

Fibrilación de proteínas: lo bueno, lo malo y lo feo

Protein fibrillation: the good, the bad and the ugly

Karen Segura

Universidad Antonio Nariño
Grupo de Ciencias Biológicas y Químicas,
Facultad de Ciencias Bogotá

Edwin Andrés Malagón

Universidad Antonio Nariño
Grupo de Ciencias Biológicas y Químicas,
Facultad de Ciencias Bogotá
edmalagon@uan.edu.co

Resumen

Los procesos de fibrilación de proteínas se refieren a la unión de cadenas ligeramente modificadas en su estructura nativa, formando pequeñas fibras. Se conoce poco acerca del mecanismo que conduce a estas conformaciones, una hipótesis difundida y aceptada es la del cono entrópico, según la cual una estructura pre-desplegada es crucial en el crecimiento de fibras. La fibrilación puede presentar ventajas en cuanto a que las proteínas así conformadas tienen cualidades aprovechables tecnológicamente. Por otra parte, si el proceso ocurre en tejidos podría generar enfermedades conocidas como amiloidosis. En la Universidad Antonio Nariño se han estudiado moléculas macrocíclicas tipo resorcinareno capaces de inhibir la fibrilación de algunas proteínas.

Palabras clave:
Amiloidosis, Estructura de proteínas, Fibrilación.

La obtención de fibras proteicas es un proceso que puede darse en cualquier tipo de proteína. La fibrilación implica nuevas propiedades físicas, químicas y biológicas, que en ocasiones pueden ser aprovechadas. En otros casos, se generan reacciones patológicas. El estudio del mecanismo de fibrilación, así como de su inhibición es un tema relevante en el control de las propiedades de las proteínas.

Abstract

Protein fibrillation is a process in which the peptide chains are slightly modified from native structure to yield fibers. The mechanism that leads to this fiber conformations is little known. An accepted hypothesis is the “entropic cone”, according to this hypothesis a pre-unfolded structure plays a crucial role in the fiber growth. Fibrillation can offer certain advantages, since the new structure offers technological possibilities. On the other hand, when the process occurs inside tissues could be responsible to generate a series of illness known as “amyloidosis”. At the University Antonio Nariño a family of macrocyclic molecules, the resorcinarenes, is been studied. Preliminary results indicate that this macrocycles are able to inhibit the fibrillation of certain proteins.

Introducción

La estructura de proteínas está estrechamente relacionada con las propiedades y funcionalidades que presentan a nivel biológico. Toda proteína presenta una (o varias) estructuras en las que conserva una actividad biológica conocida como estado nativo. Sin embargo, esta estructura es susceptible

de sufrir modificaciones. En ocasiones, los cambios conformacionales que pueden darse, por sutiles que sean, generan enormes consecuencias en las funciones biológicas y en las propiedades fisico-químicas. Una de ellas es la agregación de las unidades proteicas, es decir, la unión de varias proteínas que han sufrido una escasa alteración en su forma nativa Fink (1998).

En ocasiones los agregados que se generan no tienen formas definidas, estas uniones se conocen comúnmente como “coágulos” o “precipitados”. Menos frecuente es la unión de proteínas para generar agregados con una forma definida dando lugar a estructuras alineadas, las cuales crecen al unir miles de pequeñas moléculas, lo que conduce a una estructura de tipo fibra, fenómeno que se conoce como “fibrilación” Ledney (2014).

En ocasiones los agregados que se generan no tienen formas definidas, estas uniones se conocen comúnmente como “coágulos” o “precipitados”.

Es interesante notar dos fenómenos que rodean la formación de agregados. En primer lugar, necesariamente está implicada la pérdida de la funcionalidad de las proteínas que se unen, indistintamente si la agregación genera estructuras organizadas o no. En segundo lugar, este fenómeno puede darse aún en el medio nativo espontáneamente.

Los procesos de agregación se han estudiado recientemente con varios fines en mente: entender los mecanismos que llevan a su formación, inhibir o promover esa formación, y obtener agregados con propiedades interesantes a nivel tecnológico.

¿Por qué se agregan las proteínas?

La respuesta es muy sencilla: ¡no se sabe! Sobre todo, considerando que este proceso se da espontáneamente, aún en condiciones nativas que deberían conservar una estructura definida y funcional. Sin embargo, existen hipótesis que permiten entender los fenómenos de agregación. Una explicación muy útil es la que se conoce como “cono entrópico” Borgia et al. (2015). Conviene recordar brevemente algunos conceptos termodinámicos para entender esta hipótesis.

Inicialmente, cuando un proceso se da espontáneamente se dice que tiene una energía libre (ΔG) negativa. La espontaneidad, a su vez, se relaciona con la entalpía (ΔH) y con la entropía (ΔS). Cuando un proceso es espontáneo se debe a que es entálpico o entrópicamente favorable. En otras palabras, la entalpía se relaciona con la energía térmica y la entropía con el grado de desorden molecular, por lo que si un proceso libera calor es favorable por entalpía, mientras que si genera más desorden es favorable por entropía. Como es de suponer, la unión de cadenas proteicas para formar estructuras fibrilares es desfavorable por entropía, ya que las fibras presentan una estructura definida. Esto equivale, por ejemplo, a lanzar un ovillo de lana al aire y que al caer al suelo se formara una bufanda espontáneamente.

El cono entrópico (Figura 1) ilustra un delicado balance entre distintas posibilidades estructurales en proteínas. Inicialmente se tiene una “fase nativa” donde se da una funcionalidad definida con una energía base (arbitrariamente asignada). La estructura puede sufrir cambios reversibles a formas de mayor energía, sutilmente diferentes (estados intermedios). Algunos estados (parcialmente plegados) se forman por la unión de estructuras muy similares al estado nativo que son de menor energía y por tanto más favorables. Posiblemente el hecho de ser más favorables se deba a que un cambio conformacional exponga hélices alfa hidrófobas (representadas como flechas azules en la Figura 1) que se estabilizan por la unión de dos cadenas, ya que el entorno nativo es típicamente acuoso y las cadenas expuestas son hidrófobas. Hasta ahí los cambios son netamente por plegamientos sin mayores consecuencias en la funcionalidad de las proteínas, por lo que todo ello se considera un mismo estado nativo. El proceso de unión puede continuar, es decir, no restringirse a la unión de dos cadenas. Estas uniones más grandes se conocen como núcleos.

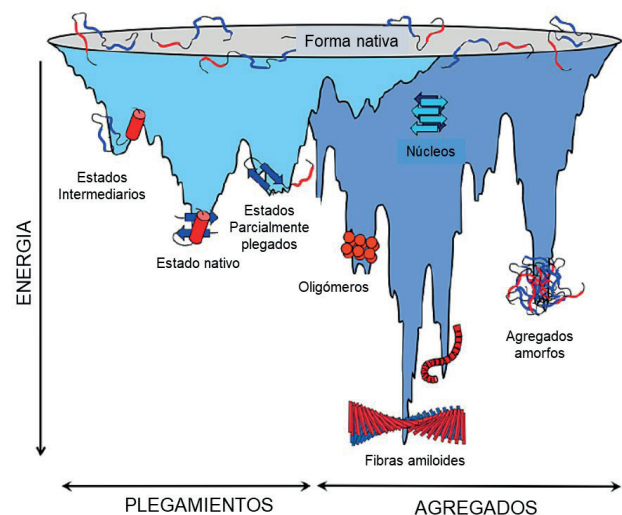


Figura 1. Modelo del cono entrópico para la formación de agregados proteicos. El ancho de los picos se relaciona con la probabilidad energética. Adaptado de Salahuddin (2015).

Los núcleos formados pueden tener varios destinos: generar agregados amorfos, favorecidos por entropía, formar oligómeros parcialmente estructurados o formar fibras amiloides. Esta es la razón por la que las regiones de agregación se conocen como de “cono entrópico”. Muy similares son las uniones que generan oligómeros, donde la favorabilidad aún es entrópica a pesar de que se generan estados semi-organizados. Finalmente, es muy poco probable que el cono genere uniones que, aunque requieren una desorganización previa, conduzcan a agregados paradójicamente organizados, las formas de fibra. Es importante resaltar que el cambio de entropía que lleve a formar fibras no puede darse de cualquier forma. Es necesario una exposición de hélices hidrófobas. Teniendo esto en mente se entiende que la fibrilación es un proceso realmente poco probable. No obstante, una vez se genere un germen de nucleación, el proceso se auto-favorece por un arrastre en un cono entrópico. Esta teoría es debatible, pero experimentalmente tiene solidez, debido a que se ha detectado la presencia de estructuras desorganizadas previa a la formación de fibras organizadas (Militello *et al.*, 2003).

¿Qué es lo bueno?

Lo bueno de la fibrilación de proteínas consiste en dos situaciones distintas. La primera: hay proteínas de uso tecnológico o industrial, cuyas propiedades mejoran al fibrilarse. Por otra parte, su estudio permite elucidar cómo pueden controlarse los procesos de fibrilación.

En efecto, industrias como la alimentaria requieren de ingredientes para otorgar propiedades especiales a los productos finales, tales como panes y bizcochos más flexibles, masas con humedad controlada, mayor digestibilidad de los productos; e incluso, al fibrilarse, pueden disminuirse reacciones alérgicas en ciertos

productos, donde es famoso el caso del gluten (Mohammadian y Madadlou, 2018). Otras aplicaciones tienen origen en la diversidad de grupos funcionales que se dan sobre las fibras obtenidas, lo cual permite el diseño de sensores de afinidad variable a numerosos agentes, como anticuerpos o metales (Knowles y Mezzenga, s.f). Además, la obtención de fibras estables permite el diseño de nuevos materiales (Bolisetty y Mezzenga, 2016).

¿Qué es lo malo?

La fibrilación puede ocurrir tanto *in vivo* como *in vitro*. En particular, es indeseable que se formen fibras dentro de células o tejidos vivos. En medicina, las fibras se conocen como “amiloides” dando origen a una serie de enfermedades llamadas “amiloidosis” (Uversky y Fink, 2004). En medios vivos, la formación de una sola estructura fibrilar arrastra hacia la propagación del proceso, una especie de proceso auto-catalítico, que guarda relación con la teoría del cono entrópico, donde el aumento de desorden es un paso previo para la formación de estructuras fibrilares. Actualmente existen más de veinte enfermedades catalogadas como amiloidosis, entre ellas están el Parkinson y el Alzheimer, que son enfermedades neuro-

degenerativas e irreversibles, en donde las fibras (en particular de la proteína “beta amiloide”) que se forman alrededor de células neuronales generan una capa aislante entre ellas inhibiendo la comunicación intercelular (Han *et al.*, 2017). Otras proteínas, como la albúmina de suero, aunque pueden fibrilarse no están asociadas a una patología. De hecho, en el cuerpo humano hay proteínas que deben formar fibras: el colágeno y la actina son ejemplos claros de ello.

¿Qué es lo feo?

El proceso de fibrilación no está claramente establecido (Militello *et al.*, 2003), aquí se ha mostrado solo una de las hipótesis que existen en torno a él. Pese a la gran utilidad que tendría develar el misterio de la fibrilación, aún no existe una sola explicación ampliamente aceptada. Otra particularidad es que se ha visto que, en las condiciones adecuadas, toda proteína es susceptible a formar fibras. Sin importar si se trata de una proteína globular, amorfa o metaloproteína.

El estudio de la fibrilación es complejo, incluso porque hay ocasiones donde es muy difícil saber si el material obtenido es o no una fibra. Existen métodos protocolarios para saber si un agregado proteico es realmente fibrilar. Uno muy popular consiste en la generación de materiales fluorescentes con sondas especializadas como tioflavina T y rojo Congo (Arasteh *et al.*, 2016). Otra técnica es la inspección visual, para confirmar si el material forma pequeños hilillos. Esto se hace mediante estudios de imágenes de microscopía 10. Ambas técnicas son motivo de debate, ya que no están totalmente estandarizadas para detectar fibras. Aún más difícil es el estudio de estados pre-agregados. Las fases previas escapan de la posibilidad de ser estudiadas por métodos aplicables tanto a fases homogéneas

(diversas espectroscopias) como a heterogéneas (técnicas de microscopía). Es necesario aplicar métodos mixtos y factibles sólo en el estudio de cada proteína en particular.

Estudios realizados en fibrilación de albúmina de suero bovino

Recientemente en el grupo de investigación de Ciencias Biológicas y Químicas, de la Universidad Antonio Nariño, se ha estudiado la cinética de fibrilación de la albúmina de suero bovino. La cual puede ser usada como modelo de procesos de agregación mediante técnicas de microscopía confocal de barrido y fluorescencia de tioflavina T. Además, se estudió el efecto de macrociclos solubles en agua tipo resorcinareno (Figura 2) en dicha cinética.

Se ha encontrado que la presencia de resorcinarenos es capaz de inhibir la fibrilación en rangos que van desde 20 a 60% con respecto a las condiciones de agregación más eficientes de la albúmina. Este hallazgo es interesante en la búsqueda de sustancias con potencial aplicación en farmacéutica.

El uso de macrociclos es una alternativa interesante para detener procesos de agregación, se ha visto que son versátiles en cuanto a las posibilidades

de interacción que presentan frente a una proteína, las cuales incluyen: formación de puentes de hidrógeno, interacciones en la cavidad de macrociclo a través de uniones con la nube electrónica de los anillos aromáticos, interacciones por cargas, todas ellas son uniones donde no se genera una unión fuerte (de tipo covalente) por lo que son conocidas como interacciones supramoleculares.

Los resultados de la interacción con resorcinarenos han permitido evidenciar una reducción considerable en la forma y tipo de agregación, para lo cual se han usado técnicas de microscopía confocal de barrido. En la Figura 3 se muestra cómo una fibra de albúmina en ausencia de macrociclo pasa a generar agregados amorfos, más cortos e identificables como coágulos.

Se ha planteado que la inhibición de la fibrilación obedece a que la unión del macrociclo genera estructuras donde la exposición de las regiones hidrófobas de la proteína se ve impedida. Estas regiones son ricas en motivos de tipo hélice, que son fundamentales para la alineación los núcleos, tal como lo sugiere el modelo del cono entrópico. Dichas uniones se han modelado usando técnicas de docking molecular, un ejemplo de ello se muestra en la Figura 4.

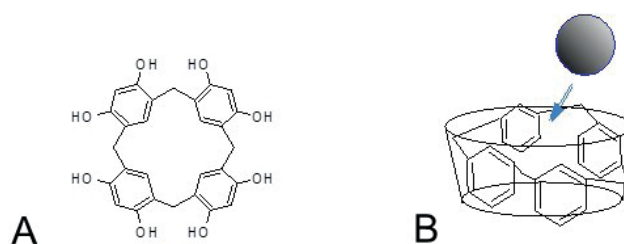


Figura 2. A. Estructura general de los resorcinarenos. B. forma de copa, en donde se muestra que pueden alojarse moléculas que actúan como huésped.

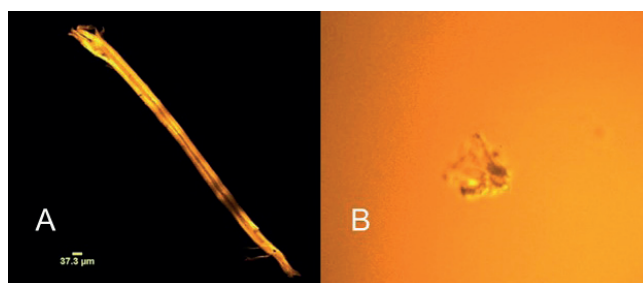


Figura 3. A. Imagen microscópica de una fibra de albúmina. B Imagen de un agregado no fibrilar, ala misma escala, inhibido por la acción de resorcinarenos. Tomada usando microscopio confocal de barrido Olympus objetivo FV1000 60x/1.42 oil PlanApo N.

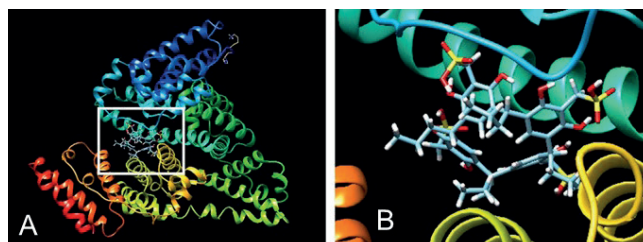


Figura 4. A. Simulación del sitio de unión de un resorcinareno en albúmina. B. Ampliación de la región marcada en recuadro blanco. La visualización se realizó usando el software CHIMERA 1.13.1rc.

Otros estudios han revelado que los resorcinarenos también inhiben la fibrilación del amiloide abeta, relacionado con el Alzheimer, y de la insulina, relacionada con la diabetes (Han *et al.*, 2017). El uso de albúmina podría permitir el estudio del mecanismo de agregación por medio de técnicas que no son aplicables a proteínas poco disponibles por la dificultad que tienen en su purificación.

Conclusiones

La fibrilación de proteínas es un tema de interés en la actualidad. Uno de los principales objetivos en la investigación de este tema es proporcionar información que permite esclarecer los mecanismos que conllevan a la agregación fibrilar. A pesar de las aplicaciones que tiene el estudio de este tema, no es clara aún la forma en que una estructura proteica definida cambia a nivel de organización intermolecular para agregarse perdiendo su funcionalidad biológica. En el caso de la investigación que se realiza en la Universidad Antonio Nariño, se han descubierto moléculas capaces de inhibir eficientemente la formación de fibras.

Fichas biográficas de los autores

Karen Segura: una de las primeras egresadas del programa de Bioquímica de la Universidad Antonio Nariño. Su interés en la investigación se ha enfocado en las descripciones termodinámicas de los fenómenos de agregación.



Andrés Malagón: Docente investigador, ha trabajado en interacciones entre macrociclos y biomoléculas. Además se interesa en la investigación básica de los resorcinarenos, en cuanto a estructura y reactividad.



Referencias

- Fink, A. L. (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Design*. 3, 1, pp. 9-23.
- Lednev, I. K. (2014). Amyloid Fibrils: The Eighth Wonder of the World in Protein Folding and Aggregation. *Biophys. J.* 106, 7, pp. 1433-1435.
- Borgia, A., Kemplen, K., Borgia, M.B., Sorano, A., Shammass, S., Wunderlich, B., Nettels, D., Best, R.B., Clarke, J. y Schuler, B. (2015). Transient misfolding dominates multidomain protein folding. *Nature Comm.* 6, 8861.
- Salahuddin, P. (2015). Protein Folding, Misfolding, Aggregation and Amyloid Formation: Mechanisms of A β Oligomer Mediated Toxicities. *J. Biochem. Mol. Biol. Res.* 1:2.
- Mohammadian, M. y Madadlou, A. (2018). Technological functionality and biological properties of food protein nanofibrils formed by heating at acidic condition. *Trends in Food Science and Technology*, 75, pp. 115-128.
- Knowles, T.P.J. y Mezenga, R. (s.f.). Technological functionality and biological properties of food protein nanofibrils formed by heating at acidic condition. *Advanced Materials*, 28(31), pp. 6546-6561.
- Bolisetty, S. y Mezzenga, R. (2016). Amyloid-carbon hybrid membranes for universal water purification. *Nat. Nanotech.* 11, 4, pp. 365-371.
- Uversky, V. N.; Fink, A. L. (2004). Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Bioch. Biophys. Acta. Protein Proteomics*. 1698, 2, pp. 131-153.
- Militello, V., Vetri, V. y Leone, M. (2003). Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Bioph. Chem.* 105, pp. 133-141 [doi.org/10.1016/s0301-4622(03)00153-4].
- Arasteh, A., Rashvand, M., Habibi, A. E., Raezaeli, M. H. y Movahedi, A. K. (2016) Optimization of Bovine Serum Albumin Fibrillation by Congo Red Spectrophotometry for Using as a new Bionanomaterial. *Int. J. Adv. Sci. Eng. Techn.* 2, pp. 59-65.
- Gras, S., Waddington, L.J. y Goldie, K. (2011). Transmission Electron Microscopy of Amyloid Fibrils. *Methods mol. Biology.* 752, pp. 197-214.
- Han, X.; Park, J.; Malagon, A.; Wang, L.; Vargas, E.; Wikramanayake, A.; Houk, K.N.; LeBlanc, R. (2017) A resorcinarene for inhibition of A β fibrillation. *Che. Sci.* 3, pp. 2003-2009.
- Han, X., Tian, C., Gandra, I. Eslava, V., Galindres, D., Vargas, E. y LeBlanc, R. (2017). The Investigation on Resorcinarenes towards either Inhibiting or Promoting Insulin Fibrillation. *Chem. Eur. J.* 23, 71, 17903-17907.