

## Estructura y Dinámica de Proteínas

Curso de Doctorado de Formación Específica de currícula fija

Facultad de Ciencias Químicas. UNC

**Fechas: 18 al 29 de octubre 2021**

**Carga horaria: 40h.**

**Evaluación:** con examen final

**Directores:** Dra. M. Soledad Celej y Dr. Guillermo Montich

**Colaboradores:** Dra. M. Elena Carrizo, Dra. Daiana Capdevila, Dra. Lucia Chemes, Dra. Valeria Risso, Dr. Gonzalo Parra, Dr. Andrés Binolfi, Dr. Javier Santos.

**Objetivos:** Brindar conocimientos básicos referidos a los distintos estados conformacionales de proteínas, las bases termodinámicas de la adopción y mantención de dichos estados, sus propiedades estructurales y dinámicas, así como los fundamentos de las metodologías biofísicas más difundidas para adquirir información sobre la estabilidad y estructura de proteínas. Se propone también brindar un panorama avanzado y actualizado acerca de la relación estructura-función de proteínas.

El curso está dirigido a estudiantes de postgrado que realicen su trabajo de Tesis Doctoral en el área de biología, bioquímica, farmacia, biofísicoquímica y físicoquímica cuyo trabajo involucra directa o indirectamente la manipulación de proteínas y la comprensión de sus actividades biológicas. Al completar el curso, el/la estudiante dispondrá de elementos para analizar los factores que determinan la adquisición de la estructura nativa de una proteína, su solubilidad y estabilidad en diferentes condiciones, la relación entre su dinámica estructural y su actividad biológica, y un panorama de las metodologías espectroscópicas y físicoquímicas más utilizadas en el estudio de estos problemas.

1er Semana		
<b>LUNES 18/10</b>	Clase 1 G Montich	<b>Estado Nativo:</b> Estructura supersecundaria, gráfico de Ramachandran. Motivos estructurales, estructura supersecundaria. Dominios estructurales. Topología. Clasificación estructural, evolutiva y funcional. Base de datos
<b>MARTES 19/10</b>	Clase 2 G Montich	<b>Estado Desplegado:</b> Descripción del estado desplegado. Geometría de polímeros (compactación, radio de giro, volumen de exclusión)
	Clase 3 MS Celej	<b>Técnicas espectroscópicas de baja resolución</b> para el estudio de la estructura y la dinámica de proteínas: Dicroísmo circular (CD), fluorescencia y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Fundamentos e instrumentación. CD: estructura secundaria y terciaria de proteínas. Fluorescencia: fluorescencia intrínseca, anisotropía y <i>quenching</i> para el estudio conformacional de proteínas. FTIR e intercambio H/D: estructura secundaria y dinámica de proteínas. Ventajas y desventajas. Aspectos a tener en cuenta para la adquisición e interpretación de los datos.

<b>MIÉRCOLES 20/10</b>	Clase 4 G Montich	<b>Estabilidad</b> del estado nativo. Balance de fuerzas. Termodinámica del proceso de plegamiento. Solubilidad, estabilizantes y desnaturizantes, efecto de cosolventes y estabilización por unión de ligandos.
<b>JUEVES 21/10</b>	Clase 5 ME Carrizo	<b>Técnicas estructurales de alta resolución: Cristalografía</b> de rayos X y criomicroscopia electrónica. Fundamentos y etapas que involucra el análisis de proteínas con ambas metodologías. Ventajas y desventajas.
<b>VIERNES 22/10</b>	Clase 6 V Risso	Resurrección de proteínas ancestrales: robustez fenotípica y narrativa evolutiva. Validación experimental de proteína ancestral. Proteínas ancestrales: potencial biotecnológico. Resurrección de proteínas ancestrales vs proteínas consenso. Promiscuidad enzimática, termoestabilidad y flexibilidad conformacional.
	Clase 8 G Montich	Rutas de plegamiento, modelo de colapso hidrofóbico ( <i>HP model</i> ) y de <i>framework</i> . Cinética de plegamiento. Intermediarios de plegamiento. Estado <b>molten globule</b>
<b>2da Semana</b>		
<b>LUNES 25/10</b>	Clase 9 G Parra	Frustración y función de proteínas. Frustración energética local: Conflictos entre plegado y función en proteínas; Frustración local y sitios catalíticos, su relación con la dinámica de proteínas y emergencia de la función proteica en la historia evolutiva de superfamilias proteicas.
<b>MARTES 26/10</b>	Clase 10 L Chemes	<b>Proteínas intrínsecamente desordenadas.</b> Propiedades químicas y físicas. Dinámicas estructural y funcional. Separación de fases
	Clase 9 MS Celej	<b>Amiloides.</b> Características generales. Aspectos mecanísticos. Polimorfismo. Regulación. Estrategias para evitar agregación.
<b>MIÉRCOLES 27/10</b>	Clase 11 A Binolfi	<b>Técnicas estructurales de alta resolución. RMN:</b> Principios básicos de RMN; aplicaciones de RMN para la caracterización de estructura; movilidad; interacciones proteína/proteína; proteína/ligando; plegamiento de proteínas, proteínas intrínsecamente desordenadas; modificaciones post-transduccionales. <b>In-cell e in vivo RMN:</b> Motivaciones; preparación de muestras; controles de calidad; secuencias de pulso rápidas; estudios en células y animales vivos.
<b>JUEVES 28/10</b>	Clase 12 G Montich	Dinámica y estabilidad. Fluctuaciones estructurales. Intercambio de protones como índice de fluctuaciones estructurales.
	Clase 13 D Capdevila	Dinámica funcional. Relación entre la dinámica interna en ms-ms con los procesos de unión (selección conformacional). Relación entre dinámica interna rápida y entropía conformacional. Estrategias experimentales para determinar contribuciones entrópicas. Rol de la entropía conformacional en los mecanismos de evolución molecular.
<b>VIERNES 29/10</b>	Clase 14 J Santos	Supercomplejo mitocondrial para la biosíntesis de centros ferro-sulfurados. La frataxina, estabilidad conformacional, dinámica, y función. Adición cuaternaria.
	Clase 15	Mesa redonda de cierre

## Bibliografía seleccionada

### General:

- Proteins. Structures and Molecular Properties. T.E. Creighton. Freeman, 1998
- Introduction to Protein Structure. C. Brandsen and J. Tooze. 1993
- Protein Folding. T.E. Creighton, Freeman, 2001
- Liberles D Ancestral sequence reconstruction. Oxford University Press. 2007
- McPherson A. (2017) Protein Crystallization. En: Wlodawer A., Dauter Z., Jaskolski M. (eds) Protein Crystallography. Methods in Molecular Biology, vol 1607. Humana Press.
- Structural Biology. Practical NMR applications. Teng Q. Springer. 2005

### Específica

- Protein Stability. Advances in Protein Chemistry. Vol. 46 (1995)
- The control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How do Solvents Affect These Processes? Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **1993**, vol. 22. S.N. Timasheff.
- Polymer Principles in Protein Structure and Stability. Annu. Rev. Biophys. Biophys Chem. (1991) vol 20. H.S. Chan and K.A. Dill
- A theoretical model for the mechanical unfolding of repeat proteins. Makarov DE. Biophys J. **2009** Mar 18;96(6):2160-7.
- Half a century of amyloids: past, present and future. Ke PC , Zhou R , Serpell LC , Riek R , Knowles TPJ , Lashuel HA , Gazit E , Hamley IW , Davis TP , Fändrich M , Otzen DE , Chapman MR , Dobson CM , Eisenberg DS , Mezzenga R .Chem Soc Rev. **2020** Aug 7;49(15):5473-5509. doi: 10.1039/c9cs00199a. Epub 2020 Jul 7.
- Secondary Nucleation and the Conservation of Structural Characteristics of Amyloid Fibril Strains. Hadi Alijanvand S, Peduzzo A, Buell AK. Front Mol Biosci. **2021** Apr 16; 8:669994. doi: 10.3389/fmolb.2021.669994. eCollection 2021.
- Life in Phases: Intra- and Inter- Molecular Phase Transitions in Protein Solutions. Uversky VN, Finkelstein AV. Biomolecules. 2019 Dec 8;9(12):842. doi: 10.3390/biom9120842.
- The growth of amyloid fibrils: rates and mechanisms. Buell AK. Biochem J. 2019 Oct 15;476(19):2677-2703. doi: 10.1042/BCJ20160868.
- The molecular lifecycle of amyloid - Mechanism of assembly, mesoscopic organisation, polymorphism, suprastructures, and biological consequences. Lutter L, Serpell CJ, Tuite MF, Xue WF. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. 2019 Nov;1867(11):140257. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.07.010.
- Localizing frustration in native proteins and protein assemblies. DU Ferreiro, JA Hegler, EA Komives, PG Wolynes. Proc Natl Acad Sci U S A. **2007**
- Structural and Energetic Characterization of the Ankyrin Repeat Protein Family. Parra RG, Espada R, Verstraete N, Ferreiro DU. PLOS Comp. Biol. DOI:10.1371/journal.pcbi.1004659
- Local Frustration around Enzymes Active Sites. Freiburger MI, Guzovsky AB, Wolynes PG\*, Parra RG\*, Ferreiro DU\*. Proc Natl Acad Sci U S A. **2019**
- Protein Frustratometer 2: A tool to localize energetic frustration in protein molecules, now with electrostatics. Parra RG, Schafer N, Radusky L, Tsai MY, Guzovsky AB, Wolynes PG, Ferreiro DU. Nucleic Acids Res. **2016** Apr 29. pii:gkw304
- FrustratometerR: An R package to calculate energetic local frustration in proteins. AO Rausch\*, MI Freiburger\*, C Leonetti, DM Luna, LG Radusky, PG Wolynes, DU Ferreiro, RG Parra. Bioinformatics, **2021**. doi.org/10.1093/bioinformatics/btab176
- Carlomagno T. Ligand-target interactions: what can we learn from NMR? Annu Rev Biophys Biomol Struct (2005);34:245-66.
- Theillet F, Binolfi A, Frembgen-Kesner T, Hingorani K, Sarkar M, Kyne C, Li C, Crowley PB, Gierasch L, Pielak GJ, Elcock AH, Gershenson A, Selenko P. Physicochemical properties of cells and their effects on intrinsically disordered proteins (IDPs). Chem Rev. (2014) 9;114(13):6661-714.

- Nishida N, Ito Y, Shimada I. In situ structural biology using in-cell NMR. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* (2020);1864(2):129364.
- Cox VE, Gaucher EA: Engineering proteins by reconstructing evolutionary adaptive paths. *Directed Evolution Library Creation.* Springer; 2014:353-363.
- GUMULYA Y, GILLAM EMJ. Exploring the past and the future of protein evolution with ancestral sequence reconstruction: the 'retro' approach to protein engineering. *Biochem J*, (2017), 474: 1.
- Benner SA, Sassi SO, Gaucher EA: Molecular paleoscience: systems biology from the past. *Adv Enzym Relat Areas Mol Biol* (2007), 75:1-132.
- Merkl R, Sterner R: Ancestral protein reconstruction: techniques and applications. *Biol Chem* (2016), 397:1-21.
- Matthew A.Spence, Joe A.Kaczmarek, Jake W.Saunders and Colin .Jackson: Ancestral sequence reconstruction for protein engineers. *Curr Opin Struct Biol.* (2021) 20;69:131-141.
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2013). Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *FEBS J.* 280, 5705-5736.
- Nogales, E., & Scheres, S. H. (2015). Cryo-EM: a unique tool for the visualization of macromolecular complexity. *Mol. Cell* 58, 677-689.
- Fernandez-Leiro, R., & Scheres, S. H. Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature* (2016) 537, 339-346.
- Doerr, A. Single-particle cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* (2016) 13, 23.
- Capdevila DA, Braymer JJ, Edmonds KA, Wu H, Giedroc DP: Entropy redistribution controls allostery in a metalloregulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017), 114:4424–4429.
- Capdevila DA, Edmonds KA, Campanello GC, Wu H, Gonzalez-Gutierrez G, Giedroc DP: Functional Role of Solvent Entropy and Conformational Entropy of Metal Binding in a Dynamically Driven Allosteric System. *J Am Chem Soc* (2018), 140:9108–9119.
- Caro JA, Harpole KW, Kasinath V, Lim J, Granja J, Valentine KG, Sharp KA, Wand AJ: Entropy in molecular recognition by proteins. *Proc Natl Acad Sci* (2017), 114:6563–6568.
- Tzeng S-R, Kalodimos CG: Allosteric inhibition through suppression of transient conformational states. *Nat Chem Biol* 2013, 9:462–5.
- Popovych N, Sun S, Ebright RH, Kalodimos CG: Dynamically driven protein allostery. *Nat Struct Mol Biol* (2006), 13:831–838.
- Fox, N.G., Yu, X., Feng, X. *et al.* Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nat Commun* 10, 2210 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09989-y>
- Castro IH, Bringas M, Doni D, Noguera ME, Capece L, Aran M, Blaustein M, Costantini P, Santos J. Relationship between activity and stability: Design and characterization of stable variants of human frataxin. *Arch Biochem Biophys.* (2020) 30;691:108491. doi: 10.1016/j.abb.2020.108491.
- Herrera MG, Noguera ME, Sewell KE, Agudelo Suárez WA, Capece L, Klinke S, Santos J. Structure of the Human ACP-ISD11 Heterodimer. *Biochemistry.* (2019)19;58(46):4596-4609. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00539.
- Lindorff-Larsen K, Kragelund BB. On the potential of machine learning to examine the relationship between sequence, structure, dynamics and function of intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol.* (2021) Aug 11:167196. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167196.
- Ruff KM, Pappu RV AlphaFold and implications for intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol.* 2021 Aug 18:167208.
- Uversky VN. Intrinsically Disordered Proteins and Their "Mysterious" (Meta)Physics. *Front. Phys.*, 07 February 2019 | <https://doi.org/10.3389/fphy.2019.00010>
- Kjaergaard M, Glavina J, Chemes LB. Predicting the effect of disordered linkers on effective concentrations and avidity with the "C<sub>eff</sub> calculator" app. *Methods Enzymol.* (2021)647:145-171. doi: 10.1016/bs.mie.2020.09.012.