del organismo al cual pertenecen. Los microorganismos del estudio, veinticuatro diferentes especies de bacterias y archaea, se dividieron en cuatro grupos: los mesófilos cuya temperatura óptima es cercana a los 30°C, los termófilos con temperaturas óptimas entre 55°C y 60°C, los hipertermófilos entre 70°C y 85°C, y los muy hipertermófilos con temperaturas óptimas mayores de 90°C.

Se escogió estudiar las pequeñas proteínas de *shock térmico* porque son chaperonas comunes a los diferentes organismos y son muy importantes para la supervivencia en altas temperaturas y la adquisición de termotolerancia. Además se eligieron organismos de los dominios bacteria y archaea, repartidos de seis en seis en los cuatro grupos (Tabla 1). Las *archaea* son microorganismos unicelulares cuyo genoma se encuentra más emparentado con el de los eucariontes - animales, plantas- que con el de las bacterias, siendo que morfológicamente son muy similares y se encuentran, en ambas, adaptaciones a rangos de temperatura bastante amplios. Por otra parte, son objeto de muchas aplicaciones en procesos biotecnológicos.

Las secuencias de aminoácidos en cada proteína se encuentran en la base de datos de la *National Center for Biotechnology Information*, llamada *GenBank* Internet.

Nuestros hallazgos

Se conoce que hay ciertos aminoácidos que por su naturaleza le confieren estabilidad a las proteínas, y hay aminoácidos que se presentan más en termófilos que en mesófilos. En este estudio mostramos, en efecto, que los aminoácidos glutamato y arginina se presentan con mayor frecuencia en las pequeñas proteínas de *shock térmico* de los organismos que habitan en las temperaturas mayores (70-87°C y de 90-103°C) que en los que habitan las temperaturas menores (37-39°C y de 55-60°C).

El glutamato y la arginina son aminoácidos de carga negativa y positiva, respectivamente, y reportes anteriores enuncian que los hipertermófilos presentan un contenido de aminoácidos con carga eléctrica mayor que los mesófilos, aumentando la disposición de los puentes salinos que mantienen estable la estructura tridimensional de las proteínas. Se enuncian otros quince posibles factores fisicoquímicos que afectan la termoestabilidad, entre ellos la estabilización del dipolo de las hélices, la cual mantiene estable la estructura terciaria de la proteína [4,5]. Como las sHSP contienen hélices alfa, esto explicaría, en parte, un posible mecanismo de estabilización de estas proteínas.

Por otra parte, mostramos que los aminoácidos glutamina, treonina y asparagina presentan una frecuencia significativamente reducida en los organismos hipertermófilos, en relación con los mesotermófilos. La glutamina y la asparagina tienen reacciones que desestabilizan las proteínas, luego la reducción en el contenido de estos aminoácidos es un indicativo de que las diferencias entre estos aminoácidos sí tienen

un significado biológico, que puede estar relacionado con un tipo de estrategia para evitar reacciones desestabilizantes.

Con respecto al aminoácido glicina, a pesar de encontrar diferencias significativas entre los cuatro grupos, no se encontró que se siguiera el orden de los rangos de temperaturas establecidos -de mayor a menor temperatura o viceversa-, por lo que se sugiere que el contenido de este aminoácido que difiere entre los grupos de microorganismos sigue otros criterios. En este estudio sólo se observó la relación entre los grupos formados por rangos de temperatura y el contenido de aminoácidos pero, como se mencionó, la temperatura no es el único tipo de estrés que puede determinar la naturaleza de las sHSP. Hay muchos otros tipos de estrés y, siendo estos microorganismos de una ecología tan variada, puede estar interviniendo un factor que no se está tomando en cuenta dentro del estudio. Por ejemplo, muchas de las *archaeas* hipertermófilas también viven en ambientes muy ácidos, luego el pH puede ser un factor no medido que estaría afectando los resultados [5].

Aunque las sHSP son proteínas muy conservadas y existe una alta homología entre las de las *archaea* y las de las bacterias, se quiso comprobar si había interacción entre el contenido de aminoácidos y el dominio de los microorganismos -*archaea* o eubacteria-. Sólo se encontró interacción para la metionina, que es más abundante en las proteínas de las *archaea*. Este resultado corrobora reportes de dominios ricos en metionina en la HSP60 de *Thennococcus litoratis* y de otras *archaea* [8], aunque las razones de esta diferencia no se conocen aún.

El estudio corrobora resultados anteriores que sugieren que algunas sHSP, en su evolución, han incrementado su

termoestabilidad con cambios en el contenido de ciertos aminoácidos, como el glutamato, la arginina, la glutamina, la treonina y la asparagina. Las sHSP son proteínas muy importantes para mantener la viabilidad de ciertas células al conservar la estabilidad durante un choque térmico. Parecen tener actividad chaperona, que pliegan proteínas nuevas y denaturadas, las ayudan a mantenerse en un estado competente, durante períodos de estrés, para poder ser plegadas de nuevo, luego del *shock térmico*. De esta manera son responsables, en parte, de la termotolerancia adquirida por algunos microorganismos, aunque los mecanismos son aún desconocidos.

REFERENCIAS

- [1] Tosco A. Birolo L., Madonna S., Lolli G., Sannia G. y Marino G. "GroEL from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125: molecular characterization and gene cloning" *Extremophiles* 7:17-28 (2003)
- [2] Gusev N.B., Bogatcheva N. V. y Marston S.B. "Structure and Properties of Small Heat Shock Proteins (sHsp) and Their Interaction with Cytoskeleton Proteins" *Biochemistry* 67:613-623 (2002)
- [3] Kyu K., Kim R. Y Kim S.H. "Crystal structure of a small heat-shock protein" *Nature* 394:595-599 (1998)
- [4] Das R. y Gerstein M. "The Stability of Thermophilic Proteins a study based on comprehensive genome comparison" *Functional Integrated Genomics* 1:76-88 (2000)
- [5] Nelson D. y Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3a ed Worth Publishers. 2000
- [6] Madigan M., Martinko J. y Parker J. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8ª ed. Prentice Hall, 1999.

[7] Feder M. E. "Heat-shock proteins, Molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology" Annual review of physiology 61:243-282 (1999).

[8] Mogk A. Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rudiger S. Roder D., Langen H. y Bukau B. "Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by Dnak and ClpB". The EMBO Journal. 18:6934-6949 (1999)

[9] Llorce O., Galán A., Carrascosa J.L., Muga A., y Valpuesta J.M. "GroEL Under Heat-Shock: Switching from a Holding to a Storing Function". The Journal of Biological Chemistry. 273: 32587-32594 (1998)

[10] Johnson J. L y Creing E.A. "Protein Folding In vivo: Minireview Unrevealing Complex Pathways". 90: 201-204 (1997)

[11] Levy-Rimler G., Bell R., BenTal N., Azem A. "Type I chaperonins: not all are created equal" FEBS Letters 2002.