

Conclusión

Quinta Parte

Resulta fascinante pensar en la posibilidad de diseñar proteínas con actividades biológicas nuevas. Esto podría hacerse usando, como andamios, el esqueleto de proteínas conocidas y, más ambiciosamente, diseñando proteínas *de novo*.

En ambos casos, como buenos diseñadores o ingenieros necesitaríamos conocer las bases de la estabilidad proteica desde un punto de vista estructural y, también, las bases químicas y físicas de la función biológica que queremos que la proteína en cuestión cumpla. En el segundo caso, necesitamos, además, conocer el código que permite predecir una estructura a partir de una secuencia de aminoácidos determinada.

De cualquiera de las dos maneras será un requisito básico para el diseñador conocer la estructura tridimensional para realizar la ingeniería de la nueva función. Los grupos químicos que la desempeñen deberán estar ubicados y orientados en el espacio con una precisión absoluta.

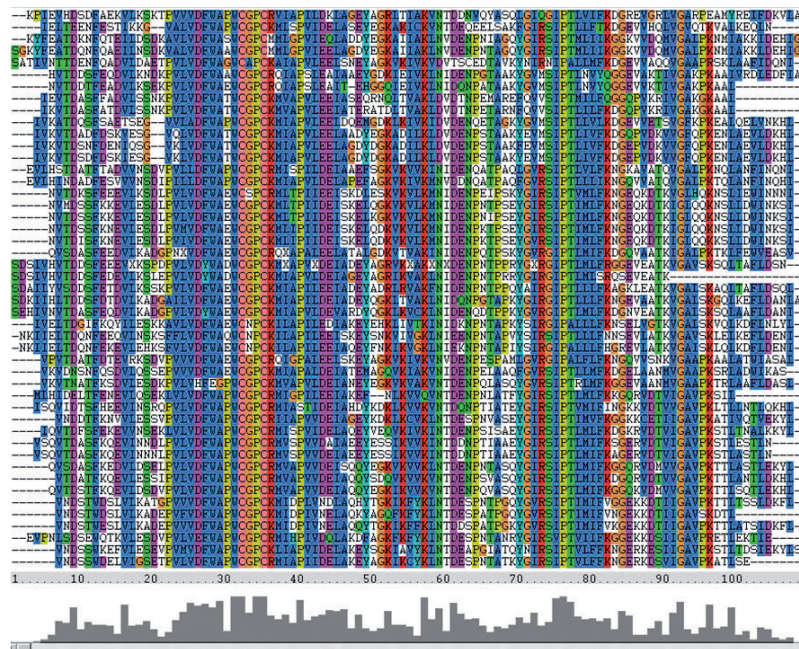
Uno de los problemas más importantes que los científicos intentan resolver en la actualidad es, justamente, comprender cómo la secuencia de aminoácidos en última instancia determina la estructura proteica, la búsqueda de un código para el plegado. Por ahora este problema no tiene una solución formal, sólo contamos con respuestas insipientes.

Sin embargo, podemos mencionar algunas generalidades. Hemos visto que existen familias de proteínas y que, los miembros de estas familias, tienen secuencias homólogas. Estos homólogos (que cuentan con un porcentaje de la secuencias conservada) tienen similitud en sus secuencias, similitud en su estructura y muchas veces en su función. Por lo general los residuos que suelen conservarse entre proteínas homólogas son residuos del corazón de la proteína pero, también, se conservan los relacionados con la fun-

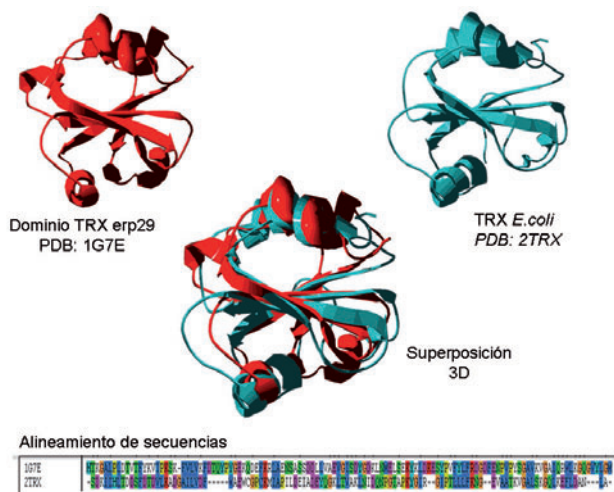
ción, si es que estos homólogos cumplen similar función biológica (ver Figura 5-1)

En muchos casos, sin embargo, un mismo plegado puede estar asociado con funciones proteicas bien distintas (Figura 5-2).

Por esto, es muy riesgoso extraer conclusiones apresuradas acerca de los motivos por los cuales un residuo se ha conservado a lo largo de la evolución biológica de una secuencia.



• **Figura 5-1.** Conservación del sitio activo WCGPC en las tioredoxinas. Para este ejemplo se utilizó la base de datos de secuencias homólogas ConSurf. Se obtuvieron 50 homólogos. Puede verse que coexisten en la secuencia regiones menos conservadas, particularmente, en los extremos N y C-terminales y que ciertos bloques de residuos apolares se conservan (por ejemplo aminoácidos 22-25 y 78- 81); estos residuos apolares corresponden a residuos del corazón de la proteína. El alineamiento de estructuras primarias fue realizado con el programa de libre acceso ClustalX.



• **Figura 5-2.** Comparación de las estructuras primaria y terciaria de dos proteínas homólogas, evolutivamente distantes.

Por un lado, la tioredoxina de *E. coli*, una enzima, que como ya hemos mencionado tiene actividad óxido-reductasa y puede reducir puentes disulfuro (catalizando la reacción $R_1-S-S-R_1 \rightarrow 2 R_1-SH$), por otro lado el dominio TRX de la chaperona *erp29*, que no tiene actividad óxido reductasa sino que interviene en el plegado de otras proteínas. Al comparar sus secuencias se observan grandes diferencias, entre ellas, los residuos del sitio activo de las tioredoxinas no están conservados en *erp29*. Al alinear las estructuras tridimensionales de ambas proteínas sin embargo, podemos ver que ambos plegados son superponibles. El alineamiento estructural fue realizado con el programa SwissPDBviewer. El alineamiento de estructuras primarias fue realizado con el programa ClustalX. (ver Figura 5-2)

Una pregunta muy importante que podemos hacernos es si dada una secuencia podemos, aunque más no sea, predecir qué estructura secundaria adoptaría. La respuesta es que, sí. Por lo general podemos.

En la actualidad existen numerosos métodos para hacerlo. Los más precisos utilizan simultáneamente varios tipos de información:

Cabe destacar que la conservación de un residuo particular puede volver más eficiente a una proteína desde un punto de vista funcional, pero simultáneamente puede desestabilizarla desde un punto de vista termodinámico-estructural

a. Puntual. Examina la tendencia de cada residuo en particular. De qué aminoácido se trata y cuál es la probabilidad de encontrarlo, formando parte de tal o cual elemento de estructura secundaria en las proteínas conocidas.

b. Local. Examina qué probabilidad hay de encontrarlo formando parte de tal o cual elemento dado su entorno inmediato, por ejemplo si está rodeado por residuos muy propensos a formar hélice o, por el contrario no lo está.

c. Evolutiva. Examinan en las secuencias homólogas disponibles en las bases de datos qué residuos ocupan esa posición y las vecinas.

Claramente, contar con una buena predicción de la estructura secundaria es un gran avance. Sin embargo,

¿Cómo interaccionan entre sí estos elementos de estructura secundaria, qué disposición adoptan en el espacio?

Si existe por lo menos una proteína homóloga con estructura tridimensional conocida podríamos montar nuestra secuencia sobre la estructura e intentar construir un modelo, aunque sea parcial, de la estructura de la proteína de interés.

Sin embargo tendremos un problema grave cuando no encontremos un homólogo que permitan construir un modelo confiable. En estos casos podemos recurrir a otro tipo de modelado. El modelado *ab initio* (desde el principio, aplicando primeros principios). Este tipo de modelado se basa en que gran parte de la información para la estructura 3D estaría localmente codificada. Esto quiere decir que cada pequeño fragmento de la proteína puede modelarse en base a bibliotecas de fragmentos existentes y, teniendo en cuenta predicciones de estructura secundaria, predicciones de accesibilidad a solvente, restricciones conformacionales, propias de las distintas cadenas laterales podríamos construir un modelo sin contar con la estructura de una proteína homóloga. Los resultados que se han obtenido son exitosos, sólo, parcialmente. Y se hace muy complicada la implementación de este tipo de metodología en forma rutinaria a pesar de que existen en la actualidad varios servidores funcionando. En definitiva todavía no es posible predecir la estructura de una proteína a partir de su secuencia si no contamos con un homólogo de estructura conocida.

Este tipo de estrategias suele utilizarse y se conocen en general con el nombre de modelado por homología.

Existen algunos problemas que complican aún más las cosas:

- a. Existen proteínas con secuencias muy diferentes (por debajo del límite de de tección de homólogos) de aminoácidos con estructuras tridimensionales prácticamente superponibles.
- b. Existen proteínas con secuencias muy similares pero que poseen estructuras muy diferentes.
- c. Existen proteínas naturalmente desestructuradas.

Este último punto es sumamente importante porque, en la actualidad, se piensa que numerosas familias de proteínas podrían caer en este rango de la clasificación. La caracterización estructural de este tipo de macromoléculas es sumamente compleja, justamente, por la presencia del alto grado de desorden interno que poseen y las dificultades que esto trae aparejado en relación a los requerimientos que una proteína debe cumplir para poder hacer cristalografía de rayos X y NMR. En este caso estamos frente a un nuevo desafío:

¿Cómo estudiar proteínas desorganizadas?

Encontrar el código para el plegado parece ser una tarea complicada, sin embargo, la información requerida para que cada una de estas macromoléculas adopte una conformación tridimensional específica está contenida en la secuencia de aminoácidos.

La función biológica en realidad, depende no sólo de una proteína sino de una intrincada red de miles de proteínas que deben plegarse correctamente. Por lo general las proteínas adquieren la estructura correcta. Sin embargo existe una gran variedad de enfermedades que se caracterizan por la presencia de defectos de plegado; en una parte importante de los casos, estos desórdenes resultan de la acumulación de proteínas en forma de depósitos en los tejidos como consecuencia de la agregación proteica aparentemente irreversible.

Estos procesos son, en su conjunto, enormemente tóxicos para el organismo e inductores de procesos de muerte celular.

La conformación incorrectamente plegada, usualmente, contiene láminas β organizadas en un arreglo multimérico que tienden, naturalmente, a asociarse y estabilizarse mediante interacciones intermoleculares.

Existen mutaciones en los genes que codifican a estas proteínas que producen formas he-

Podríamos citar numerosos avances realizados por grupos de investigación distribuidos por todo el mundo. Se piensa que el código no es secuencial, sino que es espacial, y muchas pruebas indican que no toda la secuencia es esencial para el plegado. Encontrar el código de plegado no es un mero capricho.

Algunas de las enfermedades de tipo conformacional más conocidas y estudiadas a nivel molecular son las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, la enfermedad de Huntington, las encefalopatías espongiformes transmisibles, la anemia hemolítica, la fibrosis quística y la diabetes de tipo II.

Aunque cada una de estas enfermedades es causada por defectos conformacionales asociados a una proteína distinta con una secuencia de aminoácidos particular, todas estas proteínas tienen un aspecto común: puede adoptar por lo menos dos conformaciones.

reditarias y muy graves de estas enfermedades. Por otro lado, en el caso particular de las encefalopatías espongiformes transmisibles pudo demostrarse que la enfermedad puede transmitirse a través de mecanismos de cambio conformacional y agregación que involucran agentes proteicos infectivos capaces de modular la conformación de proteínas propias del organismo que es infectado.

Hasta hace unos pocos años era impensado que una proteína pudiera estar involucrada como único agente infeccioso en procesos infectivos. Ahora comenzamos a conocer partes de un mecanismo, sumamente, intrigante en el que, efectivamente, el agente infeccioso es una proteína incorrectamente plegada. Las encefalopatías espongiformes afectan tanto a animales como a humanos y se caracterizan por producir muerte neuronal (por lo que se las llaman enfermedades neurodegenerativas) y acumulación de una proteína llamada prion (PrP) incorrectamente plegada llamada PrP_{sc} en el sistema nervioso central.

Aunque el mecanismo preciso a nivel molecular de conversión de PrP_c a PrP_{sc}, la conformación correcta en la conformación PrP_{sc} no se conoce, las evidencias indican que PrP_{sc} es un oligómero que actúa como semilla para unir a la PrP_c y catalizar el cambio conformacional a la forma incorrectamente plegada mediante la incorporación al multímero creciente (**Figura 5-3**).

En esta breve lista se enumeran las evidencias que avalan la hipótesis del cambio conformacional de la proteína prion.

En la actualidad se piensa que muchas proteínas tienen la capacidad de funcionar como priones y que, como se mencionó, las formas infectivas difieren de las no infectivas, únicamente, en su estructura tridimensional. Sin embargo hasta, recientemente, no disponíamos de estructuras del estado de fibra que, como también se mencionó, muy probablemente sea infeccioso. Por técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR) a fines del año 2008 se estudió un dominio de la proteína HET-S que posee propiedades de prion y se obtuvieron las primeras estructuras de este tipo de conformaciones (Christian Wasmer y colaboradores **Science 14 March 2008: Vol. 319. no. 5869, pp. 1523 – 1526**). Los resultados de estos experimentos muestran la existencia de un alto contenido de estructura β y a las subunidades dispuestas en forma de solenoide. En este caso el modelo experimental permite inferir cómo interaccionan las subunidades entre sí para formar estructuras con forma de fibrilla (**ver Figura 5-4**).

Estas enfermedades, en su origen raras, han ganado popularidad con la emergencia en Europa (Inglaterra) de la nueva variante de la enfermedad Creutzfeldt–Jacob causada por el consumo de carne infectada proveniente de animales con encefalopatía espongiforme bovina. La naturaleza proteica del agente infeccioso y el mecanismo de propagación fueron descubiertos por el Profesor de Neurología y Bioquímica de la Universidad de California, San Francisco Stanley B. Prusiner; estos descubrimientos le valieron en 1997 el Premio Nobel Medicina. Actualmente, todas las evidencias sugieren el extraordinario concepto de que la proteína incorrectamente plegada PrP_{sc} es el único componente necesario productor de la infección.

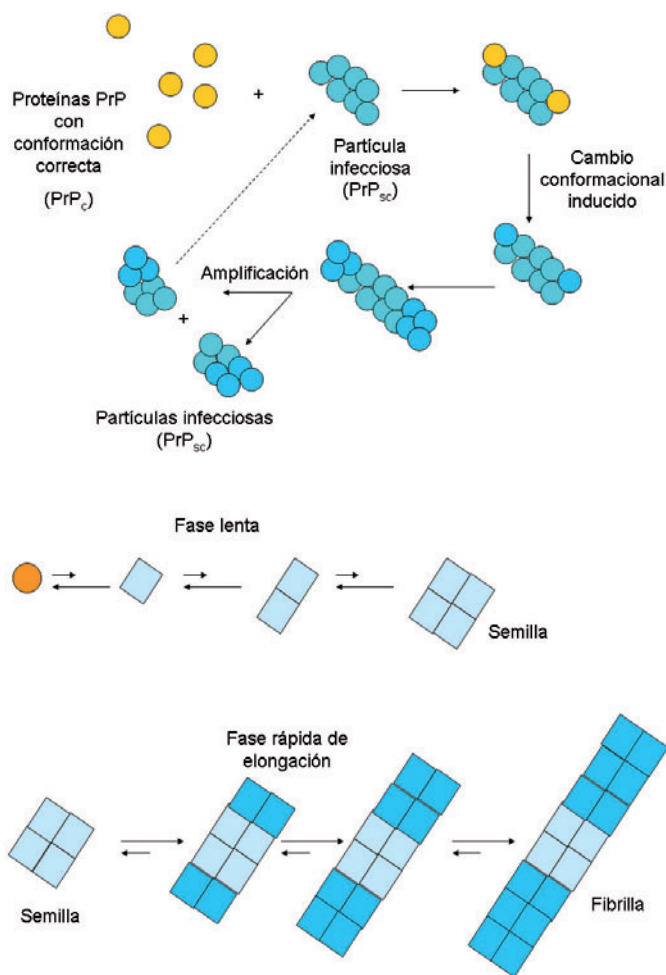


Figura 5-3. Esquema del mecanismo de replicación del prion infeccioso (panel superior) y modelo de semilla para la formación de fibrillas (panel inferior).

La formación de las semillas es lenta porque requeriría un cambio conformacional relativamente poco probable. Sin embargo, una vez generadas, estas semillas actúan como núcleo para una posterior y rápida conversión a la forma PrP_{sc} de las moléculas. (ver Figura 5-3)

Estas evidencias han sido citadas en una excelente revisión realizada recientemente por Claudio Soto y colaboradores (TRENDS in Biochemical Sciences Vol.31 N° 3 marzo de 2006):

(I) El agente infeccioso no es afectado por procedimientos que normalmente destruyen a los ácidos nucleicos

Alper, T. et al. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? Nature 214, 764–766

(II) El material infeccioso es muy pequeño para ser un microorganismo convencional.

Alper, T. et al. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 278–284

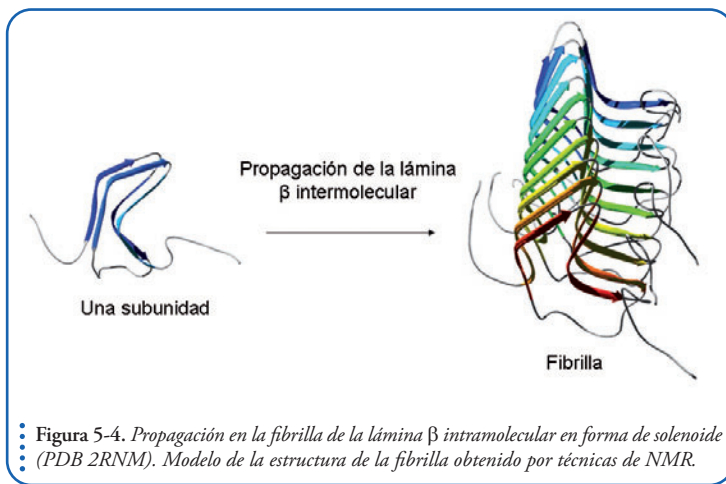
Silveira, J.R. et al. (2005) The most infectious prion protein particles. Nature 437, 257–261

(III) No se ha podido asociar partículas virales con el agente infeccioso

Safar, J.G. et al. (2005) Search for a prion-specific nucleic Acid. J. Virol. 79, 10796–10806

(IV) Preparaciones de proteína PrP_{sc} altamente purificada transmiten la enfermedad

Prusiner, S.B. et al. (1984) Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. Cell 38, 127–134



Desgraciadamente, en la actualidad, no podemos decir que contamos con las soluciones y curas para estas y tantas otras enfermedades, sin embargo, el estudio estructural muy probablemente, permitirá comprender las bases moleculares de los mecanismos de cambio conformacional y tal vez, con suerte la elaboración de soluciones.

(V) La infectividad es proporcional a la concentración de la proteína PrP^{Sc}.

Gabizon, R. et al. (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6617–6621

(VI) Procedimientos de desnaturalización agresiva de PrP^{Sc} reducen o eliminan la infectividad.

Prusiner, S.B. et al. (1993) Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2793–2797

(VII) Los ratones modificados genéticamente de tal forma que se les elimina el gen propio de PrP^C no son susceptibles a la infección.

Bueler, H. et al. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339–1347

(VIII) En todos los casos en los que la enfermedad es hereditaria existen mutaciones del gen PrP

Prusiner, S.B. (1998) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13363–13383

(IX) PrP^{Sc} puede inducir el cambio conformacional de PrP^C in-vitro en forma autocatalítica.

Saborio, G.P. et al. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810–813