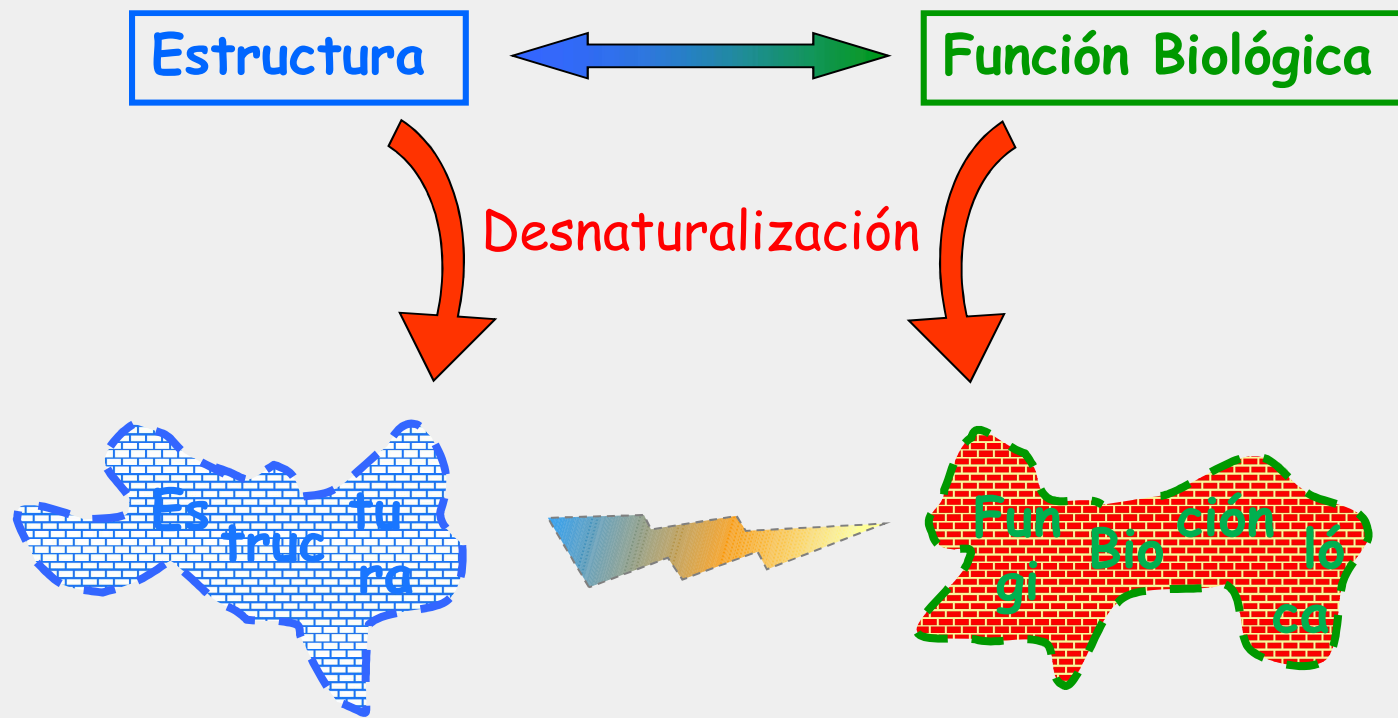


Contenido de la clase

- Desnaturalización y plegamiento de proteína
- Plegamiento: Métodos experimentales
- Modelos de plegamiento
- Termodinámica del plegamiento
- Plegamiento en la célula.



Agentes	Efecto
Calor	actúa sobre interacciones débiles (enlaces H)
pH extremos	cambio de carga neta: repulsiones electrostáticas y destrucción de enlaces H
- Solventes orgánicos (alcohol, acetona) - Urea - Detergentes - Cloruro de guanidinio	actúa sobre interacciones hidrofóbicas

Contenido de la clase

- Desnaturalización y plegamiento de proteína
- Plegamiento: Método experimentales
- Plegamiento: Método informático
- Modelos de plegamiento
- Termodinámica del plegamiento
- Plegamiento en la célula

La estructura terciaria no es rígida

Las proteínas globulares presentan cierta flexibilidad
Cambios conformacionales:

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

Plegamiento de una proteína: rápido y en varias etapas

Por ejemplo: en E. coli sintetiza una proteína de 100 Aa en 5 seg a 37°C.

Suponiendo que

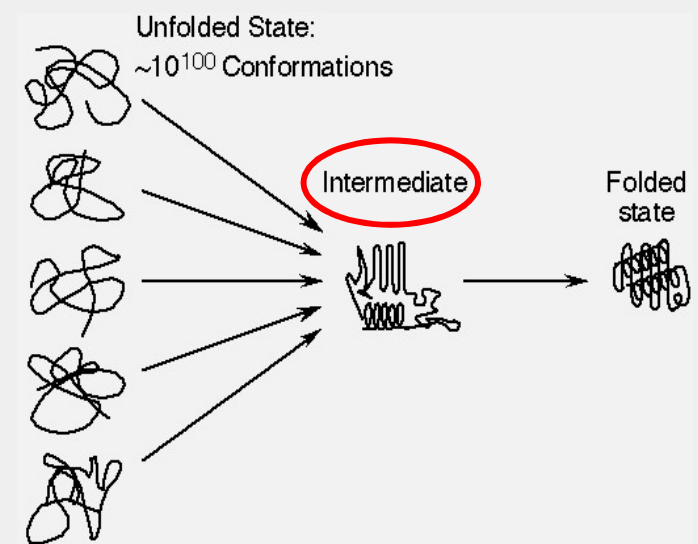
- c/residuo (c/enlace simple) adopta 10 conformaciones independientes $\Rightarrow$ la cadena podrá adoptar 10^{100} conformaciones (paradoja de Levinthal)
- ensayo de conformaciones es al azar
- velocidad de transformación de una conformación en otra es muy rápida ($\approx 10^{-13}$ seg)

"tiempo promedio requerido para visitar todas las posibles conformaciones en el orden de 10^{81} años (edad del universo 15^9 años)"

"el plegamiento NO puede ser al azar (prueba y error)" $\Rightarrow$
bebe seguir atajos: modelos de plegamiento.

Las proteínas generalmente adoptan su estructura tridimensional funcional en intervalos de miliseg.

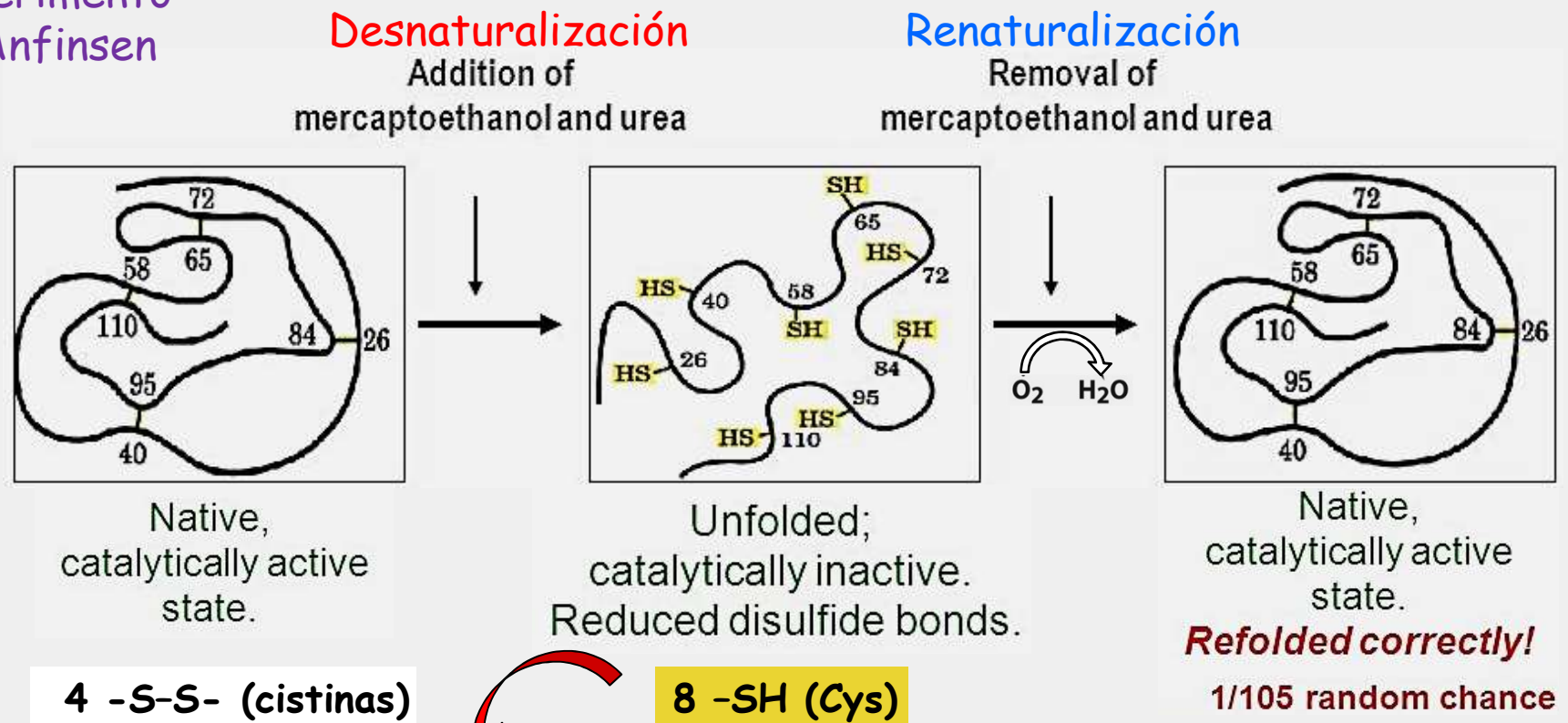
- 5 segundos a 37°C en E. coli (100R)



La secuencia de Aa determina la estructura terciaria y el plegado correcto

- La proteína **Ribonucleasas A** (degradación de ARN) desnaturalizada pueden recuperar su estructura nativa y función biológica **El estado nativo es el estado de menor energía**

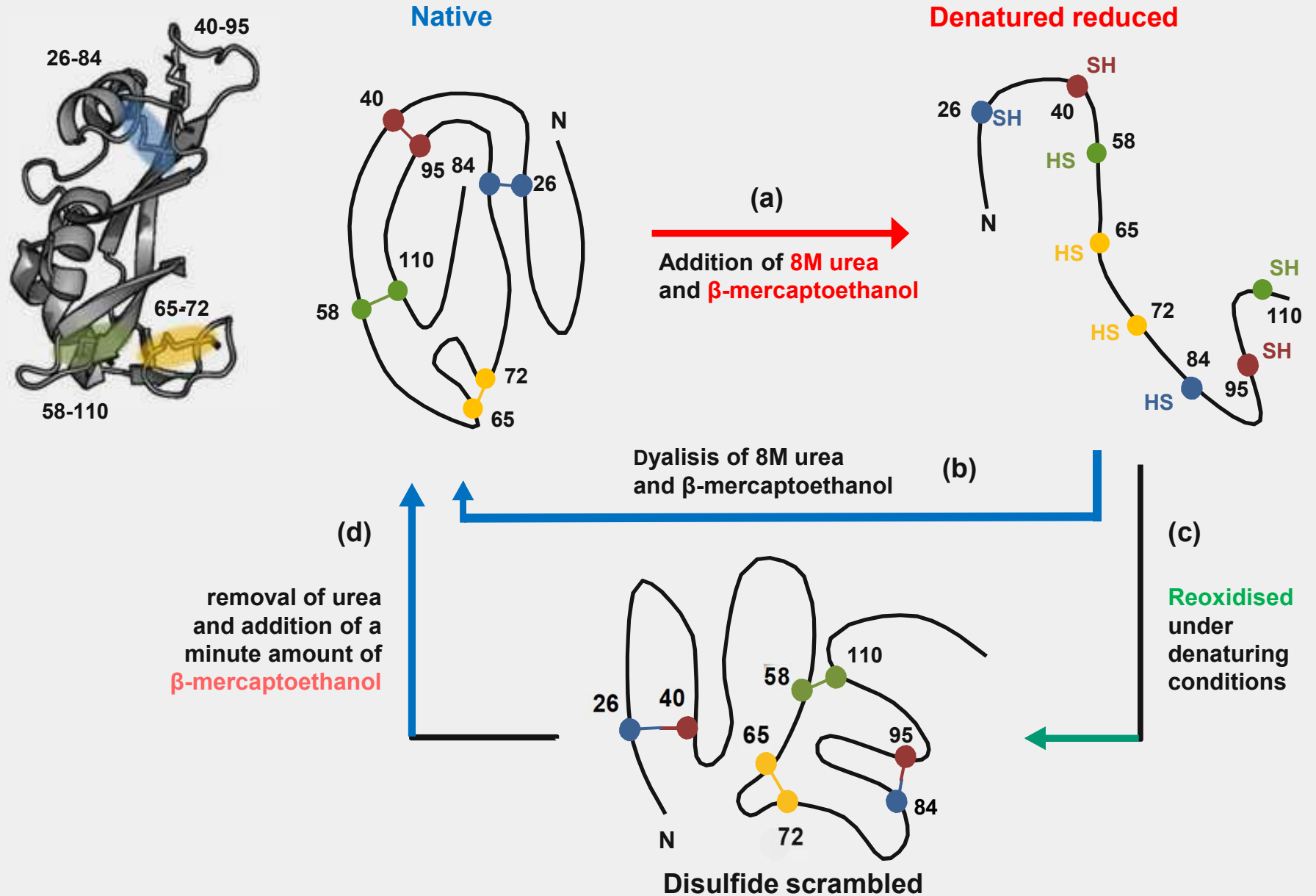
Experimento de Anfinsen



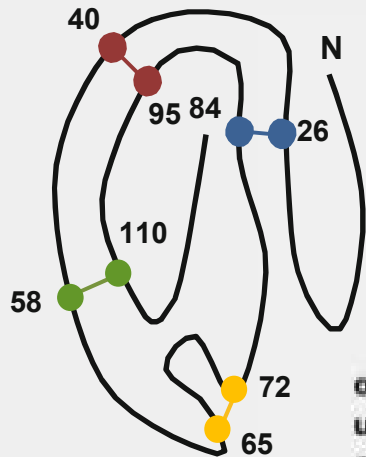
Probabilidad que se vuelva a formar **al azar** los 4 enlaces -S-S- nativos ($1/7 \times 1/5 \times 1/3 \times 1/1 = 1/105$): 105

se forman los 4 -S-S- originales

Ribonucleasa A: experimento de Anfinsen



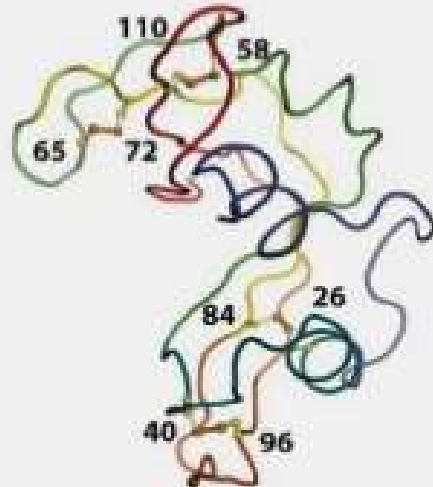
Anfinsen's Experiment



oxidation with O_2
under renaturing
conditions



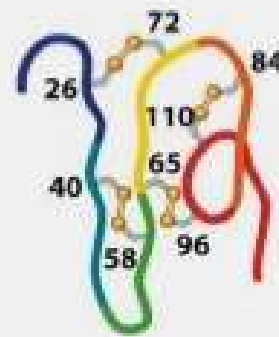
oxidation with O_2
in the presence
of urea, followed by
folding



26-84
40-96
72-65
58-110

native folded protein structure

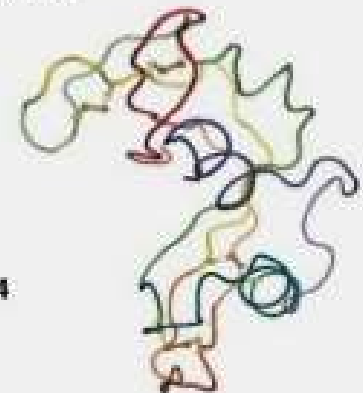
105 possible combinations



26-72
40-58
65-96
84-110



26-72
40-65
58-96
84-110



26-84
40-96
72-65
58-110

~1% native folded
protein structure

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:

- 1° grupo -SH: 5 posibilidades: 1/5
- 2° grupo -SH: 3 posibilidades: 1/3
- 3° grupo -SH: 1 posibilidad: 1/1

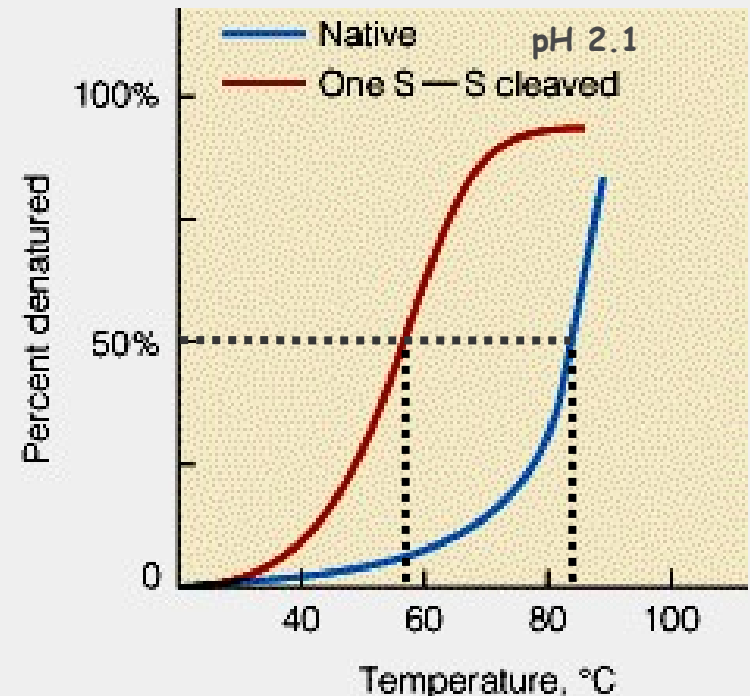
1/15 $\Rightarrow$ 15 combinaciones igualmente posibles
 $\Rightarrow$ ~7% BPTI se pliega con éxito por azar

Sin embargo ~100% de las moléculas (BPTI u otros ej.) muestran apareamientos correctos $\Rightarrow$ el plegado preferido ubica los -SH en posición correcta para formar los -S-S-, los que contribuyen a la estabilidad de la proteína

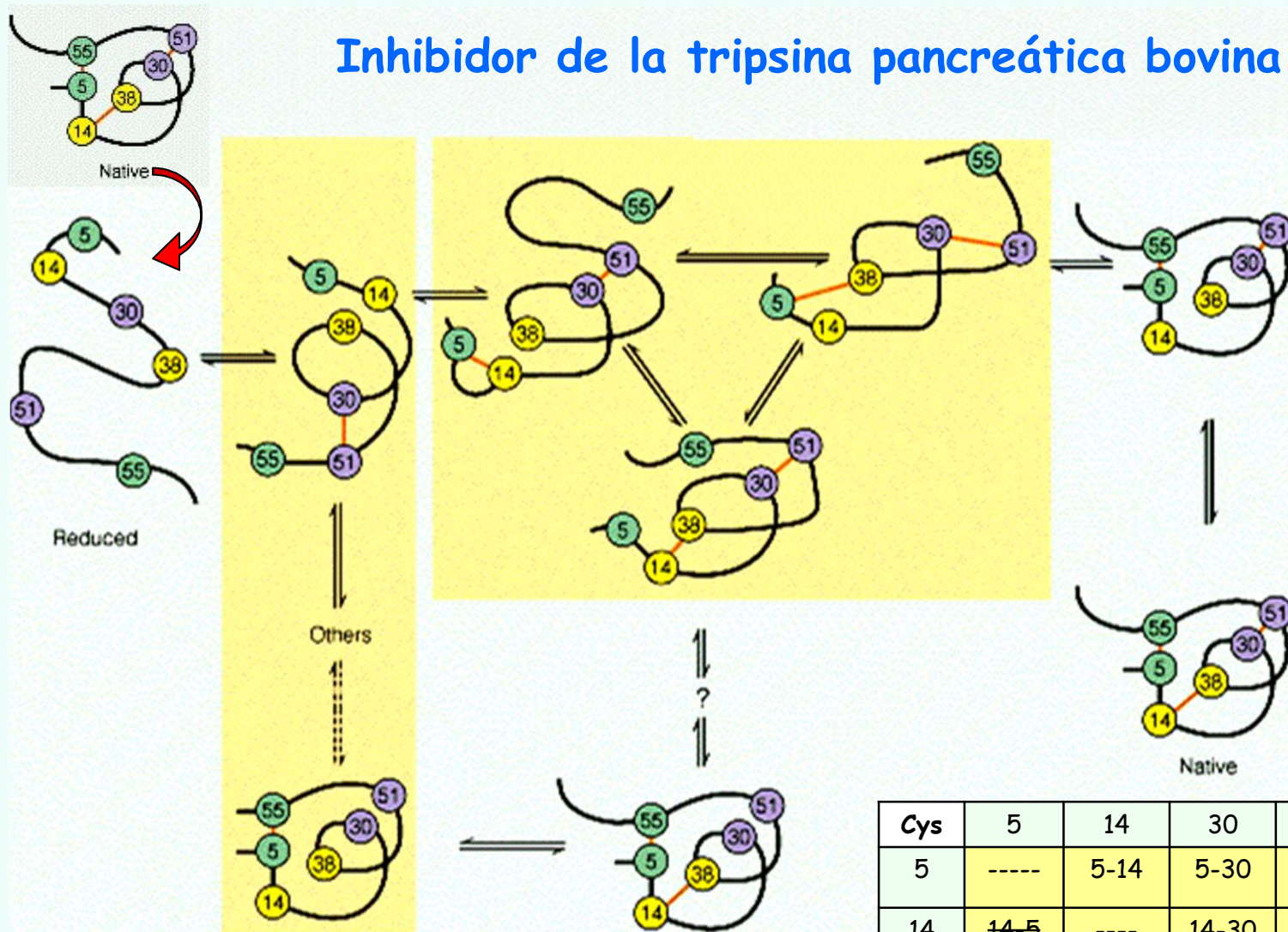
Conclusión: -S-S-: NO son esenciales para el plegado correcto, SÍ contribuyen a la estabilidad en la molécula plegada.

- 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.



Inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI)

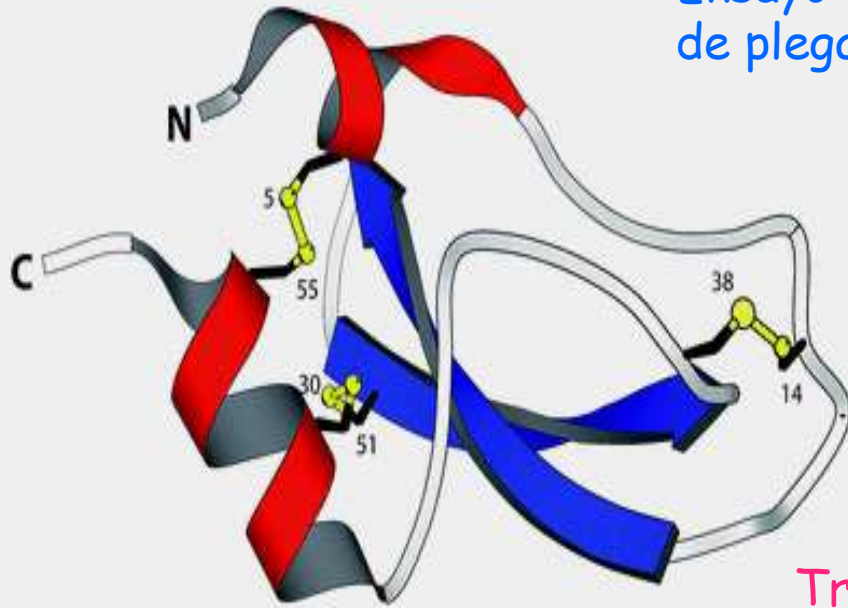


15 combinaciones
igualmente posibles

Cys	5	14	30	38	51	55
5	-----	5-14	5-30	5-38	5-51	5-55
14	14-5	----	14-30	14-38	14-51	14-55
30	30-5	30-14	-----	30-38	30-51	30-55
38	38-5	38-14	38-30	-----	38-51	38-55
51	51-5	51-14	51-30	51-38	-----	51-55
55	55-5	55-14	55-30	55-38	55-51	-----

Replegado y formación de enlaces disulfuro

Ensayo químico in vitro para detectar intermediarios de plegamiento de BPTI

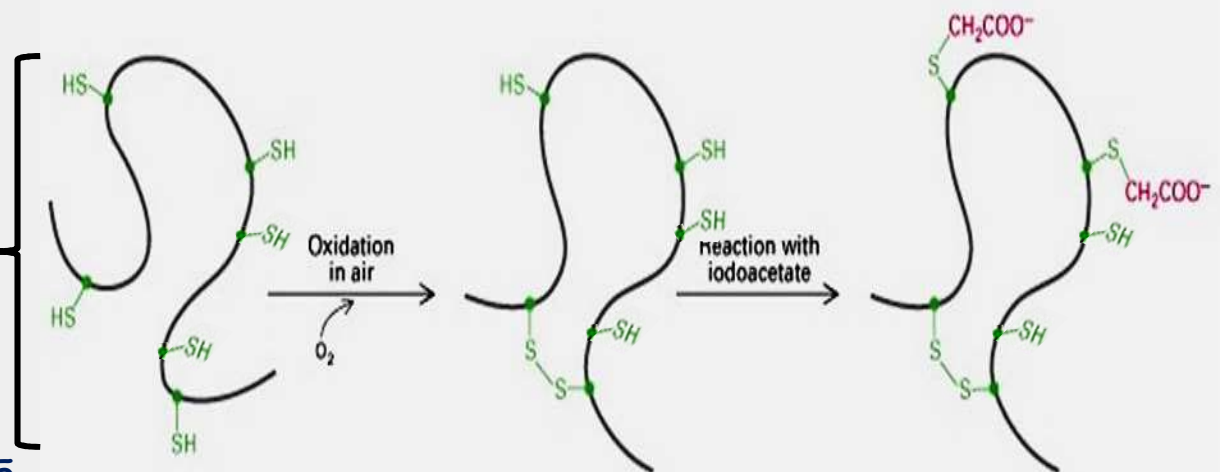


- Reducción de $-S-S- \Rightarrow -SH$
- Desnaturalización a temperatura ambiente
- Bloqueo con yodoacetato de $-SH$ que no han reaccionado
- El derivado S-carboximetilos de Cys es estable. Separación y determinación de intermedios formados por HPLC o electroforesis en gel.

Trapping of Disulfide-bound Intermediate

$\left. \begin{array}{l} C5-C55 \\ C14-C38 \\ C30-C51 \end{array} \right\} -N$

6 Cys: 5, 14, 30, 38, 51, 55



1° grupo $-SH$: 5 posibilidades: $1/5$

2° grupo $-SH$: 3 posibilidades: $1/3$

3° grupo $-SH$: 1 posibilidad: $1/1$

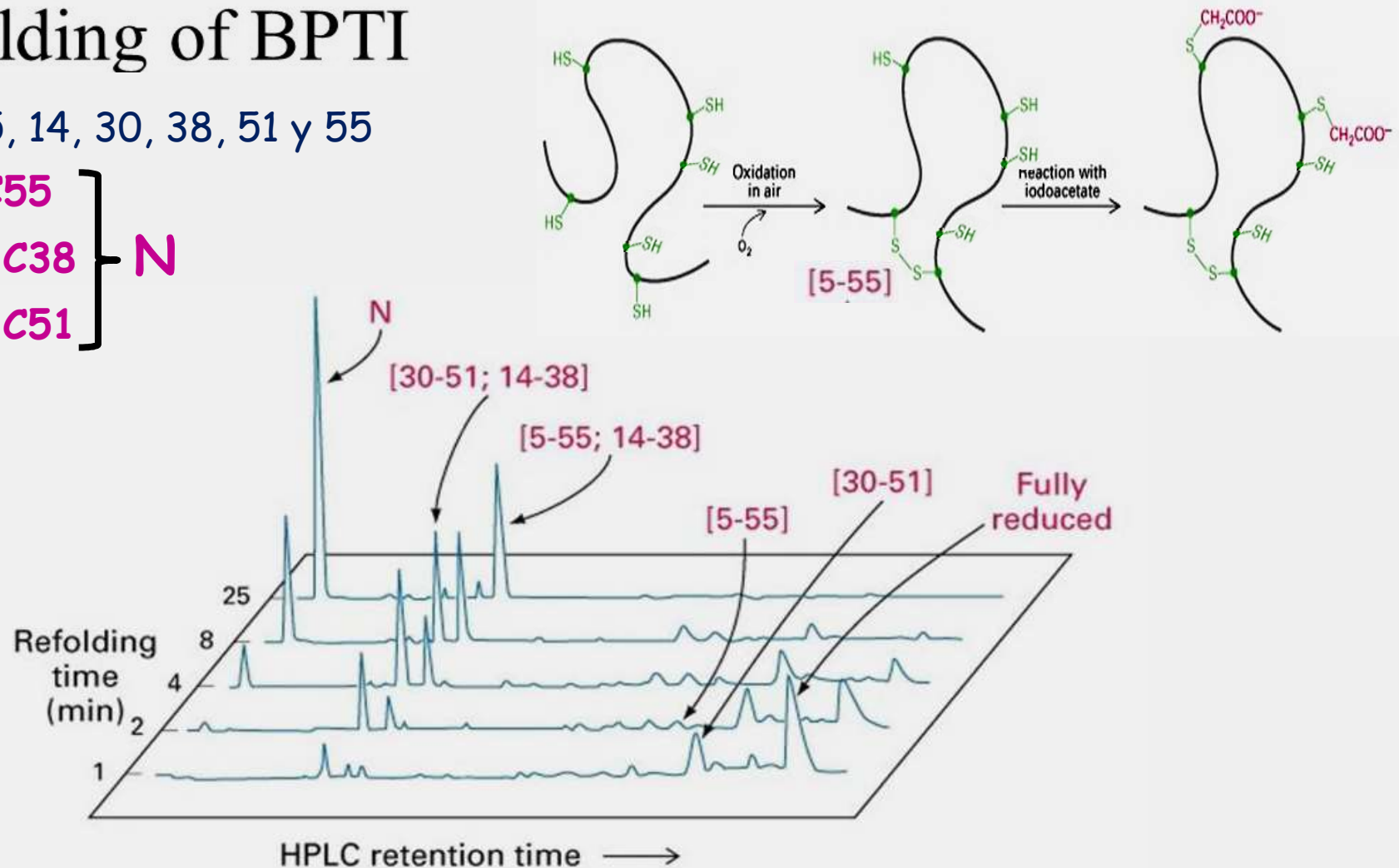
$1/5 \times 1/3 \times 1/1 = 1/15 \equiv 15$ combinaciones igualmente posibles

Folding of BPTI

6 Cys: 5, 14, 30, 38, 51 y 55

C5-C55
C14-C38
C30-C51

N



Disulfide bond formation was quenched at the indicated times by addition of an acid. The identities of the HPLC peaks were determined after free sulfhydryls were reacted with iodoacetate to prevent rearrangements.

Only native disulfide bonds are present in the major peaks.

Contenido de la clase

- Desnaturalización y plegamiento de proteína
- Plegamiento: Método experimentales
- Modelos de plegamiento
- Termodinámica del plegamiento
- Plegamiento en la célula

Proteínas homólogas entre especies

- Relacionadas evolutivamente.
- Similar función (Hb).
- Longitud idéntica.
- Muchas posiciones con = Aa: }

Residuos invariables: = Aa en = posición

Residuos variables: variación de Aa en = posición

- sustituciones conservadoras ($\approx Aa$)
 - sustituciones NO conservadoras ($\neq Aa$)
- posición hipervariable

Amino acid	Abbreviated names
Glycine	Gly G
Alanine	Ala A
Valine	Val V
Leucine	Leu L
Isoleucine	Ile I
Methionine	Met M
Phenylalanine	Phe F
Tyrosine	Tyr Y
Tryptophan	Trp W
Serine	Ser S
Proline	Pro P
Threonine	Thr T
Cysteine	Cys C
Asparagine	Asn N
Glutamine	Gln Q
Lysine	Lys K
Histidine	His H
Arginine	Arg R
Aspartate	Asp D
Glutamate	Glu E

Comparación de las secuencias de Aa en el citocromo de $\neq$ especies



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.

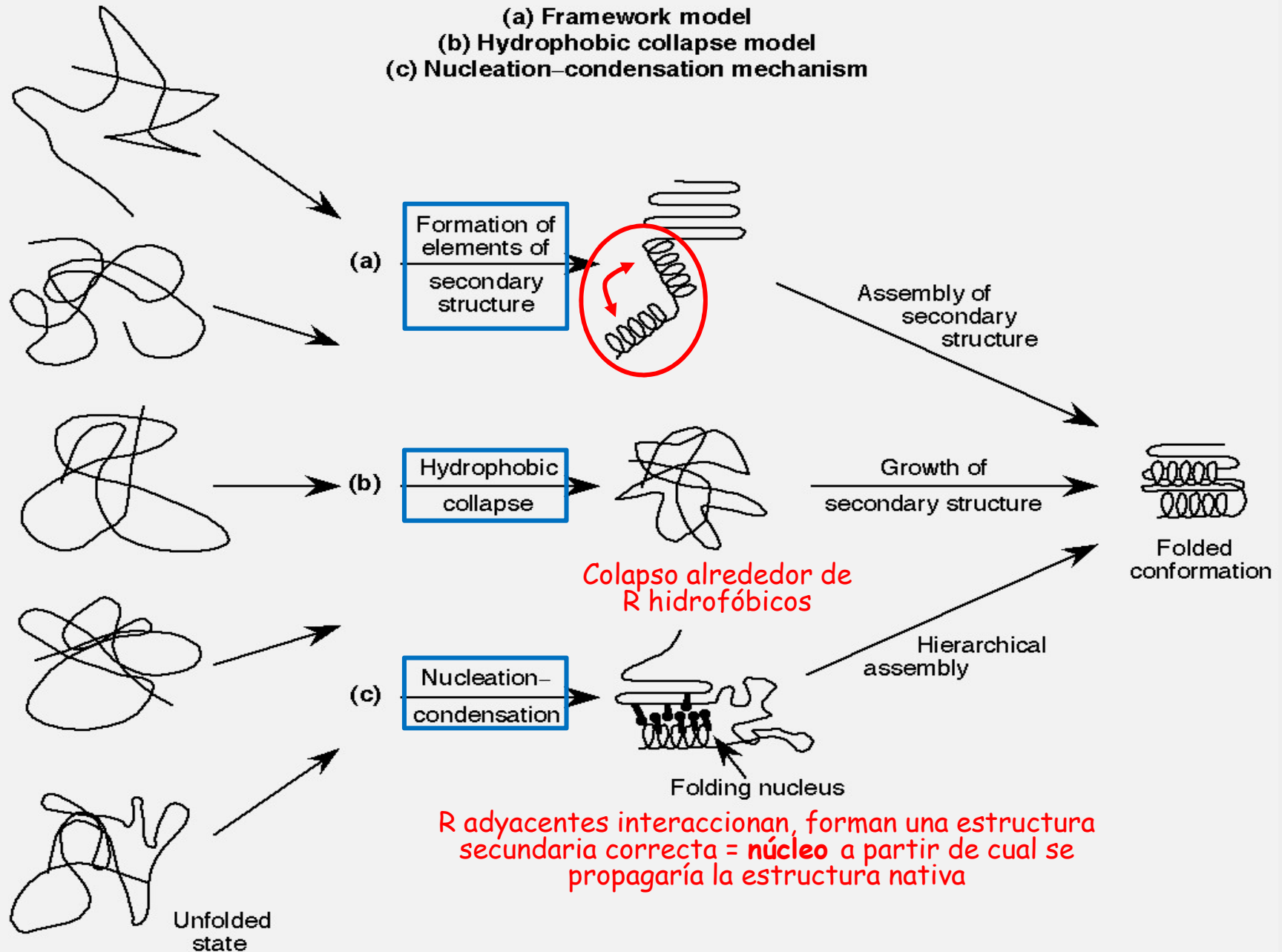
En proteínas homólogas muchos **R invariantes** se encuentran en puntos críticos:

- 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.

Modelos de plegamiento



Modelos de plegamiento: posible combinación durante el plegamiento

Formación rápida de estructuras secundarias locales

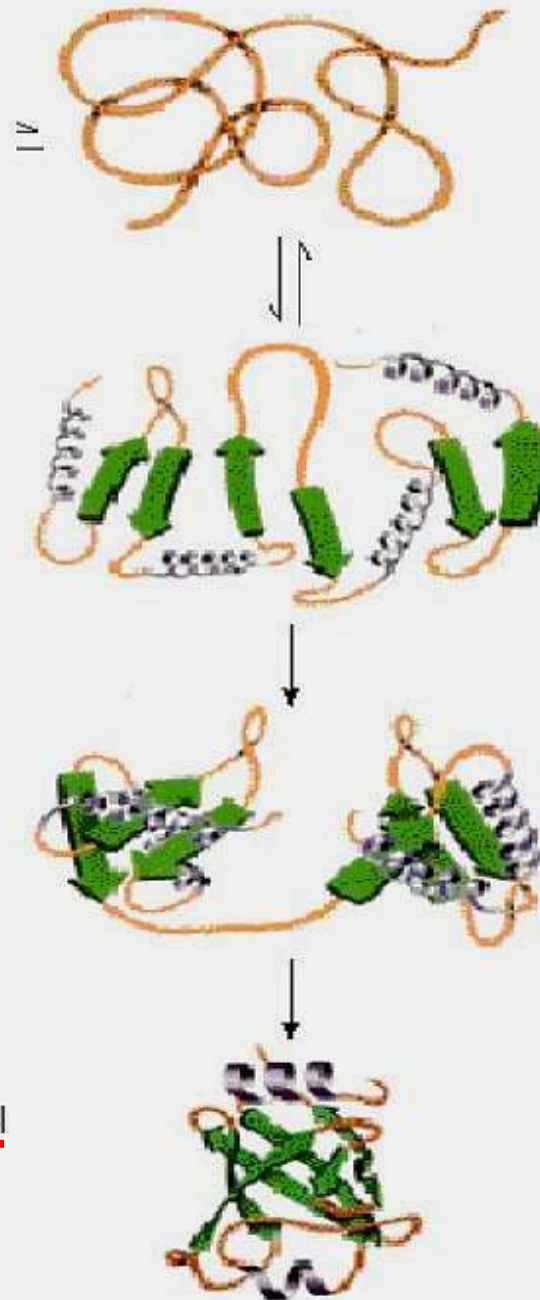
núcleos de plegamiento

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



Plegamiento de la proteína en varios pasos: forma nativa

1. **5 ms**: 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

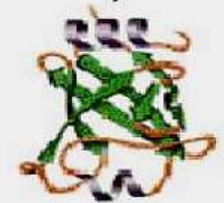
Por agregación cooperativa de distintos núcleos de plegamiento

3. Formación del glóbulo fundido

En proteínas con varios dominios, dichos dominios se agregan formando un glóbulo fundido



4. **5 a 1000 ms**: transformación del glóbulo fundido en una estructura terciaria que adopta la estructura nativa de una proteína monomérica. Se logra mediante pequeños cambios conformacionales.



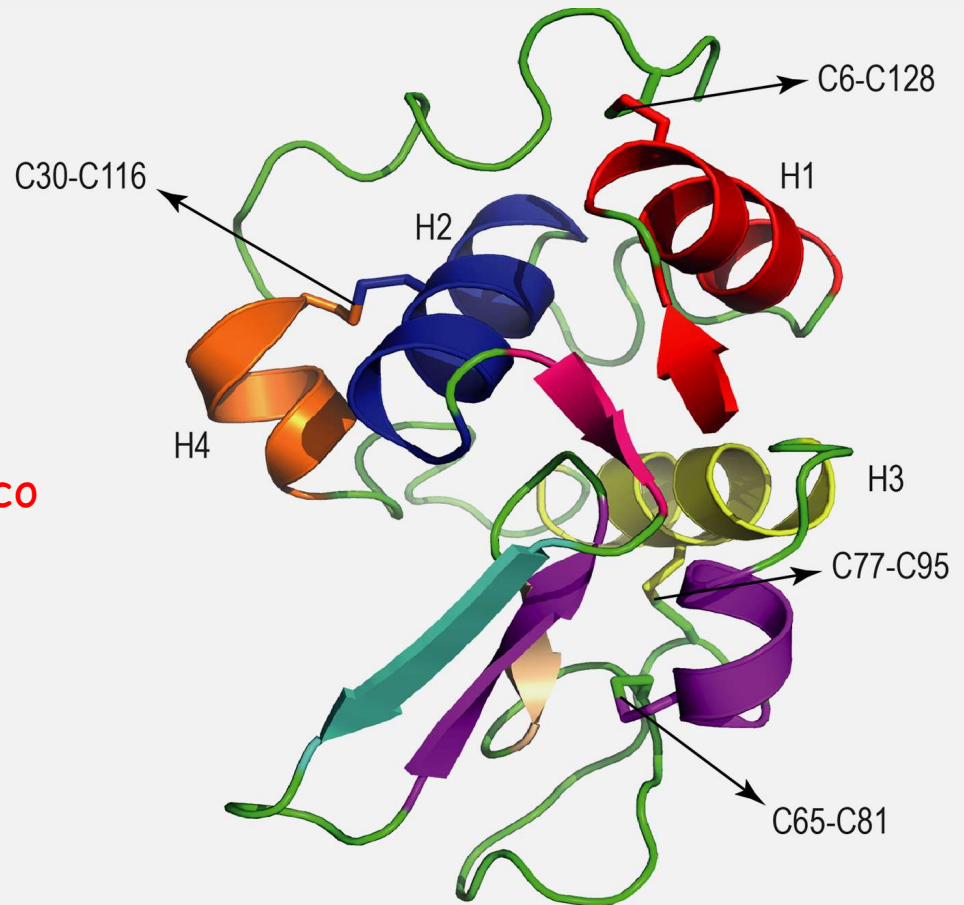
5. Adquisición de la estructura cuaternaria y obtención de la forma nativa. Estructura cuaternaria exclusivamente en proteínas multiméricas.

* Características del Estado de Glóbulo fundido

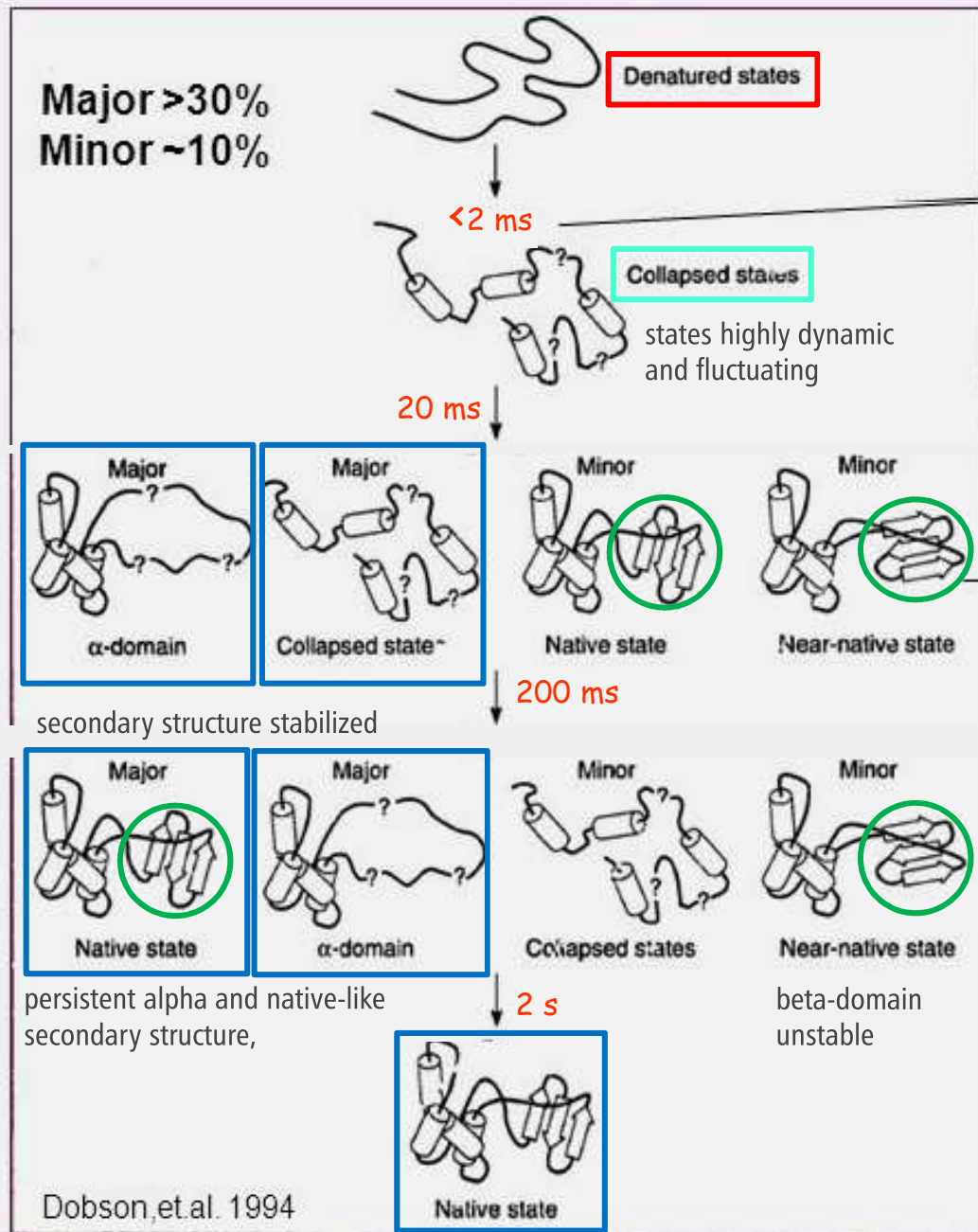
- Presencia de alguna estructura secundaria
- Ausencia de contactos terciarios específicos
- Compactación similar a la nativa
- Presencia de un núcleo hidrofóbico

Lysozyme

- enzima antibacterial secretada
- 120 Aa, 14.3KDa
- tpo $\alpha+\beta$
- 11 Aa aniónicos y 19 Aa catiónicos
- 8 Cys, 4 -S-S-:
 - C6-C128
 - C30-C116
 - C65-C81
 - C77-C95
- superficie polar, interior hidrofóbico



Folding pathway of lysozyme



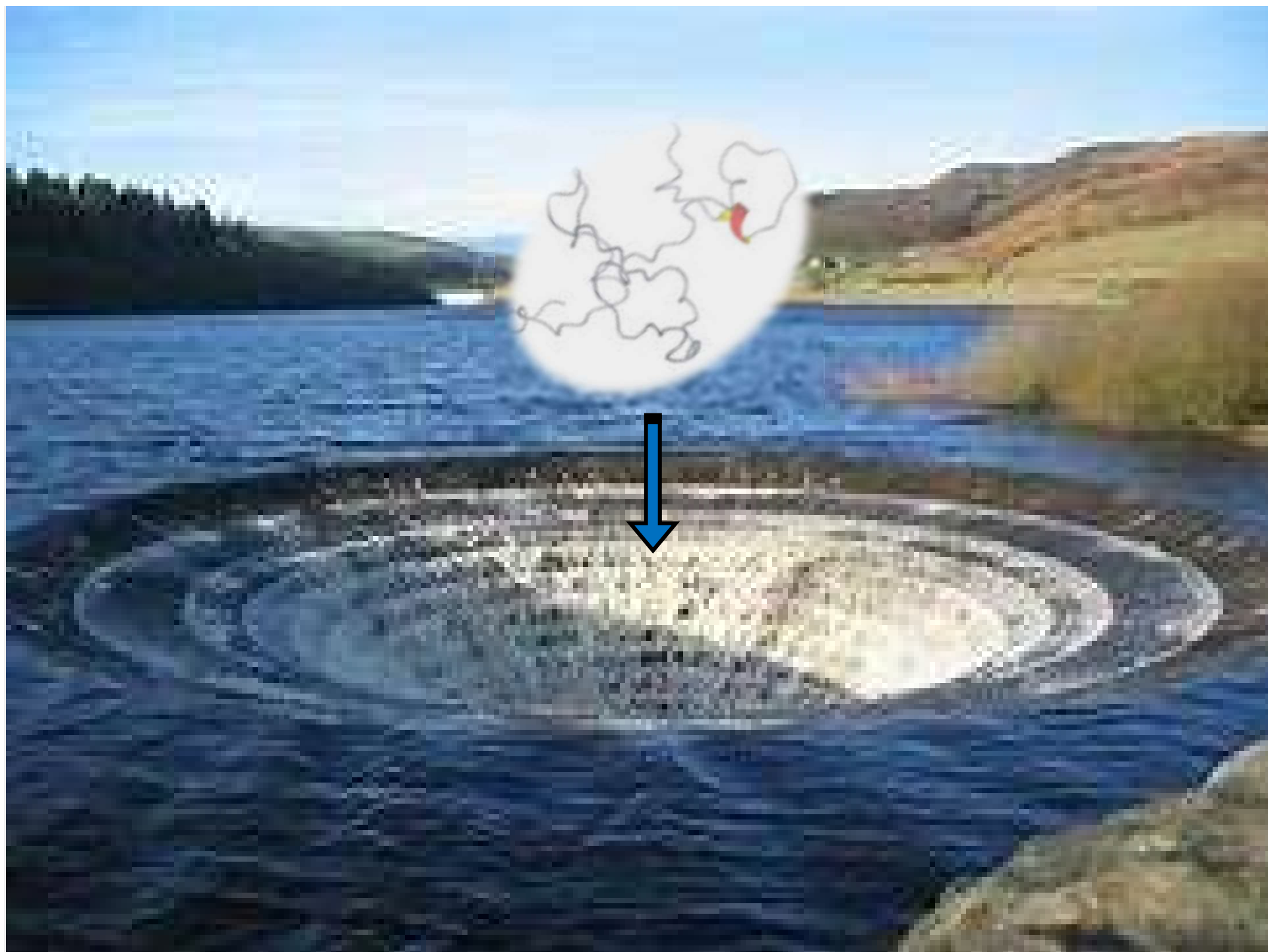
Very rapidly
alpha domain forms.
Hydrophobic interior develops.
Few tertiary interactions.

Protective structure
evolves. Dynamic and
fluctuating beta domain.

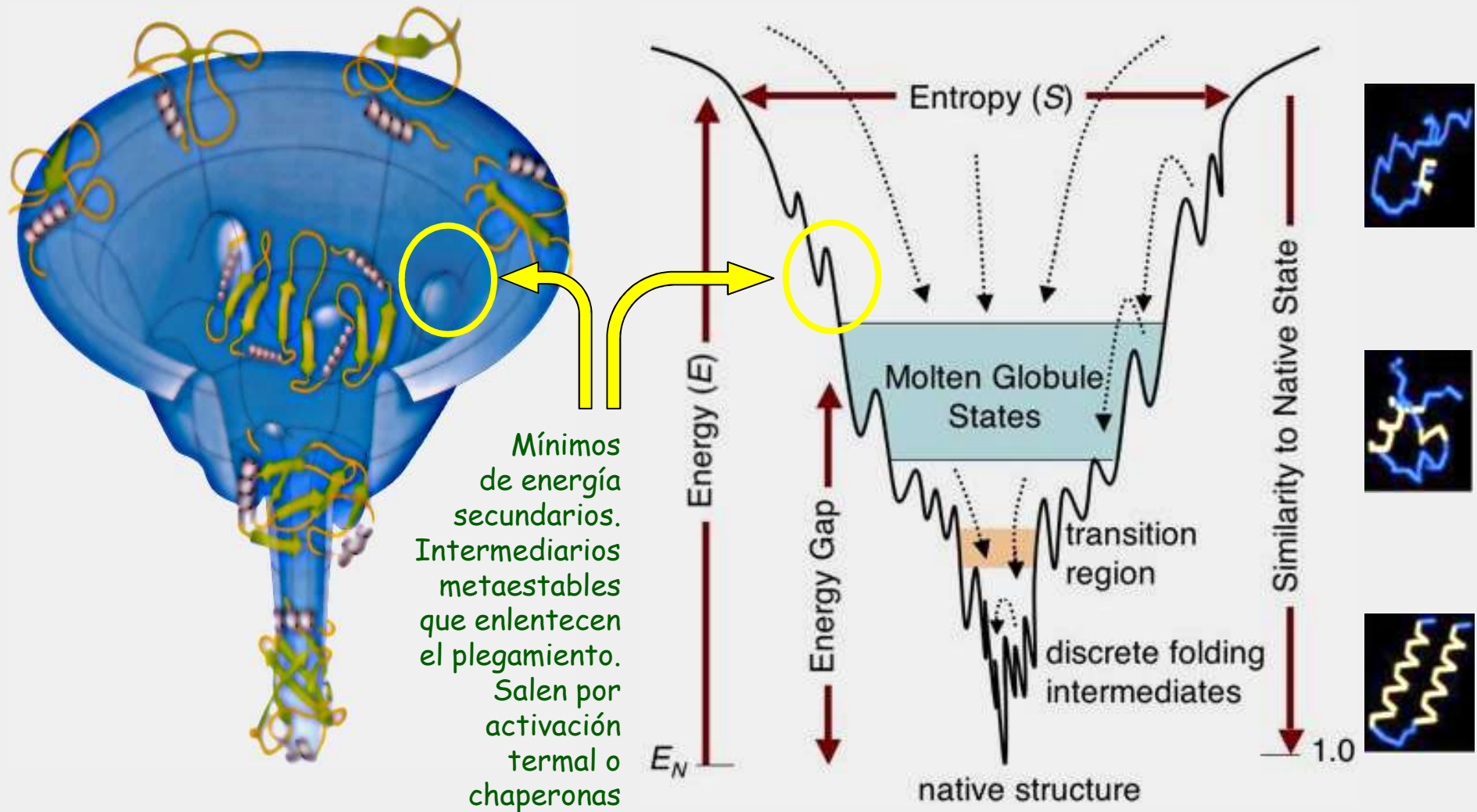
Alpha and beta domains
are stabilized

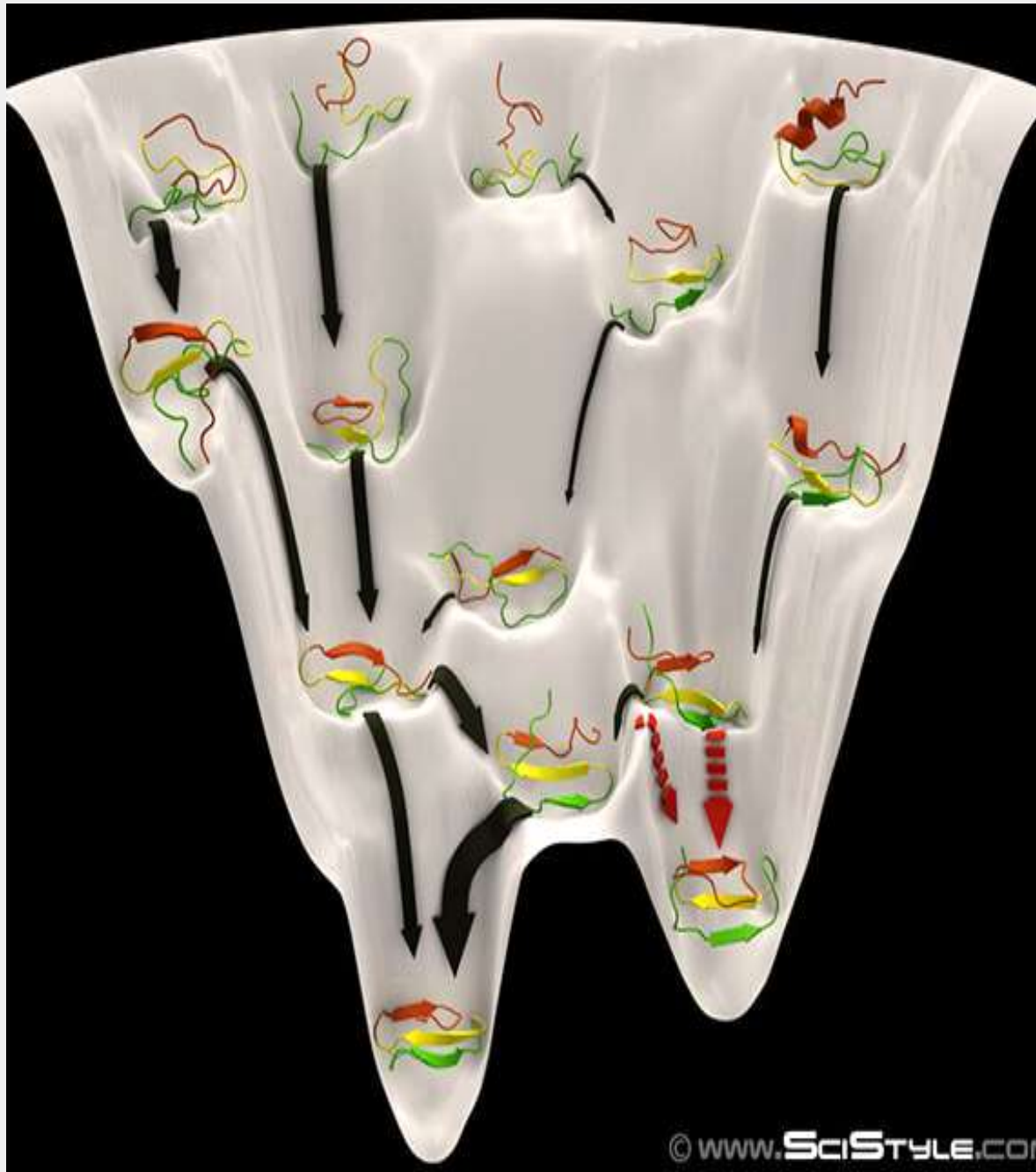
Contenido de la clase

- Desnaturalización y plegamiento de proteína
- Plegamiento: Método experimentales
- Modelos de plegamiento
- Termodinámica del plegamiento
- Plegamiento en la célula

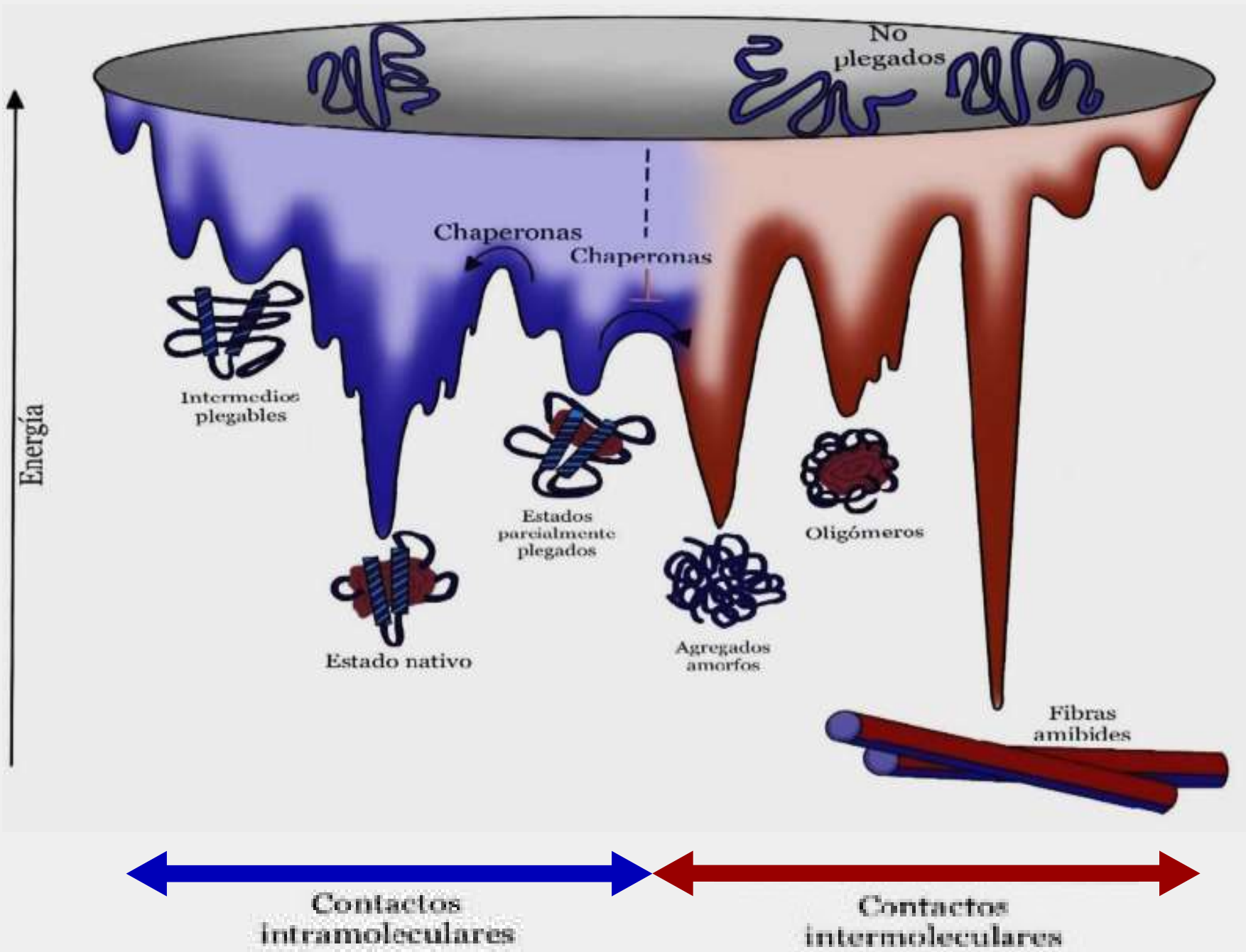


Embudo de plegamiento (Colapso hidrófobo: glóbulo fundido)





In this model, the unfolded protein had both high entropy and high free energy. The high entropy corresponds to there being a large number of possible conformational states—the molecule can take on many different three-dimensional shapes. The high free energy means that the molecule is unstable, and flops easily between the different conformational states. As the protein starts to fold, the free energy drops and the number of available conformational states (denoted by the width of the funnel) decreases. There are local minima along the way that can trap the protein in a metastable state for some time, slowing its progress towards the free energy minimum. One such trap is indicated by the dashed red arrows. At the bottom of the funnel, the free energy is at a minimum and there is only one conformational state available to the protein molecule, called the 'native state'.



Termodinámica del plegamiento

- 1- Entropía conformacional de plegado.
- 2- Interacciones carga-carga.
- 3- Interacciones de van der Waals.
- 4- Enlaces de H internos.
- 5- Efecto hidrofóbico.

Termodinámica del plegamiento

1- **Entropía conformacional de plegado:** proceso de plegado que comprende el paso desde una multitud de conformaciones de "ovillo aleatorio" a una única estructura plegada => disminución de la aleatoriedad => disminución de la entropía ($-\Delta S$)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

- ΔS (-) (**Entropía conformacional**) => ΔG (+) => **no plegamiento**
- ΔG (-) => **plegamiento**

ΔG (-): ΔH (-): interacciones energéticas favorables en el interior de la molécula plegada: interacciones **no covalentes**
 ΔS (+)

2- **Interacciones carga-carga:** fuerzas electrostáticas de atracción entre $R(+)$ y $R(-)$ a **pH 7**: puentes salinos (par iónico) => **nativa**

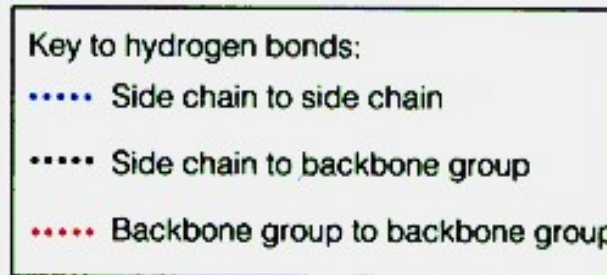
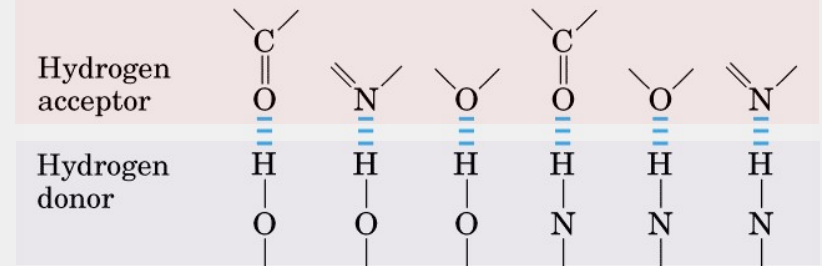
- Cambio de **pH** => alteración de la interacción => **desnaturalización**.
- pH extremos => fuerzas de repulsión entre R de igual carga => **desnaturalización**.

3- **Interacciones de van der Waals:** Rs sin carga, no polares (dipolo inducido-dipolo inducido). Empaquetados en la proteína plegada, actúan a distancias cortas se => pierden cuando la proteína se despliega.

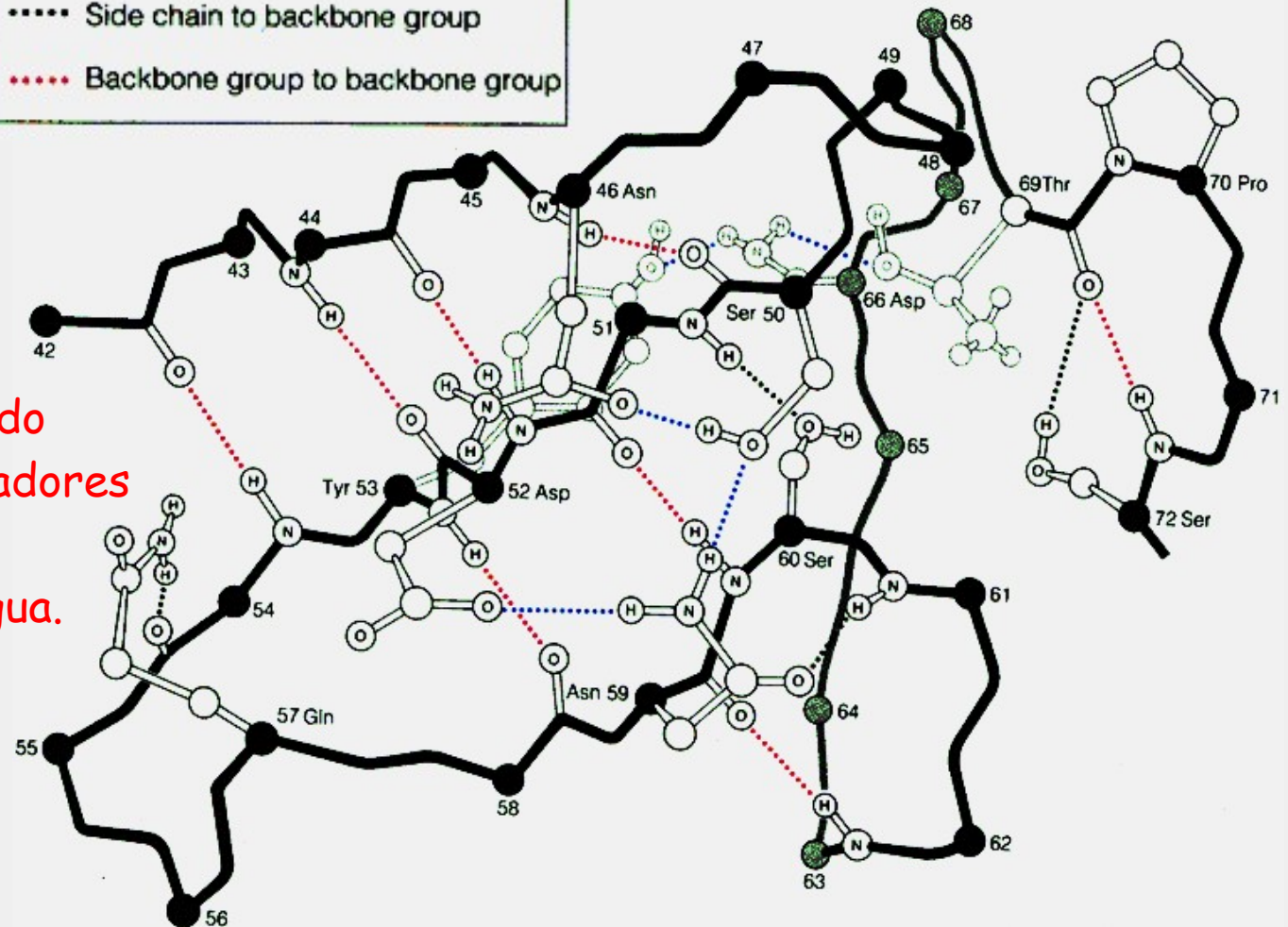
4- Enlaces de H internos (disminuye el ΔH)

- Grupos aceptor en R : Asn o Gln, His

- Grupos donador en R: Ser y Thr



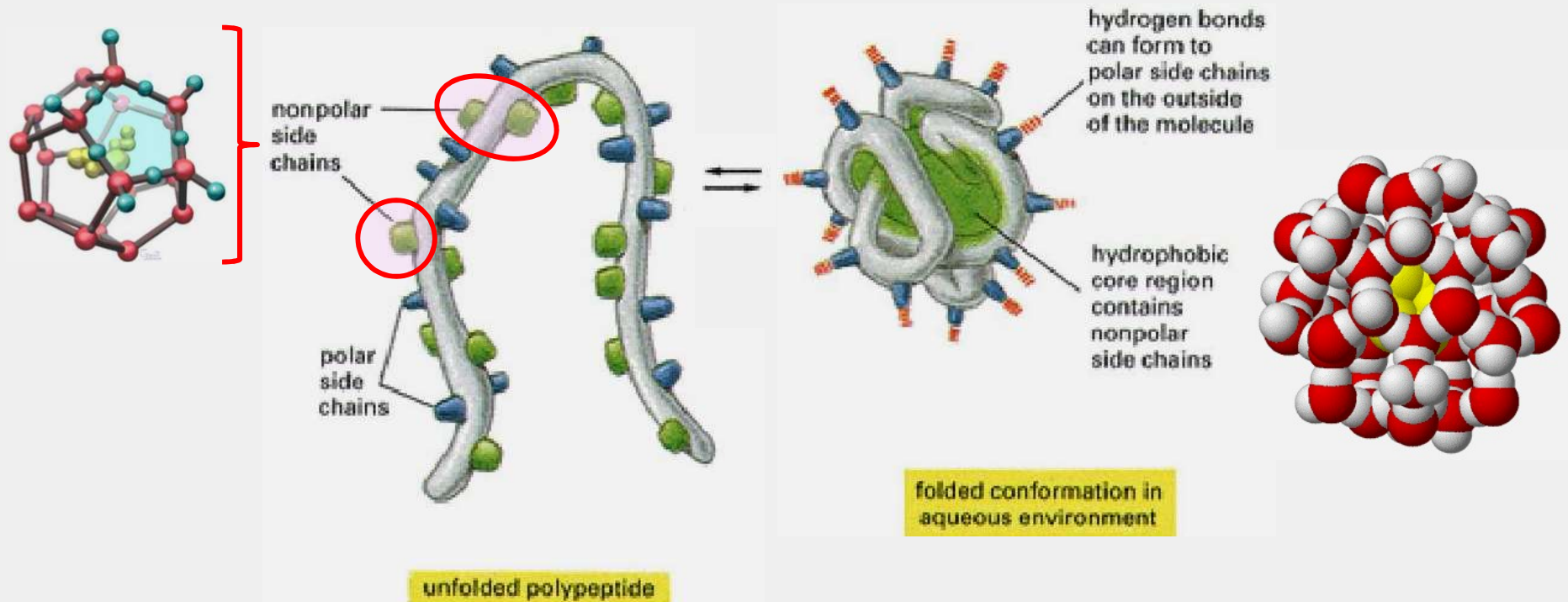
Lisozima

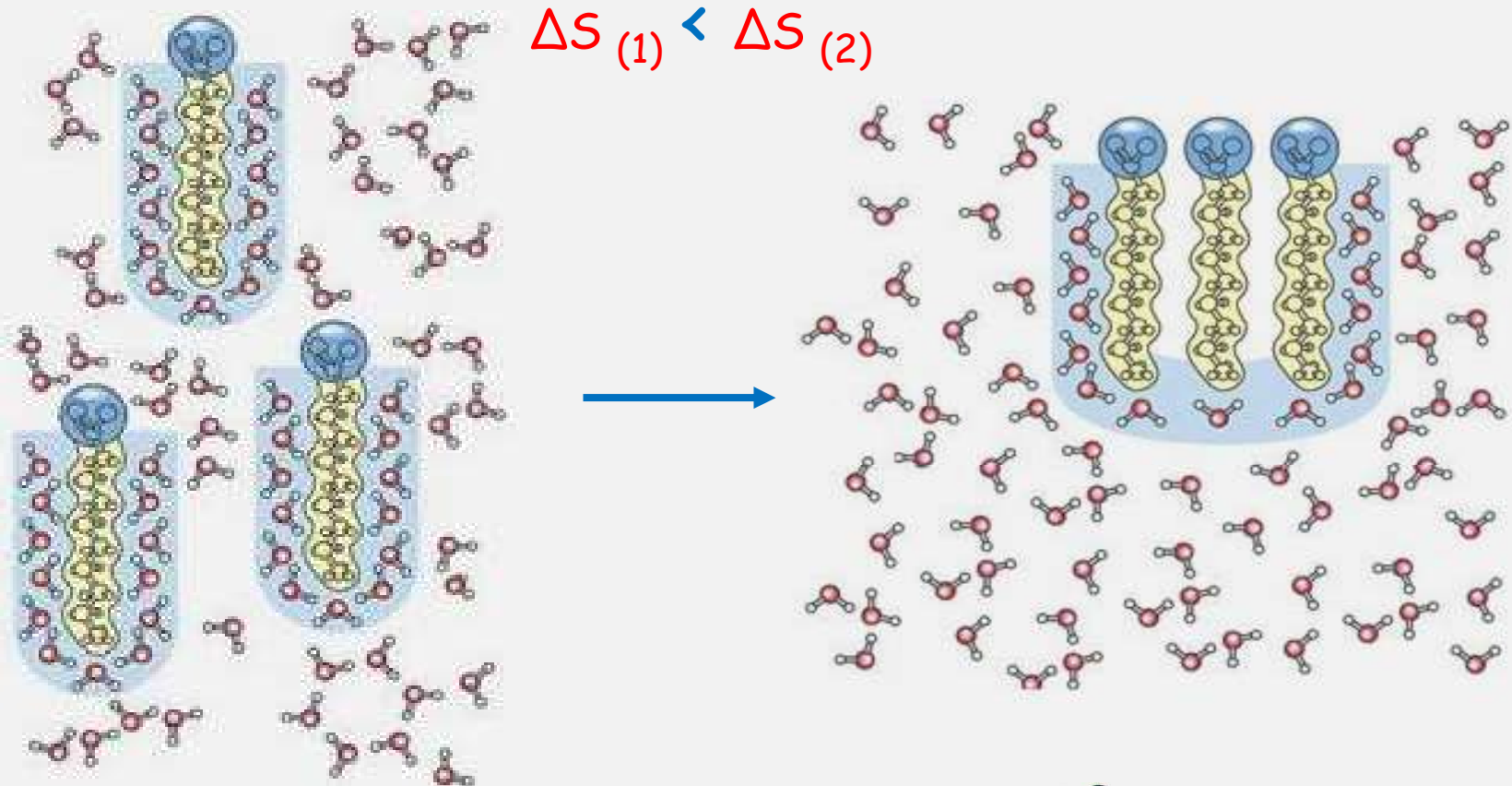


En el estado desplegado
Grupos aceptores y dadores
de H muy alejados =>
enlaces de H con el agua.

5- Efecto hidrofóbico: Residuos hidrofóbicos (Leu, Ile, Phe)

- en la **cadena desplegada** los **R** son rodeados por el H_2O , se forman estructuras similares a jaulas (clatrato) $\Rightarrow$ pérdida de aleatoriedad en el Sistema $\Rightarrow \downarrow$ "S" solvente.
- al liberarse las moléculas de H_2O $\Rightarrow$ libertad de movimiento
- los residuos se internalizan, quedan enterrados dentro de la molécula en la **cadena plegada** $\Rightarrow \uparrow$ aleatoriedad global (prot. + H_2O) $\Rightarrow \uparrow$ "S" $\Rightarrow \Delta G (-) \Rightarrow$ **plegado** y $\uparrow$ de la estabilidad de la proteína.





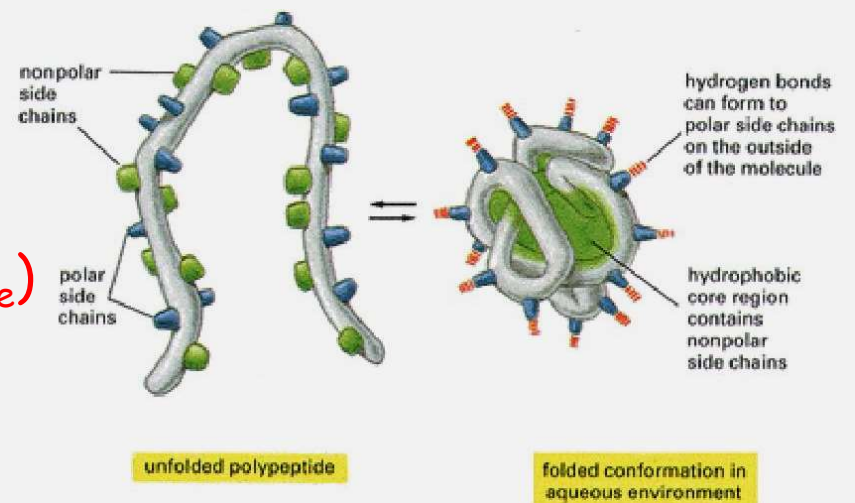
$$\Delta S_{\text{universo}} = \Delta S_{\text{sistema}} + \Delta S_{\text{entorno}}$$

$$\Delta S_{D \rightarrow P} = \Delta S_{\text{proteína}} + \Delta S_{\text{disolvente}}$$

$$\Delta S_{D \rightarrow P} = (-) (\Delta S_{\text{proteína}}) + (+) (\Delta S_{\text{disolvente}})$$

$$\Delta S_{D \rightarrow P} = (+)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = (-) : \text{plegamiento}$$



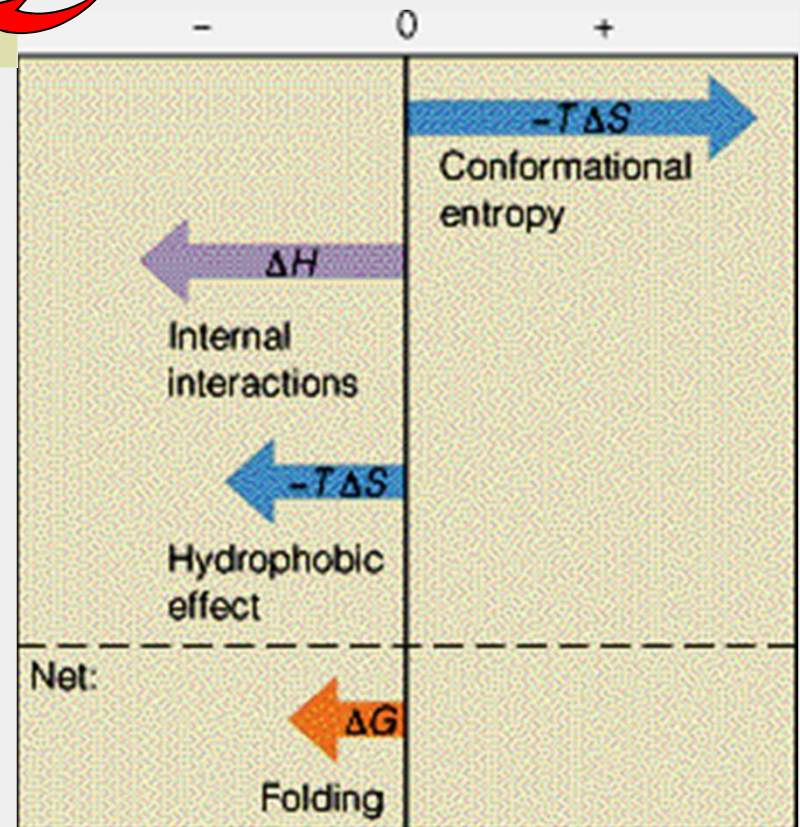
Parámetros termodinámicos del plegado de algunas proteínas globulares a 25°C en solución acuosa, pH ≈ 7.2

Desnaturalizada $\longleftrightarrow$ nativa

Protein	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K·mol)
Ribonuclease	-46	-280	-790
Chymotrypsin	-55	-270	-720
Lysozyme	-62	-220	-530
Cytochrome c	-44	-52	-27
Myoglobin	-50	0	+170

Estabilidad por efecto hidrófobo

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$



Contenido de la clase

- Desnaturalización y plegamiento de proteína
- Plegamiento: Método experimentales
- Plegamiento: Método informático
- Modelos de plegamiento
- Termodinámica del plegamiento
- Plegamiento en la célula

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.

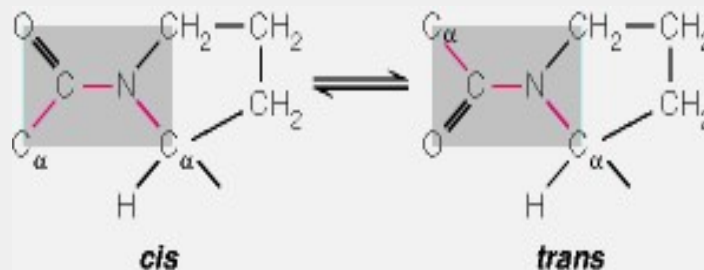
Mecanismo: **chaperona** unida a ATP expone un **bolsillo hidrófobo** que se une a regiones hidrófobas de la proteína blanco no plegada. Por su actividad ATPasa hidroliza ATP y se disocia de la proteína.

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).



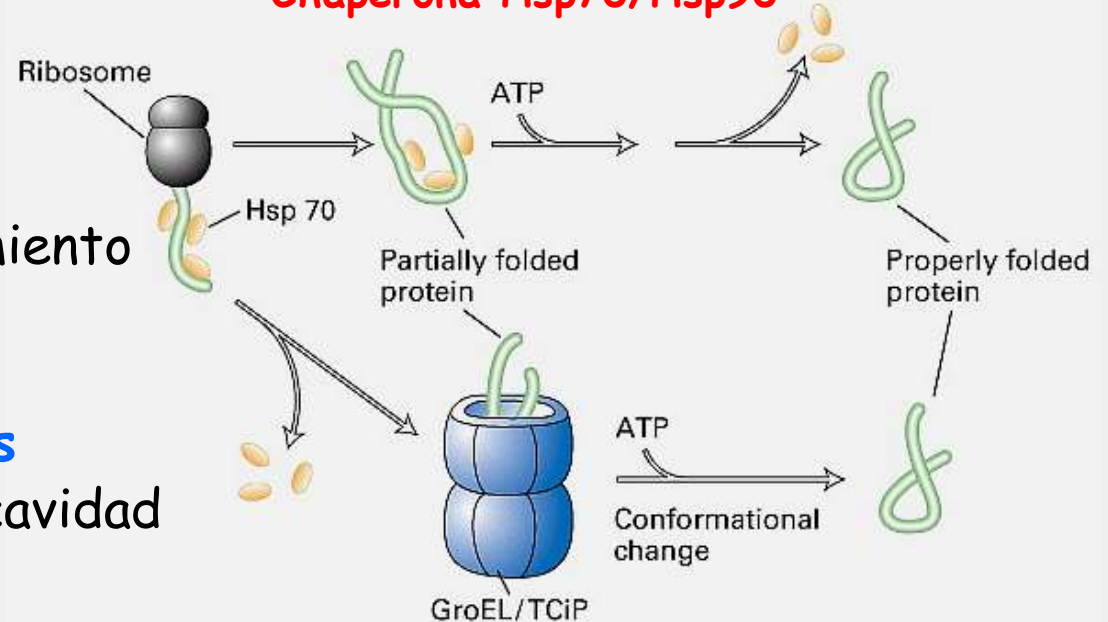
Pro: 4 trans - 1 cis

Otros Aa: 1000 trans - 1 cis

Familia Hsp70/Hsp90: chaperonas

- HSP70 ubicuo (citósol/RE).
- HSP90 (citósólico).
- Bajo Mr.
- Unión a zonas hidrofóbicas.
- Previene agregación/plegamiento prematuro.

Chaperona Hsp70/Hsp90



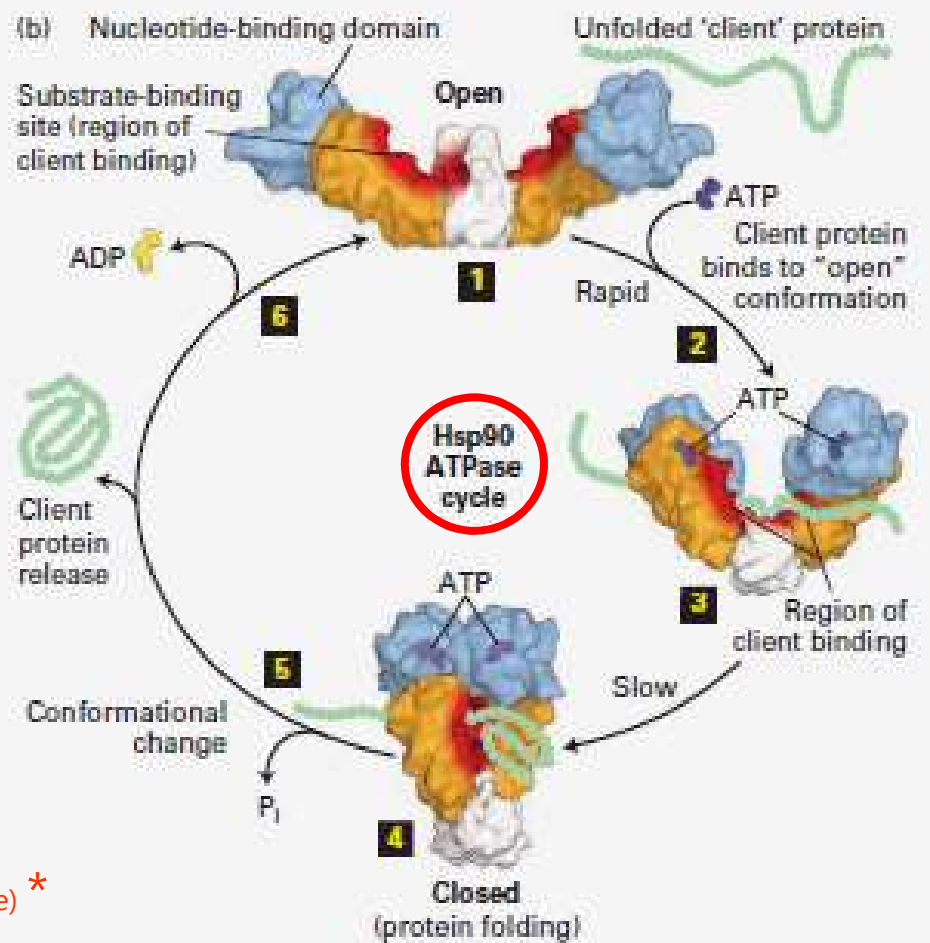
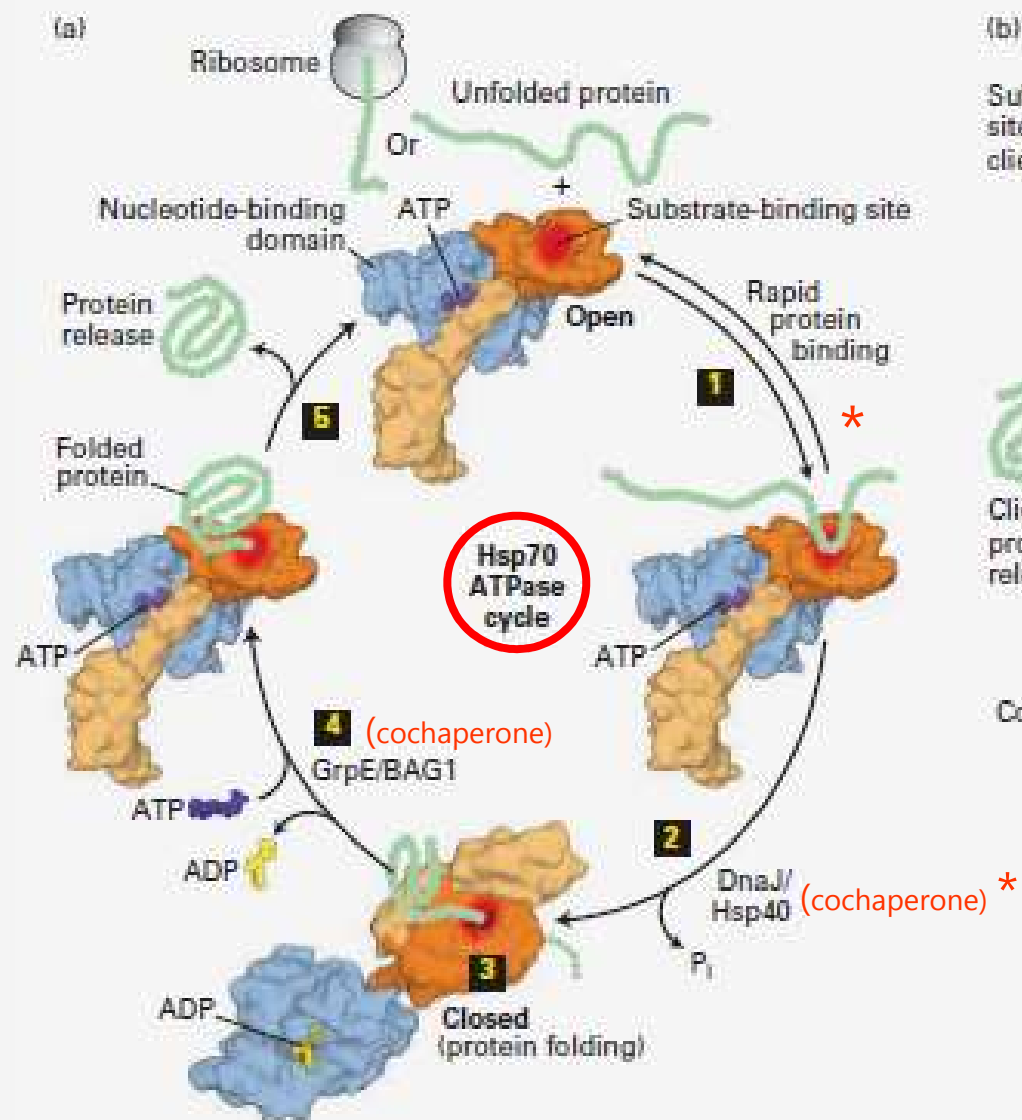
Familia Hsp60: chaperoninas

- Complejo macromolecular: cavidad de plegado.
- Plegamiento asistido.
- ATPasas: plegado ATP-dependiente.

Chaperonina Hsp60 (exclusivo citósol)

Enzimas coadyuvantes (RE)

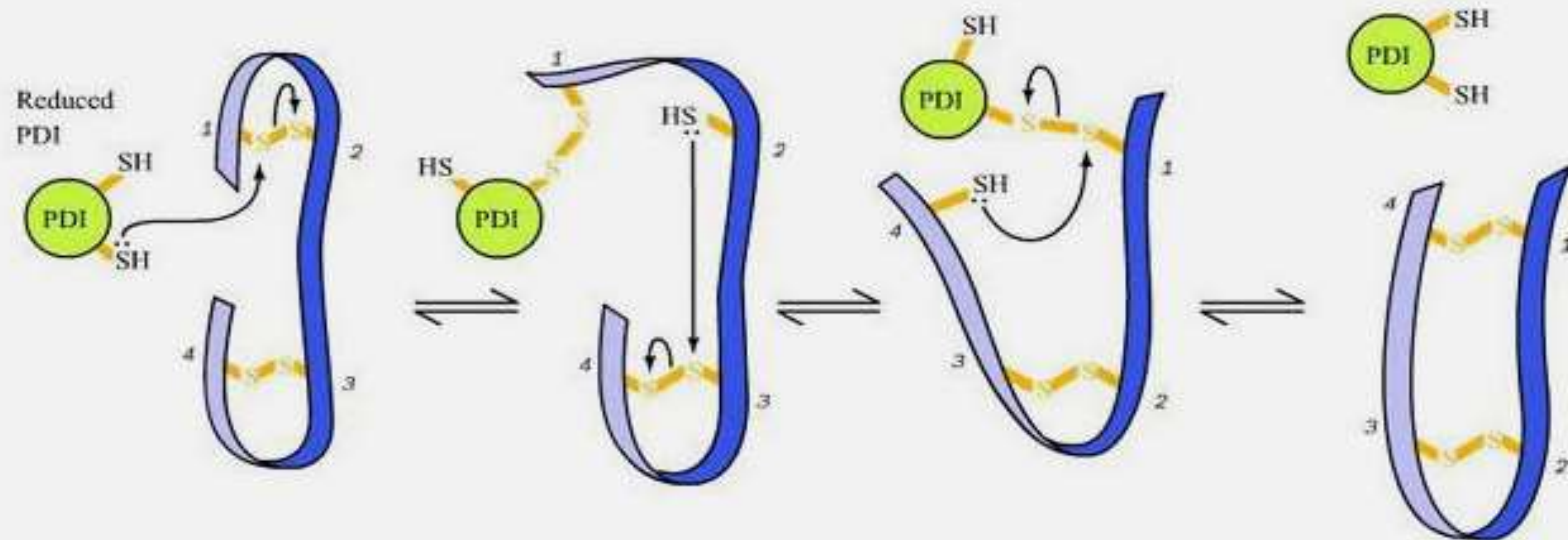
- **Proteína disulfuro isomerasa** (PDI: protein disulfide isomerase) (thiol-disulfide oxidoreductase)
- **Peptido-Prolil cis-tras isomerasa** (PPI)



Isomerases in Protein Folding

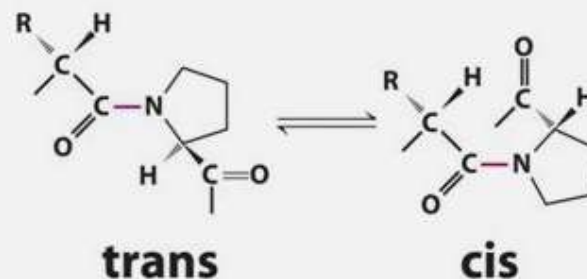
■ Protein disulfide isomerase (PDI)

- Shuffling disulfide bonds

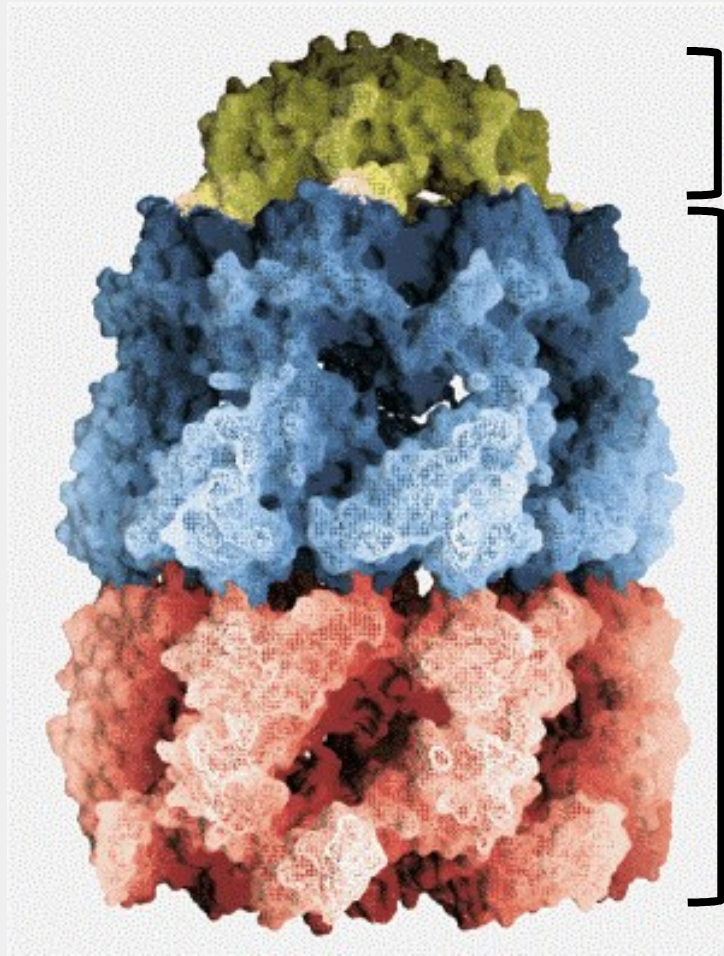


■ Peptide prolyl cis-trans isomerase (PPI)

- Interconversion of the cis and trans isomers of Pro peptide bonds

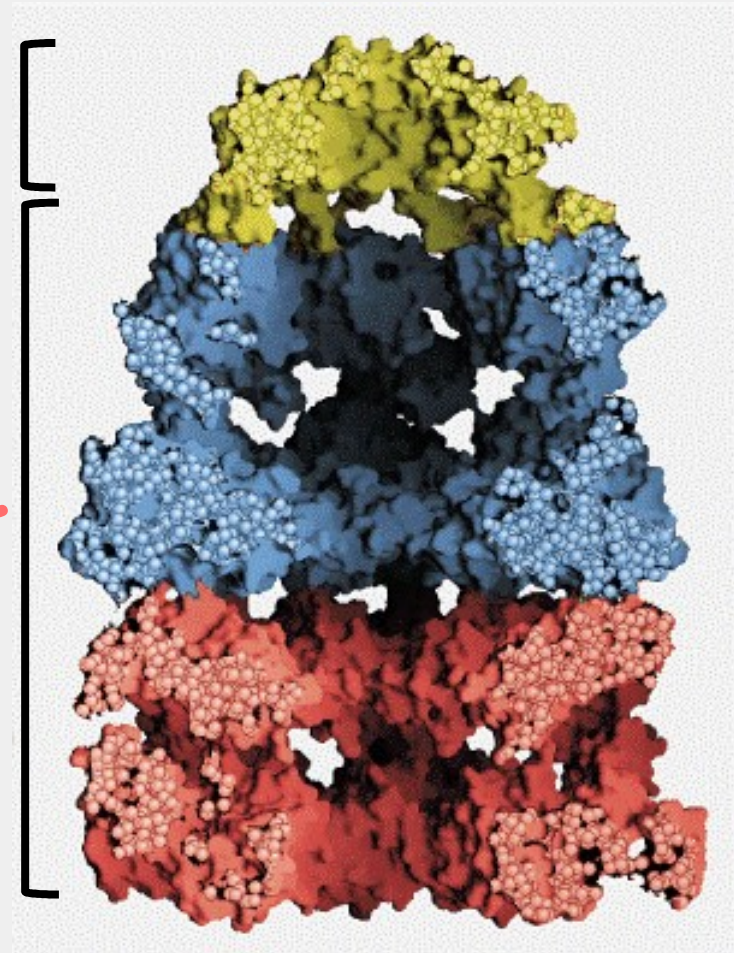


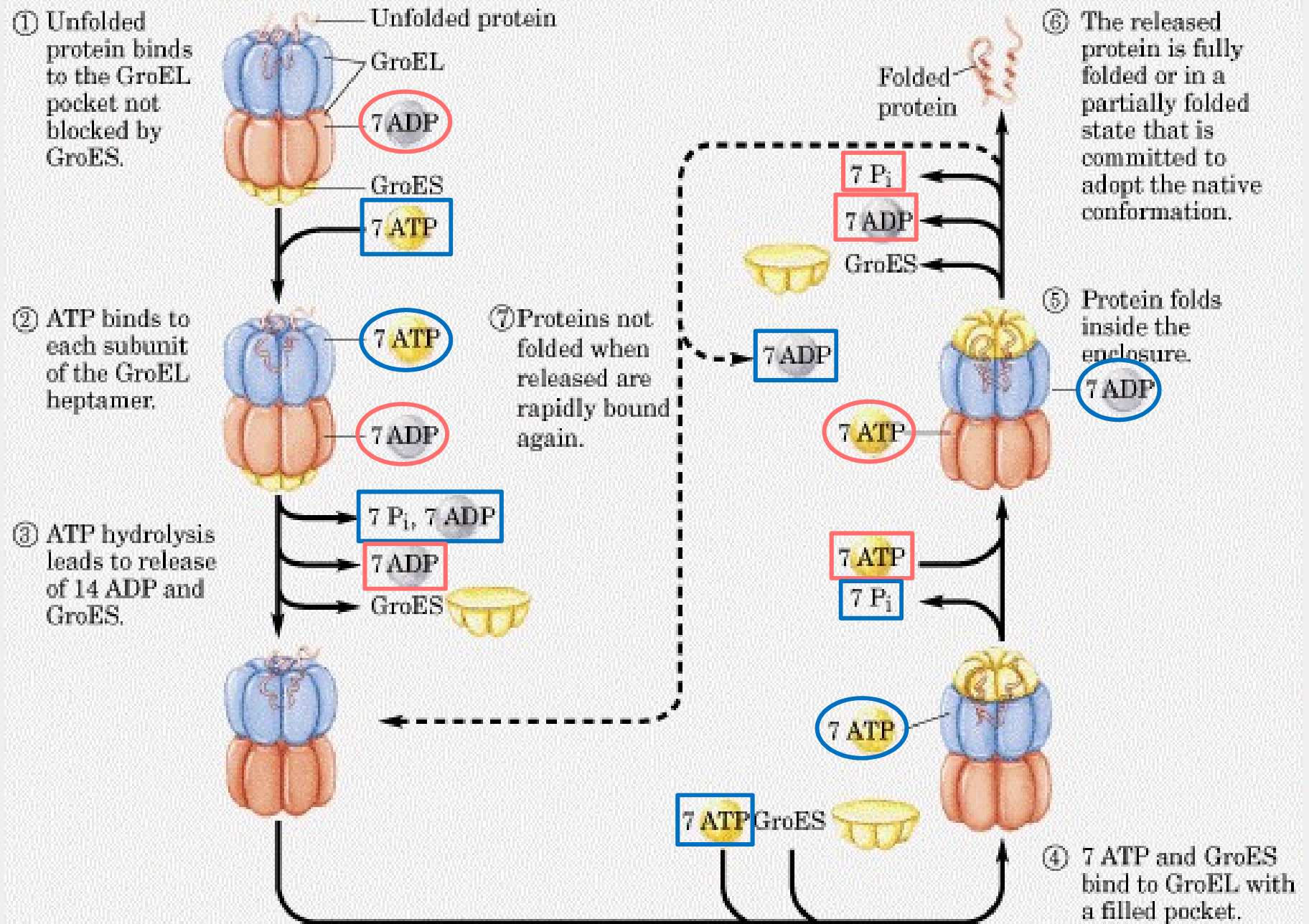
Chaperoninas: sistema GroEL en bacterias



GroES

GroEL

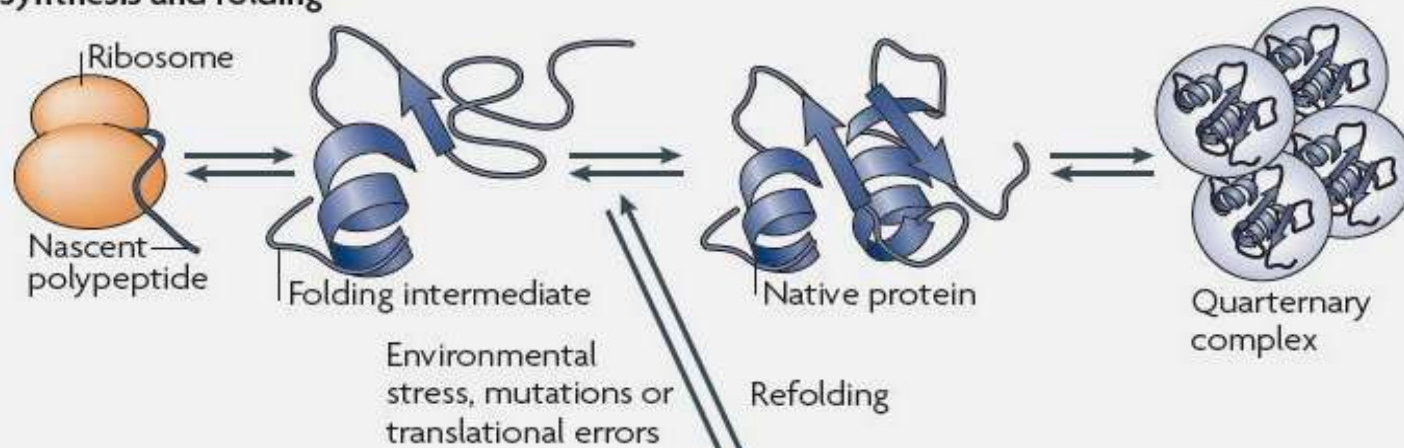




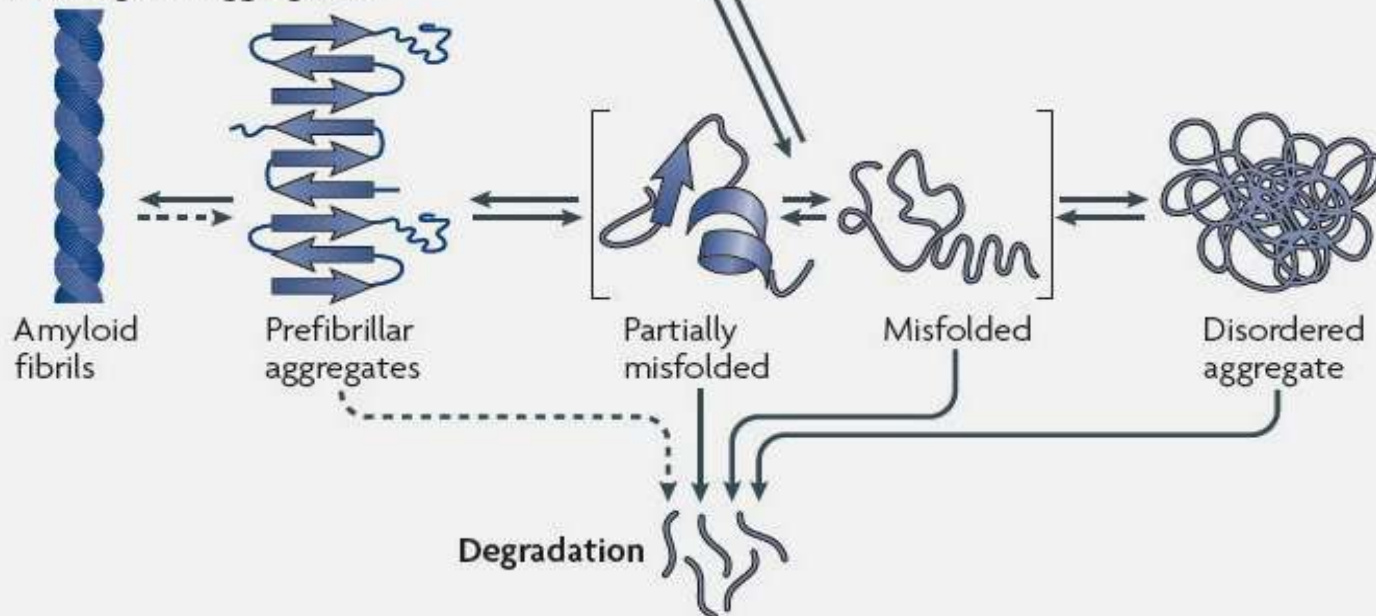
(a)

Protein Folding and Aggregation

Synthesis and folding



Misfolding and aggregation





Conditions Inducing Protein Aggregation

- **Mutations prone to aggregate**
 - Huntington's disease
 - Familial forms of Parkinson's disease and Alzheimer's disease
- **Defects in protein biogenesis**
 - Translational errors
 - Assembly defects of protein complexes
- **Environmental stress conditions**
 - Heat shock
 - Oxidative stress
- **Aging**

Deposition of Aggregates

■ Bacteria

- Inclusion body

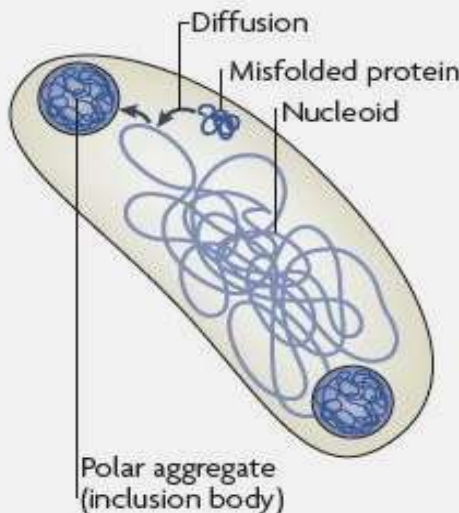
■ Yeast

- Juxtanuclear quality-control compartment (JUNQ)
 - Soluble, misfolded, ubiquitylated proteins
- Perivacuolar insoluble protein deposit (IPOD).
 - Insoluble, terminally aggregated

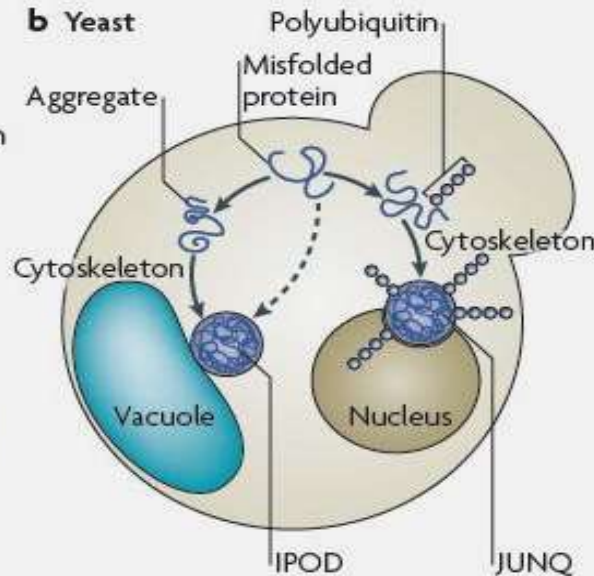
■ Mammals

- Aggresome

a Bacteria



b Yeast



c Mammals

