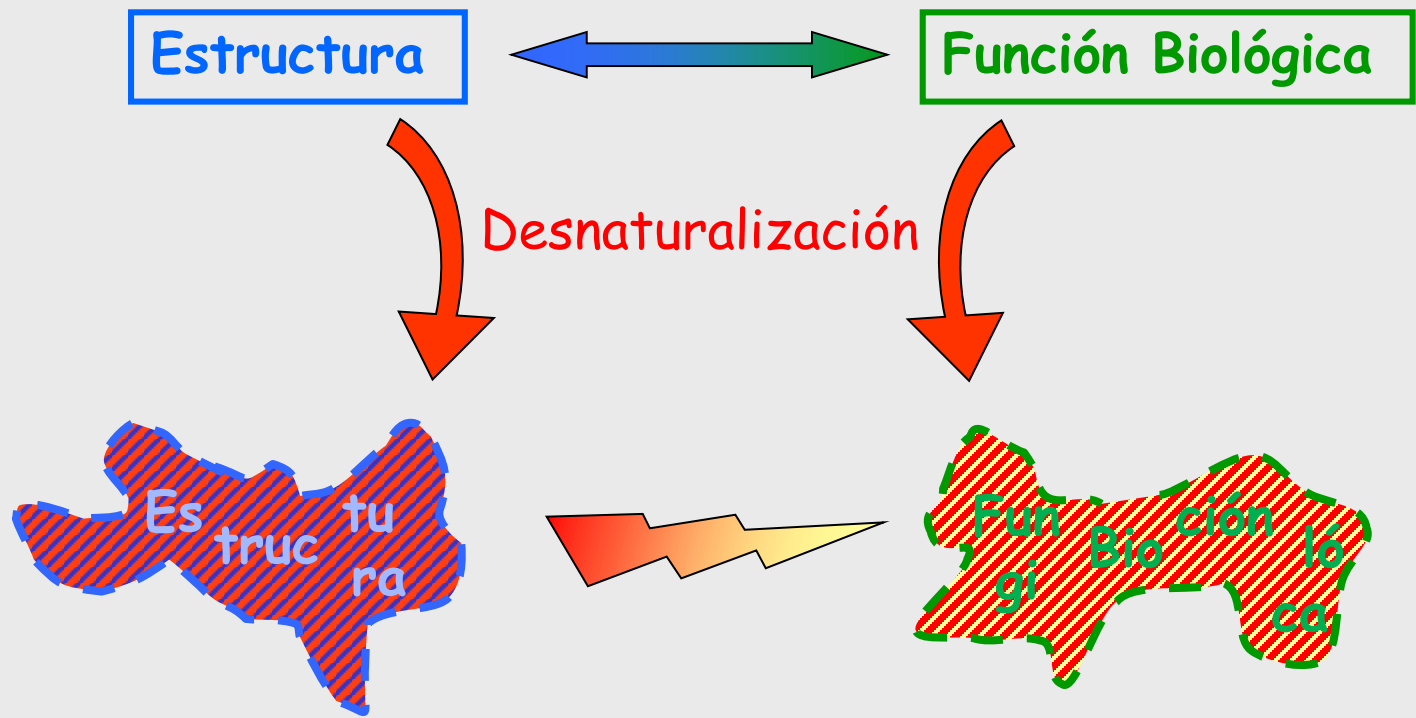


Contenido de la clase

- Formas estructurales de las proteínas
- Estructura secundaria de las proteínas
 - Hélice α (alfa)
 - Conformación β (beta)
- Estructura terciaria de proteínas
- **Desnaturalización y plegamiento**
- Plegamiento en la célula
- Estructura cuaternaria de las proteínas



Agentes	Efecto
Calor	actúa sobre interacciones débiles
pH extremos	cambio de carga neta: repulsiones electrostáticas y destrucción de enlaces H
<ul style="list-style-type: none"> - Solventes orgánicos (alcohol, acetona) - Urea - Detergentes 	actúa sobre interacciones hidrofóbicas

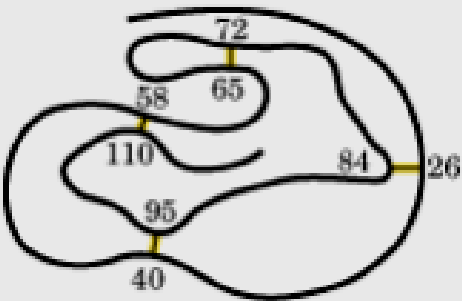
La secuencia de Aa determina la estructura terciaria

La proteína desnaturalizada pueden recuperar su estructura nativa y función biológica

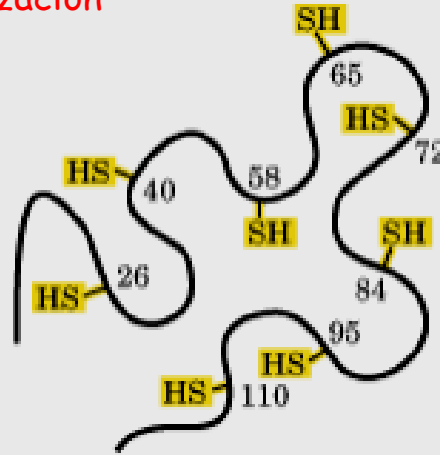
Ribonucleasa A

Desnaturalización

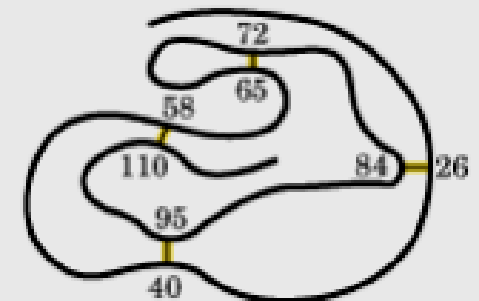
Renaturalización



addition of
urea and
mercapto-
ethanol



removal of
urea and
mercapto-
ethanol



Native state;
catalytically active.

Unfolded state;
inactive. Disulfide
cross-links reduced to
yield Cys residues.

Native,
catalytically
active state.
Disulfide cross-links
correctly re-formed.

8 -SH (Cys)

→ { 4 -S-S- (cistina):
- 105 posibilidades, pero
se forman los 4 originales

Inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI)

- Proteína con 58 R y 3 -S-S-, muy estable (bastante resistente a Urea y shock térmico)

BPTI: reducción \Rightarrow 6 Cys

Re-oxidación aleatoria:

-Primer grupo -SH: 5 posibilidades

-Segundo grupo: 3 posibilidades

-Tercer grupo: una posibilidad

\Rightarrow 15 combinaciones igualmente posibles

\Rightarrow ~7% BPTI se pliega con éxito por azar

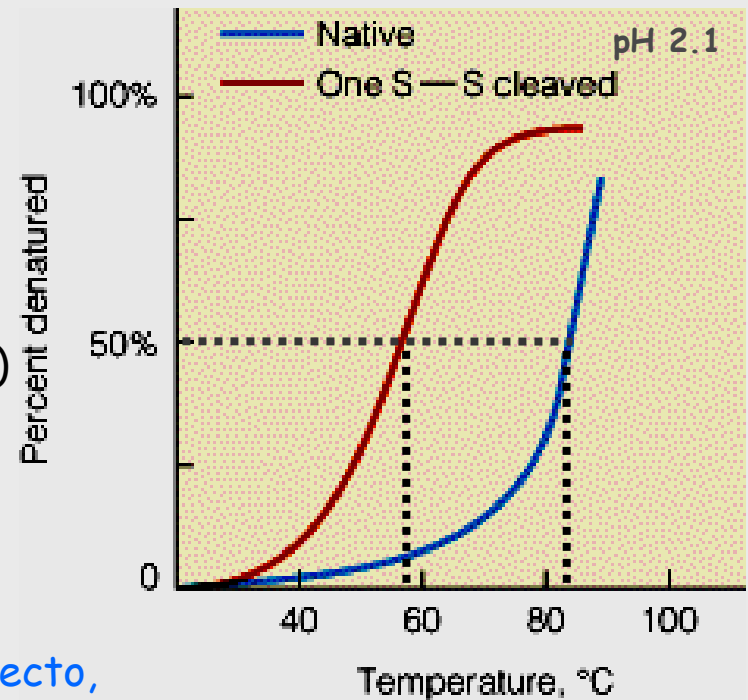
Sin embargo ~100% de las moléculas (BPTI o otros ej.)

muestran apareamientos correctos \Rightarrow es el plegado preferido el que ubica los -SH en posición correcta para formar los -S-S-, los que contribuyen a la estabilidad de la proteína

Conclusión: -S-S- NO esenciales para el plegado correcto, SÍ contribuyen a la estabilidad en la molécula plegada.

- Proteínas que tienen puentes -S-S- tiene menor N° de conformaciones posibles en la forma desplegada con respecto a una proteína comparable sin puentes \Rightarrow ganancia de "S" más pequeña \Rightarrow más estable.

- En el citoplasma celular existe un ambiente reductor \Rightarrow ausencia de -S-S- en proteínas, -S-S- presentes en algunas proteínas de exportación (medio extracelular oxidante \Rightarrow -S-S- estabilizados)



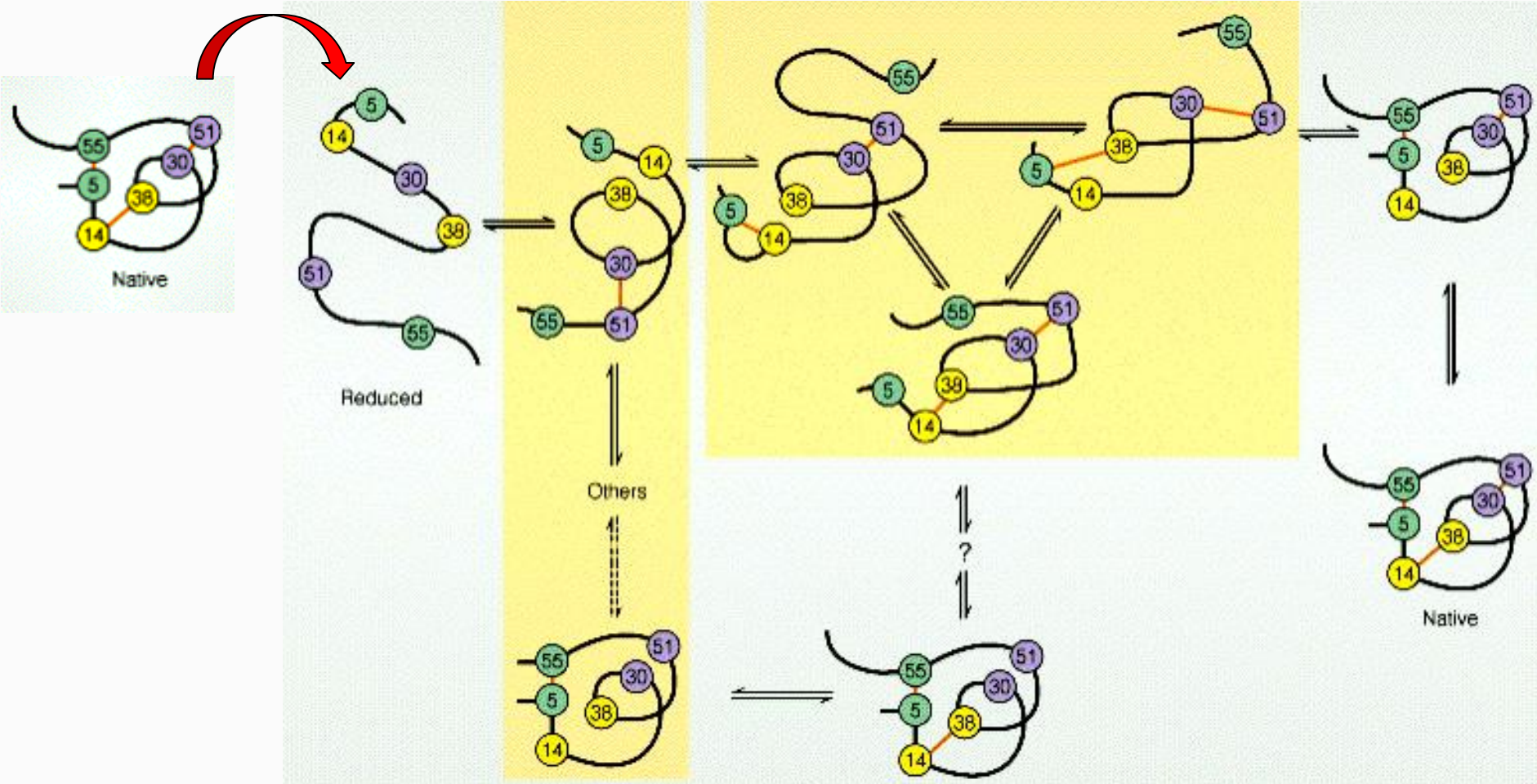
Contenido de la clase

- Formas estructurales de las proteínas
- Estructura secundaria de las proteínas
 - Hélice α (alfa)
 - Conformación β (beta)
- Estructura terciaria de proteínas
- Desnaturalización y plegamiento
- **Plegamiento en la célula**
- Termodinámica del plegamiento
- Estructura cuaternaria de las proteínas

Replegado y formación de enlaces disulfuro

Ensayo químico in vitro para detectar intermedios de plegamiento de BPTI

- Reducción de -S-S-
- Desnaturalización a temperatura ambiente
- Bloqueo con yodoacetato de -SH que no han reaccionado
- Separación de intermedios formados por electroforesis en gel o HPLC



La secuencia de Aa determina la estructura terciaria

La **similitud** entre las **estructuras terciarias** y las **secuencias de Aa** en proteínas homólogas (≠ citocromo c, ≠ mioglobinas) llevó a la conclusión de que **la secuencia de Aa determina el modelo de plegamiento tridimensional**.

En **proteínas homólogas** muchos **R invariantes** se encuentran en puntos críticos:

- en los giros de la cadena o próximos a ellos,
- en los puntos de entrecruzamientos entre lazos de la estructura terciaria (Cys que forman -S-S-),
- en centros catalíticos (Ez), sitios de fijación de grupos prostéticos (p.ej. Hemo)

El **cambio natural** de un residuo por ej. un R invariante => alterar la función de la proteína => **muerte** del organismo en estadios tempranos del **desarrollo** (selección natural) => imposibilidad de obtener información sobre la proteína.

La tecnología del DNA recombinante: **mutagénesis dirigida** => determinar la función de una secuencia específica.

La estructura terciaria no es rígida

Las proteínas globulares presenta cierta flexibilidad

Cambios conformacionales

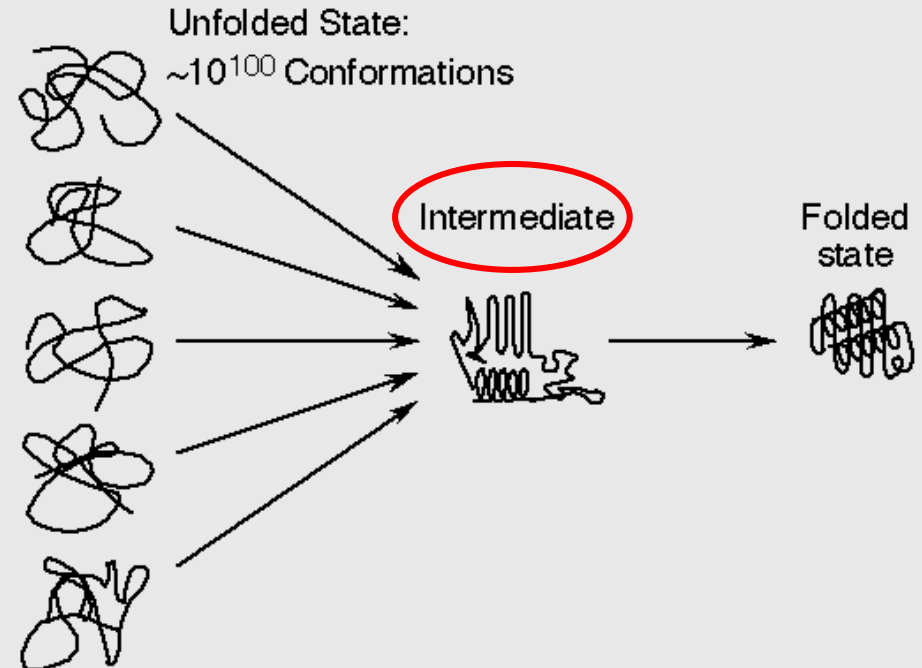
- unión de un ligando: Hb, receptor
- unión de un substrato: enzima

Plegamiento de una proteína: rápido y en varias etapa

p.ej. una proteína de 100 Aa:

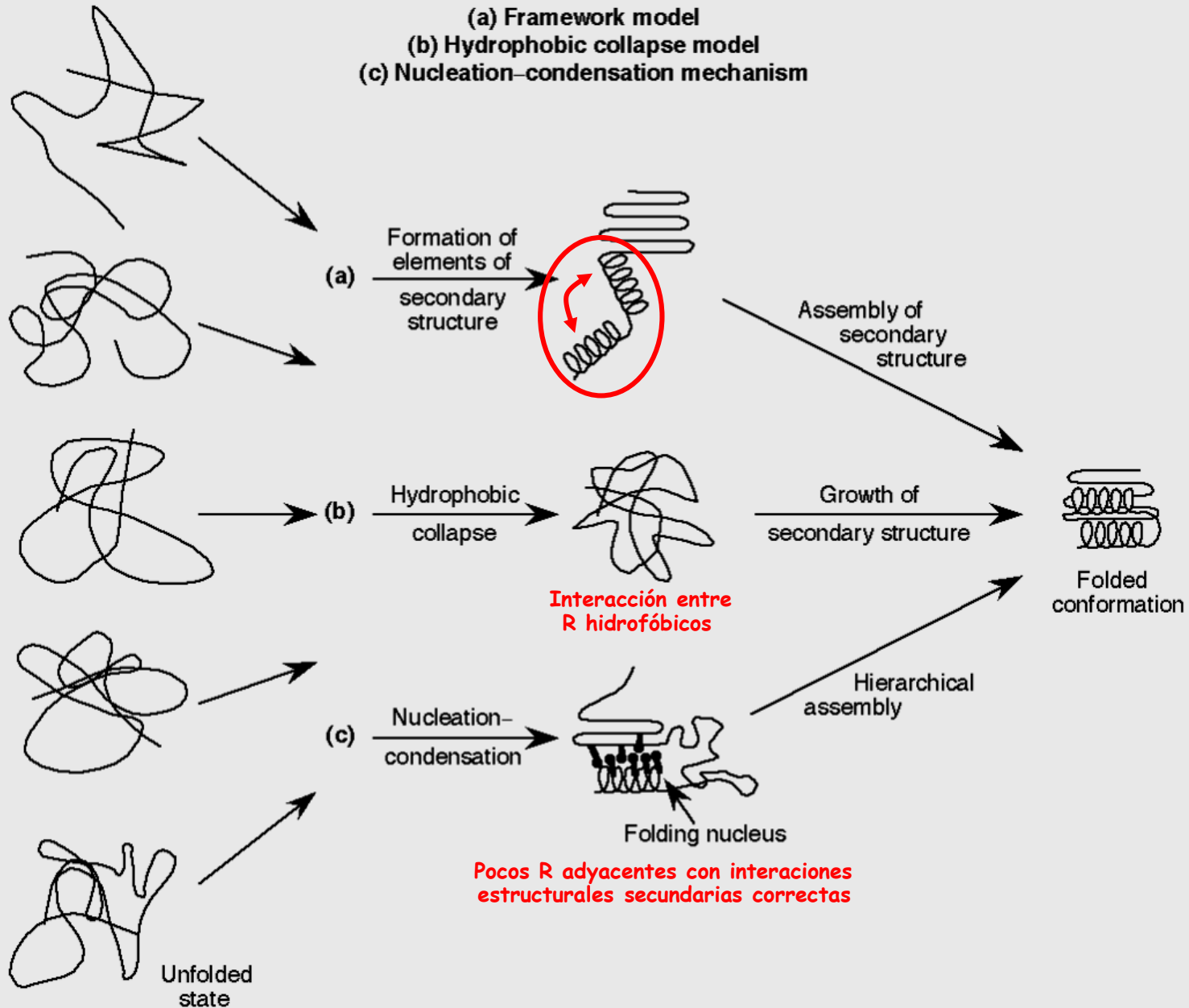
- 10^{50} años: plegamiento al azar (prueba y error): 10^{100} conformaciones posibles considerando c/enlace simple (10 conformaciones independientes por Aa) hasta encontrar la forma nativa funcional

- 5 segundos a 37°C en E.coli



Una proteína puede plegarse en nanosegundos

Modelos de plegamiento



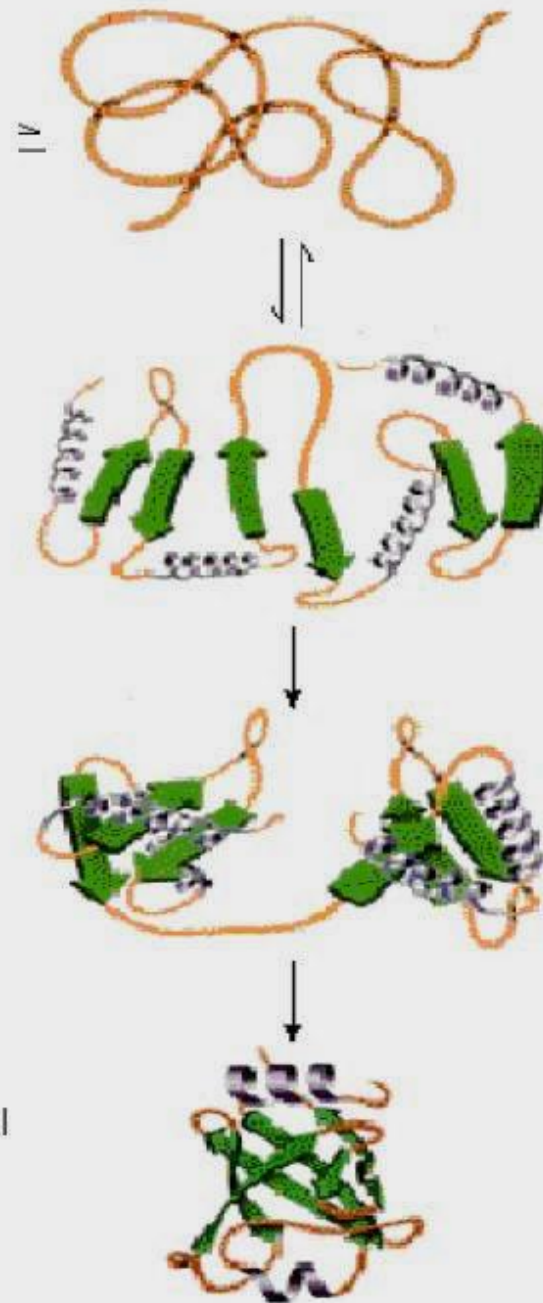
Formación rápida de estructuras secundarias locales

Formación de dominios a través de la agregación cooperativa de núcleos de plegamiento

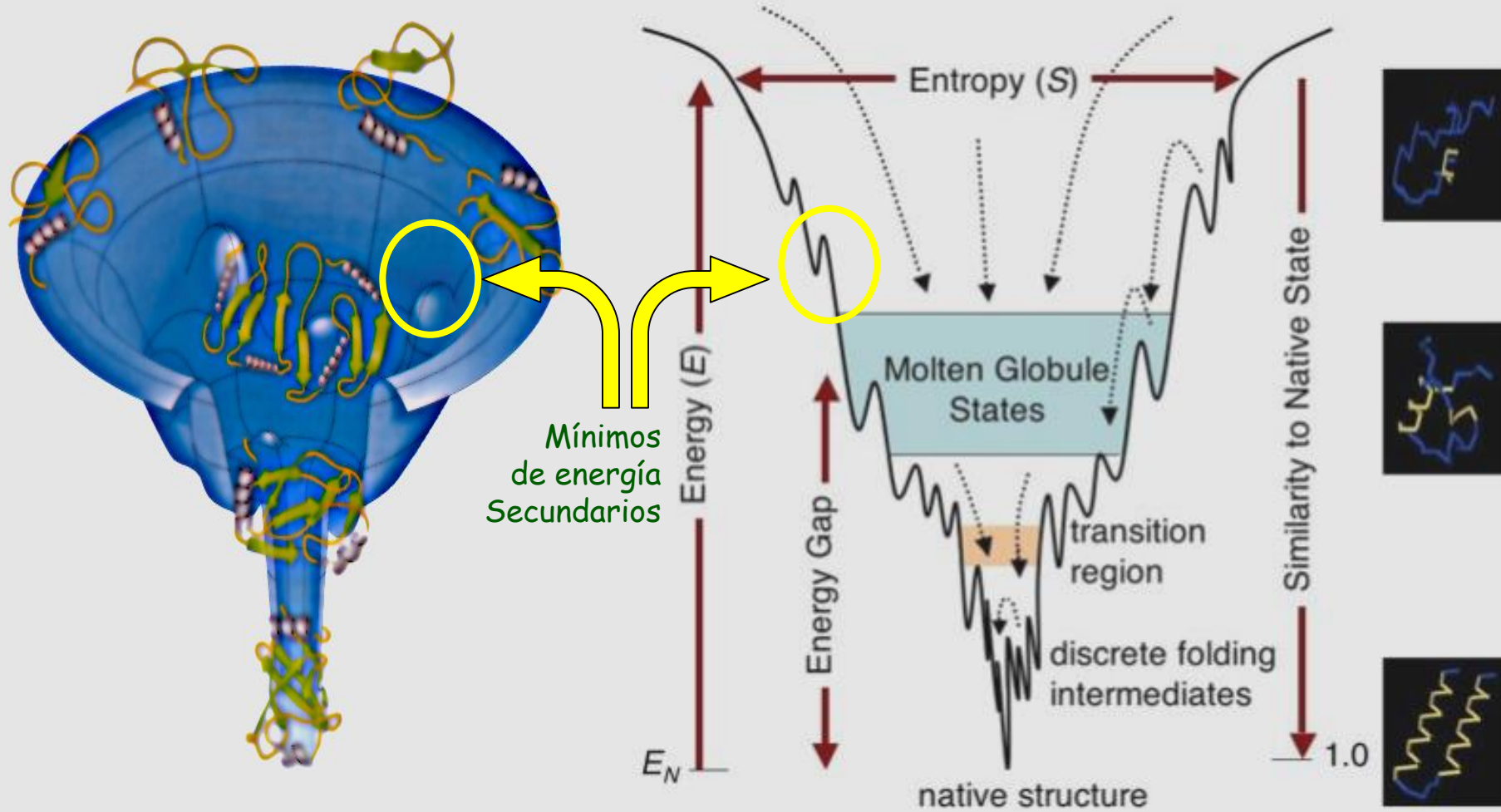
Formación de glóbulo fundido

Ajuste de la conformación de los dominios

Proteína plegada final



Embudo de plegamiento (Colapso hidrófobo: glóbulo fundido)



Plegamiento en varios pasos

1. **Formación de estructuras secundarias** (α -hélice y β -lámina)
Actúan como **núcleos de plegamiento**, estabilizando otras regiones ordenadas de la proteína
2. **Formación de dominios**
Por agregación cooperativa de distintos núcleos de plegamiento
3. **Formación del glóbulo fundido**
En proteínas con varios dominios, dichos dominios se agregan formando un glóbulo fundido
4. **Transformación del glóbulo fundido en una estructura terciaria** que adopta la estructura nativa de una proteína monomérica
Se logra mediante pequeños cambios conformacionales
5. **Adquisición de la estructura cuaternaria** y obtención de la **forma nativa**
Estructura cuaternaria exclusivamente en proteínas multiméricas

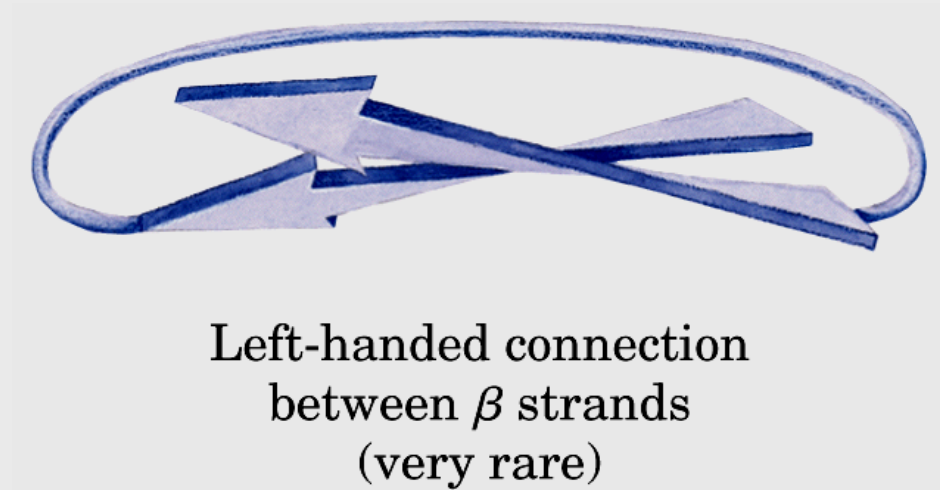
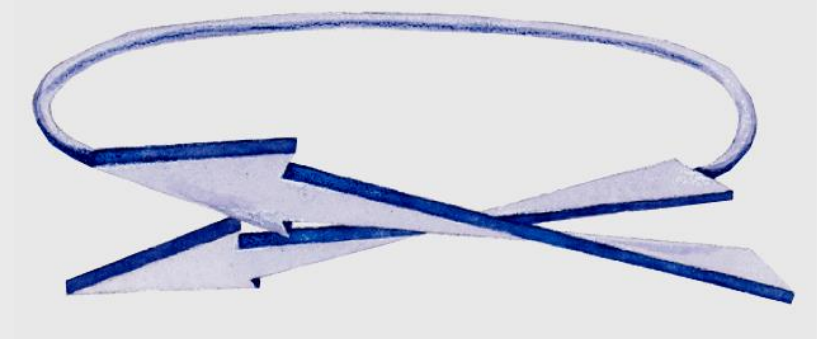
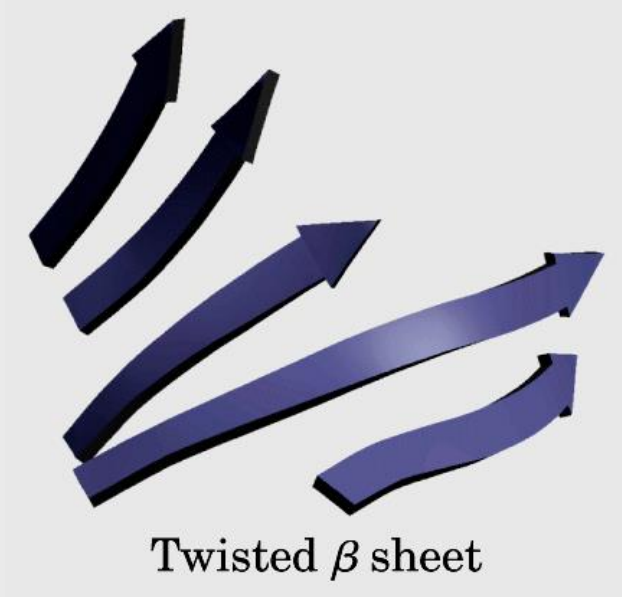
Interacción entre regiones de estructura secundaria

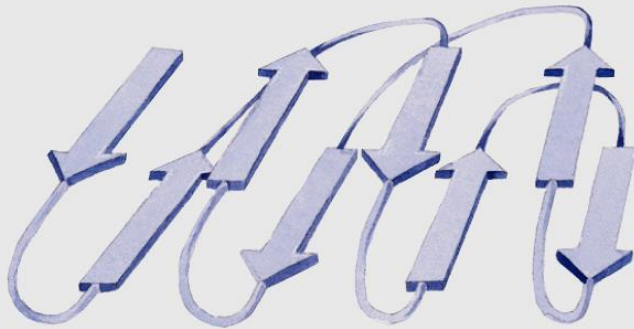
Formación de estructuras supersecundarias: "Motifs"

- Torsión dextrógira de la conformación β extendida, influye sobre la disposición de las hojas β y sobre la conformación del segmento que las conecta: **cadena que cruza dos hojas β paralelas, giro β , barril β y silla β .**
- **Lazo β - α - β** : oculta R hidrofóbicos en el interior de una proteína hidrosoluble
- **Hojas β encimadas**, con R hidrofóbicos en el espacio interior
- **Hojas β cubiertas** en uno de sus lados por varias hélices α

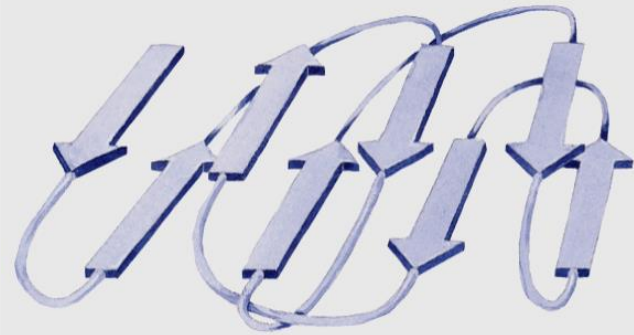
Proteínas pequeñas: presentan inconvenientes para alojar R hidrofóbicos en su interior => mantienen conformación nativa en base a enlace covalentes p.ej. -S-S- (ribonucleasa, insulina), grupo Hemo unido a una proteína (citocromo c).

Conformación de la lámina β





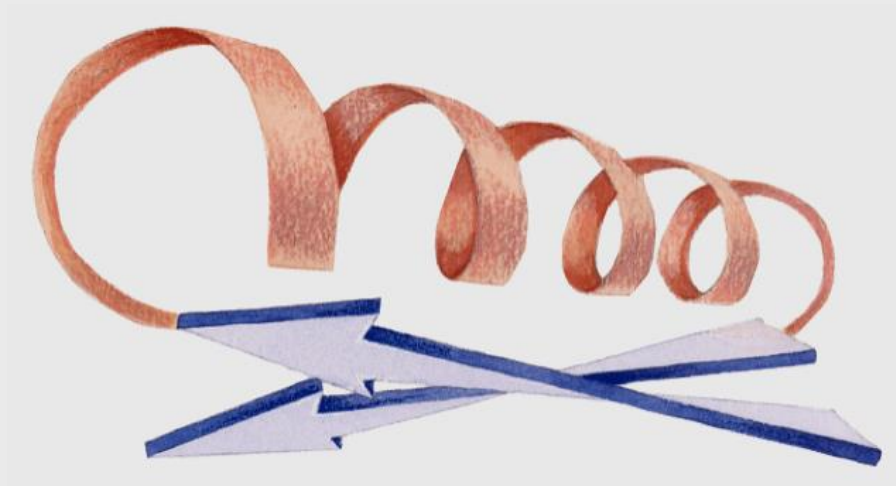
Typical connections
in an all- β motif



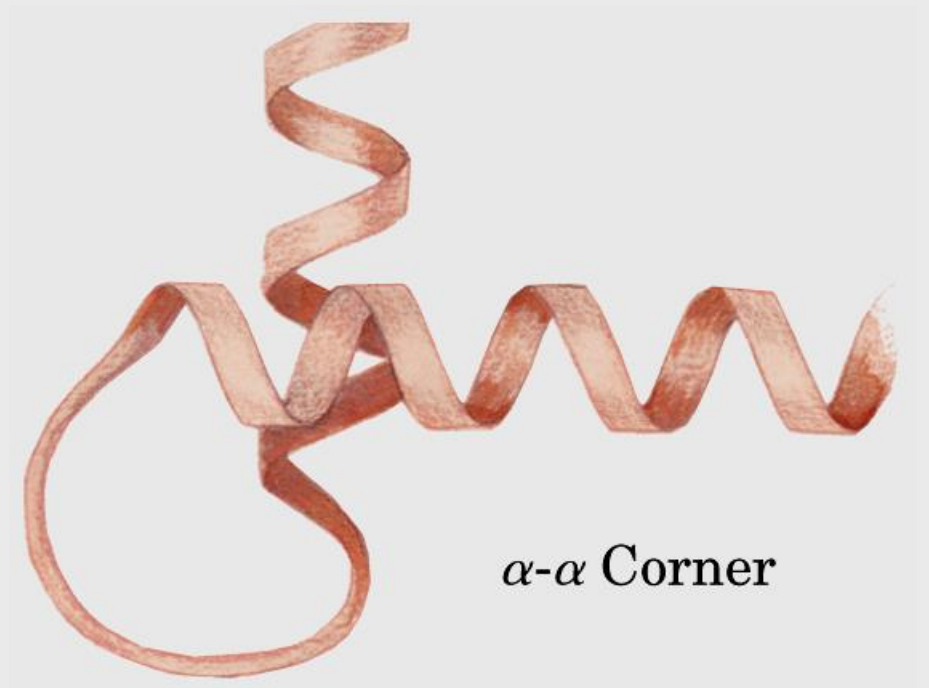
Crossover connection
(not observed)



β Barrel



β - α - β Loop



α - α Corner

Common Motifs

(a) Helix-loop-helix



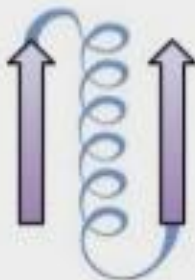
(b) Coiled coil



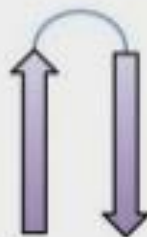
(c) Helix bundle



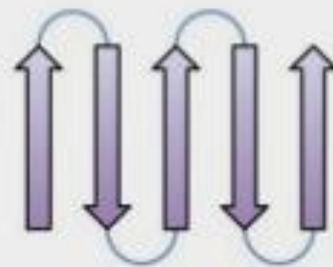
(d) $\beta\alpha\beta$ unit



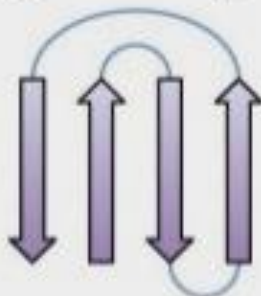
(e) Hairpin



(f) β meander



(g) Greek key



(h) β -sandwich



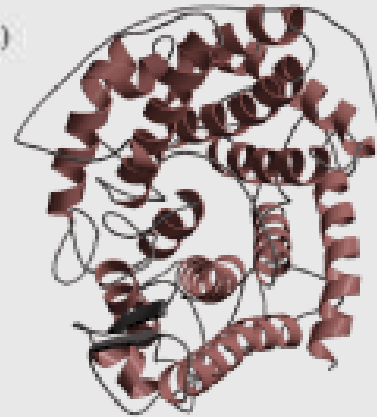
All α



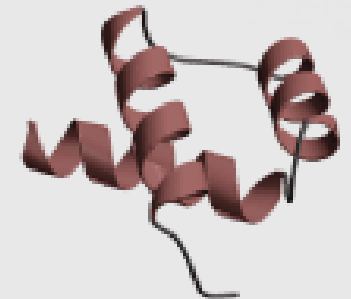
1a06
 Serum albumin
 Serum albumin
 Serum albumin
 Serum albumin
 Human (*Homo sapiens*)



1bcf
 Ferritin-like
 Ferritin-like
 Ferritin
 Bacterioferritin (cytochrome b_1)
Escherichia coli



1gai
 α/α toroid
 Glycosyltransferases of the
 superhelical fold
 Glucoamylase
 Glucoamylase
Aspergillus awamori, variant x100



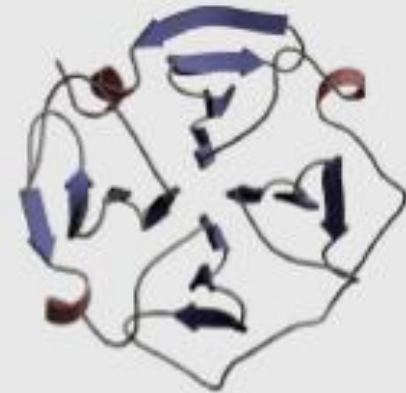
1snh
 DNA-binding 3-helical bundle
 Homeodomain-like
 Homeodomain
 engrailed Homeodomain
Drosophila melanogaster



1hoe
 α -Amylase inhibitor
 α -Amylase inhibitor
 α -Amylase inhibitor
 HOE-467A
Streptomyces tendae 4158



1lxe
 Single-stranded left-handed β helix
 Trimeric LpxA-like enzymes
 UDP *N*-acetylglucosamine acyltransferase
 UDP *N*-acetylglucosamine acyltransferase
Escherichia coli



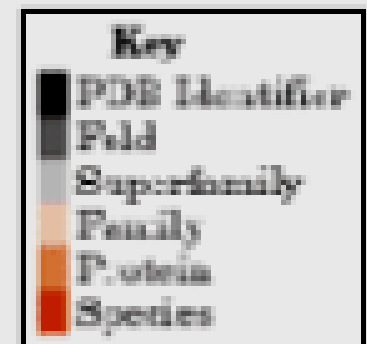
1pex
 Four-bladed β propeller
 Hemopexin-like domain
 Hemopexin-like domain
 Collagenase-3 (MMP-13),
 carboxyl-terminal domain
 Human (*Homo sapiens*)



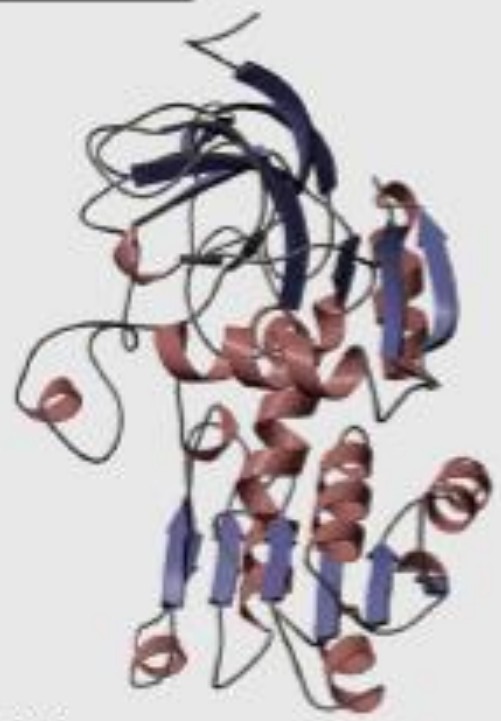
1jpc
 β -Prism II
 α -D-Mannose-specific plant lectins
 α -D-Mannose-specific plant lectins
 Lectin (agglutinin)
 Snowdrop (*Galanthus nivalis*)



1cd8
 Immunoglobulin-like β sandwich
 Immunoglobulin
 Antibody variable domain-like
 CD8
 Human (*Homo sapiens*)



α/β



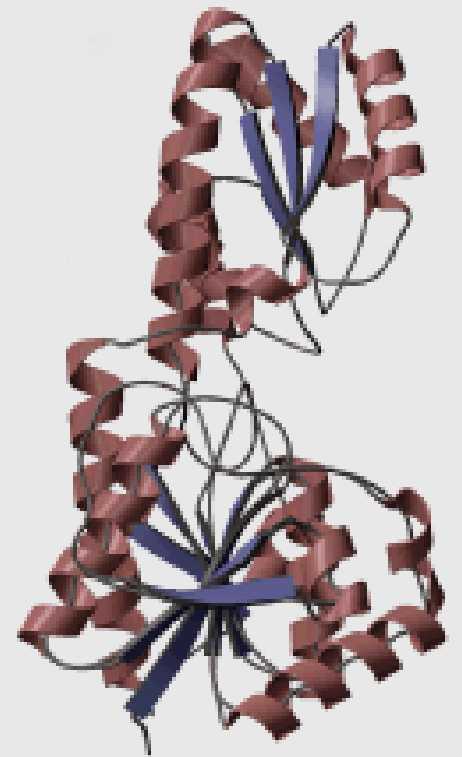
- 1deh
- NAD(P)-binding Rossmann-fold domains
- NAD(P)-binding Rossmann-fold domains
- Alcohol/glucose dehydrogenases, carboxyl-terminal domain
- Alcohol dehydrogenase
- Human (*Homo sapiens*)



- 1dub
- Crotonase-like
- Crotonase-like
- Crotonase-like
- Enoyl-CoA hydratase
- Rat (*Rattus norvegicus*)

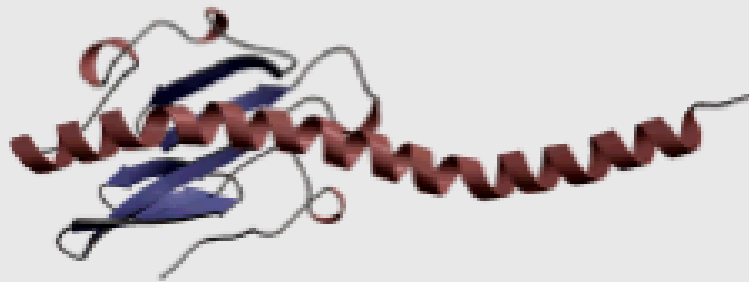
Key

- PDB Identifier
- Fold
- Superfamily
- Family
- Protein
- Species

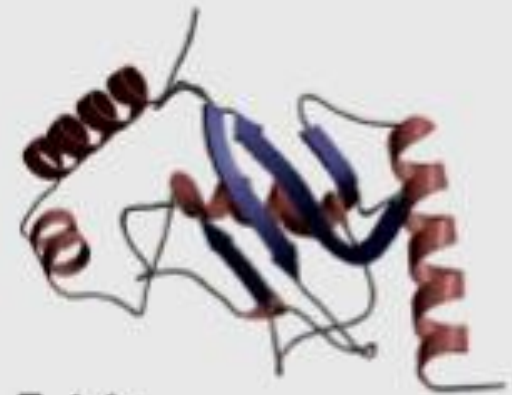


- 1pfk
- Phosphofructokinase
- Phosphofructokinase
- Phosphofructokinase
- Phosphofructokinase
- Escherichia coli*

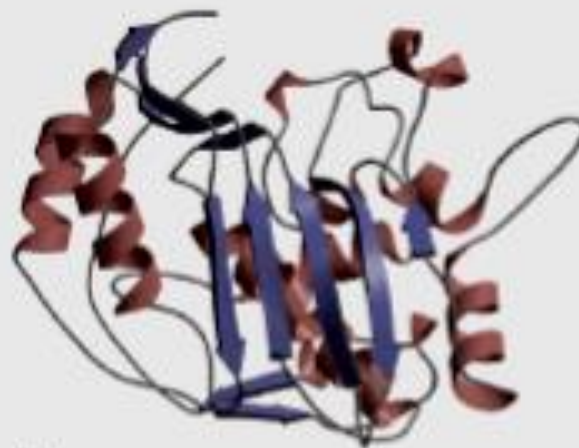
$\alpha + \beta$



- 2pil
- Pilin
- Pilin
- Pilin
- Pilin
- Neisseria gonorrhoeae*



- 1u9a
- Ubiquitin-conjugating enzyme
- Ubiquitin-conjugating enzyme
- Ubiquitin-conjugating enzyme
- Ubiquitin-conjugating enzyme
- Human (*Homo sapiens*)



- 1syn
- Thymidylate synthase
- Thymidylate synthase
- Thymidylate synthase
- Thymidylate synthase
- Escherichia coli*



- 1ema
- Green fluorescent protein
- Green fluorescent protein
- Green fluorescent protein
- Green fluorescent protein
- Jellyfish (*Aequorea victoria*)

Key

- PDB Identifier
- Fold
- Superfamily
- Family
- Protein
- Species

Contenido de la clase

- Formas estructurales de las proteínas
- Estructura secundaria de las proteínas
 - Hélice α (alfa)
 - Conformación β (beta)
- Estructura terciaria de proteínas
- Desnaturalización y plegamiento
- **Plegamiento en la célula**
- Termodinámica del plegamiento
- Estructura cuaternaria de las proteínas

Cómo se pliegan las proteínas en una célula?

Proteínas **chaperonas** moleculares: por medio de uniones débiles se unen a la proteína durante la síntesis **estabilizándola** y **evitando** que se **agregue** con otras.

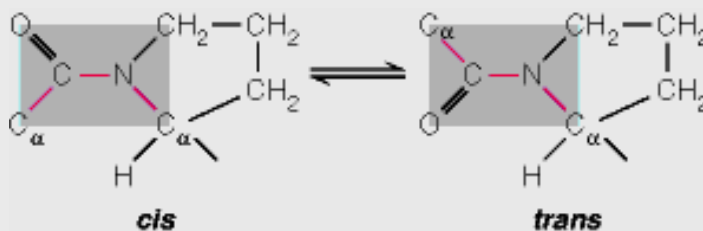
Mecanismo: chaperona unida a ATP expone un **bolsillo hidrófobo** que se une a regiones hidrófobas de la proteína blanco no plegada. Por su actividad ATPasa hidroliza ATP y se disociación de la proteína.

Algunas son conocidas como "heat shock proteins" (Hsp) ya que son inducidas por estrés térmico. Ayudarían a la estabilización de otras proteínas.

- **Chaperoninas:** TCiP (8 unidades de Hsp60 presente en eucariotas) y GroEL (14 subunidades presentes en bacterias).

-Enzimas coadyuvantes (RE)

- Enzimas que participan en la formación reversible de -S-S-.
- Enzimas que participan en la isomerización de Pro (interconversión cis-trans).



Pro: 4 trans - 1 cis

Otros Aa: 1000 trans - 1 cis

Familia Hsp70/Hsp90: chaperonas

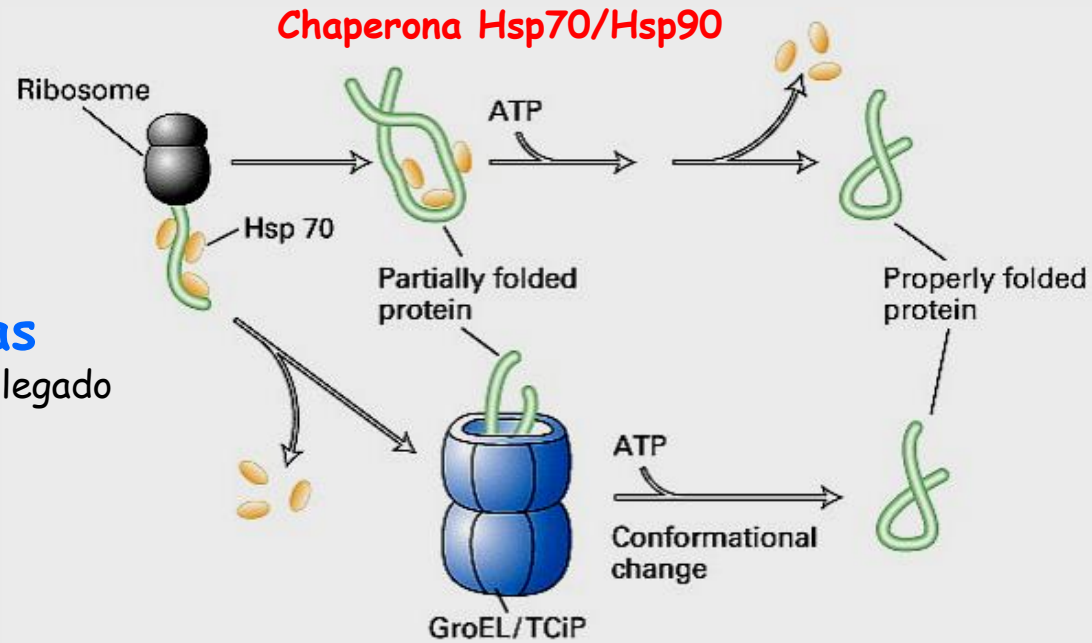
- HSP70 ubicuo (citosol/RE)
- HSP 90 (citosólico)
- Bajo Mr
- Unión a zonas hidrofóbicas
- Previene agregación/plegamiento prematuro

Familia Hsp60: chaperoninas

- Complejo macromolecular: cavidad de plegado
- Plegamiento asistido (catálisis)
- ATPasas: plegado ATP-dependiente

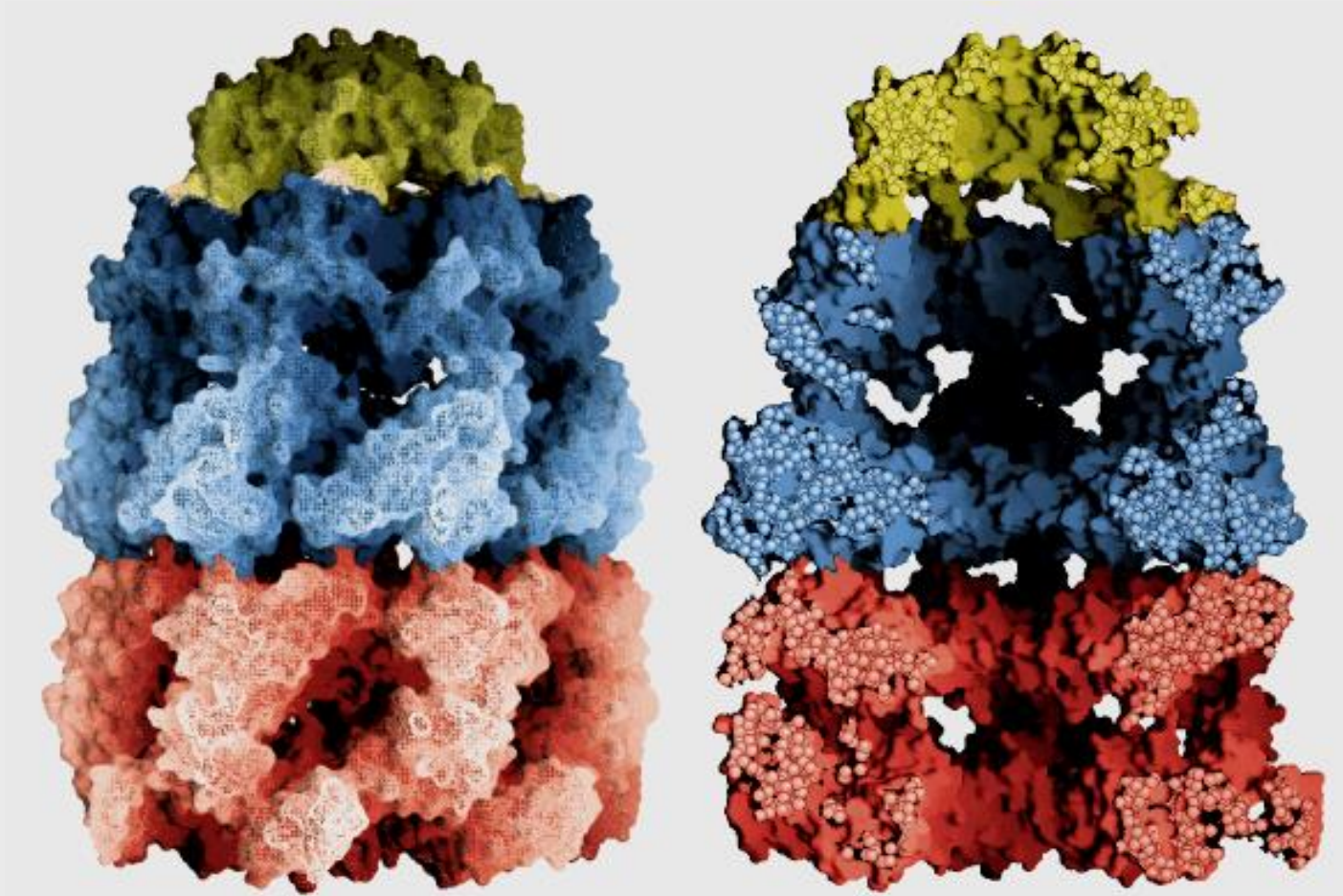
Enzimas coadyuvantes (RE)

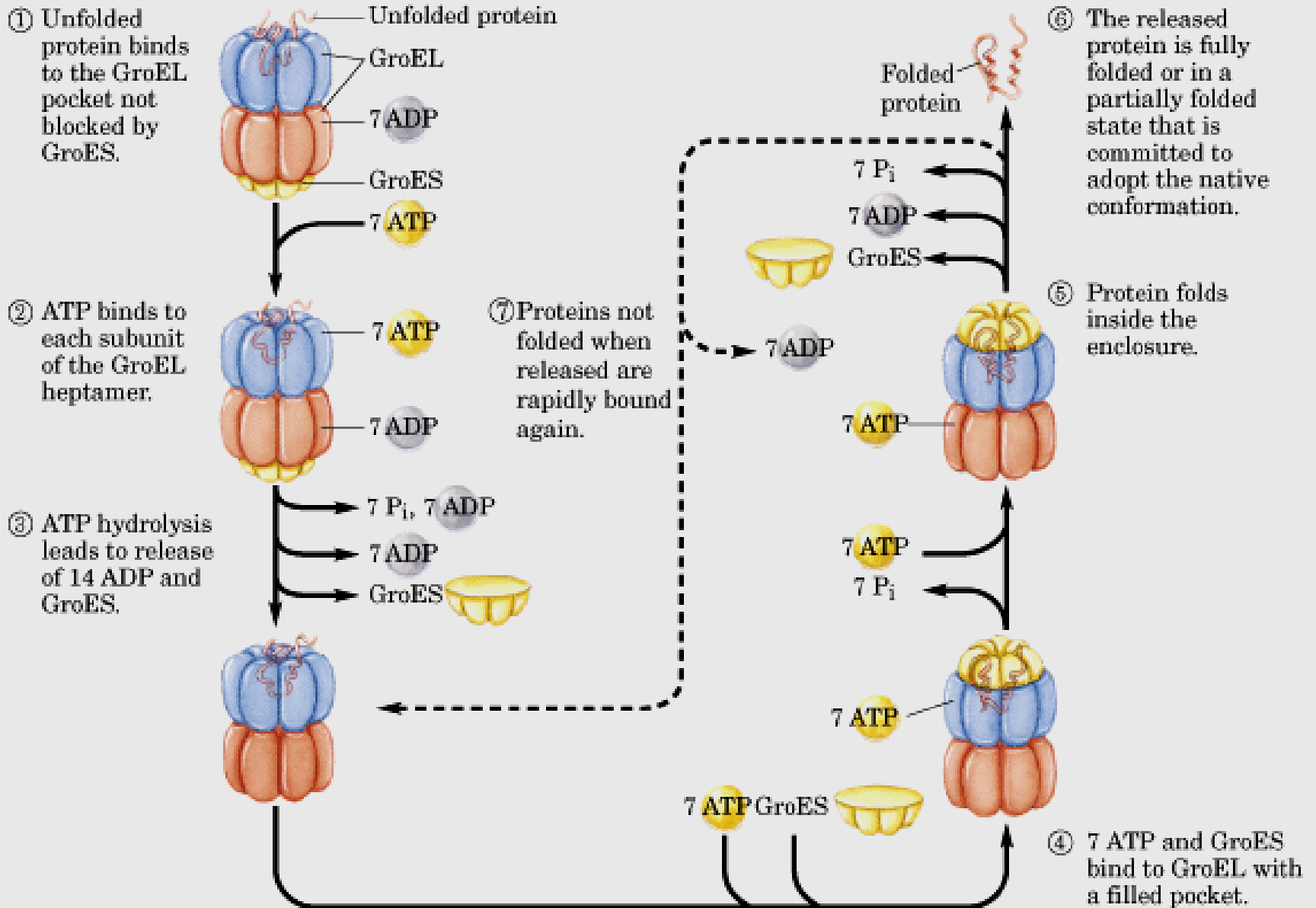
- Proteína disulfuro isomerasa (PDI)
- Peptido-Prolil cis-tras isomerasa (PPI)



**Chaperonina Hsp60
(exclusivo citosol)**

Chaperoninas: sistema GroEL en bacterias





(a)

Contenido de la clase

- Formas estructurales de las proteínas
- Estructura secundaria de las proteínas
 - Hélice α (alfa)
 - Conformación β (beta)
- Estructura terciaria de proteínas
- Desnaturalización y plegamiento
- Plegamiento en la célula
- Estructura cuaternaria de las proteínas

Contenido de la clase

- Formas estructurales de las proteínas
- Estructura secundaria de las proteínas

Hélice α (alfa)

Conformación β (beta)

- Estructura terciaria de proteínas
- Desnaturalización y plegamiento
- Plegamiento en la célula
- **Estructura cuaternaria de las proteínas**

- **Termodinámica del plegamiento**

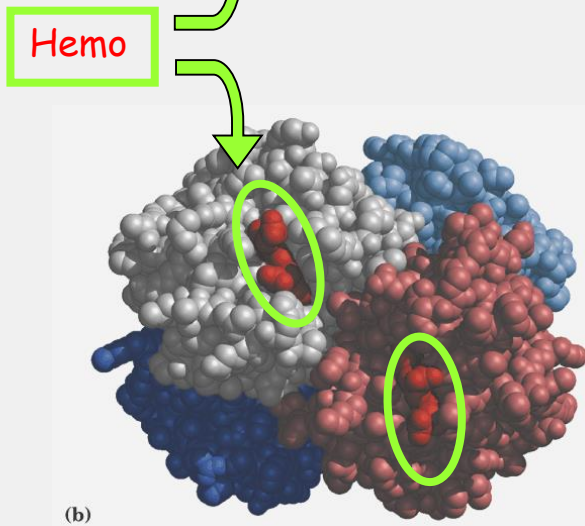
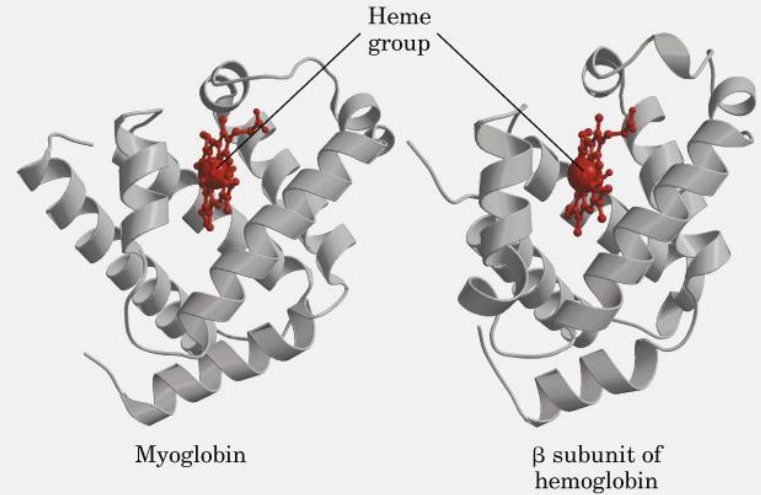
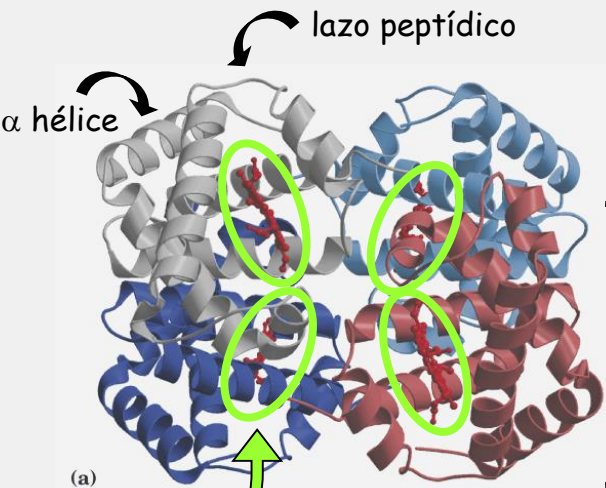
Estructura cuaternaria de las proteínas

disposición de proteínas y subunidades proteicas en complejos tridimensionales.

- **Interacciones de tipo no covalente** entre las subunidades => estabilización de la estructura cuaternaria.
- **Enzimas: unión de un sustrato** => cambio interacción entre subunidades => cambios grandes en la actividad.
- **Rutas metabólicas**: asociación de **enzimas en complejos supramoleculares** => eficacia en la transferencia de los intermedios entre enzimas consecutivas.
- **Complejos con funciones estructurales**: histonas, cápside lo virus

Hemoglobina

- 4 grupos prostéticos Hemo asociados a Fe^{2+}



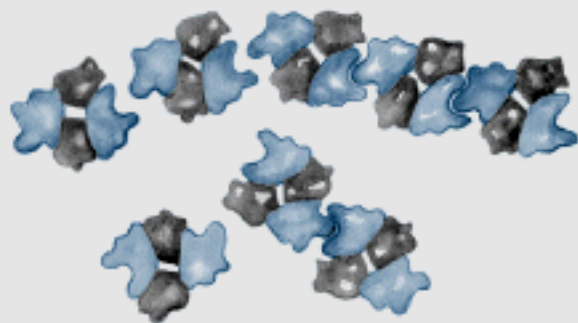
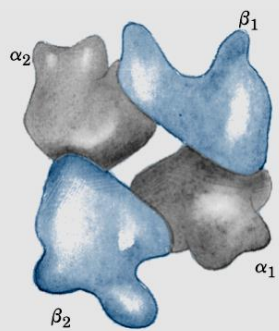
Cadenas α

Cadenas β

- 4 cadenas polipeptídicas: globinas
 - 2 cadenas α (141 Aa c/u)
 - 2 cadenas β (146 Aa c/u)

Existen muchos puntos de contacto **entre α y β** por **R hidrofóbicos** y, en menor medida, **interacciones iónicas** de los **-COOH terminales**.

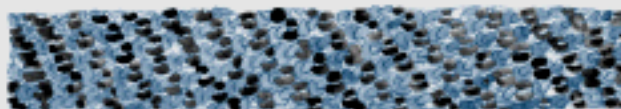
- 300 variaciones génicas en la población humano (cambios individuales de Aa: estructura y función de Hb sin alteraciones significativas)
- **Anemia falciforme**: Glu (6, superficial) por Val (hidrofóbico) en cada cadena β \Rightarrow asociación cuaternaria anómala de Hb).



Interaction between molecules



Strand formation



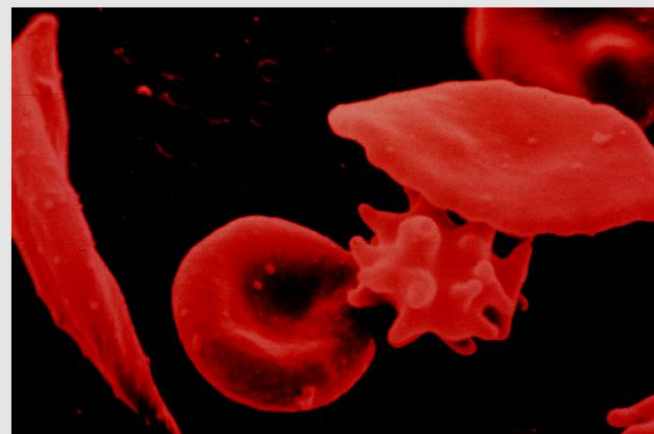
Alignment and crystallization
(fiber formation)

(b)

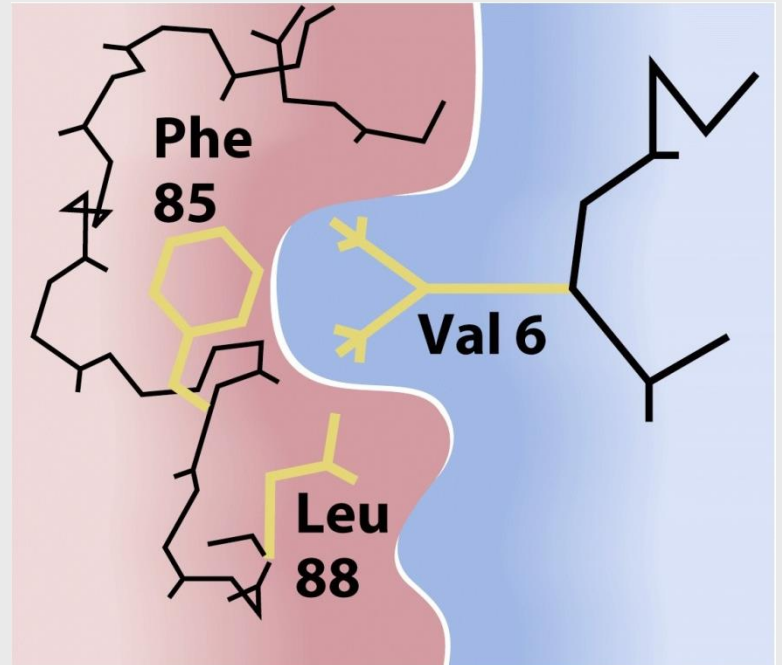
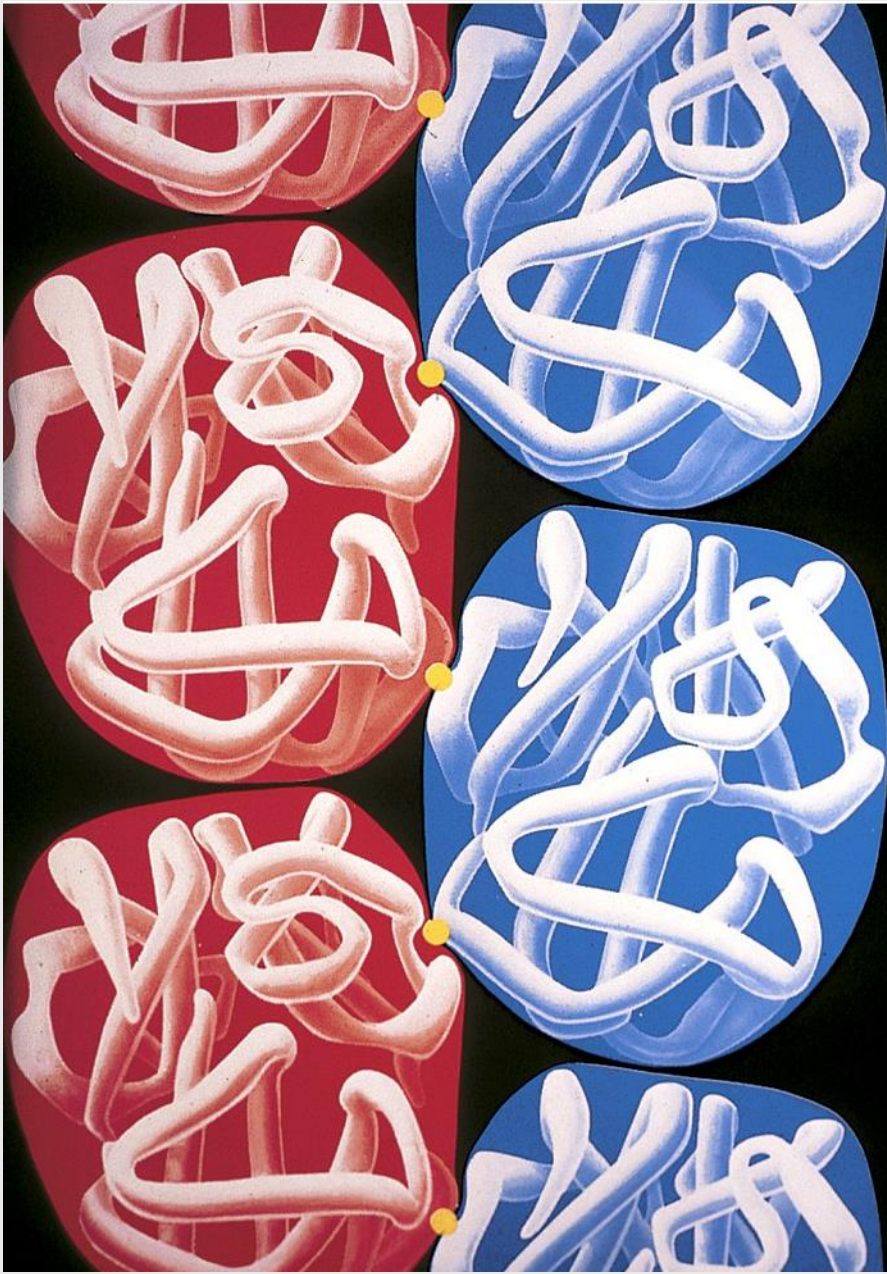


(a)

2 μm

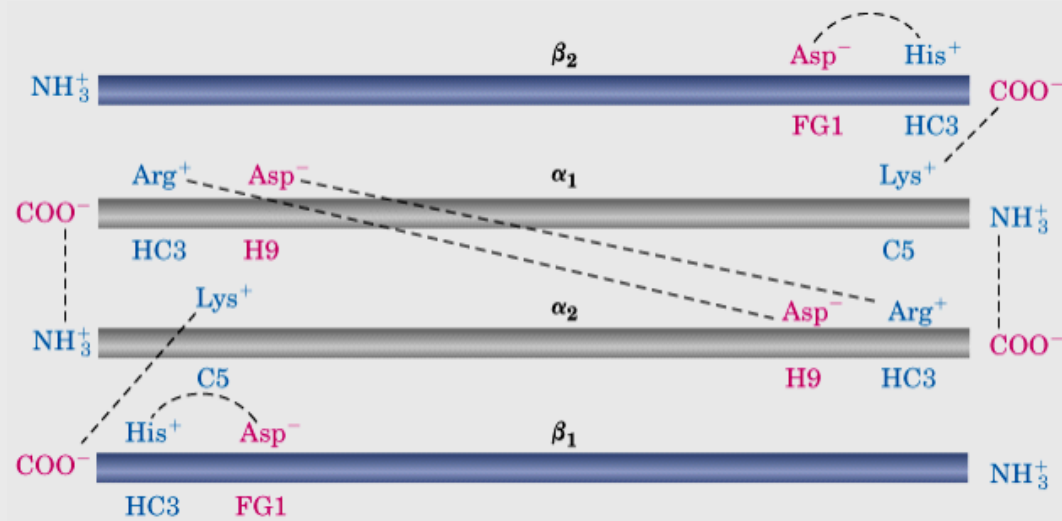
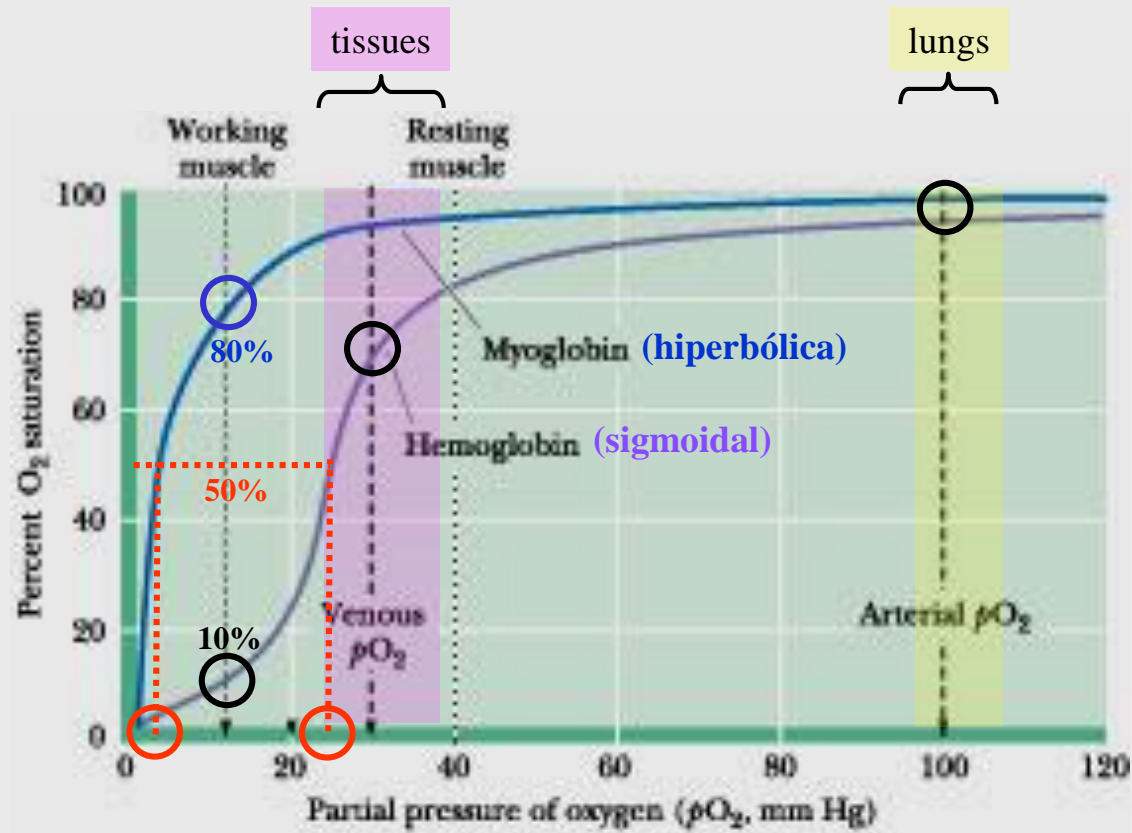


(b)



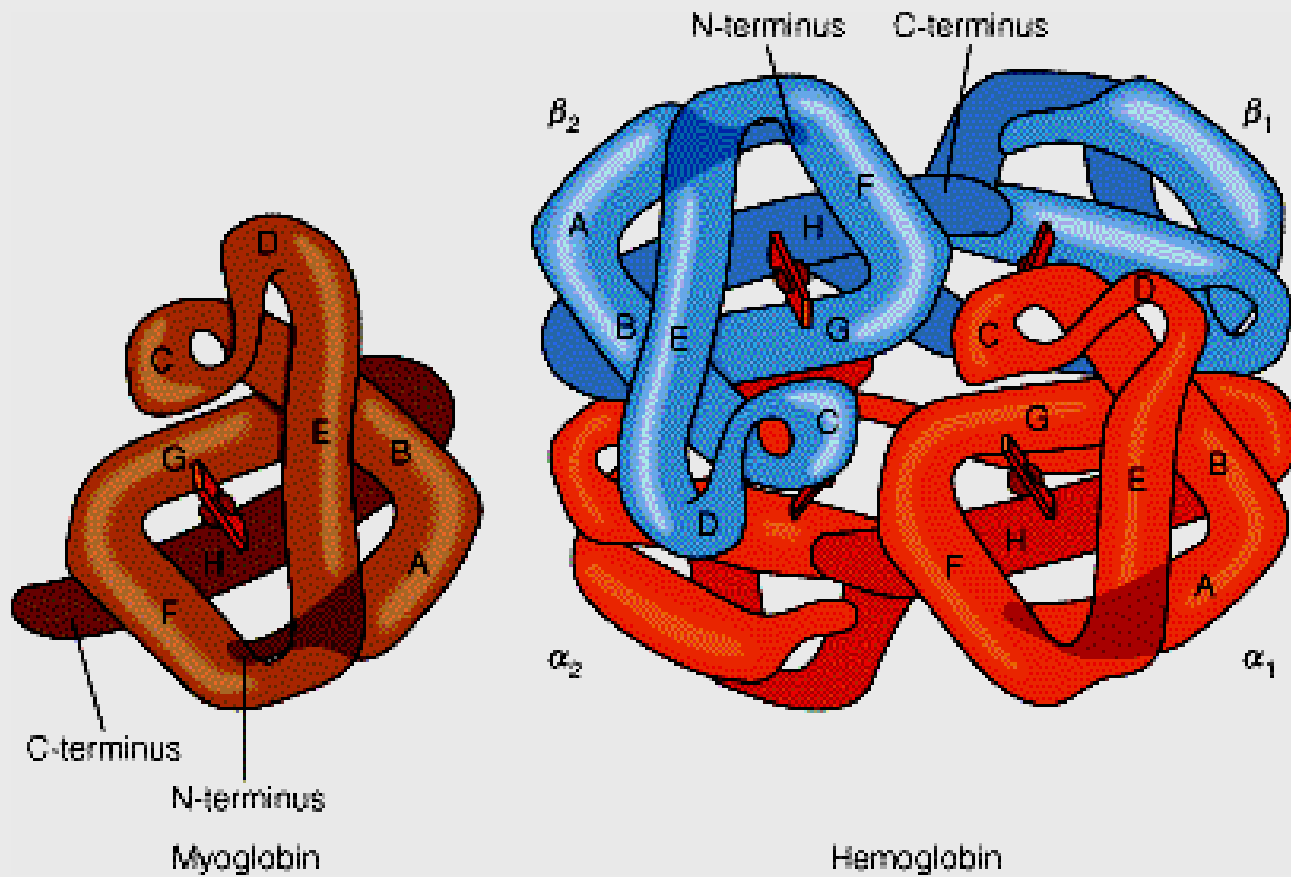
Curvas de fijación de O₂ de Mb y Hb

- Mb:** elevada afinidad por O₂
(curva hipérbola)
-almacenamiento de O₂ en el músculo
- Hb:**
- baja afinidad por el 1° O₂
- alta afinidad por 2°-4° O₂
(pendiente de la curva sigmoidea)

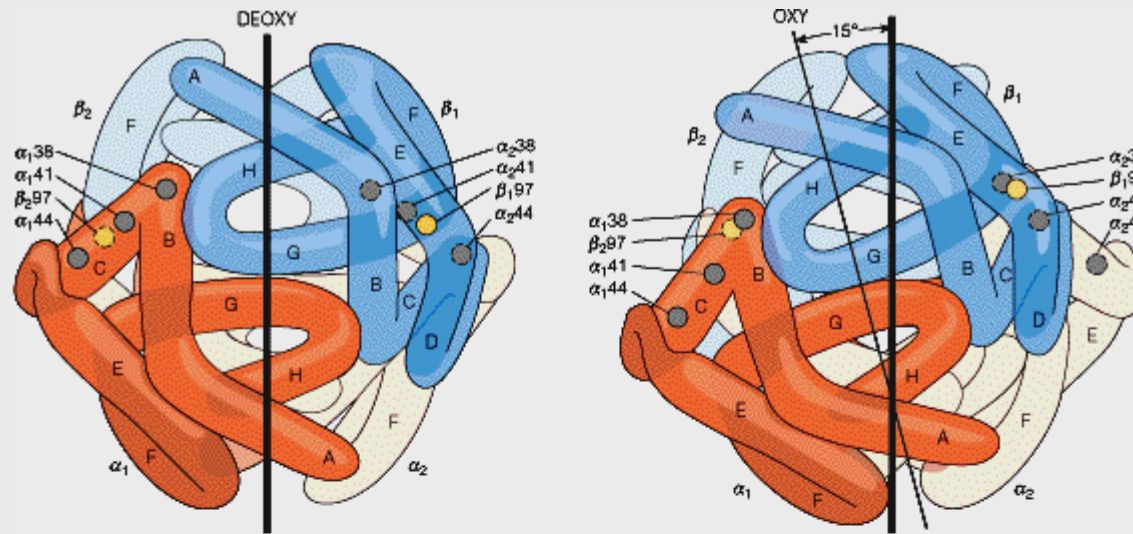


Cooperatividad positiva: O₂ se une al 1° Hemo-polipéptido, este transmite esta info a los restantes => cambio conformacional en la Hb => rotura de interacciones iónicas de los -COOH terminales de la 4 subunidades.

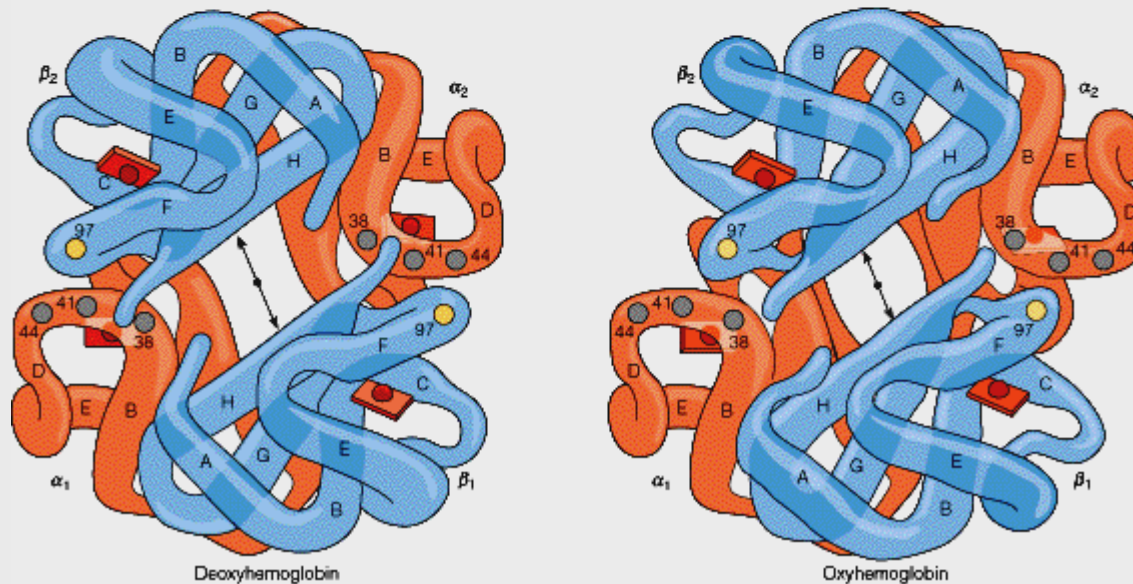
Comparación de la Mb y Hb



Cambio de la estructura cuaternaria Hb durante la oxigenación



(a)



(b)

Limitación en el tamaño de las proteínas

Tamaño limitado por

a)- la capacidad de codificación de los ácidos nucleicos.

Es más eficiente sintetizar muchas copias de una proteína pequeña que una copia de una proteína grande.

- p.ej. cápside de un virus: es una estructura muy grande sin embargo el genoma pequeño del virus codifica muchas copias de una o varias proteínas pequeñas

b)- la exactitud del proceso de biosíntesis de proteínas.

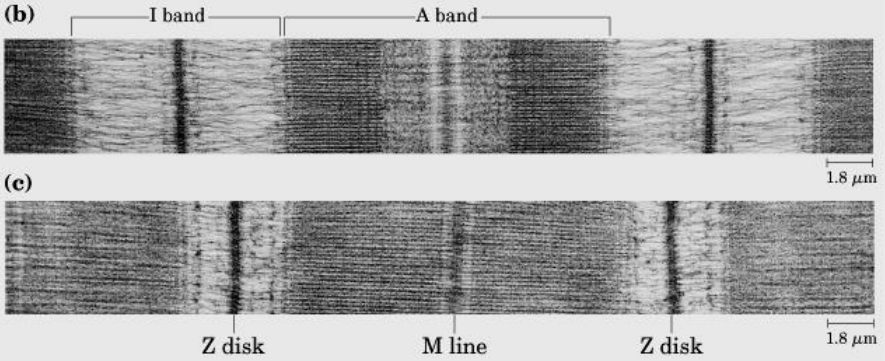
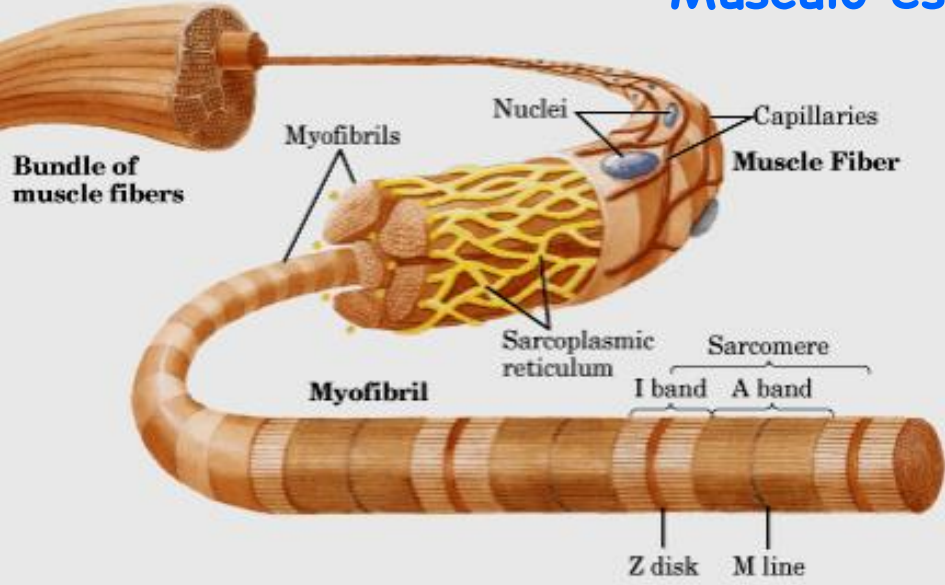
Frecuencia de errores: baja, pero más significativa en proteínas grande

Complejos supramoleculares

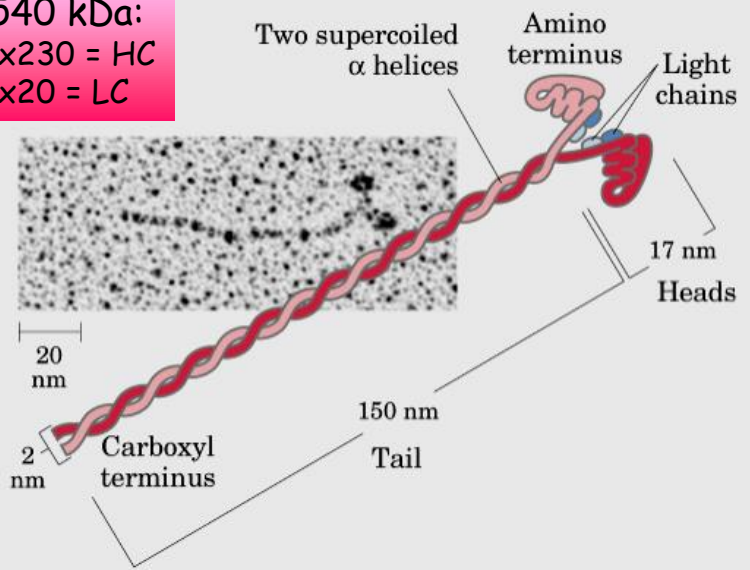
Complejos proteicos:

- músculo
- citoesqueleto
- empaquetamiento de DNA
- maquinaria de la síntesis proteica
- Cápside del virus
- etc.

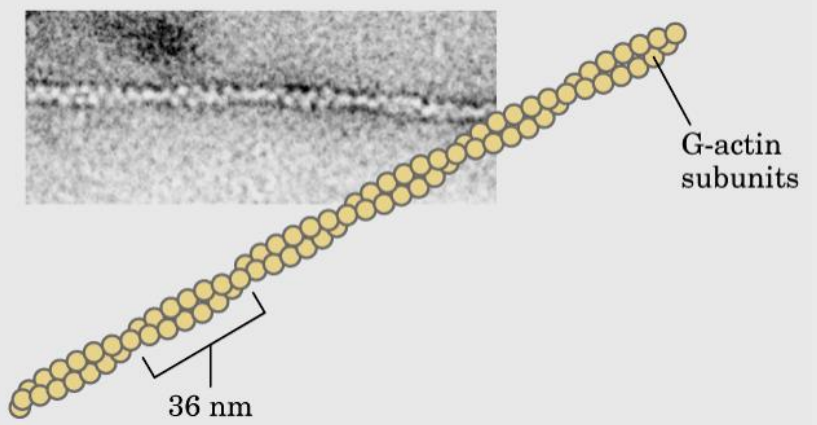
Músculo esquelético



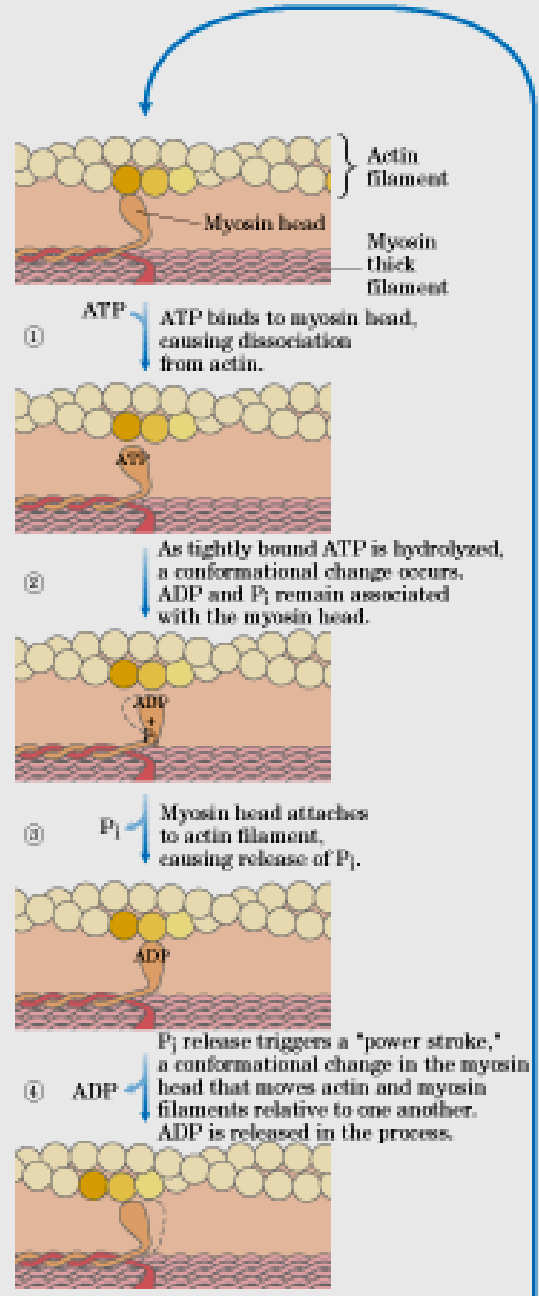
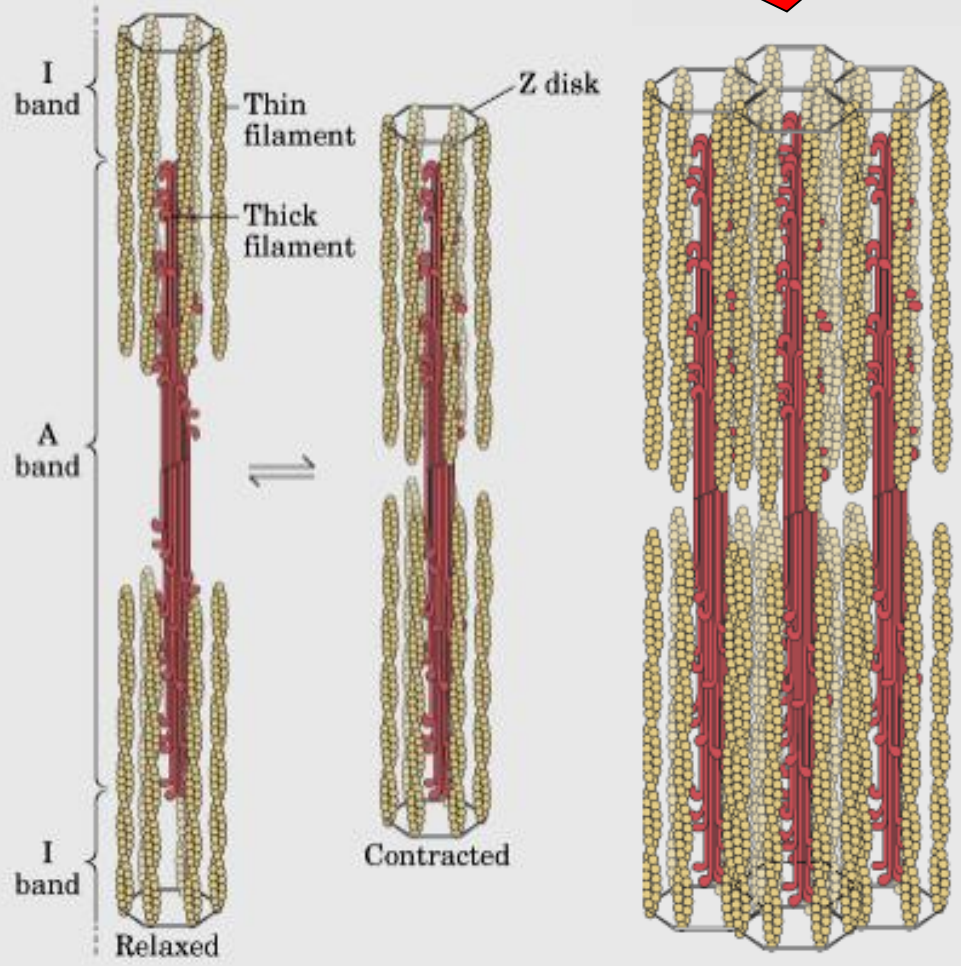
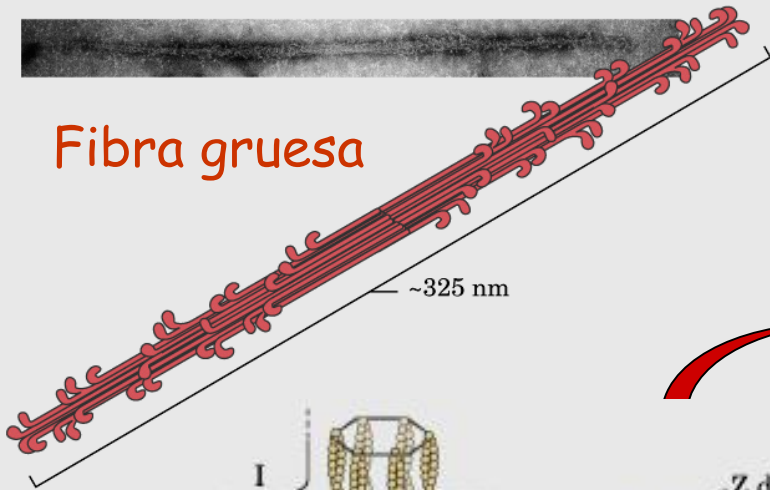
Miosina
 540 kDa:
 $2 \times 230 = \text{HC}$
 $4 \times 20 = \text{LC}$



Actina
 42 kDa

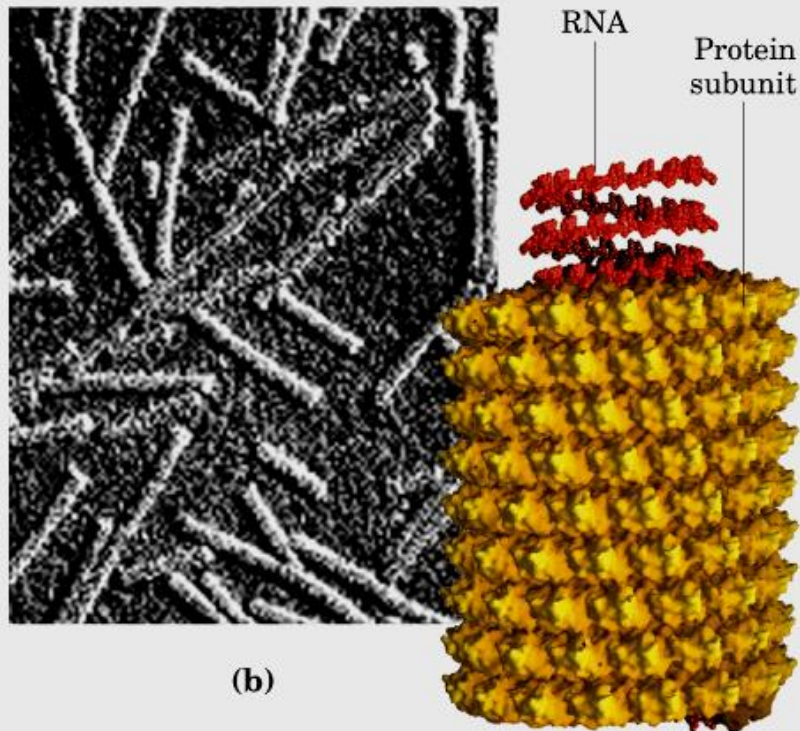


Fibra gruesa



Virus de mosaico del tabaco

2130 copias de una única proteína conformando un cilindro



Rinovirus 14 (resfriado)

- Forma de icosaedro con 12 vértices,
- 20 triángulos equiláteros
- 60 unidades de proteínas
- c/unidad: 4 polipéptidos \neq

