

EM. leccion 1

 bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas2015/9plegamiento/9plegamiento.html

Estructura de Macromoléculas. Javier Sancho

Lección 9. El plegamiento de las proteínas

1. Experimento de Anfinsen y paradoja de Levinthal
2. Medida de la velocidad de plegamiento
3. Modelos clásicos del plegamiento y especies observadas
4. La 'nueva visión' del plegamiento
5. Plegamiento *in vivo* y chaperonas
6. *Simulación del plegamiento de las proteínas*
7. *Predicción de la estructura a partir de la secuencia*

Para saber más:

[Folding at Home](#)

1. Experimento de Anfinsen y paradoja de Levinthal

Anfinsen demostró a finales de los 60' que al desplegar la enzima ribonucleasa A con urea y mercaptoetanol aumentaba su volumen aparente y desaparecían sus propiedades catalíticas. Al dializar la proteína volvía a plegarse. El plegamiento de las proteínas no está inducido por la célula sino que es el resultado de la interacción de la secuencia polipeptídica con el agua. Toda la información necesaria para adquirir su estructura tridimensional está presente en la secuencia de aminoácidos por lo que algún día se podrá predecir.

Dada la flexibilidad de los polipéptidos el número de conformaciones posible de una proteína es enorme. Levinthal planteó la paradoja que lleva su nombre: si una proteína se pliega explorando al azar todas las conformaciones posibles tardará mucho más que la edad que tiene el Universo. Como las proteínas se pliegan muy deprisa (típicamente en milisegundos o segundos) está claro que no exploran todas las conformaciones al azar.

2. Medida de la velocidad de plegamiento

Las reacciones muy rápidas no se pueden medir mezclando "a mano" los reactivos. La técnica apropiada para medir reacciones que duran entre decenas de ms y algunos segundos es el flujo detenido stopped-flow. Hay que registrar la evolución en el tiempo de una propiedad espectroscópica (fluorescencia DC en el UV lejano) que distinga al estado desplegado del plegado. El ajuste a una exponencial simple nos permite conocer la constante de la reacción. Si la curva se ajusta a una exponencial doble indica que hay intermediarios en la reacción y es preciso realizar un ajuste global de curvas obtenidas en distintas condiciones para calcular las constantes de velocidad. Muchas proteínas pequeñas se pliegan sin que aparezcan intermediarios (plegamiento de dos estados). Algunos fenómenos tempranos de la reacción de plegamiento ocurren por debajo del milisegundo y requieren otras técnicas como la mezcla en chorro o el salto de temperatura inducido por láser para poderlos observar.

3. Modelos clásicos del plegamiento y especies observadas

La visión clásica del plegamiento de las proteínas supone que todas las moléculas siguen el mismo camino pasando en su caso por los mismos intermediarios y por el estado de transición. Hay dos clases principales de modelos. Los modelos de tipo armazón (framework) que asumen que los procesos iniciales consisten en la formación temprana de algunos de los elementos de estructura secundaria que aparecen en el estado final. Estas regiones chocan y dan lugar a intermediarios que terminan plegándose. El modelo del colapso hidrófobo, sin embargo, supone que el primer suceso relevante es el colapso al azar del polipéptido para ocultar los residuos hidrófobos. A partir del estado colapsado se va organizando el polipéptido y aparece la estructura secundaria de los intermediarios y, finalmente, del estado nativo. También se postuló un modelo (de puzzle) que asumía que cada moléculas seguía un camino distinto. Experimentalmente las especies que podemos observar y estudiar con más o menos detalle son las siguientes:

- -estado desplegado: se puede estudiar por rmn, pero con dificultad porque las señales de los residuos del mismo tipo se solapan. Se utilizan también fragmentos de la proteína que simulan su situación en los primeros momentos del plegamiento cuando los residuos del segmento estudiado todavía no han tenido tiempo de interactuar con el resto de la cadena. Algunas secuencias ya se pliegan aunque débilmente, como lo hacen luego en el estado nativo.
- -intermediarios: se pueden estudiar por rmn preparando con aparatos de mezcla rápida muestras de proteína que se incuban durante distintos tiempos (muy cortos) en H₂O y luego se transfieren a D₂O. Las regiones que ya se habían plegado cuando la proteína se transfiere a D₂O retienen los protones fácilmente intercambiables con el disolvente. También se pueden estudiar por ingeniería de proteínas midiendo la velocidad de plegamiento de la proteína silvestre y comparándola con la de muchos mutantes de la misma. En general los intermediarios del plegamiento estudiados se parecen ya al estado nativo (aunque con partes desestructuradas y las demás menos consolidadas).

- -estado de transición: es la conformación de alta energía por la que atraviesa el polipéptido para plegarse. Sólo se puede estudiar por el método de comparar la velocidad de plegamiento de muchos mutantes distintos. En proteínas pequeñas puede estar limitado a una región pequeña (núcleo de plegamiento). En proteínas de más de 100 residuos suele parecerse bastante a una forma distorsionada del estado nativo.
- -estado nativo: su estructura se determina precisamente por rmn o rayos x.
- Los modelos clásicos secuenciales han sido cuestionados en los últimos años y se ha propuesto una “nueva visión” del plegamiento en la que cada molécula se pliega por una ruta distinta (como en el antiguo modelo de puzzle). La razón de que el plegamiento sea rápido es que las moléculas se mueven por un paisaje de energía en forma de embudo de modo que las interacciones nativas que aparecen tienden a conservarse y la proteína sigue plegándose “cuesta abajo”. En general las barreras de energía entre conformaciones son bajas pero donde el embudo presenta rugosidades aparecen intermediarios.

5. Plegamiento in vivo y chaperonas.

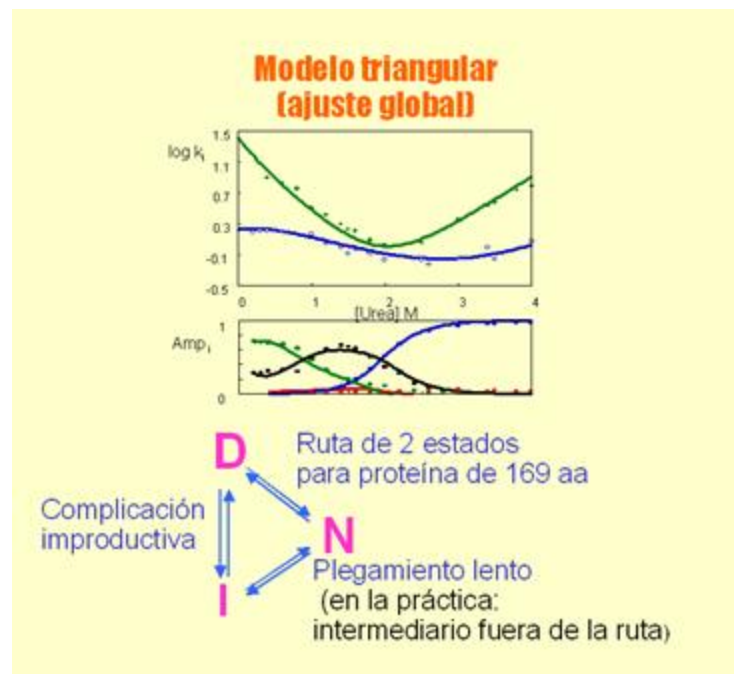
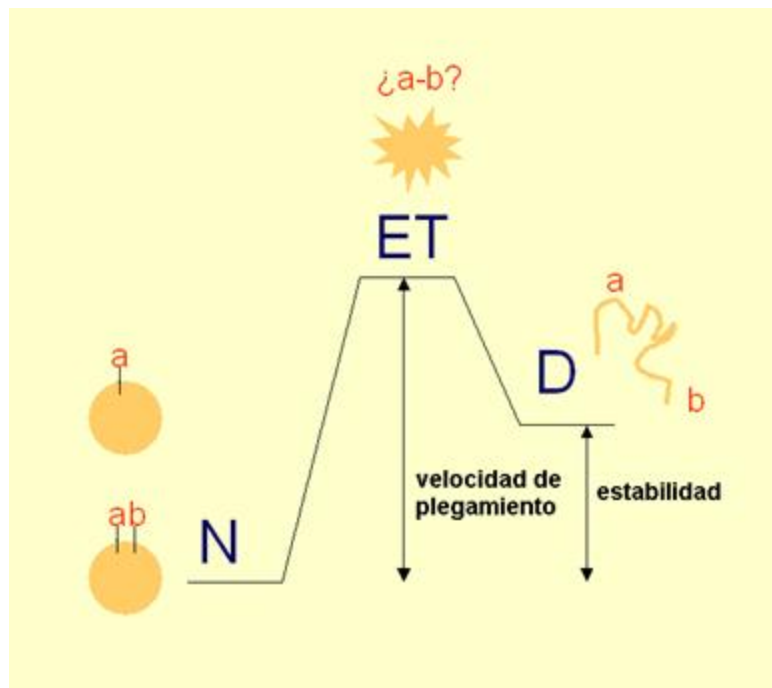
Aunque toda la información que precisa una proteína para plegarse reside en su propia secuencia, el interior de la célula está tan repleto de proteínas que aparecen problemas de agregación, pues los intermediarios del plegamiento pueden tener expuestas regiones hidrófobas que son "pegajosas". Para evitar estos problemas o los que surgen como consecuencia de un estrés térmico (intermediarios parcialmente desnaturalizados con el mismo problema de tendencia a agregar) la célula expresa proteínas auxiliares chaperonas que secuestran temporalmente las conformaciones no plegadas, o desnaturalizan las mal plegadas y les dan otra oportunidad de plegarse correctamente (chaperoninas).

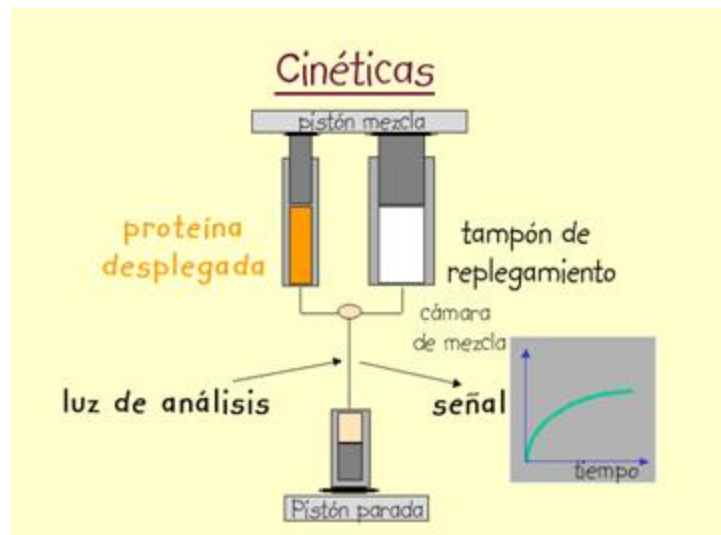
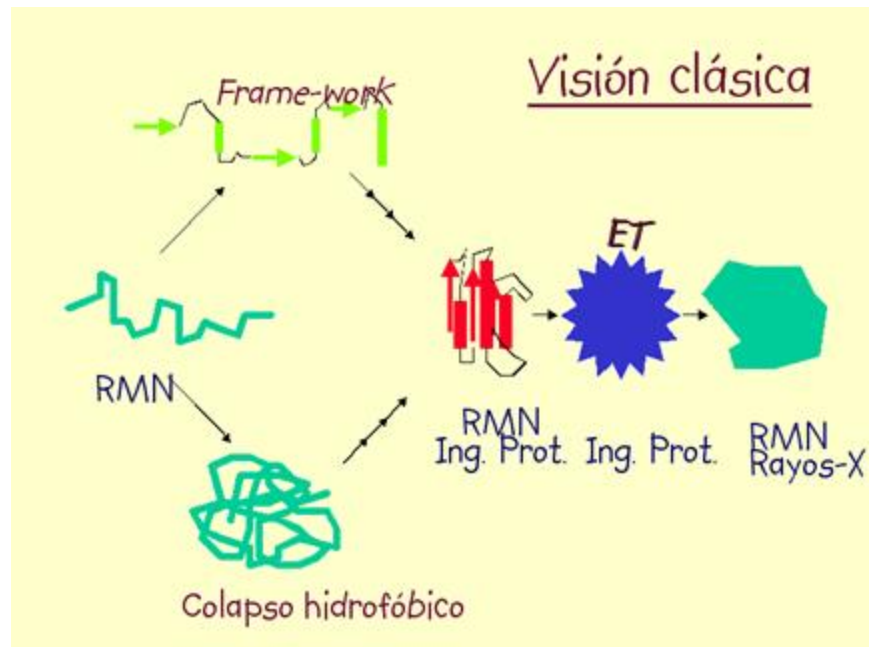
6. Simulación del plegamiento de las proteínas

Para estudiar las etapas más tempranas del plegamiento o para analizar aspectos generales de la reacción se utilizan modelos simplificados y técnicas de simulación (dinámica molecular y Monte Carlo). Estos modelos tienen de momento un elevado coste computacional cuando son más realistas. El objetivo final es simular un modelo suficientemente realista y conseguir calcular la conformación nativa de la proteína.

7. Predicción de la estructura a partir de la secuencia.

Hasta que se entienda mejor cómo se pliegan las proteínas resulta conveniente explorar otros procedimientos menos ortodoxos de predecir la estructura a partir de la secuencia. Cuando existe una proteína de secuencia parecida y estructura conocida se puede construir un modelo realista basado en la estructura conocida (modelado por homología). Cuando no existe ninguna proteína de secuencia parecida en que inspirarse se recurre al modelado por hilvanado (threading) o reconocimiento del plegamiento que consiste en plegar la proteína de todas las maneras empleadas por proteínas conocidas y calcular en cual de ellas la energía es menor.





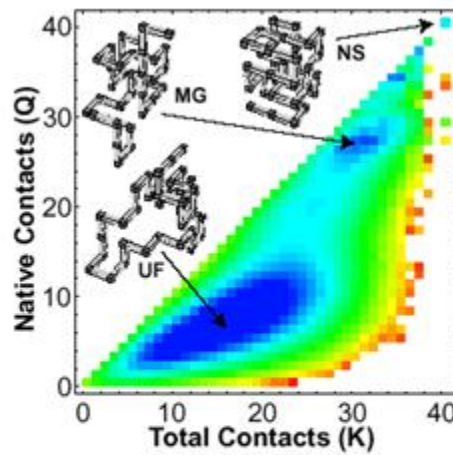
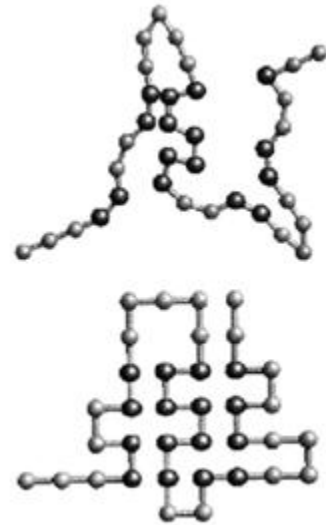


Figure 16: Free energy vs the number of native contacts (Q) and the total number of contacts (K) of a 36-mer lattice model designed heteropolymer near the three phase coexistence temperature and denaturant value. Note that the number of contacts K is directly related to the averaged volume fraction ϕ in the theory.

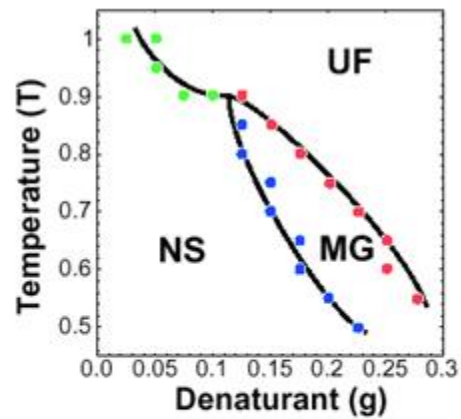
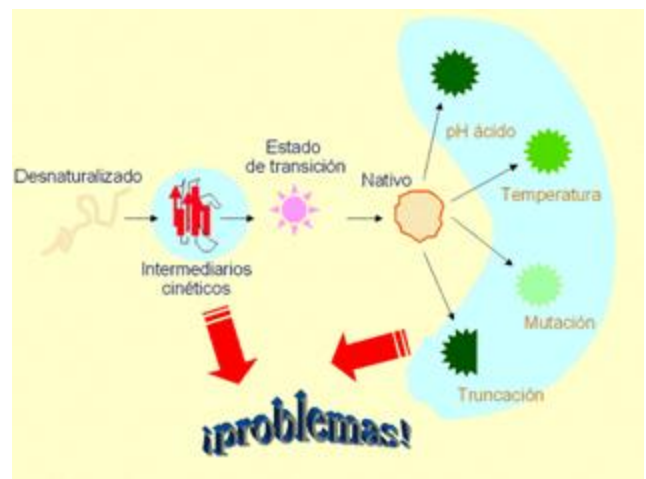
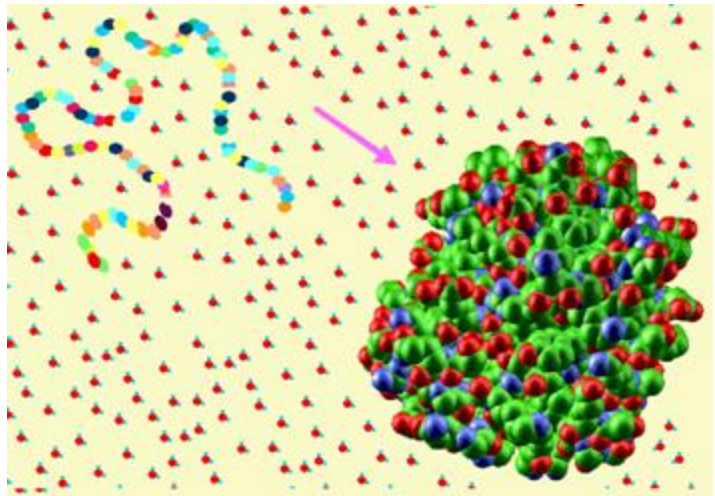
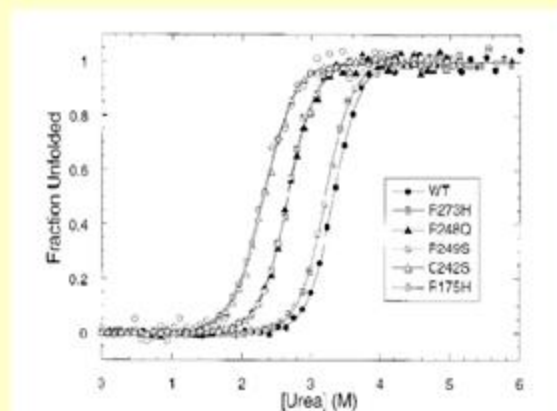


Figure 17: Phase diagram for a 36 mer under denaturation. We see three phases: unfolded, molten globule, and native state. The boundaries of these phase were calculated by the examination of the free energy as a function of the number of native contacts and the total number of contacts (Figure 16).



Los mutantes de P53 en células cancerosas Son frecuentemente proteínas inestables

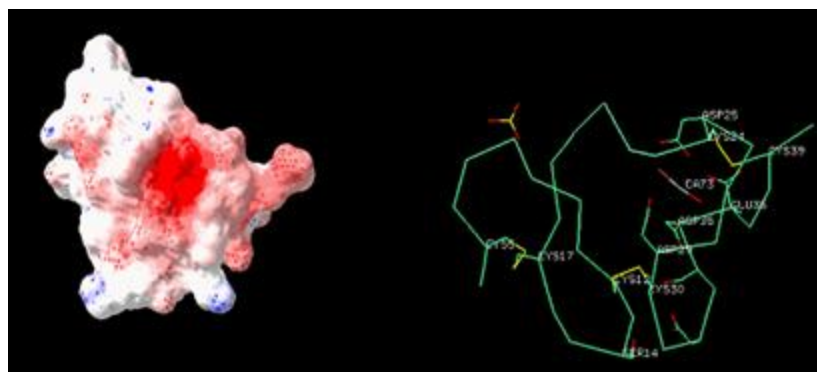
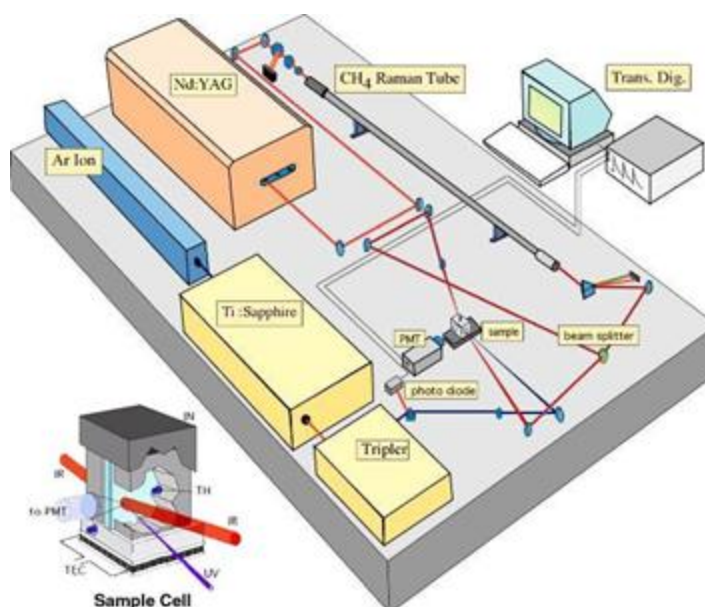
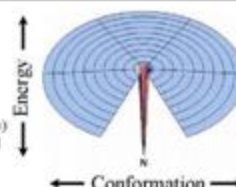


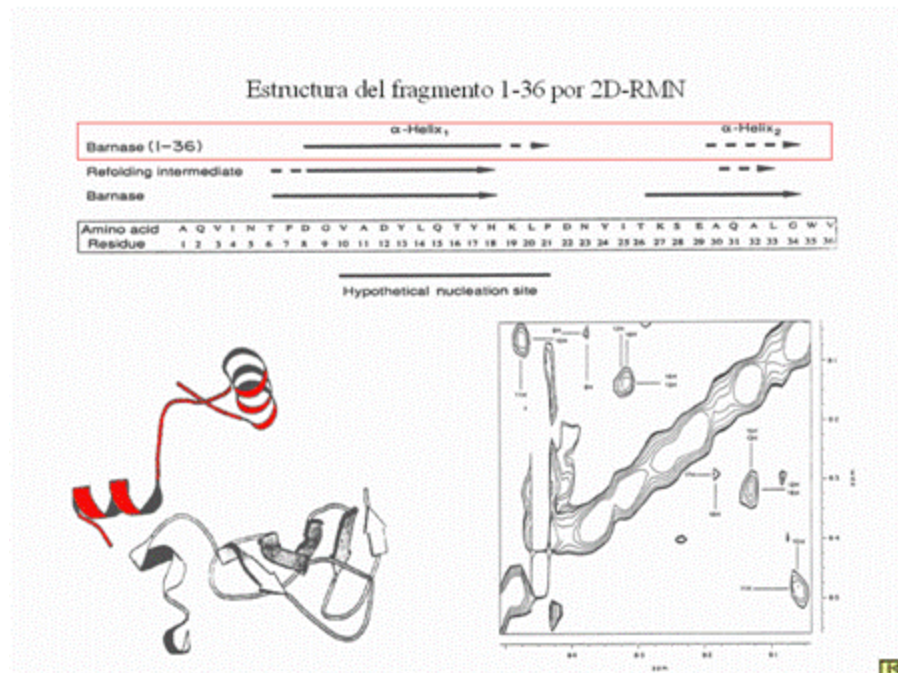
Bullock et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1997. 94: 14338-14342

The Levinthal Paradox

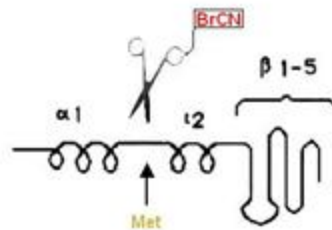
Levinthal's paradox can be summarized as follows. The three-dimensional structure of the main chain of a protein is determined by the dihedral angles ϕ and ψ ($\omega = 180^\circ$ is assumed). If only local interactions are considered, these dihedral angles have a few preferred values that correspond to the local minima of the torsion energy around each rotation bond. For instance, when we consider four atoms along a rotation bond, three values of angles in gauche ($\pm 60^\circ$) and trans (180°) correspond to rather stable local minima of the torsion energy. Hence, we have to consider only about 10 conformations per each amino acid (in average). But this means that we have to examine at least as many as 10^N conformations for a protein with N amino acids. This number increases very rapidly with N . For example, with $N=40$ there are 10^{40} possible conformations. Considering an average rotation frequency around each bond, one can assume that a protein can sample of the order of 10^{14} structures per second. Hence, it would take this protein about 10^{26} seconds, 10^{18} years to examine all the possible conformations. This is of course much longer than the present age of the Universe. Then why can proteins fold into their native conformations on the time scale of milliseconds to minutes?

The Levinthal paradox assumes that all of the possible conformations will be sampled with equal probability until the proper one ($N = \text{native}$) is found. Thus, the funnel surface looks like a hole in a golf course.



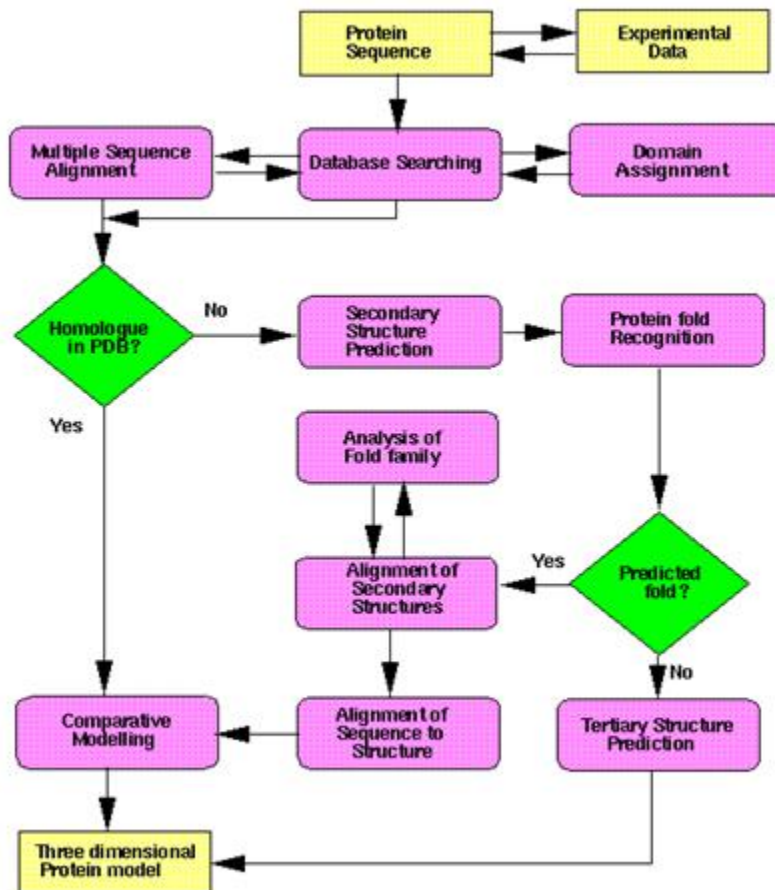


Estructura secundaria de barnasa. Introducción de sitios de corte



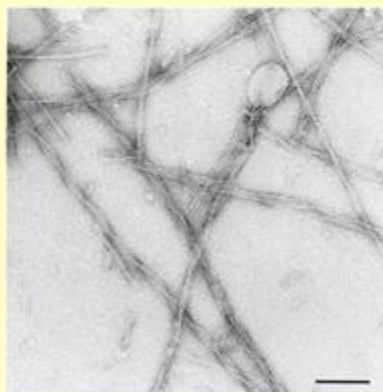
Etapas iniciales del plegamiento Interacción entre fragmentos complementarios Simulación del plegamiento *in vivo* acoplado a la síntesis

Sancho et al 1992 J. Sancho, J.L. Neira and A.R. Fersht, An N-terminal fragment of barnase has residual helical structure similar to that in a refolding intermediate. J. Mol. Biol. 224 (1992), pp. 749-758

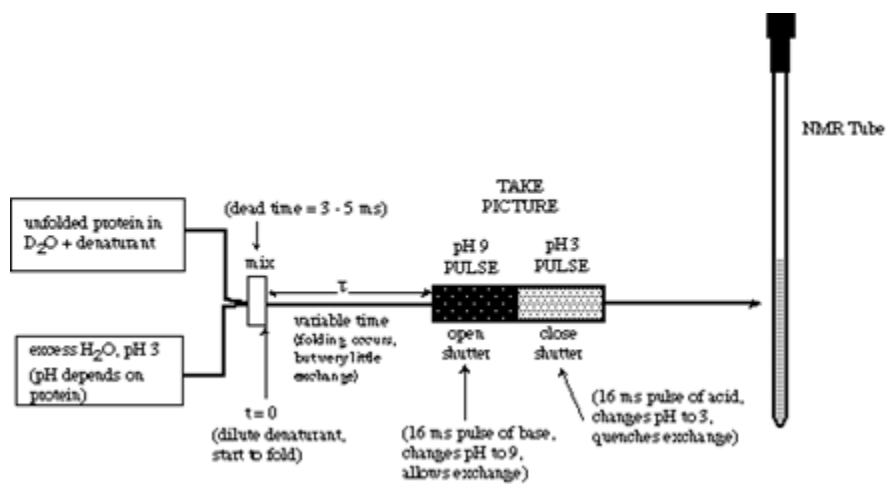
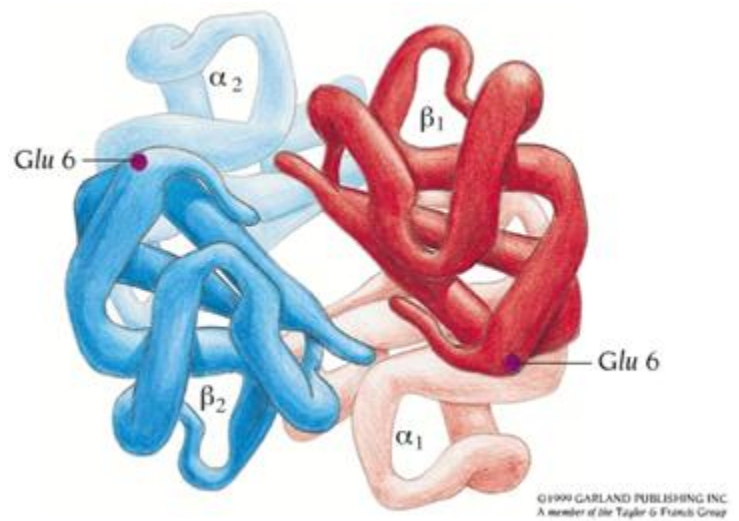
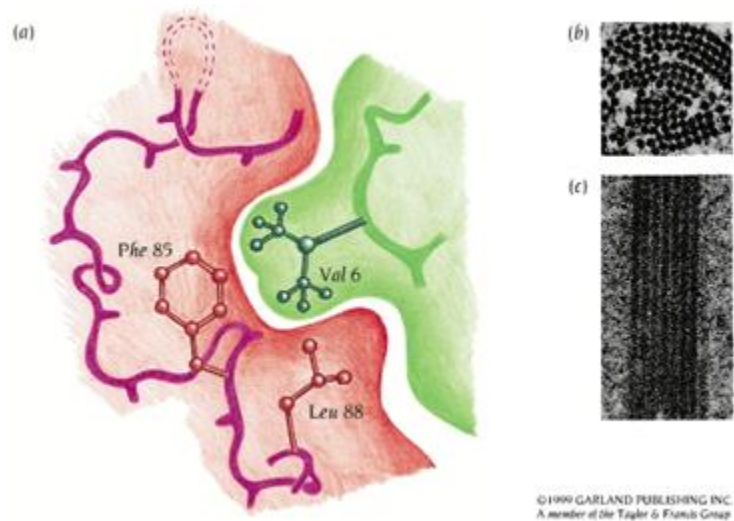


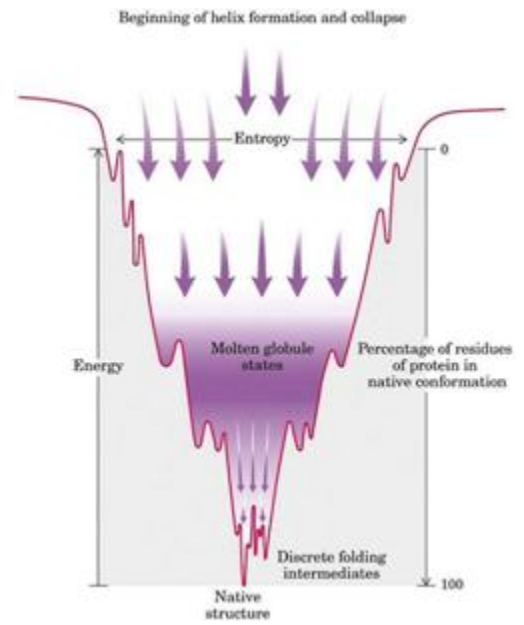
Estados parcialmente plegados en solución
Son precursores de fibras amiloides!!

N → I →

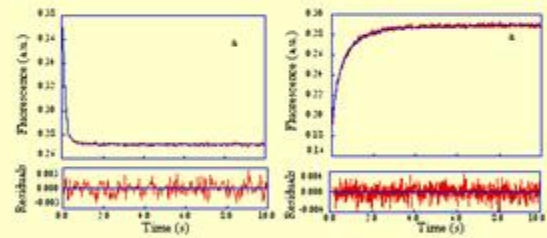


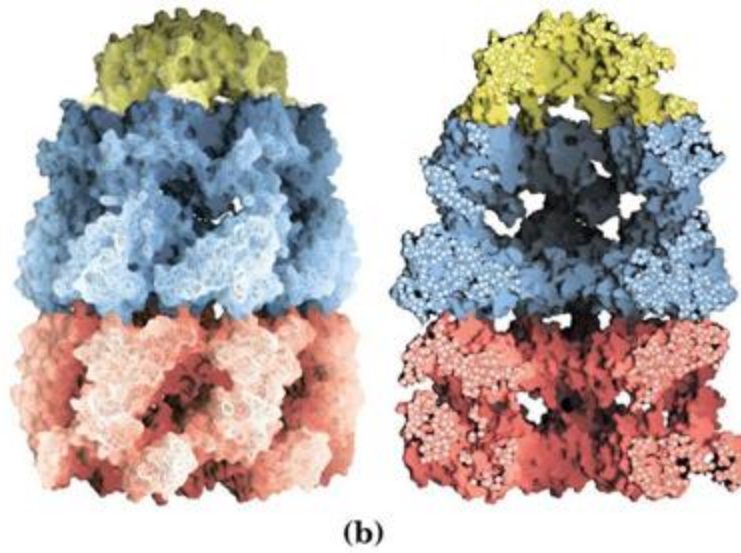
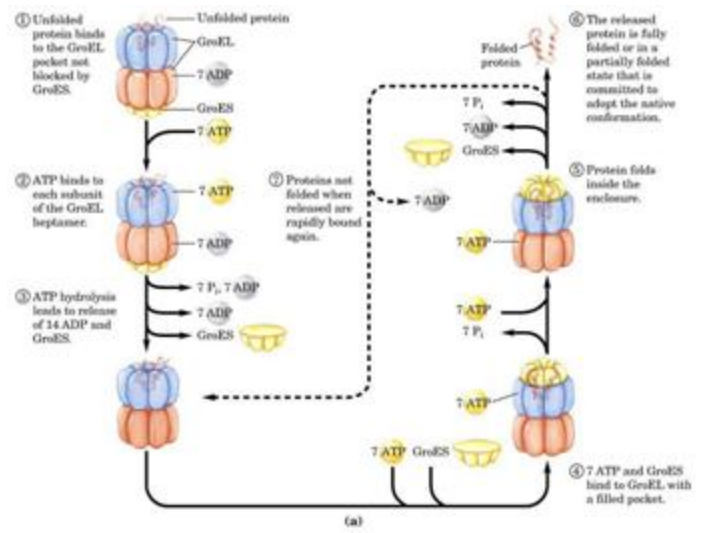
Guíjarro et al. Proc Natl Acad Sci U S A (1998)

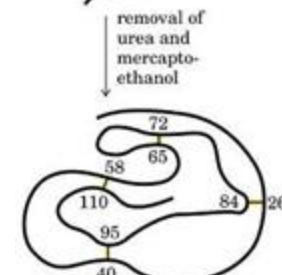
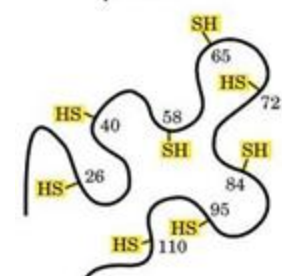
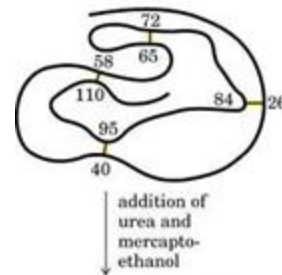
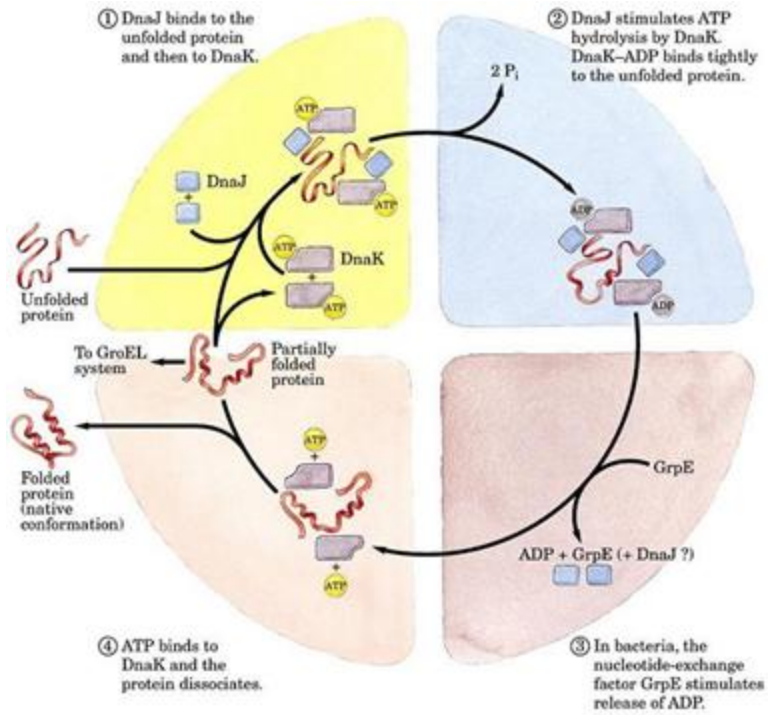




Intermediario de plegamiento







Estructura del ET

