



Plegamiento de proteínas: Aspecto fisiológicos y patológicos

[¹]Dr. Retamal, Patricio, M.V; [²]Andrade Orlando, Alex, M.V.

AUTOR(ES)

[¹]Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile,

[²]Escuela de Postgrado y Postítulo, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de Chile

CORRESPONDENCIA

[¹]Casilla 2 - Correo 15, Santiago, Chile, E-mail: pretamal @ uchile.cl,

[²]56 - 2 - 6785570, E-mail: aandrade @ uchile.cl

CITA

Retamal, Patricio, Dr., Andrade Orlando, Alex, Plegamiento de proteínas: Aspecto fisiológicos y patológicos. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol.21(2), diciembre 2001.

[Introducción]

El plegamiento de las proteínas constituye una de las áreas con grandes perspectivas en la investigación bioquímica, ya que parece ser la base de importantes enfermedades neurodegenerativas en seres humanos y animales, que se han denominado en conjunto como Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs). Tales patologías comparten las siguientes características:

- a.) Un período de incubación prolongado de meses o años.
- b.) Una enfermedad neurológica progresiva y debilitante que siempre es fatal.
- c.) Al examen microscópico, los extractos de tejido cerebral revelan la presencia de fibrillas;
- d.) Los cambios patológicos parecen estar confinados al SNC.

Entre las que afectan al humano se encuentran cinco enfermedades raras: el Kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (ECJ), el síndrome de Gertsman-Stráussler-Scheinker, el insomnio familiar fatal (IFF) y una variante nueva de la enfermedad de CreutzfeldtJacob (nvCJ). En los animales los tipos específicos de EETs incluyen al Scrapie, el cual afecta a los borregos y cabras; la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) que afecta a los bovinos, la Encefalopatía Transmisible del Visón; la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) y la enfermedad debilitante crónica del ciervo y el venado.

Estas patologías, y especialmente EEB, han afectado fuertemente las relaciones comerciales a nivel internacional y constituyen en la actualidad todo un desafío para los servicios sanitarios oficiales en la búsqueda de procedimientos efectivos para su prevención, control y erradicación . Esta revisión aborda la fisiología del plegamiento proteico, para

luego dar paso a un análisis general de los mecanismos moleculares que explican el desarrollo de las encefalopatías espongiiformes más importantes del ser humano y de los animales.

[Fisiología]

El plegamiento de proteínas no es una búsqueda aleatoria de todas las conformaciones posibles, sino que se lleva a cabo mediante la estabilización progresiva de intermediarios correctos, que se van formando por etapas sucesivas y rápidas. Dentro de este proceso, también se forman intermediarios incorrectos, que no llevan a la formación de la proteína nativa (madura), sino que quedan en un estado denominado "trampa cinética".

Existen tres modelos que se han propuesto para explicar el proceso de plegamiento en las proteínas:

* **Nucleación:** en este caso existirían lugares específicos de la cadena polipeptídica que adquieren un estado avanzado de plegamiento, y que actúan como centros de estructuración para el resto de la cadena, formando una especie de núcleos o semillas de plegamiento.

* **Colapso hidrofóbico:** en esta situación, los dominios o sectores hidrofóbicos de la cadena se plegarían primero, en forma bastante densa o «empaquetada», y luego se plegarían las estructuras secundarias hidrofílicas.

* **Estructuración:** es un modelo semejante al anterior, pero en este caso los dominios hidrofóbicos se pliegan después que los hidrofílicas.

En muchas proteínas, generalmente de tamaño pequeño, durante el proceso de plegamiento solo se observan 2 estados conformacionales: plegado o nativo (N) y desnaturalizado o desplegado (U), los que se encuentran en un rápido equilibrio. En otras proteínas de mayor tamaño, es posible apreciar un estado intermediario denominado glóbulo fundido (M), que contiene la estructura secundaria nativa pero sin las interacciones que determinan la conformación terciaria. Por lo tanto sus características principales son:

- menos compacto que la estructura nativa
- mas compacto que la estructura desplegada
- con gran cantidad de estructura secundaria
- con cadenas laterales desplegadas

Este glóbulo se forma por la fuerza de unión entre grupos hidrofóbicos, quienes llevan a cabo el agrupamiento mediante el llamado colapso hidrofóbico, y por la formación de estructuras secundarias estables.

La formación de α -hélices y hojas β es la clave del proceso de plegamiento. Al respecto, se debe mencionar que la cadena polipeptídica tiene 2 grados de rotación definidos:

- * ϕ (ϕ): alrededor del enlace entre el nitrógeno y el carbono (de la cadena principal.
- * ψ (ψ): entre el carbono (y el carbono del grupo carbonilo.

La conformación de la cadena principal queda definida cuando se determina el valor de ψ y ϕ para cada uno de los residuos de la cadena. Algunas conformaciones no pueden

existir debido a impedimentos estéricos. Los aminoácidos tienen tendencia a formar distintas conformaciones secundarias, por lo que su presencia en la cadena determina también la forma de la estructura secundaria que predominará. Sin embargo y como ocurre en muchos casos, es el contexto en que se encuentran esos aminoácidos el que será decisivo a la hora de determinar la conformación final.

Sin embargo, existen lugares dentro de la proteína que adquieren conformaciones plegadas de manera mas o menos independiente respecto del resto de la cadena, por lo cual se les ha denominado unidades de plegamiento autónomo. Estas unidades quedan determinadas por las interacciones de los aminoácidos que la conforman.

A medida que avanza el plegamiento, las estructuras secundarias comienzan a interactuar entre sí, formando las denominadas estructuras supersecundarias y marcando tendencias o patrones de plegamiento en la proteína. Este plegamiento es llevado a cabo y está dirigido por las mismas interacciones que estabilizan la estructura nativa final.

El ambiente intracelular ofrece una gran cantidad de posibles interacciones entre las distintas moléculas que allí se encuentran, por lo que la célula ha debido establecer mecanismos que aseguren el plegamiento completo, rápido y funcional de las proteínas sin que desarrollen enlaces o interacciones indeseadas en el proceso. Es así como existen proteínas que facilitan y aceleran el plegamiento correcto de otras proteínas, como es el caso de la isomerasa de puentes disulfuro (PDI) y las chaperonas. Uno de los elementos mas importantes a considerar, es que las proteínas son muy poco estables, es decir, la diferencia de energía libre entre los estados plegado y desnaturalizado de una proteína de 100 residuos es de 10 Kcal/mol. Esta inestabilidad se ha explicado de la siguiente manera:

- Las proteínas se caracterizan por interactuar con muchas otras moléculas, donde además están sometidas a cambios conformacionales que les permiten llevar a cabo todas sus funciones de manera eficaz. Si tuvieran una estructura muy estable, las proteínas verían dificultada su posibilidad de llevar a cabo estas modificaciones, o bien, las harían a costa de un gran gasto energético.

- Durante el plegamiento se generan intermediarios incorrectos que son más estables que sus precursores. Sin embargo, debido a que la diferencia termodinámica es pequeña, se facilita la corrección o eliminación de estas estructuras.

- Las proteínas una vez sintetizadas son llevadas a sus puntos de destino, para lo cual muchas de ellas deben atravesar por distintas membranas celulares. Por lo tanto, deben ser fácilmente modificadas a una conformación que les permita junto a otros mediadores ser transportadas por esas estructuras.

- Las proteínas una vez cumplida su función deben ser fácilmente eliminadas, por lo que su inestabilidad permite a la célula llevar a cabo estos mecanismos degradativos.

Otra situación que llama la atención a los científicos es la similaridad de estructuras nativas de distintas proteínas cuyas secuencias primarias son completamente diferentes. El proceso de plegamiento en estos casos se basa más en la importancia relativa y en la distribución de dominios hidrofóbicos e hidrofílicos que en las secuencias de aminoácidos de ellas.

[Patología]

Las EETs corresponden a una serie de patologías cuya causa primaria es un defecto en el plegamiento de proteínas específicas. Cada una de estas enfermedades se asocia a un tipo particular de proteína, pero todas ellas desarrollan un plegamiento patológico

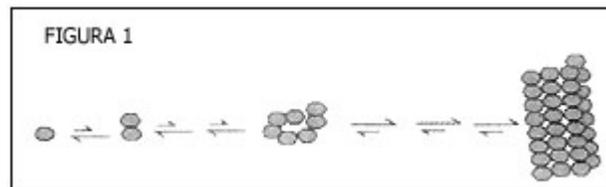
que tiene características comunes.

El eslabón inicial de la enfermedad lo constituye una proteína normal y soluble, ya sea en su conformación primaria o terciaria (funcional), que es sometida a una denaturación parcial con la aparición de un estado intermediario de plegamiento. Aparentemente, el punto clave del proceso patológico se encuentra a este nivel, donde la cadena aminoacídica es capaz de interactuar con otras moléculas intermediarias de otras proteínas del mismo tipo y conformar de esta manera una estructura fibrilar de características insolubles.

Forma soluble intermediario de plegamiento que expone cadena de aminoácidos interacción con otros intermediarios en estado similar forma fibrilar insoluble.

Esta forma fibrilar es capaz de agregarse con otras del mismo tipo, para comenzar a formar los denominados amiloides o placas amiloidóticas al interior de la célula en un principio, y posteriormente en el extracelular en distintos órganos del cuerpo.

Las primeras agregaciones insolubles actúan como núcleos o semillas de depósito, que favorecen la formación de otras estructuras similares y aceleran la progresión de la enfermedad (Figura 1).

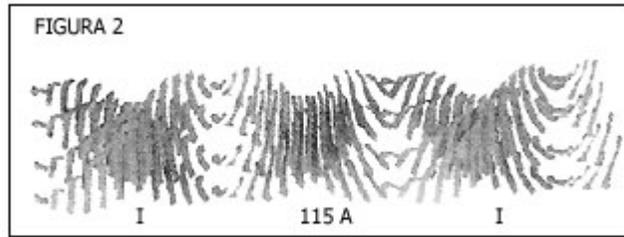


Aparentemente la etapa limitante del proceso es la formación de esos núcleos, ya que normalmente la agregación de intermediarios proteicos se da por enlaces e interacciones altamente desfavorecidas ya sea por la repulsión misma de las moléculas como por la acción de otras proteínas chaperonas. Sin embargo, los núcleos ya constituidos sobrepasan estas barreras y determinan la agudización del cuadro.

Otro hallazgo interesante corresponde a la estructura misma de los amiloides: se diseñó un experimento con el precursor soluble del prión humano, el cual fue sometido a una denaturación suave por la reducción de sus puentes disulfuro. Esta denaturación permite la formación de un intermediario de su plegamiento. Lo sorprendente, es que la forma nativa está constituida en su mayoría por ahélices, pero su intermediario se conforma básicamente por hojas- β . Posteriormente se elimina el reductor de puentes disulfuro, y la proteína adquiere su plegamiento patológico, constituido básicamente por hojas- β .

Experimentos subsecuentes intentaron determinar si otras proteínas, a parte de aquellas vinculadas con las enfermedades mencionadas, eran capaces de generar agregaciones fibrilares bajo algunas condiciones denaturantes predisponentes. El resultado fue sorprendente, ya que prácticamente todas las proteínas estudiadas llegaban a desarrollar plegamientos afuncionales e insolubles, similares a los encontrados anteriormente. Se sostuvo entonces la hipótesis experimental de que el amiloide puede ser un estado común de todas las proteínas.

Se determinó asimismo la estructura de estos agregados, llegándose a concluir en todos los tipos las siguientes características comunes (Figura 2):



- * Ellos corresponden a protofilamentos con segmentos específicos de hojas- β .
- * Con arreglo helicoidal.
- * Con puentes de hidrógeno entre las cadenas y paralelos al eje de la fibra, entregándole gran estabilidad a la estructura.

En condiciones fisiológicas, estos filamentos resultan indestructibles.

La célula ha creado mecanismos defensivos que la protegen de estas formas patológicas, ya que normalmente se están creando durante los procesos de plegamiento de las distintas proteínas.

Los mecanismos protectivos más importantes son:

- a)** Selección de secuencias que se pliegan en forma globular, ocultando rápidamente la cadena peptídica y los residuos hidrofóbicos.
- b)** Cooperatividad durante el plegamiento. Esto significa que las mismas unidades o dominios de plegamiento de una proteína adoptan conformaciones que tienden a ocultar y proteger la cadena peptídica, cooperando con interacciones intramoleculares en la tarea del plegamiento general.
- c)** Esta cooperatividad dentro de la molécula, se complementa con el ambiente intracelular que normalmente está controlado a un pH y T° ideales para un plegamiento correcto. Además, las chaperonas y diversos mecanismos degradativos refuerzan la protección de la célula sobre las conformaciones proteicas patológicas.

Entre los factores predisponentes se pueden mencionar:

- * Disminución del pH a nivel de endosomas y/o lisosomas, lo que genera condiciones reductoras de los puentes disulfuro.
- * Mutaciones que pueden desestabilizar la estructura nativa.
- * Generación de fragmentos peptídicos por mecanismos de degradación parcial, que pueden ser potenciales sustratos de un plegamiento patológico.

Con toda esta información se ha llegado a sostener que el fin evolutivo de la rapidez en el proceso de plegamiento en las proteínas no solo se basa en el desarrollo de gran eficiencia en su desempeño, sino que también permite evitar la formación de agregaciones amiloides insolubles.

[Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)]

En la actualidad se está investigando con gran interés al prión causante de la EEB, catalogada como una enfermedad emergente de gran impacto en el comercio internacional de productos y subproductos de origen animal.

El mecanismo exacto por el cual la proteína prión normal (PrP^c) se convertiría en su forma patológica (PrP^{EEB}) es aún desconocido. Existen varias teorías que intentan explicar este fenómeno.

Teoría del dúo mortal o de la proteína sola

Es la teoría más aceptada, y fue propuesta por Prusiner en 1982. Parte del supuesto que las diferencias entre PrP^{EEB} y PrP^c no se deben a diferencias de estructura primaria entre ambas proteínas. Tanto la PrP^c como la PrP^{EEB} existen como moléculas aisladas (monómeros) o como asociaciones de dos moléculas (dímeros) en estado de equilibrio. En los dímeros formados por una PrP^c y una PrP^{EEB} , ésta última catalizaría la conversión de la PrP^c en PrP^{EEB} . A medida que ello se repite, aumentaría exponencialmente la proporción de PrP^{EEB} , de modo análogo a como crece por división una agente infeccioso convencional. La PrP^{EEB} se formaría en vesículas intracelulares llamadas lisosomas, donde se incorpora el material fagocitado por la célula. El medio ácido característico de estas vesículas favorece la conversión del PrP^c a PrP^{EEB} . Cuando se alcanzan suficientes concentraciones de PrP^{EEB} en el interior del lisosoma, éste se rompe y libera al medio PrP^{EEB} y enzimas hidrolíticas. Como consecuencia la neurona degenera y muere y la PrP^{EEB} puede ser captada por otra neurona en la que se reanuda el ciclo.

Teoría cristalina

Una hipótesis alternativa para comprender la propagación de la PrP se basa en que su forma anormal constituye estructuras cristalinas. Después de sintetizada la PrP se glicosila (es decir se asocia con azúcares) y posteriormente se une con la membrana celular mediante la molécula llamada GPI (glicosilfosfoinositol). La PrP es muy poco soluble en agua y, en cualquier de las etapas posteriores a sus síntesis, la forma anormal podría formar un cristal PrP infeccioso, por el ordenamiento de las moléculas de PrP^{EEB} . Uno de los sustentos de esta hipótesis es que, en el cerebro de animales y humanos enfermos, se observan depósitos de placas amiloideas constituidas por PrP en estado cristalino, cuya forma es resistente a la degradación enzimática. El cristal puede romperse y sus fragmentos también pueden crecer por acoplamiento de moléculas idénticas. La teoría cristalina explica la multiplicación de la PrP^{EEB} en ausencia de ácido nucleicos y define una manera de dispersión de la infección, por el traslado de fragmentos de cristales rotos.

Teoría unificada

El holoprión que tiene PrP^{EEB} (apoprión) y ácido nucleico (coprión) invade la célula y la PrP^c se convierte en PrP^{EEB} por un proceso que media la PrP^{EEB} del holoprión. El ácido nucleico podría ser replicado por polimerasas celulares que requieren de la presencia de PrP^{EEB} . Alternativamente, luego de que el apoprión entra en la célula, podría asociarse con algún ácido nucleico, que sería replicado. El apoprión estaría constituido por ácido nucleico, que podría acompañar a la PrP^{EEB} (lo que nunca ha sido demostrado) o, por el contrario, ser un componente normal de la células no infectadas, reclutado por el apoprión y, posteriormente, replicado por enzimas celulares mediante un proceso estimulado por la presencia de PrP^{EEB} . Si el ácido nucleico del coprión fuera ARN, su multiplicación podría seguir un proceso parecido al del virus de la Hepatitis. En tal caso, la PrP^{EEB} sería indispensable para la replicación del ARN por enzimas celulares, como sucede con la replicación del ARN del virus de la hepatitis, que requiere de la presencia del antígeno 8. Dado que la enzima responsable de ello (la ARN polimerasa dependiente del ADN) solo puede multiplicar a ciertos tipos de ARN, se seleccionarían y amplificarían únicamente determinados ARN del coprión. Así se

comprendería la existencia de distintas cepas del agente patógeno, pues el pasaje de holopriones por diferentes hospedadores ocasionaría el cambio de los copriones.

[Conclusión]

Alteraciones en el proceso de plegamiento proteico de algunas proteínas celulares han determinado la aparición de moléculas indestructibles para los sistemas de control y degradación de las mismas células. Además, tienen la capacidad de transmitirse a otros animales susceptibles y reproducir en ellos los mismos fenómenos descritos en su formación. Son proteínas capaces de actuar como agentes infecciosos y transformarse en enfermedades de interés y preocupación mundial, que tienen implicancias en la salud de diversas especies animales incluyendo al ser humano. Por tales motivos, es un gran desafío y una gran necesidad el fortalecer y promover la investigación molecular del proceso de plegamiento proteico, ya que el mejor entendimiento de la formación de amiloides fibrilares y sus causas, resultará en el conocimiento de la patogenia de las EETs y de las opciones para su prevención, control, diagnóstico y tratamiento.

[Bibliografía seleccionada]

ALBERTS, B; D. BRAY; J. LEWIS; M. RAFF; K. ROBERTS; J.D. WATSON. (1994). Protein Structure. En: **Molecular biology of the cell. 3d Edition, p 111-128.**

COHEN, F.; S. PRUSINER. (1998). Pathologic conformations of prión proteins. **Annu. Rev. Biochem. 67, 793-819.**

DETWILER, L.; R. RUBENSTEIN; E. WILLIAMS. (2000). Transmissible Spongiform Encephalopathies. En: **Emerging Diseases of Animals. Edited by C. Brown and C. Bolin. ASM Press, Washington, D.C., USA, p 131-159.**

DOBSON, C. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. **Trends Biochem. Sci. 24, 329-332.**

HARPER, J.; P. LANSBURY (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and Scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the timedependent solubility of amyloid proteins. **Annu. Rev. Biochem. 66, 385-407.**

HARRIS, A. (1999). Cellular Biology of Prión Diseases, American Society for Microbiology, **Clinical Microbiolgy Review, 429-444.**

KIMBERLIN, R. (1990). Unconventional "slow- viruses. En: **Topley and Wilson Principles of Bacteriology, Virology and Inmunity, 8th Edition, 4ª, 671-693.**

LEVITT, M.; M. GERSTEIN; E. HUANG; S. SUBBIAH; J. TSAI. (1997). Protein folding: the endgame. **Annu. Rev. Biochem. 66, 549-579.**

STRYER, L. (1995). Plegamiento y diseño de proteínas. en: **Bioquímica. 4a edición, p417-440.**

WELLS, G; S. HAWKINS; W. HADLOW; Y SPENCER. 1992. The discovery of BSE and observations on the vacuolar changes. **Prión diseases of human and animals, Prusiner, Collinge, Powell y Anderton (eds) Ellis Horwood Publishers. England, p256-274.**

WELLS, G; J. WILESMITH. 1991. BSE: a neurological perspective, **Brain Pathology. 1,p68-78.**

© Sitio desarrollado por SISIB :: UNIVERSIDAD DE CHILE, 2004