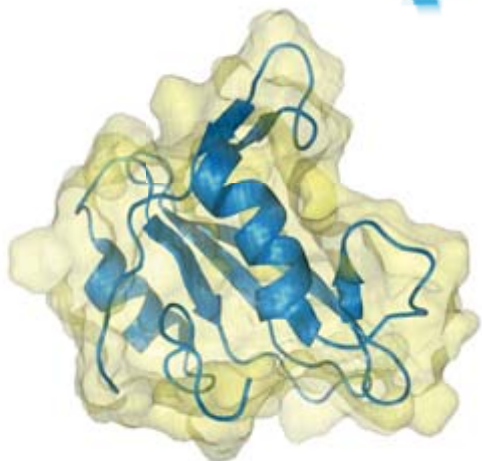


El movimiento de las proteínas



La espectroscopía de RMN arroja luz sobre la compleja dinámica de las proteínas. Revela una estrecha relación entre la flexibilidad molecular y la función biológica

Oscar Millet

CONCEPTOS BASICOS

- Las proteínas son entidades flexibles, movilidad a menudo ligada a la función celular.
- La resonancia magnética nuclear permite estudiar, con resolución atómica, la dinámica de las proteínas y observar fenómenos moleculares que tienen lugar en múltiples escalas de tiempo.
- La comprensión de los fenómenos dinámicos en las proteínas reviste interés para el desarrollo de fármacos.

La biología estructural, una de las ramas más dinámicas de la biología contemporánea, se ocupa del estudio de los procesos celulares a nivel molecular. La unidad fundamental de investigación son las macromoléculas, las proteínas sobre todo. Buena parte de la exquisita precisión con que operan las proteínas y enzimas se debe a su plasticidad. Sin embargo, el estudio del movimiento proteínico entraña una notable dificultad. Su relación con la función biológica se encuentra a menudo enmascarada por otros factores.

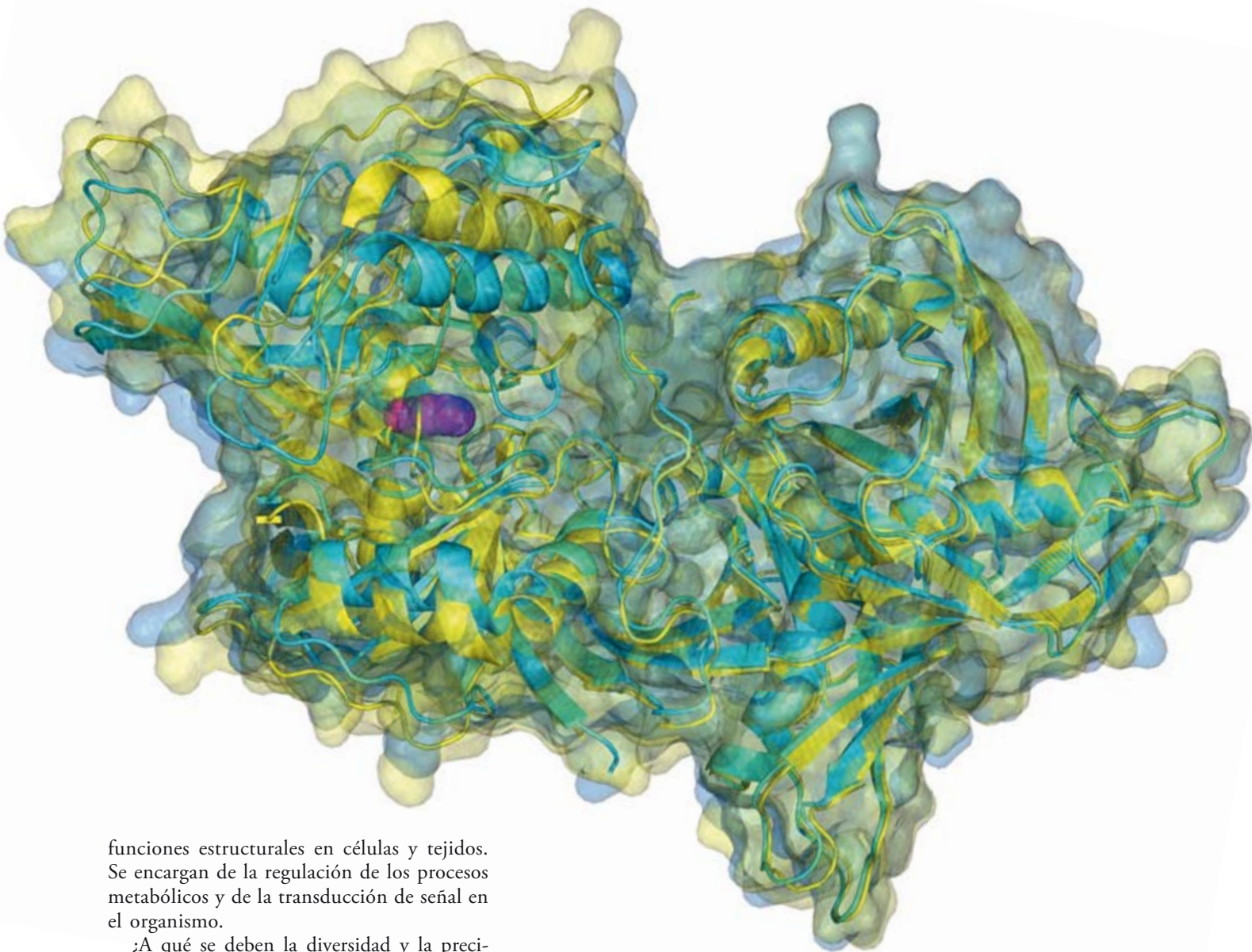
La resonancia magnética nuclear (RMN) resulta idónea para analizar la movilidad de las biomoléculas; se aplica a la “observación” de fenómenos moleculares que tienen lugar en múltiples escalas de tiempo. Los fundamentos teóricos del estudio de la movilidad conformacional por RMN se conocen desde hace decenios, pero ha sido la reciente introducción de métodos experimentales junto con notables desarrollos técnicos en instrumentación los que han permitido obtener, con resolución atómica, información cualitativa y cuantitativa de proce-

tos dinámicos. Aquí describimos uno de esos métodos, el estudio por RMN del intercambio químico conformacional. A través de ejemplos seleccionados ahondaremos en la capacidad de las técnicas de RMN para obtener información de los procesos celulares.

Plegamientos y reorientaciones

Las proteínas son biopolímeros, constituidos por concatenación de aminoácidos. A partir de veinte aminoácidos se forman, mediante enlaces amida, múltiples combinaciones. Todos los seres vivos (virus incluidos) contienen proteínas; del funcionamiento de éstas y de su adecuada integración en el medio celular depende la subsistencia del organismo.

Proteínas son las enzimas que catalizan las reacciones químicas en un organismo, los receptores que detectan específicamente determinados metabolitos o agentes patógenos, y los canales transmembrana que regulan los gradientes de concentración de iones y otras sustancias a ambos lados de la pared celular. Las proteínas ejercen también



funciones estructurales en células y tejidos. Se encargan de la regulación de los procesos metabólicos y de la transducción de señal en el organismo.

¿A qué se deben la diversidad y la precisión con que estos biopolímeros desarrollan sus funciones? Por una parte, cada uno de los veinte aminoácidos constituyentes (monómeros) presenta características fisicoquímicas singulares, que confieren a cada proteína una reactividad específica. La secuencia aminoácida (estructura primaria) define las propiedades de la proteína. Las proteínas adoptan espontáneamente una conformación tridimensional (estructura terciaria) que tiene por misión orientar en el espacio a los aminoácidos de interés funcional.

Para ejercer tal abanico de funciones, las proteínas requieren una flexibilidad conformacional notable. Hace medio siglo, tras las primeras determinaciones de estructuras tridimensionales de proteínas, mediante cristalografía de rayos X, se planteó la posibilidad de que en las proteínas se desarrollaran fenómenos de dinámica conformacional. La confirmación de la hipótesis llegaría, años más tarde, con los experimentos de RMN, cuando Gerhard Wagner y Kurt Wütrich, del Instituto Politécnico Federal Suizo en Zúrich, observaron movimientos de rotación en los

residuos aromáticos del núcleo hidrofóbico de una proteína globular.

Sabemos ahora que los fenómenos dinámicos en proteínas se manifiestan en distintos niveles. Centrémonos en el equilibrio entre la forma nativa (conformación plegada caracterizada por su estructura terciaria) y la forma desnaturalizada (forma inactiva y carente de estructura definida).

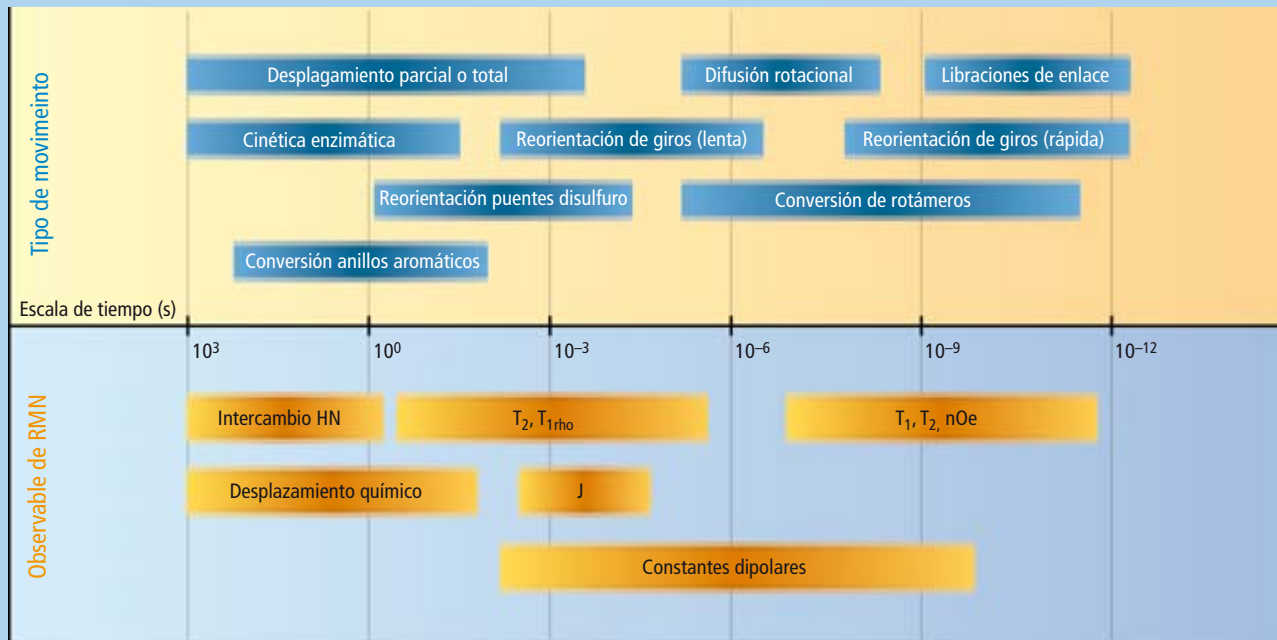
Pese a que la forma nativa es más estable que la desnaturalizada, se trata de una estabilidad marginal, pues equivale a la energía de unos pocos enlaces de puente de hidrógeno. Ambas formas se convierten una en otra constantemente. La conformación nativa debe existir sólo durante el tiempo necesario para cumplir su función; luego, se desnaturaliza a través de un mecanismo de regulación y renovación del material celular.

La conversión entre las formas nativa y desnaturalizada sucede a escalas de tiempo que van del milisegundo al segundo. La información necesaria para dicha transformación

1. LA MOVILIDAD DE LAS PROTEÍNAS reviste suma importancia para su función biológica. La imagen corresponde a la racemasa de prolina, enzima de *Trypanosoma cruzi*, el parásito responsable del mal de Chagas. Se muestra la superposición de dos conformaciones moleculares: abierta (amarillo) y cerrada (azul). En ausencia de sustrato, la proteína interacciona con nuestro sistema inmunitario de forma que lo desbarata. Cuando se une al centro activo un sustrato (morado), la estructura se cierra, lo que evita la acción patógena. Ahondar en el movimiento de esta molécula reviste suma importancia para el desarrollo de fármacos contra esta enfermedad.

MOVIMIENTOS RAPIDOS Y ULTRARRAPIDOS

En las proteínas se producen varios tipos de movimiento: rotaciones de enlaces, plegamientos, libraciones, etcétera. Cada uno ocurre a una escala de tiempo característica. Para estudiar uno de esos movimientos (*barras azules*), deberemos recurrir al "observable" equivalente (*barras naranjas*) en aquella escala de tiempo. (Un "observable" corresponde a una propiedad del sistema que puede determinarse, u "observarse", por una secuencia de operaciones físicas.) Los observables que describen la dinámica de las proteínas se determinan mediante experimentos de RMN.



suele ser función exclusiva de la secuencia aminoacídica de la proteína. Esas escalas de tiempo son extraordinariamente pequeñas si las comparamos con el tiempo que necesitaría el polipéptido para tantear todas las conformaciones posibles, lo que se conoce por paradoja de Levinthal. De lo que se infiere que debe haber cierta direccionalidad en el proceso de plegamiento.

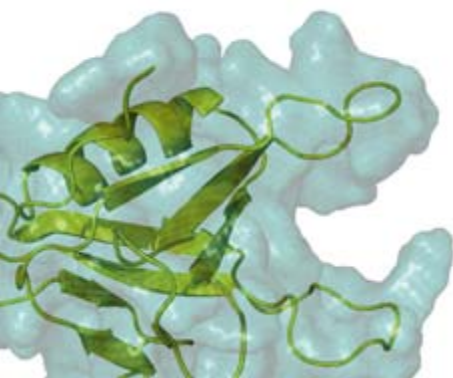
El modelo de plegamiento más aceptado es el del "embudo de plegamiento proteico". De acuerdo con el mismo, los estadios intermedios restringen paulatinamente el espacio conformacional accesible y, de ese modo, encaminan el plegamiento hacia la conformación nativa. El estudio de la dinámica del plegamiento proteínico se lleva buena parte de los trabajos actuales sobre biología estructural.

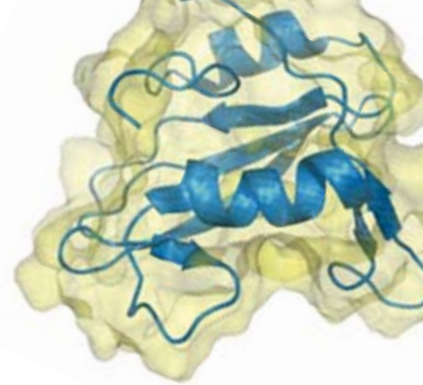
La estructura nativa no es rígida, sino que experimenta cambios conformacionales, en su totalidad o en segmentos aislados. Aunque se trata de reordenamientos reversibles y no producen la desnaturalización de la proteína, revisten máximo interés biológico. Su posible función quedó ya recogida en una observación pionera de Daniel Koshland en 1958: "...la naturaleza flexible de fragmentos o de la totalidad de la cadena polipeptídica se atribuye a múltiples razones; entre ellas, cambios conformacionales producidos por moléculas

de tamaño limitado". Con otras palabras, la interacción con una molécula orgánica puede inducir en la proteína cambios conformacionales que facilitan la creación de un complejo y aumentan la especificidad. Esta hipótesis ha sido ampliamente corroborada experimentalmente mediante RMN de alta resolución y otras técnicas espectroscópicas.

El mecanismo de acción de las enzimas constituye un buen ejemplo de movilidad segmental: una reordenación de átomos en la proteína facilita la adaptación entre ésta y el sustrato. Se esgrimen varias razones para explicar el fenómeno. Se habla, por ejemplo, de grados de libertad, que permitirían a la enzima adoptar conformaciones que se encuentran en la coordenada de reacción y rebajan la energía de activación del proceso. Otro mecanismo posible se basa en un acoplamiento con el sustrato, que iniciaría la reorientación y desencadenaría la reacción enzimática.

También, al hallarse a temperaturas superiores al cero absoluto, todas las moléculas experimentan movimientos y vibraciones de enlace que ocurren a escalas de tiempo muy reducidas. Nos referimos al "movimiento térmico". En el caso de las proteínas, esos movimientos incluyen, entre otros, las vibraciones de enlace (con periodos de femtosegundos) y las rotaciones de las cadenas laterales (con





períodos de picosegundos, si se hallan en la superficie, y nanosegundos, si los residuos son interiores).

El delicado equilibrio entre las componentes entálpica y entrópica explica que el movimiento térmico para residuos distintos no sea independiente. En la dihidrofolatorreductasa y la ciclofilina A, por ejemplo, se ha demostrado un movimiento térmico concertado de un grupo de residuos. Como veremos más adelante, en la ciclofilina A, ese movimiento de “respiración” es el responsable último de la actividad catalítica de la enzima.

RMN biomolecular

La resonancia magnética nuclear se basa en la interacción entre núcleos atómicos y ondas de radiofrecuencia, en presencia de campos magnéticos intensos. En el caso de las proteínas, los núcleos más estudiados mediante esta técnica espectroscópica son el protón (^1H), carbono (isótopo ^{13}C) y nitrógeno (isótopo ^{15}N).

En el espectro de RMN monodimensional, el más sencillo, se registran las frecuencias de resonancia de uno de los núcleos que se estudian, el protón (^1H), por ejemplo. Se obtiene entonces una serie de señales correspondientes a los protones de la molécula. Las diferencias entre señales provienen de las diferencias entre los entornos químicos que rodean a los núcleos en la molécula. El entorno difiere incluso entre núcleos que están tendiendo el mismo tipo de

enlaces químicos, con lo que la señal proporciona información estructural de gran valor. La espectroscopía de RMN y la cristalografía de rayos X de alta resolución constituyen las dos técnicas más utilizadas en la elucidación estructural de biomoléculas y las que proporcionan una mayor resolución.

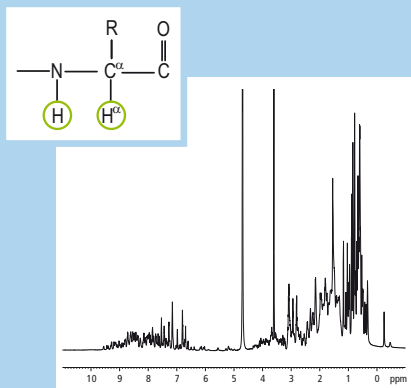
El espectro de RMN de una proteína entraña una complejidad notable, vinculada al solapamiento de señales con el mismo “desplazamiento químico” y al acoplamiento entre señales. Merced al desarrollo de la RMN multidimensional, donde la información correspondiente a distintos núcleos se presenta de manera combinada, se ha registrado un progreso espectacular en el estudio de biomacromoléculas.

En el experimento ^1H - ^{15}N -HSQC (“Heteronuclear Single-Quantum Correlation bidimensional”), se combinan los desplazamientos químicos de los núcleos de hidrógeno y de nitrógeno. Cada señal que aparece en el plano del espectro corresponde a un grupo N-H vinculado a un residuo de la proteína. La dispersión en el plano basta para resolver la mayoría de las señales. Mediante RMN se han estudiado proteínas de pesos moleculares de hasta 80 kilodalton (Kda) (80.000 g/mol, unos 700 aminoácidos).

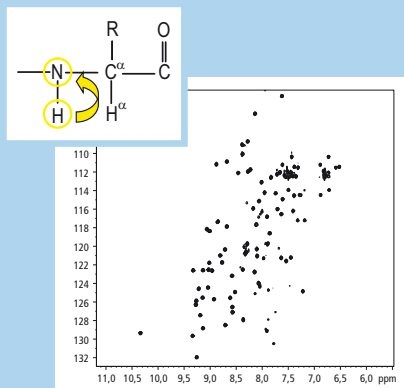
En general, el estudio del ^1H - ^{15}N -HSQC precede a otros experimentos multidimensionales, de mayor complejidad técnica y concep-

DETERMINACION ESTRUCTURAL MEDIANTE RMN

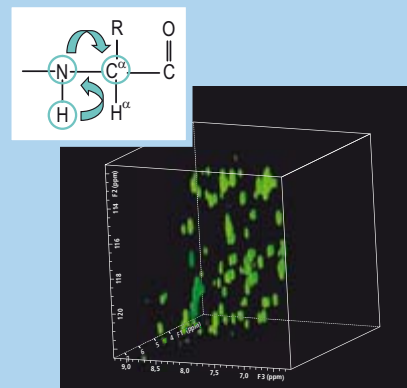
La aplicación de la resonancia magnética nuclear (RMN) a la determinación estructural se basa en la medida del “desplazamiento químico” para cada núcleo atómico. Este parámetro depende del entorno químico que rodea el núcleo en estudio, es decir, de la composición y la conformación de la biomolécula. Las siguientes imágenes muestran ejemplos de espectros de RMN mono, bi y tridimensional junto con un esquema del tipo de interacción química que permiten estudiar. El desarrollo de la RMN multidimensional ha facilitado un progreso espectacular en el estudio estructural de las biomoléculas.



El espectro monodimensional es el más sencillo de registrar y de analizar. Su principal inconveniente es que el solapamiento de bandas de átomos parecidos (verde) complica a menudo la interpretación de la señal.



El espectro bidimensional resuelve el problema del solapamiento. Al hacer uso del acoplamiento entre dos núcleos unidos por un enlace (amarillo), permite diferenciar entre átomos que la RMN monodimensional no distingue.



El espectro tridimensional añade complejidad técnica y de interpretación de la señal, pero permite estudiar de forma simultánea la interacción entre tres núcleos relacionados (azul).

tual, que permiten asignar las señales relativas a la posición de los núcleos en la proteína.

Captar el movimiento

De la RMN destacamos su capacidad para proporcionar información acerca de procesos dinámicos en un amplio intervalo de escalas de tiempo. Revisten especial interés biológico los procesos que implican un intercambio entre dos conformaciones de la molécula en la escala del microsegundo-milisegundo. Para su caracterización, importa recabar información estructural de ambas conformaciones, así como describir la termodinámica y la cinética del cambio químico.

Supongamos un equilibrio de intercambio entre dos conformaciones, $C_1 \rightleftharpoons C_2$, donde C_1 y C_2 representan los dos estados involucrados en el proceso y k_{12} y k_{21} sus respectivas velocidades de conversión (en s^{-1}). La constante cinética de intercambio (k_{int}) se define como la suma de k_{12} y k_{21} . Proporciona una idea del número total de conversiones por unidad de tiempo. Dado que la frecuencia de resonancia de cada núcleo depende de su entorno químico, esperaríamos dos señales (una para cada una de las dos conformaciones), separadas por una diferencia de frecuencias $\Delta\nu$. La presencia de señales adicionales en el espectro evidencia, pues, un intercambio químico conformacional. El análisis de la frecuencia característica de cada señal proporciona información estructural de ambas conformaciones.

Las señales correspondientes a C_1 y C_2 pertenecen a dos estados del mismo núcleo. Dado que la integral total debe conservar-

se, la intensidad de cada señal disminuirá en función de las poblaciones relativas de cada conformero en el equilibrio. Los procesos de intercambio conformacional suelen corresponder a transiciones entre un estado fundamental y un estado excitado escasamente poblado (población inferior al 1 por ciento). En esos casos, la señal del estado excitado apenas se detecta; el espectro no difiere del que correspondería a un sistema sin intercambio conformacional, lo que constituye una limitación del método.

Las condiciones en las que se observan dos señales distintas, una para C_1 y otra para C_2 , se dan sólo cuando el intercambio es lento, es decir, cuando los valores de k_{int} son inferiores a la diferencia de frecuencias entre las dos conformaciones ($k_{int} \ll 2\pi\Delta\nu$). Si el intercambio es rápido ($k_{int} > 2\pi\Delta\nu$), no es posible resolver ambas frecuencias; el espectro muestra una señal, única, cuya frecuencia de resonancia corresponde al valor promedio de las dos conformaciones, con la consiguiente dificultad para identificar los procesos de intercambio químico subyacentes.

Esas dificultades para la identificación y caracterización de los procesos de intercambio químico se han superado merced al desarrollo de secuencias de pulsos que cuantifican el ensanchamiento de la señal. (Y no la frecuencia de resonancia o el desplazamiento químico. La anchura de banda también se ve modificada por la presencia de procesos de intercambio químico.) En esos experimentos de relajación-dispersión, se mide la envolvente de la señal (anchura de la banda) a tiempos de evolución distintos. La conversión de C_1 en C_2 implica un intercambio de frecuencias, lo que comporta una interferencia destructiva, que resulta en la atenuación, o ensanchamiento, de la señal. Cuanto mayor es el tiempo de coexistencia entre las dos frecuencias, mayor es la probabilidad de interconversión (probabilidad que viene dada por k_{int}) y más ancha la señal obtenida. La representación de la evolución temporal de las anchuras de banda proporciona las curvas de dispersión.

El ajuste matemático de las curvas de dispersión proporciona una descripción del equilibrio conformacional. Por un lado, se obtiene la velocidad del proceso (k_{int}); este parámetro guarda relación directa con la barrera energética que separa los dos estados: el sustrato y el producto en una enzima, o el estado fundamental y el excitado en el caso de otra proteína. Por otro, se determinan los desplazamientos químicos de ambas conformaciones, que contienen valiosa información estructural. Se obtienen también las poblaciones relativas de los dos estados; a partir del análisis de

2. LABORATORIO DE RMN DEL CICbioGUNE (Bilbao), dedicado a la biología estructural de proteínas. Se muestran los imanes superconductores (izquierda y centro) y la sala de control (derecha).



una sola señal, se deducen las poblaciones de ambos conforméromos, incluso en el caso de que la señal de uno de ellos sea muy pequeña. Se han detectado conformaciones con poblaciones de un exiguo 0,5 por ciento.

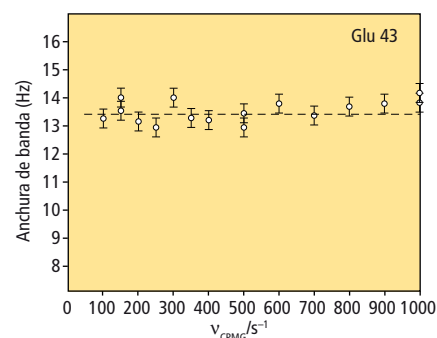
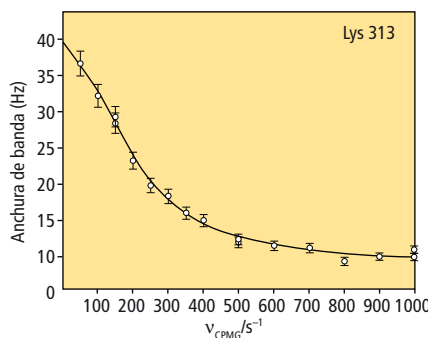
El experimento básico de medición de la dispersión en proteínas lo llevó a cabo el grupo de Arthur G. Palmer, de la Universidad de Columbia, en 1998. Desde entonces se ha venido depurando la técnica. Se han publicado numerosas aplicaciones. Dos de ellas se detallan a continuación.

Mecanismo catalítico de la ciclofilina A

La ciclofilina A (CypA) pertenece a una familia de prolin-isomerasas que catalizan la isomerización *cis-trans* de enlaces en péptidos y proteínas, siempre que contengan el aminoácido prolina. Participa en importantes procesos celulares —activación de linfocitos T en el sistema inmunitario, por ejemplo— y cumple funciones de chaperona molecular, es decir, asiste al plegamiento de otras proteínas recién formadas. La CypA constituye el receptor natural de la ciclosporina A (CsA), un fármaco inmunosupresor. Desempeña una función esencial en el mecanismo de acción del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH-1): se une al virus a través de la proteína gag y afecta a la generación de copias de la proteína de la cápside Vpr.

Esta enzima presenta un elevado grado de reversibilidad en la reacción de isomerización. Opera, pues, con velocidades semejantes en ambas direcciones. Los valores de las constantes de interconversión son del mismo orden de magnitud: 1049 s^{-1} para la conversión del isómero *cis* en *trans* (k_{ct}) y 1640 s^{-1} para el proceso inverso (k_{tc}). La unión de CsA a CypA, muy fuerte, con una constante de disociación del complejo CypA/CsA de $30 \text{ }\mu\text{M}$ (micromolar). En presencia de un exceso de ciclosporina A, la población de enzima libre puede considerarse despreciable, y decimos que se produce la saturación de la enzima. Ambas formas, *cis* y *trans*, son a la vez sustrato y producto de la enzima. La saturación de la enzima conlleva la generación de un estado estacionario en el que las formas *cis* y *trans* se transforman entre sí indefinidamente; ambas conformaciones se encuentran casi equipobladas.

Mediante experimentos de RMN, se ha estudiado la dinámica enzimática de CypA en presencia de CsA, así como la relación entre este movimiento y la función biológica. A partir de las curvas de dispersión se ha determinado el ensanchamiento de la señal inducido por el intercambio químico conformacional, para cada grupo amida de cada aminoácido de la proteína. Los resultados de-



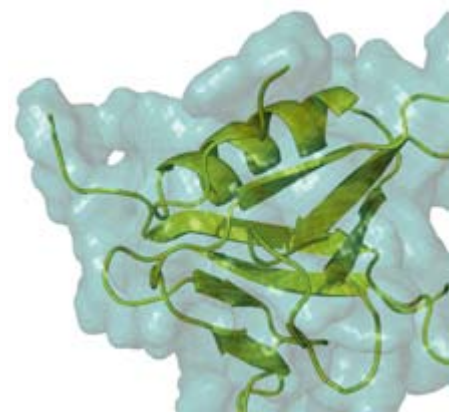
muestran que la mayoría de los aminoácidos no se hallan implicados en procesos dinámicos; sólo un grupo de 30 residuos presenta una flexibilidad conformacional notable. Los aminoácidos de ese subgrupo se apiñan en el centro activo de la proteína y en ciertos residuos periféricos.

La mayoría de los grupos amida proporcionan valores de intercambio químico (k_{int}) muy similares en la escala de tiempo de la fluctuación; ello sugiere que siguen un movimiento concertado. El valor conjunto obtenido para k_{int} ($2500 \pm 220 \text{ s}^{-1}$) encaja con la suma de las constantes enzimáticas k_{ct} y k_{tc} (2689 s^{-1}). Esos resultados, junto con el análisis de proteínas mutantes, demuestran que el movimiento de los residuos implicados resulta crítico para la actividad catalítica de la enzima y que el valor de la velocidad máxima de la enzima ($k_{ct} + k_{tc}$) corresponde al tiempo necesario para que los residuos cambien de la conformación *cis* a la *trans*.

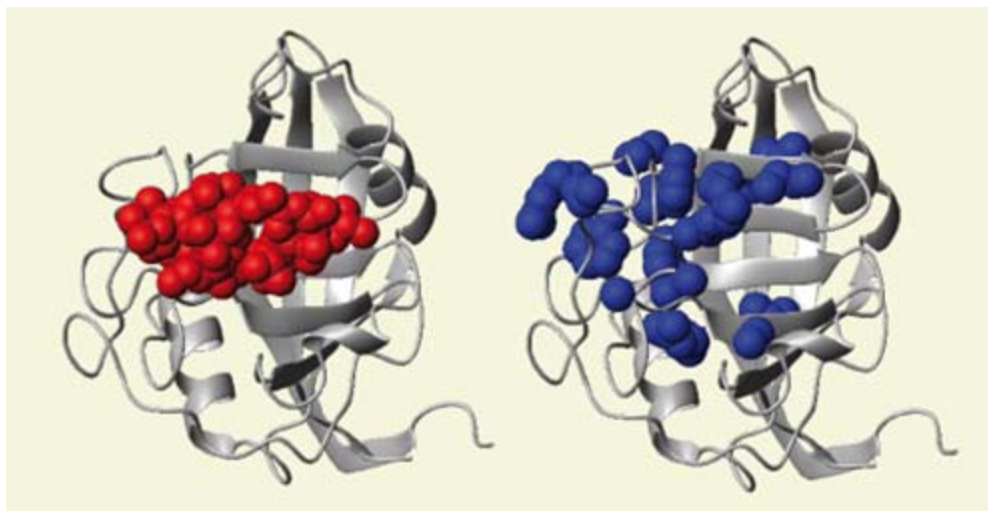
Los experimentos de dispersión demuestran que el movimiento conjunto de un grupo de aminoácidos es el responsable último de la acción enzimática en la ciclofilina. Bajo una apariencia caótica, esas fluctuaciones térmicas establecen la estereoselectividad necesaria para ejecutar la catálisis enzimática con una precisión exquisita. ¿De qué modo se produce la sincronización del movimiento de ese grupo de aminoácidos? La respuesta se encuentra en la arquitectura molecular de la enzima: la evolución ha moldeado la disposición espacial de este grupo de átomos de forma que aparezca el movimiento concertado en situación de equilibrio.

Con el propósito de averiguar la función que desempeña el sustrato en la activación del proceso, se han medido las curvas de dispersión en ausencia de sustrato. Se han descubierto equilibrios conformacionales, en la misma escala de tiempo, que afectan aproximadamente al mismo grupo de aminoácidos. De la investigación se desprende que la ciclofilina A no necesita el sustrato para llevar a cabo su actividad, sino que desarrolla su función catalítica a través del movimiento tér-

3. EN LOS EXPERIMENTOS DE RELAJACION-DISPERSION se mide la anchura de banda a diferentes tiempos de interferencia (representados aquí como frecuencias). Se muestran los resultados obtenidos para dos aminoácidos de la proteína que se une a la maltosa. La lisina 313 muestra una curva de dispersión característica. Del ajuste de los datos experimentales se extrae información sobre la movilidad del aminoácido. El aminoácido glutámico 43, en cambio, no muestra ninguna respuesta diferencial con respecto al tiempo de interferencia; ello indica que no experimenta ningún proceso de intercambio químico conformacional.



4. LA CICLOFILINA A (*gris*) constituye el receptor natural de la ciclosporina A (*rojo*). Se muestran también los átomos involucrados en procesos de intercambio químico conformacional (*azul*). Los experimentos de RMN demuestran una correlación entre la dinámica de la ciclofilina A y el sitio de unión a la ciclosporina.



mico de un fragmento activo de la proteína. Se trata de un mecanismo complementario a otros modos de catálisis enzimática, como el encaje inducido.

La comparación de los valores obtenidos en ambos experimentos revela que las características dinámicas de la enzima en estado de reposo (en ausencia de sustrato) y en estado activo (cuando procesa el sustrato) no son idénticas.

En ausencia de sustrato, la enzima opera con una k_{int} del orden de $1140 \pm 200 \text{ s}^{-1}$; en condiciones de saturación de sustrato, la constante cinética de intercambio alcanza los 2500 s^{-1} . Tal discrepancia síguese de las diferencias en la distribución de la población molecular. En el estado de reposo, alrededor de un 10 por ciento de la población se encuentra en la forma *trans* y un 90 por ciento en la forma *cis*; en presencia de elevadas concentraciones de CsA, en cambio, las poblaciones de ambos conformeros se acercan al 50 por ciento. El estado de reposo establece, por tanto, la direccionalidad del proceso biológico —favorable a la transformación de *cis* en *trans*—, mientras que la maquinaria catalítica cataliza ambos procesos con rendimientos equiparables.

Detección de estados excitados

La conformación nativa de una proteína se caracteriza por un corazón, o núcleo hidrofóbico, en donde las cadenas laterales se hallan densamente empaquetadas con el fin de maximizar las interacciones no covalentes entre los aminoácidos. Dada la complejidad de la estructura, el empaquetamiento sólo puede predecirse —y de manera aproximada— a partir de métodos computacionales. El diseño de proteínas mutantes con cavidades que puedan alojar moléculas constituye un reto para la ingeniería de proteínas y reviste interés farmacológico. Pero existe un grave

inconveniente: la proteína recombinante tiende a colapsarse sobre sí misma para eliminar el volumen adicional.

La lisozima T4 constituye la excepción. Proteína bacteriolítica de dos dominios, la encontramos en tejidos humanos y animales. Los trabajos presentados en 1992 por el grupo de Brian Matthews, de la Universidad de Oregón, descubrieron que una sola mutación en el núcleo de la lisozima T4 (leucina 99 por alanina: L99A) es suficiente para generar una cavidad de 150 angstrom cúbicos. La estructura cristalográfica de la proteína mutante confirma que la cavidad no distorsiona la arquitectura molecular, pese a hallarse enterrada a siete angstrom de la superficie. Y lo que es más, se revela capaz de alojar en su interior ligandos de tamaño reducido e hidrofóbicos (benceno, por ejemplo).

La estabilidad de la cavidad sugiere la existencia de una fuerza repulsiva entre los aminoácidos que la componen. Además, según los datos estructurales, la cavidad no daría entrada a una molécula de tamaño reducido; se requiere una segunda conformación “abierta” por donde la molécula penetraría. Experimentos de unión de xenón a la lisozima T4-L99A han revelado que la unión transcurre en torno a la escala de tiempo del milisegundo.

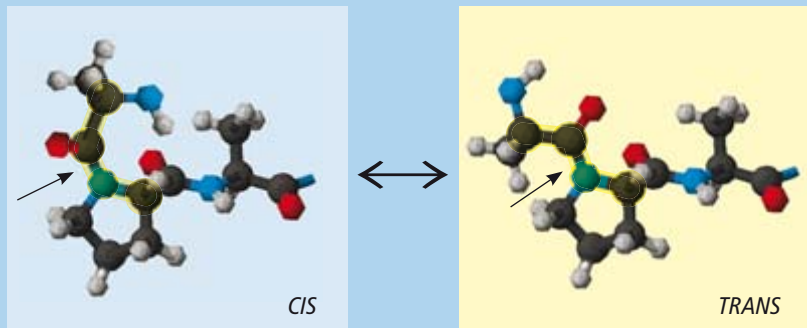
La dinámica de la cavidad de la lisozima T4 ha sido estudiada por Lewis E. Kay y su grupo, de la Universidad de Toronto, mediante técnicas de RMN de relajación-dispersión. Se ha monitorizado el comportamiento de los grupos amida y metilo de la proteína. A una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, más de la mitad de los aminoácidos que forman la proteína muestran cierta flexibilidad: todos los residuos que se hallan orientados hacia la cavidad, numerosos residuos del dominio que contiene la mutación e incluso aminoácidos que se encuentran en el otro dominio. La existencia de un movi-

El autor

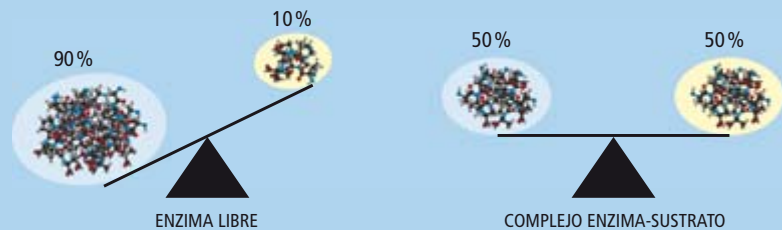
Oscar Millet es investigador del laboratorio de RMN de proteínas del Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias bio-GUNE. Realizó su tesis doctoral en la Universidad de Barcelona y completó su formación con una estancia posdoctoral en la Universidad de Toronto.

AMINOACIDOS SINCRONIZADOS

El aminoácido **prolina**, al ser cíclico, presenta isomería geométrica. Puede adoptar dos conformaciones, que se distinguen por la orientación de los residuos respecto del enlace peptídico (*flecha*): *cis* (residuos en el mismo lado) y *trans* (residuos en lados opuestos). A la derecha, el equilibrio *cis-trans* del péptido alanina-prolina-alanina (ALA-PRO-ALA).



La **ciclofilina A (CypA)** es una enzima que participa en numerosos procesos celulares de importancia máxima. Cataliza la isomerización *cis-trans* de enlaces en péptidos y proteínas que contienen **prolina**. Presenta un equilibrio entre dos conformaciones, que reconocen específicamente a las formas *cis* y *trans* del péptido respectivamente. En ausencia de sustrato, la enzima presenta un equilibrio *cis-trans* desplazado hacia la forma que se une a la conformación *cis* de la prolina; en presencia de sustrato, en cambio, ambas conformaciones son equiprobables.



Los experimentos de RMN indican que el responsable último de la dinámica enzimática de la CypA es el **movimiento concertado de un grupo de aminoácidos**, una sincronización que se produce en situación de equilibrio. Es decir, que la CypA no necesita el sustrato para llevar a cabo su actividad, sino que desarrolla su función catalítica a través del movimiento térmico de un fragmento activo de la proteína.

miento concertado se ha corroborado tras la comparación de los valores de k_{int} .

A diferencia de la proteína nativa, en la proteína mutante L99A los grupos flexibles oscilan entre el estado fundamental (esencialmente idéntico al de la proteína sin la mutación) y un estado excitado (de naturaleza desconocida), accesible al ligando. La población del estado excitado se cifra en torno al 3 por ciento, “invisible” a los experimentos estándar de resonancia magnética nuclear y de cristalografía de rayos X.

Con el fin de caracterizar la naturaleza del estado excitado se han repetido las mediciones de dispersión a una serie de temperaturas que oscilan entre los 10 °C y los 30 °C. Se han analizado los resultados de forma conjunta. Al incluir en el estudio el factor térmico, se han determinado las poblaciones del estado excitado a cada temperatura y extraído las componentes entrópica y entálpica.

Las conclusiones del análisis revelan que el estado excitado corresponde a una estructura más desordenada que el estado fundamental: existen menos interacciones y los aminoácidos presentan mayor movilidad. Una movilidad que se concentra en las zonas afectadas por el intercambio químico. Pero el desorden local observado en el estado excitado no desemboca en la desnaturalización completa de la proteína.

Lo impide una compensación entrópico-entálpica: la mayor libertad conformacional de las cadenas laterales compensa, en parte, la pérdida de estabilidad que produce la disminución del número de interacciones no covalentes.

Una mirada hacia el futuro

Una silenciosa revolución en el campo de la RMN ha acelerado el desarrollo de nuevos métodos para el estudio del intercambio químico conformacional en la escala de los microsegundos y milisegundos. Dada la íntima, y compleja, relación entre la flexibilidad conformacional y la función biológica, a los métodos de dispersión por RMN les espera un futuro prometedor en la caracterización molecular de procesos celulares: intermedios de plegamiento, proteínas mal plegadas (así, la proteína β -amiloide y su relación con la enfermedad de Alzheimer) y las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN.

Una comprensión más honda de la componente entrópica de la dinámica de las proteínas facilitará el diseño de fármacos selectivos y el escalado de enzimas para su uso industrial. Por fin, la integración de la información de los experimentos de dispersión con otros experimentos sensibles a fenómenos ultrabreves arrojará luz sobre otros procesos dinámicos que ocurren en las proteínas.

Bibliografía complementaria

STUDYING EXCITED STATES OF PROTEINS BY NMR SPECTROSCOPY. Frans A. Mulder, Anthony Mittermaier, Bin Hon, Frederick W. Dahlquist y Lewis E. Kay en *Nature Structural Biology*, vol. 8, pág. 932; noviembre, 2001.

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE METHODS FOR QUANTIFYING MICROSECOND TO MILLISECOND MOTIONS IN BIOLOGICAL MACROMOLECULES. Arthur G. Palmer, Christopher D. Kroenke, Patrick J. Loria en *Methods in Enzymology*, vol. 339, pág. 204; diciembre, 2001.

INTRINSIC DYNAMICS OF AN ENZYME UNDERLIES CATALYSIS. Elan Z. Eisenmesser, O. Millet, W. Labeikovsky, D. Korzhnev, M. Wolf, D. Bosco, J. Skalicky, L. Kay y D. Kern en *Nature*, vol. 438, pág. 117; 3 de noviembre, 2005.