

Enovelamento de Proteínas

Roberto K. Salinas
roberto@iq.usp.br

Christian Anfinsen refolding experiments

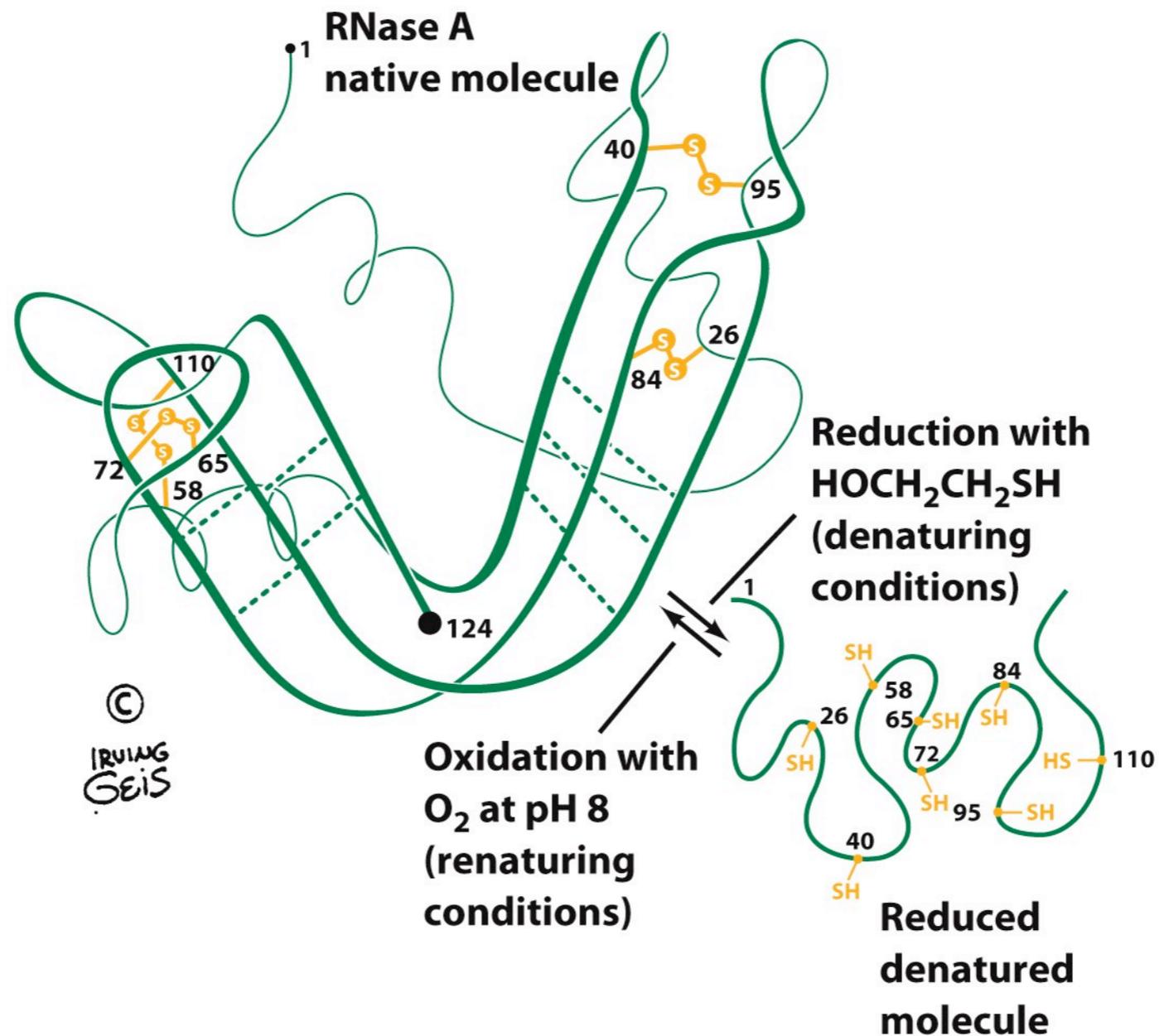
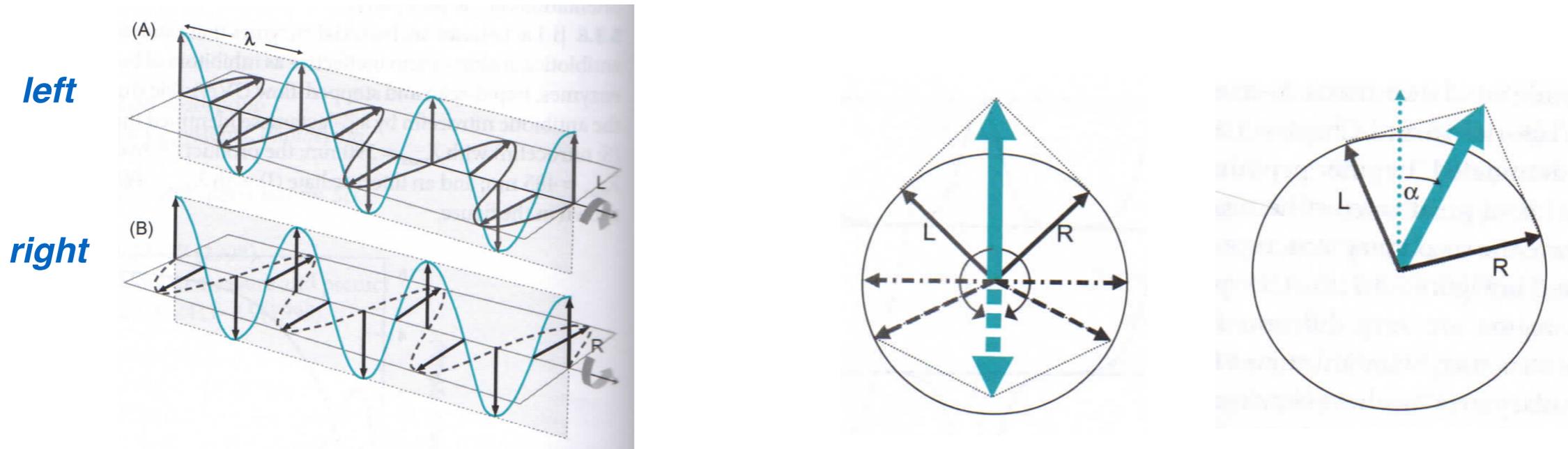


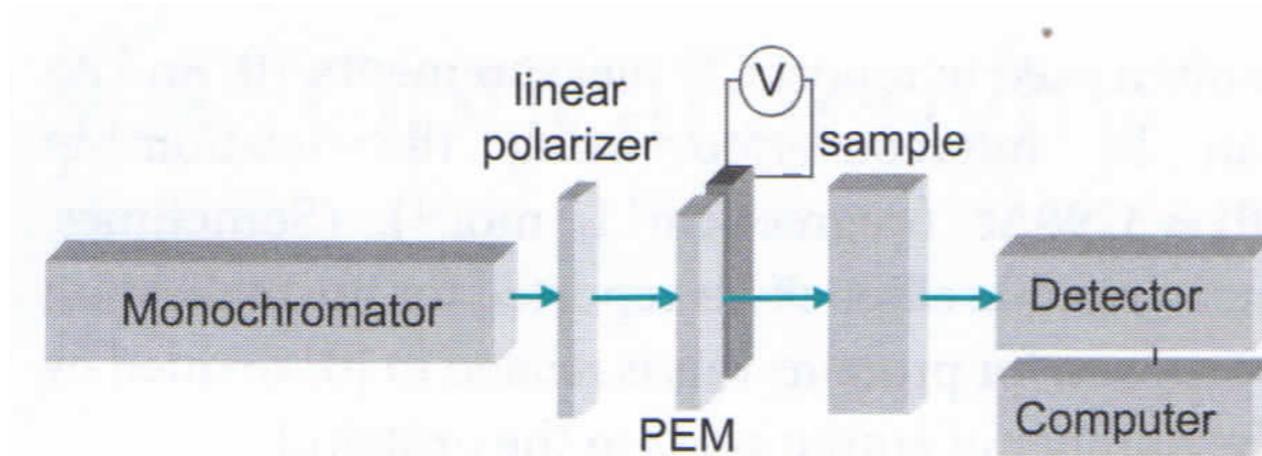
Figure 9-2
Illustration, Irving Geis. Image from the Irving Geis Collection, Howard Hughes Medical Institute. Reprinted with permission.

“Scrambled” RNase A pode ser renaturada removendo-se uréia na presença de traços de BME o que indica que o estado nativo é termodinamicamente mais estável

Dicroísmo Circular (CD)

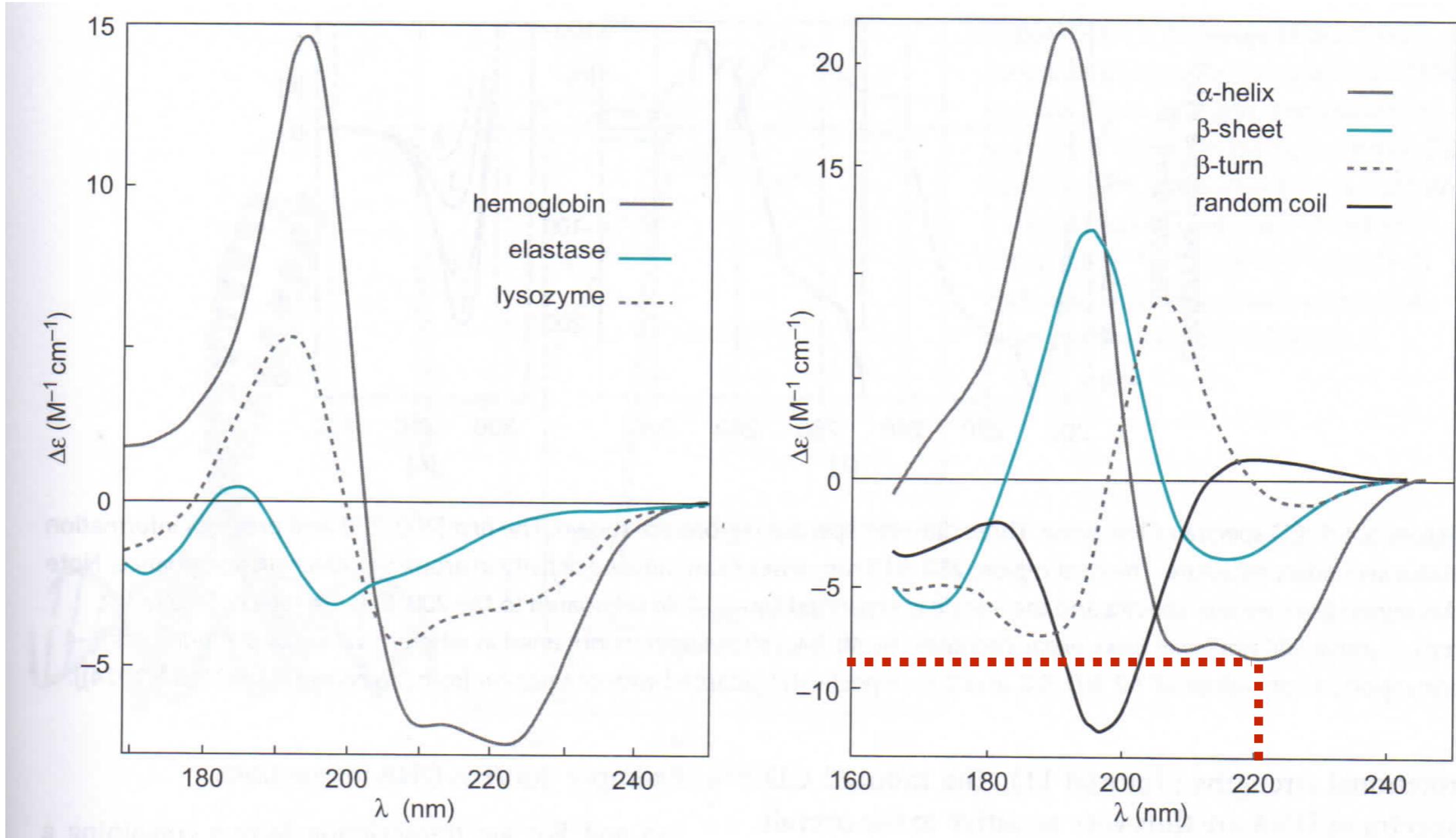


Compostos quirais alteram o plano da luz plano-polarizada



Medida de um espectro de CD

Θ a 222 nm é indicativo do conteúdo de α-hélice



“Unfolding”

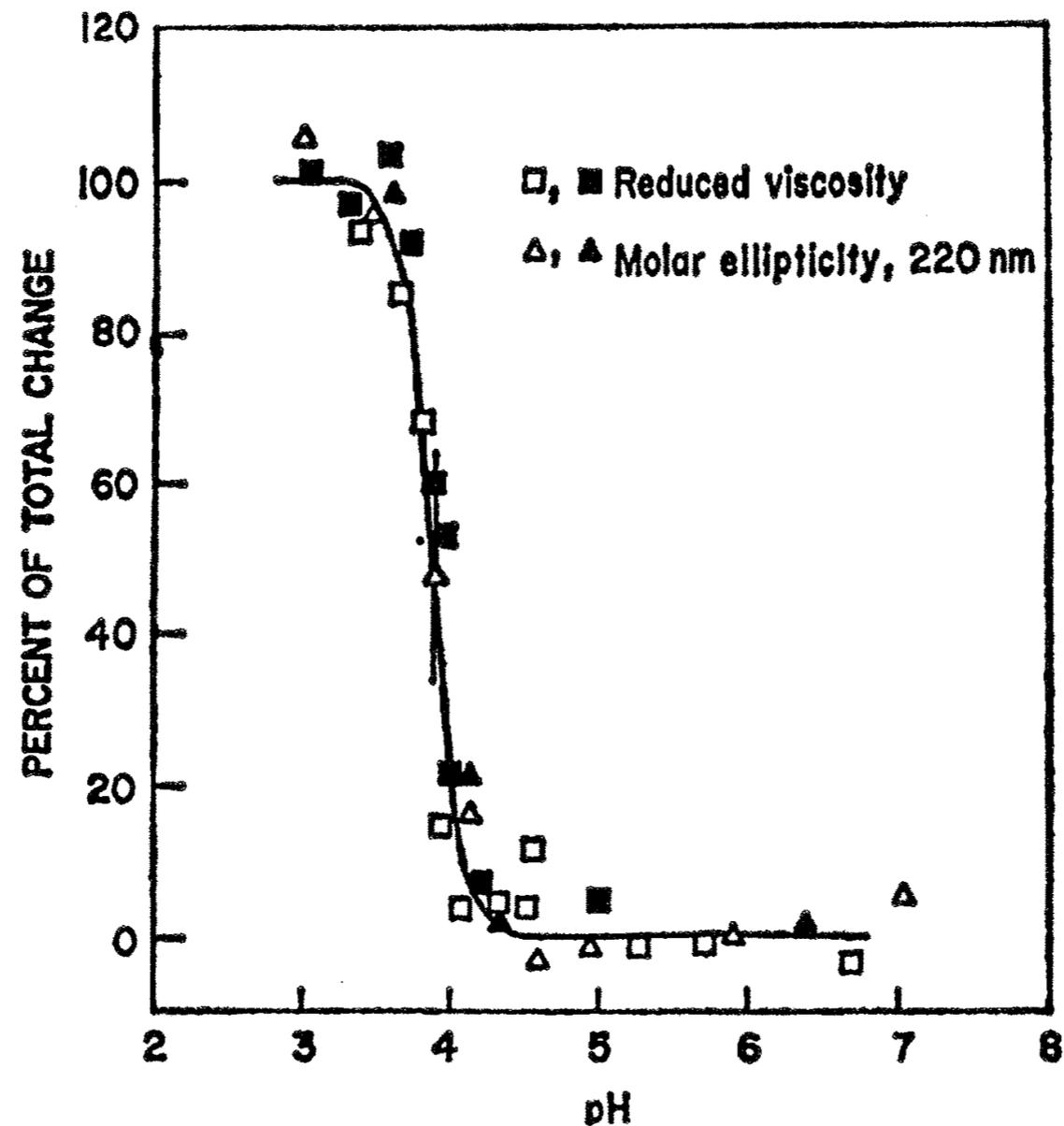
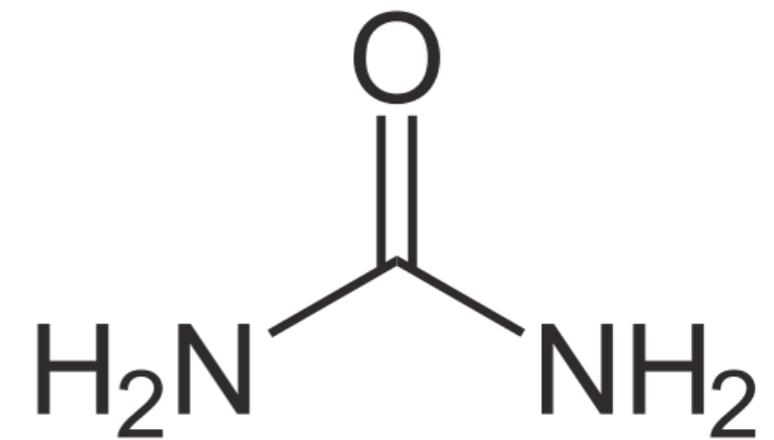
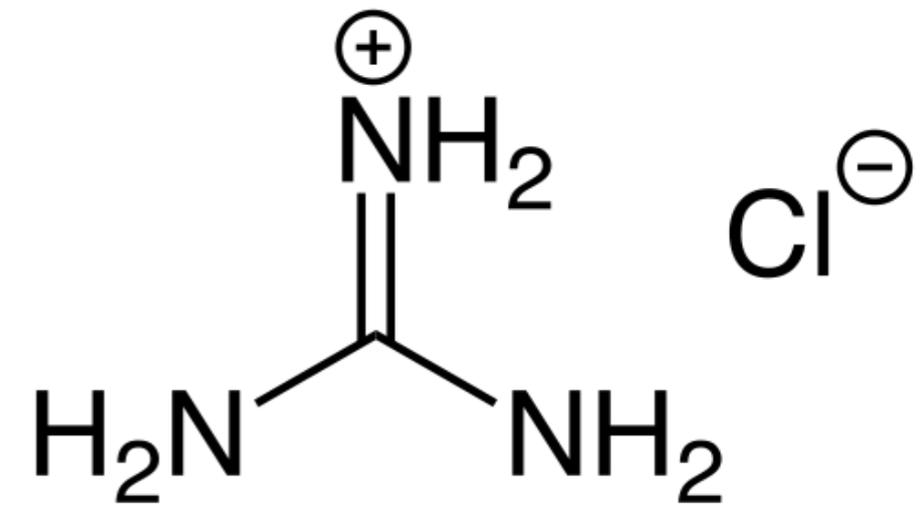
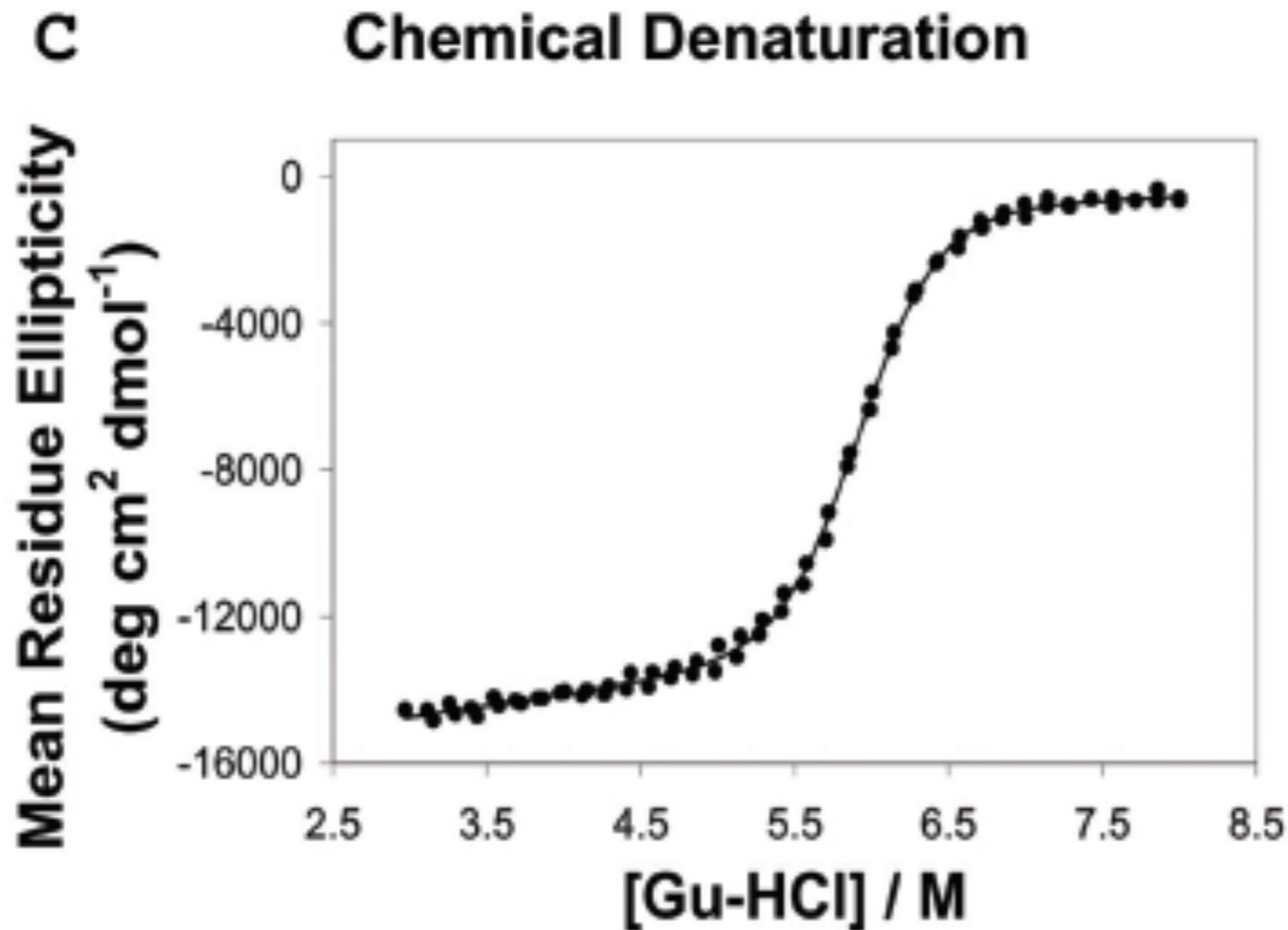


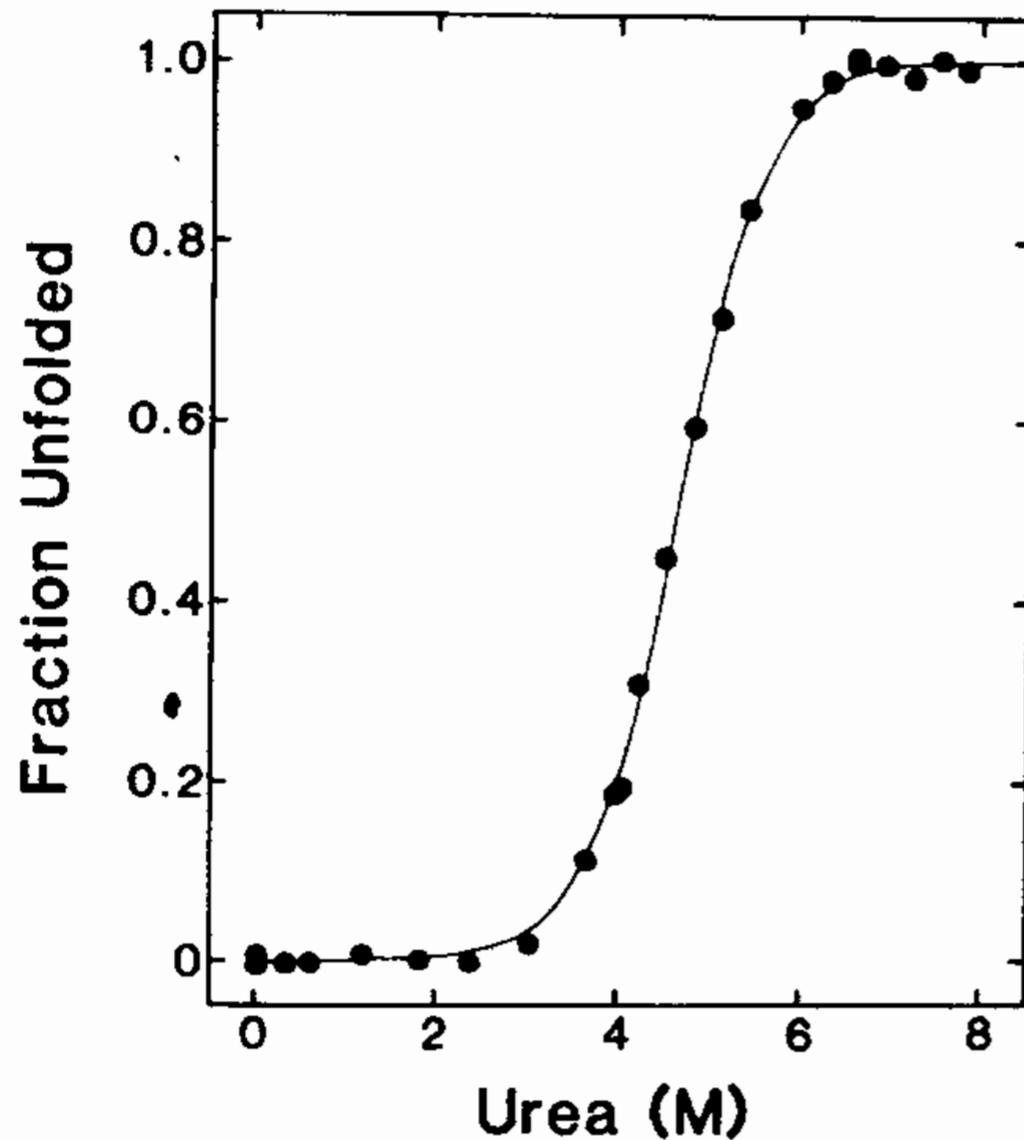
Fig. 9. Changes in reduced viscosity and molar ellipticity at 220 nm during the acid-induced transition from native to denatured nuclease. □ and ■, Reduced viscosity; △ and ▲, molar ellipticity at 220 nm; □ and △, measurements made during the addition of acid; ■ and ▲, measurements made during the addition of base (44).

- Como medir a estabilidade conformacional de uma proteína?

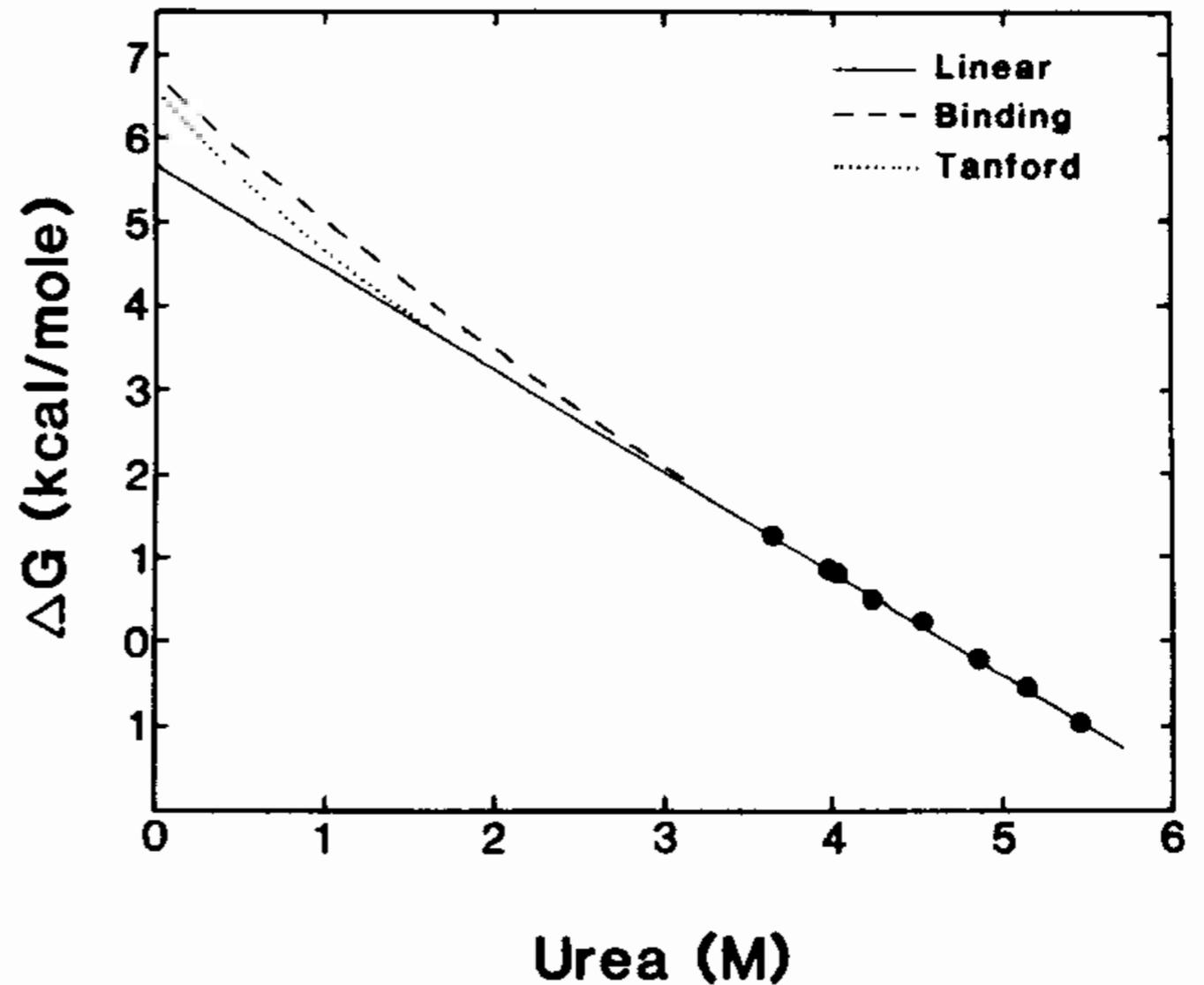


Kuhlman et al. (2003) *Science* 302: 1364

- Como medir a estabilidade conformacional de uma proteína?



$$\Delta G = \Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m [\text{denaturant}]$$



Termodinâmica de enovelamento de proteínas

Proteína	ΔG^0 (kcal/mol)	ΔH^0 (kcal/mol)	$T\Delta S^0$ (kcal/mol)
CI2	-6.62	-32.26	-25.64
EglinC	-8.82	-27.48	-18.66
RNAse T1	-8.96	-67.16	-58.22
Citocromo c	-8.87	-21.27	-12.40
Barnase	-11.69	-73.37	-61.71

Fonte: Lesk, A. *Introduction to protein science*. Oxford University Press, 2ª edição, p. 352 (2010)

$$\Delta G_{\text{folding}} = (H_{\text{folded}} - H_{\text{unfolded}}) - T(S_{\text{folded}} - S_{\text{unfolded}})$$

A estabilidade da proteína é da mesma ordem de grandeza que 4-5 ligações de hidrogênio

$$u(r) = (\text{constant})r^{-p}$$

Diferentes tipos de energia $u(r)$

Tipo	u (kcal/mol)	Dependência em r
iônica	66	$1/r$
íon/dipolo	4	$1/r^2$
dipolo/dipolo	0.5	$1/r^3$
dipolo/dipolo induzido	0.012	$1/r^6$

Energia de ligações covalentes

Ligação	u (kcal/mol)
H—C	80.6
C—C	98.3

Ponte de hidrogênio:

Água/Água	5.5 kcal/mol
-----------	--------------

• Proteínas são marginalmente estáveis

1. Estabilidade está intimamente conectada com enovelamento, proteínas precisam ser estáveis no estado enovelado (nativo)
2. Estado desnaturado (D) não é necessariamente o mesmo que desenovelado (U)
3. $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
4. A energia livre de enovelamento é a soma de termos entálpicos e entrópicos, resultando em um valor ΔG pequeno (tipicamente -5 a -15 kcal/mol), portanto **proteínas são marginalmente estáveis**

- **Origens da estabilidade da estrutura de uma proteína**

Interações que estabilizam a estrutura 3D

Não covalentes

Interações de van der Waals

Interações eletrostáticas

Ligações de hidrogênio

Covalente

Ligação dissulfeto

Proteínas enovelam-se em consequência do efeito hidrofóbico

Ligações de disulfeto

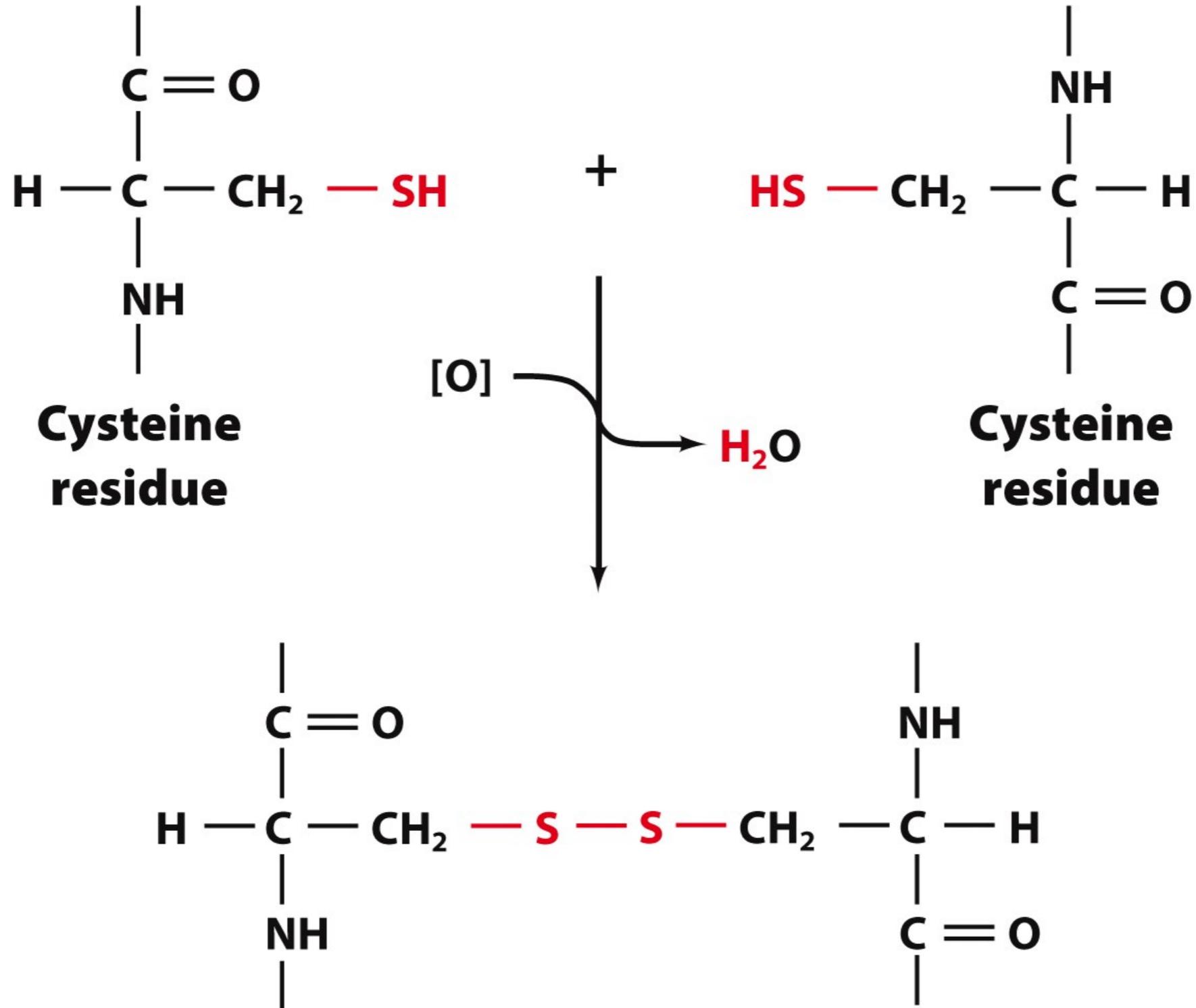


Figure 4-5
© John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Energias típicas de interações não covalentes

Diferentes tipos de energia $u(r)$

Tipo	E (kJ/mol)	
íon-íon	250	íons
íon-dipolo	15	íons e moléculas polares
dipolo-dipolo	2/0.3	moléculas polares
dipolo-dipolo induzido	2	pelo menos uma molécula
London	2	todas as moléculas

Energia de ligações covalentes

Ligação	u (kJ/mol)
H—C	337
C—C	411

Ligação de hidrogênio:

Água/Água	23.01 kJ/mol
-----------	--------------

Efeito hidrofóbico

Propriedades termodinâmicas de transferência de hidrocarbonetos para a água, baseado nas solubilidades a 298K

	ΔG° (kJ/mol)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/Kmol)
benzeno	19,33	2,08	-57,8
pentano	28,62	-2	-102,7
hexano	32,54	0	-109,1
ciclohexano	28,13	-0,1	-94,7



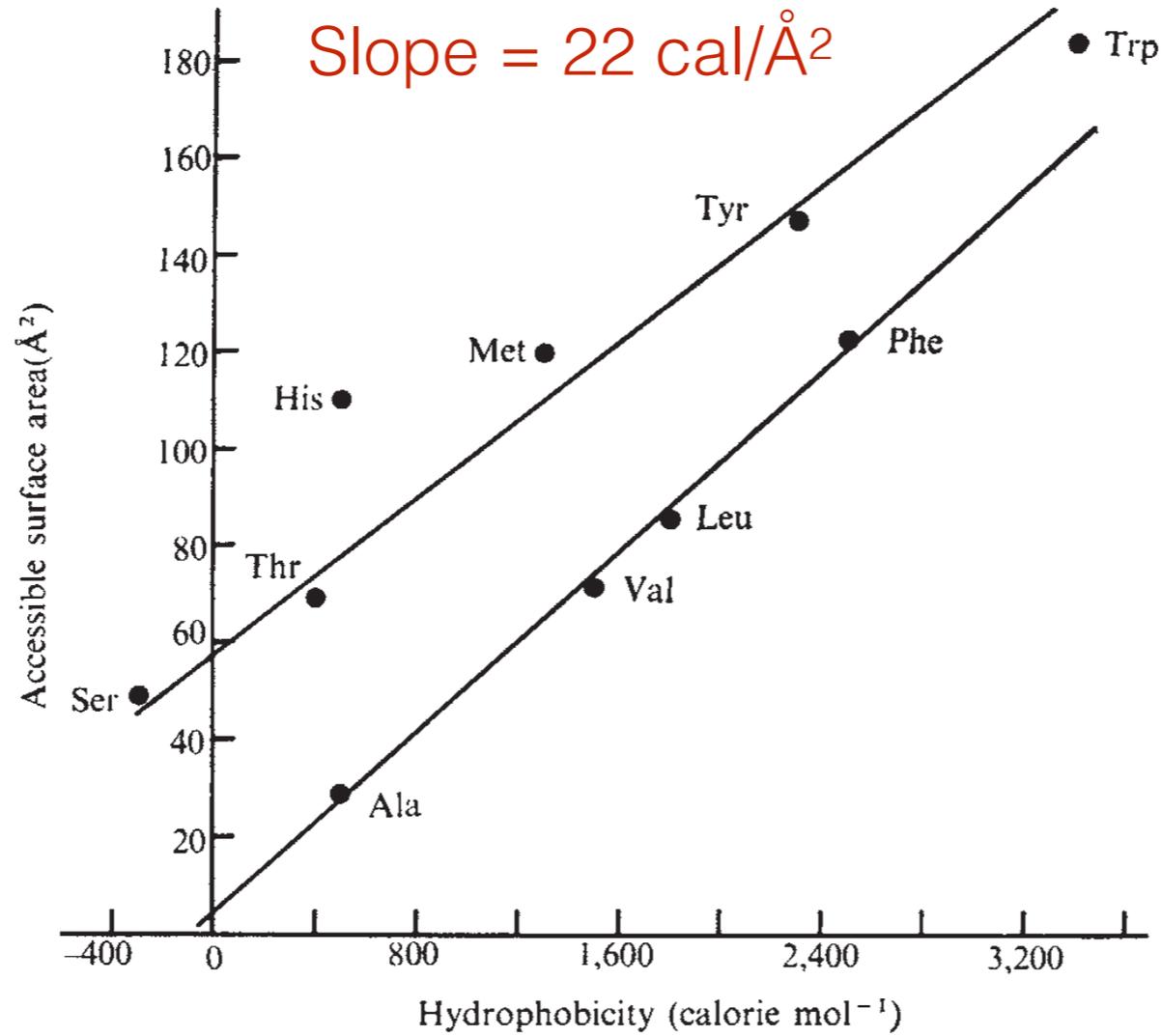
hidrofílico: dissolve em água
hidrofóbico: não dissolve em água

Dill, K. et al. Molecular Driving Forces, Garland Science, 1ª. ed., 2003, Madison (pág. 579)

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



Cyrus Clothia quantificou o efeito hidrofóbico



Cyrus Clothia (1974) *Nature* **248**:338

1. O interior de uma proteína é hidrofóbico ($D \sim 2$)
2. Pontes salinas no interior hidrofóbico de uma proteína possuem bastante energia
3. O pKa de um aminoácido será alterado de forma a prevenir a formação de uma carga no interior da proteína

Constantes dielétricas (D) de diferentes líquidos

Líquido	T(°C)	D
Heptano	30	1,916
Metanol	25	33
Formamida	20	109
Glycol	25	37
Água	25	78,54

$$u(r) = C \frac{q_1 q_2}{Dr}$$

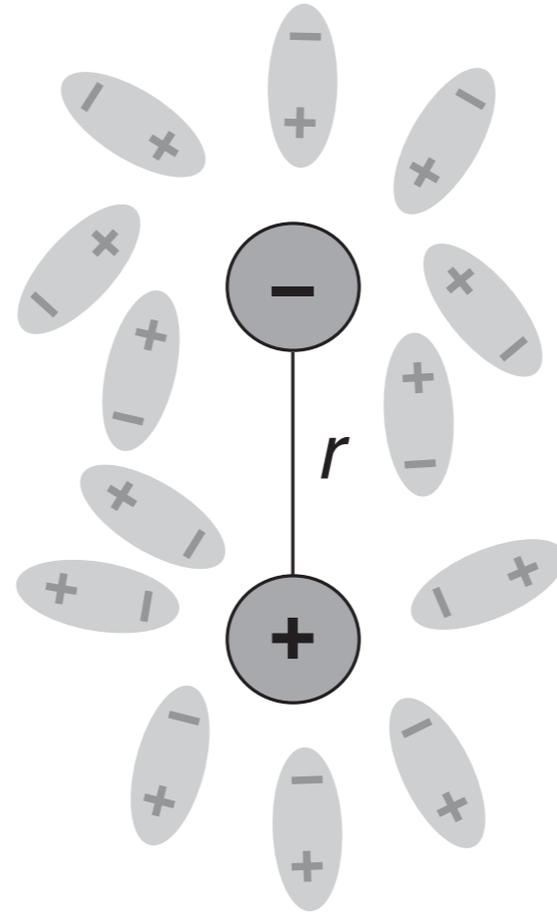
Interações eletrostáticas (longo alcance)

Energia electrostática no vácuo:

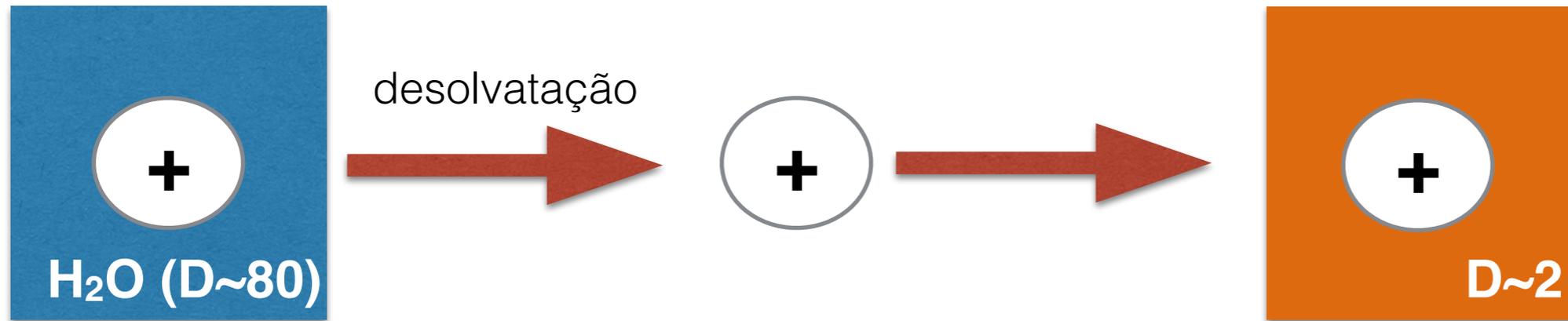
$$u(r) = C \frac{q_1 q_2}{r}$$

Energia electrostática em um
líquido de constante dielétrica D:

$$u(r) = C \frac{q_1 q_2}{Dr}$$



Transferência de uma esfera carregada da água para um meio apolar ($\mu=0$) consome muita energia



Energia eletrostática (considere carga “q” e raio “a”)

$$\Delta G_{elet} = \frac{Cq^2}{2a} \left(\frac{1}{D_{final}} - \frac{1}{D_{inicial}} \right) = \frac{Cq^2}{2a} \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{80} \right) = +175 \text{ kJ/mol}$$

Energias típicas de interações não covalentes:

Tipo	u (kJ/mol)
iônica	276
íon/dipolo	16,7
dipolo/dipolo	2,09
dipolo/dipolo induzido	0,050

- O problema de *protein folding*: como proteínas atingem a estrutura nativa?

Christian Anfinsen (anos 50): conformação nativa da RNase A é a mais estável

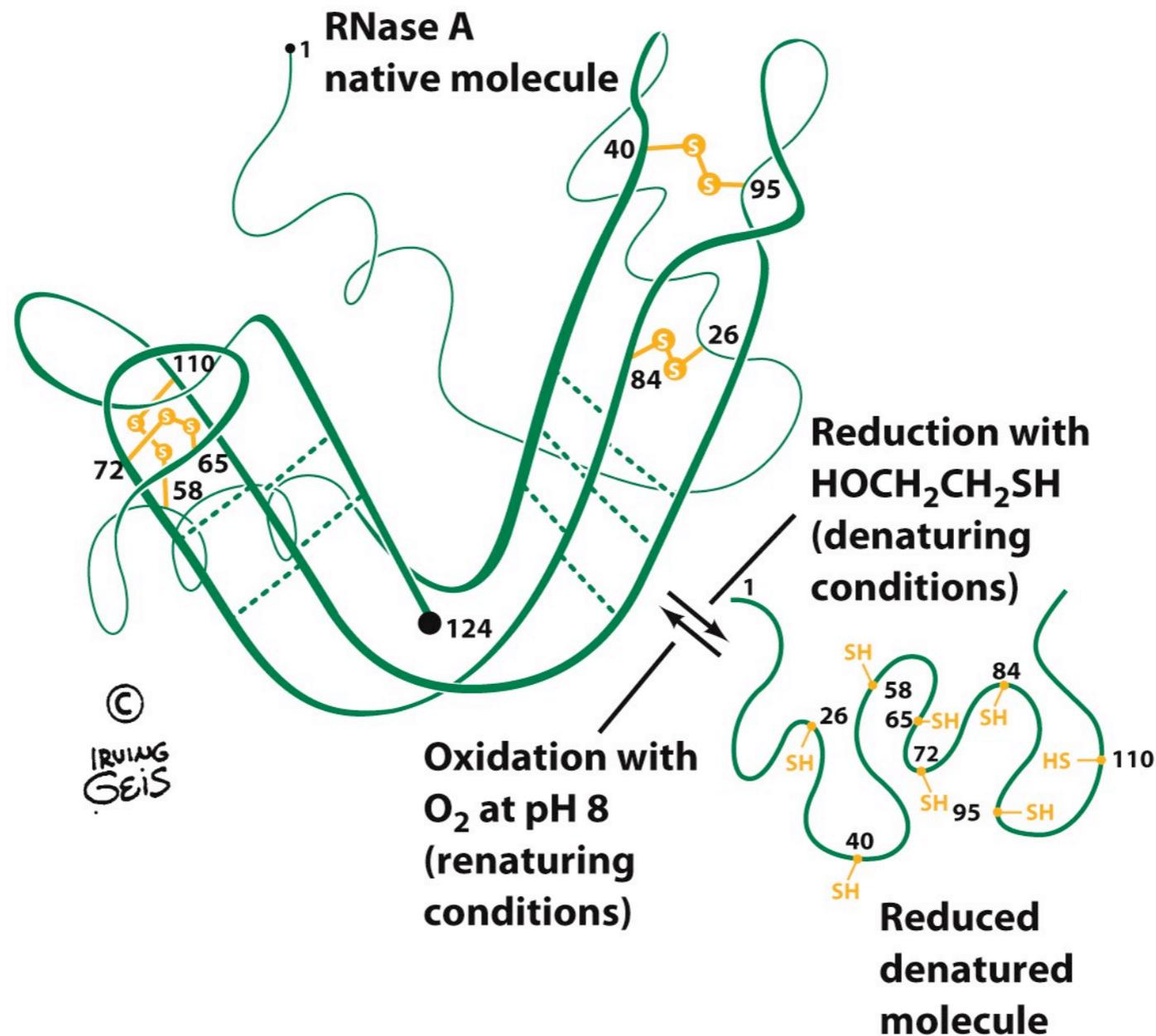


Figure 9-2
Illustration, Irving Geis. Image from the Irving Geis Collection, Howard Hughes Medical Institute. Reprinted with permission.

“Scrambled” RNase A pode ser renaturada removendo-se uréia na presença de traços de BME o que indica que o estado nativo é termodinamicamente mais estável

- A hipótese termodinâmica de Anfinsen

A sequência de aminoácidos determina a estrutura tridimensional

The studies on the renaturation of fully denatured ribonuclease required many supporting investigations (6–8) to establish, finally, the generality which we have occasionally called (9) the “thermodynamic hypothesis.” This hypothesis states that the three-dimensional structure of a native protein in its normal physiological milieu (solvent, pH, ionic strength, presence of other components such as metal ions or prosthetic groups, temperature, and other) is the one in which the Gibbs free energy of the whole system is lowest; that is, that the native conformation is determined by the totality of interatomic interactions and hence by the amino acid sequence, in a given environment. In terms of natural selection

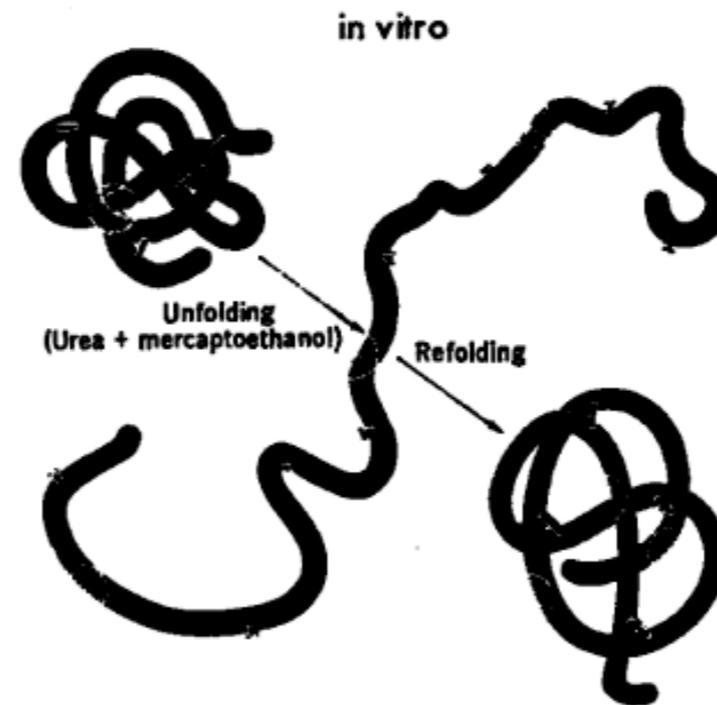
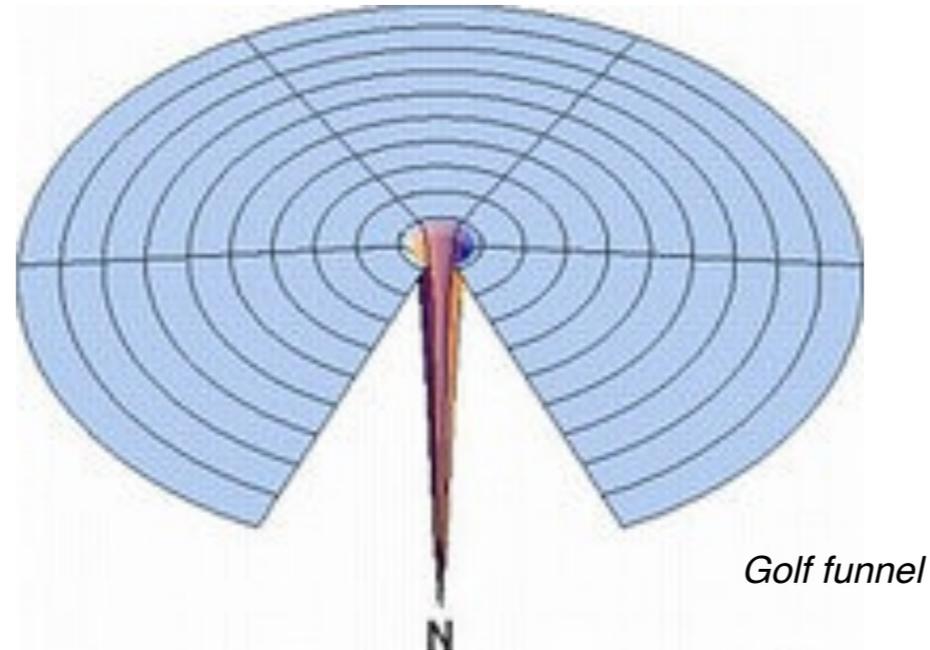


Fig. 2. Schematic representation of the reductive denaturation, in 8M urea solution containing 2-mercaptoethanol, of a disulfide-cross-linked protein. The conversion of the extended, denatured form to a randomly cross-linked, “scrambled” set of isomers is depicted at the lower right.

Cinética de enovelamento: Paradoxo de Levinthal

Considere um jogador de golfe, cego. Se ele que atira a bola para qualquer direção do campo de golfe, qual é a chance de acertar o buraco?

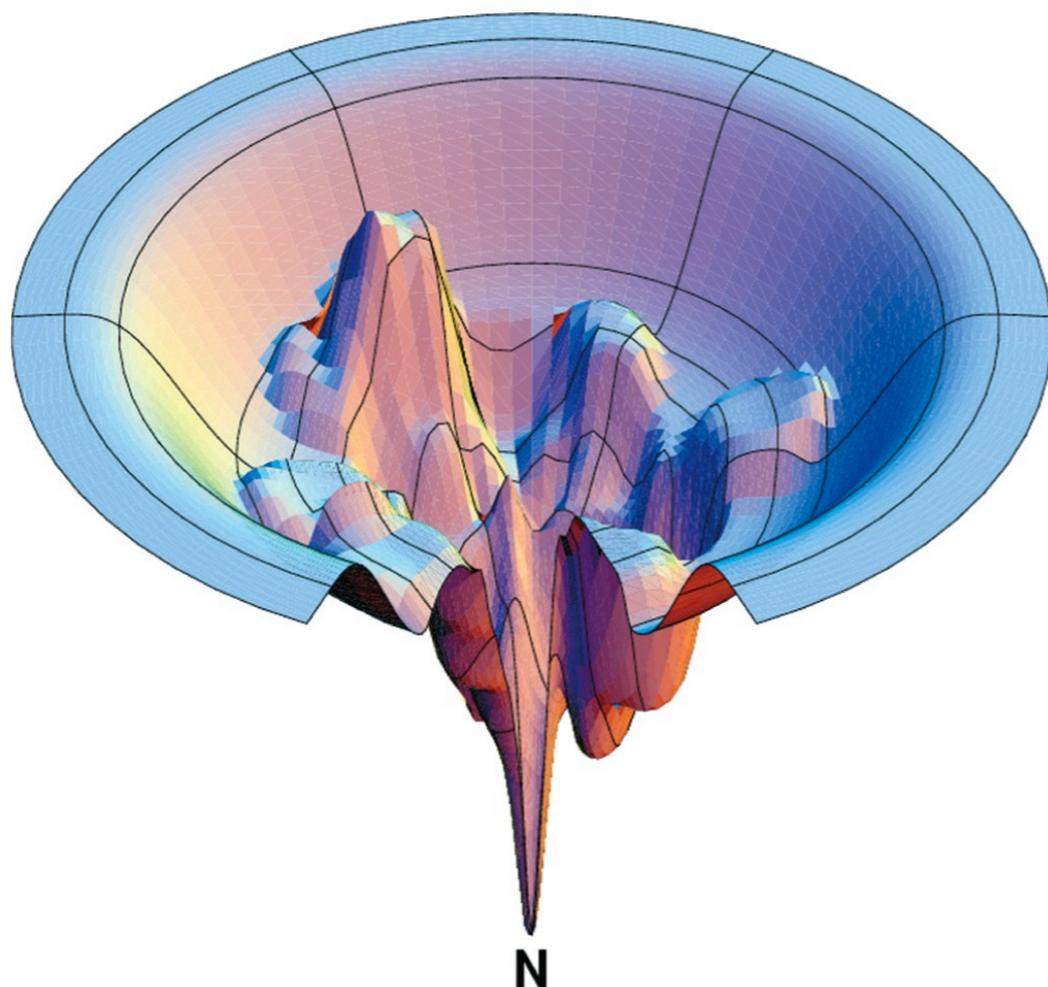


Este é o mesmo problema de uma proteína que precisa encontrar a conformação nativa, aquela de menor energia. Como ela consegue fazer esta busca tão rapidamente?

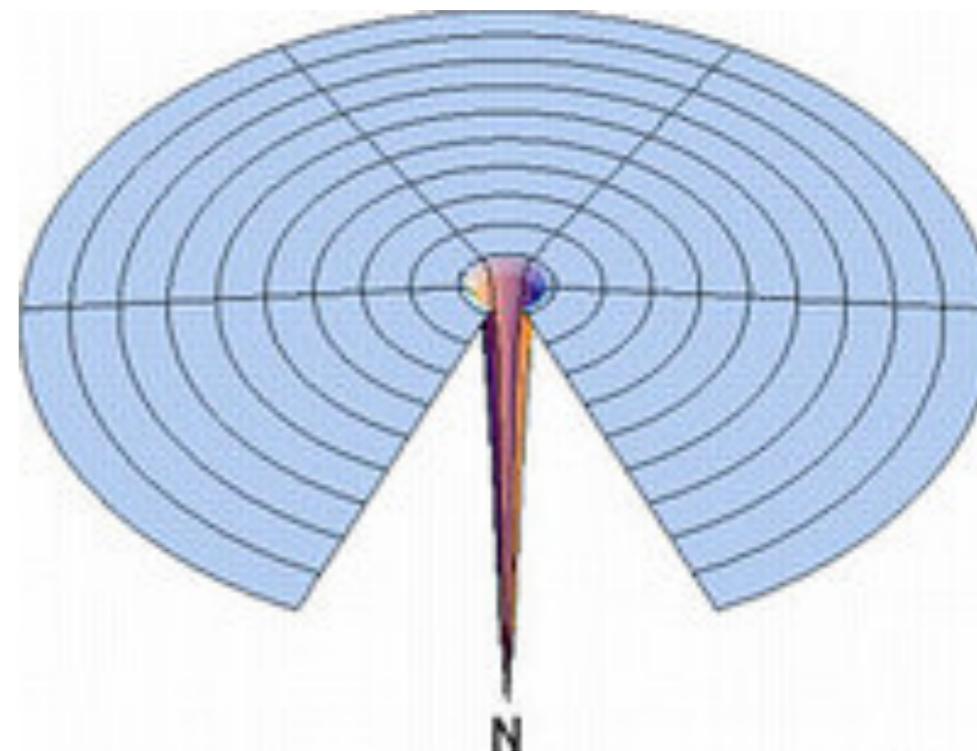
Proteínas enovelam-se rapidamente

Proteína	Número de aminoácidos	Tempo que demora o enovelamento (μ s)
Domínio de ligação a Albumina	47	1
α 3D	73	3
Tryptophan cage	20	4,1
Villin headpiece subdomain	36	4,3

Uma proteína supera o paradoxo de Levinthal ao “descer” uma superfície de energia livre multidimensional: *folding funnel*



Folding funnel

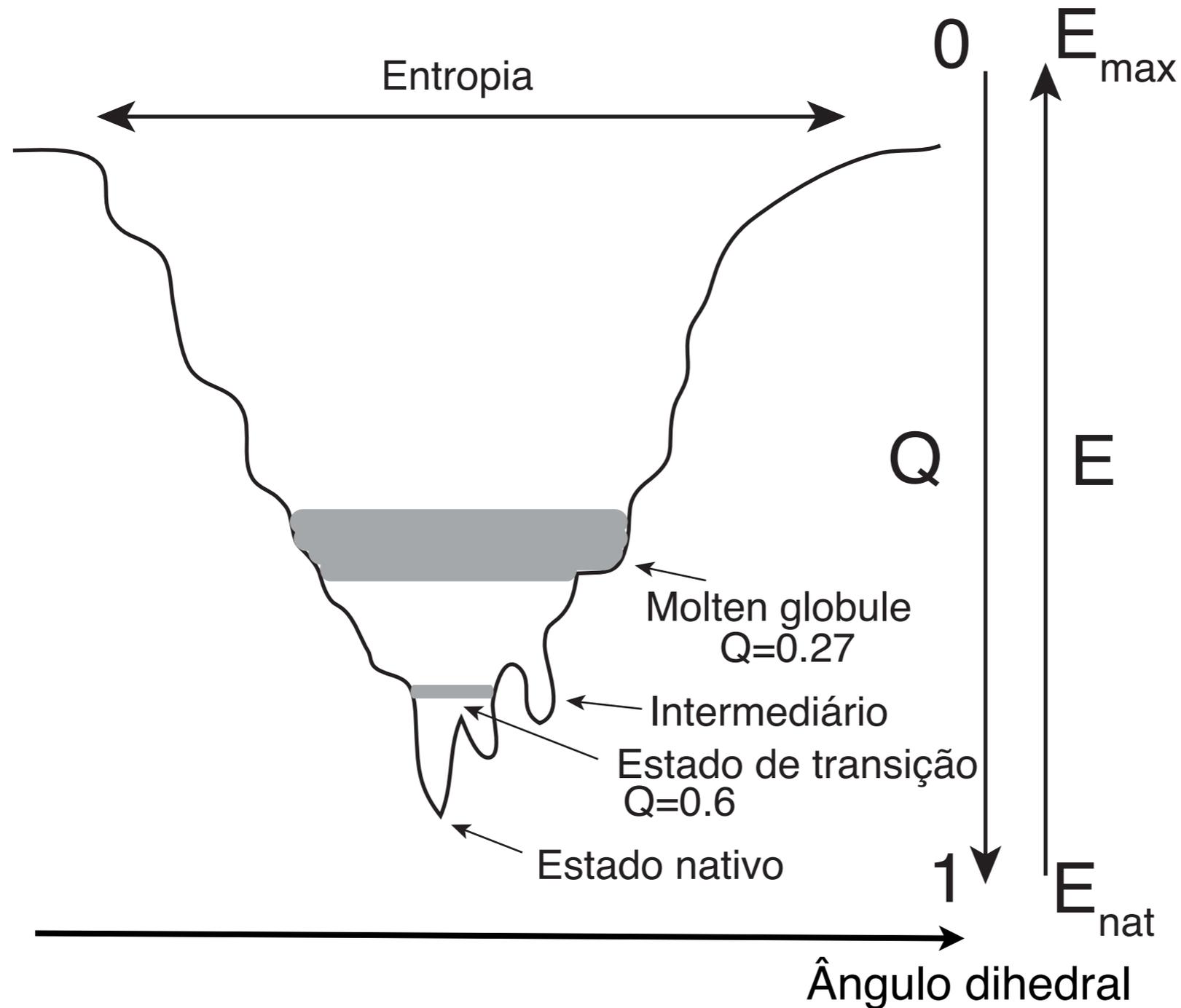


Golf funnel: situação mencionada por Levinthal

Ken A. Dill, S. Banu Ozkan, M Scott Shell, Thomas R Weikl. The Protein Folding Problem. *Annu. Rev. Biophys.* 37: 289-316 (2008)

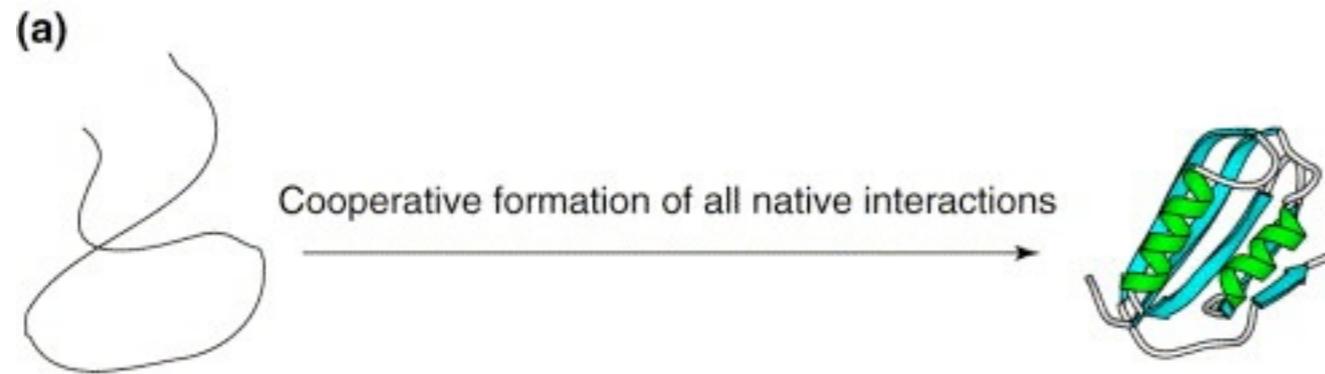
Peter E. Leopold, Mauricio Montal, José Nelson Onuchic. Protein folding funnels: A kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8721-8725 (1992)

De acordo com a hipótese do funil de enovelamento devem existir múltiplos caminhos preferenciais que conduzem a proteína ao estado nativo

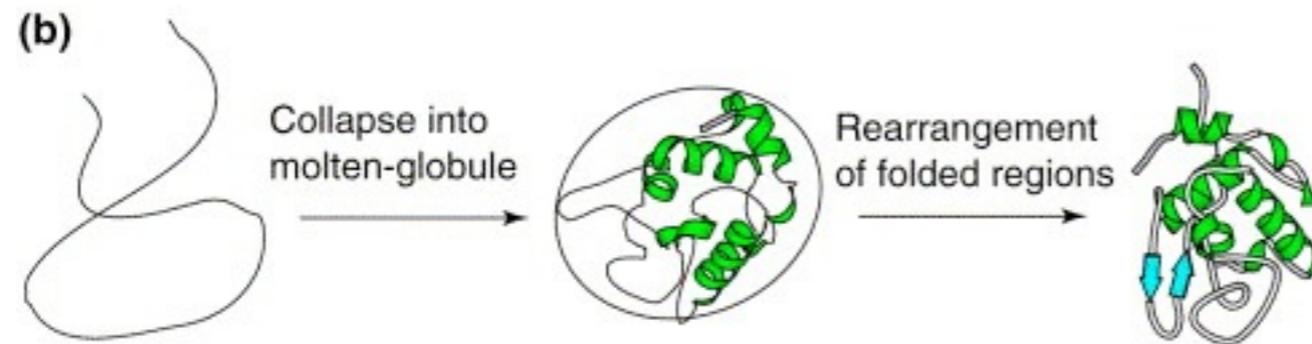


Corte transversal de um funil de enovelamento

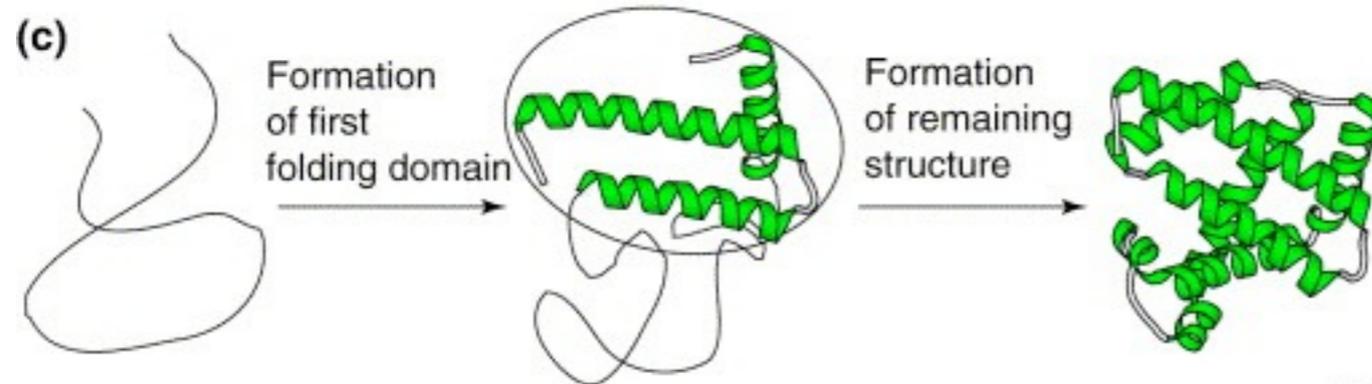
1. No caso de proteínas pequenas (100aa) o enovelamento geralmente ocorre como um equilíbrio entre dois estados
2. Nucleação - condensação: formação de um *molten globule* seguida de compactação lenta formando o estado nativo
 - a) colapso rápido formando molten globule (ms)
 - b) estrutura terciária (ms a s)
 - c) formação do estado nativo (< s)
3. Estado desenovelado: expandido, com alguma formação de estrutura secundária, mas sem estrutura terciária ou com poucas interações de longo alcance
4. Estado enovelado (nativo): compacto e ordenado
5. No caso de proteínas os vários domínios enovelam-se independentemente



proteínas pequenas (<100aa)



proteínas maiores (>100aa)



proteínas multi-domínio

Algumas proteínas ou regiões de proteínas são intrinsecamente desordenadas

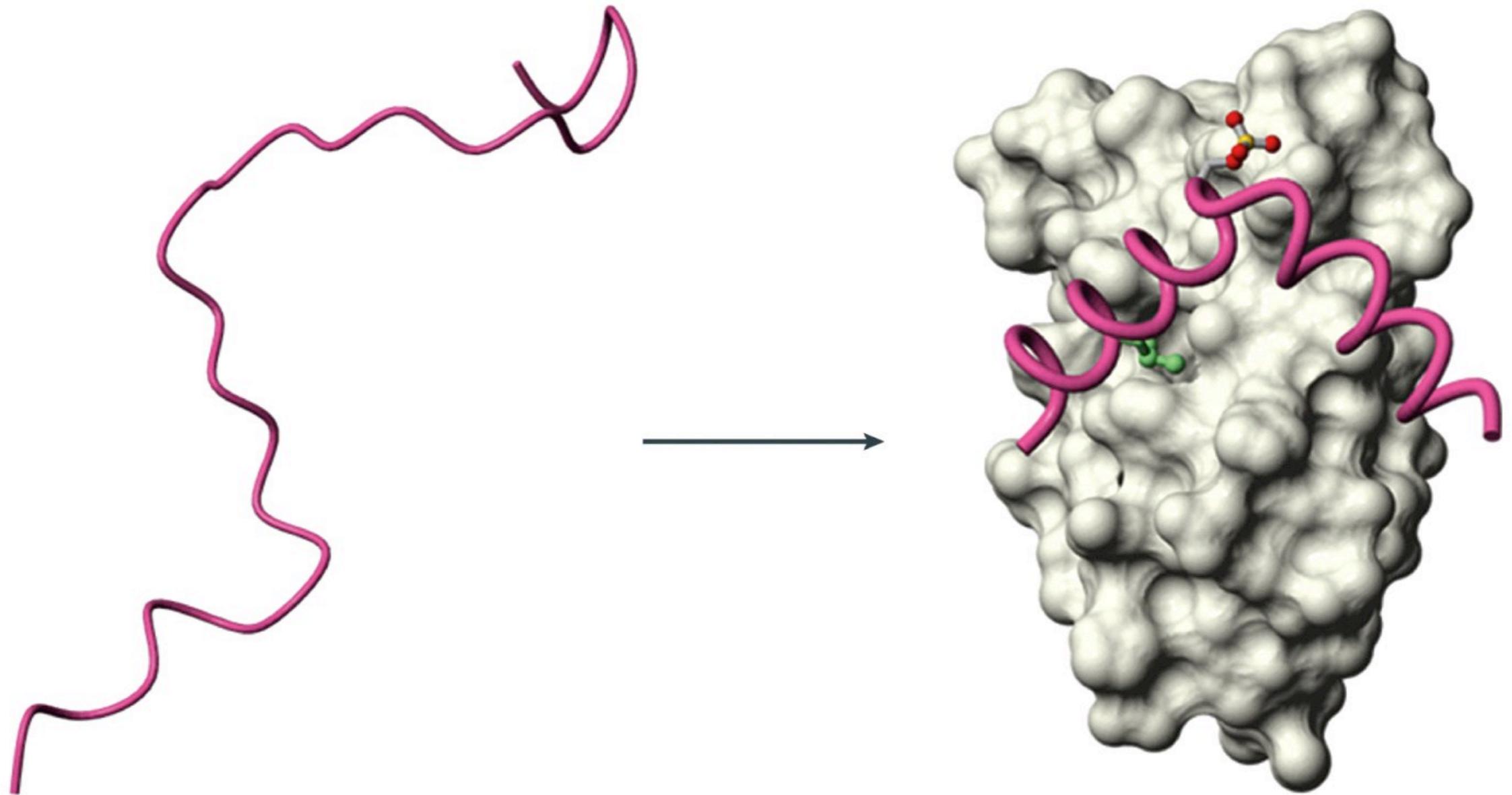
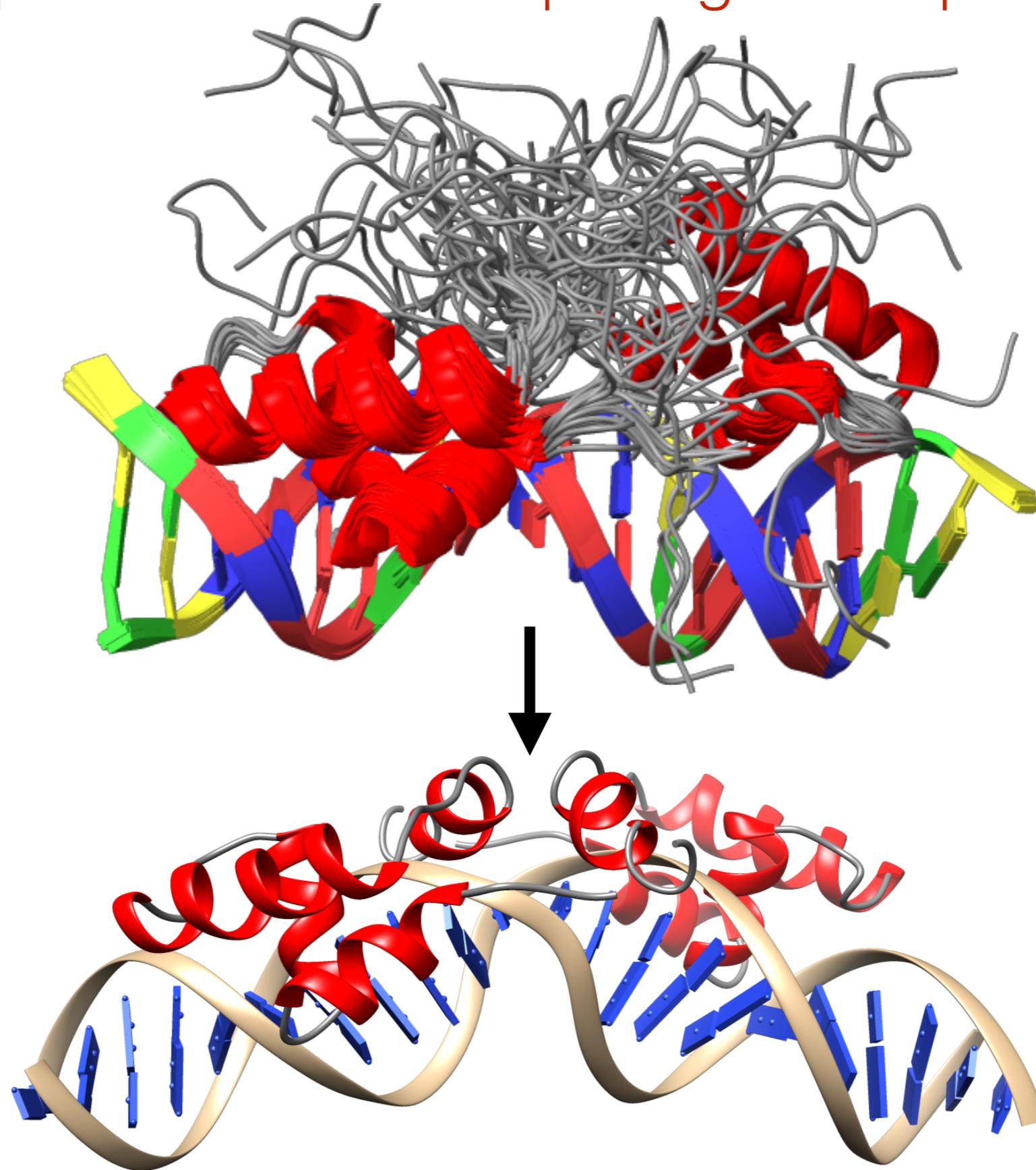


Figure 9-8
© John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

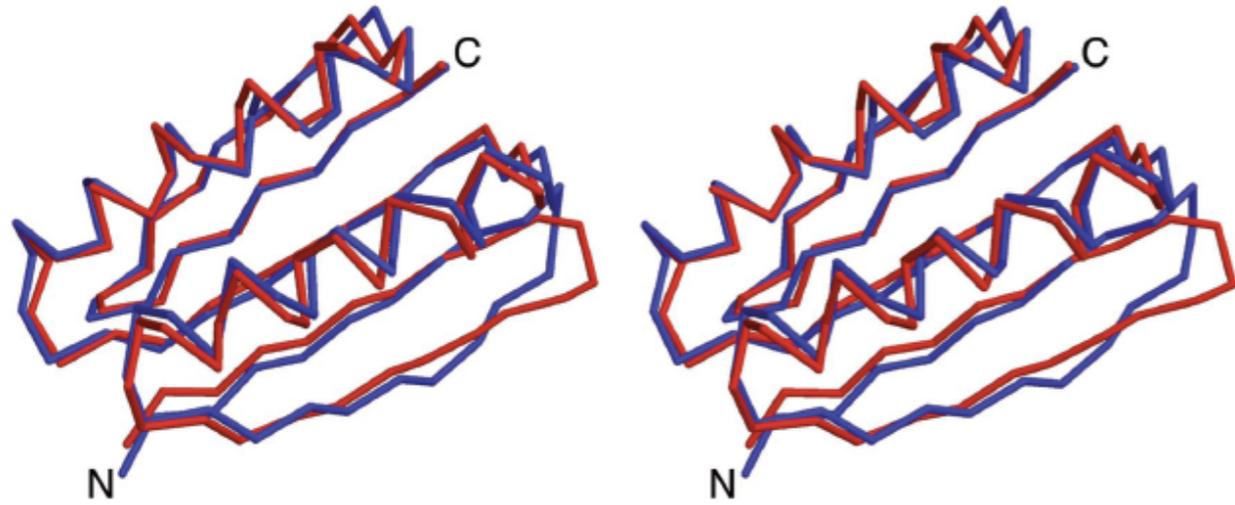
Lac headpiece se enovela após ligar ao operador *lac*



Outra forma de olhar o problema de *protein folding*

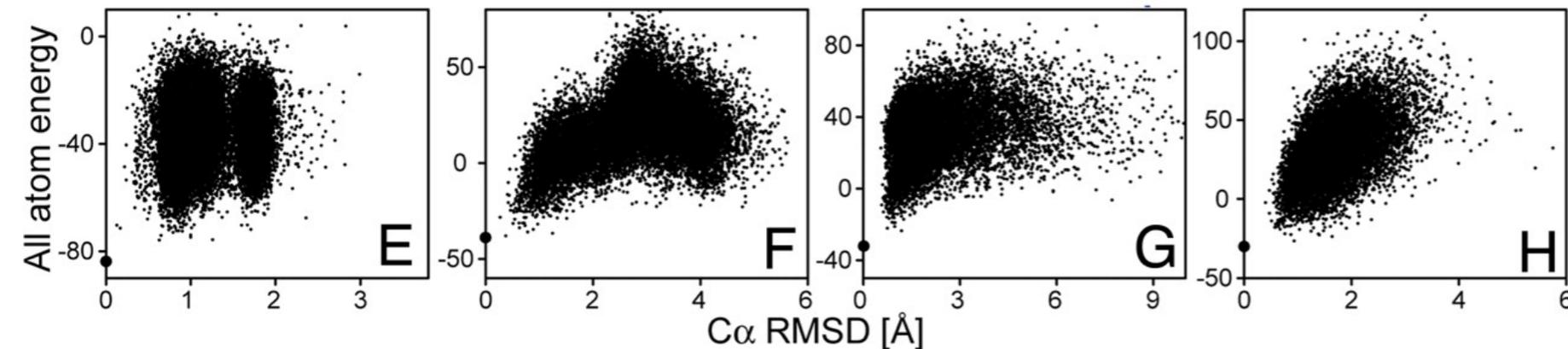
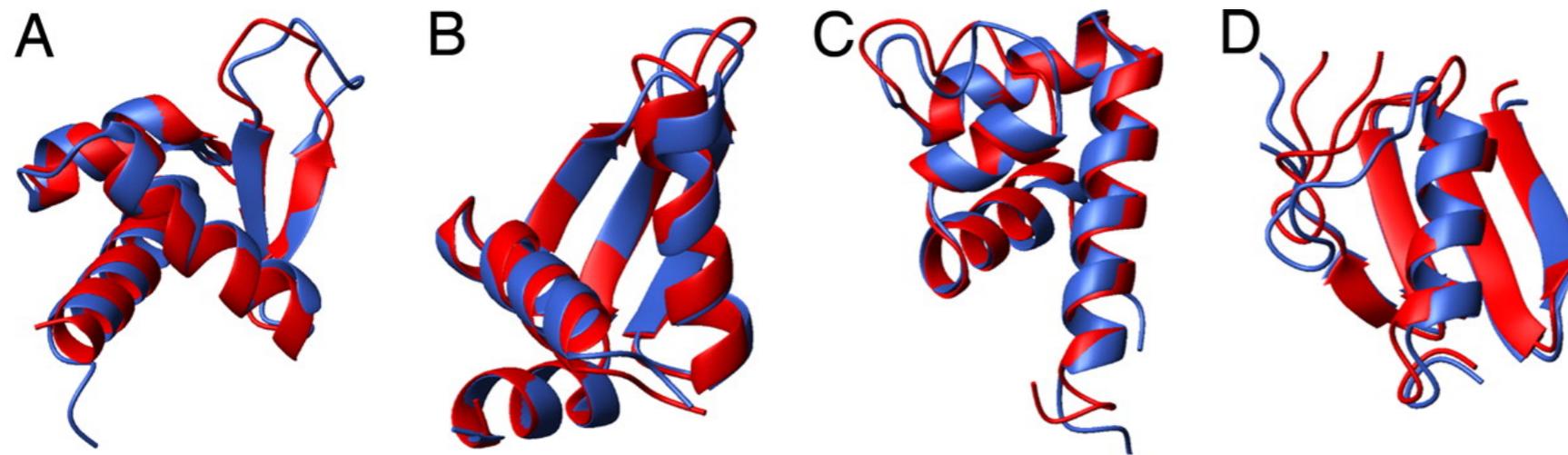
Dada uma sequência de aminoácidos,
como prever qual será a estrutura nativa?

De-Novo protein design e predição da estrutura tridimensional (*CASP - critical assessment of techniques for protein structure prediction*)



Desenho: Top7 é uma proteína de 93-resíduos com nova sequência e topologia

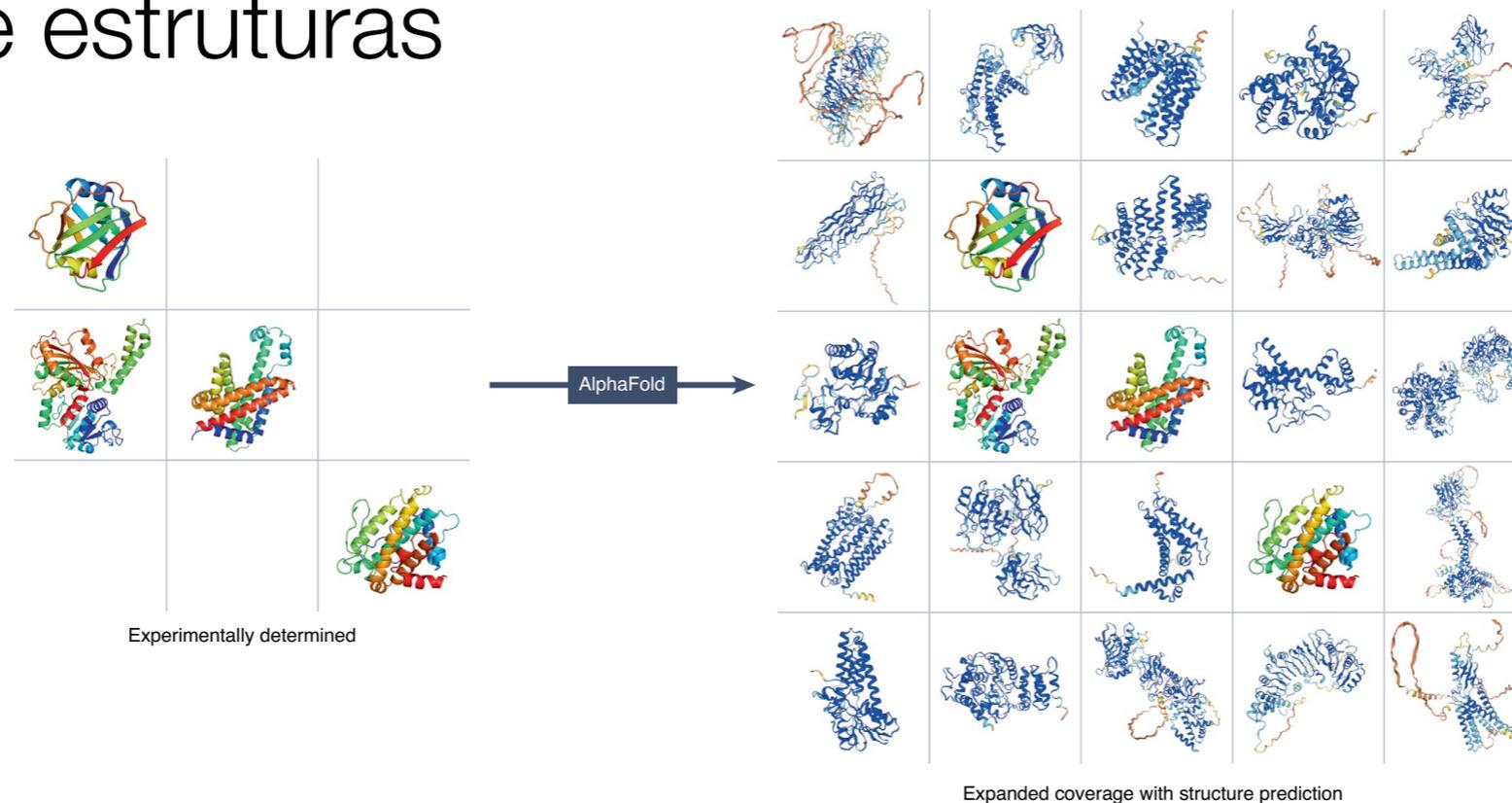
Kuhlman et al. (2003) *Science* 302: 1364



Shen Y et al. *PNAS* 2008;105:4685-4690

CS-Rosetta - Estado da arte para predição da estrutura 3D

AlphaFold - predição de estruturas de proteínas com grande exatidão (~ 1 Å) com base nos grandes bancos de dados de sequências e estruturas



Jumper & Hassabis (2022) Nature Methods 19: 11-26

- identifica padrões de coevolução em alinhamentos múltiplos de sequência, e padrões no conjunto de estruturas do PDB para treinar uma rede neural capaz de encontrar relações entre a sequência de aminoácidos e a estrutura 3D
- AlphaFold é capaz de prever estruturas de proteínas de *folding* desconhecido
- As regiões com predição pouco confiável geralmente apontam para regiões desordenadas
- Prever interações proteína - proteína (complexos e estrutura quaternária)
- Fornece modelos para substituição molecular, ajuste em mapas de densidade de Cryo-ET, e para a predição de deslocamentos químicos (RMN)

Como proteínas se enovelam *in vivo*?

Enquanto que a maior parte dos princípios discutidos aplicam-se ao enovelamento *in-vivo*, dentro das células o enovelamento é mais complicado devido a:

Proteínas são sintetizadas a uma velocidade (4-20aa/segundo) muito mais lenta do que velocidades de enovelamento típicas ($\sim < 1s$). O N-terminal começa a enovelar-se antes do C-terminal ter sido sintetizado.

Superpopulação de partículas dentro da célula (densidade de *E. coli* \sim 340 mg/ml de proteína) aumenta a chance de superfícies hidrofóbicas expostas interagirem com outras moléculas

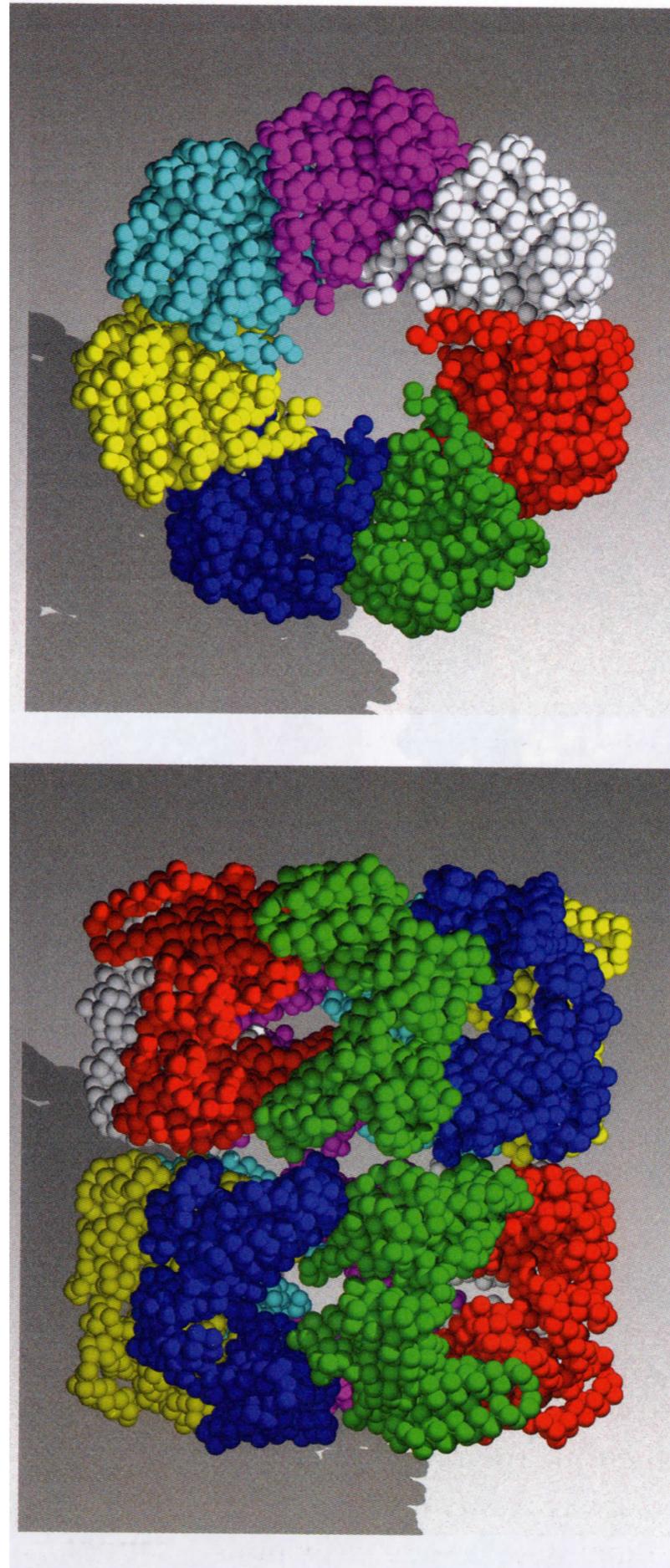
In-vivo, o enovelamento de proteínas é auxiliado por **Chaperonas: um conjunto de proteínas auxiliares que ajudam outras proteínas a enovelarem-se corretamente**

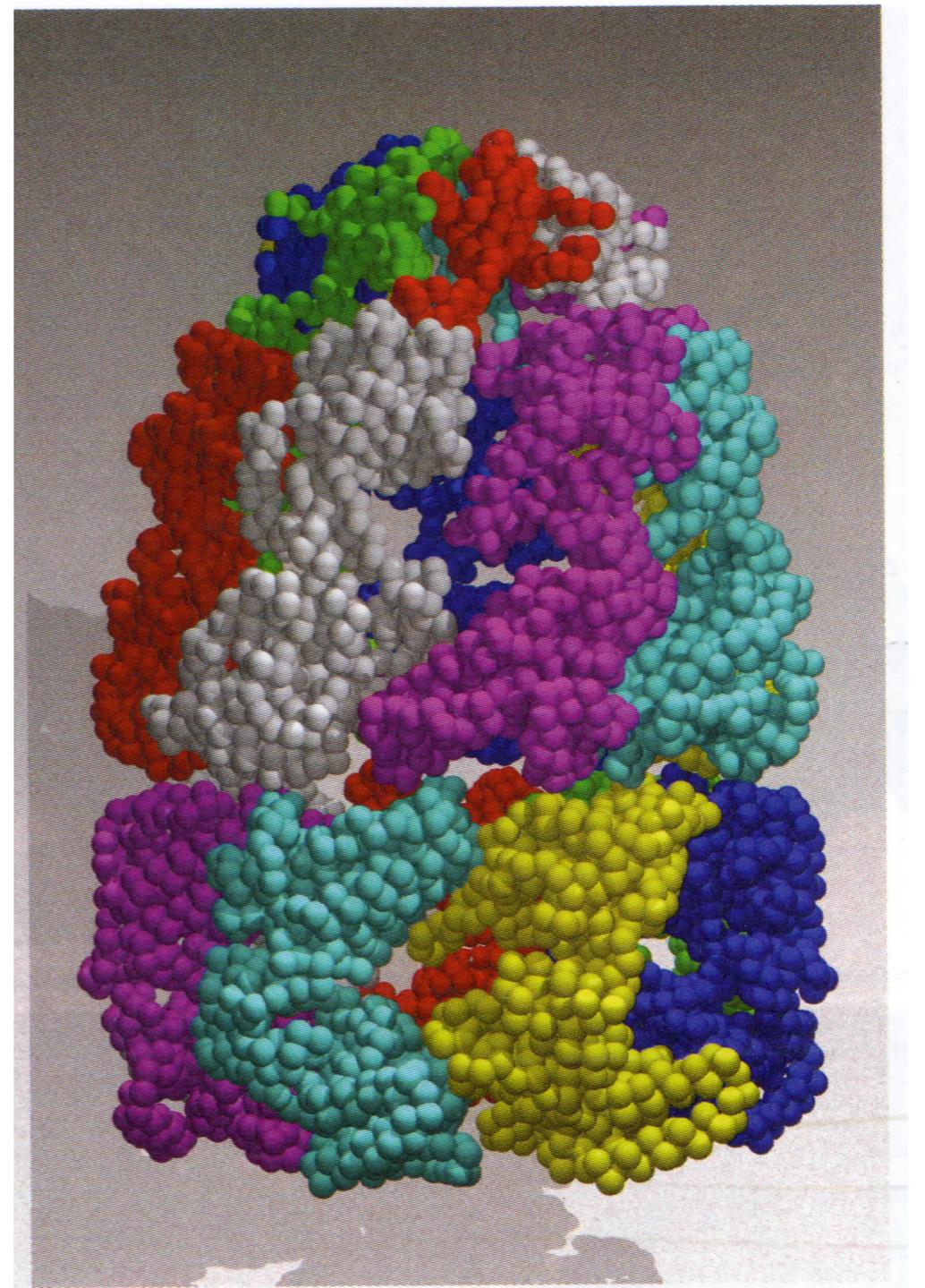
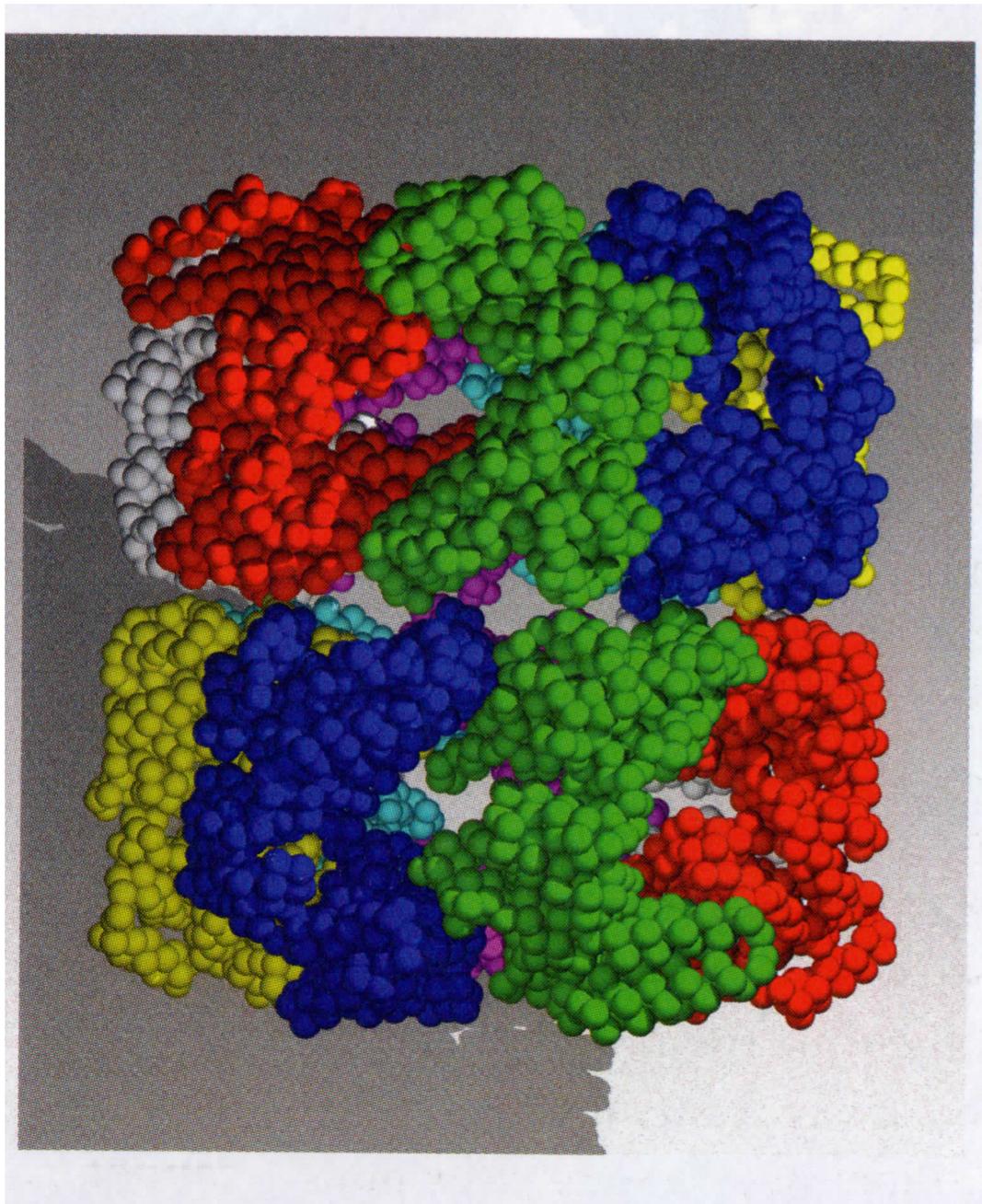
-*protein disulfide isomerases* - catalizam a troca de pontes SS

-*peptidyl-prolyl isomerases* - aceleram a isomerização cis-trans de prolinas

-*Hsp (Heat Shock Proteins)* - ligam-se a superfícies hidrofóbicas

Chaperones: GroEL-GroES





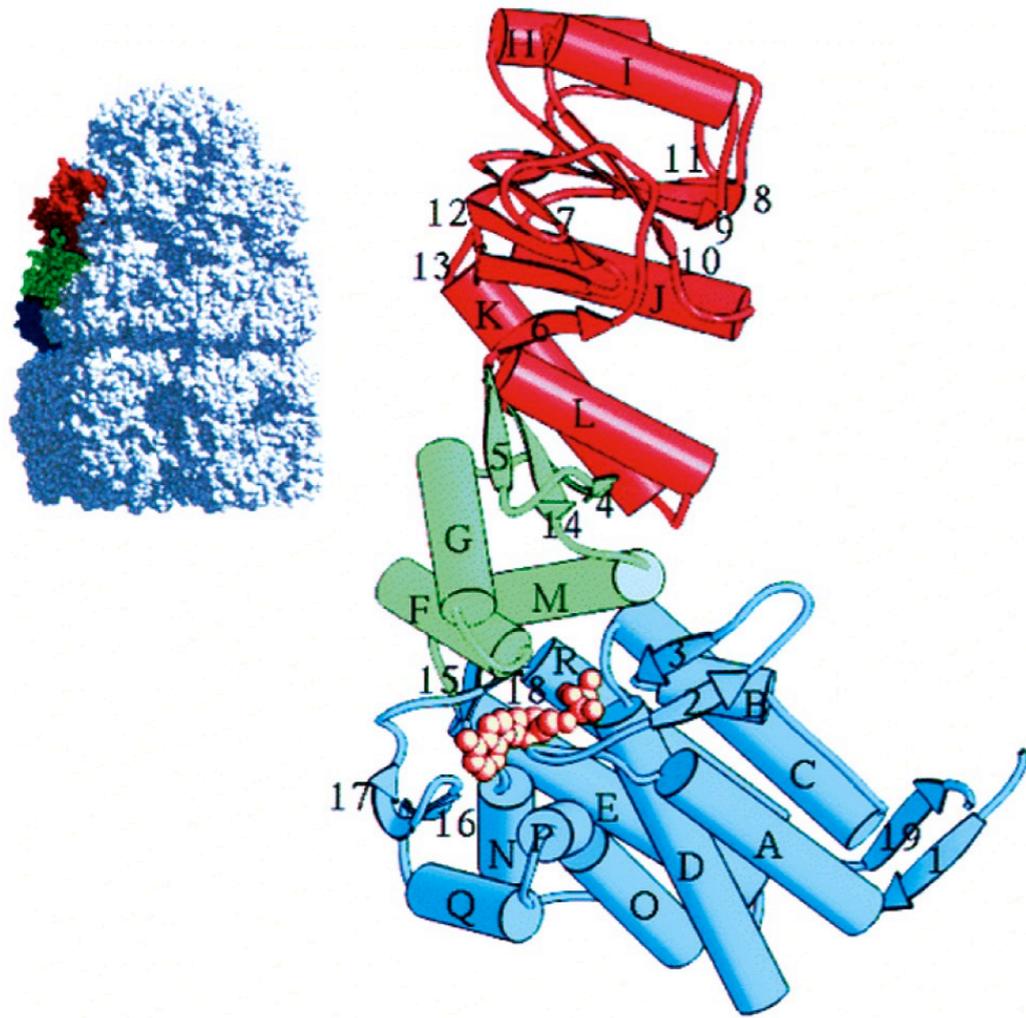


Figure 9-22b
 Courtesy of Arthur Horwich, Yale University

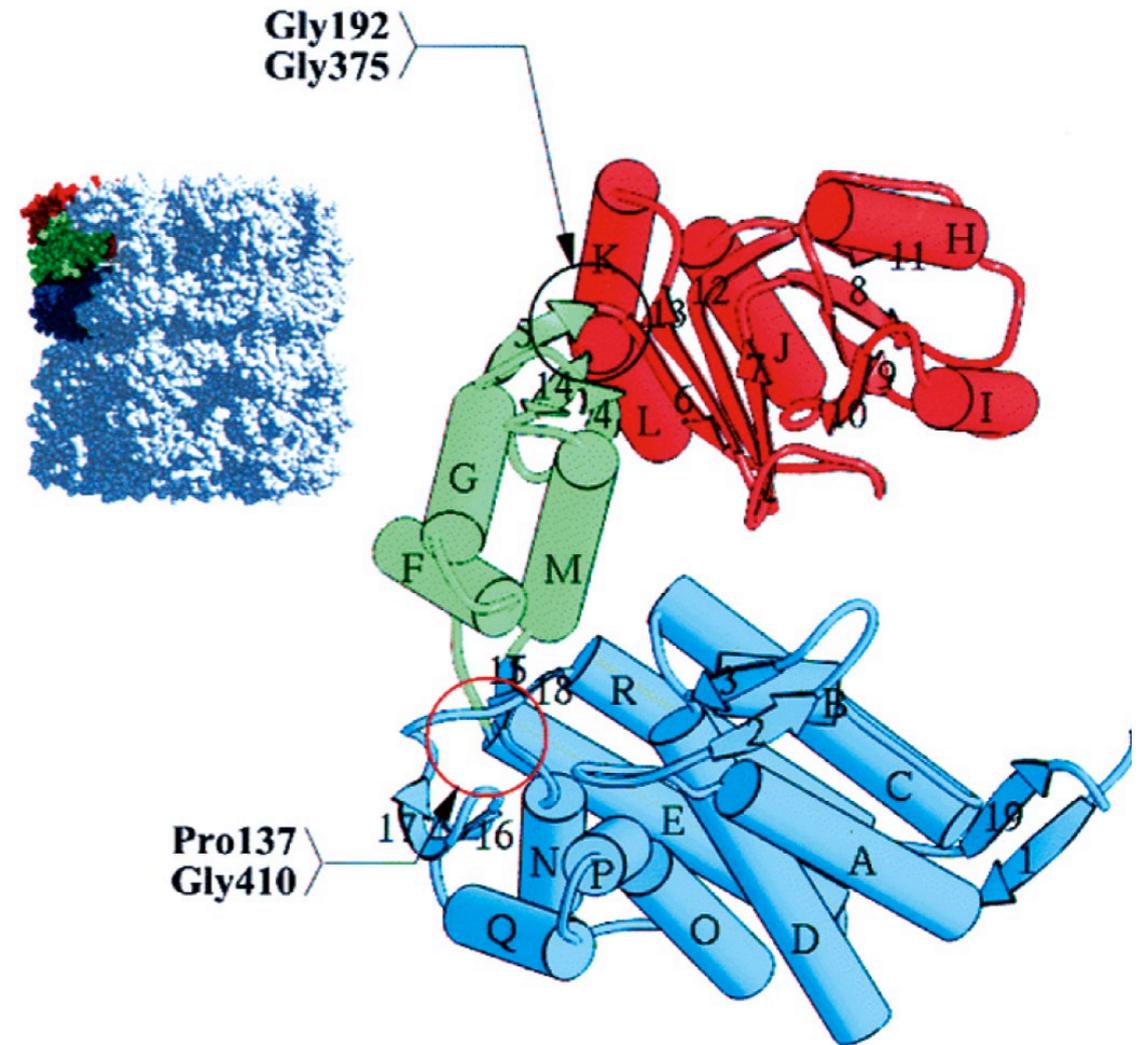
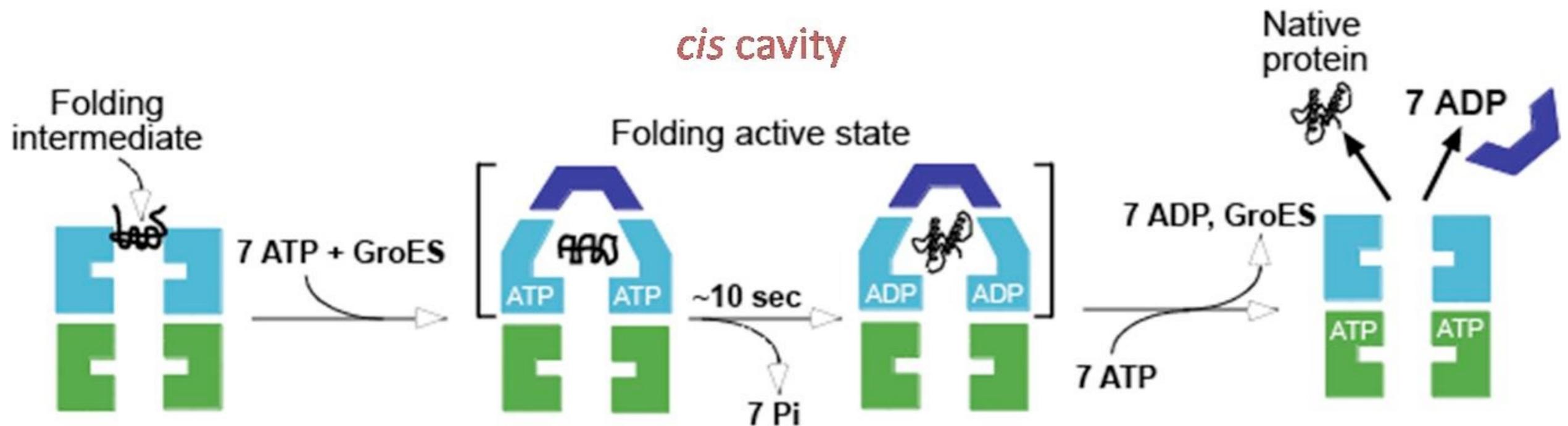


Figure 9-22a
 Courtesy of Arthur Horwich, Yale University

GroEL (Hsp60) - GroES (Hsp10)

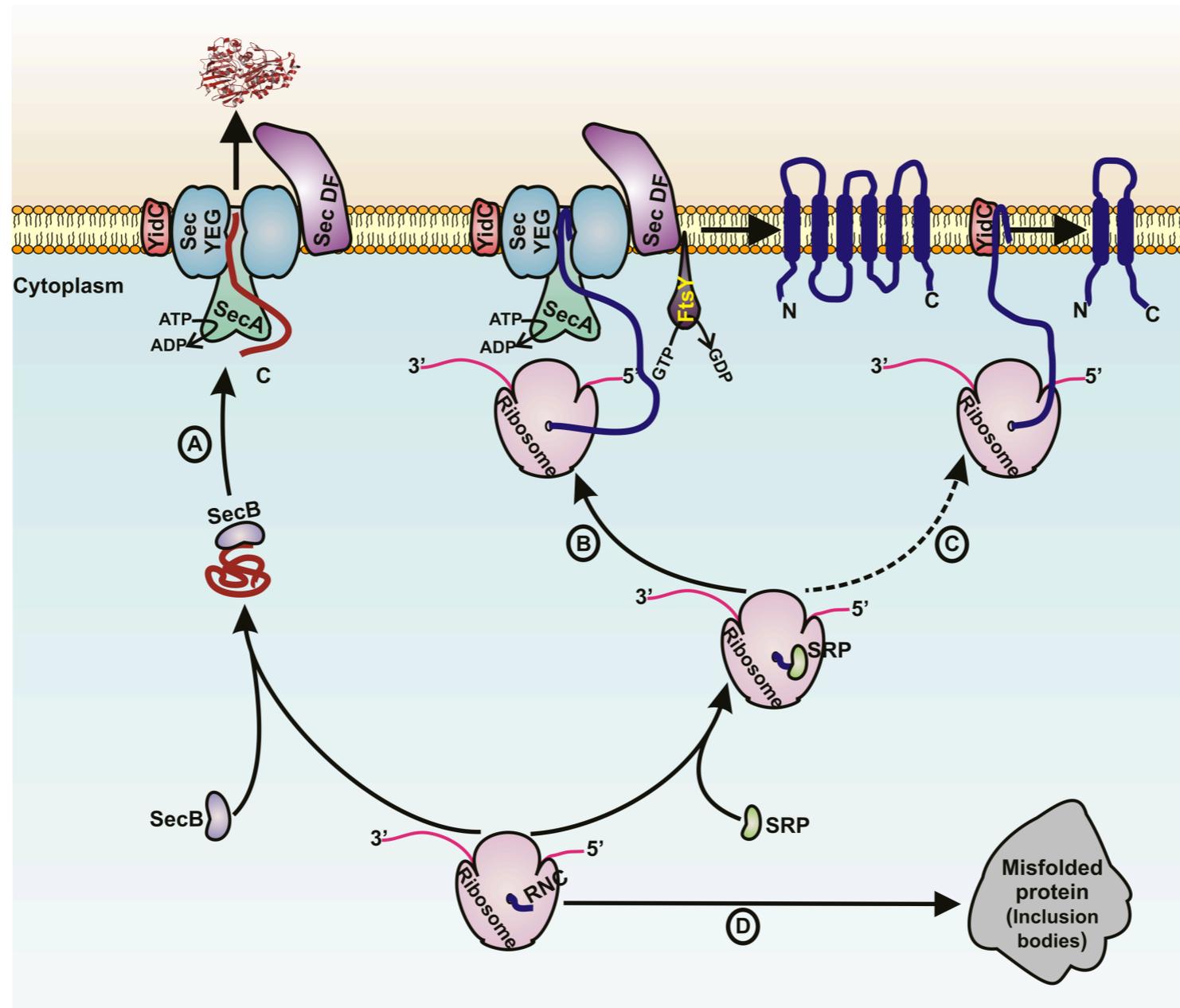


Tang et al. (2006) *Cell* 125: 903-914

GroEL liga-se a superfícies hidrofóbicas com muito maior afinidade do que GroEL-GroES-ATP

Annealing mechanism: ao ligar superfícies hidrofóbicas GroEL impede a agregação de intermediários não produtivos de enovelamento, permitindo que estes intermediários desenovelem-se e reenovelem-se formando um intermediário produtivo

- Enovelamento de proteínas de membrana



Recombinant membrane protein production: past, present and future
 Ravi K. R. Marreddy, Eric R. Geertsma, e Bert Poolman