

## Desplegado por temperatura

Uno de los métodos más comunes, aunque todavía no lo hemos discutido profundamente, es la desnaturalización térmica, y particularmente por aumento de temperatura, cuando cocinamos, desnaturalizamos proteínas y cuando hervimos la leche, también desnaturalizamos proteínas. La desnaturalización por frío, es un proceso muy interesante pero, por lo general, menos estudiado. Como en el caso de la desnaturalización química, por agentes caotrópicos, nos va a interesar evaluar antes que nada si el proceso de desplegado o desnaturalización por incremento de la temperatura es reversible o no. La aplicación de recursos teóricos de la termodinámica dependerá de este punto. Si la desnaturalización no es reversible nuestra descripción del proceso será mucho más acotada. La irreversibilidad en muchos casos ocurre por la existencia de otros procesos que están relacionados con el cambio conformacional por ejemplo la agregación. En este sentido procesos como la agregación eliminarán a la proteína del sistema, esta precipitará impidiendo el retorno de las moléculas a la conformación estado nativo.

Uno de los puntos más interesantes relacionado a la desnaturalización térmica es que, el estado nativo y el estado desplegado tienen capacidades caloríficas ( $C_p$ ) distintas. El estado desplegado tiene una mayor capacidad calorífica. Esto quiere decir que para aumentar en 1 °C la temperatura de una solución de proteína nativa se necesita entregar una menor cantidad de energía que para aumentar en 1 °C la temperatura de una solución de proteína de la misma concentración en estado desplegado. Esto se relaciona con una de las propiedades que posee el estado desplegado de la que ya hemos hecho referencia muchas veces: el estado desplegado expone una superficie considerablemente mayor que el estado nativo. Las moléculas de agua próximas a la superficie proteica tienden a establecer interacciones entre sí, consolidando una red de puentes de hidrógeno intermoleculares. Así la energía entregada al sistema podrá ser absorbida por esta red de moléculas de agua, produciendo un aumento menor de temperatura de la solución, recordemos que el aumento de la temperatura es un indicador del aumento de la energía cinética del sistema.

Para entender este proceso, podemos pensar en el cambio de fase sólido/líquido para el  $H_2O$  que se da a una temperatura determinada a presión atmosférica a 0 °C. La energía entregada al sistema permitirá deformar y luego romper la red de interacciones existente en el hielo. Las moléculas vibran, alrededor de sus posiciones de equilibrio, cada vez con mayor amplitud. Llega un momento en el que vencen a las fuerzas de atracción que las mantienen fijas y el sólido se convierte en líquido. Las moléculas siguen interaccionando, pero ahora pueden moverse. Con este aumento de la movilidad de las moléculas de agua aumentará la temperatura del sistema.

En definitiva la reacción de desplegado  $N \rightarrow U$  tiene un  $\Delta C_{p\ UN}$  positivo porque  $C_{p\ desplegado} > C_{p\ nativo}$ . Como se ve este parámetro ( $\Delta C_{p\ UN}$ ) está fuertemente relacionado con el  $\Delta ASA_{UN}$ ; es sobre la superficie de la proteína que se formará una capa de moléculas de agua más estructurada.

A medida que aumentemos la temperatura estas moléculas de agua se irán desplazando de la superficie e incrementarán su movilidad, esto incrementará el desorden y producirá un aumento de entropía) y favorecerá, en definitiva, la formación del estado desplegado. La entropía se define aquí como

$$\Delta S_{UN(T_2)} = \Delta S_{UN(T_1)} + \Delta S_p \ln \frac{T_2}{T_1}$$

Por otro lado la entalpía del estado desplegado aumenta, se desestabiliza el estado desplegado con la temperatura, porque las moléculas de agua ordenadas entorno a la superficie apolar, progresivamente, pierden las interacciones de puente de hidrógeno entre si a medida que el agua se desestructura.

$$\Delta H_{UN(T_2)} = \Delta H_{UN(T_1)} + \Delta C_P (T_2 - T_1)$$

Así el desplegado por temperatura, en realidad, es causado por el incremento entrópico que domina a altas temperaturas al término entálpico.

Las proteínas se despliegan cuando  $\Delta G_{UN}$ , la energía libre, comienza a ser negativa, cuando  $T\Delta S_{UN}$  es mayor que  $\Delta H_{UN}$ , recordar que  $\Delta G_{UN} = \Delta H_{UN} - T\Delta S_{UN}$

Existe una temperatura en la que el  $\Delta G_{UN} = 0$ . En esta temperatura  $f_N = f_U$  por lo tanto la estabilidad del estado nativo es idéntica a la del estado desplegado en el experimento mostrado en la Figura 2-17 esta temperatura es  $T_m \sim 68^\circ\text{C}$ . Otro punto importante es que existe una temperatura de máxima estabilidad (en este caso en el rango de  $30\text{--}45^\circ\text{C}$ ), a esta temperatura, la diferencia de energía entre el estado nativo y el estado desplegado es máxima.

Podemos ver que, en realidad,  $\Delta G_{UN}$  en función de la temperatura es una campana que interseca dos veces en  $\Delta G_{UN} = 0$ , una vez como se ve en la Figura 2-17, es en el  $T_m$  y la segunda es en el  $T_C$ ; lo que suele ocurrir es que  $T_C$  en la mayoría de los casos es  $T_C \ll 0^\circ\text{C}$ , y por este motivo no se suele tener acceso experimental sencillo a esta parte de la curva de desplegado. A bajas temperaturas por ejemplo  $-20^\circ\text{C}$  a  $-80^\circ\text{C}$  las proteínas se despliegan. *En el laboratorio entonces tendremos que tener mucho cuidado al intentar conservar una solución de proteína. Muy probablemente no podremos conservarla en una heladera a  $-20^\circ\text{C}$ .*

*En la Figura 2-17 se muestra un experimento de desplegado de la proteína  $\beta$  lactamasa del organismo *Bacillus licheniformis* en función de la temperatura. La transición entre los dos estados conformacionales nativo y desplegado se siguió por dicroísmo circular, una técnica que, como veremos, permite estudiar el contenido de estructura secundaria. En la Figura 2-17 se ve que hasta aproximadamente  $50^\circ\text{C}$ , el contenido de estructura secundaria es relativamente constante y que se produce un brusco cambio entre  $60$  y  $70^\circ\text{C}$ , en el que se pierde cerca del 100% de la estructura secundaria.*

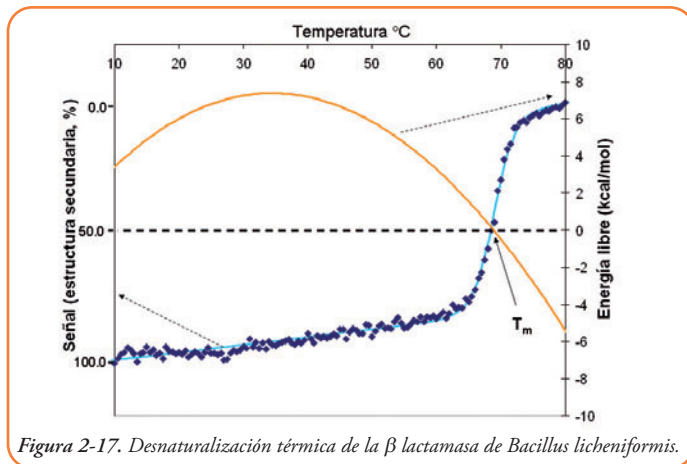


Figura 2-17. Desnaturalización térmica de la  $\beta$  lactamasa de *Bacillus licheniformis*.

*Se puede ajustar un modelo (trazo celeste) de dos estados ( $U \leftrightarrow N$ ) a los datos experimentales (diamantes azules) de desplegado. Cómo resultado podremos extraer los parámetros termodinámicos y el  $\Delta C_{P UN}$ . Luego podremos calcular la energía libre,  $\Delta G_{UN}$ , en función de la temperatura (trazo naranja). (ver Figura 2-17)*

A medida que la temperatura baja, como se dijo anteriormente, las moléculas de agua sobre la superficie apolar de la proteína interaccionan entre sí y se estabiliza una red de puentes de hidrógeno optimizados por la estructura del agua a esta temperatura, esto conduce a una disminución en entalpía de desplegado. La entropía (el desorden) también disminuye porque las moléculas de agua al formarse la red se ordenan.

El cambio entálpico es favorable desde el punto de vista del desplegado ( $N \rightarrow U$ ) y es más importante que el cambio entrópico desfavorable llevando a la proteína al estado desplegado en frío (recordar que  $\Delta G_{UN} = \Delta H_{UN} - T\Delta S_{UN}$ ).

A temperaturas mayores, las moléculas de agua, también, formarán la red sobre la superficie de la proteína pero la estructura de puentes de hidrógeno del agua no estará optimizada sobre la superficie y, consecuentemente, la reducción en entalpía no será suficiente para compensar la pérdida entrópica. Así, en esta condición la exposición de superficie apolar será desfavorable y se estabilizará el estado nativo con respecto al desplegado.

En algunos casos cuando desestabilizamos, suficientemente, a la estructura nativa podemos explorar, experimentalmente, el desplegado por frío. En la **Figura 2-18** se muestran tres curvas de desnaturalización por temperatura:

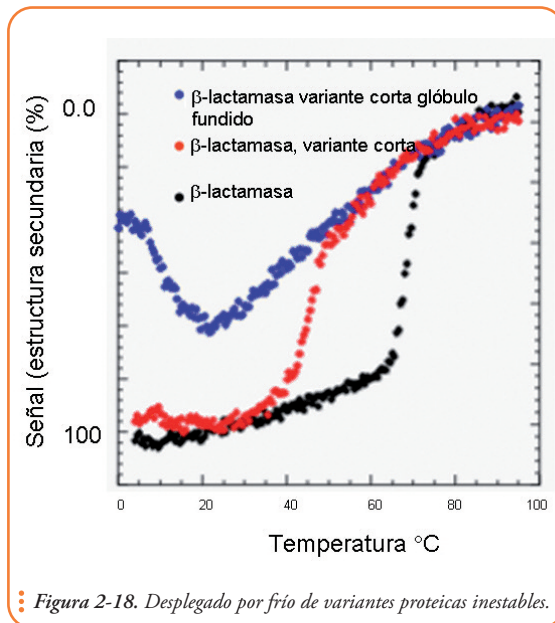


Figura 2-18. Desplegado por frío de variantes proteicas inestables.

a. el desplegado de una conformación, parcialmente, plegada tipo glóbulo fundido de una mutante de la proteína  $\beta$ -lactamasa (una variante corta que presenta ausencia de estructura terciaria y menor contenido de estructura secundaria a 20 °C, en azul),

b. el desplegado de la conformación nativa de esta mutante (en rojo),

c. el desplegado de la variante salvaje (sin mutación) de la  $\beta$  lactamasa (en negro).

Puede verse cómo cuando la estructura está suficientemente desestabilizada (el caso de este glóbulo fundido) el proceso de desnaturalización por frío transcurre a temperaturas incluso  $> 0^{\circ}\text{C}$ . Además puede observarse que el proceso de desnaturalización de este tipo de estructuras altamente fluctuantes no es cooperativo y esto se traduce en que la transición ( $N \leftrightarrow U$ ) se lleve a cabo en un rango mucho mayor de temperaturas (20 a  $70^{\circ}\text{C}$ ).

## El $\Delta C_p$ y el $\Delta S_{AUN}$

La relación entre el  $\Delta C_p$  y el  $\Delta S_{AUN}$  ha sido estudiada por numerosos investigadores. Por ejemplo, Murphy and Freire (1992) dan una correlación entre ambos parámetros

$$\Delta C_p = 0,45 \times \Delta ASA_{np} - 0,26 \times \Delta ASA_{np}$$

donde **np** es no polar y **p** es polar.

Una correlación mejor es obtenida (sin tener que discriminar entre área polar y apolar) usando la ecuación desarrollada por J. K Myers y colaboradores (Myers et al. 1995)

$$\Delta C_p = 0,19 \times \Delta ASA - (864 \times n_{s-s})$$

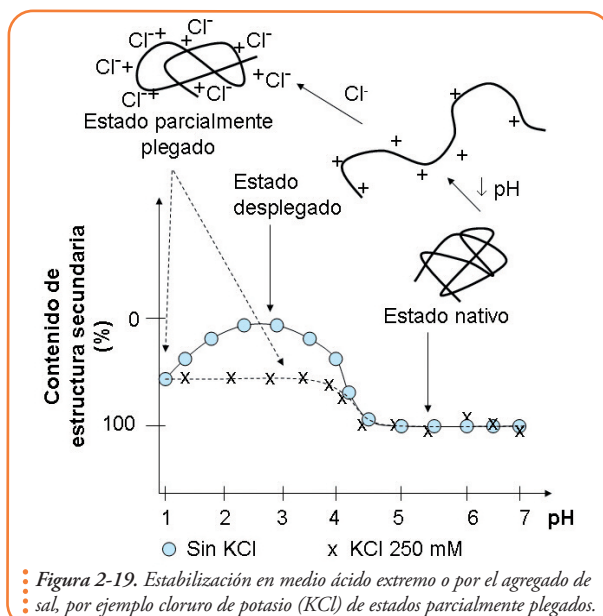
Esta ecuación contempla que, el número de puentes disulfuro existentes en las proteínas, restringirá, significativamente, la accesibilidad de la cadena principal y de las cadenas laterales.

Estas correlaciones y las correlaciones obtenidas entre la longitud en número de residuos y la diferencia de superficie accesible al solvente entre los estados nativo y desplegado se basaron en datos experimentales de diferencia de capacidad calorífica obtenidos mediante estudios calorimétricos y datos teóricos de  $ASA_U$  modelados por simulación y datos de  $ASA_N$  basados en modelos experimentales de estructuras nativas de las proteínas usadas para el cálculo.

## Desplegado por pH

Otro método, relativamente, común para desplegar proteínas es a través de cambios en el pH (Figura 2-19). La acidificación de la solución de proteína (por ejemplo por el agregado de ácido clorhídrico) llevará a que se protonen todos aquellos grupos que pueden captar un protón (por ejemplo, las histidinas adquirirán carga positiva mientras que los residuos de ácido glutámico y aspártico perderán su carga negativa en este proceso). Cuando esto ocurre, los distintos segmentos de la cadena comienzan a repelerse por el accionar de fuerzas electrostática (presencia de altas densidades de cargas positivas).

Sin embargo, si al estado desplegado en medio ácido se le agregan sales capaces de apantallar, aunque sea parcialmente, las cargas positivas sobre la proteína, entonces la cadena polipeptídica podrá volver a compactarse, y algunos elementos de estructura secundaria podrán estabilizarse. Esto es lo que ocurre en el caso de los estados parcialmente plegados (glóbulos fundidos) estabilizados en medio ácido extremo o por el agregado de sal, por ejemplo cloruro de potasio (KCl).



*En ausencia de sales (KCl) el estado parcialmente plegado se estabiliza recién con el agregado de suficiente HCl a pH 1,0 (presencia de aniones Cl<sup>-</sup>). En cambio si agregamos sales y luego disminuimos el pH (KCl 250 mM) el estado parcialmente plegado se estabiliza a pH mayores. (ver figura 2-19)*

## La reacción de plegado proteico seguida en función del tiempo.

El avance de las reacciones de plegado y de desplegado pueden seguirse en el tiempo mediante diversas técnicas que veremos más adelante. Estas técnicas nos permitirán medir en función del tiempo la proteína replegada desplegada. En la **Figura 2-20** se muestra un ejemplo sencillo de un sistema para medir el avance de la reacción de plegado.

En este caso se prepara una solución de proteína desplegada (por ejemplo en 6.0M de GuHCl) y se inyecta un volumen de esta solución en una celda o cubeta de replegado (una cubeta de cuarzo) que tiene buffer de replegado y en el caso más simple no tiene agente desnaturizante y un magneto mezclador que permite unir, rápidamente, el volumen agregado de proteína y, por lo tanto, diluir la concentración de desnaturizante.

Demorando el menor tiempo posible, se observa cómo cambia alguna propiedad de las macromoléculas a medida que se repliegan, por ejemplo alguna propiedad óptica, es decir, cómo interactúan las macromoléculas con la luz. Por ejemplo, podemos evaluar cómo cambia en función del tiempo la absorción de luz por parte de la solución de proteína. Para esto debemos usar una celda de replegado transparente, en este caso no debe absorber luz en el rango de longitudes de onda en el que se mide. Un punto importantes es que algunas proteínas se pliegan (o despliegan) lentamente, en segundos a minutos, en cambio otras lo hacen muy rápidamente, desde milisegundos hasta micro segundos, así que dependiendo de qué proteína se trate podremos o no usar este tipo de dispositivo sencillo. En los casos en los que se pliegan muy rápidamente se debe utilizar otro tipo de equipamiento, ahora con dispositivos controlados electrónicamente que permiten inyectar, mezclar eficientemente y medir en tiempos muy cortos. Uno de estos equipos se detalla en la **Figura 2-21**.

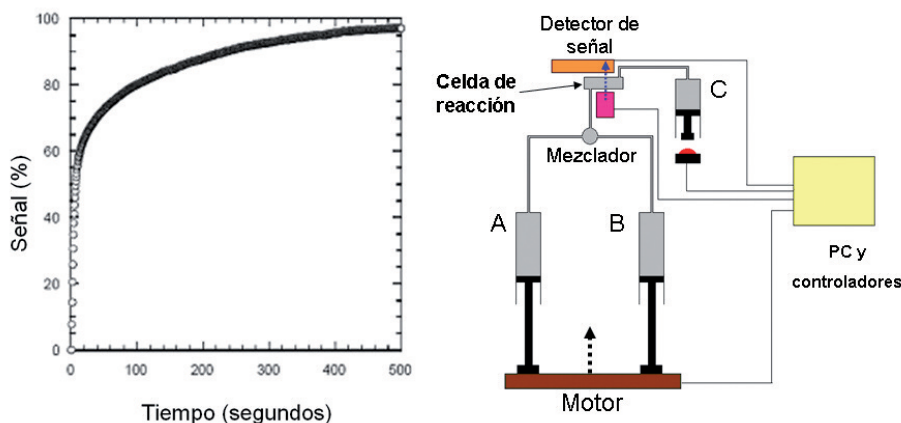
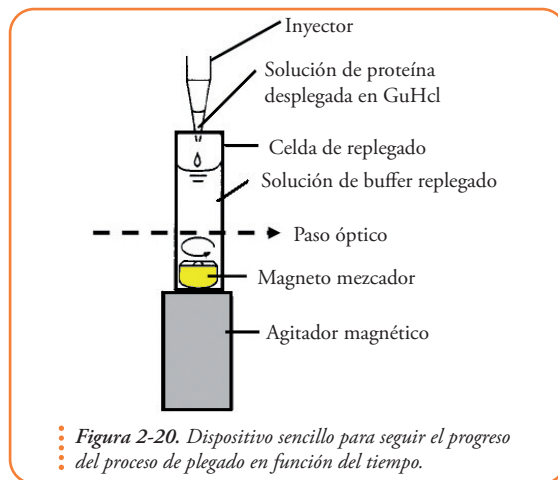


Figura 2-21. Experimentos de plegado y desplegado en función del tiempo: mediciones a tiempos cortos.

*Aquí en la Figura 2-21, como se ve, las cosas se complejizan un poco: tenemos tres jeringas controladas por una computadora. En la jeringa A se almacena proteína desplegada en desnaturalizante, en jeringa B solución de replegado. Cuando el motor (placa marrón) avanza los émbolos de las jeringas A y B impulsan un volumen (que se puede controlar) hacia el mezclador, aquí se mezclan ambas soluciones y la mezcla ingresa a la celda de reacción desplazando el volumen presente en ella hacia la jeringa C, el émbolo de la jeringa C (a medida que se llena la jeringa) retrocede hasta cierto punto (este volumen puede regularse) en el que se detiene por contacto (frenado de flujo), simultáneamente se dispara una señal electrónica (al oprimirse el botón rojo de frenado de flujo, que indica que la reacción ha comenzado). En este caso también se mide alguna propiedad que cambia con el replegado de la proteína a medida que la reacción avanza. En el panel de la izquierda se muestra como cambia una propiedad óptica (señal) en el proceso de replegado de la proteína  $\beta$ -lactamasa a medida que transcurre tiempo de reacción. Se parte del estado desplegado que tiene señal= 0%. En los primeros 100 segundos se ha adquirido más del 80% de la señal final (estado nativo). Vale la pena ver que en el proceso de replegado de esta proteína existe una etapa muy rápida, a los 20 segundos de reacción la señal ya ha tomado un valor mayor al 60% de la señal que tiene una solución en la que todas las moléculas se encuentran en estado nativo.*

## El estado de transición de la reacción de plegado

Para descubrir los principios que gobiernan el proceso de adquisición de estructura nativa es necesario, además, comprender la naturaleza de las barreras que lo bloquean y las fuerzas que lo impulsan.

Durante el proceso de plegado se generan muchas uniones no covalentes. La formación de estas interacciones limita la velocidad, imponiendo una barrera energética debido a los notables cambios en la entropía conformacional, durante el plegado se restringe la libertad conformacional de la cadena polipeptídica que adquiere una única conformación, la nativa, y de hidratación, a medida que avanza la reacción de plegado una gran cantidad de moléculas de agua que hidrataban a la cadena polipeptídica desplegada deben liberarse al seno del solvente permitiendo la compactación de la macromolécula.

El conjunto de estructuras en formación que están en la cima de la barrera energética, y constituyen el máximo de energía en la coordenada de reacción, se conoce como estado de transición de la reacción de plegado ( $T^\ddagger$ ). El estado de transición está formado por un conjunto de estructuras inestables que, por definición, tienen un 50 % de probabilidad de progresar al estado nativo.

Para el caso de la reacción 1 (Figura 2-22 panel de la izquierda) el estado desplegado es más estable que el estado nativo; en esta condición experimental, la reacción transcurrirá hacia U, lo contrario sucede en el caso de la reacción 2. Por último en la reacción 3 la estabilidad de los nativo y desplegado es idéntica (misma energía) por esto las barreras ener-

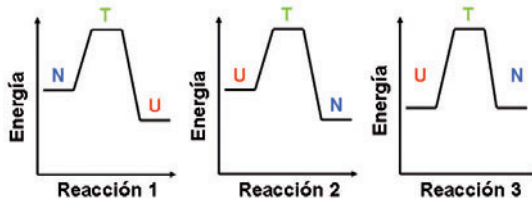


Figura 2-22. Coordenada de reacción del proceso de plegado. El transición de la reacción de plegado: T.



géticas son de la misma altura y, entonces, las velocidades de plegado y desplegado también lo son. Esta última condición es la que se observa para la concentración media de agente caotrópico en un experimento en el equilibrio. En este punto la concentración de U en solución será  $[U]=[N]$ . Ambos estados son igualmente probables.

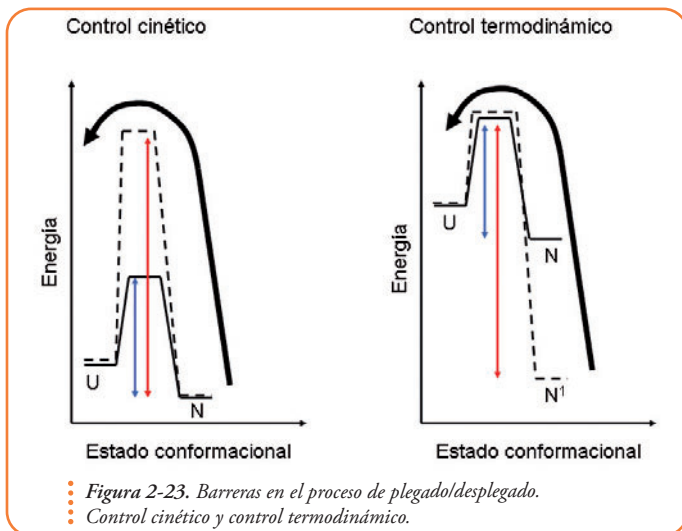
Podemos pensar que la probabilidad de que una proteína se pliegue dependerá de la diferencia de energías entre los estados conformacionales pero, también, esta probabilidad depende radicalmente de la altura de la barrera energética que separa ambos estados. Una barrera muy alta disminuirá, completamente, la probabilidad de que la proteína se pliegue en un tiempo corto. Simultáneamente, si la proteína se encuentra plegada la barrera podría impedir que se despliegue en un lapso de tiempo considerable.

Para entender este concepto, que no es únicamente teórico porque, en muchos casos, se han seleccionado este tipo de mecanismos para controlar el estado conformacional de las macromoléculas, se muestra, en la **Figura 2-23**, en el panel de la derecha, una proteína en la que, en una condición particular (línea de puntos), su estado de transición se desestabiliza (aumenta su energía) pero el estado nativo no. Esto tiene como consecuencia un gran incremento en la barrera energética que debe atravesarse para que la proteína se despliegue (flecha roja con respecto a flecha azul). En panel de la derecha si bien el resultado es similar (aumento de la barrera, flecha roja con respecto a flecha azul) el origen es completamente diferente. En una condición (líneas de puntos) el estado nativo está sumamente estabilizado. En algunos casos reales ocurren procesos similares. Las proteínas se pliegan bajo una condición fisiológica (barrera baja) y luego es transferida a una segunda condición (barrera alta), por ejemplo cambio de pH o proteólisis controlada.

Algunas de las preguntas que podemos hacernos con respecto al estado de transición son:

- ¿Es compacto o posee un incremento de superficie expuesta con respecto a N?
- ¿Cómo está estructurado el estado de transición?
- ¿Cómo se lo puede estabilizar o desestabilizar?
- ¿Cuáles son las interacciones nativas presentes en el estado de transición?
- ¿Se lo puede estudiar computacionalmente, se puede simular?

Para responder la primera pregunta podemos imaginarnos que el conjunto de estructuras fluctuantes e inestables a las que llamamos estado de transición son, verdaderamente expandidas tanto como el estado desplegado. Si pensamos en la reacción de despliegado, la energía del estado de transición variará en función de la concentración de agente desnaturante



de la misma forma que para el estado desplegado porque los agentes caotrópicos, como ya mencionamos, actúan solubilizando superficie expuesta (Izquierda panel superior, en la **Figura 2-24**). Nuestro experimento se puede llevar a delante por medio de una dilución de proteína en estado nativa en un medio que contenga una concentración definida de agente desnaturante. Más adelante veremos algunos de los problemas técnicos con los que nos enfrentamos al realizar este tipo de experimentos.

Si hacemos la reacción de desnaturalización (desplegado) en dos concentraciones distintas de agente caotrópico ( $[D]$ ), el trazo punteado representa una concentración mayor de desnaturante que el trazo continuo) las energías relativas de los estados conformacionales podrían representarse cualitativamente como en los paneles inferiores de la **Figura 2-24** (reacciones A y B). Aquí nuevamente se ve que la estabilización que sufre cada estado conformacional depende de la superficie que expone. El estado desplegado se estabiliza más que el estado nativo, y en este caso, como el estado de transición posee tanta

superficie expuesta como el estado desplegado (nuestro supuesto inicial) se estabiliza tanto como este (**Figura 2-24**, paneles superior e inferior, izquierda). Lo interesante es que en este caso como la constante de velocidad de desplgado es inversamente proporcional a la altura de la barrera NT, un aumento en la concentración de agente desnaturante incrementará la velocidad de desplgado.

Pero, sin embargo, también podemos imaginarnos que el conjunto de estructuras fluctuantes e inestables a las que llamamos estado de transición son tan compactas como el estado nativo. Ahora nuestro supuesto inicial es el otro extremo. Esto se representa en el panel de la derecha. La energía del estado de transición no variará tanto con el incremento en la concentración de desnaturante. La pendiente de la recta (verde) ahora será similar a la pendiente de la recta azul que representa el efecto del incremento de desnaturante sobre la estabilidad del estado nativo (**Figura 2-24**, panel superior centro). Como se ve el estado desplegado expone más superficie y por lo tanto se estabiliza más con una concentración de desnaturante mayor (línea de puntos). Bajo esta condición la barrera energética no cambia significativamente con un aumento de agente desnaturante. Por este motivo la velocidad de desplgado tampoco variará significativamente.

En el panel de la derecha de la **Figura 2-24** se muestra un gráfico que se conoce con el nombre de gráfico de Chevron, brazo (o rama) derecho. Aquí lo que se grafica es cómo varía la constante de velocidad de desplgado  $k_U$  con la concentración de desnaturante para una proteína que posee un estado de transición extremadamente compacto (trazo rosa) y para una proteína que el-posee un estado de transición extremadamente expandido (naranja). Como dijimos más arriba, si estado de transición está expandido variará significativamente la velocidad de desplgado mientras

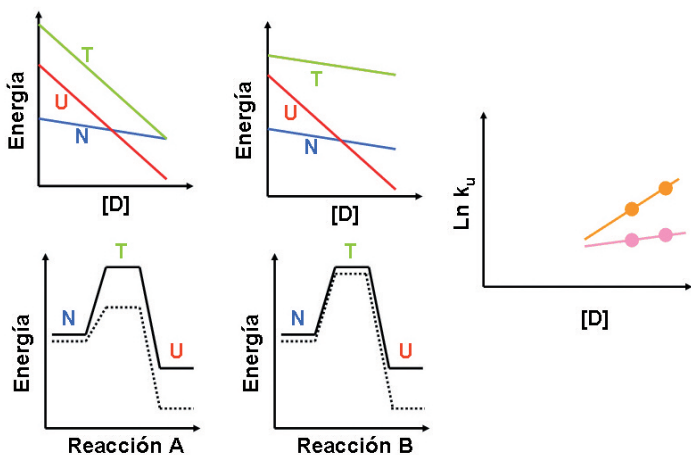


Figura 2-24. El estudio del cambio de la velocidad de desplgado en función de la concentración de desnaturante.



que si es compacto el cambio en la velocidad de desplegado en función de la concentración de agente caotrópico será menor. Así analizando las pendientes de estos brazos podemos definir una de las características más importantes del estado de transición: su grado de compactación.

El análisis del brazo derecho del gráfico de Chevron es el complemento que necesitamos (Figura 2-25). La reacción que se estudia en este caso es el replegado desde el estado desplegado hasta la forma nativa en distintas concentraciones de desnaturante. Ahora si el estado de transición es expandido (tanto como el estado desplegado), la barrera energética que separa a U de N será siempre la misma porque U y T se estabilizan de la misma manera (Figura Panel inferior izquierda). Mientras que si el estado de transición es compacto (tan

compacto como el estado nativo), con el agregado de desnaturante únicamente se estabilizará U (baja su energía, Figura panel inferior centro). De esta manera variará, considerablemente, la velocidad de replegado porque al incrementarse la barrera con el desnaturante la velocidad disminuirá.

En el gráfico de la derecha se muestra este efecto: la dependencia de la velocidad de plegado con la concentración del desnaturante para dos concentraciones. En naranja para un estado de transición expandido: no hay cambio de barrera, no hay cambio en la constante de velocidad de plegado ( $k_F$ ). Por el contrario, en rosa se muestra cómo un estado de transición compacto determina un incremento en la dependencia de la constante de velocidad de plegado con la concentración de agente caotrópico. El incremento en la pendiente es indicador de este proceso: mayor [D] menor  $k_F$ .

Si juntamos ambas ramas, la derecha (plegado) y la izquierda (desplegado) obtenemos el gráfico de Chevron completo (Figura 2-26).

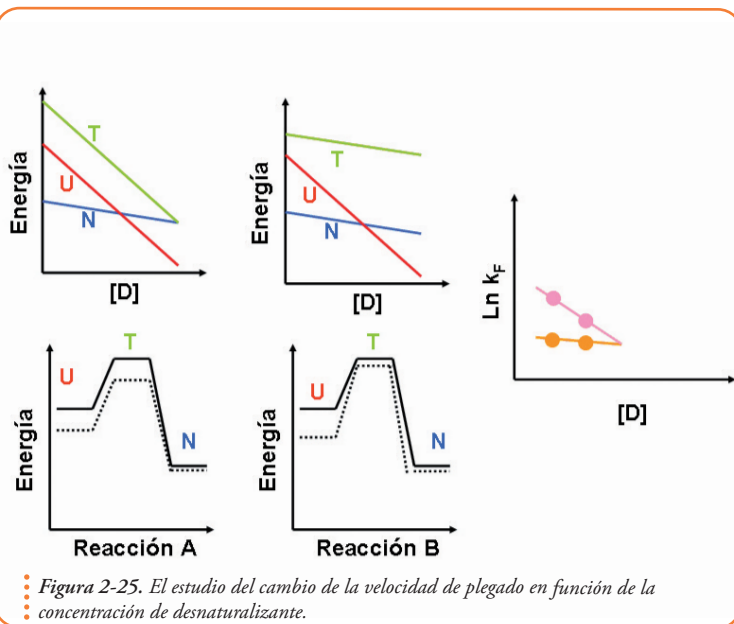


Figura 2-25. El estudio del cambio de la velocidad de plegado en función de la concentración de desnaturante.

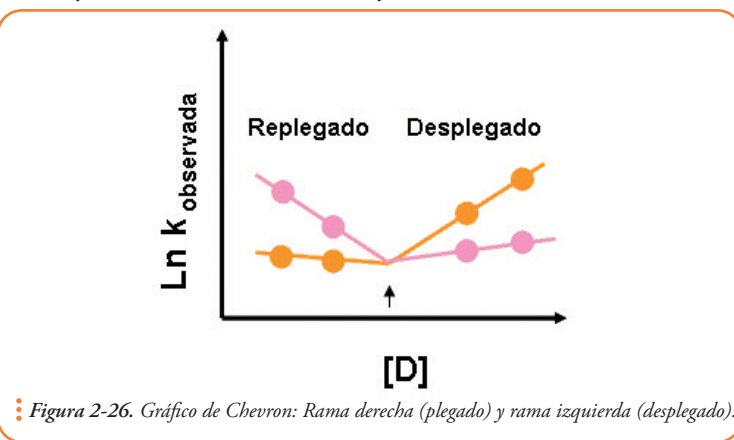


Figura 2-26. Gráfico de Chevron: Rama derecha (plegado) y rama izquierda (desplegado).

Es importante ver que, como se mencionó anteriormente, cuando las energías del estado desplegado y del estado nativo son idénticas las velocidades de plegado ( $k_F$ ) y desplegado  $k_U$  serán iguales (Figura 2-22 reacción 3).

Si miramos atentamente un gráfico de Chevron, podemos ver que existe una región donde el brazo derecho toma valores semejantes al brazo izquierdo. Justamente, esto ocurre en la concentración media de agente caotrópico ( $C_m$ ). En la Figura 2-27 se muestra en el panel superior un gráfico de Chevron en el que si se hacen extrapolaciones a concentración de desnaturante  $[D]=0$ , se obtienen las constantes de velocidad en  $H_2O$  (en ausencia de desnaturante). Recordemos que nuestros datos experimentales son los puntos naranjas. En el panel central podemos ver un experimento de desplegado en el equilibrio en el que se grafica la fracción de las moléculas de proteína que se encuentran desplegadas (a bajas concentraciones de agente desnaturante  $f_U \sim 0$  (ninguna de las moléculas se ha desplegado) y a altas concentraciones  $f_U \sim 1$  (cerca del 100 % de las moléculas se ha desplegado). En la concentración de desnaturante  $C_m = [D]$  el 50% de las moléculas se encuentra desplegado, aquí entonces  $f_U = 0.5$ . La línea vertical de puntos muestra como esta  $[D] = C_m$  es la región donde  $k_U = k_N$  en el gráfico de Chevron (panel superior).

Una de las técnicas más poderosas de la química orgánica para probar la estructura de  $T^\ddagger$  en una reacción simple consiste en el estudio de la relación 'estructura reactividad'. Este tipo de estudio comienza con la preparación de una serie de reactivos que poseen pequeñas modificaciones químicas con respecto al reactivo original. Posteriormente, se mide el cambio en la constante de equilibrio y en las constantes de velocidad de la reacción. En base a los resultados pueden inferirse aspectos de la estructura de  $T^\ddagger$ .

Para estudiar el estado  $T^\ddagger$  del plegado

*Vale la pena recordar que en el equilibrio (ver desnaturalización), la constante de equilibrio  $K_{eq} = k_U / k_F$  y, a su vez,  $K_{eq} = [U] / [N]$  o  $K_{eq} = f_N / f_U$ . Así en la concentración media ( $C_m$ ) de un experimento típico de desnaturalización en el equilibrio vale  $k_U = k_F$ ,  $[U] = [N]$ ,  $f_U = f_N$ .*

*También vale la pena recordar que*

$$\Delta G^\circ_{NU} = -RT \ln K$$

*y como  $K = K_{eq} = [U] / [N] = k_U / k_F$*

*vale en la concentración media que*

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k_U / k_F = 0$$

*(efectivamente la estabilidad de U es la misma que la de N y por esto la probabilidad de que la reacción transcurra en un sentido (plegado) es la misma que transcurra en el otro (desplegado)).*

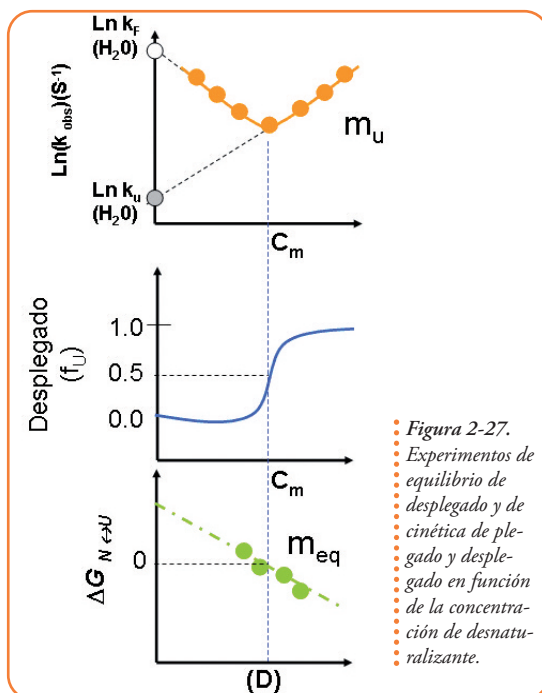


Figura 2-27. Experimentos de equilibrio de desplegado y de cinética de plegado y desplegado en función de la concentración de desnaturante.

proteico, se desarrolló un procedimiento experimental basado en los mismos conceptos, pero sustentado en la ingeniería de proteínas. Este procedimiento permite medir la magnitud y la importancia de una interacción particular, y cómo esta afecta la cinética, el equilibrio y el mecanismo de plegado. La estrategia, muy sintéticamente, incluye la modificación por ingeniería genética de una interacción. Se reemplaza un residuo por otro eliminando una parte de la cadena lateral, por ejemplo leucina por alanina. También es necesario establecer el efecto de la modificación sobre los estados nativo y desplegado. Del análisis de los cambios en la magnitud de la barrera energética que separa al estado desplegado del nativo, puede inferirse la estructura del estado de transición. En efecto, cada mutación actúa como una sonda específica del grado de formación de estructura en el micro entorno del residuo modificado. Es decir que puede inferirse si la interacción medida está o no formada en  $T^+$ .

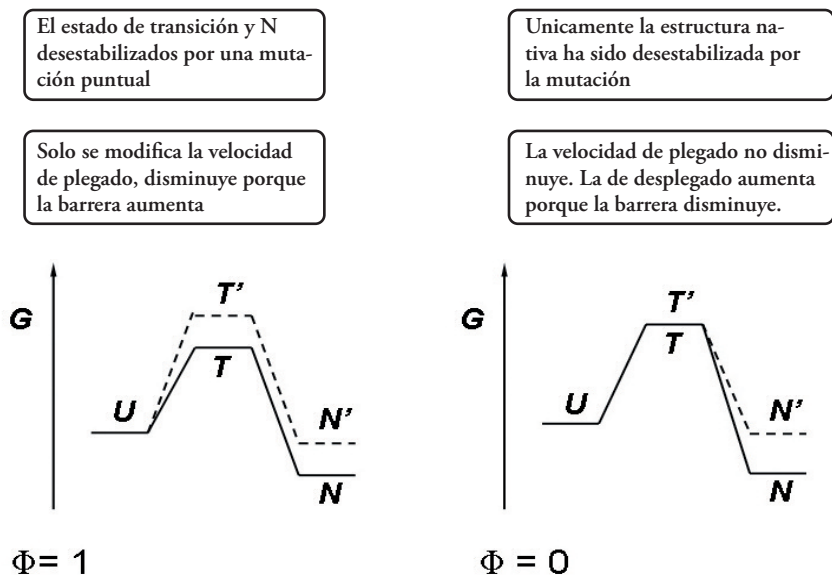


Figura 2-28. Análisis de phi de Alan Fersht para estudiar el estado  $T^+$  del plegado proteico. Del análisis de los cambios en la magnitud de la barrera energética que separa al estado desplegado del nativo, puede inferirse la estructura del estado de transición.

La aplicación en forma rigurosa de este tipo de procedimiento experimental está limitada a proteínas que se pliegan en dos estados ( $U \leftrightarrow N$ ) o a 'tramos' del proceso de plegado. Por ejemplo, en la reacción de plegado  $U \leftrightarrow I_1 \leftrightarrow N$  se limita al proceso  $I_1 \leftrightarrow N$  que puede considerarse como una reacción de plegado de dos estados. Es importante notar que las mutaciones que desestabilicen al estado de transición tendrán un efecto sobre la velocidad de la reacción de plegado. De esta manera, más alta es la barrera energética, más lento será el proceso de plegado. La constante de velocidad de reacción  $k$  es proporcional a  $e^{(-\Delta G_{TU})}$ .

El valor **phi** ( $\Phi$ ) es un indicador de la presencia de determinada interacción en el estado de transición. Este parámetro toma el valor  $\Phi=1$  cuando la interacción desestabiliza por igual a  $T$  y al estado nativo indicando que la interacción presente en el estado nativo también estaba formada en el estado de transición y contribuía con la estabilidad del mismo del mismo

modo que contribuye con la estabilidad del estado nativo. En cambio, cuando, solamente, afecta al estado nativo y no al estado de transición  $\phi$  toma el valor  $\Phi=0$  (Figura 2-28 y 2-29). Esto ocurre porque  $\phi$  se define como

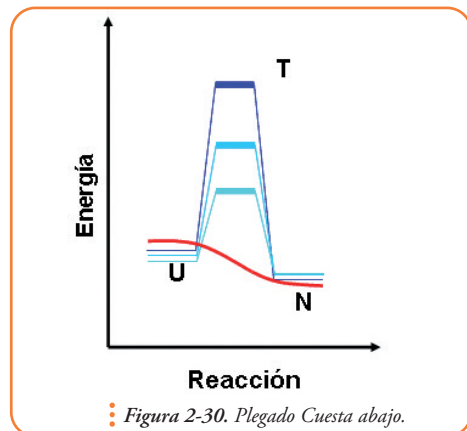
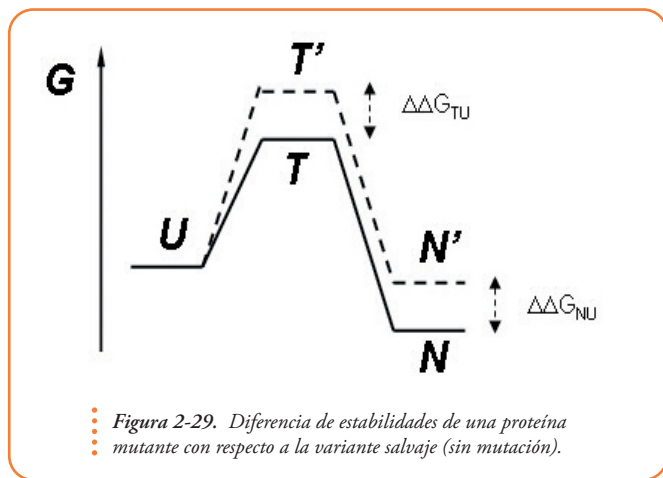
$$\phi = \frac{\Delta\Delta G_{TU}}{\Delta\Delta G_{NU}}$$

Donde  $\Delta\Delta G_{NU}$  no es, ni más ni menos, que la diferencia de estabilidades de la proteína mutante con respecto a la salvaje ( $\Delta G_{NU \text{ salvaje}} - \Delta G_{NU \text{ mutante}}$ ) y  $\Delta\Delta G_{TU}$  es la diferencia de estabilidad del estado de transición entre las dos variantes,  $\Delta G_{TU \text{ salvaje}} - \Delta G_{TU \text{ mutante}}$  que puede obtenerse calculando las alturas de las barreras mediante experimentos en los que se mide la velocidad de plegado.

Existen evidencias de una fuerte correlación entre la velocidad de plegado de proteínas simples (que poseen un único dominio) con parámetros que miden la complejidad topológica del estado nativo. Esta correlación sugiere que la topología podría ser determinante para alcanzar el estado de transición. Por el contrario, no hay correlaciones entre el tamaño o la estabilidad y la cinética de replegado. Este tema será abordado nuevamente más adelante. Sin embargo, resulta interesante ver que las barreras energéticas para el plegado pueden tener base entálpica

(interacciones nativas ausentes o interacciones no nativas presentes) o base entrópica (topologías complicadas). En definitiva ambos términos intervienen en el plegado de la cadena polipeptídica en el espacio. Existe un grupo de proteínas, particularmente, llamativas en las que, aparentemente, no se detecta una barrera energética a través de un estado de transición; a este tipo de plegado se lo ha llamado cuesta abajo (*down hill* en inglés). Algunos investigadores piensan que los mecanismos de plegado en dos estados ( $N \leftrightarrow U$ ) resultarían de una falta de sincronización entre la ganancia de energía de estabilización y la pérdida de entropía conformacional (estado desplegado representado por miles de conformaciones mientras que el estado nativo estaría representado por una). Se piensa que la sincronización entre estos dos términos resulta en un plegado cuesta abajo (curva roja en la Figura 2-30).

*Se caracteriza por la ausencia de una barrera energética a través de un estado de transición. Se representa con un trazo en color rojo. (ver Figura 2-30)*



También es importante notar cómo varían estos diagramas en el caso de la presencia de intermediarios. En la figura se muestra un ejemplo hipotético en el que existen en la reacción de plegado por lo menos dos intermediarios ( $I_1$  e  $I_2$ ) ambos con características estructurales bien distintas.  $I_1$  posee toda la estructura secundaria del estado nativo pero no es compacto. En cambio  $I_2$  es casi tan compacto como el estado nativo, si bien no se han fijado aún todas las interacciones terciarias nativas. Sin embargo cuando analizamos el estado de transición de la reacción de plegado la etapa lenta limitante es la conversión de  $I_2$  en N. La barrera más alta es efectivamente la barrera limitante de la velocidad de plegado (Figura 2-31).

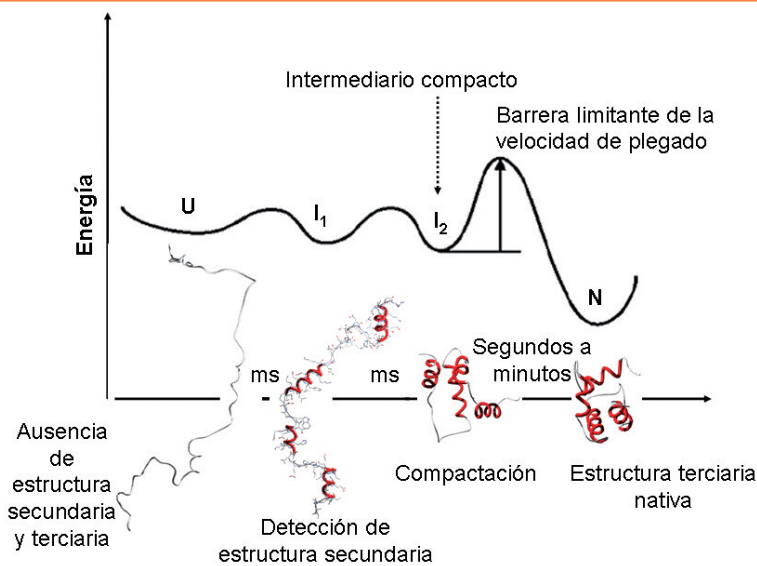


Figura 2-31. Un ejemplo hipotético que describe una ruta de plegado hacia la estructura nativa a través de varios intermediarios.

## La paradoja de Levinthal

Por mucho tiempo coexistieron dos conceptos muy interrelacionados en torno al estudio del proceso del plegado de las proteínas: la paradoja de Levinthal y la supuesta necesidad de la existencia de intermediarios o vías específicas del plegado.

Levinthal dedujo, hace 30 años, que si la búsqueda de la conformación nativa desde el estado desplegado fuera un proceso aleatorio, las moléculas deberían cambiar su conformación tantas veces que sería un proceso irrealizable en tiempos razonables. Por ejemplo, si una cadena de cien residuos tiene 10100 posibles conformaciones (un promedio de diez conformaciones por residuo), y si una conformación se convierte en otra en el tiempo más corto posible (tal vez 10-13 ps), el tiempo promedio requerido para explorar todas las posibles conformaciones hasta hallar el mínimo energético sería 1.077

años. Las observaciones, por el contrario, indican que las proteínas se pliegan en tiempos muy cortos, desde unos pocos microsegundos a minutos u horas.

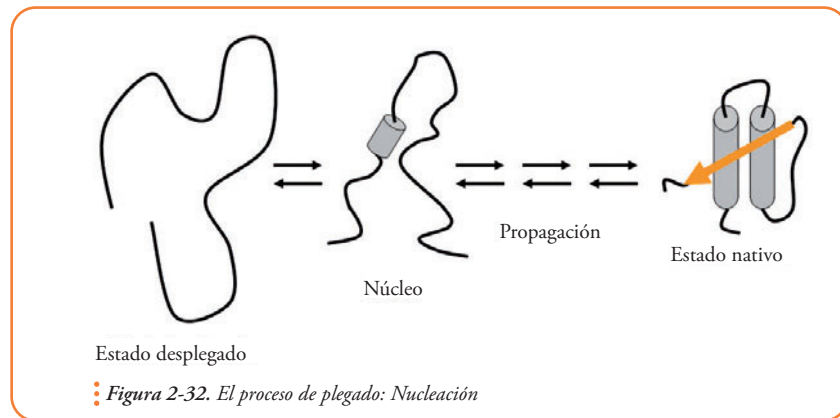
A partir de este tipo de consideraciones Levinthal propuso la existencia de vías discretas (caminos) de plegado que eviten las conformaciones no productivas (las que no conducirían hacia el estado nativo).

## Modelos de plegado: Teorías para el proceso de plegado

### Nucleación

En el contexto descrito anteriormente surgieron una serie de modelos sobre las rutas de plegado. El estudio de las vías de plegado debía, en teoría, revelar el mecanismo de plegado y ayudar a determinar el código por el cual la secuencia determina la estructura.

El propio Levinthal, en el año 1968, sugirió que una parte de la cadena polipeptídica podría servir como núcleo para una posterior propagación de la estructura 3D (Figura 2-32). Este modelo requiere que el núcleo sea suficientemente pequeño para que una búsqueda al azar permitiera encontrar, localmente, la estructura nativa. Una vez que el núcleo alcanza la estructura nativa se posibilita el plegado secuencial y esencialmente independiente de cada residuo.



### Difusión, colisión y coalescencia

Otros modelos simplificaron la búsqueda conformacional desacoplando la formación de estructura secundaria y terciaria. Así Martín Karplus y David L. Weaver (1976) propusieron el modelo de difusión, colisión y coalescencia. Este modelo asume que las proteínas están compuestas por una serie de partes fluctuantes muy móviles (microdominios) suficientemente pequeñas y simples como para que en ellas la búsqueda conformacional sea rápida (Figura 2-33). Los microdominios no tienen acceso a estructura secundaria estable por búsqueda al azar pero sí a estructura secundaria incipiente y a grupos o clusters de interacciones hidrofóbicas.

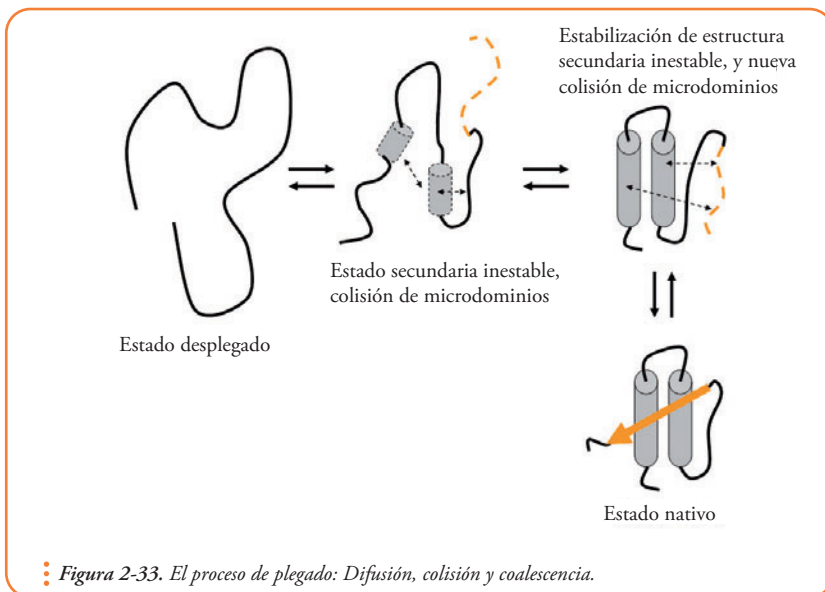
El proceso de plegado es descrito como una serie de pasos únicos, de difusión, colisión y coalescencia, en la que se estabilizan mutuamente los microdominios. Las fuerzas que gobiernan el movimiento de microdominios son las interacciones específicas entre microdominios y las colisiones al azar con el solvente y con otras partes de la cadena polipeptídica. La estabilización final de estructura secundaria está ligada a la formación de estructura terciaria.



En la Figura las flechas discontinuas indican las colisiones de microdominios que llevarán a la estabilización de estructura secundaria. Los elementos de estructura secundaria aún inestables o insipientes se dibujaron también en trazo discontinuo.

El modelo permite postular múltiples vías (paralelas) de secuencias de pasos de difusión y colisión. La información contenida en la secuencia de cada microdominio

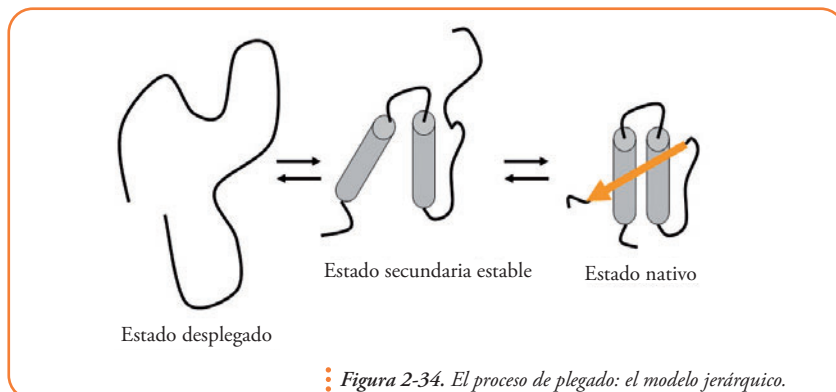
puede ser usada independientemente. Otra particularidad del modelo es que las colisiones pueden generar intermediarios con interacciones entre microdominios no adyacentes en relación a la secuencia lineal de la proteína. El modelo reduce en definitiva la dinámica del proceso de plegado, ya no considerando cada residuo, sino el análisis de las propiedades de los microdominios y sus interacciones. Este modelo predice la dependencia de la velocidad de replegado con respecto a la viscosidad del solvente.



## El modelo jerárquico

En la década del 80 Robert L. Baldwin y colaboradores propusieron una serie de ideas inspiradas en los experimentos realizados por los pioneros Ptitsin, Rashin y Richmond, Richards y Cohen. Se trata de un modelo jerárquico en el que, inicialmente, se forman elementos locales de estructura secundaria nativa, independientes e intrínsecamente estables (con estructura de puentes de hidrógeno nativa), en ausencia de estructura terciaria. Posteriormente, estos elementos se empaquetan para formar estructuras más complejas (Figura 2-34).

Este modelo se ve apoyado por la evidencia de que una hélice  $\alpha$  se forma, en muchos péptidos y proteínas, en microsegundos, mientras que la estructura terciaria tarda en aparecer milisegundos o más.



Existen numerosos ejemplos en los que la estructura terciaria es desensamblada antes que la estructura secundaria. De los experimentos en equilibrio de desplegamiento inducido por agentes caotrópicos.

El estudio de las vías del plegado (ej:  $U \leftrightarrow I_1 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow \dots I_n \leftrightarrow N$ ) se hace muy complicado o imposible para proteínas pequeñas con un único dominio, porque generalmente no se observan intermediarios. Su ausencia, es explicada en el modelo jerárquico por la existencia de una alta cooperatividad en el proceso de plegado, que hace muy poco estables a los intermediarios y aproxima el proceso a un sistema de dos estados (N y U). Estos sistemas pueden abordarse con experimentos de cinética del plegado en solventes en los que los intermediarios se estabilizan.

## Rompecabezas

En el año 1985, Harrison y Durbin [39] propusieron un modelo cualitativo para el mecanismo de plegado. Por analogía con el juego del rompecabezas, recibió el nombre de Rompecabezas. Los autores sugirieron que las proteínas se pliegan por vías alternativas paralelas y no por una secuencia de eventos definida. Incluso para proteínas pequeñas con unos pocos microdominios, estos, por combinatoria, podrían generar un importante número de vías alternativas para alcanzar la estructura nativa. Este modelo podría representar un caso límite de la teoría de difusión y colisiones y su aplicación podría ser dependiente de características específicas de ciertas proteínas en relación a las propiedades de los microdominios y sus interacciones (Figura 2-35).

Llevado al extremo, sería equivalente a armar el 'rompecabezas' comenzando por cualquier pieza. Se generarían así núcleos de plegado y la estructura crecería entorno a estos centros, pero cada molécula elegiría su propia vía hacia el estado nativo.

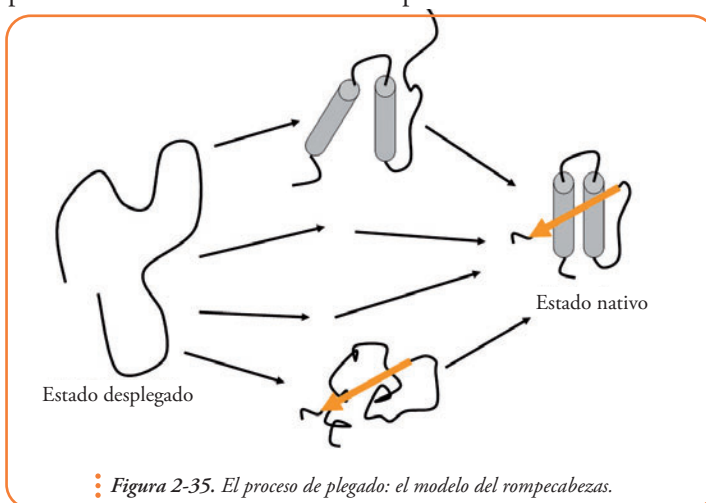


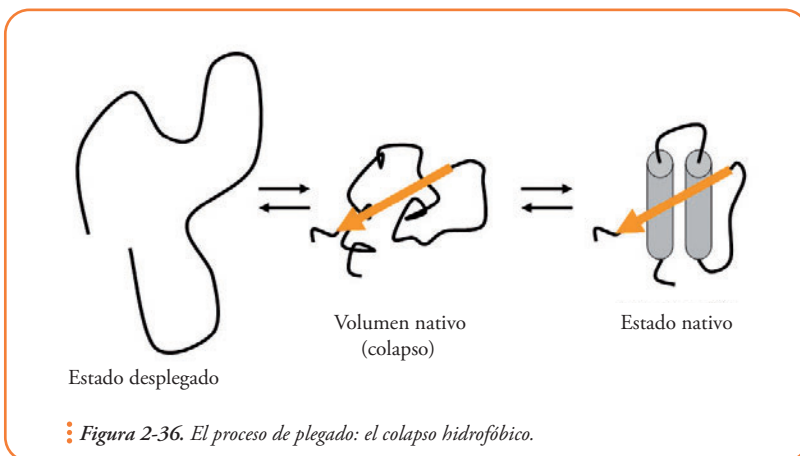
Figura 2-35. El proceso de plegado: el modelo del rompecabezas.

## El colapso hidrofóbico

A fines de la década del 70 surgió la hipótesis de que un 'colapso hidrofóbico' podría tener lugar antes de la formación de estructura secundaria y terciaria. Bajo condiciones de replegado, el polipéptido adoptaría conformaciones compactas, incrementando notablemente la probabilidad de alcanzar la topología nativa. El efecto hidrofóbico es, para este modelo, la fuerza impulsora del plegado y, en definitiva, responsable de la deshidratación del corazón de la proteína, dando lugar a intermediarios sin estructura terciaria fija, con estructura secundaria parcial y con un volumen muy similar al nativo.

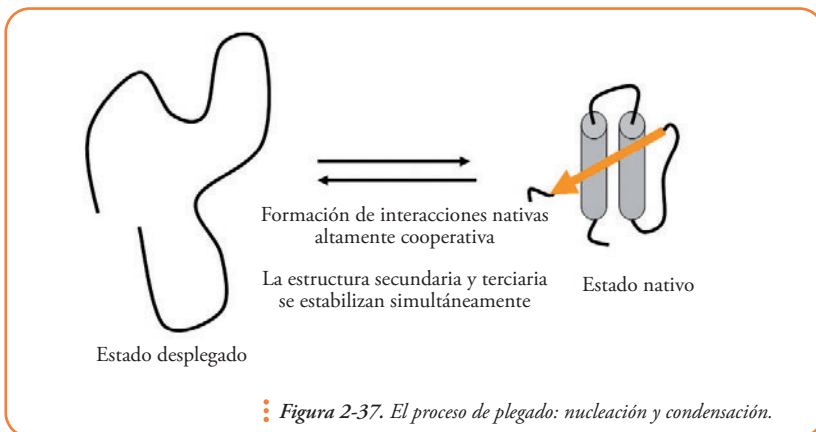
Los elementos de estructura secundaria más inestables podrían estabilizarse posteriormente. Dicho de otra forma, la formación de estructura secundaria nativa (fija) podría estar dirigida por

interacciones terciarias, o superficies apolares más o menos inespecíficas existentes en la estructura del intermediario, incluso por la topología global que adopta la cadena polipeptídica restringiendo el espacio conformacional. Hay indicios de que el colapso y la aparición de estructura secundaria podrían darse de manera simultánea (Figura 2-36).



## Nucleación condensación

En el mecanismo de nucleation condensation o nucleation collapse un grupo de residuos adyacentes forma un núcleo, pero a diferencia de la visión clásica de 'nucleación', en la que el núcleo es fuertemente localizado, por ejemplo dos o tres vueltas de hélice, este modelo predice un núcleo local inestable, que se estabiliza o consolida como consecuencia de interacciones de largo alcance (terciarias) y que, en definitiva, a su vez, extienden el núcleo. La formación del núcleo no es el paso limitante porque para que éste se estabilice una fracción importante de la cadena polipeptídica debe estar correctamente posicionada para proveer los contactos de largo alcance que estabilizan al núcleo. Debe haber entonces un número crítico de interacciones locales y de largo alcance del que depende el plegado global. La estructura secundaria y la terciaria se forman paralelamente (Figura 2-37). Este modelo podría proveer el marco teórico para cada unidad de plegamiento en proteínas complejas.



## Plasticidad del mecanismo de plegado

Las visiones actualizadas de los modelos jerárquicos y de difusión y colisión se sola-

pan. Un elemento de estructura secundaria estable o parcial (microdominio elemental), debería sin duda difundir y colisionar con otro o con un conjunto de microdominios para formar después un dominio mediante un ajuste fino (empaquetamiento). Las estabildades de los elementos de estructura secundaria en forma aislada podrían ser muy variables. De esta forma ambos modelos coinciden en que el plegado es un proceso jerárquico en el que se forman primero estructuras simples con estabilidad marginal, dada por interacciones locales en la secuencia, que posteriormente se agrupan para formar estructuras más complejas.

### ¿Existe un único mecanismo de plegado?

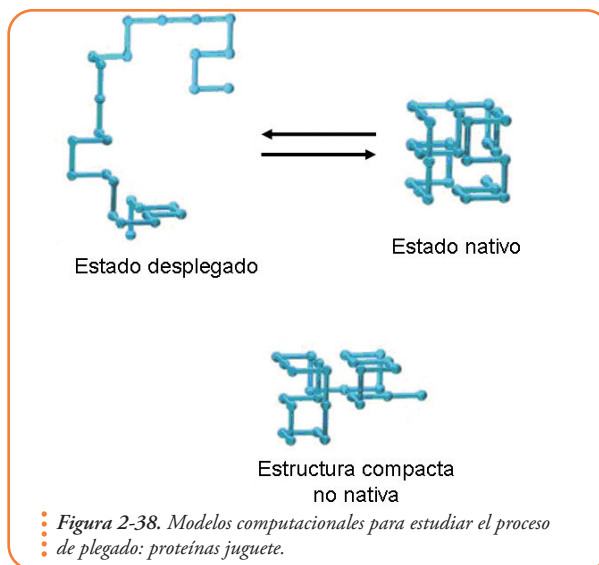
Esto parece poco probable teniendo en cuenta las evidencias experimentales. Que el plegado sea un proceso concertado, o en pasos sucesivos, podría depender de la estabilidad de las subestructuras individuales, por ejemplo, si son inestables en sus formas aisladas, la estructura final se forma de manera concertada, nucleación y condensación. Si las subestructuras individuales fueran suficientemente estables, en forma independiente, podrían alcanzar el estado nativo siguiendo un modelo jerárquico o de difusión y colisión. Las proteínas estudiadas no siguen un único modelo y aún hoy cada modelo mecanístico tiene sus adeptos y ninguno se impone claramente sobre los otros.

## Paisajes energéticos y embudos de plegado

Hace algunos años se propuso una visión del plegado alternativa que permite sortear la paradoja de Levinthal y generar hipótesis con respecto al mecanismo de plegado. Esta visión surgió de la simulación extensiva en computadoras de los cambios conformacionales posibles para representaciones simplificadas de la cadena polipeptídica. En estas representaciones los residuos son considerados esferas de dos tipos, polares (P) y no polares (NP), y su ubicación en el espacio está limitada por la conectividad de la cadena y la localización en un enrejado cúbico. La energía de las interacciones entre esferas es asignada como favorable o desfavorable, de acuerdo a su carácter en polaridad. Para un número pequeño de residuos pueden ser enumeradas todas las conformaciones y su energía puede ser evaluada.

Para estas proteínas conocidas como proteínas de juguete (*toy proteins* en inglés, **Figura 2-38**) el estado nativo es aquel que presenta el mayor número de contactos favorables (NP NP, P P) y máxima compactación.

Mientras los modelos fenomenológicos anteriores usan símbolos para representar cada conformación (U o D, el estado desplegado; T<sub>+</sub>, el estado de transición; I, estados intermediarios), los nue-

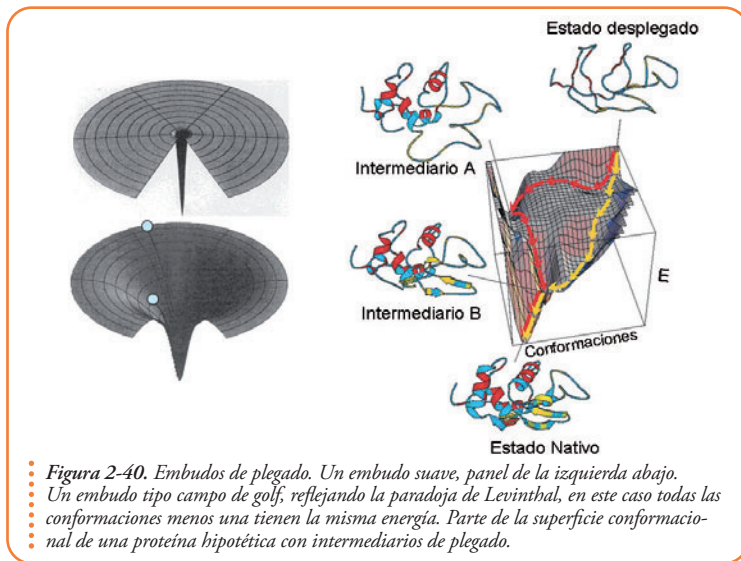
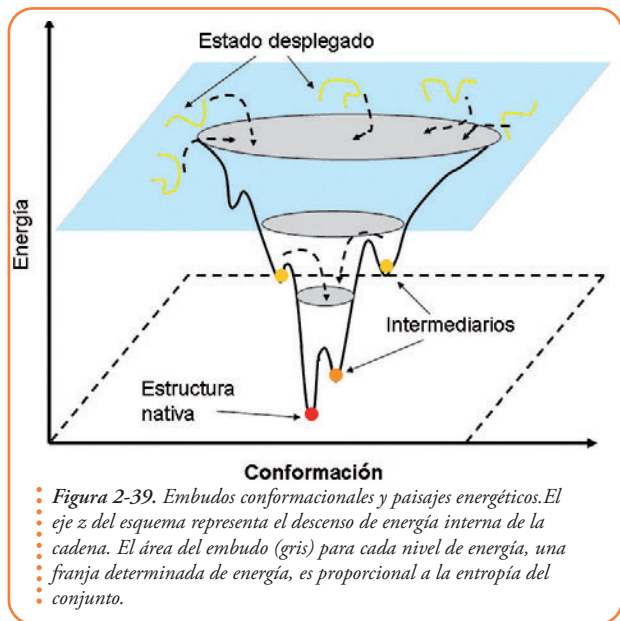


vos modelos teóricos, basados en la mecánica estadística, reconocen que esos estados macroscópicos son en realidad ‘conjuntos moleculares’ de conformaciones. Esta visión reemplaza el concepto de ‘vía de plegado’ (eventos secuenciales) con conceptos como ‘superficie conformacional’, ‘embudos de energía’ y ‘eventos paralelos’.

En estas superficies conformacionales con forma de embudos (ver **Figura 2-39**) se representa en forma gráfica el conjunto de todas las trayectorias conformacionales posibles por las que atraviesa la cadena principal desde el conjunto de estados desplegados (U) hacia la forma nativa.

Las conformaciones que son geométricamente similares son cercanas en la superficie del embudo. El proceso de plegado puede representarse como el trazo producido por una bola al desplazarse por el embudo. La clave del modelo consiste en que cuando la energía interna y la entropía se compensa adecuadamente, el paisaje conformacional adquiere forma de embudo y esencialmente todo cambio conformacional es ‘colina abajo’, acercando la molécula al estado nativo, independientemente de la conformación inicial.

El plegado rápido, de dos estados, se corresponde con embudos suaves, sin trampas cinéticas significativas. Las cinéticas complejas, con muchas fases por el contrario, son representadas con embudos con superficies complejas, accidentadas, rugosas o con valles. En este nuevo contexto la paradoja de Levinthal deja de ser una paradoja. Llegar al mínimo global y hacerlo rápidamente dejan de ser dos aspectos mutuamente excluyentes. La paradoja es, simplemente, el producto de considerar el problema del plegamiento en términos del paisaje tipo ‘campo de golf’ (**Figura 2-40**, panel de la izquierda embudo superior), en el que la cadena busca la conformación nativa suponiendo un paisaje plano de conformaciones. En este caso todas las conformaciones están igualmente alejadas del



estado nativo en términos energéticos por lo que la chance de encontrar el estado nativo se desvanece, el paisaje ya no tiene forma de embudo. La búsqueda conformacional que propone la nueva visión del proceso de plegado es más directa, cada conformación alternativa del conjunto de las moléculas desplegadas se reconfigura rápida y progresivamente hacia el estado nativo.

Existen, entonces, procesos paralelos y conjuntos de conformaciones a los que se llega por distintas secuencias de cambios de ángulos diedros y no por ensamblado secuencial de estructuras específicas y homogéneas. En definitiva una vía está definida por una ruta unidimensional a través del espacio conformacional, mientras que los embudos, primero multidimensionales, reducen progresivamente la ‘dimensión’ del espacio conformacional hacia el estado nativo (prácticamente una única conformación, con cierta flexibilidad). Los intermediarios ahora pueden explicarse como mínimos de energía locales (ver Figura 2-40, panel de la derecha intermediarios A y B), valles en el embudo, o alternativamente trampas de alta entropía configuracional. En este último caso las moléculas deben gastar mucho tiempo de búsqueda (regiones llanas en el embudo). El mínimo global (conformación de menor energía teniendo en cuenta todas las conformaciones posibles es el que corresponde a la estructura nativa (ver hipótesis termodinámica de Anfinsen).

La prueba experimental del modelo requiere demostrar que el cambio de cada par de ángulos diedros no está correlacionado con el cambio de ningún otro par. Las partes superiores del embudo conformacional han sido de difícil acceso experimental porque los primeros eventos ocurren muy rápidamente. Por esto, hasta recientemente, se han estudiado las regiones más profundas, cercanas al estado nativo con barreras energéticas considerables. Sin embargo, hace muy poco tiempo comenzaron a realizarse experimentos de replegado en escala de los micro y de los nanosegundos.

