

SEMBLANZAS DE LOS PREMIOS NOBEL

EN FISIOLÓGIA O MEDICINA 2013: TRANSPORTE DE MOLÉCULAS DENTRO Y FUERA DE LA CÉLULA

INTRODUCCIÓN

La célula, como entidad viva, es un universo muy complejo que presenta básicamente las mismas características y necesidades que tiene un organismo multicelular. Necesita incorporar materia para poder renovar sus estructuras, crecer y reproducirse, ser capaz de eliminar o reciclar productos de desecho o tóxicos, defenderse de entidades celulares extrañas, adaptarse a las condiciones ambientales desfavorables y establecer comunicación con otras células. Sin embargo, toda esa complejidad se encuentra reducida a un compartimento rodeado de membrana, que asegura las condiciones para que puedan tener lugar de manera eficiente la multitud de reacciones químicas necesarias para la realización de sus funciones. Las células eucariotas, poseen en su interior compartimentos o sistemas internos de membrana, donde se verifican reacciones o rutas bioquímicas particulares, aisladas total o parcialmente de interferencias. Estos compartimentos intracelulares son los denominados orgánulos subcelulares. Así, existen orgánulos implicados en la producción de energía, en la síntesis de nuevas moléculas (enzimas, hormonas, neurotransmisores, etc.), en la (re)construcción de la estructura celular, etc. Por tanto, la célula, lejos de ser un mero embolsamiento donde se acumulan y "flotan" los orgánulos, es un espacio con una elevada densidad de moléculas y estructuras compartimentalizadas, que mantienen un intercambio preciso espacial y temporal con el medio intra y extracelular. Este intercambio intenso y continuo o tráfico de sustancias, se mantiene mediante la formación de vesículas rodeadas de membrana que transportan moléculas desde un lugar de procedencia a un lugar de destino. Para ello es necesario que exista un complejo proceso de fusión de membranas entre la vesícula y el compartimento de destino, para que la vesícula pueda hacer entrega de su contenido molecular

en el interior de dicho compartimento o en el espacio extracelular. Todo este proceso se define como tráfico vesicular.

El Nobel de Fisiología o Medicina de 2013, ha premiado las investigaciones de Rothman, Schekman y Südhof, relativas al descubrimiento de la maquinaria molecular implicada en el tráfico vesicular entre compartimentos subcelulares y en concreto los mecanismos que aseguran la correcta descarga del contenido de las vesículas con precisión en espacio y tiempo. Ante estos sorprendentes mecanismos moleculares cabe preguntarse ¿cómo saben las vesículas transportadoras dónde o con qué membrana tienen que fusionarse? y ¿cómo saben las vesículas el momento preciso en el que deben fusionarse?

PREMIO NOBEL EN FISIOLÓGIA O MEDICINA 2013

El 7 de octubre de 2013, el Comité Nobel del Instituto Karolinska, concedió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2013 a los Doctores JAMES E. ROTHMAN, RANDY W. SCHEKMAN y THOMAS C. SÜDHOF por sus descubrimientos sobre la maquinaria celular que regula el tráfico de moléculas en el interior de vesículas, el principal sistema de transporte en la célula. Esto significa un cambio paradigmático en el conocimiento de cómo la célula eucariota, con su compleja compartimentación interna, organiza la ruta de moléculas empaquetándolas en vesículas y enviándolas hacia diversos destinos celulares o hacia el espacio extracelular. La especificidad en el envío de la carga molecular es esencial para la función y supervivencia celulares. Esta especificidad se requiere, por ejemplo, para la liberación de neurotransmisores en la región presináptica de una célula nerviosa, que transmite una señal a otra célula nerviosa cercana. También, la especificidad se requiere para exportar hormonas, tales como la insulina al medio extracelular.

Los trabajos de Rothman se centraron en las proteínas implicadas en el mecanismo de reconocimiento (*tethering*), atraque (*docking*) y fusión de vesículas en sistemas de membranas: las SNARE, complexinas y sinaptotagmina. Rothman, en colaboración con Südhoff,

estudiaron el mecanismo, dependiente de calcio, de sincronización de la liberación de neurotransmisores en la exocitosis regulada, y describieron ciertas proteínas en neuronas: la syntaxina, la sinaptobrevina y las SM. La aportación de Steckman, más centrada en los genes implicados en el proceso de secreción, permitió establecer ciertos conceptos y aislar algunos elementos de esta vía, como por ejemplo la vesícula revestida COPII que interviene en el tráfico anterógrado entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi.

La investigación básica desarrollada por estos investigadores, ahora reconocida por el Comité Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo, no sólo tiene implicaciones para la dinámica y supervivencia de las células individuales, sino también para los organismos pluricelulares formados por ellas. Es más, por ser organismos formados por multitud de células espe-

cializadas, éstas requieren mecanismos de señalización que aseguren la comunicación y la coordinación entre tejidos y órganos. Por ejemplo, la actividad del sistema nervioso depende de la acumulación en el espacio y la liberación en un momento concreto de neurotransmisores transportados por las vesículas, necesarios para establecer la sinapsis. La ausencia de vesículas o la liberación descontrolada temporalmente de los neurotransmisores proporciona alteraciones.

Aunque se conocía desde hace tiempo el papel crítico que jugaban las vesículas en el interior de la célula en el esquema del transporte molecular, el mecanismo preciso que utilizaban estas vesículas para encontrar su destino correcto y cómo se fusionaban con las membranas de los orgánulos o con la membrana plasmática, para enviar su carga molecular en el momento exacto, permanecía aún sin resolver. Los estudios de los tres investigadores



JAMES E. ROTHMAN nació en 1950 in Haverhill, Massachusetts, EEUU. Obtuvo su grado de Doctor en 1976, en la Escuela de Medicina de Harvard. Posteriormente, como becario postdoctoral se incorporó al Instituto de Tecnología de Masachusetts y en 1978 se trasladó a la Universidad Stanford en California, donde empezó sus investigaciones sobre las vesículas de la célula. Rothman ha trabajado también en la Universidad de Princeton en el Instituto del cáncer del Memorial Sloan-Kettering y en la Universidad de Columbia. En 2008, se trasladó a la Universidad de Yale en New Haven, Connecticut, donde en la actualidad es Profesor y Chairman en el Departamento de Biología Celular.

RANDY W. SCHEKMAN nació en 1948 en St Paul, Minnesota, EEUU, estudió en la Universidad en Los Ángeles y en la Universidad de Stanford, donde obtuvo su PhD en 1974 dirigido por Arthur Kornberg (Premio Nobel 1959) y donde unos años más tarde se le uniría Rothman. En 1976, Schekman se trasladó a la Universidad de California en Berkeley, donde en la actualidad es Profesor en el Departamento de Biología Celular y Molecular. Schekman es también investigador en el Instituto de Medicina Howard Hughes.



THOMAS C. SÜDHOF nació en 1955 en Göttingen, Alemania. Estudió en la Universidad Georg-August en Göttingen, donde recibió el grado de MD en 1982 y el doctorado en neuroquímica el mismo año. En 1983, se trasladó a la Universidad de Texas Southwestern Medical Center en Dallas, Texas, EEUU, como becario postdoctoral con Michael Brown and Joseph Goldstein (que compartieron el Nobel de Fisiología o Medicina 1985). En 1991 Südhof consigue ser investigador en Instituto de Medicina Howard Hughes y posteriormente, en 2008, Profesor de Fisiología Celular y Molecular en la Universidad de Stanford.

galardonados este año, han proporcionado avances de gran importancia en el conocimiento de este relevante aspecto de la fisiología celular.

Randy Schekman utilizó la genética de la levadura para identificar un grupo de genes críticos para el tráfico vesicular y demostró que estos genes son esenciales para la vida y pueden clasificarse en tres categorías reguladoras de diferentes aspectos del transporte vesicular. James Rothman identificó proteínas que forman un complejo funcional que controla la fusión celular. Las proteínas de la vesícula y las de la membrana del compartimento de destino, se unen en combinaciones específicas que aseguran el envío preciso de la carga molecular en el lugar y momento correctos. Thomas Südhof se interesó por el control de la maquinaria de fusión de la vesícula. El desentrañó el mecanismo responsable de que los iones calcio desencadenaran la liberación de neurotransmisores e identificó los componentes reguladores clave en la maquinaria de fusión vesicular. Juntos, Rothman, Schekman y Südhof han transformado nuestro conocimiento acerca del transporte de las moléculas a destinos específicos dentro o fuera de la célula. Sus descubrimientos han aclarado un viejo enigma en la biología celular y arrojan nueva luz al hecho de que cualquier alteración en esta maquinaria puede tener efectos deletéreos y contribuir a condiciones patológicas tales como enfermedades neurológicas e inmunológicas y la diabetes.

TRAFICO DE MOLÉCULAS EN EL INTERIOR DE VESÍCULAS

Las células eucariotas difieren de las procariontas en que poseen una organización intracelular más compleja. En eucariotas, las funciones celulares específicas se encuentran en compartimentos (núcleo y orgánulos), rodeados de membranas intracelulares. Esta compartimentación mejora de manera importante la eficiencia de muchas funciones celulares y previene que moléculas potencialmente dañinas circulen libremente en el interior de la célula. Los diferentes compartimentos no solo necesitan intercambiar moléculas específicas, sino también, algunas de dichas moléculas tienen que ser enviadas al espacio extracelular. Como la mayoría de las moléculas son demasiado grandes para atravesar directamente las membranas, se requiere un mecanismo que asegure el envío específico de esta carga molecular (Figura 1).

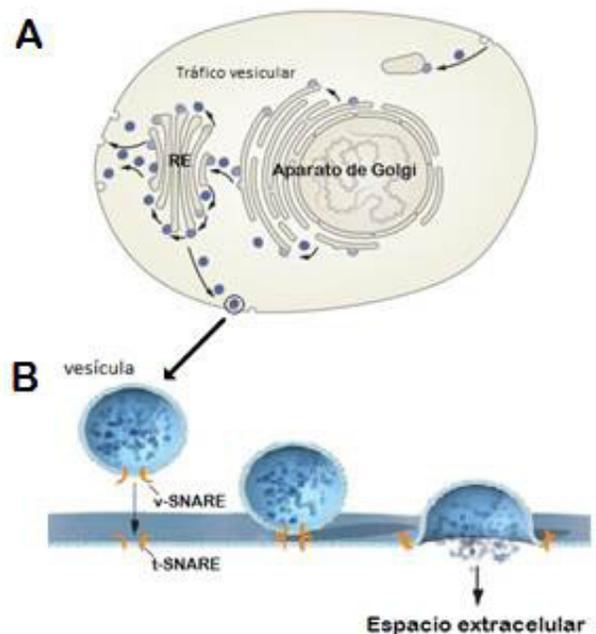


Figura 1. Las células del organismo poseen una organización compleja en la que las funciones celulares específicas están distribuidas en los diferentes compartimentos denominados orgánulos. A: las moléculas producidas en la célula se empaquetan en vesículas y se transportan con precisión espacial y temporal a los lugares correctos dentro y fuera de la célula. B: complejo proteico (v-SNARE y t-SNARE) descubierto por Rothman que capacita a las vesículas a fusionarse con sus membranas de destino. Las proteínas de las vesículas, v-SNARE, se unen a proteínas específicas complementarias en la membrana del objetivo, t-SNARE, asegurando que esta fusión se verifica en el lugar correcto y que la carga molecular se entrega en el destino apropiado, en el momento oportuno (RE, retículo endoplásmico). (Zierathy Lendahl modificado).

Los misterios de la compartimentación celular han intrigado a los científicos desde hace mucho tiempo. Las técnicas de microscopía óptica ayudaron a esclarecer algo de la organización intracelular de las células eucariotas, pero ha sido la microscopía electrónica y las nuevas técnicas de tinción, combinadas con ensayos de fraccionamiento subcelular y ultracentrifugación diferencial, lo que ha conducido a un conocimiento más profundo de la vida interna de la célula. Albert Claude, George Palade y Christian de Duve (Premios Nobel en Fisiología o Medicina, 1974), fueron pioneros en estas investigaciones y sus estudios pusieron de manifiesto muchos aspectos de la organización interna de la célula. Ellos demostraron que las proteínas secretoras sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE) son transportadas al complejo de Golgi (Camilo Golgi, Premio Nobel 1906).

Investigaciones posteriores descifraron el mecanismo utilizado por las proteínas para encontrar su destino

apropiado. Günter Blobel (Premio Nobel en Fisiología o Medicina 1999), descubrió que las proteínas poseen señales intrínsecas que gobiernan su transporte y localización en la célula. A pesar de estos progresos, todavía quedaba pendiente una cuestión: ¿cómo moléculas tales como, hormonas, proteínas de transporte y neurotransmisores, se dirigen de manera correcta a su destino apropiado en el momento exacto? Los trabajos de Palade pusieron de manifiesto que el tráfico de las proteínas secretoras desde el retículo endoplásmico, era llevado a cabo mediante vesículas pequeñas rodeadas de membrana, que surgían de una membrana y se fusionaban con otra. Pero, a pesar de este nuevo avance, aún permanecía enigmático cómo se adquiría la precisión en este proceso.

GENES IMPLICADOS EL TRÁFICO VESÍCULAR

Randy Schekman, que adquirió su especialización en bioquímica en el laboratorio de Arthur Kornberg (Premio Nobel 1959), decidió utilizar los genes de la levadura (*Sacharomyces cerevisiae*) para estudiar los mecanismos implicados en el tráfico de las vesículas. Schekman observó que la levadura secreta glicoproteínas y utilizó este modelo para estudiar los genes implicados en este transporte. Consiguió identificar los genes que regulan el transporte intracelular y observó que algunas mutaciones en estos genes podían ser letales. Para evitar el problema de la letalidad utilizó mutantes sensibles a la temperatura donde exploró aquellos genes que afectaban el acúmulo intracelular de los enzimas secretores.

En una exploración inicial Schekman identificó dos genes, *sec1* y *sec2*, pero posteriormente llegó a identificar 23 genes, que agrupó en tres clases diferentes en base al acúmulo de membranas como reflejo del bloqueo en el tráfico desde el retículo endoplásmico (RE) al complejo de Golgi, o en el caso específico de *sec1*, a la superficie celular. La secuencia de los eventos post-traduccionales implicados en la exportación de glicoproteínas de la levadura fue determinada con la ayuda de mutantes que afectaban el aparato secretor. Mediante un posterior estudio genético y morfológico de estos mutantes, Schekman descubrió intermediarios vesiculares en el tráfico entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Además, los mutantes *sec17* y *sec18* acumulaban pequeñas vesículas lo que implicaba un papel en la fusión vesicular.

De esta manera Schekman proporcionó una base genética para el tráfico y fusión de las vesículas al identificar genes reguladores clave de estos procesos, y desenmarañó de manera sistemática los acontecimientos a lo largo de las vías secretoras implicadas en el tráfico vesicular y en la interacción de dichas vesículas con las membranas del compartimento de destino.

PROTEÍNAS CLAVE EN EL PROCESO DE FUSIÓN

James Rothman emprendió un nuevo planteamiento con su grupo, en la Universidad de Stanford, en el que desarrolló un ensayo de reconstitución *in vitro* del mecanismo de transporte, para analizar los eventos implicados en el intercambio intracelular de las vesículas. De esta manera consiguió purificar los componentes esenciales del proceso de fusión vesicular. Como en los 1970 era difícil expresar genes en células animales, Rothman se aprovechó de un sistema basado en el virus de la estomatitis vesicular (VSV) que había aprendido en el laboratorio de Harvey Lodish, en el Instituto de Tecnología de Massachusetts. En este sistema se producían grandes cantidades de una proteína vírica particular en células infectadas, la proteína VSV-G. Una característica de este sistema es que la proteína VSV-G está marcada por la modificación de un azúcar particular cuando alcanza el compartimento de Golgi, lo cual hace posible identificarla cuando llega a su destino. Rothman publicó una serie de artículos donde describía la reconstitución del transporte intracelular de la proteína VSV-G dentro del complejo de Golgi. Utilizando este ensayo estudió la formación y fusión de las vesículas y purificó las proteínas citoplasmáticas requeridas para el transporte. La primera proteína purificada fue el factor sensible a la N-etilmaleimida (NSF). El descubrimiento de NSF preparó el camino para la identificación posterior de otras proteínas importantes para el control de la fusión vesicular. La siguiente fue SNAP (proteína soluble de unión al NSF), que se une a membranas y ayuda al reclutamiento del NSF. Un punto importante de convergencia entre los trabajos de Schekman y Rothman fue descubrir que uno de los productos del gen *sec18* mutante de la levadura, correspondía al NSF, lo que revelaba que la maquinaria implicada en la fusión de las vesículas era muy antigua desde el punto de vista evolutivo. Además, Rothman y Schekman en colaboración, clonaron el gen *sec17* y pusieron en evidencia su equivalencia funcional con SNAP. Por otros métodos se demostró que otros genes *sec* se

correspondían a genes que codificaban proteínas de fusión.

Utilizando las proteínas NSF y SNAP como cebo, Rothman posteriormente volvió al tejido cerebral de donde purificó proteínas, entre ellas las denominadas SNARE (*soluble NSF-attachment protein receptors*). Curiosamente, tres proteínas SNARE, VAMP/sinaptobrevina, SNAP-25 y syntaxina, se encontraron en cantidades estequiométricas, lo que hizo pensar a Rothman que funcionaban juntas en la vesícula y en las membranas del orgánulo de destino. Aunque estas tres proteínas habían sido identificadas por Richard Scheller, Kimio Akagawa, Reinhard Jahn y Pietro de Camilli, y localizadas en la región presináptica, su función se desconocía totalmente. La proteína VAMP/sinaptobrevina residía en la vesícula, mientras que la SNAP-25 y la syntaxina se encontraban en la membrana plasmática. Estos hallazgos llevaron a Rothman a proponer una hipótesis "la hipótesis SNARE" que especificaba que las proteínas SNARE de la vesícula (v-SNARE) y la del objetivo (t-SNARE) eran críticas para la fusión vesicular mediante una serie de etapas secuenciales de atraque (*docking*), activación y fusión sinápticas.

Para comprobar la hipótesis SNARE, Rothman utilizó un ensayo de reconstitución *in vitro* y consiguió revelar que las proteínas SNARE podían, de hecho, fusionar membranas. De esta manera puso en evidencia que el sistema tenía un elevado grado de especificidad, de tal manera que una t-SNARE solo interactuaría con una o unas pocas entre el gran número de v-SNARE potenciales (Figura 1). La hipótesis SNARE fue crítica para estimular la investigación en este campo y la esencia de la hipótesis, con su énfasis en la interacción entre v-SNARE y t-SNARE,

ha resistido la prueba del tiempo, y ya ha sido clarificado su mecanismo por varios grupos de investigación.

Rothman analizó los mecanismos del transporte y fusión vesiculares y mediante estudios bioquímicos propuso un modelo para explicar cómo ocurre la fusión de las vesículas con la especificidad requerida.

PROCESOS QUE CONTROLAN LA FUSIÓN VESICULAR

Thomas Südhof procedente de la Universidad Georg-August y del Instituto Max-Planck de Ciencias Biológicas en Göttingen (Alemania), fue becario postdoctoral con Michael Brown y Joseph Goldstein (Premio Nobel 1985) en la Facultad de Medicina de la Universidad de Texas en Dallas (EEUU). Como líder de un grupo joven, comenzó a estudiar el control de la función de la vesícula sináptica. Rothman y Schekman habían proporcionado la maquinaria fundamental para la fusión vesicular, pero faltaba ahora encontrar cómo se controlaba espacial y temporalmente esa fusión vesicular. Las fusiones vesiculares tienen que ser ejecutadas con alta precisión en respuesta a estímulos específicos. Este es el caso, de la liberación de los neurotransmisores en el cerebro, y la secreción de insulina desde el páncreas endocrino.

El campo de la neurofisiología tuvo importantes avances con los descubrimientos de Bernard Katz, Ulf von Euler y Julius Axelrod (Premios Nobel 1970), concernientes a los transmisores humorales en los terminales nerviosos y el mecanismo para su almacenamiento, liberación e inactivación. Südhof estaba intrigado por la rápida exocitosis de las vesículas sinápticas, la cual estaba bajo un estricto control temporal, regulada por los cambios en la concentración citoplasmática de calcio libre. Südhof observó el papel del calcio como regulador de la liberación de los neurotransmisores en las neuronas y

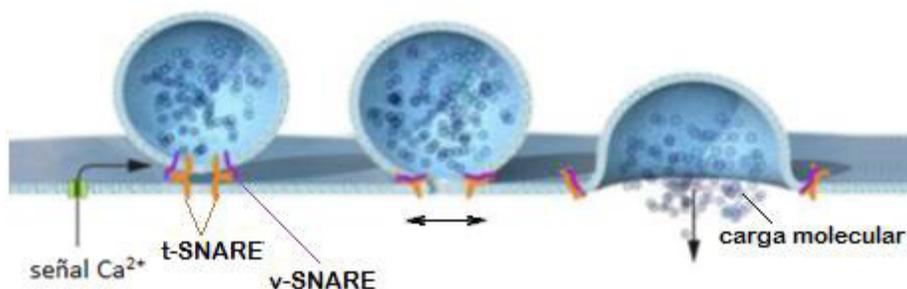


Figura 2. Los estudios de Südhof han demostrado cómo se verifica la transmisión de señales de una célula nerviosa a otra en el cerebro y cómo el calcio controla este proceso. Estos estudios identificaron la maquinaria molecular sensible a los iones calcio, que convierte esta información a lo que corresponde a la fusión vesicular, y explica cómo se consigue la precisión temporal para que las vesículas puedan liberarse de su carga molecular. (Zierath, y Lendahl, 2013)

descubrió que la complexina y la sinaptotagmina son dos proteínas críticas en la fusión vesicular mediada por calcio (Figura 2).

La complexina compite con alpha-SNAP, pero no la sinaptotagmina, por el receptor que se une a SNAP. Las neuronas de ratones knockout para la complexina, mostraron una eficiencia muy reducida en la liberación de transmisores debido a la menor sensibilidad al calcio del proceso de secreción sináptica. Esto revelaba que la complexina actúa en una etapa tardía en la fusión sináptica, como un mecanismo de sujeción, que previene la fusión constitutiva y permite que se verifique la exocitosis regulada. Südhof descubrió también que la sinaptotagmina-1 interviene acoplando el calcio a la liberación del neurotransmisor. La sinaptotagmina-1 interactúa con fosfolípidos de manera dependiente del calcio, como también con la syntaxina-1 y con los receptores SNARE, y Südhof estableció un papel para la sinaptotagmina-1 como un sensor del calcio para la rápida fusión sináptica, demostrando que la unión del calcio a la sinaptotagmina-1 participa en el desencadenamiento de la liberación de neurotransmisores en la sinápsis. Südhof caracterizó también el gen *Munc18-1*, que se corresponde con el gen *sec-1* de Schekman y de ahí recibe su nombre proteína SM (Sec/Munc), y encontró que Munc18-1 interacciona con la syntaxina y que más tarde abraza al complejo trans-SNARE. Se sabe ahora que las proteínas SM son una parte integral del complejo proteico implicado en la fusión de las vesículas, junto con las proteínas SNARE. Südhof también demostró que la delección de Munc18-1 en ratón producía una pérdida completa de la secreción de neurotransmisores a partir de las vesículas sinápticas.

Südhof realizó descubrimientos críticos que han proporcionados avances importantes en el conocimiento del control en espacio y tiempo de la fusión de las vesículas y desentrañó las vías dependientes del calcio que regulan la liberación de los neurotransmisores en la sinapsis (Figura 2).

PROTEÍNAS SNARE, EL CORAZÓN DE LA FUSIÓN DE MEMBRANAS

Las células se encuentran rodeadas por una bicapa lipídica, la membrana plasmática, que la separa del medio circundante. Además de esta membrana, las células eucariotas poseen corpúsculos u orgánulos intracelulares, también rodeados de membranas lipídicas internas, que

demarcan los diversos compartimentos intracelulares: el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas, entre otros. Estos compartimentos se encuentran especializados en la ejecución de determinadas funciones, tales como, síntesis de proteínas, hidrólisis de proteínas, reacciones metabólicas, etc.

La presencia de tales compartimentos u orgánulos y su especialización funcional constituyen características fundamentales de las células eucariotas, que las distinguen de las células procariotas tales como las bacterias. Las ventajas evolutivas que ofrecen esta compartimentación celular se refleja en la gran variedad de células eucariotas que existen en la naturaleza, que van desde las levaduras hasta las neuronas.

La mayoría de las funciones específicas de cada orgánulo intracelular son ejecutadas por proteínas que residen en su interior o en la membrana. Se requiere, por tanto, el transporte de estas proteínas y de sus sustratos, hasta los compartimentos correspondientes. Este transporte corre a cargo de vesículas lipídicas que se forman en un compartimento y se fusionan en otro, cediendo su carga molecular en este último. Por ejemplo, las proteínas que han de residir en la membrana del aparato de Golgi, se sintetizan en los ribosomas y se insertan, primero en la membrana del retículo endoplásmico, luego se “empaquetan” en el interior de las vesículas que se forman en el retículo endoplásmico y por último, estas vesículas portadoras de la carga molecular se trasladan hacia su destino, se fusionan con la membrana del aparato de Golgi y ceden las moléculas que transportan al interior de dicho aparato (Figura 3).

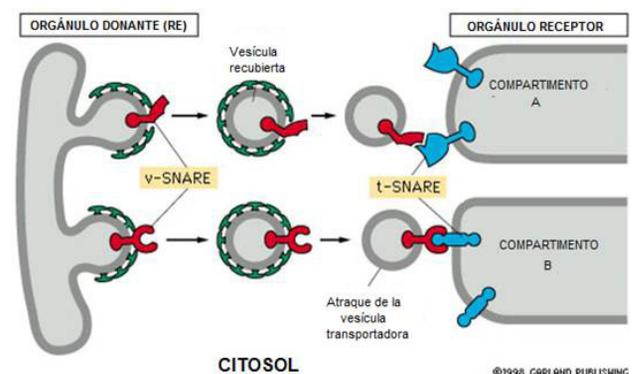


Figura 3. Las vesículas se forman a modo de brote en la membrana del orgánulo donante RE (retículo endoplásmico), llevando anclado en su membrana a v-SNARE. La vesícula desprendida y recubierta, viaja a través de los microtúbulos celulares hacia el orgánulo receptor. Una vez que ha perdido la cubierta se inserta en el compartimento receptor, o de destino, mediante la unión de v-SNARES y t-SNARES. (Garland Pub 1998)

En otros procesos operan mecanismos similares. Por ejemplo, en la secreción al medio extracelular de pequeñas moléculas con funciones diversas, se encuentra la liberación de neurotransmisores para la comunicación entre neuronas y para el funcionamiento del cerebro. Los neurotransmisores se empaquetan a elevadas concentraciones en el interior de vesículas lipídicas que se forman en los terminales presinápticos de las neuronas. Los neurotransmisores se liberan posteriormente mediante la fusión de las membranas de estas vesículas con la membrana plasmática (exocitosis). Los neurotransmisores liberados se unen, entonces, a receptores alojados en las membranas de otras neuronas próximas, iniciándose de esta manera una respuesta en las mismas. Estos y otros ejemplos indican que los procesos de fusión de membranas intracelulares constituyen una gran parte de la biología de las células y de los organismos que las poseen.

Desde el descubrimiento de las proteínas SNARE, estas proteínas han sido reconocidas como los componentes clave de los complejos proteicos que gobiernan la fusión de las membranas. A pesar de la considerable divergencia en las secuencias de las proteínas SNARE, su conservado mecanismo se adapta a reacciones de fusión tan diversas como las implicadas en el crecimiento celular, reparación de membranas, citocinesis y transmisión sináptica.

DESCUBRIMIENTO Y ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS SNARE

Fue en los 1980, cuando se caracterizaron las proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), y se identificaron como elementos clave en la fusión de las membranas. Aunque con alguna que otra discrepancia, hoy se considera que las proteínas SNARE median la fusión de las membranas en todas las etapas transportadoras de la vía secretora, mediante un modelo mecanístico molecular apoyado por numerosas evidencias. De acuerdo con este modelo, las proteínas SNARE, que se localizan en membranas opuestas promueven la fusión de las membranas utilizando la energía libre liberada durante la formación de un haz de cuatro alfa-hélices.

La formación de este haz conduce a una estrecha conexión de las membranas destinadas a fusionarse, e inicia su fusión. El reciclaje de las SNARE se consigue mediante la disociación del agrupamiento de las hélices,

mediada por la proteína AAA+ NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), una ATPasa.

Las proteínas SNARE forman una superfamilia de proteínas pequeñas con 25 miembros en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, 36 miembros en humanos y 54 miembros en la crucifera *Arabidopsis thaliana*. Poseen una estructura de simples dominios y un motivo característico SNARE, evolutivamente conservado, de 60–70 aminoácidos dispuestos en heptadas repetidas. En su región C-terminal la mayoría de las proteínas SNARE poseen un dominio transmembrana unido al motivo SNARE mediante una conexión corta al extremo carboxilo, mientras que al extremo amino de dicho motivo pueden añadirse diversos dominios que constituyen la principal fuente de variabilidad entre las proteínas SNARE. Existen, no obstante, algunas excepciones a este patrón estructural. Es el caso de las brevinas, que carecen de dominio aminoterminal, o de SNAP-25 (*25-kDa synaptosome-associated protein*), una SNARE neuronal que carece de dominio transmembrana, pero que posee dos motivos SNARE unidos por un región conectora palmitoilada que posibilita su anclaje a las membranas celulares (Figura 4).

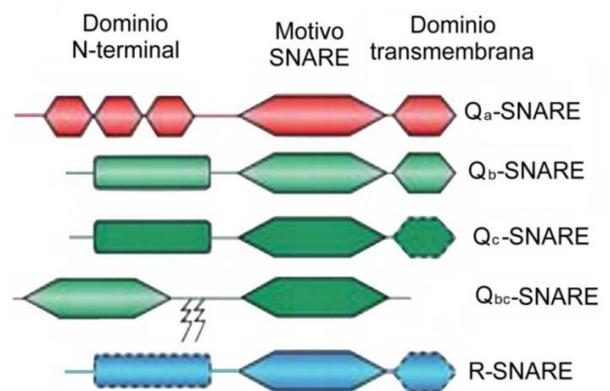


Figura 4. Estructura de las proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor—NSF— attachment protein receptor*). Organización de los dominios en las distintas familias o tipos de proteínas SNARE (Qa, Qb, Qc, Qbc y R). Aquellas regiones limitadas por líneas discontinuas representan dominios cuya presencia no es constante en todos los miembros de la familia. (Fashauer et al. 1998, modificado)

MOTIVOS SNARE

La formación del complejo de fusión de las proteínas SNARE en las membranas que van a fusionarse, está mediada por los motivos SNARE. Los motivos SNARE carecen de una estructura definida en los monómeros de

las proteínas; sin embargo, cuando las proteínas SNARE entran en contacto, sus motivos SNARE adoptan espontáneamente la conformación de hélice alfa formando complejos de extraordinaria estabilidad constituidos por 4 hélices alfa entrelazadas o superhélices, en los que cada hélice corresponde a un motivo SNARE diferente: sinaptobrevina/VAMP, syntaxina y SNAP-25 (Figura 5A).

En el interior del haz formado por estas 4 hélices alfa se sitúan 16 capas o anillos (numerados desde -7 hasta +8, comenzando por el extremo amino) integrados por las cadenas laterales de aminoácidos pertenecientes a los distintos motivos SNARE. Estos anillos son de carácter hidrofóbico con la excepción del anillo en posición media (capa «0») que contiene tres residuos de glutamina (Q) y uno de arginina (R) (Figura 5B). Atendiendo a la presencia de estos aminoácidos, las proteínas SNARE se clasifican en Q y en R. A su vez, dependiendo de la posición del motivo SNARE, en el seno de la proteína, las SNARE Q se subdividen en Qa, Qb y Qc y Qbc, debiendo asociarse siempre en combinaciones heteroméricas plenas (QaQbQcR o QaQbcR) y disponerse de forma paralela para poder constituir complejos productivos, capaces de inducir la fusión de las membranas. Como ya se ha mencionado, el dominio aminoterminal de la proteína SNARE constituye la región de mayor variabilidad, cumpliendo funciones diversas entre las que se encuentran la de plegarse sobre el motivo SNARE, forzando una conformación “cerrada” de la proteína (syntaxina), que impide su participación en los complejos de fusión, y la de mediar la interacción con proteínas como las SM. La formación del complejo de fusión tiene lugar, probablemente, en dos etapas, consistentes en la formación de un complejo intermediario QaQbQc en la membrana plasmática y la posterior asociación con una SNARE R vesicular. Este ensamblaje secuencial se vería favorecido por el hecho de que las proteínas SNARE Q no se distribuyen uniformemente en la membrana plasmática sino que se agrupan en regiones ricas en colesterol sobre las que las vesículas SNARE R, tenderían a fijarse, lográndose, en consecuencia, una mayor eficiencia en los procesos de fusión de membranas.

Aunque esta estructura prototipo se aplica a la mayoría de SNARE, existen importantes excepciones. Un subgrupo de SNARE, entre las que se incluyen las más jóvenes desde el punto de vista evolutivo, las brevinas, carece del dominio N-terminal. Otro subgrupo carece de dominios transmembrana, pero la mayoría de ellas

contienen modificaciones post-traduccionales hidrofóbicas que median el anclaje a las membranas. Estas SNARE incluyen un pequeño subgrupo representado por la SNARE SNAP-25 (25-kDa *synaptosome associated protein*), neuronal, que contiene dos motivos SNARE diferentes que se unen mediante una conexión flexible palmitoilada.

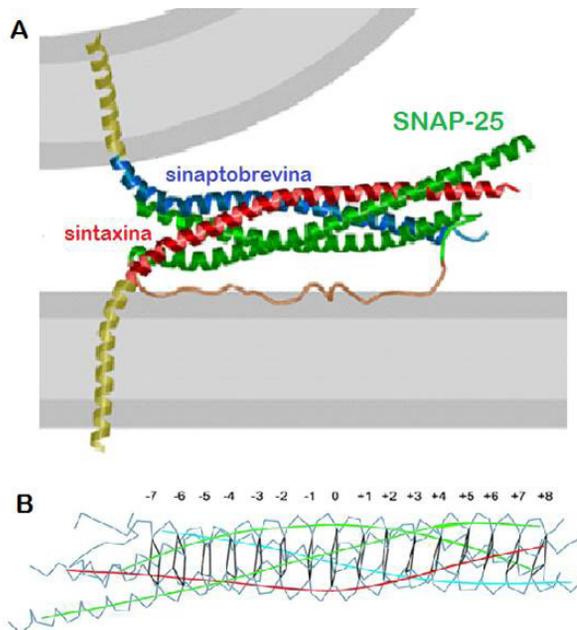


Figura 5. A. Grupo de 4 hélices alfa que se enroscan una sobre otra formando un haz. La syntaxina y la sinaptobrevina contribuyen con una hélice cada una y la SNAP-25 contribuye con dos. B. En la parte central de este grupo las hélices se conectan con 16 capas de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas perpendiculares al eje longitudinal del grupo. En la mitad del haz existe una capa iónica (‘0’ layer) poco corriente que contiene 3 glutaminas de la syntaxina y de SNAP-25, y una arginina de la sinaptobrevina. Este estrato se encuentra muy conservado en la evolución y conduce a la clasificación de las proteínas SNARE en Q-SNARE y R-SNARE. (Fasshauer et al. 1998 modificado)

LAS PROTEÍNAS SM

Otro componente esencial de la maquinaria molecular de la fusión de membranas son las proteínas SM. Se trata un grupo de 7 proteínas solubles de pequeño tamaño molecular (650-700 aminoácidos) relacionadas con Sec1/Munc18, de ahí su nombre SM. Munc18-1 ha sido implicada en procesos tan diversos como los de estabilizar la conformación cerrada de la syntaxina 1, favorecer la constitución de complejos entre proteínas SNARE de tipo Q que servirían de aceptores de proteínas R durante el ensamblaje del complejo de fusión, o la formación de complejos estables con proteínas solubles. Esta variedad de funciones ha motivado que se le hayan

asignado papeles diversos y a veces contradictorios en la regulación de la exocitosis, facilitando o inhibiendo la formación del complejo SNARE («priming»), promoviendo el atraque vesicular («docking») e incluso acelerando la expansión del poro de fusión (fusión de membranas). Trabajos más recientes consideran que la proteína SM es un coagonista esencial de las proteínas SNARE en la fusión y que todas las reacciones de fusión dependientes de SNARE requieren la intervención de una proteína SM. Al menos para la fusión durante la secreción de los neurotransmisores, el papel de SM está ligado a la syntaxina. La syntaxina constituye un organizador central que contiene muchos dominios: un péptido N-terminal, un dominio Habc, un motivo SNARE y una región C-terminal transmembrana. La syntaxina asume dos conformaciones, una cerrada fuera del complejo SNARE y una conformación abierta en el complejo SNARE. Ambas conformaciones se unen a Munc-18 (SM), pero solo la unión de Munc-18 a la región aminoterminal de la syntaxina, consigue la conformación abierta necesaria para la fusión. Aún se desconoce cómo la syntaxina orquesta la fusión.

PROTEÍNAS SNARE, ATPASAS Y GTPASAS DE TRANSPORTE

Para asegurar que el tráfico de membrana se realiza de forma adecuada, las vesículas de transporte han de ser muy selectivas en el reconocimiento de la membrana de destino con la que se fusionarán. Es probable que cualquier vesícula se encuentre con muchas membranas antes de hallar la correcta. La especificidad se asegura por: a) la existencia de marcadores de superficie en las vesículas, y b) la existencia en las membranas del compartimento de destino, de receptores complementarios para esos marcadores.

Esta etapa de reconocimiento crítica está controlada por las proteínas SNARE, que juegan un papel central por aportar la especificidad de reconocimiento y catalizan la fusión de la vesícula con la membrana del compartimento aceptor, y por las GTPasas de direccionamiento llamadas Rab, implicadas en la regulación del anclaje inicial de la vesícula a la membrana destino.

Existen dos tipos de proteínas SNARE, las v-SNARE y las t-SNARE como juegos complementarios; la primera en la membrana de la vesícula y la segunda en la membrana del corpúsculo de destino. Cuando interaccionan, los dominios helicoidales de una, envuelven los de la otra formando complejos estables *trans*-SNARE que fijan la unión de las dos membranas y provocan su fusión.

Una vez han actuado, las proteínas SNARE tienen que separarse para poder actuar de nuevo. Una proteína crucial denominada NSF alterna su situación entre la membrana y el citosol y cataliza el proceso de desensamblaje. Es una ATPasa que utiliza ATP para deshacer las interacciones de enrollamiento helicoidal entre los dominios helicoidales de las SNARE, utilizando para ello algunas proteínas que se unen a las SNARE (Figura 6).

Las proteínas Rab son GTPasas monoméricas con más de 30 miembros conocidos. Cada una posee una distribución característica en las membranas celulares y en la superficie citosólica de las membranas de los orgánulos. Las proteínas Rab facilitan y regulan la frecuencia de anclaje de las vesículas al controlar el apareamiento de las proteínas v-SNARE con las t-SNARE, requerido para la fusión de las membranas. Las proteínas Rab oscilan entre las membranas y el citosol. En su estado unido a GDP son inactivas y se encuentran en el citosol y en su estado unido a GTP son activas y se encuentran

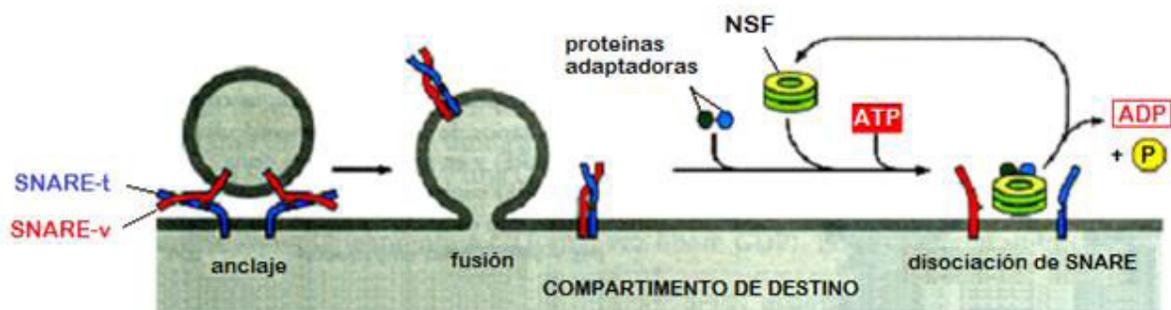


Figura 6. Disociación de las parejas de proteínas SNARE por la acción del NSF después de completar un ciclo de fusión de membrana. Después de que las v-SNARE (en rojo) y t-SNARE (en azul) hayan participado en la fusión de vesículas sobre la membrana del corpúsculo de destino, NSF se une al complejo SNARE vía proteínas adaptadoras e hidroliza ATP para separar las SNARE. (www.jolugar.ebs.uil.es)

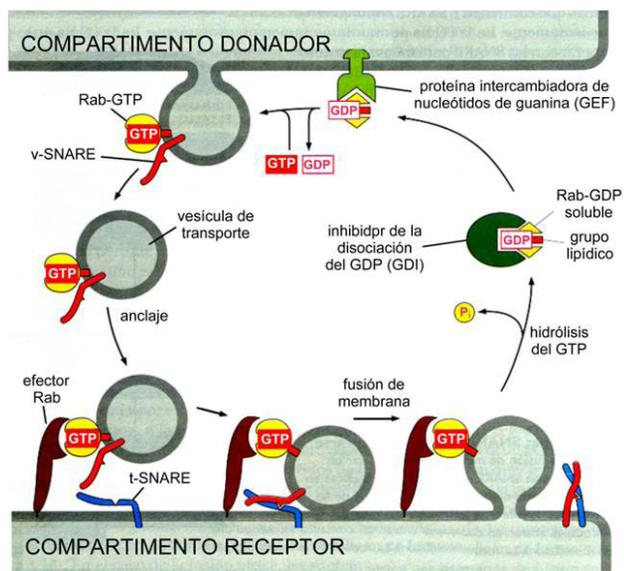


Figura 7. Intervención de las proteínas Rab en la unión de las vesículas de transporte con la membrana receptora o de destino. Una GEF (proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina) de la membrana donadora, reconoce a una proteína Rab específica y la induce a intercambiar su GDP por GTP. La unión a GTP altera la conformación de Rab, exponiendo su grupo lipídico unido covalentemente, el cual produce el anclaje de la proteína a la membrana. La Rab-GTP permanece unida a la superficie de la vesícula después de que esta se separe de la membrana donadora y después se une a efectores Rab de la membrana receptora. La proteína Rab y los efectores contribuyen al anclaje de la vesícula y por lo tanto al apareamiento de v-SNARE con t-SNARE. Después de la fusión de la vesícula con la membrana receptora la proteína Rab hidroliza su GTP, liberándose al citosol como Rab-GDP desde donde puede ser reutilizada en una nueva ronda de transporte. Rab-GDP en el citosol está unida a un inhibidor de la disociación de GDP (GDI) que impide que Rab pueda liberar GDP hasta que haya interactuado con las proteínas apropiadas de la membrana del compartimento donador. (www.jolugar.webs.ull.es)

unidas a la membrana de un orgánulo o de una vesícula de transporte.

Las proteínas Rab intervienen en la especificidad de unión de las vesículas de transporte con la membrana receptora. Una GEF (proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina) de la membrana donadora reconoce a una proteína Rab específica y la induce a intercambiar su GDP por GTP. La unión a GTP altera la conformación de la Rab, exponiendo su grupo lipídico unido covalentemente, el cual produce el anclaje de la proteína a la membrana. La Rab-GTP permanece unida a la superficie de la vesícula después de que esta se separa de la membrana donadora y después se une a efectores Rab de la membrana receptora. La proteína Rab y los efectores contribuyen al anclaje de la vesícula y por lo tanto al apareamiento de las proteínas v-SNARE con las t-SNARE. Después de la fusión de la vesícula con la

membrana receptora la proteína Rab hidroliza su GTP, liberándose al citosol como Rab-GDP, desde donde puede ser reutilizada en una nueva ronda de transporte. Rab-GDP en el citosol está unida a un inhibidor de la disociación de GDP (GDI) que impide que Rab pueda liberar GDP hasta que haya interactuado con las proteínas apropiadas de la membrana del compartimento donador (Figura 7).

Las proteínas SNARE desempeñan un papel fundamental en la fusión. Los complejos SNARE actúan

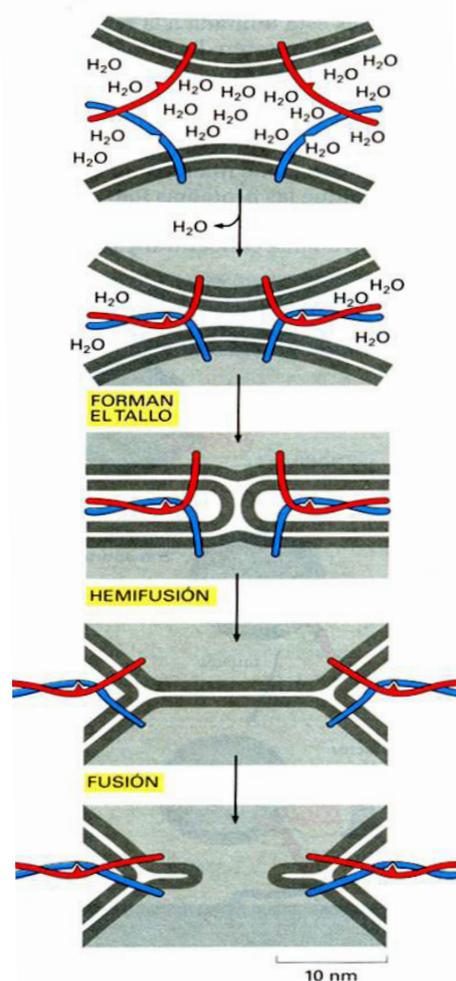


Figura 8. La unión y la fusión de las membranas son dos procesos diferentes. El anclaje solo requiere que las dos membranas se acerquen lo suficiente para permitir que las proteínas que sobresalen de la bicapa lipídica interactúen entre sí y se adhieran. Cuando están muy próximas, los lípidos pueden fluir de una membrana a otra. Así, el estrecho apareamiento de las proteínas SNARE sitúa las bicapas lipídicas en una gran proximidad que expulsa las moléculas de agua de la interfase. Los lípidos de las dos capas confluyen formando un tallo de conexión. Los lípidos de las otras dos monocapas entran en contacto formando una nueva bicapa que amplía la zona de fusión (hemifusión). La rotura de la nueva bicapa completa la fusión. (www.jolugar.webs.ull.es)

como un tornillo utilizando la energía que se libera cuando las hélices que interactúan se enrollan aproximando las 2 membranas mientras simultáneamente expulsan el agua de la interfase (Figura 8).

FUSIÓN DE LAS VESÍCULAS Y SU IMPORTANCIA EN MEDICINA

Las investigaciones de Rothman, Schekman y Südhof han desentrañado secretos de la maquinaria esencial para encaminar la carga molecular en células procedentes de organismos tan distantes como la levadura y el hombre. Estos descubrimientos han tenido gran impacto en nuestro conocimiento de cómo las moléculas se disponen en los lugares precisos en la célula. A la luz de estos conocimientos no es sorprendente que las alteraciones en cualquiera de las muchas etapas de esta maquinaria que controla el transporte y fusión de estas vesículas se asocien con la enfermedad.

El transporte y fusión de las vesículas es esencial para procesos fisiológicos que van desde el control de la comunicación entre células nerviosas en cerebro hasta la respuesta inmunológica y hormonal. La alteración de este sistema de transporte se asocia con enfermedades. Por ejemplo, enfermedades metabólicas tales como la diabetes tipo 2 se caracterizan por alteraciones en la secreción de insulina a partir de las células beta del páncreas y en la translocación del transportador de la glucosa mediado por insulina en músculo esquelético y tejido adiposo. Además, las células inmunes dependen del tráfico funcional de las vesículas para el envío de citoquinas y moléculas inmunológicas efectoras que median las respuestas inmunes innata y adaptativa.

Además de estas conexiones generales entre la fusión vesicular y enfermedad, se han descubierto mutaciones específicas en genes que codifican las proteínas implicadas en la maquinaria de fusión, que dan lugar a un número de enfermedades. Por ejemplo, se han en el gen que codifica la proteína MUNC-18-1. También, en un grupo de pacientes que sufrían de Linfocitosis hemofagocítica familiar (FHL), se han encontrado mutaciones en los genes que codifican las proteínas MUNC13-4, MUNC18-2 y syntaxina-11. En estos pacientes las células naturales asesinas (NK) fracasan al no regular apropiadamente sus funciones lo que ocasiona hiperinflamación, a veces letal. También ciertas toxinas bacterianas se fijan a la maquinaria de fusión vesicular. El botulismo causado por la bacteria anaeróbica *Clostridium*

botulinum, es una enfermedad que produce parálisis y la mayoría de toxinas se fijan a SNAP-25, VAMP/sinaptobrevina y syntaxina, e inhiben la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular. La neurotoxina del tétano del *Clostridium tetani* actúa sobre VAMP/sinaptobrevina en las interneuronas inhibitoras y bloquea la liberación de GABA o glicocola produciendo una parálisis espástica. Por tanto, Rothman, Schekman y Südhof con sus investigaciones han aclarado los mecanismos de estas enfermedades proporcionando la posibilidad de tratamientos prospectivos.

CONCLUSIONES

Los descubrimientos de James Rothman, Randy Schekman y Thomas Südhof han puesto de manifiesto algunos de los procesos fundamentales en el funcionamiento de las células eucariotas, procesos que aseguran el intercambio de las moléculas de manera correcta. Estos hallazgos han tenido un impacto importante pues han hecho conocer cómo se verifica la comunicación celular mediante el envío de moléculas a sus destinos específicos, dentro y fuera de la célula. El transporte y fusión de las vesículas opera con los mismos principios generales en organismos tan diferentes como la levadura y el hombre. Es crítico para una gran variedad de procesos fisiológicos en los cuales la fusión vesicular ha de ser controlada en multitud de procesos que van desde la liberación de hormonas y neurotransmisores, a funciones del sistema inmune. Sin esta organización exquisita y precisa la célula sería incapaz de mantener sus funciones.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro reconocimiento a la inestimable ayuda prestada por D.^a Adoración Urrea Salazar en la búsqueda de bibliografía y preparación de figuras.

ABREVIATURAS

COP I y II, proteínas de la cubierta I y II; GABA, gamma aminobutirato; GDI, inhibidor de la disociación de GDF; GDF, proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina; GDP, guanosina difosfato; GTP, guanosina trifosfato; FHL, linfocitosis hemofagocítica; LDL, low density lipoproteins; NK, células naturales asesinas; NSF, factor sensible a la N-etilmaleimida, ATPasa; Rab, GTPasa; SM,

proteína producto del gen Munc18-1 (sec/Munc18); SNAP, proteína soluble de unión al NSF (soluble NSF attachment protein) (25kDa synaptosome associated protein); SNARE, (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) receptor de SNAP; TNG, red trans Golgi; VAMP, proteína de membrana asociada a vesícula/ sinaptobrevina; VSV, virus de la estomatitis vesicular; VSV-G, proteína del virus VSV.

BIBLIOGRAFÍA

Bacaj, T., Pang, Z.P. & Südhof, T.C. *Testing the SNARE/SM protein model of membrane fusion*. PNAS 107, 22365-22366 (2010).

Clary, D.O., Griff, I.C. & Rothman, J.E. *SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast*. Cell 61, 709-721 (1990).

Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T. & Jahn, R. *Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q and R-SNAREs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15781-15786 (1998).

Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F. & Südhof, T.C. *Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse*. Cell 79, 717-727 (1994).

Hata, Y., Slaughter, C.A. & Südhof, T.C. *Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin*. Nature 366, 347-351 (1993).

Malhotra, V., Orci, L., Glick, B.S., Block, M.R. & Rothman, J.E. *Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack*. Cell 54, 221-227 (1988).

Novick, P., Field, C. & Schekman, R. *Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway*. Cell 21, 205-215 (1980).

Rohman, J.E. *The future of Golgi apparatus*. Research Mol. Biol. Cell 21, 3776-3780 (2012).

Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. & Rothman, J.E. *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion*. Nature 362, 318-324 (1993).

www.jolugar.webs.ull.es

Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H. & Rothman, J.E. *SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion*. Cell 92, 759-772 (1998).

Zierath, J.R. & Lendahl, U. Karolinska Institutet (2013).

Consuelo Boticario Boticario
Departamento de Ciencias Analíticas y
Directora del Centro Asociado de la UNED en Plasencia
María Cascales Angosto
Doctora ad honorem del CSIC y
Doctora Honoris Causa de la UNED