

Determinantes estructurales de la oligomerización en proteínas

Alejandra Hernández Santoyo*

Resumen

Una gran cantidad de las proteínas presentes en la naturaleza se encuentran en forma oligomérica o requieren cambiar su estado de oligomerización para cumplir con una función determinada. Este proceso de asociación puede provocar un efecto positivo o negativo en las propiedades de las proteínas. Por un lado, puede regular su función, favorecer su estabilidad y actividad y, por el otro, puede generar proteínas no funcionales y la formación de depósitos en fibras, dando lugar a un gran número de enfermedades degenerativas como Alzheimer, Creutzfeld-Jacob, Parkinson, Huntington, amiloidosis sistémica, diabetes de tipo II, esclerosis lateral amiotrófica y angiopatía cerebral, entre otras. El conocimiento de cómo ocurre este tipo de interacción proteína-proteína nos puede ayudar a encontrar procedimientos que permitan inhibir dicha oligomerización, ya sea mediante modificaciones químicas, mutaciones o por medio de la búsqueda de fármacos o anticuerpos monoclonales específicos que inhiban dicho efecto. Además, inducir este tipo de asociaciones puede generar proteínas muy activas, estables bajo condiciones extremas, o con una mayor especificidad, aspectos importantes para su aplicación biotecnológica. Es muy poco lo que se conoce sobre los mecanismos de oligomerización de proteínas debido a que cada proteína se comporta diferente. Una técnica muy valiosa en el estudio de estos mecanismos a un nivel molecular lo constituye la cristalografía de macromoléculas, en donde a partir de datos de difracción de rayos X es posible obtener la estructura 3D de una proteína. La técnica tiene la ventaja de que podemos analizar oligómeros de gran tamaño.

Introducción

Las proteínas en los sistemas biológicos raramente actúan en forma aislada, por lo que se unen a otras biomoléculas para dar las respuestas celulares específicas. Estas biomoléculas son a menudo otras proteínas, y un número sorprendente de estas asociaciones proteína-proteína intervienen en diversas reacciones en cascada que afectan todos los procesos en una célula. Las proteínas oligoméricas abundan en la naturaleza. Están compuestas por múltiples cadenas polipeptídicas, las cuales pueden ser iguales (proteínas homo oligoméricas) o diferentes (proteínas hetero

oligoméricas). Estudios recientes, estiman que aproximadamente 35% de las proteínas en una célula son oligoméricas, siendo el estado oligomérico promedio el tetramérico [1, 2].

La asociación de proteínas consigo mismas para formar dímeros y oligómeros de orden superior es un fenómeno muy común y puede conferir ventajas estructurales y funcionales a las mismas, incluyendo el aumento en la actividad y estabilidad, el control de la accesibilidad y especificidad de sitios activos. Sin embargo, el aspecto negativo de este proceso ocurre cuando se pierde la actividad y se forman fibras amiloides dando lugar a un gran número de enfermedades degenerativas [3-6]. Se sabe que este tipo de fenómenos puede ocurrir mediante cambios conformacionales muy sutiles que pueden dar lugar a efectos a larga distancia favoreciendo las interacciones β - β originando la formación de fibras amiloides, tal es el caso de la inmunoglobulina 6aJL2 (Figura 1) [7], que es la proteína responsable de la amiloidosis sistémica de cadena ligera. Sin embargo, el cambio conformacional puede ser más drástico creando un fenómeno que se conoce como intercambio de dominios (3D domain Swapping), en donde justamente se intercambia un dominio estructural de un monómero de una proteína con un dominio idéntico de otro monómero, resultando en un oligómero donde cada subunidad contiene los mismos motivos estructurales que el monómero antes del intercambio de los dominios. Se ha sugerido que este mecanismo puede dar lugar a la formación de fibras amiloides [8-10]. Una de las diversas proteínas que presentan este comportamiento es la cistatina C humana. Las propiedades amiloidogénicas de esta proteína se incrementan fuertemente en presencia de la mutante natural L68Q resultando en la enfermedad conocida como angiopatía cerebral amiloide, fatal, que se presenta en adultos jóvenes (Figura 2). Otro mecanismo de oligomerización se observa en la superóxido dismutasa de *Taenia solium* (Figura 3), donde la asociación de los monómeros de la proteína está mediado por la coordinación de iones zinc [11]. En el presente estudio se presentan avances en la investigación de los mecanismos de oligomerización de proteínas.

* Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior, Ciudad Universitaria. Coyoacán 04510 México, D.F. hersan@unam.mx

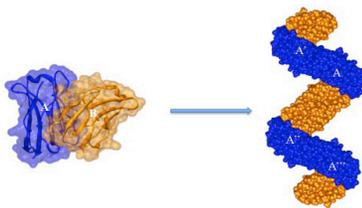


Figura 1. Análisis estructural de la oligomerización de 6aJL2. Se presentan las moléculas relacionadas por simetría que permiten inferir cómo se formaría una fibra amiloide (código PDB 3BDX).

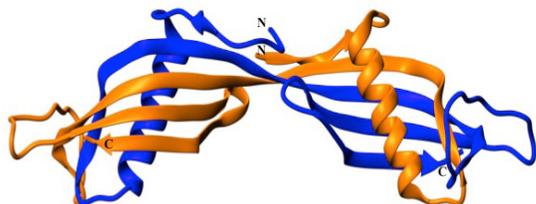


Figura 2. Oligomerización de la cistatina C humana mediante intercambio de dominios. La estructura contiene los elementos de estructura secundaria correctos, pero formados por más de una cadena (código PDB 1TIJ).

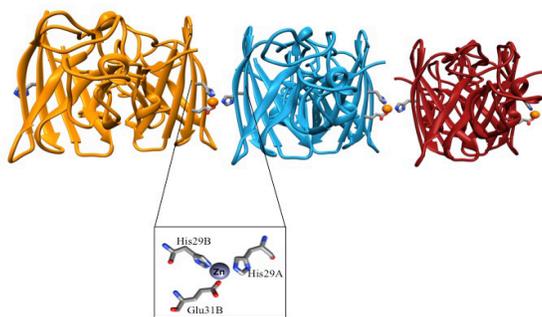


Figura 3. Oligomerización de la superóxido dismutasa de *Taenia solium* mediante la coordinación de iones zinc. Este mecanismo se pudo observar mediante el análisis de las moléculas relacionadas por simetría (código PDB 3MND).

Materiales y métodos

Se seleccionaron proteínas de diferentes fuentes que tienen en común la presencia de fuertes fenómenos de oligomerización. La purificación se realizó utilizando técnicas cromatográficas apropiadas para cada proteína que incluyen cromatografías de afinidad, intercambio iónico y exclusión molecular. El análisis del estado oligomérico se realizó utilizando dispersión dinámica de luz. Para el análisis filtraron las muestras con filtros de 0.22 μm y se utilizó una concentración de proteína de 1 mg/mL. Las proteínas se cristalizaron utilizando la técnica de difusión de vapor en gota colgante [12]. Los datos obtenidos por difracción de rayos X se procesaron con el programa XDS [13] y se escalaron con SCALA [14]. La estructura 3D se determinó por reemplazo molecular y se afinó utilizando el programa PHENIX [15].

Resultados

Se observó que cada proteína presenta un comportamiento diferente cuando se le modifica su estado oligomérico. En el caso de una celulasa purificada del molusco marino *Megathura crenulata* observamos que su actividad se incrementa notablemente cuando forma hexámeros (Figura 4). Por otro lado, la alginasa purificada del mismo organismo presentó un comportamiento similar, sólo que la forma más activa fue el octámero (Figura 5). Además, fue interesante notar que la misma oligomerización favorece la estabilidad térmica de la proteína manteniendo su actividad aun después de incubar por una hora a ebullición. Este comportamiento puede ser el resultado de la asociación de los monómeros de la proteína, que protegen zonas lábiles. A la fecha se está intentando la cristalización de estas proteínas para analizar con mayor detalle estos procesos y poder explicar su comportamiento.

Por otro lado, la lisozima del camarón *Litopenaeus vannamei* se purificó y cristalizó por difusión de vapor en gota colgante. Se observó que es una proteína con una fuerte tendencia a oligomerizar. Al analizar la estructura cristalina observamos que el extremo carboxilo terminal está formado por aminoácidos hidrofóbicos que favorecen la interacción con la misma zona de otros monómeros formando oligómeros que favorecen la formación de un poro que permite que esta lisozima sea capaz de hidrolizar la pared celular de bacterias tanto Gram (+) como (-) (Figura 6).

Finalmente se analizó el efecto de una mutación en la interfase del dímero de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*. Esta proteína, vital para la vida, es funcional únicamente en la forma dimérica. Al desestabilizar la interfase, la proteína formó un hexámero de dímeros, perdiendo su actividad y estabilidad, lo que provocó que se agregara y precipitara en periodos de tiempo muy cortos (Figura 7). Es importante señalar que es algo interesante ya que se están tratando de diseñar fármacos contra este tipo de parásitos y este resultado resalta la importancia del aminoácido 104 en la estabilidad de la proteína de este organismo.

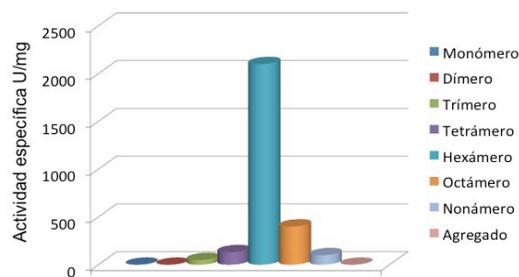


Figura 4. Actividad de una celulasa de *Megathura crenulata* en diferentes estados oligoméricos.

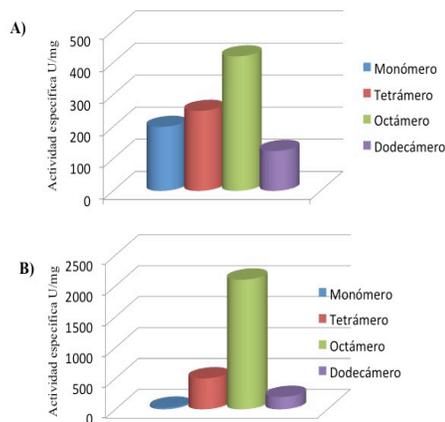


Figura 5. Actividad de una alginasa del molusco *Megathura crenulata*. (A) En diferentes estados oligoméricos. (B) Después de incubar cada oligómero por una hora a ebullición.

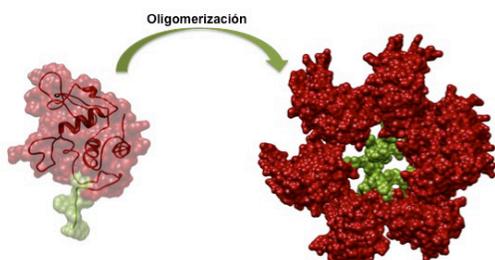


Figura 6. Lisozima de *Litopenaeus vannamei*. Se observa que la oligomerización ocurre por la interacción del extremo carboxilo terminal, que es de naturaleza hidrofóbica.

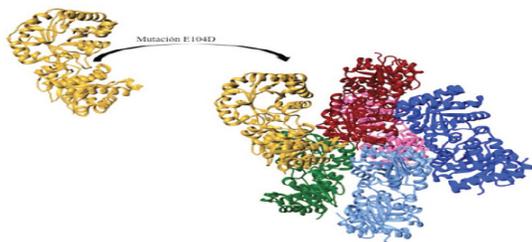


Figura 7. Oligomerización de una trifosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* inducida por la mutación E104D (4JEQ).

Conclusiones

La difracción de rayos X es una técnica que nos permite analizar a un nivel atómico los procesos de asociación de las proteínas. Cada proteína utiliza mecanismos diferentes para formar oligómeros.

La oligomerización puede conferir efectos positivos en las propiedades de las proteínas, como el aumento en su actividad y estabilidad; sin embargo, también puede dar lugar a moléculas inactivas.

Agradecimientos

Agradezco a la DGAPA-UNAM el apoyo económico IN207013 y al CONACyT el apoyo con el proyecto I66472. Agradezco además al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas del Instituto de Química de la UNAM por su apoyo en la colecta de datos de difracción de rayos X.

Referencias

1. Ali, M.H., and Imperiali, B. 2005. *Bioorg Med Chem.* 13, 5013-20.
2. Marianayagam NJI, Sunde M, Matthews JM. 2004. *Trends Biochem Sci.* 29, 618-25.
3. Yeates, T.O., Padilla, J.E. 2002. *Curr Opin Struct Biol.* 12, 464-70.
4. Goodsell DS, Olson AJ. 2000. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29, 105-53.
5. Pongstingl, H., Kabir, T., Gorse, D., Thornton, J.M. 2005. *Prog Biophys. Mol Biol* 89, 9-35.
6. Ross, C.A., Poirier, M.A. 2005. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 891-8.
7. Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Fuentes-Silva D, Ortiz E, Rudiño-Piñera E, Sánchez-López R, Horjales E, Becerril B, Rodríguez-Romero A. 2010. *J Mol Biol.* 396, 280-92
8. Janowski R, Kozak M, Jankowska E, Grzonka Z, Grubb A, Abrahamson M, Jaskolski M. 2001. *Nature Struct Biol* 8, 316-320.
9. Jaskolski M. 2001. *Acta Biochim Polon* 48, 807-827.
10. Janowski R, Kozak M, Abrahamson M, Grubb A, Jaskolski M. 2005. *Proteins: Struc func bioinform* 61, 570-578.
11. Hernández-Santoyo A, Landa A, González-Mondragón E, Pedraza-Escalona M, Parra-Unda R, Rodríguez-Romero A. 2011. *FEBS J.* 278, 3308-18.
12. McPherson, A. 2004. *Methods.* 34, 254-265.
13. Kabsch W. 2010. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 125-132.
14. Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50, 760-763.
15. Adams P.D., Afonine P.V., Bunkoczi G, Chen V.B., Davis I.W., Echols N, Headd J.J., Hung L.W., Kapral GJ, Grosse-Kunstleve R.W., McCoy A.J., Moriarty N.W., Oeffner R, Read R.J., Richardson D.C., Richardson J.S., Terwilliger T.C., Zwart P.H. 2010. *Acta crystallogr D, Biol crystallogr.* 66, 213-221.