

16 DE OCTUBRE DE 2003

Investigadores crean un nuevo atlas de proteínas de levadura

Mediante el uso de robots de alta tecnología y laboriosas metodologías a la antigua, investigadores del Instituto Médico Howard Hughes identificaron las localizaciones celulares de 4.000 proteínas y midieron sus cantidades.

Las proteínas son los caballitos de batalla moleculares de la célula. Catalizan reacciones, transportan moléculas dentro de la célula y activan y desactivan genes. La medición de la cantidad y la identificación de las localizaciones celulares de proteínas de levadura serán inestimables para comprender la compleja biología de un organismo relativamente simple. Más allá de eso, sin embargo, el esfuerzo simboliza un cambio en la investigación biológica, hacia la comprensión de la forma en la que los cambios en el “proteoma” -que es la red global de interacción de proteínas en una célula- pueden influir en el “comportamiento celular”.

Los equipos de investigación conducidos por los investigadores del HHMI, Erin K. O'Shea y Jonathan S. Weissman, ambos en la Universidad de California, en San Francisco, publicaron dos artículos de investigación que describen su trabajo en el número del 16 de octubre de 2003, de la revista *Nature*.

“Ahora hemos hecho que el proteoma de levadura sea accesible de una forma que no lo era antes”, dijo Weissman. “En este momento, los investigadores pueden medir la cantidad de proteínas y seguir su localización con un grado de sensibilidad que nunca había sido posible para el proteoma de ningún organismo. Creemos que esta capacidad realmente consolida el estado de la levadura como el principal organismo para la metodología de biología de sistemas hacia una comprensión coherente y comprensiva de la forma en la que funciona la célula”.

Según los investigadores, la determinación de la cantidad relativa de proteínas en levadura ofrecerá más indicios sobre la función de las proteínas que los estudios de niveles de ARN mensajero (ARNm), que es el indicador de actividad celular más ampliamente utilizado. Las moléculas del ARN mensajero son los moldes genéticos de las proteínas. Al construir proteínas, el molde de ARNm se transcribe a partir de los genes y se transporta a los ribosomas -“fábricas” de proteínas de la célula que son grandes complejos de proteínas y de ARN-

“El problema básico es que, al final, todas las funciones de la célula son realizadas por las proteínas, y las proteínas están codificadas por el ARN mensajero”, dijo Weissman. “Pero la modificación del nivel de ARNm es sólo uno de muchos mecanismos que la célula utiliza para alterar el nivel de proteína”. Por ejemplo, la célula puede producir y procesar proteínas de muchas maneras que afecten en última instancia la composición de la molécula en funcionamiento y su cantidad. “El nivel más abundante del ARNm en una célula de levadura es de alrededor de cien moléculas, y el nivel más bajo, que no sea cero, que puede tener una célula es, por definición, uno”, dijo. “Pero el nivel funcional de proteínas en una célula puede variar enormemente, tanto como millones de veces”. Por lo tanto, la medición de los niveles de proteínas de la célula es crítica para comprender las propiedades funcionales de las proteínas.

Asimismo, el mapeo de la localización de proteínas individuales en la célula también es crítico para la comprensión de la función de las proteínas, dijo O'Shea. “Una meta importante del estudio de los genomas y de los proteomas es la comprensión de la función de cada proteína, y se puede obtener importantes indicios sobre dónde se encuentra cada proteína dentro de la célula”, dijo.

Para medir los niveles y las localizaciones de miles de proteínas de levadura individuales, los investigadores desarrollaron un método para marcar cada proteína. Sin un marcador común, la medición de proteínas individuales es casi imposible, dado que existen tantas y que cada proteína es bioquímicamente única. De este modo, los investigadores emplearon una técnica extensamente utilizada para introducir el ADN que codifica para un marcador específico en cada uno de los genes que especifican cada proteína de levadura. Para crear marcadores dianas, sintetizaron alrededor de 13.000 secuencias genéticas que unirían a uno de los marcadores al extremo de cada gen en el genoma de levaduras. Utilizaron estos marcadores específicos para marcar unos 6.234 segmentos genéticos de levaduras, llamados “marcos de lectura abiertos”.

Como resultado de la marcación de genes, los investigadores crearon dos “bibliotecas” distintas de células de levadura. Una biblioteca consistía en alrededor de 4.200 “cepas” de levaduras, cada una de las cuales producía una proteína marcada -marcada con una secuencia que hace fácil la detección-. Este método permitió que los investigadores utilizaran anticuerpos para cuantificar el nivel de proteínas de la célula. La otra biblioteca, utilizada para estudios de localización de proteínas, consistía en cepas donde cada proteína estaba marcada con una secuencia que producía una proteína verde fluorescente visible al microscopio.

“Por suerte, las células de levaduras tienen una característica peculiar que nos permite dirigir las inserciones genéticas a puntos específicos en el cromosoma”, dijo O'Shea. “De este modo, estos experimentos son especiales, en parte, porque pudimos medir las proteínas del cromosoma que se expresan bajo el control normal. Por lo tanto, se expresan a niveles fisiológicos relevantes y en lugares relevantes de la célula”.

Los estudios de la expresión proteica de los investigadores revelaron la cantidad de unas 4.251 proteínas de la célula de levadura. “Para mí, los aspectos experimentales más destacados son, primero, que podemos detectar más del ochenta por ciento de las proteínas de levadura en la célula -y esa es una gran fracción del genoma para estar expresándose al mismo tiempo-”, dijo O'Shea. “Y es igualmente interesante que podamos ver una amplia gama de cantidad de proteínas, que va desde menos de cincuenta moléculas por célula a más de un millón”. En contraste, los métodos anteriores de detección de proteínas de levadura sólo identificaban a las proteínas más abundantes, pero no podía identificar a las proteínas raras pero importantes, tales como las que activan genes.

“Simplemente no sabíamos qué porción del proteoma necesitaba la célula durante el crecimiento”, dijo Weissman. “Puede ser que hubiéramos estimado que la célula tenía muchos genes de reserva para otros propósitos. De este modo, el nivel de expresión del ochenta por ciento que detectamos fue un poco sorprendente. Además, aunque teníamos indicios de que existía una amplia gama de cantidades de proteínas, hasta que se realizaron estas mediciones, no había forma de cuantificar esa gama”.

Además de identificar muchos miles de genes funcionales, los investigadores también cuantificaron el número de “marcos de lectura abiertos falsos”, que son segmentos de ADN que parecen ser genes, pero que no lo son. Sus resultados, dijeron, concuerdan con estudios anteriores de segmentos de ADN no funcionales realizados por otros investigadores.

Lo siguiente que planean hacer los investigadores es utilizar sus bibliotecas de proteínas para explorar la forma en la que cambian los niveles proteicos a través del tiempo. La obtención de esta clase de información dinámica será crítica para los intentos de modelar la acción de las proteínas a medida que crece la célula y se adapta a condiciones cambiantes. Tales modelos darán a los biólogos el equivalente científico de una película de la maquinaria de la célula, en lugar de las fotos que se encuentran disponibles hoy en día, dijeron.

“Aunque es interesante saber la cantidad de cada proteína que está presente bajo condiciones estándares de laboratorio, lo que realmente se desea saber para comprender más sobre biología y los procesos biológicos, es cómo cambian las cantidades de proteínas en respuesta a distintas perturbaciones, como cambios en el medioambiente. O si se realiza una mutación en la célula, cómo cambiaría la cantidad de proteínas”, dijo O'Shea.

Los estudios de la localización de proteínas de los investigadores revelaron el lugar de la célula en el que se ubican unas 4.156 proteínas. Según Weissman, los estudios de localización fueron realizados en dos niveles de especificidad. “Primero, estudiamos las células utilizando técnicas de microscopía, y para muchas proteínas eso fue suficiente. Pudimos ver que muchas proteínas -más de mil- se encontraban en el núcleo o en el citoplasma”. El núcleo contiene el material genético de la célula y el citoplasma es la región llena de fluido fuera del núcleo. “Pero en otras proteínas, observamos un patrón punteado que sólo nos indicaba que la proteína estaba concentrada en un lugar específico”.

Para identificar las localizaciones de estas proteínas de forma más específica, los investigadores introdujeron genes para moléculas rojas fluorescentes que se sabía se localizaban en una u otra estructura celular específica. Tales estructuras podrían incluir las mitocondrias -central eléctrica de la célula- o el aparato de Golgi, que es una red de membranas internas de la célula. Cuando los investigadores observaron fluorescencia roja y verde en un lugar determinado, supieron que una proteína dada se concentraba en esa estructura.

Según O'Shea, los resultados de los estudios de localización fueron gratificantes, y ya están comenzando a tener un impacto. “Nos sorprendió que pudiéramos ver tantas proteínas como las que vimos, y que la calidad de los datos fuera tan buena. Además, nos sorprendió que más de mil ochocientas proteínas tuvieran al menos una parte de su localización en otros lugares que no fueran ni el citoplasma ni el núcleo. De este modo, gracias a este estudio hemos obtenido mucha información sobre nuevas funciones que podrían tener estas proteínas”.

O'Shea dijo que sus próximos estudios de localización, como los que cuantifican los niveles proteicos, se centrarán en los cambios dinámicos de la célula. “En este estudio, sólo hemos proporcionado una visión estática de la localización bajo una condición”, dijo. “Pero la localización de las proteínas es dinámica, en muchos casos, y pienso que ahora el gran desafío es utilizar esta biblioteca de cepas para estudiar la forma en la que localización de las proteínas cambia en respuesta a condiciones ambientales”.