

INSERCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA: ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO

Membrane Protein Insertion: Some Features of this Process

RICARDO CABEZAS.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Presentado en septiembre 15 de 2003, aceptado en noviembre 21 de 2003.

INTRODUCCIÓN

El proceso de inserción de proteínas en una bicapa lipídica es todavía objeto de estudio riguroso. Se sabe, que es un proceso en el que se requiere romper grandes barreras energéticas, que produce importantes cambios tanto para la proteína como la membrana y que es realizado con facilidad por las células para el correcto funcionamiento de la membrana. su estudio es importante para optimizar aplicaciones en biotecnología, y productos farmacéuticos. Se exponen los datos conocidos en estos procesos hasta el momento, se mencionan las distintas metodologías usadas en la investigación de estos procesos y que temas continúan siendo motivo de debates.

Las bicapas lipídicas están compuestas de dos monocapas opuestas de lípidos, en los cuales la cadena acil hidrofóbica se coloca hacia el centro de la bicapa y la cabeza anfifílica del lípido se coloca hacia fuera en contacto con la fase acuosa. (Maddox y Longo, 2002). Si bien, la estructura básica de las membranas biológicas es proveída por la bicapa lipídica, son las proteínas de membrana, las encargadas de desarrollar la mayoría de las funciones específicas de la misma, incluyendo transducción de señales, infección viral, agregación celular, fusión y ruptura de membrana. La cantidad de proteína en la membrana, varía según el tipo de célula y según el tipo de organelo. Por ejemplo, la masa de proteínas de membrana involucradas en la producción de ATP (mitocondrias y cloroplastos) es de aproximadamente un 75%, con un promedio de 50 lípidos por proteína. Existen numerosas modalidades de asociación de la proteína a la membrana (Alberts *et al*, 2002), entre las que el modo transmembrana (atravesar toda la bicapa), es una de los más comunes.

Las proteínas transmembranales, se extienden a lo largo de la bicapa lipídica, con parte de su masa en cada lado, comúnmente poseen motivo estructural alfa hélice, si bien algunas como se pliegan en lámina beta. Se trata de proteínas anfipáticas con regiones hidrofóbicas e hidrofílicas que interactuando con las colas hidrofóbicas de los lípidos en el interior de la bicapa. Sus regiones hidrofílicas están expuestas al agua en ambos lados de la membrana. La hidrofobicidad de algunas de estas proteínas transmembranales, se ve incrementada, por enlaces covalentes de una cadena de ácidos grasos que se inserta en el lado citosólico de la membrana. Dada la importancia de las proteínas

transmembranales (y de otras proteínas de membrana), se intenta desde hace años dilucidar el problema de la inserción de las mismas en el interior de la membrana celular.

MÉTODOS USADOS

Para el estudio de inserción de proteínas en membranas, se usan numerosos métodos ya que recientemente ha habido un considerable progreso en este campo (Tieleman *et al*, 2001). Las técnicas más comunes son: difracción por rayos X, resonancia magnética nuclear de estado sólido, espectroscopia infrarroja, medidas de intercambio de deuterio, calorimetría y modelos de simulación de dinámica molecular. Estas últimas pueden dividirse en dos clases (Maddox y Longo, 2001): los modelos que observan el comportamiento de todos los átomos del sistema, mostrando gran detalle y usando millones de pasos temporales, o modelos mas generales (coarse graining), que solo toman en cuenta los aspectos de más relevancia del sistema y permiten simulaciones de mayor tamaño y tiempo. Entre los programas computarizados usados se encuentra la técnica de simulación Monte Carlo, el programa CHARMM de mecánica molecular en los que intervienen numerosas técnicas de matemática compleja. La simulación de estos procesos requiere de una gran capacidad computacional, por lo que para simplificar el modelo usado, se toman varios supuestos y constantes basados en datos experimentales para simplificar el modelo usado, tales como: temperatura, presión y volumen constante, Ph generalmente neutro, limitar al máximo interacciones electrostáticas y de los enlaces. Estos supuestos dependen también de las necesidades experimentales y quedan a juicio del investigador. Otro factor importante es la escala de tiempo usado, que generalmente es de algunos pocos nanosegundos o picosegundos (ver Bachar y Becher, 2001). Esta escala de tiempo no permite simular la totalidad de los procesos, pero sin embargo da una buena aproximación. A su vez la técnica Monte Carlo que usa varios millones de pasos, no usa tiempo real (la simulación puede durar varias horas) a diferencia del programa CHARMM, que realiza los procesos de simulación de forma inmediata.

INSERCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA

Cuando las proteínas se insertan en membranas, encuentran grandes barreras energéticas (Li y Colombini, 2002), al transportarse de la fase acuosa (citosol, ambiente extracelular) a la fase lipídica. Para permanecer solubles, las partes hidrofóbicas de las proteínas, se mantienen en el núcleo de la proteína o interactúan con chaperonas. Las regiones hidrofóbicas deben mantenerse expuestas al medio ambiente dentro de la membrana y algunas extensas regiones polares deben cruzar hasta el lado opuesto de la membrana. Las proteínas deben atravesar estados de interacciones energéticas desfavorables. Se piensa que la estructura de la proteína insertada, debe haber evolucionado una serie de reacciones que minimizara la formación de intermediarios de inserción de alta energía. Algunas proteínas formadoras de canales como toxinas, pueden insertarse en las membranas de forma espontánea presumiblemente porque encuentran pequeñas barreras de energía aproximadamente iguales a la energía térmica. El canal VDAC (voltage-dependent anion channel) encargado de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial tiene su propio

mecanismo de inserción, denominado inserción autodirigida. Por este proceso, las moléculas de VDAC que ya están en la membrana, dirigen la orientación de canales VDAC no insertados y aceleran la tasa de inserción en 9 órdenes de magnitud (Li y Colombini, 2002). La inserción de los canales VDAC, probablemente requiere una orientación correcta en los fosfolípidos. Se ha encontrado que los canales VDAC catalizan adicionalmente la inserción de varias proteínas formadoras de canales como, alfa-hemolysin y gramicidina. Se ha calculado que la tasa de inserción en una membrana es de $0.2 \text{ canales min}^{-1}$, para un área de $1 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ la tasa de inserción calculado es de 20 canales. Sin embargo, no todas las proteínas insertadas actúan como catalizadores pues si fuera así se vería un incremento exponencial en la tasa de inserción total de las proteínas, algo que no se ve experimentalmente. Así pues el mecanismo de inserción autodirigido no es muy común, pero muestra un alto grado de especificidad que puede deberse a un mecanismo común de inserción debido a las similitudes estructurales mantenidas por la evolución. En otros casos la diferencia de voltaje es fundamental en la inserción de proteínas y algunas proteínas requieren para su inserción de un determinado potencial de membrana (Tielemann *et al.*, 2001). Debido a la simplicidad de los canales iónicos dependientes de voltaje, resulta fácil su estudio por lo que son usados comúnmente como modelos de interacciones entre péptidos y membranas (Tielemann *et al.*, 2001). La Alametocina (Alm), es un péptido formador de canales que ha sido muy estudiado y su inserción es inducida por voltaje (Tielemann *et al.*, 2001). Por ejemplo, en campos eléctricos de membrana de 0.33 V/nm , y mayores la Alametocina se inserta rápidamente en una plancha de octano, para formar canales. Si se aumenta el voltaje a 1 V/nm , la plancha se vuelve inestable y aumenta su permeabilidad al agua. En condiciones fisiológicas este campo es de $100\text{-}250 \text{ mv}$ manteniendo estable la estructura.

EFFECTOS DE LA INSERCIÓN

El efecto general de incorporar proteínas integrales en las membranas, es un cambio significativo en el equilibrio de fase, causante de cambios estructurales en los lípidos adyacentes (Bachar y Becker, 2000). Los efectos deben ser simétricos si se trata de una proteína integral, y asimétricos en el caso de proteínas que solo penetran hasta cierto punto ambas capas (como el caso de melitina), esto puede medirse por ejemplo con el parámetro de orden (S_{cd}), que se refiere al orden conformacional en las cadenas acilo. Es también importante señalar que la manera en la que la presencia de las proteínas, afecta a la membrana cambia según se trate de fosfolípidos en directo contacto con la proteína (boundary) o los lípidos más distantes (bulk) de esta proteína (Bachar y Becker, 2000). Los efectos de la inserción afectan también la integridad estructural de la proteína, produciendo un desenrollamiento de la alfa hélice a nivel de los extremos N o C terminales, (Bachar y Becker, 2000; Tielemann *et al.*, 2001), por ejemplo la inserción de Alm en un ambiente lipídico (Tielemann *et al.*, 2001) presenta fluctuaciones en el extremo C-terminal las cuales consisten en pérdidas reversibles de la estructura hélice de los últimos 7 residuos como producto de sus interacciones con el medio. En una simulación de melitina (principal componente de veneno de abeja) en una membrana de DPPC (Dipalmitoilfosfatidilcolina), los 3 últimos residuos del N terminal eran los que perdían la estructura hélice, adquiriendo esta

una configuración lineal (Bachar y Becker, 2000), esto debido a las cargas de los residuos (si estos son hidrofóbicos o hidrofílicos) que conforman la estructura primaria de la proteína, y las distintas interacciones que presentan al plegarse a estructura terciaria e interactuar con la membrana. Adicionalmente se observó que el ángulo de inclinación (tilt) de la proteína respecto a la membrana, variaba durante los 500 picosegundos que duraba la simulación. Este ángulo de inclinación, también estaba fuertemente relacionado con los ángulos de inclinación que adquirían los lípidos de la capa superior de la membrana durante la simulación, el cual fue de aproximadamente de 25 grados. Otros parámetros como los perfiles de densidad (density profiles), el volumen libre de la membrana, las fuerzas de campo o el coeficiente de difusión también se ven afectadas notablemente con la inserción.

DISCUSIÓN

La inserción de proteína en membrana es un proceso dinámico que altera gran número de propiedades del sistema. Es, además, un proceso que las células realizan continuamente y con gran facilidad. Actualmente, los modelos computacionales no permiten simular la totalidad de los procesos implicados en la inserción de proteínas ya que este proceso, puede llegar a tardar incluso algunos segundos, comparado con las escalas temporales en nanosegundos y picosegundos, simulados en los estudios. Por lo tanto es necesario aumentar la capacidad computacional en años futuros para permitir desarrollar sistemas, de mayor tamaño y de duración más larga. Esto no es imposible, ya que la capacidad computacional aumenta día a día. Es además probable que las simulaciones en las que se observa el comportamiento de todos los átomos, sean más efectivas que las simulaciones coarse grained, ya que se analizan un mayor número de interacciones y se aproximan más a la realidad del fenómeno.

Tal como dice Tieleman *et al.* (2001), “sería interesante combinar las simulaciones de dinámica, con cálculos termodinámicos detallados, así como establecer una metodología para estudiar los cambios conformacionales, dependientes de voltaje”. Pero a la par de estas simulaciones computacionales, es conveniente generar modelos experimentales que ayuden a complementar las simulaciones. Otro hecho importante mencionado es que la inserción del canal VDCA parece haberse conservado evolutivamente, pero se trata de un evento singular. Como ha sido la evolución de los sistemas de inserción de proteínas y su relación con la estructura de las mismas? La resolución de esta y otras preguntas permitirá en el futuro comprender con mayor claridad la dinámica del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, P. WALTER. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science.
- BACHAR, M., O. M. BECHER. 2000. Protein-Induced Membrane Disorder: A Molecular Dynamics Study of Melittin in a Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer. *Biophys. J.* 78: 1359-1375.

- LI, X. X., Y. M. COLOMBINI. 2002. Catalyzed Insertion of Proteins into Phospholipid Membranes: Specificity of the Process. *Biophys. J.* 83: 2550-2559.
- MADDOX, W. M., M. L. LONGO. 2002. A Monte Carlo Study of Peptide Insertion into Lipid Bilayers: Equilibrium Conformations and Insertion Mechanisms. *Biophys. J.* 80: 244-263
- TIELEMAN, D. P., H. J. C. BERENDSEN, M. S. P. SANSOM. 2001. Voltage-Dependent Insertion of Alamethicin at Phospholipid/Water and Octane/Water Interfaces. *Biophys. J.* 80: 331-346.