

Revisión

## ¿Es el glóbulo fundido un intermediario general en la vía de plegamiento de las proteínas globulares?

María Elena Cháñez-Cárdenas<sup>1</sup> y Edgar Vázquez-Contreras<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Insurgentes sur 3877, Col. La Fama, 14269.

<sup>2</sup> Instituto de Química. Departamento de Bioquímica. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria México, D.F. 04510, México. \* Tel (+52) 56 22 45 65; Fax: (+52) 56 16 22 17; [vazquezc@servidor.unam.mx](mailto:vazquezc@servidor.unam.mx)

Recibido el 2 de septiembre del 2003; aceptado el 10 de noviembre del 2003

**Resumen.** El glóbulo fundido se considera como un tercer estado termodinámico de la ruta del plegamiento de las proteínas (junto con los dos previamente establecidos: nativo y desnaturalizado). Este estado ha sido observado bajo ciertas condiciones desnaturantes, y es un conformero con propiedades intermedias entre los estados nativo y desplegado. En los estudios de plegamiento de proteínas, es particularmente importante conocer la estructura y los cambios de energía asociados a la formación de estados intermediarios transitorios que se puedan identificar durante el proceso de plegamiento de proteínas globulares, para entender los factores que dirigen el proceso de plegamiento. Un gran número de estudios indican que muchas proteínas globulares (aunque no todas) presentan este estado intermediario bajo condiciones de equilibrio.

**Palabras clave:** Plegamiento de proteínas, intermediarias del plegamiento, glóbulo fundido.

**Abstract.** The molten globule state has been considered like a third thermodynamic state of the protein molecules (in addition to the two previously established states —the native and the unfolded—). This intermediate state is observed under certain denaturant conditions, and represents a conformational state with properties between those observed in the native and unfolded states. In protein folding studies it is important to understand the structure and energy changes associated with the formation of transient intermediate states involved during the acquisition of the three-dimensional structure. Many, but not all globular proteins in folding studies show this compact intermediate state under equilibrium conditions.

**Key words:** Protein folding, molten globule.

El plegamiento (“folding”) es el proceso mediante el cual una cadena polipeptídica en estado desplegado (*U* de “unfolding”) se pliega hacia la estructura tridimensional que posee una función biológica específica. A esta última se le conoce como estado nativo (*N*), pues es en esta condición en la cual la proteína pasará la inmensa mayoría su existencia (revisado en [1]). Debido a que la información genética está codificada en el ADN y se expresa únicamente después de que la estructura *N* se ha formado, al plegamiento se le conoce como la segunda parte del código genético y es por tanto, una cuestión fundamental en la biología molecular actual.

### Intermediarios estables

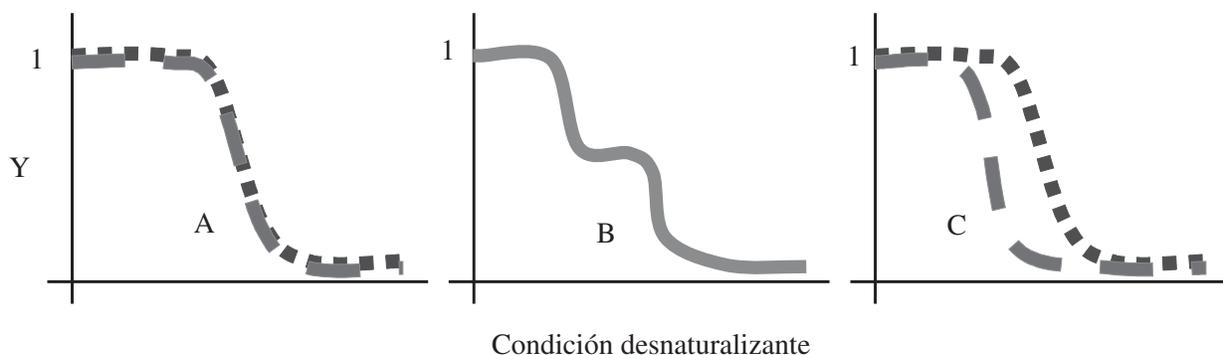
El modelo más sencillo para explicar el plegamiento de una proteína, es el de dos estados. En este modelo, los procesos de desnaturalización y plegamiento son completamente cooperativos y no hay poblaciones de intermediarios estables en el equilibrio; en cualquier momento, sólo existe una variación entre las poblaciones entre el estado *N* y el *U*. En el caso de proteínas en las cuales existen regiones de la cadena polipeptídica con estabilidad estructural independiente, este modelo no es apropiado. Como resultado de esta idea, se ha propuesto que durante la transición tridimensional de la secuencia primaria hacia la estructura tridimensional con actividad biológica,

existen estados transitorios —intermediarios cinéticamente accesibles— que actúan como guías en el plegamiento. De ahí que en la actualidad, una buena parte de los estudios de plegamiento están enfocados en la búsqueda de estos conformeros, pues si se llega a conocer su estructura así como los cambios de energía asociados a su formación, será posible entender los factores que gobiernan el plegamiento por medio de rutas productivas.

A pesar de que el plegamiento de proteínas monoméricas es generalmente un proceso de dos estados, existen proteínas para las cuales un aumento en la condición desnaturante alrededor de la transición *N/U*, produce conformaciones parcialmente desplegadas (Tabla I). La presencia de intermediarios en la ruta de plegamiento ocasiona que el cambio en las propiedades estructurales de las proteínas al aumentar la condición desnaturante no sea descrito monofásicamente, o bien que los patrones obtenidos siguiendo diferentes propiedades —estructurales o funcionales— de la proteína en cuestión, no sean coincidentes (Fig. 1).

### Condición desnaturante

En este sentido, uno de los primeros ejemplos descritos para el plegamiento fue el de la anhidrasa carbónica [2], cuyo modelo



**Fig. 1.** Algunas pruebas para determinar el patrón de plegamiento en estudios al equilibrio. Y: es una señal de la proteína sensible a cambios en los diferentes niveles de estructura de la misma (ver más adelante en el texto). A. patrones monofásicos coincidentes (mecanismo de dos estados). B. patrón no monofásico (tres estados). C.- patrones no coincidentes (no dos estados).

molecular cristalográfico no presenta dominios. Para esta enzima se ha estudiado el corrimiento en la constante de velocidad para el plegamiento ( $K_{\text{pleg}}$ ), como función de la concentración de clorhidrato de guanidinio (Gdn-HCl), un potente desnaturalizante. Las alteraciones producidas por este perturbante, se cuantificaron por cambios en dicroísmo circular (CD), absorción ultravioleta y rotación óptica (Y en la Figura 1). La observación fue clara, los patrones de desnaturalización obtenidos por estas técnicas no son coincidentes; además, estudios de la cinética de renaturalización de esta enzima sugieren que la reacción no es un proceso homogéneo de primer orden. A partir de estos resultados se ha concluido que en la transición existe al menos un intermediario.

Para algunas proteínas se ha propuesto que el mecanismo de plegamiento es a través de dominios estructurales, en el cual ciertas unidades de estructura secundaria se pliegan independientemente para formar regiones globulares que finalmente colapsan en la estructura *N*. Este postulado es razonable cuando existen evidencias experimentales (por cristalografía o calorimetría) que hagan sospechar la evidencia de los dominios, como en el caso de la piruvato cinasa [3] o la 3-fosfoglicerato cinasa [4]. El hecho es que las estructuras intermedias estables se han observado incluso cuando no hay razón para sospechar la existencia de dominios en el plegamiento.

Por más pequeña que sea la secuencia de aminoácidos es imposible pensar que una proteína pueda visitar todas las conformaciones posibles para plegarse correctamente. Por ejemplo, si una cadena polipeptídica tiene 100 residuos y en promedio cada residuo puede adoptar 10 conformaciones, la cadena podrá adoptar  $10^{100}$  conformaciones. Si la velocidad de transformación de una conformación en otra es muy rápida por ejemplo de  $10^{-13}$  s, el tiempo promedio requerido para visitar todas las posibles conformaciones sería del orden  $10^{81}$  años. El resultado de esta estimación, es muchas veces mayor que la edad del universo ( $15^9$  años). A pesar de lo anterior, las proteínas generalmente adoptan su estructura tridimensional funcional en intervalos de milisegundos-segundos. Para resolver esta paradoja, Levinthal a finales de la década de los 60s,

postuló la existencia de rutas preferenciales en el plegamiento de los polipéptidos. En estas rutas, la cadena polipeptídica viaja a través de una secuencia específica de intermediarios hasta plegarse en la estructura *N*. Debido a lo anterior, la detección y caracterización de los intermediarios estables que aparecen en las rutas desde el estado *N* (desnaturalización) o hacia él (renaturalización) son preguntas centrales en los estudios de plegamiento. A pesar de la inmensa diferencia que existe entre las secuencias y los motivos estructurales de las proteínas, los intermediarios que se observan en los estudios al equilibrio de muchas proteínas presentan características comunes: son estructuras de tamaño molecular y cantidad de estructura secundaria parecidas a las que existen en la estructura *N*, pero que carecen de estructura terciaria específica. A principios de la década de los 80s dos grupos [5,6] de manera independiente propusieron que los intermediarios observados al equilibrio, probablemente pertenecen a un estado físico común de las proteínas globulares, al cual denominaron estado de "glóbulo fundido" (GF). A mediados de esa década, otro grupo [7,8] mostró por medio de cinéticas de renaturalización, que para la  $\alpha$ -lactalbúmina desnaturalizada con Gdn-HCl, existe un intermediario idéntico al que se observa en estudios al equilibrio. Por lo tanto, se ha propuesto regularmente en la literatura que el GF es un intermediario general del plegamiento de proteínas.

## El glóbulo fundido (GF)

El glóbulo fundido (GF) es un estado de la cadena polipeptídica obtenido experimentalmente en la renaturalización de *U* o en la desnaturalización de *N*. Las características estructurales comunes [9-11] al estado de GF son: *i*) La presencia de una elevada cantidad de estructura secundaria; *ii*) ausencia de la mayoría de la estructura terciaria específica producida por el alto empaquetamiento de las cadenas laterales; *iii*) es un conformero compacto, con un radio de giro entre 10 y 30% mayor que el observado para el estado *N* y *iv*) la molécula ha perdido

parte del núcleo hidrofóbico, lo que incrementa la accesibilidad de superficie hidrofóbica de la molécula al solvente. A la fecha, no ha sido posible cristalizar a ningún polipéptido en este estado y sus propiedades de RMN (resonancia magnética nuclear) se parecen más a la estructura *U* que a la *N*. A pesar de los aspectos aparentemente estáticos de la estructura descritos anteriormente para el GF, la molécula es muy dinámica y flexible. El estado de GF no puede ser representado por una única conformación sino por un número de conformaciones diferentes que se interconvierten rápidamente unas en otras. De hecho, estas características permiten que algunas moléculas de agua penetren en la estructura. En este estado condensado la entropía configuracional de *U* ha sido reducida significativamente debido a las restricciones impuestas por el volumen excluido [12].

Las técnicas convencionales (Fig. 1) utilizadas para caracterizar la estructura del GF son *i*) espectro de dicroísmo circular en la región 222 nm, a esta longitud de onda se verifica la presencia del enlace peptídico que modifica las propiedades de elipticidad en esa región; este hecho demuestra un cambio en la cantidad de estructura secundaria tipo  $\alpha$  hélice. Por otra parte, siguiendo el cambio en la elipticidad a una longitud de onda de 270 nm, se pueden observar modificaciones en la estructura terciaria, al hacer evidente el ocultamiento o exposición de los aminoácidos aromáticos al solvente; *ii*) técnicas hidrodinámicas como cuantificación de la viscosidad y cromatografía de filtración molecular para determinar el tamaño molecular de la proteína y *iii*) el uso de moléculas fluorescentes como el ANS, o sus análogos, para detectar la formación de regiones particulares expuestas al solvente [13,14]. Todas estas técnicas proveen de información sobre características estructurales promedio de la proteína en cuestión. En los últimos años, se han utilizado nuevas aproximaciones para caracterizar la estructura del GF, entre ellas se encuentran: RMN, dispersión de rayos X en solución y técnicas de ingeniería de proteínas. Estos métodos han sido exitosos en la caracterización del GF que aparece al someter a las proteínas a condiciones ligeramente desnaturizantes. Estos estudios recientes muestran que la estructura del GF es más heterogénea de lo que inicialmente se pensaba. Una porción de la estructura está más organizada, parecida a la estructura *N*, mientras que otras se tornan menos organizadas; las características estructurales detalladas, dependen fuertemente de la proteína en estudio.

Cuando algunas proteínas se someten a condiciones que difieren significativamente de aquellas que se observan *in vivo*, el número de conformaciones estructuradas que pueden ser estables aumenta. De ahí que para hacer evidente el estado intermediario es necesario someter a la proteína a condiciones extremas. Es precisamente a partir de estas observaciones que se ha propuesto que el GF puede ser un intermediario en la vía de plegamiento *in vivo*.

Por otra parte, se ha argumentado en la literatura que los estados intermediarios detectados en la reacción de plegamiento-desplegamiento de muchas proteínas bajo diversas circunstancias, son ejemplos del estado GF [15]. Sin embargo, hay

que tomar en cuenta que la cuantificación de las mismas propiedades físicas no siempre es posible para todas las proteínas en condiciones idénticas, por lo cual, el asignar la presencia del mismo estado a todas ellas no es totalmente concluyente.

En la Tabla I se muestran 66 proteínas diferentes que poseen dentro de la vía de plegamiento al intermediario tipo GF; este número sugiere que el GF no es una rara excepción; por el contrario es probable que este intermediario sea típico para muchos tipos de proteínas en condiciones de desnaturización discretas.

Las proteínas pueden ser transformadas *in vitro* al estado de GF al modificar algunas condiciones del medio que las contiene. Por ejemplo (revisado en [10]), al incrementar o disminuir el pH de la solución; también es posible obtener este estado al incrementar la temperatura. Al agregar concentraciones moderadas de perturbantes químicos como la urea o sales de guanidinio; o bien por la influencia de sales como el  $\text{LiClO}_4$  y otras. El GF puede obtenerse también al someter a la proteína a un aumento en la presión atmosférica. También se ha reportado que el ácido tricloroacético produce la aparición del GF [16], así como el hexafluoroisopropano [17].

Las proteínas pueden ser transformadas al GF sin modificar las condiciones de la solución que las contiene, es decir en condiciones que semejan el medio original en donde se encuentra la proteína, modificando la estructura química de la macromolécula. A continuación se describen los ejemplos disponibles en la literatura.

El GF se presenta en la nucleasa estafilococal al remover 21 residuos del C-terminal de la proteína [18]. Sorprendentemente, remover únicamente 13 de estos residuos lleva a la proteína a desplegarse calorimétricamente en un mecanismo de dos estados [19]. Siguiendo con esta caracterización, se ha encontrado que una doble mutación en esta proteína, también produce un GF [20]. Por otra parte, una triple mutación puntual, transforma la estructura nativa de la lisozima del fago T4 en un GF [21]. El reemplazo de residuos de ácido aspártico en la superficie del dominio P de la colicina A por alanina, son necesarios para la formación del GF (Tabla I). El caso más crítico en cuanto a alteraciones de la vía del plegamiento por mutación de algunos residuos, se ha reportado en la apomio-globina [22] y en la interleucina 6 [23], en donde una mutación puntual modifica el patrón de plegamiento.

Para la proteína BPTI (Tabla I), el simple hecho de reducir sus puentes disulfuro, produce un GF [24]; se ha mostrado también que un análogo de la proteína que contiene únicamente uno de los puentes disulfuro, posee bajo ciertas condiciones experimentales características de GF [25].

Los intermediarios tipo GF se han detectado en proteínas que no tienen relaciones estructurales aparentes (Tabla I) y bajo diversas condiciones, todas ellas extremas. Diversas propiedades físicas se han cuantificado para este tipo de intermediarios. La mayor parte de la señal de dicroísmo circular (entre 200-240 nm) observada en la enzima nativa es retenida en el estado intermediario, lo cual sugiere que la estructura secundaria se conserva; esto es, las  $\alpha$ -hélices y estructuras  $\beta$

**Tabla I.** Proteínas cuyo patrón de plegamiento incluye a un glóbulo fundido.

$\alpha$ -lactalbúmina <sup>5</sup> [26-28]	análogo de cardiotoxina III [29]
citocromo c [5]	BPTI $\phi$ [30]
anhidrasa carbónica [31]	glutamini-tARN sintetasa [32]
fragmento Fc de IgG [33]	$\alpha$ -fetoproteína [34]
hormona de crecimiento bovina [35]	dihidrofolato reductasa [36]
aspartato aminotransferasa [37]	apo-ceruloplasmina [38]
$\beta$ -lactamasa [39]	albúmina <sup>3</sup> [40,41]
$\beta$ -lactoglobulina [42]	equinatoxina II [43]
fosfoglicerato cinasa [10]	interferon gama [44]
interleucina <sup>6</sup> [10,45,46]	Fosfatasa [47]
colicina <sup>2</sup> [48,49]	xilosa reductasa [50]
triptofano sintasa <sup>3</sup> [51,52]	Catepsina [53]
Arc [54]	Fetuina [55]
des-pentapéptido-insulina <sup>8</sup> [56]	apoflavodoxina (fragmento) [57]
estefina B [58]	proteína triplex <sup>5</sup> [59]
proteína de unión del retinol [60]	Papaina [61]
Lisozima [62]	Lectina de cacahuete [63]
Acetilcolinesterasa [64]	fosfolipasa A2 [65]
factor-4 de las plaquetas [66]	StAR <sup>6</sup> [67]
creatinasa (en estado A) [68]	proteína que une maltosa [69]
Apomioglobina [70]	proteína de unión de calcio <sup>6</sup> [71]
nucleasa estafilococal [72]	proteína de 33 kDa <sup>2</sup> [73]
superóxido dismutasa [74]	Caleritrina [75]
Barstar [76]	PAS domain receptor photoactive yellow protein [77]
ribonucleasa A [78]	Cistatina [79]
Factor de necrosis tumoral [80]	Clusterina [81]
DnaK [82]	glutamato deshidrogenasa [83]
prion del scrapie [84]	Xilanasas [85]
Barnasa [86]	neurotoxina del botulismo [87]
ADN metiltransferasa <sup>7</sup> [88]	apolipoproteína E4 [89]
creatina cinasa <sup>90</sup>	

<sup>5</sup>: humano, cobayo y bovino, respectivamente; <sup>6</sup>: 1 $\beta$ , 2 y 6 respectivamente; <sup>2</sup>: A y E, respectivamente; <sup>3</sup>: subunidad  $\beta$ 2 y subunidad  $\alpha$  respectivamente; <sup>8</sup>: análogo monomérico de la insulina; <sup>3</sup>: de huevo y de suero humano, respectivamente;  $\phi$ : inhibidor de la tripsina pancreática bovina; <sup>7</sup>: subunidad de reconocimiento; <sup>5</sup>: del virus herpes simplex; <sup>6</sup>: steroidogenic acute regulatory protein; <sup>6</sup>: en el retículo sarcoplásmico; <sup>2</sup>: del fotosistema II.

se forman espontáneamente en la renaturalización o permanecen en la desnaturalización [91]. Por otra parte, en el estado intermediario, la señal de CD entre 260-290 nm disminuye casi completamente, lo cual resulta de la pérdida de la asimetría en el ambiente que rodea a los fluoróforos intrínsecos de la proteína *i.e.* los aminoácidos aromáticos.

Después de la formación del intermediario, el espectro de RMN se torna más sencillo, semejante al observado para el enrollamiento al azar. Esto es de esperarse ya que se pierde el ambiente particular que se encuentra alrededor de cada aminoácido [5]. La intensidad de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos sufre apagamiento y corrimiento a longitudes de onda mayores, lo cual es resultado de la exposición parcial o total de estos residuos al solvente. En los casos en los que ha sido posible cuantificar la viscosidad intrínseca, tiempos de relajación rotacional y coeficientes de difusión de estos intermediarios, se ha observado que son indistinguibles de los que se observan en *N*, pero muy diferentes a los que se presentan en el enrollamiento al azar [5,92]. Estas observaciones en con-

junto han permitido demostrar que el GF es una estructura globular compacta semejante a la que presenta *N*.

Si el GF define a los intermediarios que aparecen en la ruta cinética entre *N* y *U* entonces, el “modelo de condensación” para el plegamiento de un polipéptido puede ser una buena aproximación para describir al proceso (revisado en [93]). En este modelo, el enrollamiento al azar espontáneamente colapsa bajo la influencia del efecto hidrofóbico para formar una estructura condensada que puede ser un GF. Este intermediario demuestra el número limitado de conformaciones accesibles en la condensación del polímero hacia la conformación *N*.

La alternativa al modelo de condensación es el “modelo de nucleación” (revisado en [93]); en el cual, la configuración metaestable asumida espontáneamente por un pequeño segmento del polipéptido es similar a aquella que el mismo segmento tiene en la estructura *N*. Este pequeño núcleo se asemeja a la configuración en la enzima *N* tanto en sus interacciones secundarias como terciarias. A partir de este núcleo, otros seg-

mentos de la cadena difunden para producir la estructura  $N$ . La evidencia para esta propuesta deriva de observaciones en las cuales pequeños segmentos de polipéptido pueden asumir estados estructurados diferentes al enrollamiento al azar.

## Descripción de un glóbulo fundido

Debido a lo anterior es de utilidad describir la estructura del GF de una proteína globular típica:

### La $\alpha$ -lactalbumina y la lisozima que une $\text{Ca}^{2+}$

La  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA) y la lisozima, son proteínas globulares homólogas, que consisten de 123 a 130 residuos. Desde el punto de vista evolutivo, la familia  $\alpha$ -LA-lisozima se divide en tres grupos [94]:  $\alpha$ -LA, lisozima que une  $\text{Ca}^{2+}$  y lisozima convencional (que no une  $\text{Ca}^{2+}$ ). La estructura tridimensional de los tres grupos es esencialmente la misma, está compuesta por el dominio carboxilo terminal que está formado por 4  $\alpha$ -hélices y una hélice  $3_{10}$ . Se ha podido caracterizar otro dominio, el cual contiene una hoja  $\beta$ , una hélice  $3_{10}$ , además de largas asas irregulares [95]. Estas enzimas poseen 4 puentes disulfuro; la  $\alpha$ -LA y la lisozima que une  $\text{Ca}^{2+}$  unen al catión cerca de la región interdominios.

### El GF de la $\alpha$ -lactalbúmina

Este intermediario que es el paradigma del GF, se ha observado bajo diferentes condiciones experimentales e incluye un intermediario al equilibrio en la desnaturalización inducida por desnaturalizantes, acidificación del medio (conocido como "estado A") y removiendo el ion  $\text{Ca}^{2+}$  a pH neutro. También se ha observado en los eventos tempranos de estudios cinéticos para la renaturalización [96] y se ha demostrado que todos estos intermediarios, son idénticos entre ellos. Dentro de las características que poseen estos intermediarios se encuentran las siguientes:

#### a. Estructura secundaria

Todos los elementos de estructura secundaria presentes en el estado A, de la  $\alpha$ -LA, son estables en  $N$ , todos ellos se encuentran en el dominio  $\alpha$ , por lo cual este GF tiene una estructura heterogénea [11]. La formación de estos elementos helicoidales, indica interacciones nativas entre las hélices, ya que los elementos helicoidales no son estables por ellos mismos.

#### b. Grado de compactación y plegamiento terciario semejante al estado nativo

El tamaño compacto de una proteína en estado de GF se conoce desde hace tiempo, este hecho es consistente con la presen-

cia de plegamiento terciario semejante al estado nativo, *i.e.* organización espacial de los elementos de la estructura secundaria como en el estado  $N$  [11]. El radio de giro ( $R_G$ ) cuantificado por dispersión de rayos X es solamente 10 % mayor que el del estado  $N$  y es mucho más pequeño que aquel de la enzima con los puentes disulfuro intactos en el estado  $U$ , la cual es el doble de la enzima  $N$ . El GF de esta enzima es el más pequeño reportado.

El GF de la  $\alpha$ -LA posee tanto empaquetamiento nativo como no nativo de las cadenas laterales, que se forma gracias a interacciones no polares entre los aminoácidos hidrofóbicos, lo cual permite estabilizar elementos de estructura secundaria en la molécula. Además de los aspectos estáticos mencionados anteriormente, el GF de esta proteína es muy dinámico y flexible, por lo que no puede ser representado por una única conformación, sino por un número de ellas que se interconvierten unas en otras. Este carácter dinámico y flexible permite a las moléculas de agua penetrar al interior de la proteína, de tal forma que el GF está muy hidratado [11].

### El GF de la lisozima que une $\text{Ca}^{2+}$

La lisozima de la leche equina o canina pertenece a las lisozimas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  y forma un intermediario tipo GF en Gdn-HCl y también en condiciones ácidas (revisado en [11]). Estas propiedades lo hacen análogo al descrito para la  $\alpha$ -LA. Aún así, el GF de esta lisozima es muy diferente. Este conformero es más parecido al estado N, muchas de las interacciones de empaquetamiento de residuos aromáticos se preservan. Pero a diferencia del GF que presenta la  $\alpha$ -LA, el de la lisozima que une  $\text{Ca}^{2+}$  no presenta transición térmica cooperativa, es un intermediario del desplegamiento térmico, se supone que las interacciones nativas que contiene son las responsables de este efecto. Por medio de diversas pruebas se ha concluido que en el interior del GF de la Lisozima que une  $\text{Ca}^{2+}$ , existen residuos de triptofano inmóviles, esta observación es contraria a la que se presenta en el intermediario de la  $\alpha$ -LA, cuyos triptofanos están expuestos al solvente.

### Posibles papeles del glóbulo fundido *in vivo*

En las secciones anteriores se mencionaron las características del GF encontrado en la vía de plegamiento de algunas proteínas *in vitro*, en condiciones que se alejan en gran medida de aquellas que se observan en los seres vivos. Pero ¿el GF tiene algún papel en el plegamiento *in vivo*? Para contestar esta pregunta hay que recordar que existen muchas diferencias entre las condiciones que se utilizan en los experimentos para evidenciar la presencia del GF, mencionados en las secciones anteriores y las condiciones que ocurren en el ambiente celular. Por ejemplo, la temperatura, salinidad, capacidad amortiguadora de las soluciones, así como la concentración de proteína y cosolutos son muy diferentes en ambas situaciones. En

los sistemas vivos, las proteínas pueden ser sometidas a diferentes condiciones desnaturizantes leves como cambios en temperatura, pH o solubilidad en membranas. Debido a lo anterior, tiene sentido considerar los posibles papeles *in vivo* de proteínas ligeramente desnaturizadas, incluyendo al GF:

1. Observaciones generales: (i) la proteína de choque térmico (heat-shock) GroEL une y estabiliza al estado no nativo de cadenas nascentes; (ii) algunas proteínas de choque térmico unen subunidades inactivas de proteínas oligoméricas para prevenir su agregación inespecífica y/o transportarlas a su lugar de ensamblaje; y (iii) algunas proteínas de choque térmico que unen proteínas secretadas e importadas, están involucradas en los eventos de translocación transmembranal. De acuerdo a lo anterior, es razonable asumir que algunas proteínas de choque térmico, en particular GroEL, reconocen y unen a una proteína nascente en estado de GF [1]. GroEL retarda el plegamiento cuando se agrega a la proteína en estado *U* (tiempo cero) o cuando se encuentra en estado de GF (después de 1 o 2 s) [1].
2. Existen numerosos reportes de proteínas que no pueden ser translocadas a través de las membranas en su estado nativo, pero son competentes para la translocación cuando se encuentran en un estado no nativo susceptible a proteólisis. Las conclusiones a partir de estas observaciones involucran al GF como el conformero idóneo para la translocación [1,97].
3. Es posible que el proceso de degradación en los lisosomas (en donde se ha descrito la participación de proteínas de choque térmico), a pH ácido o bien por medio de proteosomas (*ej.* sistema ubiquitina ATP dependiente), sea facilitado por la anterior desnaturización proteica, la cual probablemente sea la transición al estado de GF [1].
4. Existen posibles papeles de intermediarios en el plegamiento en la formación de fibrillas amiloides en algunas enfermedades conformacionales o plegopatías [98].

Aunque todas las observaciones anteriores indican que los estados no nativos de las proteínas pueden jugar algún papel *in vivo*, si los intermediarios dirigen la reacción de plegamiento, es todavía una pregunta abierta y sujeta a debate.

## El pre-glóbulo fundido

En 1994 Uversky y Ptitsyn [99], reportaron el desplegamiento de la  $\beta$ -lactamasa a través de dos intermediarios, al primero lo clasificaron como un GF y al segundo le llamaron “intermediario parcialmente plegado”, porque es menos compacto que el GF, pero más que el estado desplegado y posee una parte de la estructura secundaria de la enzima nativa o del GF. Sugirieron que este intermediario parcialmente plegado podría ser la contraparte al equilibrio del primer intermediario cinéti-

co que se forma en esta enzima en pocos milisegundos. Más adelante [100], estudiaron el desplegamiento de la anhidrasa carbónica B y encontraron un comportamiento parecido al de la  $\beta$ -lactamasa. Una mejor observación sobre las características del intermediario parcialmente plegado, los llevó a sugerir un nuevo nombre para este intermediario y lo rebautizaron como pre-GF para resaltar la jerarquía de este conformero en la ruta de plegamiento. Chaffotte y colaboradores [101] describieron la presencia de este estado en el desplegamiento de un fragmento de la subunidad  $\beta$  2 de la triptofano sintasa. La presencia de este intermediario también se ha encontrado en la desnaturización de la apomioglobina [102].

## Consideraciones finales

El tiempo típico requerido para la biosíntesis de una cadena polipeptídica es entre 10 y 100 s. Este tiempo es en promedio mucho mayor que aquel que se necesita para la formación del GF (aproximadamente 1 s), pero menor a aquel que algunas proteínas necesitan para llegar a *N*, el cual puede ser hasta de  $10^3$  s. Por lo tanto, una cadena nascente durante e inmediatamente después de su biosíntesis puede estar en el estado de GF. Tal vez, la naturaleza prefiera mantener a la cadena nascente en este estado, que es lo suficientemente flexible para ajustarse a eventos posteriores como la oligomerización o el transporte transmembranal o bien su cotransporte por medio de una chaperona o chaperonina.

La comparación de las propiedades de los GFs observados en diferentes proteínas es muy importante para la elucidación de los mecanismos moleculares comunes por los cuales el glóbulo fundido es estabilizado. Así mismo conocer las características de este conformero eventualmente permitirá determinar en primer lugar, el papel de los intermediarios en la vía de plegamiento y por otra parte, la pertinencia del glóbulo fundido como un intermediario general para el plegamiento de las proteínas *in vivo*.

## Referencias

1. Creighton, T. E. *Protein Folding*. W. H. Freeman and Company, N. Y. **1992**, 547 p.
2. Wong, K. Y.; Tanford, C. *J. Biol. Chem.*, **1973**, *248*, 8518-8523.
3. Doster, W.; Hess, B. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 772-780.
4. Adams, B.; Burgess, R. J.; Pain, R. H. *Eur J Biochem.*, **1985**, *152*, 715-20.
5. Ohgushi, M.; Wada, A. *FEBS Letters*, **1983**, *164*, 21-24.
6. Ptitsyn, O. B.; Dolgikh, D. A.; Gil'manshin, R. I.; Shakhnovich, E. I.; Finkel'shtein, A. V. *Mol Biol (Mosk)*. **1983**, *17*, 569-76.
7. Kuwajima, K.; Hiraoka, Y.; Ikeguchi, M.; Sugai, S. *Biochemistry* **1985**, *24*, 874-881.
8. Ikeguchi, M.; Kuwajima, K.; Mitani, M.; Sugai, S. *Biochemistry* **1986**, *25*, 6965-6972.
9. Christensen, H.; Pain, R. H. *Eur Biophys J*. **1991**, *19*, 221-229.
10. Ptitsyn, O. B. The Molten Globule State. In: *Protein Folding*. Creighton, T.E. Ed. Freeman. USA. **1992**, p. 243.

11. Arai, M.; Kuwajima, K. *Adv Protein Chem.* **2000**, *53*, 209-82.
12. Dobson, C. M. *Curr. Op. Struc. Biol.*, **1991**, *1*, 22-27.
13. Semisotnov, G. V.; Rodionova, N. A.; Razgulyaev, O. I.; Uversky, V. N.; Gripas, A. F.; Gilmanshin, R. I. *Biopolymers* **1991**, *31*, 119-128.
14. Cháñez-Cárdenas, M. E. *Boletín de Educación Bioquímica.* **1998**, *17*, 11-17.
15. Dill, K. A.; Shortle, D. *Annu. Rev. Biochem.*, **1991**, *60*, 795-825.
16. Kumar, T. K.; Subbiah, V.; Ramakrishna, T.; Pandit, M. W. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 12620-12625.
17. Cort, J. R.; Andersen, N. H. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *233*, 687-691.
18. Shortle, D.; Meeker, A. K. *Biochemistry*, **1989**, *28*, 936-944.
19. Griko, Y.V.; Gittis, A.; Lattman, E.E.; Privalov, P. L. *J. Mol. Biol.* **1994**, *243*, 93-99.
20. Li, Y.; Jing, G. *J. Biochem. (Tokyo)* **2000** *128*, 739-744.
21. Uversky, V. N.; Leontiev, V. V.; Gudkov, A. T. *Protein Eng.* **1992**, *5*, 781-783
22. Cavagnero, S.; Nishimura, C.; Schwarzingler, S.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14459-14467.
23. Matthews, J. M.; Norton, R. S.; Hammacher, A.; Simpson, R. J. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1942-1950.
24. Amirt, D.; Haas, E. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8889-8893.
25. Ferrer, M.; Barany, G.; Woodward, C. *Nat Struct Biol* **1995**, *2*, 211-217.
26. Nozaka, M.; Kuwajima, K.; Nitta, K.; Sugai, S. *Biochemistry*, **1978**, *17*, 3753-3758.
27. Dolgikh, D. A.; Gilmanshin, R. I.; Brazhnikov, E. V. ;. Bychkova, V. E.; Semisotnov, G. V.; Yu, S.; Venyaminov, S. Yu.; Ptitsyn, O. B. *FEBS Letters* **1981**, *136*, 311-315 .
28. Baum, J.; Dobson, C.M.; Evans, P. A.; Hanley, C. *Biochemistry* **1989**, *28*, 7-13.
29. Kumar, T. K.; Jayaraman, G.; Lee, C. S.; Sivaraman, T.; Lin, W. Y.; Yu, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *207*, 536-543.
30. Kosen, P. A.; Creighton, T. E.; Blout, E. R. *Biochemistry* **1983**, *22*, 2433-2440.
31. Dolgikh, D. A.; Kolomiets, A. P.; Bolotina, I. A.; Ptitsyn, O. B. *FEBS Letters* **1984**, *165*, 88-92.
32. Das, B. K.; Bhattacharyya, T.; Roy, S. *Biochemistry.* **1995**, *34*, 5242-5247.
33. Vonderviszt, F.; Lakatos, S.; Gal, P.; Sarvari, M.; Zavodszky, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *14*, 148(1), 92-98.
34. Uversky, V. N.; Kirkitadze, M. D.; Narizhneva, N. V.; Potekhin, S. A.; Tomashevski, A. Yu. *FEBS Lett*, **1995**, *364*, 165-167.
35. Brems, D. N.; Havel, H. A. *Proteins.* **1989**, *5*(1), 93-95.
36. Uversky, V. N.; Kutysenko, V. P.; Protasova, N. Yu.; Rogov, V. V.; Vassilenko, K. S.; Gudkov, A. T. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1844-1851.
37. Herold, M.; Kirschner, K. *Biochemistry.* **1990**, *29*, 1907-1913
38. De Filippis, V.; Vassiliev, V. B.; Beltramini, M.; Fontana, A.; Salvato, B.; Gaitskhoki, V. S. *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, *1297*, 119-123.
39. Goto, Y.; Fink, A L. *Biochemistry* **1989**, *28*(3), 945-952.
40. Tatsumi, E.; Hirose, M. *J Biochem (Tokyo)*, **1997**, *122*, 300-308.
41. Muzammil, S.; Kumar, Y.; Tayyab, S. *Eur..J. Biochem.* **1999**, *266*, 26-32.
42. Ptitsyn, O. B.; Pain, R.H.; Semisotnov, G.V.; Zerovnik, E.; Razgulyaev, O.I. *FEBS Lett.* **1990**, *262*(1), 20-24.
43. Poklar, N.; Lah, J.; Salobir, M.; Macek, P.; Vesnaver, G. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14345-114352.
44. Nandi, P.K. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, *22*, 23-31.
45. Dryden, D.; Weir, M. P. *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, *30*; 1078(1), 94-100.
46. De Filippis, V.; de Laureto, P. P.; Toniutti, N.; Fontana, A. *Biochemistry.* **1996**, *35*, 11503-11511.
47. Kuciel, R.; Mazurkiewicz, A. *Acta Biochim Pol.* **1997**, *44*, 645-657.
48. Van der Goot, F.G.; Gonzalez-Manas, J. M.; Lakey, J. H.; Pattus, F. A. *Nature.* **1991**, *5* (354), 408-410.
49. Menill, A. R.; Cohen, F. S.; Cramer, W. A. *Biochemistry.* **1990**, *29*, 5829-5836.
50. Rawat, U.; Rao, M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9415-9423.
51. Goldberg, M. E.; Semisotnov, G. V.; Friguier, B.; Kuwajima, K.; Ptitsyn, O. B.; Sugai, S. *FEBS Lett.* **1990**, *9*, 26351-26356.
52. Ogasahara, K.; Matsushita, E.; Yutani, K. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 1197-1206.
53. Jerala, R.; Zerovnik, E.; Kidric, J.; Turk, V. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11498-11504.
54. Silva, J. L.; Silveira, C. F.; Correia, Jr. A.; Pontes, L. *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 545-555.
55. Wang, C.; Lascu, I.; Giartosio, A. *Biochemistry.* **1998**, *37*, 8457-8464.
56. Hua, Q.X.; Kochoyan, M.; Weiss, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 2379-2383.
57. Maldonado, S.; Jimenez, M.A.; Langdon, G. M.; Sancho, J. *Biochemistry.* **1998**, *37*, 10589-10596.
58. Zerovnik, E.; Jerala, R.; Kroon-Zitko, L.; Turk, V.; Pain, R. H. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **1992**, *373*, 453-458.
59. Kirkitadze, M. D.; Barlow, P. N.; Price, N. C.; Kelly, S. M.; Boutell, C. J.; Rixon, F. J.; McClell, D. A. *J. Virol.* **1998**, *72*, 10066-10072.
60. Bychkova, V. E.; Berni, R.; Rossi, G. L.; Kutysenko, V. P.; Ptitsyn, O. B. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 7566-7571.
61. Edwin, F.; Jagannadham, M. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *252*, 654-60.
62. Lu, J.; Dahlquist, F. W. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4749-3756.
63. Reddy, G. B.; Srinivas, V. R.; Ahmad, N.; Surolia, A. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 4500-4503.
64. Dolginova, E. A.; Roth, E.; Silman, I.; Weiner, L. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12248-54
65. Yuan, C.; Byeon, I. J.; Poi, M.J.; Tsai, M.D. *Biochemistry* **1999**, *38*, 2919-2929.
66. Mayo, K. H.; Barker, S.; Kuranda, M. J.; Hunt, A.J.; Myers, J.A.; Maione, T. E. *Biochemistry.* **1992**, *31*, 12255-12265.
67. Bose, H. S.; Whittall, R. M.; Baldwin, M. A.; Miller, W. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 7250-7255.
68. Schumann, J.; Jaenicke, R. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 1225-1233.
69. Sheshadri, S.; Lingaraju, G. M.; Varadarajan, R. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1689-1695.
70. Barrick, D.; Baldwin, R. L. Stein and Moore Award address. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 869-876
71. Christova, P.; Cox, J. A.; Craescu, C. T. *Proteins* **2000**, *40*, 177-184.
72. Fink, A. L.; Calciano, L. J.; Goto, Y.; Nishimura, M.; Swedberg, S. A. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1155-1160.
73. Shutova, T.; Irrgang, K.; Klimov, V.V.; Renger, G. *FEBS Lett.* **2000**, *467*, 137-140.
74. Silva, N. Jr.; Gratton, E.; Mei, G.; Rosato, N.; Rusch, R.; Finazzi-Agro, A. *Biophys. Chem.* **1993**, *48*, 171-182.
75. Aitio, H.; Laakso, T.; Pihlajamaa, T.; Torkkeli, M.; Kilpelainen, I.; Drakenberg, T.; Serimaa, R.; Annala, A. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 74-82.
76. Khurana, R.; Udgaonkar, J. B. *Biochemistry* **1994**, *33*, 106-115.
77. Lee, B.C.; Croonquist, P.A.; Sosnick, T.R.; Hoff, W.D. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20821-20823.
78. Denton, J. B.; Konishi, Y.; Scheraga, H. A.. *Biochemistry.* **1982**, *21*, 5155-5163.
79. Staniforth, R. A.; Giannini, S.; Higgins, L. D.; Conroy, M. J.; Hounslow, A. M.; Jerala, R.; Craven, C. J.; Waltho, J. P. *EMBO. J.* **2001**, *20*, 4774-4781.
80. Hlodan, R.; Pain, R. H. *FEBS Lett.* **1994**, *343*, 256-260.

81. Bailey, R. W.; Dunker, A. K.; Brown, C. J.; Garner, E. C.; Griswold, M. D. *Biochemistry*. **2001**, *40*, 11828-11840.
82. Shi, L.; Palleros, D. R.; Fink, A. L. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7536-7546.
83. Ghobadi, S.; Safarian, S.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Ranjbar, B. *J. Biochem. (Tokyo)* **2001**, *130*, 671-677.
84. Safar, J.; Roller, P.P.; Gajdusek, D.C.; Gibbs, C. J. Jr. *Biochemistry* **1994**, *33*, 8375-8383.
85. Nath, D.; Rao, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288*, 1218-1222.
86. Freire, E.; Xie, D. *Biophys. Chem.* **1994**, *51*, 243-251.
87. Cai, S.; Singh, B. R. *Biochemistry*. **2001**, *40*, 15327-15333.
88. Hornby, D.P.; Whitmarsh, A.; Pinarbasi, H.; Kelly, S. M.; Price, N. C.; Shore, P.; Baldwin, G. S.; Waltho, J. *FEBS Lett.* **1994**, *355*, 57-60.
89. Morrow, J. A.; Hatters, D. M.; Lu, B.; Hochtl, P.; Oberg, K.A.; Rupp, B.; Weisgraber, K.H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 50380-50385.
90. Ou, W.; Wang, R. S.; Lu, J.; Zhou, H. M. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2002**, *34*, 970-982.
91. Chan, H.S.; Dill, K.A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87*, 6388-6392.
92. Dolgikh, D. A.; Gilmanishin, R. I.; Brazhnikov, E. V.; Bychkova, V. E.; Seminostov, G. V.; Venyaminov, S. Y.; Ptitsyn, O. B. *FEBS Letters*. **1981**, *136*, 311-315.
93. Kyte, J. *Structure in Protein Chemistry*. Garland Publishing, Inc. New York & London. **1995**, 606 p.
94. Nitta, K.; Sugai, S. *Eur J Biochem.* **1989**, *182*, 111-118.
95. Pike, A. C.; Brew, K. Acharya, K. R. *Structure*. **1996**, *4*, 691-703.
96. Kuwajima K. *FASEB J.* **1996**, *10*, 102-109.
97. Bychkova, V. E.; Pain, R. H.; Ptitsyn, O. B. *FEBS Lett.* **1988**, *238*, 231-234.
98. Cháñez-Cárdenas, M. E.; Cisneros-Armas, D. A.; del Pozo-Yauner; Becerril, B.; Fernández-Velasco, D. A. Enfermedades Relacionadas al Plegamiento Anómalo de las Proteínas. En: Cea Bonilla A.; del Arrenal Mena I. P.; Riveros Rosas H.; Vázquez-Contreras E. (eds). **2002**, *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVI. UNAM, México, DF (<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>).
99. Uversky, V. N.; Ptitsyn, O. B. *Biochemistry*. **1994**, *33*, 2782-2791.
100. Uversky V. N.; Ptitsyn, O. B. *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 215-228.
101. Chaffotte, A. F.; Guijarro, J. I.; Guillou, Y.; Delepierre, M.; Goldberg, M. E. *J. Protein. Chem.* **1997**, *16*, 433-439.
102. Uversky, V. N.; Fink, A. L. *Biochemistry (Moscow)* **1999**, *64*, 552-555.