

Proy. T-13/105

T
14
63

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA

*Estabilidad Térmica de los Sistemas
Pro-carboxipeptidasa B
y Fragmentos de Termolisina.
Aspectos Cinéticos y Termodinámicos.*

Francisco Conejero Lara

Tesis Doctoral
1993

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	619664758
Nº Copia	121214402

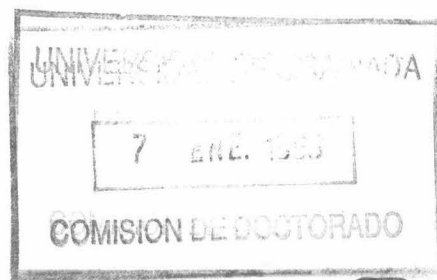
Memoria presentada para aspirar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas



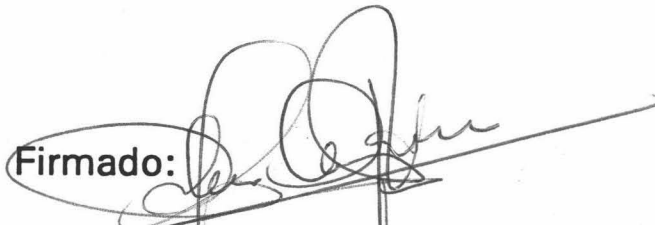
Firmado: Francisco Conejero Lara
Licenciado en Ciencias, Sección Químicas

Visado en Granada, a 22 de Diciembre de 1992.

DIRECTORES DE LA TESIS



Firmado:



Pedro Luis Mateo Alarcón,
Catedrático de Química Física
de la Universidad de Granada.



José Manuel Sánchez Ruiz,
Profesor Titular de Química
Física de la Universidad de
Granada.

INDICE GENERAL.

1.INTRODUCCION	1
2.ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	10
2.1.Procarboxipeptidasa B, carboxipeptidasa B y dominio globular de activación	11
2.1.1.Procarboxipeptidasa B	11
2.1.2.Carboxipeptidasa B (E.C. 3.4.17.2)	12
2.1.3.Dominio globular de activación	14
2.2.Termolisina, fragmentos 205-316 y 255-316 y "nicked"-termolisina	18
2.2.1.Termolisina (E.C. 3.4.24.4)	18
2.2.2.Fragmentos de termolisina TLN-205-316 y TLN-255-316	20
2.2.3."Nicked"-termolisina	23
3.MATERIALES Y METODOS	25
3.1 Materiales	26
3.1.1 Reactivos	26
3.1.2 Material Biológico	27
3.1.3 Instrumentación	27
3.2 Purificación y preparación de muestras	29
3.2.1 Procarboxipeptidasa B	29
3.2.2 Carboxipeptidasa B	29
3.2.3 Dominio globular de activación	30
3.2.4 Termolisina	31
3.2.5 "Nicked"-termolisina	38
3.2.6 Fragmento de TLN-205-316	39
3.2.7 Fragmento de TLN-255-316	45
3.3 Técnicas de análisis de muestras	49
3.3.1 HPLC de fase reversa analítica	49
3.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)	49
3.3.3 Medidas de actividades enzimáticas	50
3.4 Cinéticas de inactivación térmica de carboxipeptidasa B	53
3.5 Cromatografía de exclusión molecular	54

3.6 Calorimetría diferencial de barrido	59
3.6.1 El instrumento	59
3.6.2 Experimentación	61
3.6.3 Análisis de datos	62
4. FUNDAMENTOS TEORICOS	65
4.1 Modelos de equilibrio	66
4.1.1 Modelo de equilibrio de dos estados	66
4.1.2 Modelos de equilibrio multiestado	72
4.1.3 Efectos de la concentración de proteína en transiciones con cambio en el estado de asociación	78
4.1.4 Efecto de ligandos en transiciones de equilibrio	81
4.2 Modelos cinéticos	83
4.2.1 Modelo cinético de dos estados	83
4.2.2 Otros modelos cinéticos más complejos	89
4.2.3 Efectos de la concentración de proteína sobre transiciones irreversibles	90
4.2.4 Efectos de concentración de ligandos en transiciones irreversibles	91
5. RESULTADOS Y DISCUSION	93
5.1 Estudio de la desnaturalización térmica de la procarboxipeptidasa B, la carboxipeptidasa B y el dominio globular de activación por calorimetría diferencial de barrido	94
5.1.1 Procarboxipeptidasa B y carboxipeptidasa B	94
5.1.2 Dominio globular de activación	113
5.1.3 Mezclas equimolares de carboxipeptidasas A y B y sus dominios globulares de activación	124
5.2 Estudio del efecto del Zn^{2+} en la desnaturalización térmica de la carboxipeptidasa B	129
5.2.1 Efecto del Zn^{2+} en las transiciones de DSC en pirofosfato 20 mM, pH 9.0	129
5.2.2 Cinéticas de inactivación térmica de CPB a temperatura constante	139
5.2.3 Un modelo cinético sencillo que explica el efecto del Zn^{2+} en la desnaturalización térmica de la CPB	143
5.2.4 Desnaturalización térmica de la CPB en presencia de	

1,10-fenantrolina	151
5.3 Estudio de la desnaturalización térmica de la termolisina por calorimetría diferencial de barrido	161
5.3.1 Efecto del pH en la desnaturalización térmica de la termolisina .	162
5.3.2 Efecto de la concentración de proteína	169
5.3.3 Efecto de la presencia de inhibidores de la actividad de termolisina	175
5.3.4 Efecto de los iones Zn^{2+} y Ca^{2+}	178
5.4 Estudio del desplegamiento térmico de los fragmentos TLN-255-316 y TLN-205-316	188
5.4.1 Efecto de la concentración de muestra en las transiciones de DSC del fragmento TLN-255-316	188
5.4.2 Efecto de la concentración de muestra en las transiciones de DSC del fragmento TLN-205-316	197
5.4.3 Experimentos de cromatografía de exclusión molecular con el fragmento TLN-205-316	206
5.4.4 Un modelo sencillo que explica las curvas de $C_p(T)$ correspondientes al desplegamiento térmico del fragmento TLN-205-316	210
5.5 Estudio de la desnaturalización térmica de la "nicked"-termolisina	230
5.6 Resumen	244
6. CONCLUSIONES	255
7. BIBLIOGRAFIA	258

INDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>	<u>PAGINA</u>
2.1	12
2.2	14
2.3	17
2.4	19
2.5	22
3.1	30
3.2	32
3.3	33
3.4	35
3.5	36
3.6	37
3.7	40
3.8	43
3.9	44
3.10	46
3.11	48
3.12	57
3.13	60
3.14	62
3.15	63
4.1	68
4.2	70
4.3	72
4.4	75
4.5	77
4.6	80
4.7	85
4.8	86
4.9	88
5.1.1	95
5.1.2	97
5.1.3	98
5.1.4	99
5.1.5	100
5.1.6	102
5.1.7	103
5.1.8	105
5.1.9	106
5.1.10	110
5.1.11	112
5.1.12	114
5.1.13	115
5.1.14	116
5.1.15	119
5.1.16	120

5.1.17	121
5.1.18	122
5.1.19	125
5.1.20	126
5.2.1	130
5.2.2	132
5.2.3	133
5.2.4	136
5.2.5	137
5.2.6	138
5.2.7	141
5.2.8	142
5.2.9	143
5.2.10	147
5.2.11	148
5.2.12	150
5.2.13	152
5.2.14	153
5.2.15	155
5.2.16	157
5.2.17	159
5.3.1	164
5.3.2	167
5.3.3	168
5.3.4	171
5.3.5	172
5.3.6	177
5.3.7	179
5.3.8	181
5.3.9	182
5.3.10	185
5.4.1	189
5.4.2	191
5.4.3	192
5.4.4	194
5.4.5	196
5.4.6	198
5.4.7	199
5.4.8	201
5.4.9	202
5.4.10	203
5.4.11	205
5.4.12	207
5.4.13	211
5.4.14	220
5.4.15	221
5.4.16	223
5.4.17	224
5.5.1(A)	232

5.5.1(B)	233
5.5.2(A)	235
5.5.2(B)	236
5.5.3(A)	237
5.5.3(B)	238
5.5.4	239
5.5.5	240
5.6.1	252

INDICE DE TABLAS

<u>TABLA</u>	<u>PAGINA</u>
3.I	37
3.II	56
5.1.I	101
5.1.II	108
5.1.III	111
5.1.IV	113
5.1.V	123
5.1.VI	128
5.2.I	131
5.2.II	135
5.2.III	139
5.2.IV	149
5.2.V	154
5.3.I	165
5.3.II	170
5.3.III	176
5.4.I	190
5.4.II	195
5.4.III	204
5.4.IV	208
5.4.V	210
5.4.VI	222
5.5.I	234
5.6.I	250

1. INTRODUCCION

Una de las principales metas que se persiguen hoy día en el ámbito de la Biotecnología es el control de la estabilidad de las proteínas, especialmente de su estabilidad térmica. El incremento de la resistencia de las enzimas frente a la inactivación a altas temperaturas tiene múltiples aplicaciones como, por ejemplo, en el campo de los biorreactores enzimáticos, dado que su eficiencia se ve fuertemente aumentada con la temperatura de trabajo (Volkin y Klibanov, 1989), por lo que siempre se persigue obtener la enzima más termoestable posible, que conserve intacta la actividad catalítica deseada. Existen otros ámbitos en que la termoestabilidad de las proteínas es importante tales como tecnología de alimentos, esterilización de medios de fermentación por calor, etc.

Es bien sabido que la estabilidad conformacional de las proteínas relativamente baja. La definición usualmente utilizada de la estabilidad conformacional de una proteína es la diferencia de energía de Gibbs entre el estado nativo de una proteína y las conformaciones desplegadas (Pace, 1990a), siendo esta diferencia generalmente para proteínas globulares de 5-20 kcal/mol (Pace, 1975; Privalov, 1979). Este valor equivale aproximadamente a la formación de uno o dos enlaces de hidrógeno, por lo que incluso la modificación de la interacción más pequeña puede contribuir significativamente a la estabilización o desestabilización de la estructura globular (Dill, 1987).

Por otra parte, las fuerzas de plegamiento de las proteínas y los factores que las gobiernan son hasta ahora prácticamente desconocidos. Sin embargo, se han hecho recientemente algunos avances en su conocimiento, aunque subsisten todavía serias discrepancias. Algunos autores han propuesto que la principal fuerza impulsora del plegamiento de las proteínas es el llamado "efecto hidrofóbico", que se debe a la tendencia que presentan los grupos apolares de la cadena polipeptídica a evitar el contacto con el agua, escondiéndose en el interior de la estructura plegada de la proteína. Esto se debería a la disminución de entropía que acompaña a la hidratación de los grupos apolares al exponerse al medio con el desplegamiento. Este efecto se compensaría parcialmente por el incremento de entropía configuracional de la cadena, resultando un balance ligeramente favorable al plegamiento de la proteína a temperatura ambiente. Otras fuerzas tales como interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, etc., pueden desequilibrar este débil balance influenciando apreciablemente la estabilidad de la estructura

plegada (Dill, 1990). De otro lado, otros autores, basándose en el análisis termodinámico de datos calorimétricos, proponen que el efecto hidrofóbico es poco estabilizante o incluso desestabilizante y que las interacciones que favorecen el plegamiento son principalmente la formación de puentes de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals, que mantienen la cadena polipeptídica plegada a temperaturas a las que el efecto desestabilizador debido a la hidratación de los grupos apolares y las fuerzas disipativas es relativamente bajo, es decir a temperatura ambiente (Privalov y Gill, 1988; Privalov, 1989).

La subsistencia de estas incógnitas hace que en general acometer con éxito experimentalmente la estabilización de una proteína mediante modificación química, de condiciones ambientales, ingeniería genética, etc., contenga una buena parte de azar, aunque hay ciertas pautas de actuación conocidas como, por ejemplo: la sustitución de aminoácidos poco conservados en secuencias de proteínas homólogas, que favorezca la hidrofobicidad interna de la proteína y el empaquetamiento de los grupos hidrofóbicos; la creación de enlaces internos que rigidifiquen la estructura, tales como puentes disulfuro, puentes de hidrógeno o puentes salinos; la creación de sitios de unión de iones que sean estabilizantes en otras proteínas; etc. (Pace 1990b).

En cuanto al mecanismo de plegamiento de las proteínas, la existencia de intermediarios de plegamiento poblados, normalmente con una estructura cercana a la nativa ha sido bastante documentada (Creighton, 1975; Weissman y Kim, 1991; Kuwajima, 1989; Ptitsyn et al., 1990 ; Kim y Baldwin, 1990). Además, ha sido posible aislar fragmentos correspondientes a dominios estructurales de proteínas que son capaces de plegarse espontáneamente en disolución en una conformación similar a la nativa (Vita et al., 1979; Wetlaufer, 1981; Vita y Fontana, 1982; Dalzoppo et al., 1985; Vita et al., 1989). Parece estar bien establecido que el plegamiento de las proteínas procede a través de formación de núcleos de estructura secundaria (hélices α , láminas β ,...) que inician la formación de dominios/subunidades que posteriormente se asocian para formar la estructura tridimensional nativa (Jaenicke, 1991).

A pesar de todo esto, hoy día se dista mucho de un conocimiento amplio de las reglas de plegamiento de las proteínas, es decir, lo que se ha venido a llamar la "segunda parte del código genético" que gobierna el paso espontáneo de una estructura monodimensional (la estructura primaria) al estado tridimensional funcional de la proteína (Jaenicke, 1991). Un

conocimiento de estas reglas facilitaría la modificación de proteínas mediante técnicas de DNA recombinante, encaminada a la estabilización térmica o frente a otros agentes, o incluso a cambios dirigidos en sus actividades biológicas. Más aún, sería posible el diseño y fabricación de proteínas "de novo" con las actividades y propiedades deseadas. Sin embargo, la actuación en este sentido está hoy día muy limitada, dado que sólo se conocen las características generales de los factores controlantes del plegamiento y de la estabilidad de las proteínas. Existen a pesar de todo bastantes trabajos sobre la estabilización de enzimas mediante modificación genética (Mitchinson y Wells, 1989; Pantoliano et al., 1988 y 1989; Toma et al., 1991), e incluso algún diseño de proteínas completamente nuevas (Regan y DeGrado, 1988).

El estudio del desplegamiento térmico de proteínas es uno de los enfoques más utilizados para caracterizar su estructura y su estabilidad térmica. En particular, la técnica más informativa es la microcalorimetría diferencial de barrido (DSC), que provee de la capacidad calorífica, C_p , del sistema en función de la temperatura. El análisis termodinámico de los datos de DSC permite, en principio, la descripción completa de todas las funciones termodinámicas del desplegamiento reversible de proteínas. Este enfoque es válido y tremendamente informativo siempre que el proceso de desnaturalización térmica transcurra reversiblemente y en equilibrio (Privalov, 1979 y 1982; Mateo, 1894). La reversibilidad de la desnaturalización térmica se comprueba fácilmente en experimentos de DSC mediante la realización de dos barridos consecutivos con la muestra en estudio, obteniéndose para procesos reversibles termogramas iguales o parecidos. Además se supone que los procesos de desplegamiento-plegamiento son suficientemente rápidos para permitir que el equilibrio se encuentre en todo momento establecido. El estudio de proteínas globulares sencillas y algunas complejas mediante DSC condujo en su día a la definición estructural de los dominios cooperativos, como unidades de plegamiento de las proteínas (Privalov, 1982). Para proteínas globulares pequeñas está establecido que se despliegan térmicamente de acuerdo con el modelo de equilibrio de dos estados (Privalov, 1979), constituyendo dominios estructurales únicos, altamente cooperativos. Proteínas más complejas se encuentran formadas por más de un dominio estructural que despliegan más o menos independientemente (Privalov, 1982). Este hallazgo se ha establecido principalmente del análisis de la forma de las transiciones

reversibles de DSC obtenidas con proteínas complejas en comparación con algunos de sus fragmentos (Privalov et al., 1981; Privalov y Medved, 1982; Potekhin y Privalov, 1982; Brzeska et al., 1983; Novokhatni et al., 1984). Normalmente estos fragmentos corresponden a dominios claramente diferenciados en la estructura proteica, tales como enzimas activadas por proteólisis de un zimógeno, fragmentos de inmunoglobulinas o de proteínas fibrilares, etc. (Privalov, 1982). Está tomando auge el estudio por diversas técnicas del desplegamiento térmico de fragmentos de proteínas más compactas, que se supone que constituyen dominios estructurales de acuerdo con predicciones basadas en el análisis de su estructura por computador, y que son aislados también normalmente mediante proteólisis limitada o mediante semisíntesis (Vita y Fontana, 1982; Vita et al., 1984 y 1985; Dalzoppo et al., 1985). En general los estudios de este tipo mediante DSC son bastante escasos (Rudolph et al., 1990). Estos estudios, en conjunción con nuevos modelos que permiten analizar las interacciones interdominio a partir de datos de DSC (Brandts et al., 1989; Ramsay y Freire, 1990; Freire y Murphy, 1991), podrían aportar bastante luz sobre la "organización jerárquica" de la estructura de las proteínas, que procede gradualmente de estructuras secundarias locales, subdominios y dominios, para generar finalmente la estructura terciaria completa (Jaenicke, 1991). Un mejor conocimiento de esta organización estructural es necesario para garantizar el éxito al afrontar la estabilización de proteínas.

Por desgracia la mayoría de la proteínas presentan una desnaturalización térmica irreversible, lo que se demuestra por la no aparición en el segundo barrido de DSC de efecto térmico alguno. Normalmente este hecho se ha atribuido a la presencia de procesos indeseados que alteran el estado desplegado de la proteína, impidiendo su posterior plegamiento (Zale y Klibanov, 1986; Klibanov y Ahern, 1987; Volkin y Klibanov, 1989). En este sentido, ha surgido un tema de gran controversia en la actualidad referente a si es correcto o no el estudio de la estabilidad de proteínas mediante el análisis termodinámico de los datos de DSC correspondientes a su desnaturalización térmica irreversible. Un esquema sencillo que describe la situación es el modelo de Lumry y Eyring: $N \rightleftharpoons D \rightarrow F$ (Lumry y Eyring, 1954), donde N y D representan el estado nativo y desplegado de una proteína respectivamente y F representa un estado alcanzado por alteración irreversible de D. Dado que la segunda etapa, $D \rightarrow F$, es un proceso dependiente del tiempo, sea cual fuere su

naturaleza (procesos conformacionales, agregación, autólisis, deamidación, rotura o formación incorrecta de puentes disulfuro,...; para una revisión reciente ver Volkin y Klibanov, 1989), no está claro a priori en qué medida es capaz de alterar la información de equilibrio procedente de la primera etapa, $N \rightleftharpoons D$, que puede estar contenida en los datos de DSC.

En los últimos años han aparecido publicados una serie de trabajos en los que se analizan termogramas irreversibles de DSC en base a la termodinámica de equilibrio (Manly et al., 1985; Edge et al., 1985 y 1988; Hu y Sturtevant, 1987 y 1989; Sturtevant, 1987; Brandts et al., 1989; Pantoliano et al., 1989; Sturtevant et al., 1989; Bertazzon et al., 1990). La principal evidencia que ha apoyado a este tipo de análisis viene del hecho de que el efecto de la concentración ligandos encontrado sobre las transiciones de DSC parece seguir los dictados de la ecuación de van't Hoff (Manly et al., 1985; Edge et al., 1985; Hu y Sturtevant, 1987 y 1989). La importancia de esta controversia procede del hecho de que se vienen realizando con asiduidad estudios de estabilización de proteínas mediante mutagénesis dirigida en los que se caracteriza la termoestabilidad de las especies mutantes obtenidas utilizando los resultados de energías de Gibbs de plegamiento que resultan de estos análisis termodinámicos de los datos de DSC (Pantoliano et al., 1989; Brandts et al., 1989; Sturtevant et al., 1989).

Por otro lado, trabajos publicados recientemente por miembros del Departamento de Química Física de esta Universidad demuestran que las transiciones calorimétricas correspondientes a la desnaturalización térmica irreversible de varias proteínas dependen fuertemente de la velocidad de barrido empleada, lo que indica que el proceso responsable de la absorción de calor está controlado, al menos en parte, por un proceso de no equilibrio. En la mayoría de estos casos el proceso de desnaturalización térmica irreversible se describe cuantitativamente mediante el modelo cinético de dos estados (Sánchez-Ruiz et al., 1988a y 1988b; Guzmán-Casado et al., 1990; Galisteo, 1990), aunque se han encontrado situaciones más complejas (Galisteo et al., 1991). Sin embargo, es común a todos los casos la no existencia de equilibrio entre los estados de la proteína implicados en el proceso de desnaturalización, por lo que el análisis termodinámico directo de los datos de DSC correspondientes no es correcto y podría conducir a grandes errores en las magnitudes termodinámicas que se persigue obtener.

La aparición de modelos cinéticos que permiten el análisis de datos calorimétricos procedentes de procesos de no equilibrio es algo todavía naciente, aunque se están realizando recientemente serios esfuerzos en este sentido en el Departamento de Química Física de la Universidad de Granada (Sánchez-Ruiz, et al., 1988a; Freire et al., 1990; Galisteo et al., 1991; Conejero-Lara et al., 1991b; Sánchez-Ruiz, 1992). Estos modelos aportan una serie de criterios muy útiles que permiten distinguir cuándo los datos de DSC correspondientes a un proceso de desnaturalización térmica irreversible contienen o no información termodinámica sobre el desplegamiento térmico de la proteína y en qué medida es posible extraer dicha información de los termogramas. Además, estos modelos permiten una caracterización cinética de los procesos irreversibles implicados, lo cual, desde cierto punto de vista, tiene tanta relevancia como la información termodinámica. Fijándonos de nuevo en el esquema de Lumry y Eyring, tan importante y efectiva en la termoestabilización de una proteína puede ser la actuación sobre el proceso de desplegamiento térmico, $N \rightleftharpoons D$, estabilizando termodinámicamente el estado nativo, N, frente al desplegado, D, como la de ralentizar o eliminar los procesos de termoinactivación irreversible del estado desplegado que llevan a un estado inactivo de la proteína, F (Volkin y Klibanov, 1989). Proteínas con desplegamiento térmico reversible por excelencia como la ribonucleasa sufren termoinactivación a temperaturas elevadas debido a procesos colaterales que afectan al estado desplegado (Zale y Klibanov, 1986). La elucidación y caracterización de los mecanismos de estos procesos de termoinactivación irreversible es un campo de gran interés en el ámbito de la biotecnología de proteínas. Los estudios de desnaturalización térmica irreversible mediante DSC, apoyados por modelos cinéticos que permitan el análisis apropiado de los datos obtenidos, pueden ser una herramienta muy importante y valiosa para aumentar el conocimiento de los factores y mecanismos que controlan la estabilidad (cinética y termodinámica) de las proteínas.

En esta Memoria se ha afrontado el estudio por DSC, bajo una serie de condiciones experimentales, de las especies constituyentes de dos sistemas claramente diferenciados pero con ciertas características comunes a priori: El primer sistema está formado por la procarboxipeptidasa B de páncreas porcino, junto con las dos especies generadas en su activación por corte trípico: la carboxipeptidasa B (una metaloenzima proteolítica

dependiente de Zn^{2+}) y el dominio globular de activación. El segundo sistema lo forman la termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus kokko*, junto con dos fragmentos aislados del extremo carboxilo terminal, correspondientes a los restos 205-316 y 255-316, y una "nicked"-termolisina (termolisina que ha sufrido cortes en su cadena pero que mantiene los fragmentos unidos en una conformación similar a la proteína intacta). La termolisina es también una metaloproteasa, procedente de un organismo termofílico, que tiene un ion Zn^{2+} esencial para su actividad enzimática.

Ambos sistemas están constituidos por una proteína globular de tamaño medio y subfragmentos aislados de los que se ha propuesto que constituyen dominios o subdominios estructurales de las especies mayores. Esto hace interesante a priori su estudio por DSC enmarcado en el análisis del plegamiento y la estabilidad de dominios estructurales y de las interacciones establecidas entre ellos así como de sus contribuciones a la estabilidad global de las proteínas implicadas, especialmente de la termolisina, que presenta una elevada termoestabilidad. La alta resistencia que presentan las proteínas procedentes de organismos termofílicos frente a su desnaturalización térmica, en comparación con las de organismos mesófilos, está siendo objeto de gran atención recientemente, centrándose el mayor interés de los investigadores en la relación estructura-función-estabilidad de las enzimas termofílicas (Fontana, 1988).

Ambos sistemas presentan ciertos antecedentes en cuanto a estudios previos por DSC en este Departamento. Anteriormente a este trabajo, se ha realizado uno similar con el sistema de la procarboxipeptidasa A de páncreas porcino (Sánchez-Ruiz, et al., 1988b). Asimismo la termolisina ya fue estudiada por DSC por Sánchez-Ruiz et al. (1988a). Estas investigaciones previas mostraron que tanto la termolisina como la pro- y carboxipeptidasa A presentaban en todos los casos una desnaturalización térmica completamente irreversible y cinéticamente controlada. Únicamente el dominio de activación de la procarboxipeptidasa A presentó un desplegamiento térmico reversible.

En el presente caso, hemos obtenido semejantes resultados, tanto para la pro- y carboxipeptidasa B, como para la termolisina y la "nicked"-termolisina, en todas las condiciones investigadas en esta Memoria. Esto ha modificado en parte la finalidad inicial del estudio. Sin embargo, el análisis de los datos obtenidos en base a modelos cinéticos previamente propuestos en la bibliografía o, en su caso, desarrollando aquí el modelo

adecuado para su interpretación, aporta valiosa información cinética sobre los procesos implicados en la desnaturalización térmica irreversible de estas proteínas y su influencia en la termoestabilidad. Además, basándonos en el estudio del efecto del Zn^{2+} en la desnaturalización irreversible de la carboxipeptidasa B, se establecen algunos criterios sobre la imposibilidad de aplicación de la termodinámica del equilibrio al análisis de los datos de DSC de algunas proteínas cuya desnaturalización térmica es irreversible y cinéticamente controlada.

En el caso de las especies menores, dominio de activación de la procarboxipeptidasa B y fragmentos de la termolisina, se ha encontrado un desplegamiento térmico reversible y de equilibrio. Esto ha permitido su caracterización termodinámica, obteniéndose unos resultados que muestran aspectos interesantes y originales sobre la estabilidad y el plegamiento de estas pequeñas cadenas polipeptídicas, tanto en la detección de un estado intermedio de desplegamiento del dominio de activación de la procarboxipeptidasa B, como en la caracterización de estados nativos diméricos de los dos fragmentos de la termolisina estudiados. Además, para el caso del fragmento de termolisina 205-316, la interpretación de los resultados obtenidos se ha llevado a cabo utilizando un modelo en el que el equilibrio de disociación puede ser lento a temperatura ambiente, encontrándose que existe un estado metastable del fragmento a baja temperatura, algo que ya se ha descrito en algún otro caso de la Bibliografía (Baker et al., 1992) y que puede ser de gran importancia en el plegamiento de las proteínas.

**2. ANTECEDENTES
BIBLIOGRAFICOS**

2.1. Procarboxipeptidasa B, carboxipeptidasa B y dominio globular de activación.

2.1.1 Procarboxipeptidasa B.

La procarboxipeptidasa B (PCPB) porcina es un zimógeno que se sintetiza en las células acinares del páncreas y se segrega al exterior celular y posteriormente al duodeno. La PCPB no presenta ninguna actividad enzimática, es un precursor de la carboxipeptidasa B (CPB) que se genera tras la pérdida de un largo segmento peptídico del extremo N-terminal por la acción de la tripsina (Burgos, 1989; Burgos et al., 1991). La PCPB porcina es una proteína globular monomérica de 45.5 kDa de peso molecular según su análisis de aminoácidos. En contraste, la procarboxipeptidasa A, zimógeno de la carboxipeptidasa A, puede formar en cambio complejos oligoméricos con otras proproteinasas (Martínez et al., 1981). No se ha encontrado ninguna evidencia de isomorfismo ni heterogeneidad molecular en la PCPB porcina al contrario que en especies como hombre o rata (Burgos, 1989). La única secuencia completa conocida hasta la fecha de una procarboxipeptidasa B es la de rata, deducida mediante decodificación génica (Clauser et al., 1988). Recientemente se ha determinado la estructura tridimensional por cristalografía de Rayos X de la PCPB porcina, que se muestra esquemáticamente en la Figura 2.1 (Coll et al., 1991). Tiene dos dominios claramente distinguibles. El primero corresponde a la enzima activa (CPB). El otro dominio está formado por una porción globular (restos 7-80) y una región que lo conecta con la enzima activa (restos 81-95). La región globular cubre la depresión del sitio activo de la CPB, ya preformado en la proenzima, evitando así el acceso de sustratos. La conformación del dominio correspondiente a la enzima activa es muy similar a la encontrada para CPA y CPB bovinas, en especial en el centro activo que contiene ya el ion Zn^{2+} . El mecanismo de activación de la PCPB ha sido recientemente descrito en detalle (Burgos et al., 1991). En la primera etapa la tripsina (probablemente la única enzima capaz de activar la PCPB en el intestino) produce un corte proteolítico en el enlace Arg95-Thr96 de la PCPB, generando CPB activa y un fragmento de 95 aminoácidos que inmediatamente es degradado por la CPB liberada y la tripsina dando lugar a una serie de intermedios característicos y finalmente al fragmento de 81 restos de aminoácido estudiado en esta Memoria, resistente a la proteólisis, que será descrito posteriormente con más detalle en este capítulo.

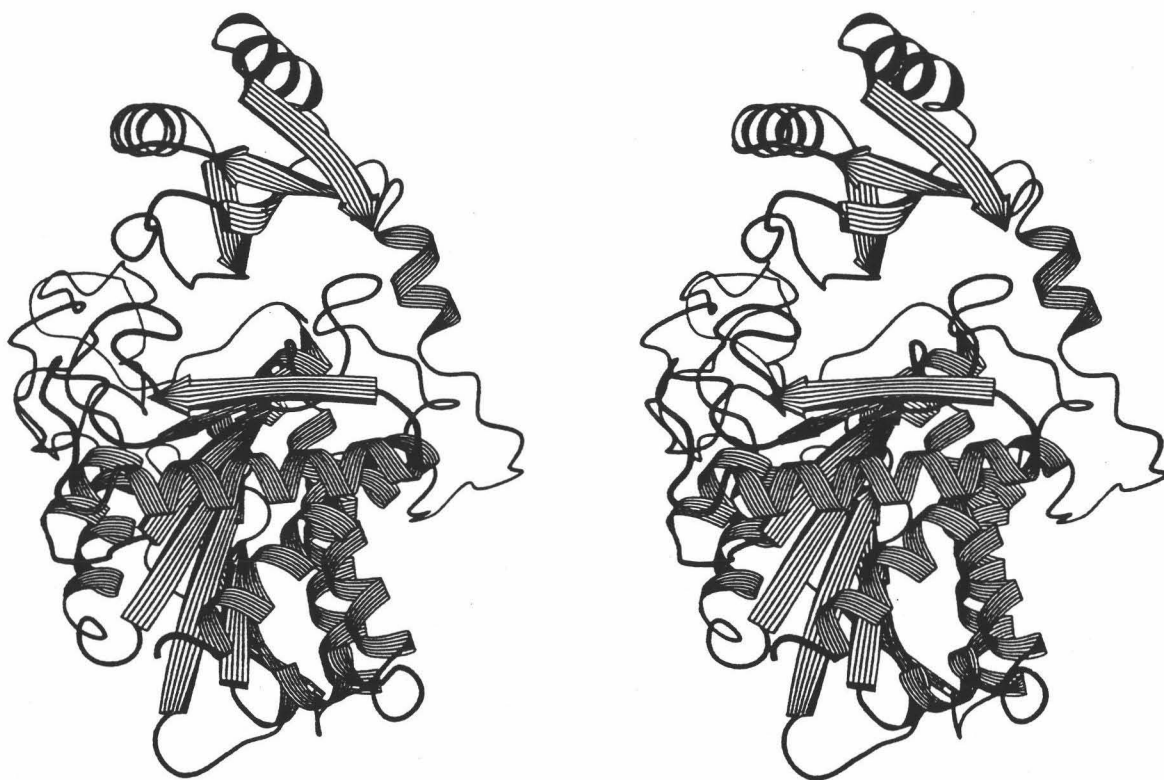


FIGURA 2.1: Representación esquemática del esqueleto de la estructura de la PCPB porcina, obtenido mediante difracción de rayos X (tomado de Coll et al., 1991).

2.1.2 Carboxipeptidasa B (E.C. 3.4.17.2).

La CPB es una metalopeptidasa que cataliza la hidrólisis de restos de aminoácidos básicos (lisina o arginina) del extremo C-terminal de proteínas y péptidos. La elevada actividad de este enzima sugiere que desempeña un papel fundamental en la digestión que probablemente es la de iniciar la degradación de los productos de hidrólisis triptica, ya que exhibe una fuerte especificidad hacia los mismos (Blackburn, 1976). Por su parte, la carboxipeptidasa A (CPA), enzima con la que presenta grandes similitudes, muestra una preferencia similar por los productos de hidrólisis quimotriptica. La carboxipeptidasa B mejor conocida es la de páncreas bovino. Fue descrita por primera vez por Folk (1956) y aislada posteriormente por Folk y Gladner (1958). La enzima bovina es una proteína de 306 restos de aminoácidos con un peso molecular de 34606 (Titani et al., 1975). La CPB porcina tiene un peso molecular de 34.5 kDa según su análisis de aminoácidos (Burgos, 1989). Las secuencias de la CPB y la CPA bovinas presentan una identidad del 49% (Titani et al., 1975). La CPB contiene 3 puentes disulfuro entre los residuos 66-79, 138-161 y 152-166, y un ion Zn^{2+} en el centro activo. Este ion Zn^{2+} es indispensable para su actividad enzimática y al ser retirado con agentes quelantes la enzima pierde toda su actividad proteolítica (Folk et al., 1960). Asimismo, puede ser reemplazado por otros cationes como Co^{2+} o Cd^{2+} cambiando con ello la actividad y la especificidad de la enzima (Folk y Gladner, 1961). La estructura tridimensional de la CPB bovina se conoce con una resolución de 2.8 Å (Schmid y Herriott, 1976). En la Figura 2.2 se muestra dicha estructura. Es una proteína globular, de forma elipsoidal y unas dimensiones semejantes a las de la CPA: 50 Å x 40 Å x 38 Å. La estructura interna básica de la CPB bovina está formada, al igual que en la CPA, por una hoja plegada β de 8 cadenas, completada por 8 hélices α . En el centro activo se encuentra un bolsillo hidrofóbico en el fondo del cual está la cadena lateral de Asp255. En la CPA hay una Isoleucina, lo que podría explicar la diferencia de especificidad entre ambas enzimas: CPB muestra especificidad hacia sustratos básicos mientras que CPA hidroliza preferentemente sustratos aromáticos y alifáticos. El ion Zn^{2+} del centro activo se encuentra tetracoordinado a los residuos His69, Glu72 e His196, así como a una molécula de H_2O . Como se menciona más arriba, recientemente se ha determinado la estructura tridimensional de la PCPB porcina observándose que la parte correspondiente a la enzima muestra una

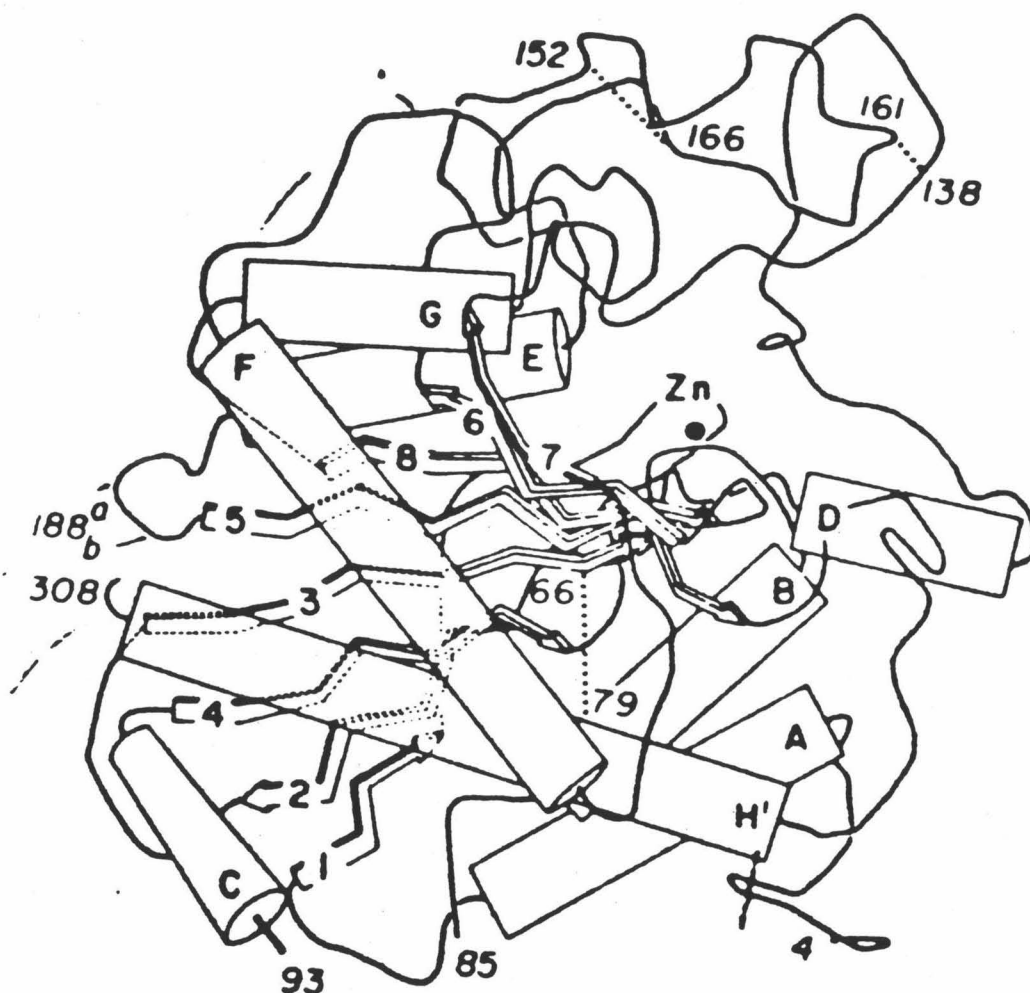


FIGURA 2.2: Modelo esquemático del esqueleto de la estructura tridimensional de la CPB bovina. Los cilindros indican hélices mientras que las flechas representan cadenas de lámina β . Puede apreciarse la situación del ion Zn^{2+} en el centro activo así como la existencia de tres puentes disulfuro (tomado de Schmid y Herriott, 1976).

estructura casi idéntica a la de CPB y CPA bovinas, sugiriendo que aquella debe conservar idénticas características estructurales que sus homólogas y que el proceso de activación de la PCPB no implica cambios estructurales apreciables en la enzima (Coll et al., 1991).

2.1.3 Dominio globular de activación.

En la activación triptica de la PCPB se genera un fragmento de 81 restos de aminoácidos del extremo N-terminal del zimógeno que posee características propias de un dominio estructural, por lo que le llamaremos dominio globular de activación (DAB). Este fragmento es bastante resistente a la proteólisis y puede ser aislado a homogeneidad a partir de PCPB (Burgos, 1989). La secuencia de aminoácidos del DAB ha sido determinada (Burgos et al., 1991) encontrándose que contiene un alto porcentaje de restos ácidos y está exento de cisteínas, metioninas y de modificaciones posttraslacionales de cadenas laterales. Tiene un peso molecular de 9318 dalton. Con su homólogo de PCPA presenta una baja homología (31%). Además, DAB es incapaz de inhibir la CPB, al contrario de lo que ocurre con el fragmento procedente de la PCPA, que inhibe fuertemente la CPA (San Segundo et al., 1982; Vendrell et al. 1990a). Se ha encontrado recientemente por RMN bidimensional que el plegamiento del DAB aislado consiste básicamente en una estructura β antiparalela con dos largas hélices α que caen sobre una de sus caras (Vendrell et al., 1990; Vendrell et al., 1991). Esto se ha confirmado con la determinación de la estructura tridimensional por rayos X de la PCPB porcina arriba mencionada (Coll et al., 1991). La región de activación de la PCPB muestra una parte globular (residuos 7-80) con una estructura de dos capas formada por una lámina β antiparalela de 4 cadenas y 2 hélices α y una hélice 3_{10} respectivamente (ver Figura 2.3). Además hay 2 giros β y un giro cis-Pro. Entre las dos capas hay un corazón hidrofóbico con unas 20 cadenas laterales de residuos apolares que no dejan cavidades ni moléculas de H_2O internas. Estas características indican a priori que la estructura terciaria muestra una alta estabilidad de acuerdo con la resistencia a la proteólisis mostrada por la parte globular. La parte que conecta con la enzima (residuos 81-95) consiste en una corta hélice α de dos giros que muestra en su final un enlace Arg-Thr muy expuesto, precisamente el enlace que es escindido por la tripsina en el primer paso de la activación de la PCPB. Al comparar la estructura del DAB con el fragmento de activación de la PCPA porcina, ambos presentan un plegamiento equivalente, con ligeras diferencias sobre todo en

las dos hélices α que se superponen a la lámina β (Guasch et al., 1992).

* * *

Previamente a esta Memoria no se había realizado ningún estudio de la desnaturalización térmica de las especies que forman el sistema de la procarboxipeptidasa B, si bien hay un estudio reciente de la desnaturalización térmica del sistema formado por la PCPA y la CPA porcinas y su correspondiente fragmento de activación, realizado por nuestro Grupo mediante calorimetría diferencial de barrido de alta sensibilidad (DSC) (Sánchez-Ruiz, et al., 1988b). En este estudio se muestra que, bajo diversas condiciones de pH (7.5 y 9.0) y fuerza iónica, la desnaturalización térmica de CPA y PCPA es completamente irreversible y además está controlada cinéticamente, siguiendo el modelo irreversible de dos estados propuesto por Sánchez-Ruiz et al. (1988a) para el estudio por DSC de la desnaturalización térmica de proteínas. Por otra parte, el segmento de activación de la PCPA muestra una gran termoestabilidad ($T_m = 87-89^\circ\text{C}$) y un desplegamiento altamente reversible que sigue un modelo de equilibrio de dos estados. Un comportamiento similar sería de esperar para el sistema PCPB-CPB-DAB, estudiado en esta Memoria, dadas las grandes similitudes que tiene con el de la PCPA.

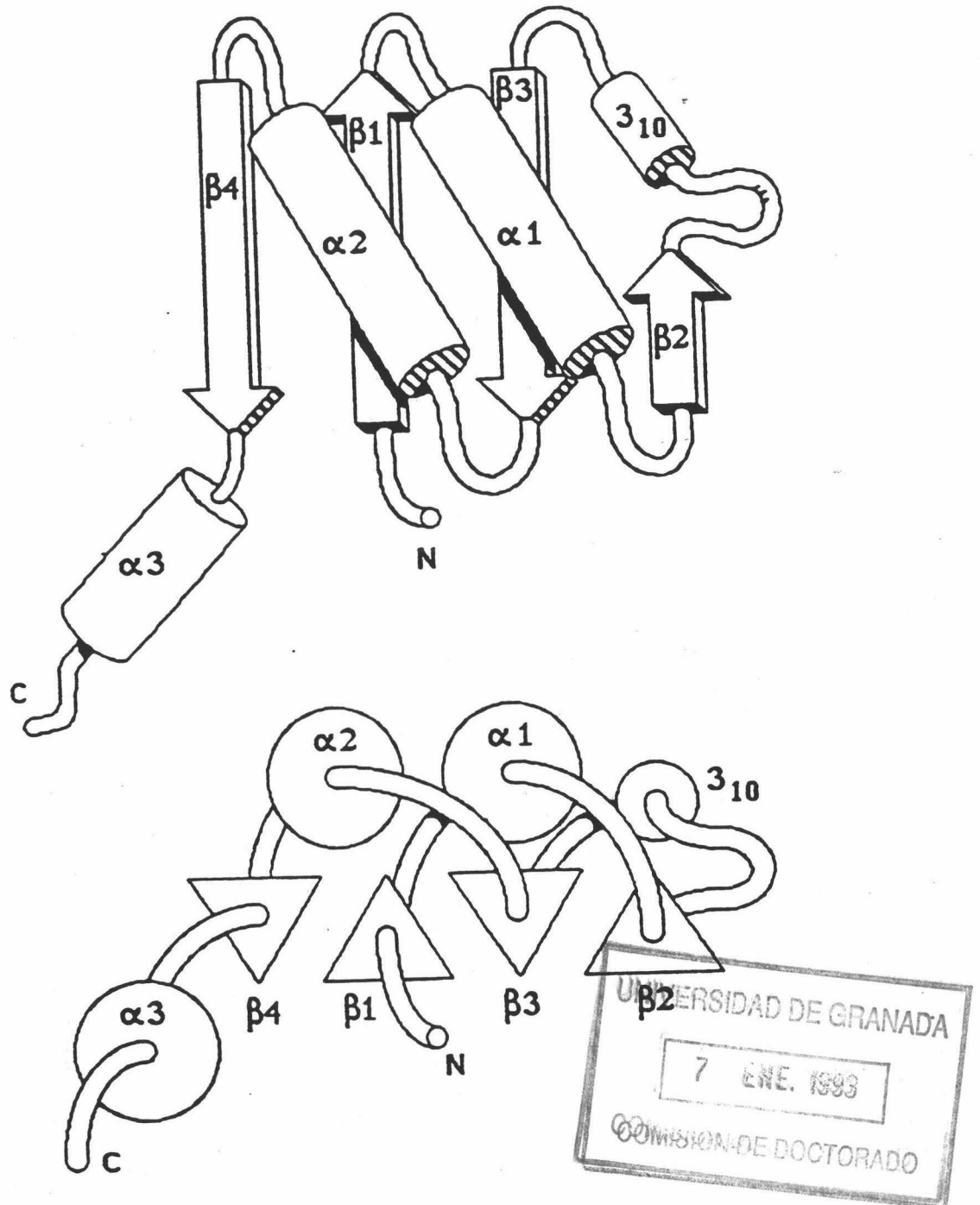


FIGURA 2.3: Esquema del esqueleto de la estructura tridimensional del fragmento de activación de la PCPB porcina correspondiente a los restos 1-94. Los cilindros representan hélices y las flechas representan cadenas que forman parte de la lámina β . El DAB está constituido por los restos 1-81 (excluida la hélice $\alpha 3$) (tomado de Coll et al., 1991).

2.2. Termolisina, fragmentos 205-316 y 255-316 y "Nicked" termolisina.

2.2.1 Termolisina (E.C. 3.4.24.4).

La termolisina (TLN) es una endopeptidasa de origen bacteriano, concretamente del *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, bacteria que forma parte del grupo de los microorganismos termofílicos. Su característica más llamativa es su elevada termoestabilidad que la ha hecho objeto de numerosos estudios estructurales y de su desnaturalización térmica. Es una metalopeptidasa específica de los enlaces peptídicos en los que Leu o Phe aportan el grupo amino (Feder y Schuck, 1970). Se conoce su secuencia de aminoácidos (Titani et al., 1972). Tiene un peso molecular de 34600 Dalton con una sola cadena polipeptídica y ningún puente disulfuro. Contiene, al igual que la CPB, un ion Zn^{2+} en el sitio activo, indispensable para su actividad proteolítica, siendo inhibida por agentes quelantes del Zn^{2+} que lo retiran reversiblemente del sitio activo (Latt et al., 1969). La adición de un exceso de Zn^{2+} produce asimismo una marcada inhibición. Modificaciones covalentes de la enzima, así como sustitución del ion Zn^{2+} por diferentes cationes divalentes como Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , pueden producir superactivación o inhibición de la TLN (Blumberg et al., 1973; Blumberg y Vallee, 1975; Blumberg, 1979; Holmquist y Vallee, 1974). Se conoce la estructura tridimensional de la TLN por difracción de rayos X a una resolución de 2.3 Å (ver Figura 2.4) (Colman et al., 1972; Matthews et al., 1974). La estructura presenta dos dominios o lóbulos claramente distinguibles con el sitio activo en la hendidura que queda entre ellos. Para una óptima estabilidad, la TLN necesita de la presencia de iones Ca^{2+} en el medio aunque no están implicados directamente en la actividad catalítica de la enzima. La TLN tiene 4 sitios de unión de iones Ca^{2+} (Feder et al. 1971). Los sitios de Ca(1) y Ca(2) están a sólo 3.8 Å formando un sitio doble que es completamente cooperativo y muestra una constante de unión de $2.8 \times 10^9 M^{-2}$. Este doble sitio está situado entre los dos dominios actuando a modo de enlace entre ellos. Los sitios de Ca(3) y Ca(4) están en cambio situados en giros de la superficie de la molécula. Parece ser que protegen esos giros de la autólisis (Matthews et al., 1974; Woordouw y Roche, 1975; Fassina et al., 1986; Fontana et al., 1986). Probablemente todos los sitios de unión de Ca^{2+} contribuyen a la alta estabilidad térmica de la enzima. Sin embargo, el ion Zn^{2+} del sitio activo no parece contribuir a dicha estabilidad de la enzima

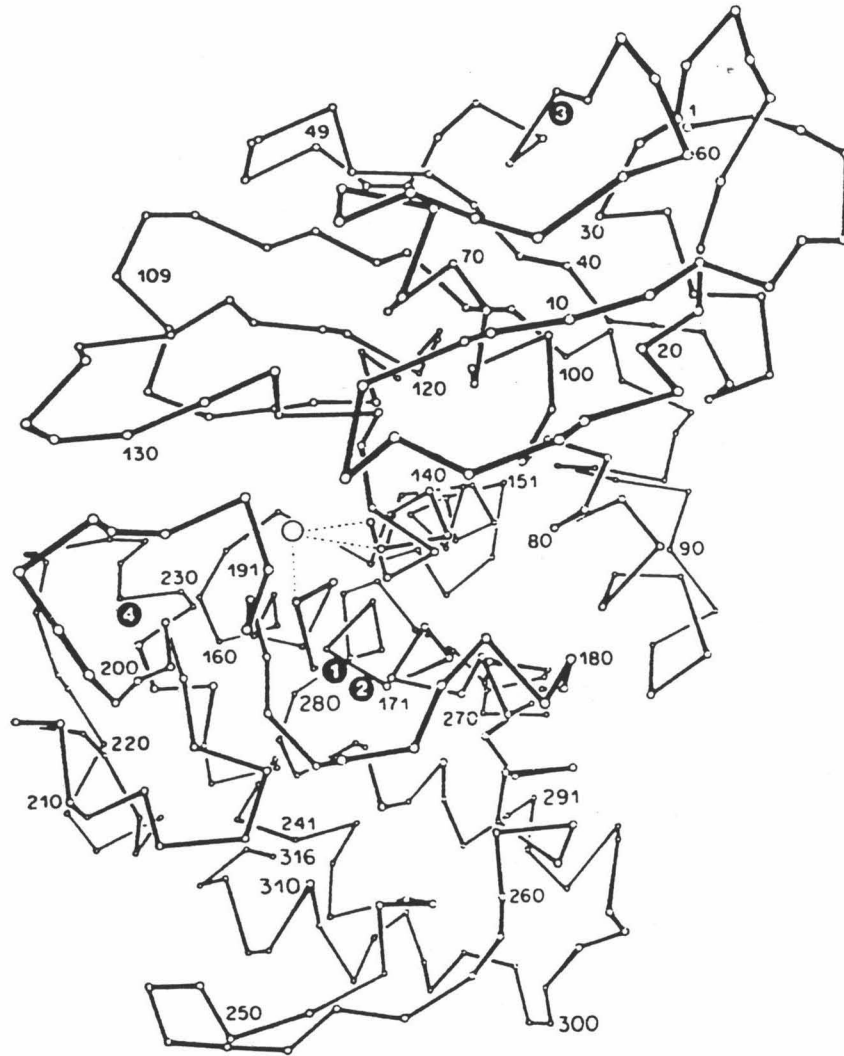


FIGURA 2.4: Modelo del esqueleto de la estructura cristalográfica de la TLN. El ion Zn^{2+} (○) y los cuatro iones Ca^{2+} (●) que se unen a la TLN están representados en la estructura. (tomado de Fontana, 1988).

frente a su desnaturalización térmica (Holmquist y Vallee, 1974).

Los estudios de desnaturalización térmica realizados hasta la fecha con TLN muestran una característica común: la irreversibilidad de la desnaturalización en todas las condiciones investigadas, tanto por métodos espectroscópicos (Voordouw et al., 1976; Khan et al., 1978; Fujita et al., 1979; Khan et al., 1980) como por DSC (Sánchez-Ruiz et al., 1988a). La causa de esta irreversibilidad parece ser la autólisis según los resultados de electroforesis en presencia de SDS de muestras calentadas (Sánchez-Ruiz et al., 1988a). La cinética de la desnaturalización de la TLN a alta temperatura es de primer orden. En el estudio de su desnaturalización térmica por DSC, realizado por miembros de este Departamento, se propuso un modelo cinético de dos estados para el análisis de las transiciones irreversibles obtenidas. Este modelo explica satisfactoriamente el comportamiento por DSC de la TLN, así como el de otras proteínas también estudiadas por este Grupo como se mencionó anteriormente para la PCPA y CPA (Sánchez-Ruiz et al., 1988b).

2.2.2 Fragmentos de termolisina TLN-205-316 y TLN-255-316.

Dado su elevado interés biotecnológico debido a su alta termoestabilidad, además de los estudios realizados con la proteína intacta se ha abordado extensamente en años recientes, por parte del Grupo del Dr. Angelo Fontana de la Universidad de Padua, la fragmentación de la TLN, tanto mediante proteólisis limitada o autólisis como por reacción con bromuro de cianógeno, con el fin de explorar la existencia de dominios de plegamiento (Vita et al., 1979; Vita y Fontana, 1982; Dalzoppo et al., 1985; Vita et al., 1985b; Vita et al., 1989). Estos dominios se han predicho mediante algoritmos de ordenador utilizando las coordenadas de la estructura tridimensional, obtenidas mediante cristalografía de rayos X (Rashin, 1981; Wodak y Janin, 1981; Rashin, 1984). Así, se han aislado una serie de fragmentos (casi todos del extremo C-terminal) que, de acuerdo con su análisis de estructura secundaria mediante dicroísmo circular (CD) de UV lejano y sus propiedades inmunoquímicas, mantienen una estructura similar a la que presentan en la proteína intacta así como una considerable termoestabilidad. Entre los fragmentos obtenidos mediante bromuro de cianógeno están el fragmento TLN-121-205 y el TLN-206-316 (Vita et al., 1979), siendo éste último el fragmento de TLN más estudiado. Otro fragmento globular, obtenido a partir del TLN-206-316 mediante corte con hidroxilamina en condiciones alcalinas, es el TLN-228-316 (Vita et

al., 1984). Mediante proteolisis limitada con varias proteasas del fragmento TLN-206-316 se han aislado otros fragmentos que también conservan estructura globular similar a la nativa entre los cuales se encuentra el TLN-255-316, identificado como el fragmento de TLN de menor tamaño capaz de plegarse en una estructura semejante a la nativa (Dalzoppo et al., 1985). Este fragmento se estudia en esta Memoria. Otro fragmento cuyo estudio de desplegamiento térmico se aborda en este trabajo es el TLN-205-316, con un aminoácido menos que el TLN-206-316, obtenido mediante autolisis de la TLN en presencia de EDTA (Fassina et al., 1986). El análisis de estructura secundaria mediante espectrometría de dicroísmo circular ha mostrado que, en los fragmentos del extremo C-terminal aislados, el contenido en α -hélice es muy similar al que poseen esas regiones de la cadena en la proteína intacta. Anticuerpos anti-TLN obtenidos de conejo reconocen todos estos fragmentos demostrando la presencia de determinantes específicos de TLN en la superficie de dichos fragmentos lo cual apoya la similitud de sus estructuras con la nativa. Por otra parte, estudios de desplegamiento, tanto mediante calor como por agentes desnaturizantes tales como urea o clorhidrato de guanidinio (GuHCl), muestran la presencia de transiciones reversibles características de pequeñas proteínas globulares. Esto contrasta abiertamente con lo mencionado arriba para la TLN intacta.

Particularizando en los fragmentos que son estudiados en esta Memoria, el TLN-205-316, de peso molecular 11978, sólo se diferencia en un aminoácido del TLN-206-316 por lo que sus propiedades deben ser prácticamente idénticas. Su estructura tridimensional se corresponde con un motivo estructural llamado "manejo de 4 α -hélices" (four α -helix bundle) (ver Figura 2.5), muy comúnmente encontrado en otras proteínas (Weber y Salemme, 1980) lo que hace de muy particular interés el estudio de las propiedades del plegamiento-desplegamiento de este fragmento aislado. Su desplegamiento térmico y en presencia de agentes desnaturizantes se ha estudiado por técnicas espectroscópicas (CD y espectrometría UV-visible) encontrándose que es reversible, con una temperatura de media de desplegamiento, T_m , de 66°C (Vita y Fontana, 1982). El análisis termodinámico de las transiciones se ha llevado a cabo asumiendo un proceso de equilibrio de dos estados, mostrando propiedades termodinámicas propias de una pequeña proteína globular. Análisis de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica muestra que, a pH neutro, el fragmento se comporta como una especie monómerica (Vita et al., 1989).

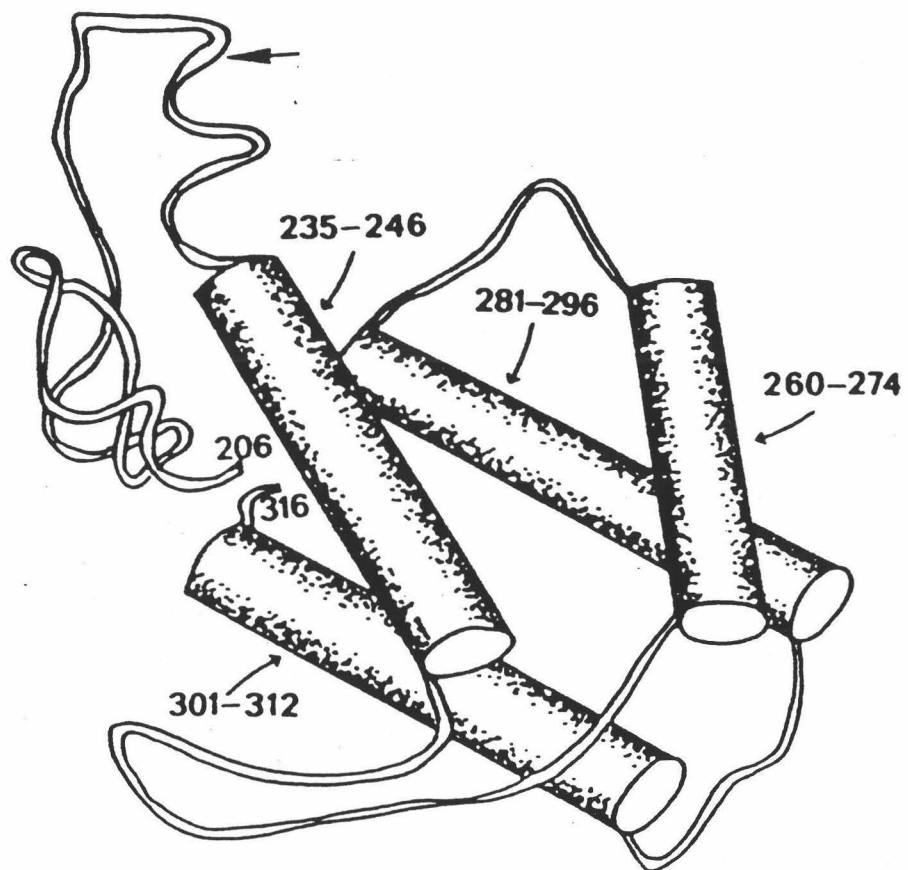


FIGURA 2.5: Modelo esquemático del esqueleto de la estructura terciaria que presenta el fragmento TLN-206-316 en TLN nativa. Los números indican los segmentos que forman las 4 hélices presentes, representadas por cilindros (tomado de Vita et al, 1974).

El fragmento TLN-255-316 se obtiene mediante proteólisis limitada con subtilisina del TLN-205-316, que pierde la primera α -hélice, quedando con un peso molecular de 6630 dalton. Este fragmento es bastante resistente a proteólisis posterior y muestra una significativa termoestabilidad a pH neutro ($T_m \approx 65^\circ\text{C}$), con transiciones cooperativas y reversibles producidas tanto por el calor como por agentes desnaturalizantes (Dalzoppo et al., 1985). Un análisis ulterior del desplegamiento térmico de este fragmento 255-316, seguido por CD, muestra una clara dependencia de la T_m de las transiciones con la concentración de muestra, por encima de 0.05 mg/ml, con un incremento de T_m de $\approx 6^\circ\text{C}$ entre 0.03 mg/ml y 1.0 mg/ml. Estudios de ultracentrifugación analítica a diferentes concentraciones de muestra han demostrado que, a esas concentraciones, el fragmento 255-316 se encuentra formando un dímero en disolución a pH neutro (Vita et al., 1989). Parece ser que en esa dimerización no están implicados cambios conformacionales significativos, a juzgar por las medidas de CD de UV lejano.

2.2.3 "Nicked" termolisina:

Por otra parte, ha sido descrito que, tras rotura de la cadena polipeptídica de la cadena de TLN mediante proteólisis limitada o autólisis, pueden aislarse especies con uno o más cortes, cuyos fragmentos no se han separado, conservando una estructura terciaria análoga a la de la TLN intacta. Estas especies denominadas "nicked" son: la termolisina S, obtenida por proteólisis controlada con subtilisina, formada por los fragmentos 5-224(225) y (225)226-316 (Vita et al., 1985a), y otra especie formada por los fragmentos 1-196, 197-204 y 205-316, obtenida en presencia de EDTA por autólisis de la TLN (Fassina et al., 1986). Ambas presentan un alto interés en cuanto al estudio de su estabilidad térmica en comparación con la TLN intacta.

En esta Memoria se aborda el estudio la especie de tres fragmentos. Los dos cortes se producen por la acción del EDTA al retirar Ca^{2+} unido al sitio Ca(4) de la TLN, dejando desprotegido y flexible el giro 190-205 frente a la autólisis. El fragmento 1-196 abarca el lóbulo N-terminal de la TLN y una pequeña parte del C-terminal, mientras que el fragmento 205-316 abarca prácticamente todo el lóbulo C-terminal. Esta "nicked" termolisina (N-TLN) no presenta ninguna actividad enzimática para el ensayo característico de TLN. Los datos de CD indican que sólo hay cambios marginales en la estructura secundaria respecto a la TLN

intacta, aunque sí hay una significativa perturbación de la estructura terciaria, con una mayor exposición de los residuos aromáticos Tyr y Trp al solvente. Además, estudios preliminares indican una fuerte pérdida de termoestabilidad ($T_m \approx 48^\circ\text{C}$).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales.

3.1.1 Reactivos.

Fosfato monosódico, pirofosfato sódico, glicina, acetato sódico, acetato cálcico, tetraborato sódico, cloruro sódico, cloruro cálcico, cloruro de zinc, hidróxido sódico, ácido clorhídrico y ácido acético, usados para preparar disoluciones tampón, fueron adquiridos a MERCK (para análisis). Tris, HEPES, EDTA disódico y cloruro de Guanidinio fueron de la casa SIGMA.

Phosphoramidon (N-(α -Rhamnopiranosiloxihidroxi-fosfinil)-L-leucil-L-triptófano), utilizado como inhibidor de termolisina se obtuvo de SIGMA y 1,10-fenantrolina, complejante del Zn^{2+} , se compró a MERCK. Hippuril-L-Arginina y FAGLA (3-(2-furilacriloil)glicil-L-leucinamida), empleados en las medidas de actividad enzimática, fueron comprados a SIGMA.

Sephadex G-25, utilizado en la preparación de muestras, y Sephadex G-50M y G-75SF y Sephacryl S-100HR, para los experimentos de Cromatografía de Exclusión Molecular, fueron adquiridos a Pharmacia/LKB. Las columnas de HPLC de fase reversa que se usaron en la purificación de los fragmentos de termolisina fueron de la marca Vydac. Acetonitrilo para HPLC se obtuvo de Scharlau. El ácido trifluoroacético fue de Fluka. La resina de afinidad Affi-prep 10, activada con grupos N-hidroxisuccinimida, fue adquirida a Biorad.

De SIGMA fueron la acrilamida, la bis-acrilamida y TEMED (N, N, N', N'-tetrametil-etiléndiamina), utilizados para preparar los geles de electroforesis en presencia de SDS. Este fue comprado a Fluka.

Se utilizaron membranas de diálisis de Medicell International Ltd. y de Spectrapore. El agua utilizada para la preparación de las disoluciones fue destilada y desionizada, y tras su disponibilidad se utilizó agua Milli-Q (Millipore). Todas las disoluciones se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 μ m. Otros reactivos utilizados en este trabajo, de los que no se haya mencionado su origen, fueron siempre de la máxima calidad disponible.

3.1.2 Material Biológico.

Las muestras de carboxipeptidasa B, procarboxipeptidasa B y dominio globular de activación han sido suministradas por el Grupo del Dr. F. X. Avilés, de la Universidad Autónoma de Barcelona, en el ámbito de la colaboración existente con nuestro laboratorio.

La termolisina (protease Type X) fue adquirida de SIGMA y posteriormente purificada como se describe en el Apartado de Métodos. Termolisina purificada fue usada para preparar la "nicked" termolisina (N-TLN). Los fragmentos de termolisina fueron purificados, a partir de termolisina de SIGMA, como se describe posteriormente, bien en el laboratorio del Dr. Angelo Fontana de la Universidad de Padua (Italia) con el cual se ha colaborado en este trabajo, bien en nuestro laboratorio, tras el correspondiente aprendizaje durante una breve estancia realizada en aquel laboratorio.

3.1.3 Instrumentación.

Las medidas de concentración de las muestras de proteínas investigadas se realizó indistintamente en un espectrofotómetro Cary 210 de la casa Variant o en un espectrofotómetro Beckman DU-70, obteniéndose los espectros de las mismas. En éste último, equipado con un baño termostático HETO, se realizaron las medidas de actividad enzimática de TLN y CPB.

Las cromatografías convencionales se monitorizaron a 280 nm mediante un detector de absorbancia ultravioleta de la casa Pharmacia/LKB, modelo UV-1. Se utilizaron bombas peristálticas LKB 2132. Los colectores de fracciones fueron el modelo Buchler Fractomat de Hucoa Erlöss o el RediFrac de Pharmacia/LKB, conectados a un registro gráfico de Lloyd Instruments. La termostatación de la columna de Sephadex G-75 utilizada en los experimentos de cromatografía de exclusión molecular se realizó mediante un baño termostático circulador LAUDA de Hucoa Erlöss.

La purificación de los fragmentos de termolisina se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la casa Pharmacia/LKB, biocompatible, equipado con dos bombas modelo 2248 con capacidad de flujo de hasta 10 ml/min, un mezclador de alta presión y un detector dual UV-visible de longitud de onda variable modelo VWM 2141. Todo el conjunto está controlado mediante software de la casa Pharmacia/LKB por un computador Tandon AT.

Para la obtención del agua ultrapura, tanto para HPLC como para la preparación de las disoluciones tampón empleadas, se utilizó un equipo de purificación Milli-Q Plus de Millipore, alimentado con agua destilada y desionizada mediante un desionizador SETA. Las medidas de pH se realizaron en pHmetros Crison con electrodos de vidrio combinados Ingold, proporcionando una sensibilidad de ± 0.01 unidades de pH. Estos pHmetros fueron calibrados con tampones estandar de pH 7.02 y 4.00 de la marca Crison. Para la centrifugación de muestras pequeñas se utilizó una centrífuga para tubos eppendorf Heareus Chryst. Para volúmenes mayores se empleó una Kokusan H-251.

El aparato de electroforesis utilizado fue el modelo Protean II de Biorad, alimentado con una fuente de tensión constante de la casa Arrosu Radio.

Para realizar los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se ha utilizado un microcalorímetro diferencial de barrido DASM-4 de fabricación soviética (Privalov, 1980; Privalov y Potheikin, 1986; Privalov y Plotnikov, 1989) cuyas características se describen más adelante en el Apartado 3.6.1.

La señal procedente del calorímetro se digitalizó mediante una tarjeta conversora analógico-digital de 8 bits DT2801 de Data Translation, instalada en un computador Inves tipo PC-XT que almacenó los datos en discos magnéticos. Los programas de adquisición y tratamiento de datos fueron implementados en este Departamento, utilizándose también programas cedidos por el Dr. E. Freire de la Universidad Johns Hopkins de Baltimore (USA). Se utilizaron computadores PC-XT y PC-AT en el tratamiento de los datos.

3.2 Purificación y preparación de muestras.

3.2.1 Procarboxipeptidasa B.

La PCPB se nos suministró purificada a homogeneidad, precipitada en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 43%, en una suspensión conservada a 4 °C. Para realizar los experimentos de DSC, sólo fue necesario centrifugar, durante unos 15 minutos a $\approx 10000\text{g}$, el volumen de suspensión necesario para tomar la cantidad de proteína deseada, resuspender en el volumen requerido de tampón de trabajo y dializar durante 24 horas frente a un gran volumen del mismo tampón, cambiando dos veces el baño de diálisis. A veces, en lugar de dializar las muestras, se pasaron a través de una columna de Sephadex G-25, previamente equilibrada en el tampón deseado, procedimiento que cambia exhaustivamente el tampón de la muestra y que es mucho más rápido, pero que diluye apreciablemente la proteína. Tras la diálisis, se midió la concentración de las muestras mediante la realización de un espectro de absorción en ultravioleta-visible entre 350 y 250 nm, y estimación de la absorbancia a 280 nm, utilizando un $\epsilon^{0.1\%} = 1.58$ (Burgos, 1989). En la Figura 3.1 se muestra un espectro típico de la PCPB.

3.2.2 Carboxipeptidasa B.

La CPB también se nos proporcionó purificada a homogeneidad. La forma de almacenamiento fue en disolución en Tris 40 mM, NaCl ≈ 0.1 M, pH 8.0, congelada a -20 °C. En estas condiciones la CPB es capaz de mantener la actividad próxima al 100% de la inicial durante períodos de tiempo cercanos a un año. Para la preparación de muestras para la realización de experimentos se dializaron las disoluciones frente al tampón deseado tal y como se describe más arriba para la PCPB. Luego se midió espectrofotométricamente la concentración de las muestras tomando un valor de $\epsilon^{0.1\%} = 2.00$ (Burgos, 1989). Un espectro típico de la CPB se muestra también en la Figura 3.1.

En las muestras de CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de 1,10-fenantrolina 5 mM, este compuesto absorbe fuertemente en la zona de UV en que absorben las proteínas, interfiriendo en la cuantificación espectrofotométrica de la concentración. Para preparar las muestras en este caso, se midió la concentración de la disolución de CPB

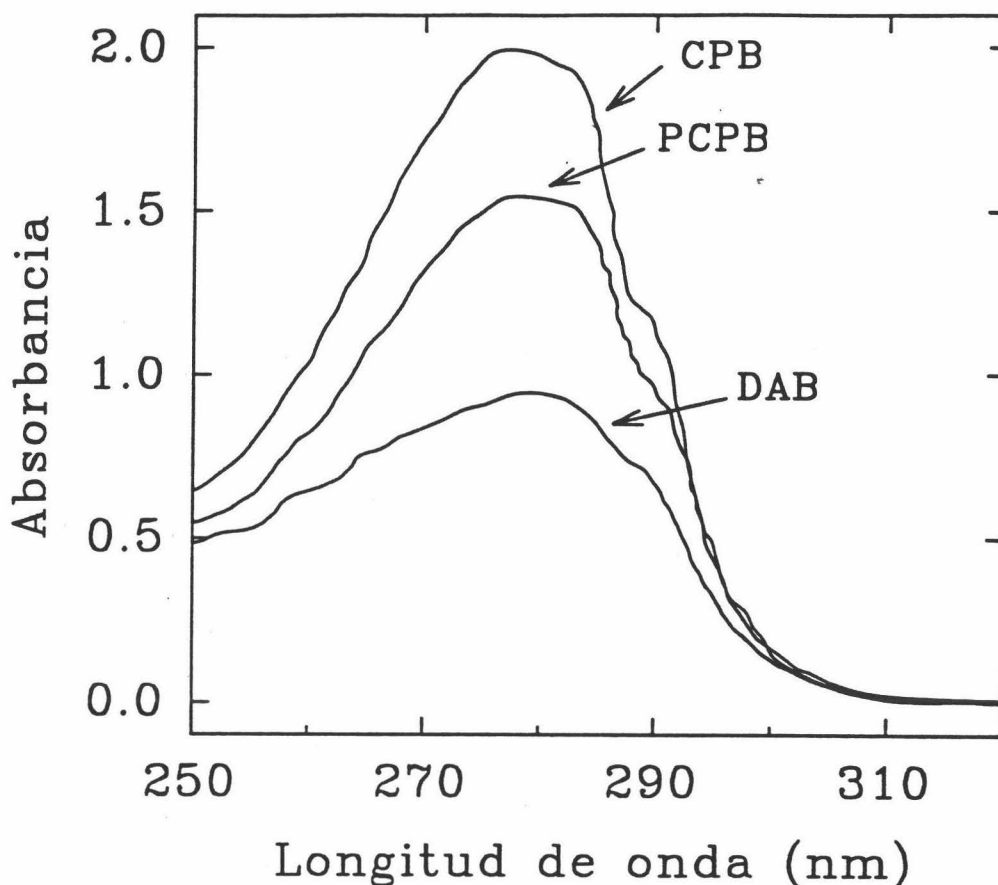


FIGURA 3.1: Espectros de absorción ultravioleta-visible de la PCPB, la CPB y el DAB, normalizados para una concentración de muestra de 1 mg/ml.

dializada frente al tampón sin 1,10-fenantrolina, añadiéndose luego el volumen adecuado de una disolución concentrada de 1,10-fenantrolina (50 mM) en el mismo tampón, a una alícuota de la muestra de CPB de volumen conocido. Se corrigió la concentración de la muestra para el nuevo volumen final. Se comprobó luego que el pH de la muestra no variaba con esta actuación.

El contenido de $ZnCl_2$ de la mayoría de los tampones utilizados se fijó a partir de una disolución madre de concentración conocida, determinada por espectrometría de absorción atómica.

3.2.3 Dominio globular de activación.

El DAB se nos suministró como un liofilizado libre de sales. Las muestras se

prepararon simplemente disolviéndolo en el tampón deseado y dializando frente al mismo, como se describe más arriba para CPB y PCPB. Para las medidas de concentración se utilizó un $\epsilon^{0.1\%} = 0.93$ (Burgos, 1989) (ver Figura 3.1).

3.2.4 Termolisina.

Purificación:

Como se menciona en el Apartado 3.1.2, la termolisina se adquirió a la casa SIGMA, catalogada como "Protease Type X". Esta termolisina se suministra como un liofilizado cristalino que contiene aproximadamente un 20% de acetato cálcico y acetato sódico. Además está contaminada con diversos productos de su degradación autolítica. Para purificar la termolisina intacta de estos fragmentos de degradación se han empleado dos métodos cromatográficos distintos: cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad.

Método 1º:

Esta purificación se planeó basándonos en la diferencia de tamaños moleculares entre la termolisina y los fragmentos de su degradación autolítica.

Se empaquetó una columna de 1.5 x 90 cm con Sephacryl S-100HR y se equilibró durante 36 horas a 12 ml/h con tampón HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, pH 7.5. Se disolvieron unos 20 mg de TLN de Sigma en el menor volumen posible del mismo tampón, que además contenía NaBr 5 M, y se dializó frente al tampón de elución durante toda la noche. Tras la diálisis se filtró la muestra, a través de un filtro Millex de Millipore de 0.45 μm , para eliminar cierto precipitado que apareció y se aplicó a la columna, recogiendo durante la elución fracciones de 3 ml. El perfil de la elución se siguió mediante un detector UV a 280 nm y se midió actividad de termolisina cada 2 fracciones. Además se hizo electroforesis en presencia de SDS de cada 6 fracciones. El resultado se muestra en la Figura 3.2. Es interesante que las impurezas correspondientes a los fragmentos de degradación salen en los primeros picos de la elución y que el pico que concentra toda la actividad de termolisina sale al final. Dado que los primeros picos deben corresponder a especies de mayor tamaño molecular (mayor radio de Stokes), estas especies deben estar formadas por agregados de los fragmentos o moléculas de TLN rotas. Como se puede ver en la electroforesis de la Figura 3.2, las fracciones del pico que tiene actividad enzimática corresponden a TLN prácticamente pura. Estas fracciones, de concentración entre 0.5 y 1.0

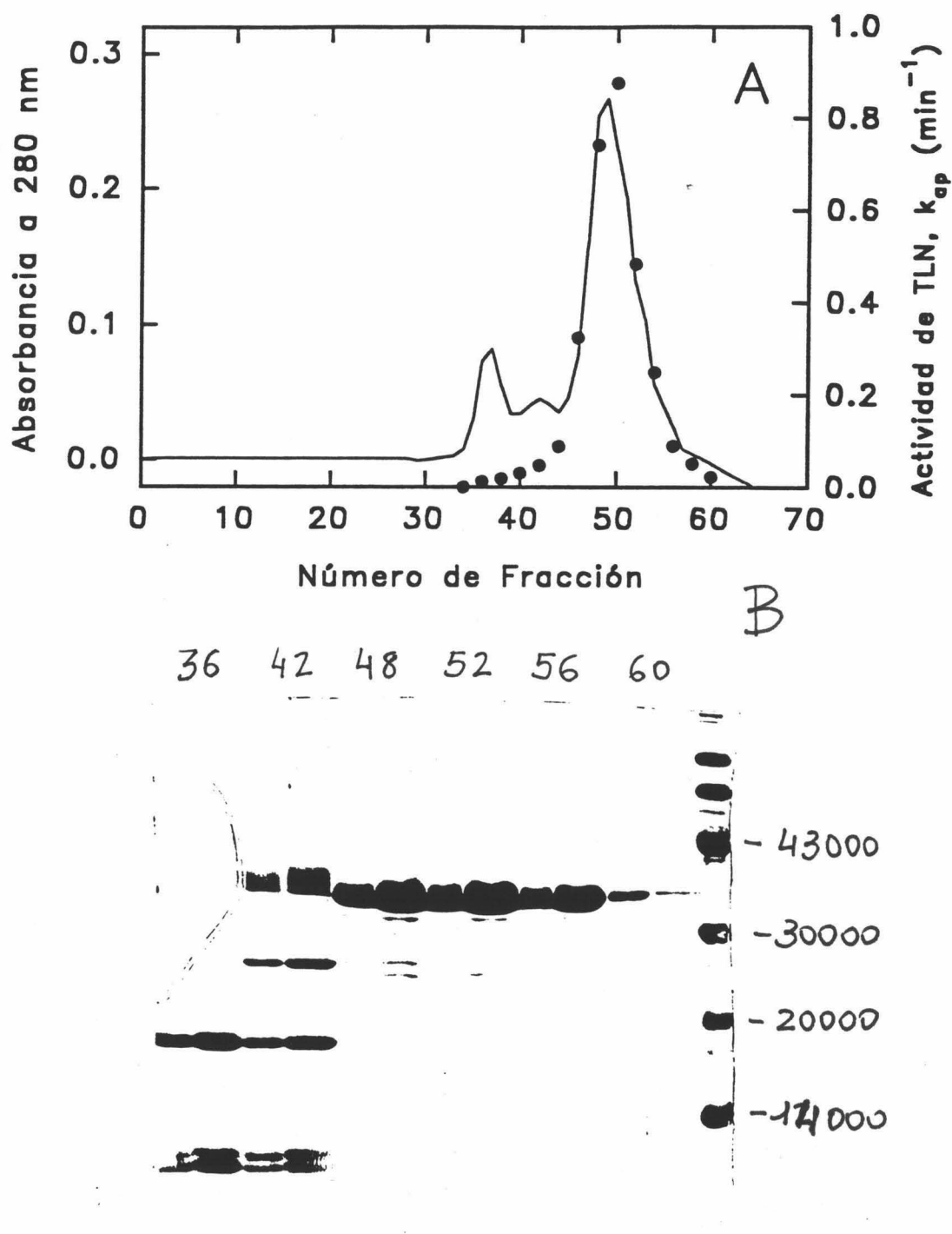


FIGURA 3.2: (A) Cromatografía de exclusión molecular de TLN de Sigma en una columna de Sephacryl S-100HR (ver condiciones de experimentación en el texto). La línea continua corresponde a absorbancia a 280 nm. Los puntos (●) representan actividad de TLN expresada como constante de velocidad aparente de primer orden de la hidrólisis de FAGLA, k_{ap} , en min^{-1} . (B) Electroforesis en presencia de SDS (SDS-PAGE) al 15% de acrilamida de las fracciones indicadas. La calle marcada con P corresponde a patrones de peso molecular.

mg/ml, fueron almacenadas congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el mismo tampón de la elución. Este método no es el más adecuado debido a la lentitud de la cromatografía y a la baja concentración de las fracciones que se recogen, siendo necesario la mayoría de las veces concentrar las muestras.

Método 2°:

Este método consiste en una cromatografía de afinidad utilizando Gly-D-Phe, covalentemente unida a una matriz polimérica (Walsh et al., 1974). Este dipéptido se une a la TLN sin ser hidrolizado, debido a la configuración D de la fenilalanina.

Preparación de la resina de afinidad: Se partió de una resina activada (Affi-Prep 10 de Biorad) que contiene un grupo ester de N-hidroxisuccinimida unido, a través de un espaciador de 10 átomos de carbono, a una matriz rígida polimérica. Este grupo reacciona fácilmente con grupos NH_2 libres, como se esquematiza en la Figura 3.3. La resina se proporciona en una suspensión en isopropanol.

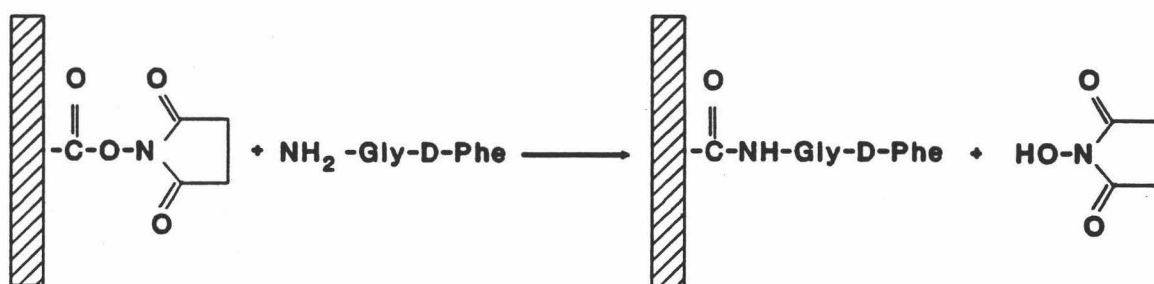


FIGURA 3.3: Esquema de la reacción de acoplamiento del ligando Gly-D-Phe a la resina activada Affi-Prep 10 de Biorad.

El procedimiento es el siguiente:

Se lavan 3 ml de resina depositada con 30 ml de dimetil-formamida anhidra (DMF) en un embudo de placa filtrante. Se disuelven 133 mg de Gly-D-Phe (de Sigma) en 2.1 ml de una mezcla DMF:H₂O:triethylamina en una proporción 15:5:1. Se añade el reactivo a la resina y se deja agitando por inversión 12 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para conseguir el acoplamiento del ligando a la resina. Se lava posteriormente con 30 ml de DMF.

Se añaden 2 ml de DMF y 100 μl de etanolamina y se deja agitando 3 horas. Con ello se consigue derivatizar los grupos reactivos no reaccionados. Se lava de nuevo con 30 ml de DMF.

Luego se lava la resina sucesivamente con:

1. NaCl 1.5 M.
2. NH_4HCO_3 0.1 M, pH 8.0.
3. Na_2HPO_4 0.1 M, pH 3.0.

Se repite de nuevo la operación y por último se equilibra en tampón $(\text{Ac})_2\text{Ca}$ 5 mM, pH 5.0 en la columna adecuada.

Obtención de la TLN: Se disuelven unos 20 mg de liofilizado de TLN de Sigma en ≈ 20 ml de tampón frío $(\text{Ac})_2\text{Ca}$ 5 mM, pH 5.0, dejando agitar a 4 °C durante 1 hora. Luego se centrifuga a 10000g y 4 °C durante 15 minutos para eliminar el resto insoluble y se filtra por un filtro Millipore de 0.45 μm . Todo el proceso debe hacerse en frío (4 °C). Se aplica todo el volumen a la columna equilibrada en el mismo tampón y se deja lavando la columna con 2 ó 3 volúmenes de tampón. Registrando absorbancia a 280 nm (ver Figura 3.4), se puede ver la salida de un primer pico de material no unido a la columna que corresponde a los productos de fragmentación de la TLN. Luego se eluye con tampón Tris/AcH 0.1 mM, NaCl 0.1 M, pH 9.0, despegándose la TLN de la columna que se recoge en fracciones. Se lava con este tampón hasta que no se detecte salida de material. Luego se equilibra de nuevo en el tampón $(\text{Ac})_2\text{Ca}$ 5 mM, pH 5.0. La TLN recogida se dializa rápidamente, ya que no es muy estable en el tampón de pH 9.0 por no contener CaCl_2 , frente a Tris 20 mM, NaCl 0.1 M, CaCl_2 10 mM, pH 7.2, en el que puede congelarse a -20 °C. Este segundo método es mucho más rápido, purificándose cantidades mucho mayores en menos tiempo y recogiendo a la salida de la columna fracciones más concentradas.

La TLN purificada por ambos métodos mostró una sola banda por SDS-PAGE y su actividad enzimática fue comparable o superior a la descrita en la bibliografía (Latt et al., 1969; Holmquist y Vallee, 1974; Khan y Darnall, 1978)

Preparación de muestras:

Una vez purificada la TLN, para su uso en los experimentos, se cambia el tampón en que está disuelta por el tampón de experimentación. En este caso la forma de hacerlo dependió bastante del tampón al que se quería cambiar. En general la muestra de TLN se dializó frente al tampón, pero en los casos en que se sospechó cierta inestabilidad de la TLN, se utilizó el método cromatográfico con una columna de Sephadex G-25. La concentración de la proteína se midió, siempre que se pudo, realizando un espectro UV-visible de la

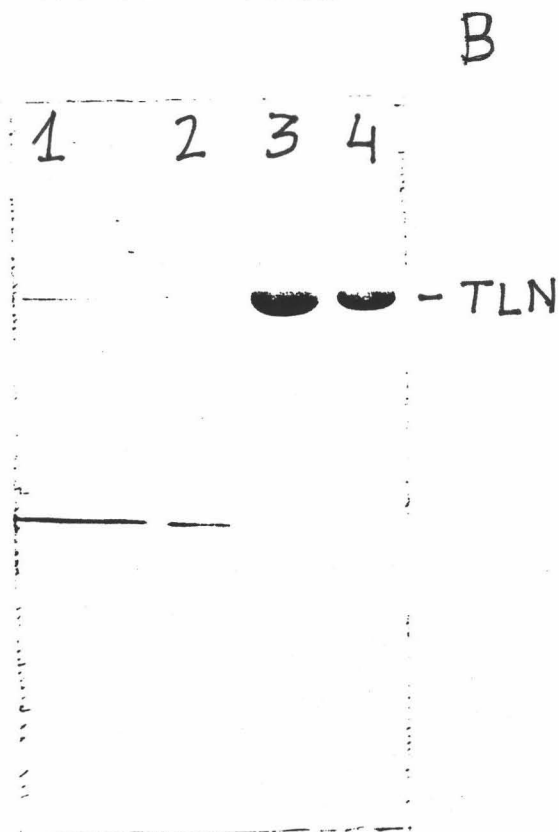
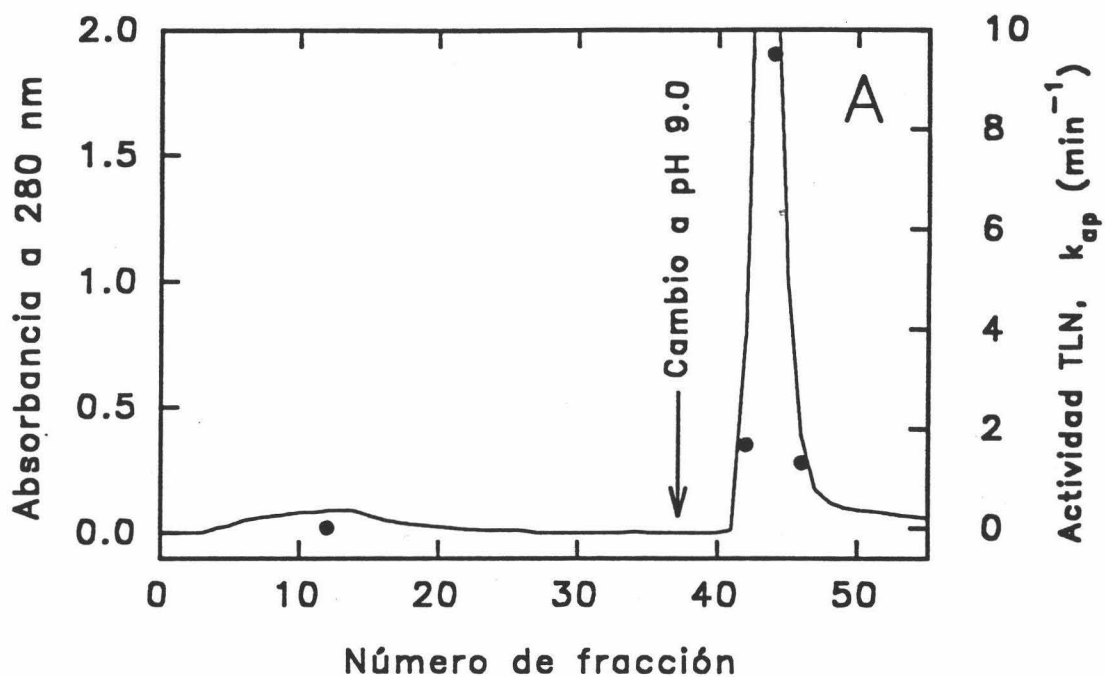


FIGURA 3.4: (A) Cromatografía de afinidad R-Gly-D-Phe de TLN procedente de la casa Sigma en las condiciones que se describen en el texto. La línea continua (—) representa la absorbancia a 280 nm. Los puntos (●) representan actividad de TLN expresada como la constante de velocidad aparente de primer orden de la hidrólisis de FAGLA, k_{ap} , en min^{-1} . (B) SDS-PAGE al 15% de acrilamida de muestras correspondientes a los dos picos de la cromatografía. Calles 1 y 2: 1^{er} pico; 3 y 4: 2^o pico.

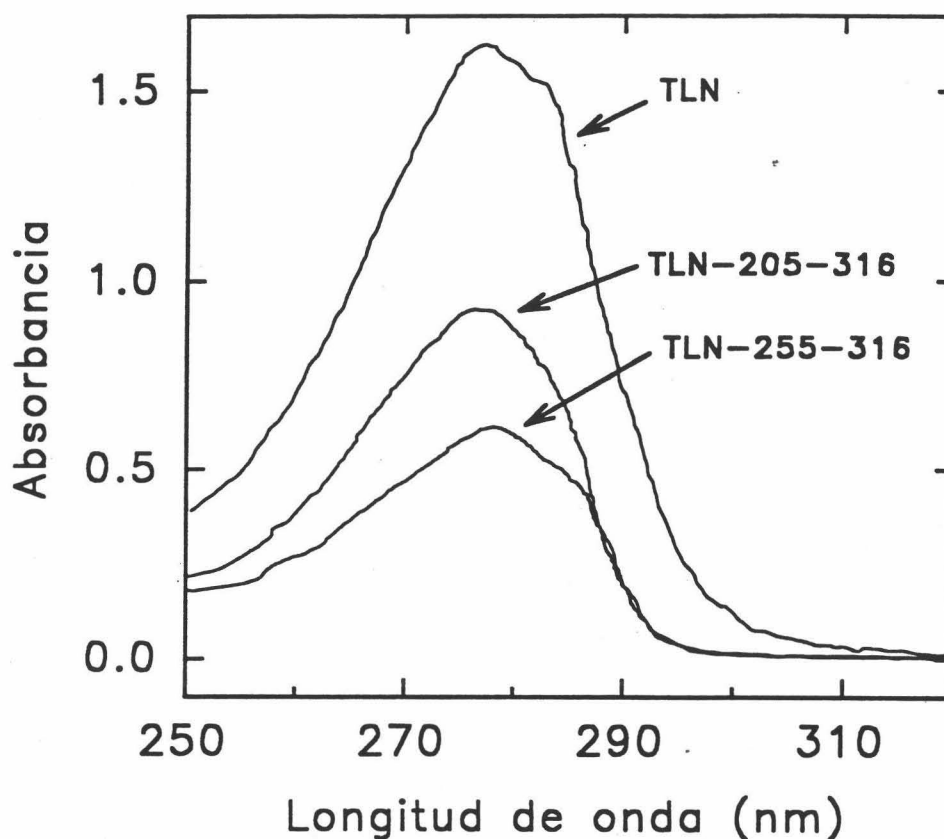


FIGURA 3.5: Espectros de absorción ultravioleta-visible de la TLN y los fragmentos TLN-205-316 y TLN-255-316, normalizados para una concentración de muestra de 1 mg/ml.

muestra (ver Figura 3.5), tomando $\epsilon^{0.1\%} = 1.52$ (Voordouw y Roche, 1974).

Para los experimentos con TLN en presencia de 1,10-fenantrolina 5 mM, en los que se dializó exhaustivamente la muestra para retirar completamente el Zn^{2+} de la TLN, se determinó la concentración de la muestra utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), ya que la 1,10-fenantrolina absorbe fuertemente en la misma zona del espectro UV que las proteínas. El procedimiento utilizado es el siguiente: Se utilizó como patrón una disolución de TLN sin 1,10-fenantrolina, de concentración conocida (determinada por absorbancia a 280 nm) similar a la de la muestra de concentración a determinar (0.5-1.5 mg/ml). Se preparan los siguientes tubos de ensayo:

Tubo	μl Patrón	μl Muestra	μl H ₂ O
blanco	-	-	40
1	10	-	30
2	20	-	20
3	30	-	10
4	40	-	-
5	-	15	25
6	-	30	10

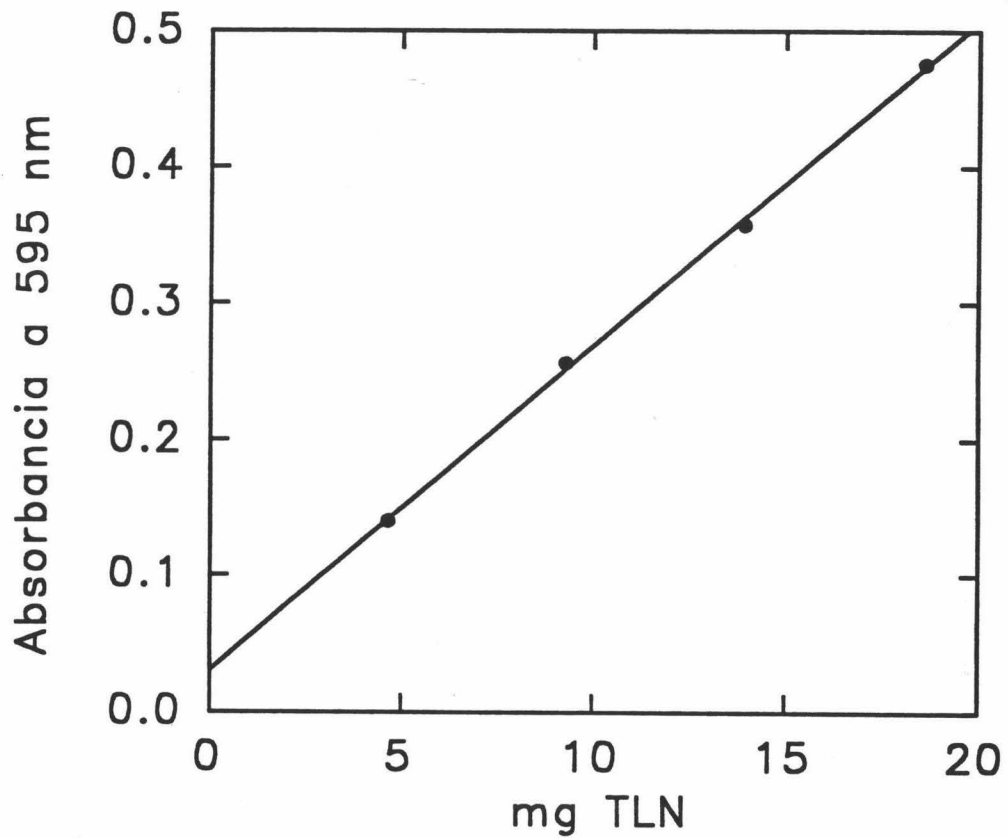


FIGURA 3.6: Recta patrón obtenida para la TLN correspondiente al método de Bradford de determinación de proteínas.

Luego se añaden, agitando, a cada tubo, 2 ml de reactivo Bradford (Biorad), previamente diluido con agua desionizada en una proporción 1:4. Se espera 5 minutos y se mide

absorbancia a 595 nm. Se construye la curva patrón representando los valores de absorbancia de los tubos 1-4 (restado el valor del blanco) frente a los μg de TLN de cada tubo (Figura 3.6). Con esta curva patrón se determinan los μg de TLN de los tubos problema y con ello la concentración de la muestra.

En los experimentos con TLN en presencia de phosphoramidon, dado que este compuesto es extremadamente caro, las muestras se prepararon de la siguiente forma: Se preparó por pesada una disolución concentrada de phosphoramidon en el mismo tampón del experimento. A una alícuota de volumen conocido de la disolución de TLN, dializada previamente en el mismo tampón, y a la que se había medido la concentración, se añadió la cantidad adecuada de la disolución concentrada de phosphoramidon para que resultara la concentración deseada de éste. La concentración de TLN fue corregida para el nuevo volumen alcanzado.

La concentración de ZnCl_2 de los tampones fue establecida, como para la CPB, a partir de una disolución madre de concentración conocida.

3.2.5 "Nicked" termolisina.

La N-TLN fue preparada a partir de TLN purificada como describen Fassina et al. (1986). Sin embargo, fue necesario optimizar el procedimiento debido a malos resultados iniciales. El procedimiento consiste en añadir con agitación, a una disolución de TLN de ≈ 1 mg/ml de concentración en Tris/HCl 0.1 M, CaCl_2 10 mM, pH 7.2, un volumen de EDTA 0.4 M en el mismo tampón, hasta alcanzar una concentración de EDTA de 10 mM. La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente durante unos 30 minutos, tomando alícuotas que se analizan mediante electroforesis en presencia de SDS (SDS-PAGE). Sin embargo, este procedimiento produjo un bajo rendimiento en la reacción de autólisis, originándose cortes indeseados, diferentes a los descritos.

Con el fin de buscar las condiciones óptimas de autólisis se realizaron los siguientes experimentos:

Está descrito que la autólisis es producida por la retirada por el EDTA del Ca^{2+} del 4º sitio de unión de la TLN. Este Ca^{2+} protege el giro 190-205 de la autólisis (Fassina et al., 1986). Por tanto, la concentración de EDTA que se ponga en el medio determinará el Ca^{2+} libre y con ello el grado de protección de la termolisina frente a la autólisis, modificando la

efectividad de la reacción así como su especificidad. Para optimizar la concentración de EDTA se prepararon 10 alícuotas de 250 μ l de disolución de TLN a 1 mg/ml de concentración, dializada frente a Tris 0.1 M, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, pH 7.2. A cada alícuota se añadió un volumen de EDTA 0.4 M, en el mismo tampón, de forma que se alcanzaran las siguientes concentraciones de EDTA en la mezcla de reacción: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mM, dejando la última sin añadir EDTA, como control. Se dejaron transcurrir \approx 30 minutos, agitando de vez en cuando, y se hizo SDS-PAGE al 15% de acrilamida de cada alícuota. El resultado se muestra en la Figura 3.7A, donde se puede apreciar que, por debajo de 20 mM de EDTA, la fragmentación es incorrecta y que a 10 mM de EDTA además queda gran parte de la TLN sin cortar. Por encima de 20 mM, la fragmentación es correcta y siempre la misma: Dos fragmentos visibles por SDS-PAGE (El 197-204 es demasiado pequeño y migra en los geles con el frente), uno de peso molecular \approx 21000 (el 1-196) y otro de \approx 12000 (el 205-316). Se utilizó 35 mM de EDTA para los experimentos subsiguientes.

Por otra parte, la autólisis es un proceso bimolecular lo que hace sospechar que su cinética puede depender fuertemente de la concentración. Para investigar esto, se prepararon 8 alícuotas de 250 μ l de disolución de TLN, en el mismo medio de más arriba, de concentraciones crecientes: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 mg/ml. A todas se les añadió EDTA 0.4 M hasta alcanzar una concentración final de EDTA de 35 mM. Además se preparó un control al que no se le añadió EDTA. Se dejaron reaccionar 30 minutos con agitación y se analizaron por SDS-PAGE al 15%. En la Figura 3.7B se muestra el resultado, apreciándose que la reacción de autólisis es tanto más efectiva cuanto mayor concentración de TLN hay, como por otra parte era de esperar.

Por tanto, se adoptó, como metodología más adecuada para la producción de N-TLN a partir de TLN purificada, la siguiente: Añadir EDTA 0.4 M, Tris 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 7.2, gota a gota y agitando, a una disolución de TLN, de concentración \geq 2 mg/ml, dializada frente a Tris 0.1 M, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, pH 7.2, hasta alcanzar una concentración de EDTA de 35 mM. Dejar a temperatura ambiente durante unos 30 min.

Mediante este método se obtiene una N-TLN prácticamente pura. Sin embargo, todavía contiene restos de TLN intacta, y por tanto, activa, con capacidad para seguir degradando la N-TLN. En el tampón en que ha sido obtenida y a 4 °C, la N-TLN es

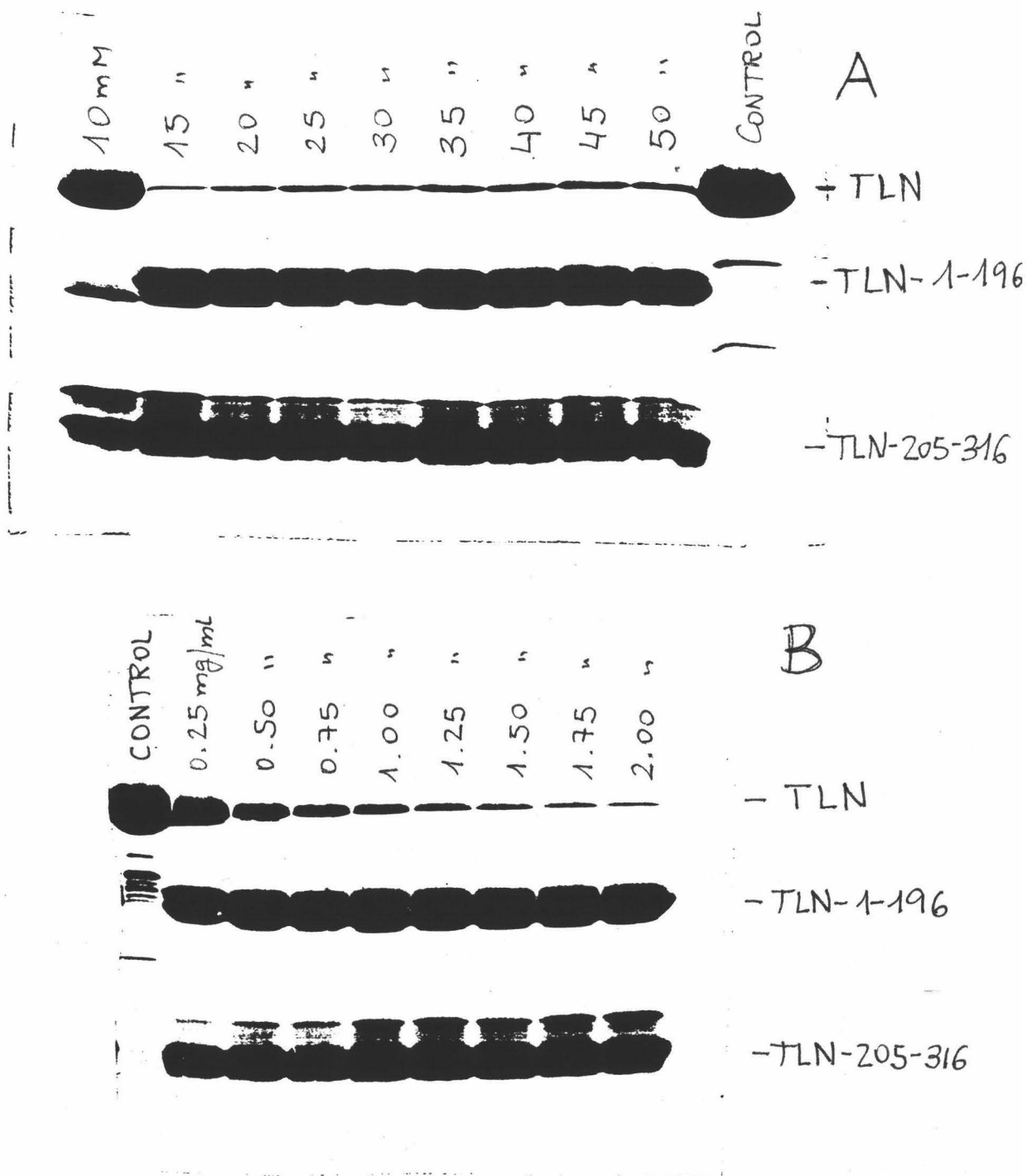


FIGURA 3.7: (A) SDS-PAGE al 15% de acrilamida de alícuotas de TLN incubadas durante 30 min. en presencia de diferentes concentraciones de EDTA (indicadas en cada calle). La concentración de TLN se mantuvo fija a 1 mg/ml. (B) SDS-PAGE al 15% de acrilamida de alícuotas de diferentes concentración de TLN (indicadas en cada calle) incubadas durante 30 min. en presencia de EDTA 35 mM.

relativamente estable y la TLN no sigue degradando de forma considerable. Sin embargo, la presencia de TLN activa podría afectar de forma considerable los resultados de los experimentos de DSC previstos con la N-TLN.

Se realizaron numerosos intentos para separar la TLN intacta de la N-TLN, utilizando la columna de afinidad Affi-Prep-Gly-D-Phe, descrita para la purificación de TLN, aprovechando que la N-TLN no se une a esta resina de afinidad (Fassina et al., 1986). Sin embargo, cuando se dializaba la N-TLN frente al medio de baja fuerza iónica utilizado en esta cromatografía ((Ac)₂Ca 5 mM, pH 5.0), la N-TLN sufría una posterior degradación de su fragmento mayor, no siendo estable en ese medio. Otros tampones utilizados no dieron buenos resultados.

Se pensó entonces en utilizar la N-TLN obtenida sin eliminar las trazas de TLN presentes pero poniendo en el medio inhibidores de la actividad de TLN, lo que evita la interferencia de la posible proteólisis que pueda producirse antes y durante los experimentos. Los inhibidores utilizados fueron phosphoramidon y 1,10-fenantrolina. El cambio de tampón para realizar los experimentos se hizo utilizando una columna de Sephadex G-25 equilibrada en el tampón deseado, con el fin de evitar el largo tiempo de diálisis.

La concentración de las muestras se midió utilizando los mismos métodos descritos para la TLN. Para medidas espectrofotométricas se utilizó el mismo valor para el coeficiente de extinción de la N-TLN que para la TLN.

3.2.6 Fragmento de TLN 205-316.

Purificación:

TLN-205-316 es uno de los tres péptidos constituyentes de la "nicked" TLN, por lo que se obtiene mediante la misma reacción de autólisis controlada y posterior separación de los fragmentos resultantes.

Sin embargo, para preparar grandes cantidades de TLN-205-316 no se purificó previamente la TLN, sino que se utilizó directamente la TLN tal como la suministra la casa Sigma para producir la autólisis.

El procedimiento seguido consistió en preparar 900 ml de tampón Tris 10 mM, NaCl 0.1 M, EDTA 30 mM, pH 7.2, que se pone a agitar a temperatura ambiente. Sobre esta disolución se añade, poco a poco, 1 g de TLN. Se deja agitando durante 1 hora. La mezcla

de reacción se analizó a varios tiempos mediante HPLC de fase reversa (RP-HPLC) analítica y SDS_PAGE, como se aprecia en las Figuras 3.8 y 3.9. Esto nos permitió identificar los fragmentos con vistas a una posterior separación preparativa. Se puede apreciar que la reacción de autólisis no es completa, dado que la concentración de TLN que se alcanza disolviéndola de esta forma no es mayor de 1 mg/ml.

Esta mezcla se congeló y se liofilizó para su posterior separación por RP-HPLC preparativa. Para ello se disolvió el liofilizado en porciones de unos 5 mg en 2 ml de H₂O con 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA) y se filtró mediante un microfiltro Millex de 0.22 μ m de Millipore.

Para la purificación por RP-HPLC se empleó una columna de fase reversa C₁₈ de la marca Vydac, con las siguientes características:

- Tamaño de la columna: 1 cm x 25 cm.
- Tamaño medio de grano: 10 μ m.
- Tamaño de poro: 300 Å.

Las condiciones empleadas para la fase móvil fueron:

- Flujo: 3 ml/min.
- Solvente A: H₂O + 0.05 % ácido trifluoroacético (TFA).
- Solvente B: Acetonitrilo (ACN) + 0.05 % TFA.
- Gradiente:

0 minutos --- 5% B.

10 minutos -- 5% B.

45 minutos -- 70% B.

Se utilizó un "loop" en el inyector de 2 ml, aplicándose una alícuota de 2 ml de muestra en cada elución. Se registró en cada cromatograma la absorbancia a 226 nm y a 280 nm, recogiendo manualmente TLN-205-316 purificado en el primer pico, TLN en el segundo y TLN-1-196 en el tercero (ver Figura 3.8). Estos se encuentran disueltos en una mezcla H₂O - ACN, con 0.05% de TFA. Estas disoluciones se congelaron, liofilizaron y almacenaron bajo desecación a -20 °C. En la Figura 3.9 se puede ver el análisis de las muestras purificadas por SDS-PAGE al 15%, observándose que sólo se obtiene completamente homogéneo el TLN-205-316, solapándose los picos de TLN y TLN-1-196.

Sin embargo, la recuperación de la TLN y TLN-1-196 durante la cromatografía de

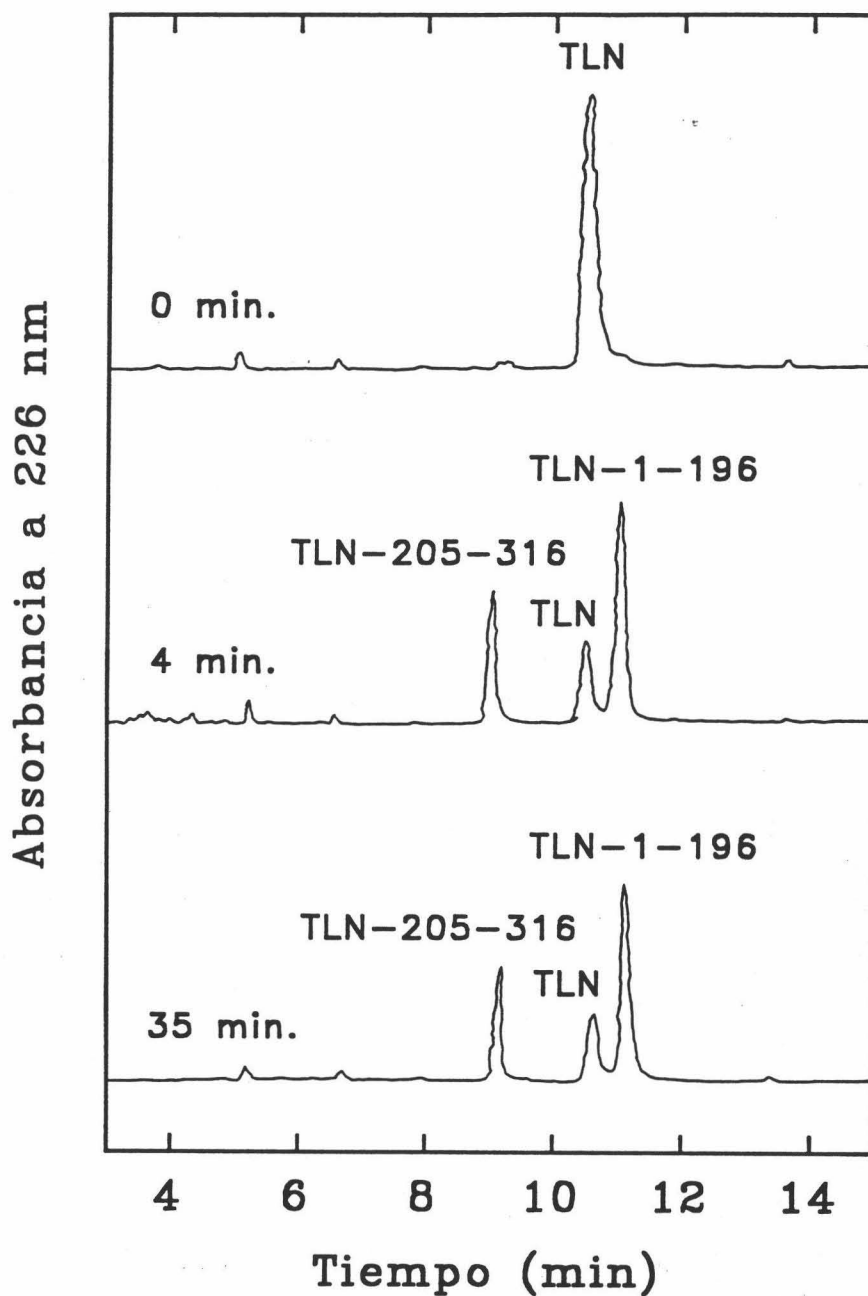


FIGURA 3.8: RP-HPLC analítica de alícuotas de la mezcla de reacción de autólisis de TLN en presencia de EDTA 30 mM, tomadas a los tiempos de reacción indicados en la figura. Para el análisis se siguió el procedimiento descrito en el Apartado 3.3.1.

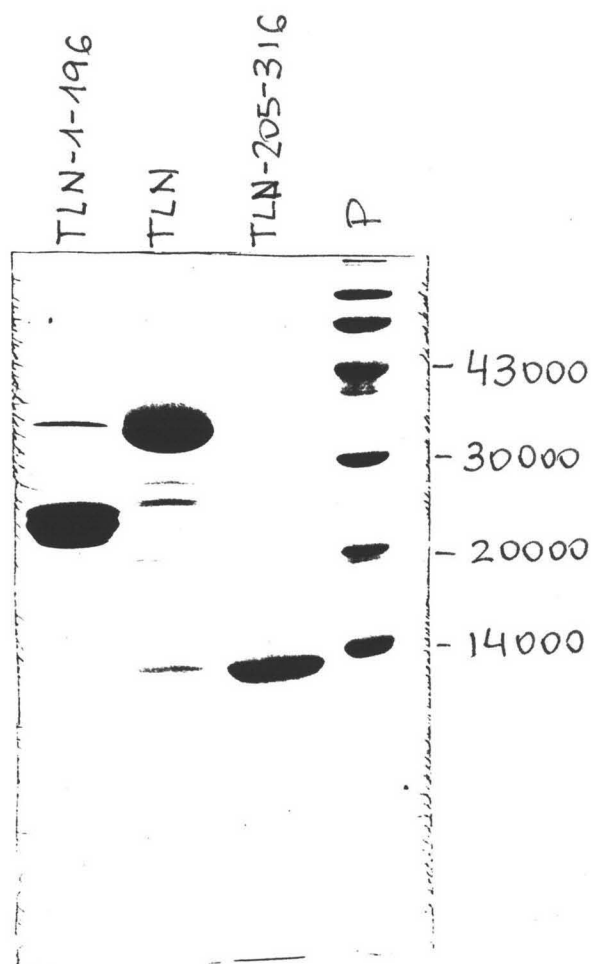


FIGURA 3.9: SDS-PAGE al 15% de acrilamida de las muestras correspondientes a los tres picos mayoritarios separados por RP-HPLC (ver Figura 3.8). La calle marcada con P corresponde a patrones de los pesos moleculares indicados.

RP-HPLC no es completa, quedándose algún material pegado a la columna. Para evitar esto se puede eliminar la mayoría de estas dos especies utilizando el siguiente procedimiento de precipitación selectiva:

Se ponen 225 ml de HCOOH al 50% en un baño de hielo agitando vigorosamente y, sobre ellos, se deja caer, gota a gota, la mezcla de reacción, alcanzándose una concentración de HCOOH del 10%. Este tratamiento desnaturaliza la "nicked" TLN producida, así como los restos de TLN sin reaccionar. La TLN y el fragmento insoluble 1-196 precipitan separándose del resto de los fragmentos que permanecen en disolución. Una vez añadida toda

la mezcla, se deja toda la noche a 4 °C para que la precipitación sea completa y se sedimente el precipitado. Al día siguiente se decanta el sobrenadante sobre un filtro Millipore de 0.45 μm . Se centrifuga el precipitado a 10000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se une al resto de la disolución. Esta contiene mayoritariamente TLN-205-316 unido a TLN-197-204 y otros fragmentos de TLN procedentes de cortes inespecíficos. La disolución se evapora en un rotavapor a 35 °C hasta alcanzar unos 150 ml. Luego se dializa durante 2 ó 3 días frente a H₂O desionizada para eliminar las sales y los péptidos pequeños. La última noche se añaden 10 ml de ácido acético para acidificar la disolución. Al final se liofiliza toda la disolución.

Este liofilizado contiene pequeñas impurezas de otros fragmentos, posiblemente de TLN-198-316 y otros productos de degradación. Estos pueden eliminarse mediante HPLC de fase reversa preparativo, como se ha descrito más arriba. En la Figura 3.10 se muestra el cromatograma correspondiente.

Preparación de muestras:

El liofilizado de TLN-205-316 no se disuelve bien directamente en los tampones que se han empleado en los experimentos posteriores. Por ello se disolvió previamente en H₂O y se dializó posteriormente frente al tampón deseado durante 24 horas. La medida de la concentración de muestra se realizó mediante la realización de un espectro UV-visible, midiéndose absorbancia a 280 nm. En la Figura 3.5 se muestra el espectro de TLN-205-316. Se utilizó un valor para $\epsilon^{0.1\%} = 0.86$ (Vita et al., 1979).

3.2.7 Fragmento de TLN 255-316.

Purificación:

TLN-255-316 se obtuvo a partir de TLN-205-316 en el estado de pureza intermedio, previo a RP-HPLC. El procedimiento es el siguiente:

Se disuelven 200 mg de TLN-205-316 en el mínimo volumen de tampón Tris 20 mM, NaCl 0.1 M, pH 9.0, añadiéndolo poco a poco al tampón y agitando durante media hora. Luego se filtra la disolución por un filtro Millipore de 0.45 μm . Se mide la concentración de TLN-205-316 y se añade 1:200 en peso de subtilisina Carlsberg (Sigma) disuelta en el mismo tampón. Se deja agitando (sin agitador magnético) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se analiza cada cierto tiempo por RP-HPLC controlándose la desaparición de TLN-205-316 y la aparición de TLN-255-316. La reacción se para cuando deja de aumentar

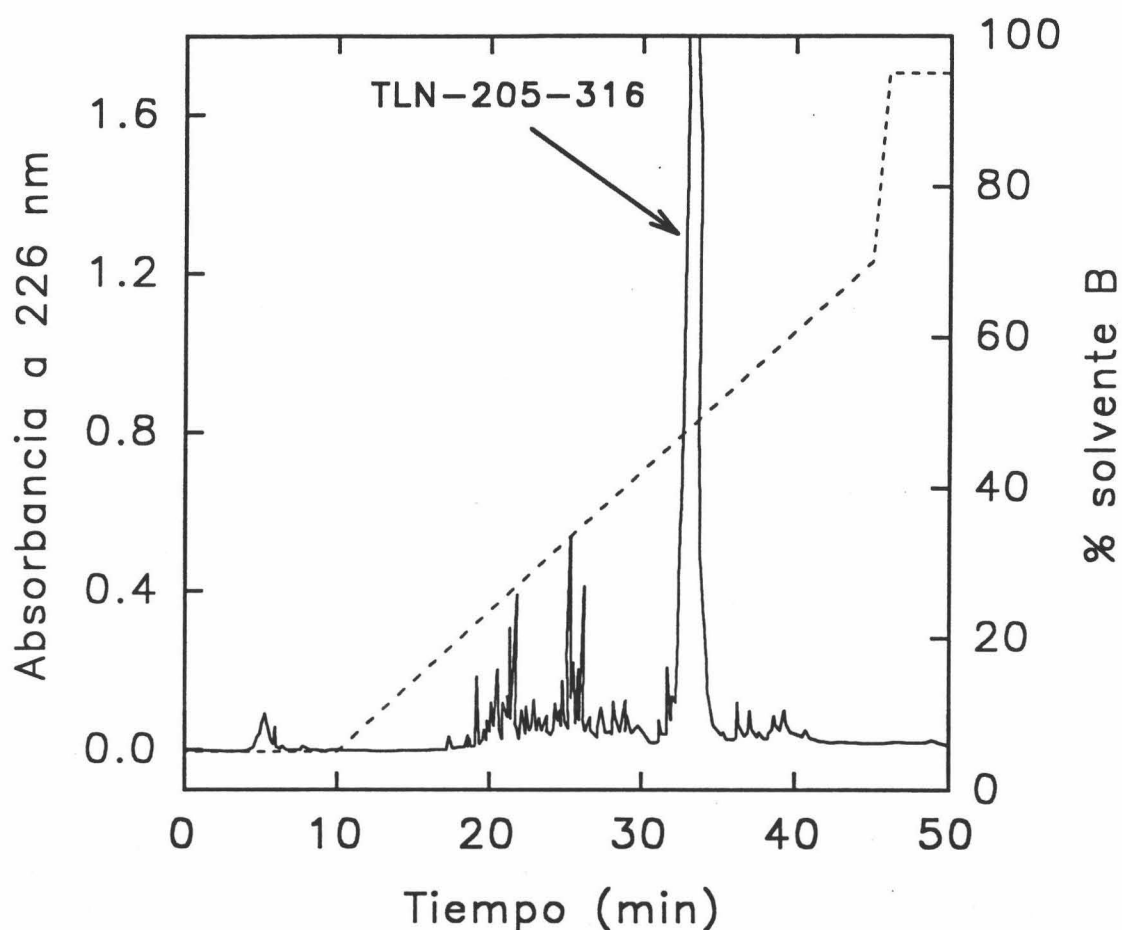


FIGURA 3.10: Cromatograma de RP-HPLC correspondiente a la purificación final del fragmento TLN-205-316 obtenido por precipitación selectiva, en una columna Vydac C₁₈ de 1 cm x 25 cm, en las condiciones que se describen en el texto. La línea discontinua (-----) representa el gradiente del solvente B (acetonitrilo + 0.05% TFA).

el tamaño del pico correspondiente a TLN-255-316. Para parar la reacción se añade fluoruro de p-metilfenil-sulfonilo (PMSF), disuelto en dimetil-formamida (DMF) (10 mg PMSF/1 ml DMF), en una proporción molar respecto a la subtilisina de 100:1. Además se añaden 3 ml de acético glacial para bajar el pH e inactivar mejor la subtilisina. Luego se divide la disolución en alícuotas de ≈ 10 ml, se congela y se liofiliza.

Cada fracción liofilizada se disolvió en ≈ 1 ml de cloruro de guanidinio (GuHCl) 7 M + 0.05 % TFA para su purificación por RP-HPLC preparativo. Para ello se empleó una

columna Vydac de las mismas características que la utilizada en la purificación del TLN-205-316, descrita más arriba, pero de 2.7 cm x 30 cm de tamaño. Las condiciones de fase móvil fueron:

- Flujo: 6 ml/min.
- Solvente A: H₂O + 0.05 % ácido trifluoroacético (TFA).
- Solvente B: Acetonitrilo (ACN) + 0.05 % TFA.
- Gradiente:
 - 0 minutos --- 35% B.
 - 5 minutos -- 35% B.
 - 25 minutos -- 45% B.

Se utilizó un "loop" en el inyector de 2 ml, inyectándose 1 ml de muestra en cada elución. Se registró en cada cromatograma la absorbancia a 226 nm. En la Figura 3.11 se muestra un cromatograma correspondiente a la separación. Los picos del cromatograma aparecen sólo parcialmente resueltos por lo que se recogió sólo parcialmente el primer pico, correspondiente a TLN-255-316, procurando no recoger contaminación del segundo pico (TLN-205-316 no cortado). Esto baja mucho el rendimiento obtenido. Las disoluciones recogidas se congelaron y liofilizaron, almacenándose a -20 °C.

Preparación de muestras:

Se disolvió el liofilizado en el tampón de experimento (se mostró bastante soluble) y se dializó posteriormente en membranas de diálisis con un tamaño de poro de 3.5 kDa, frente al mismo tampón durante 24 horas. La concentración se midió espectrofotométricamente utilizando un $\epsilon^{0.1\%} = 0.52$ (Vita et al., 1989). Un espectro de TLN-255-316 se muestra en la Figura 3.5.

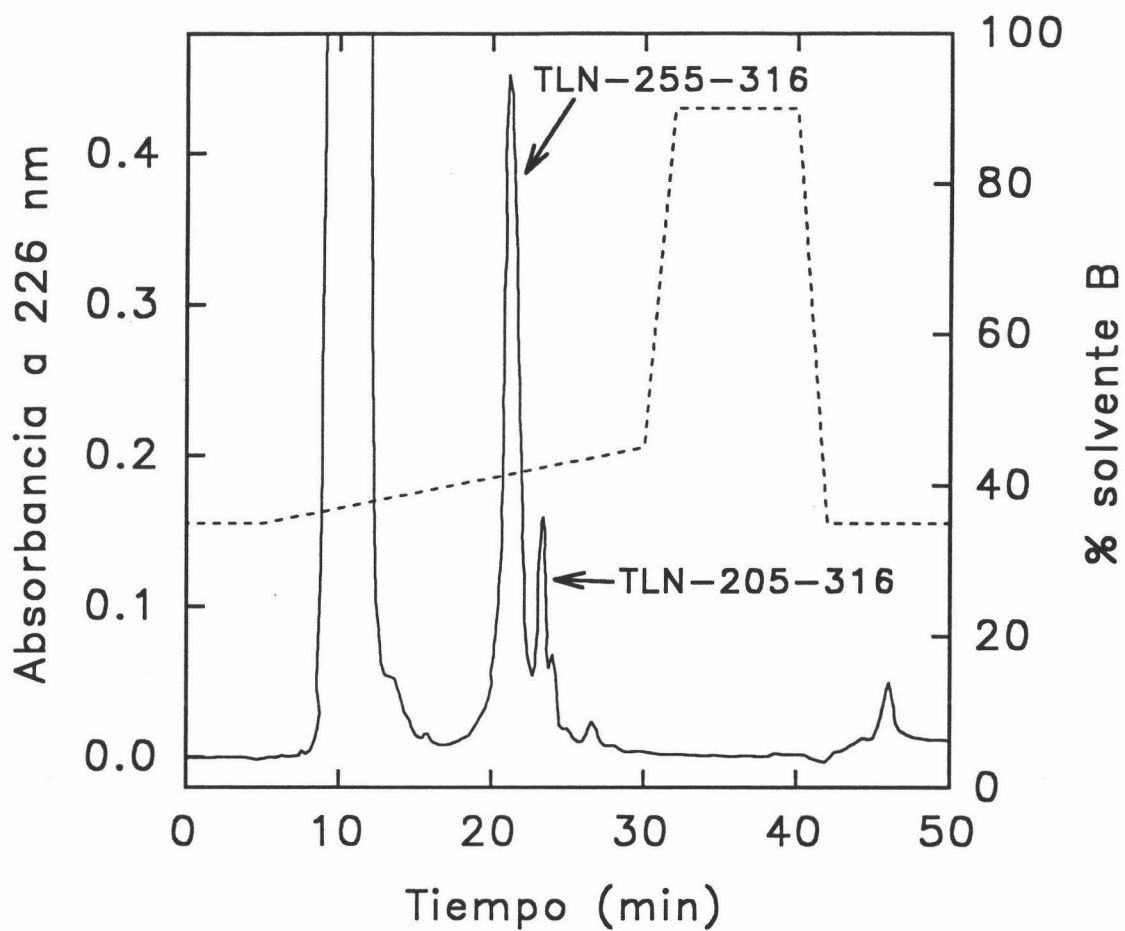


FIGURA 3.11: Cromatograma de RP-HPLC correspondiente a la purificación del fragmento TLN-255-316 tras la proteólisis controlada del fragmento TLN-205-316 con subtilisina. Se utilizó una columna Vydac C₁₈ de 1cm x 25 cm. Las condiciones se describen en el texto. La línea discontinua (-----) representa el gradiente utilizado del solvente B (acetonitrilo + 0.05% TFA).

3.3 Técnicas de análisis de muestras.

3.3.1 HPLC de fase reversa analítica.

La cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) se ha utilizado en esta Memoria para seguir las reacciones de fragmentación de la termolisina durante la preparación de los fragmentos TLN-205-316 y TLN-255-316. Para ello se ha utilizado una columna analítica de la marca Vydac, de 0.45 cm x 5 cm, rellena con un material de sílice derivatizada con cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos (C₁₈). Las características del relleno son: tamaño medio de grano: 10 μ m, tamaño medio de poro: 300 Å.

Las condiciones empleadas de la fase móvil fueron las siguientes:

-Flujo: 1.5 ml/min.

Solvente A: H₂O + TFA 0.05 %.

Solvente B: ACN + TFA 0.05 %.

Gradiente:

0 minutos: 5% B.

2 minutos: 5% B.

15 minutos: 75% B.

El volumen de muestra inyectado en cada elución fue de 50 μ l, utilizando un "loop" de 200 μ l. La detección a la salida de la columna fue mediante absorción a 280 nm o a 226 nm, dependiendo del fragmento analizado.

3.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

SDS-PAGE se realizó en una aparato vertical, de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, 1970). En todo momento se utilizó la técnica de electroforesis discontinua, que permite una mayor resolución en la separación de las bandas de proteínas (Ornstein, 1964). Consistió en utilizar un gel de 2 cm, de 4% de poliacrilamida y pH 6.8, llamado gel apilador, donde se aplican las muestras. La misión de este gel es que las proteínas pasen al gel separador dispuestas en finísimas bandas ordenadas una sobre otra según sus movilidades. A continuación va el gel separador, del 15% de poliacrilamida y pH 8.8, de unos 15 cm de longitud. Ambos geles contienen 0.1 % de SDS.

Las muestras de proteína se mezclan, a partes iguales, con el tampón de dilución de la muestra, de pH 6.8, que contiene un 4% de SDS, un 20% de glicerol y azul de bromofenol para ver la migración del frente durante la electroforesis. Se calienta esta mezcla a 100 °C durante unos 5 minutos para que el SDS despliegue las cadenas de las proteínas completamente. Se aplican entre 10 y 50 μg de proteína en cada calle del gel apilador.

Para el caso de la termolisina, si se opera de esta forma, no se obtiene ninguna banda debido a la autólisis, por efecto del SDS. Para evitar este problema se añadió a cada 50 μl de muestra de TLN a analizar, 5 μl de 1,10-fenantrolina 0.1 M, que inactiva la TLN, mezclándose luego con el tampón de dilución de muestra.

El tampón de desarrollo de la electroforesis se compone de Tris/Glicina, SDS al 0.5%, pH 8.3. Mientras la muestra atraviesa el gel apilador, se aplica una intensidad a la electroforesis de 16 mA por lámina. Luego, durante la separación se aplican 24 mA por lámina.

Una vez finalizada la electroforesis, se tiñen las láminas con Coomassie Brilliant Blue al 0.1% en una mezcla de metanol al 40%, ácido acético al 7% y agua. Se destiñen con la misma mezcla sin el colorante. Los geles se conservan secos, plastificados con papel de celofán.

3.3.3 Medidas de actividades enzimáticas.

Carboxipeptidasa B:

Se utilizó el método de Folk et al. (1960). En este método se mide espectrofotométricamente la variación de la absorción en el UV-visible que se produce en una disolución del substrato artificial hippuril-L-arginina (HLA), cuando se hidroliza por la CPB.

El procedimiento responde al siguiente esquema:

Concentración de substrato: 1 mM.

Tampón de la disolución del substrato: Tris/HCl 20 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.65.

Temperatura de ensayo: 25 °C.

Longitud de onda de medida: 254 nm.

Incremento de absorbancia para hidrólisis total del substrato: 0.36 unidades de absorbancia (U.A.), para 1 mM de concentración de HLA en cubeta de 1 cm de paso de luz (Folk y Schirmer, 1963). Este es un valor fundamental para el cálculo de los valores de

actividad.

Ensayo: Se añaden entre 10 y 20 μl de una disolución que contenga $\approx 1 \mu\text{g}$ de CPB a una cubeta con 2 ml de disolución de HLA, termostatzada a 25 °C. Se registra absorbancia en función del tiempo durante ≈ 5 minutos. Se obtendrá un incremento lineal de la absorbancia, dado que se mide a saturación de la enzima, es decir, a velocidad máxima de hidrólisis.

La actividad específica de la CPB, en este ensayo, se expresa como micromoles de sustrato hidrolizado en un minuto (Unidades de actividad enzimática, U), por un miligramo de enzima. Este valor se calcula según la siguiente fórmula:

$$A_e = \frac{\Delta Abs_{254}/\text{min} \cdot \text{ml}(\text{sustrato})}{\Delta Abs_{ht} \cdot \text{mg}(\text{CPB})}$$

donde ΔAbs_{254} se obtiene de la pendiente del registro de absorbancia. ΔAbs_{ht} es el incremento de absorbancia a hidrólisis total de sustrato ($=0.36$ U.A.). La actividad específica de la CPB descrita en la bibliografía es de 170 U/mg (Folk et al., 1960).

Termolisina:

Se siguió el método descrito por Khan y Darnall (1978). Se basa en el seguimiento de la hidrólisis del sustrato artificial FAGLA (3-(2-furilacrilol)glicil-L-leucinamida) monitorizando la disminución de absorbancia que se produce a 322 nm. Las condiciones del ensayo son las siguientes:

Concentración de FAGLA: 5×10^{-5} M.

Tampón de ensayo: HEPES 10 mM, NaCl 1 M, CaCl_2 10 mM, pH 7.5.

Temperatura del ensayo: 25 °C.

Longitud de onda de medida: 322 nm.

Ensayo: Se añaden 50 μl de una disolución de TLN de 0.5-1 mg/ml de concentración a una cubeta de 1 cm de paso de luz con 3 ml de disolución de FAGLA. Se registra absorbancia a 322 nm en función del tiempo. Dado que la concentración de FAGLA es mucho menor que la K_m de la interacción enzima-sustrato, la cinética de la hidrólisis es de pseudo-primer orden, con una constante de velocidad, k_{obs} , igual a $k_{\text{cat}}[E]/K_m$. Por lo tanto

se registran curvas de absorbancia en función del tiempo con forma de decrecimiento exponencial de primer orden.

A las curvas obtenidas se ajustó una ecuación exponencial de primer orden, mediante ajuste no lineal de mínimos cuadrados. De estos ajustes se obtiene k_{obs} . La actividad de termolisina se expresa como $k_{obs}/[E]$, en $M^{-1}min^{-1}$, con el fin de normalizarla a la concentración de la enzima. La actividad descrita para la TLN en la bibliografía es de $10^6 M^{-1}min^{-1}$.

3.4 Cinéticas de inactivación térmica de carboxipeptidasa B.

La desnaturalización térmica de una enzima puede estudiarse en función del tiempo, a una temperatura determinada y constante, midiendo actividad enzimática, que es un observable directamente proporcional a la cantidad de enzima en el estado nativo (en unas condiciones en que manifiesta dicha actividad).

Para el caso de la CPB se siguió el procedimiento descrito por Galisteo (1990), con ligeras modificaciones para adaptar el método a nuestro sistema. Consiste en introducir alícuotas de 20 μ l de disolución de CPB, de concentración conocida (en nuestro caso fue de 1.2 mg/ml y de 0.1 mg/ml) y debidamente dializada, en tubos capilares de \approx 1 mm de diámetro interno y unos 20 cm de longitud. Estos capilares se cierran al fuego, protegiendo la disolución de proteína del calor con un paño frío, y se conservan en baño de hielo hasta el experimento. Se introducen los capilares en un baño termostático a la temperatura a la que se desea seguir la cinética de desnaturalización. Se van extrayendo a intervalos de tiempo adecuados según la rapidez de la cinética, introduciéndolos inmediatamente en un baño de hielo para detener el proceso de desnaturalización. Se extrae la disolución del capilar y se mide la actividad enzimática de cada alícuota como se describe en el Apartado 3.3.3.

Hay que reseñar que la termostatación de los capilares en el baño a la temperatura del experimento y la parada de la reacción en baño de hielo son prácticamente inmediatas, como indica la ausencia de período de retraso en las cinéticas. Esto era de esperar dada la estrechez de los capilares y el pequeño tamaño de las alícuotas.

El conjunto de datos de actividad enzimática frente al tiempo se puede analizar de acuerdo con una ecuación cinética adecuada. En el caso de la CPB los datos experimentales siguieron una cinética de primer orden, como veremos más adelante en el Capítulo de Resultados. Por lo tanto, mediante el correspondiente ajuste no lineal de mínimos cuadrados de una ecuación exponencial decreciente de primer orden se puede obtener la constante de velocidad de desnaturalización de primer orden, a la temperatura del experimento de inactivación.

3.5 Cromatografía de exclusión molecular.

Para el estudio de los equilibrios de asociación de macromoléculas, en los que esté involucrado un cambio apreciable del tamaño molecular, se pueden utilizar técnicas que distingan entre las propiedades hidrodinámicas de las especies presentes en el equilibrio. Un equilibrio de este tipo podría ser el siguiente:



Una de estas técnicas es la cromatografía de exclusión molecular. Esta técnica se basa en la diferente velocidad de migración de las especies individuales, implicadas en el equilibrio de asociación, a través de una columna del medio cromatográfico. Una descripción intuitiva del fenómeno podría ser la siguiente: En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria está compuesta por pequeños gránulos porosos de material polimérico. La fase móvil está formada por una disolución en la que se encuentran las especies de diferente tamaño molecular (más correctamente, diferente radio de Stokes). En los poros de la fase estacionaria, de tamaño comparable a las macromoléculas presentes, penetran más fácilmente, o incluso únicamente, las moléculas de menor tamaño respecto de las moléculas mayores. A lo largo de una columna del material cromatográfico, el "camino" del que disponen para recorrer las moléculas pequeñas es mucho mayor que el de las grandes, retardándose aquéllas durante la cromatografía. Cuando el sistema está compuesto por especies no interaccionantes, de diferente tamaño, las moléculas migrarán a lo largo de la columna cromatográfica en diferentes tiempos. Este tipo de cromatografía puede utilizarse como técnica separativa. Lo mismo ocurre cuando la especies presentes están en equilibrio, siempre que este equilibrio sea suficientemente lento en comparación con el tiempo de la separación cromatográfica. En ambos casos se obtienen perfiles cromatográficos con picos separados. Cada pico corresponde en principio a un tamaño molecular diferente.

Sin embargo, cuando las especies presentes se encuentran en equilibrio rápido, hay una interconversión rápida entre ellas. Supongamos el equilibrio (1). A medida que el sistema migra a lo largo de la columna, las especies A y A_n tienden a separarse, pero esta separación enriquecería la zona anterior de la banda cromatográfica con A_n , que migra más rápidamente,

y la zona posterior con la especie A, que migra más lentamente. Dado que en todo momento debe estar establecido el equilibrio, en la parte inicial del perfil cromatográfico, A_n se transformará para alcanzar de nuevo el equilibrio, generando nA , que ralentiza su velocidad de migración retrasándose en la columna. En la parte posterior del perfil cromatográfico, A tenderá a generar A_n , acelerando su velocidad de migración. De esta forma no se obtienen picos separados en el perfil cromatográfico sino un sólo pico ancho en una posición intermedia. Por otra parte, el ensanchamiento de las bandas cromatográficas, aumentado por efectos de difusión y otros factores complicantes, disminuye la concentración total en la banda de migración y modifica continuamente, por tanto, la posición del equilibrio, enriqueciéndolo en la especie A, y con ello disminuyendo la velocidad de migración global de la banda cromatográfica. Todos estos factores hacen que la descripción matemática del comportamiento de sistemas de macromoléculas interaccionantes en cromatografía de exclusión molecular (y en otras técnicas de migración molecular) sea extremadamente compleja (para una revisión sobre el tema: Nichol y Winzor, 1972). El estudio de sistemas interaccionantes mediante métodos cromatográficos se facilita extremadamente realizando experimentos en los que se mantenga, a lo largo de toda la cromatografía y a la salida de la columna, un perfil con una región "plató" de composición igual a la del inicio de la cromatografía. En estos experimentos se analizan las regiones "frontera" de estos perfiles "plató" para obtener la información sobre la migración del sistema interaccionante. La desventaja es que deben emplearse volúmenes de disolución de muestra muy grandes, del orden la mitad del volumen total de la columna.

Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular han sido realizados en esta Memoria para caracterizar el estado de asociación del fragmento TLN-205-316 en disolución a pH 7.5, tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.1 M. Como se describe posteriormente en el Capítulo de Resultados, se ha encontrado que existe un equilibrio dímero-monómero que es rápido a temperaturas de ≈ 50 °C y superiores, pero que es muy lento por debajo de 30 °C, pudiéndose separar las poblaciones de cada especie en un experimento cromatográfico. Por esta razón los experimentos se realizaron a 20 °C, utilizando volúmenes de muestra pequeños (300-400 μ l).

El procedimiento seguido es el siguiente: Se empaquetó una columna de la casa Pharmacia, de 1 cm x 40 cm, equipada con una camisa de termostatación, con Sephadex

G-75SF, de acuerdo con el método recomendado por la casa Pharmacia/LKB. Se termostató la columna a 20 °C con un baño termostático circulador y se equilibró para su calibración con tampón Tris 50 mM, KCl 0.1 M, pH 7.5, durante 24 horas, a una velocidad de flujo de 8 ml/hora. A la salida de la columna se instaló un detector de absorbancia a 280 nm, conectado a un registro gráfico, para monitorizar el perfil cromatográfico. Una vez empaquetada y equilibrada la columna se calibró con muestras de 400 μ l de disoluciones de varias proteínas patrones (de Sigma), de peso molecular conocido. Los patrones utilizados se muestran en la Tabla 3.II, junto con los resultados obtenidos en el calibrado, donde se exponen los pesos moleculares, P.M., y volúmenes de retención, V_R , obtenidos. V_0 es el volumen de exclusión total, correspondiente al volumen de retención del azul dextrano. Los cromatogramas del calibrado se muestran en la Figura 3.12A.

Tabla 3.II

Patrón	P. M.	V_R (ml)	V_R/V_0	$\ln(P.M.)$
Azul dextrano	2×10^6	7.60	-	-
Albumina	66000	8.73	1.15	11.10
Anhidrasa C.	29000	11.73	1.54	10.28
Citocromo C	12400	14.27	1.88	9.43
Apronitina	6500	16.80	2.21	8.78

Para obtener la recta de calibrado se representó $\ln(P.M.)$ frente a V_R/V_0 . La recta obtenida, que se representa en la Figura 3.12B, se utilizó para determinar el peso molecular aproximado de las especies presentes en el equilibrio de asociación de TLN-205-316.

Una vez calibrada la columna, se equilibró en tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.5, a la misma velocidad de flujo y siempre a 20 °C, durante 48 horas. Muestras de TLN-205-316 de 300 μ l, de diferentes concentraciones, dializadas frente al mismo tampón, se calentaron a 50 °C durante 10 minutos, para que se alcanzara el equilibrio de asociación a esa temperatura, y se enfriaron posteriormente en un baño de hielo para congelar dicho

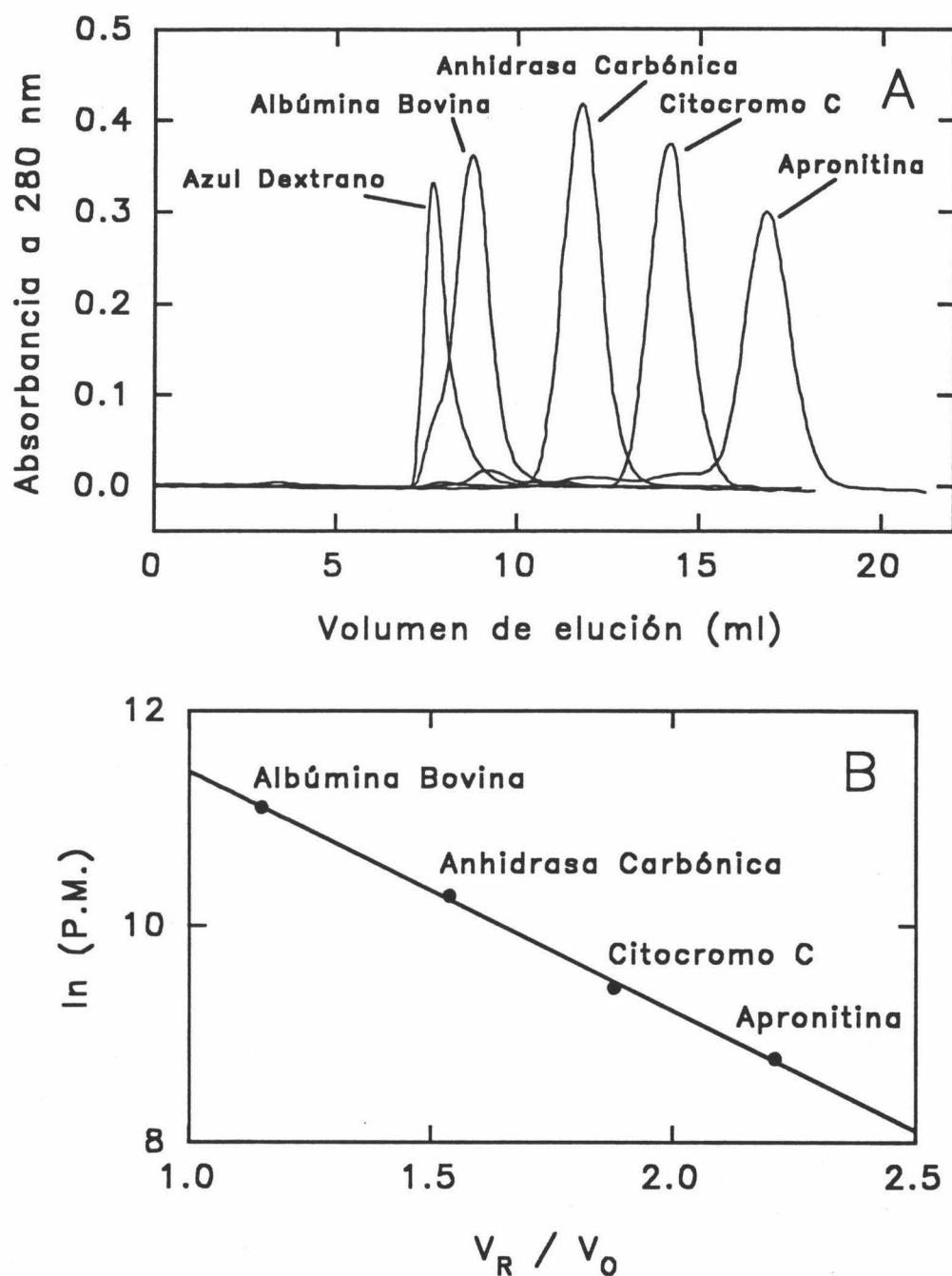


FIGURA 3.12: (A) Perfiles cromatográficos obtenidos en el calibrado de una columna de 1 cm x 40 cm de Sephadex G-75SF con los patrones de peso molecular que se indican. Las condiciones utilizadas se describen en el texto. (B) Recta de calibrado de pesos moleculares resultante de los cromatogramas de (A) obtenida representando $\ln(\text{P.M.})$ frente a V_R/V_0 , donde V_R es el volumen de retención de cada patrón y V_0 es el volumen de exclusión total de la columna (obtenido con azul dextrano).

equilibrio. Se aplicaron a la columna obteniéndose los perfiles de elución en un registro gráfico. Estos perfiles se digitalizaron con una tableta digitalizadora y se analizaron mediante un computador, como se describirá posteriormente en el Capítulo de Resultados.

3.6 Calorimetría diferencial de barrido.

3.6.1 El instrumento.

Un calorímetro diferencial de barrido proporciona una medida de la capacidad calorífica de una disolución de una macromolécula biológica, o cualquier otro sistema que se estudie, como una función de la temperatura.

Como se menciona en el Apartado de Instrumentación, para los experimentos de calorimetría diferencial de barrido, se ha utilizado un microcalorímetro DASM-4 (Privalov, 1980). Sus características son las siguientes:

Volumen de las células:	0.48 ml
Intervalo de temperatura de operación:	250-400 K
Velocidades de barrido:	0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 K/min
Nivel de ruido:	$\pm 0.2 \mu\text{W}$
Error relativo en la capacidad calorífica:	0.005 %

Este calorímetro consta de dos células, una para la muestra y otra de referencia, que son dos capilares de platino de 1 mm de diámetro interno que se encuentran formando una hélice compacta. Están situadas dentro de un bloque adiabático, formado por corazas concéntricas con forma de sombrero, como se muestra en la Figura 3.13. Entre las dos células se encuentra una termopila de 200 uniones bimetálicas, que actúa como termosensor.

Al comenzar un barrido se suministra a las resistencias eléctricas (de idéntico valor) asociadas a cada célula la misma intensidad de corriente, cuyo valor depende de la velocidad de barrido seleccionada.

A lo largo del barrido, a través de los termosensores y elementos calefactores apropiados, el sistema de control analógico del calorímetro establece la igualdad de temperatura entre las dos células, y entre éstas y las corazas interna y externa, de forma que el bloque de células se comporte en su conjunto como un sistema adiabático. Cuando se produzca cualquier efecto térmico en una de las células, la termopila de las células generará una señal eléctrica. Esta señal será utilizada como señal de error para que el sistema de control del calorímetro produzca una compensación de potencias simétrica en ambas células, que tenderá a mantener la igualdad de temperaturas. Una señal eléctrica proporcional a la

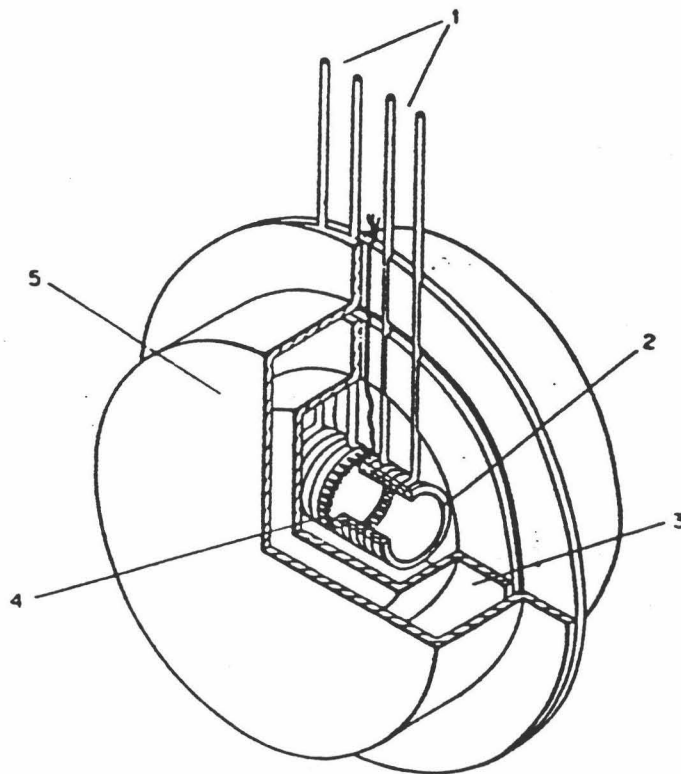


FIGURA 3.13: Esquema del bloque calorimétrico del microcalorímetro de barrido DASM-4. 1) Entradas de los capilares. 2) Resistencia calefactora de las células. 3) Coraza interna. 4) Coraza externa.

potencia de compensación suministrada será registrada como medida del efecto térmico producido en las células, en función de la temperatura de éstas. Se puede demostrar que esta señal es proporcional a la diferencia de capacidad calorífica entre la célula de muestra y la de referencia (López-Lacomba, 1987). La gran sensibilidad con que se detecta una diferencia de temperatura entre ambas células es la que determina la sensibilidad de la medida calorimétrica.

3.6.2 Experimentación.

La realización de un experimento de DSC consiste en llenar la célula de muestra con la disolución debidamente preparada del material biológico, en nuestro caso una proteína, y la célula de referencia con el tampón en que la muestra biológica va disuelta. A las células se les proporciona una sobrepresión de 2.5 atmósferas para evitar la degasificación de las disoluciones durante el calentamiento y su ebullición cuando se trabaja por encima de 100°C. Se fija la velocidad de barrido y se registra la señal de voltaje en función de la temperatura. Los datos de voltaje y temperatura se adquieren mediante un ordenador y se almacenan en discos flexibles para su posterior procesamiento. Estos datos contienen la información correspondiente a la función capacidad calorífica, C_p , del sistema en estudio.

Dado que las células no pueden construirse exactamente iguales, hay que restar la contribución a la C_p debida a la diferencia existente entre las células. Para ello se registra un barrido con las dos células llenas con el tampón en que va disuelta la muestra. A este registro se le llama línea base instrumental. Se resta del registro correspondiente al barrido con la muestra, obteniéndose exclusivamente la contribución debida a la presencia de la proteína.

Posteriormente al primer barrido con la muestra, puede registrarse un segundo barrido sin extraer la muestra de la célula con el fin de comprobar la reversibilidad de los procesos de desnaturalización detectados, algo que será muy importante en la interpretación de los datos, como posteriormente se verá. Hay que reseñar que en los casos en que estos procesos fueron completamente irreversibles fue práctica común utilizar como línea base instrumental este segundo barrido, eliminándose de esta manera pequeñas diferencias instrumentales debidas a diferentes llenados de las células.

Para transformar los datos de voltaje (mV) en valores de capacidad calorífica (J/K) hay que calcular el valor de la constante de calibrado de aparato. Para ello puede realizarse un calibrado suministrando una potencia eléctrica extra a la resistencia de una de las dos células. La altura de la señal que se produzca para una potencia suministrada, junto con la velocidad de barrido utilizada, nos dará la conversión entre voltaje y capacidad calorífica. El parámetro de conversión, o constante de calibrado, es una característica propia del calorímetro. Posteriormente se pueden normalizar los valores para el número de moles de proteína presentes utilizando el volumen de disolución de la célula y la concentración y peso molecular de la proteína en estudio. Se obtendrá la capacidad calorífica molar en kJ/K.mol.

En la Figura 3.14 se ilustra un experimento típico de DSC para una de las proteínas estudiadas en esta Memoria.

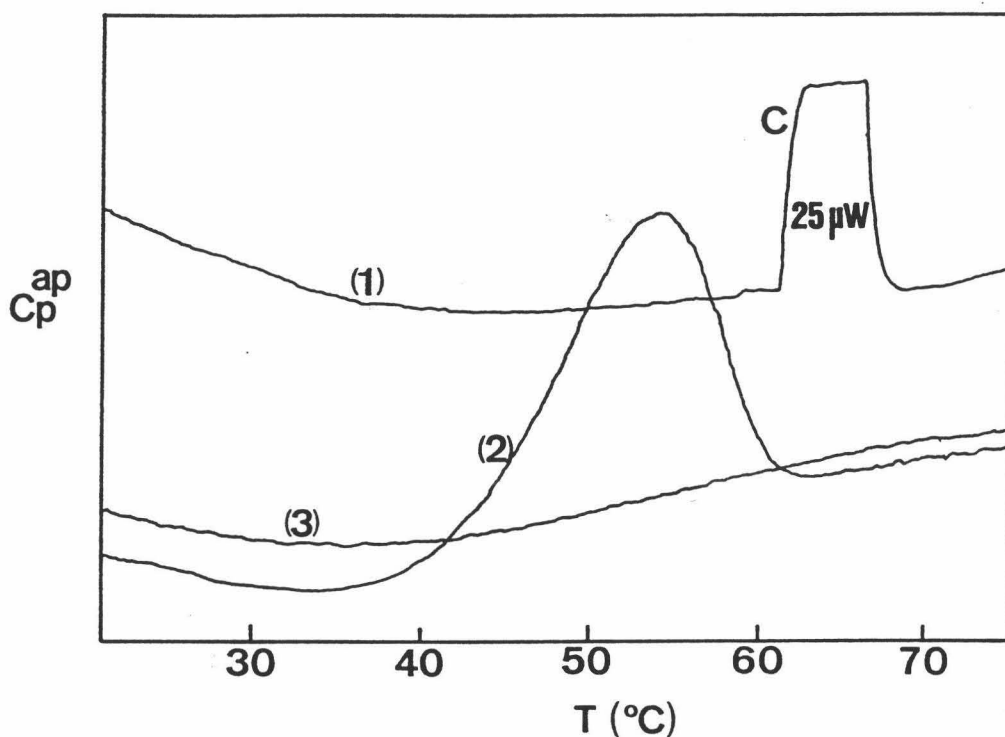


FIGURA 3.14: Registro experimental correspondiente a un experimento de DSC con carboxipeptidasa B en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, a una velocidad de barrido de 2 K/min y una concentración de muestra de 1.8 mg/ml. 1) Línea base instrumental. 2) 1^{er} barrido con la muestra. 3) 2^o barrido con la muestra. C corresponde a un calibrado eléctrico de 25 μW.

3.6.3 Análisis de datos.

Los datos de capacidad calorífica, C_p , una vez restada la línea base instrumental, contienen dos contribuciones distintas: a) La capacidad calorífica de exceso, C_p^{ex} , debida a la absorción de calor por el proceso de desnaturalización, dando lugar al "pico" o transición correspondiente, y b) la capacidad calorífica intrínseca de la mezcla de los diferentes macroestados del sistema, C_p^q , que viene dada por:

$$C_p^q = \sum_i C_{p,i} x_i$$

donde $C_{p,i}$ es la capacidad calorífica intrínseca del macroestado i a esa temperatura y x_i es la fracción presente del estado i esa la misma temperatura. Esta capacidad calorífica intrínseca es responsable de que normalmente en los termogramas de DSC de proteínas la curva de C_p empiece y acabe a diferente altura. Esta diferencia es el incremento de capacidad calorífica entre el estado nativo de la proteína y el desnaturalizado (ΔC_p), ya que a bajas temperaturas toda la proteína se encuentra en el estado nativo, y a altas temperaturas toda está en el desnaturalizado (ver Figura 3.15). La capacidad calorífica intrínseca en el intervalo de la transición, llamada también línea base química, puede determinarse, bien suponiendo

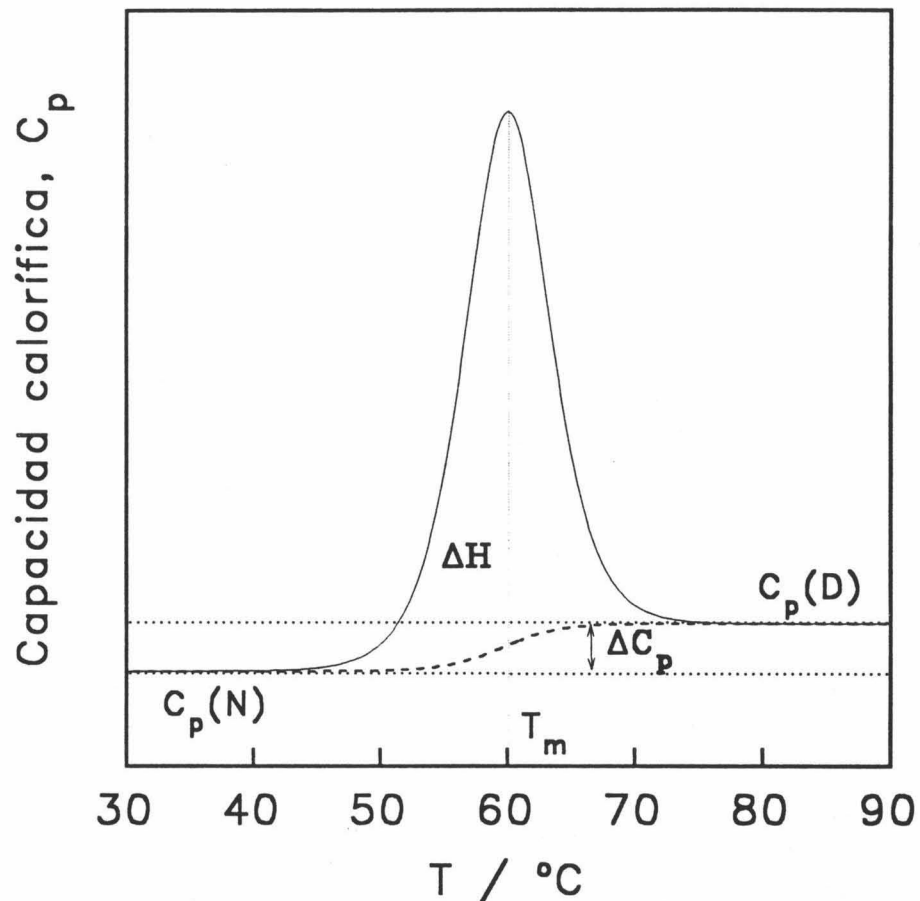


FIGURA 3.15: (—) Curva de capacidad calorífica, $C_p(T)$, en función de la temperatura calculada para una proteína hipotética que despliega según el modelo de equilibrio de dos estados. $C_p(N)$ representa la capacidad calorífica del estado nativo y $C_p(D)$ la del estado desplegado. $\Delta C_p = C_p(D) - C_p(N) = 1000 \text{ cal/K.mol}$; $\Delta H = 100 \text{ kcal/mol}$; $T_m = 60^\circ\text{C}$. (-----) Curva de capacidad calorífica intrínseca o línea base química, $C_p^q(T)$. El área encerrada entre las dos curvas equivale a la entalpía desplegamiento, ΔH .

un modelo para el proceso de desnaturalización, bien empíricamente mediante diversas interpolaciones de las curvas a ambos lados de la transición. Un método totalmente empírico es el trazado de una línea recta entre los límites de la transición. Otro método empírico muy utilizado es el de Takahashi y Sturtevant (1981). Este método establece dos niveles de C_p definidos por las prolongaciones de las curvas a ambos lados de la transición. La línea base química a lo largo de la transición será una curva que evolucionará de un nivel a otro proporcionalmente al área desarrollada por la transición (Figura 3.15). Calculada la línea base química, se resta su contribución obteniéndose la capacidad calorífica de exceso, C_p^{ex} .

Dado que, como todo instrumento de medida, el calorímetro tiene un cierto tiempo de respuesta, las curvas de $C_p^{ex}(T)$ estarán afectadas por ese retraso en la medida, que se traduce en una deformación más o menos significativa de la curva obtenida. Por ello es necesario corregir los termogramas para la respuesta dinámica del instrumento. En nuestro caso, el calorímetro presenta una dinámica de primer orden, reduciéndose la corrección a realizar la siguiente operación:

$$C_p(T) = C_p^*(T) + \tau \cdot v \cdot \frac{dC_p^*(T)}{dT}$$

donde $C_p(t)$ es la señal real o señal corregida, $C_p^*(t)$ es la señal obtenida experimentalmente, v es la velocidad de barrido y τ es el tiempo de respuesta del calorímetro. Este se determina en el proceso de caracterización dinámica del instrumento (López-Mayorga, 1983; Lechuga, 1986; López-Mayorga y Freire, 1987). En el caso del calorímetro DASM-4, τ es de 12 segundos, prácticamente independiente de la velocidad de barrido.

Una vez realizadas todas estas correcciones disponemos de la función $C_p^{ex}(T)$ que nos proporciona los parámetros característicos de la transición del proceso de desnaturalización, tales como T_m , ΔH , etc. Esta curva de $C_p^{ex}(T)$ será analizada posteriormente de acuerdo con los modelos adecuados.

4.FUNDAMENTOS
TEORICOS.

A lo largo de todo el trabajo que se describe en esta Memoria, la calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha sido la técnica fundamental y más utilizada en el estudio de los procesos de desnaturalización de las proteínas investigadas. Dado que el análisis de los datos de DSC debe realizarse bajo la suposición de determinados modelos teóricos, se hace necesario, para un mejor entendimiento de esta Memoria, exponer una serie de modelos que han sido desarrollados y frecuentemente utilizados en la Bibliografía.

4.1 Modelos de equilibrio.

La Termodinámica de Equilibrio ha sido utilizada para caracterizar la desnaturalización térmica de un cierto número de proteínas globulares simples y algunas proteínas complejas, que transcurre de forma reversible bajo ciertas condiciones, obteniéndose una valiosa información sobre la estabilidad de sus estructuras nativas (Privalov, 1979; Privalov, 1982; Schellman, 1987; Privalov, 1989). El análisis termodinámico de los datos de DSC, mediante la aplicación de modelos de equilibrio, requiere que el proceso investigado transcurra en equilibrio termodinámico a lo largo de todo el intervalo de temperatura en que ocurren las transiciones.

4.1.1 Modelo de equilibrio de dos estados.

En la desnaturalización reversible de muchas proteínas globulares pequeñas se ha encontrado que la molécula se encuentra únicamente en dos estados significativamente poblados: el estado nativo (N), con una estructura plegada, y el desnaturalizado (D), o desplegado (los estados N y D son en realidad "macroestados" formados probablemente por multitud de "microestados" que difieren muy poco en entalpía). Esta conclusión se ha deducido principalmente del hecho de que la desnaturalización de estas proteínas puede describirse cuantitativamente mediante el llamado modelo de equilibrio de dos estados, que puede esquematizarse de la siguiente forma:



Los estados N y D se encuentran en equilibrio en todo momento. La constante de

equilibrio, K , será:

$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (4.1)$$

Y la fracción de proteína, x_D , que se encuentra en el estado D vendrá dada por:

$$x_D = \frac{[D]}{[N]+[D]} = \frac{K}{1+K} \quad (4.2)$$

La transición entre los dos estados está determinada por la diferencia de entalpía entre ellos: $\Delta H = H_D - H_N$. Tomando como estado de referencia el estado nativo, N, la entalpía del sistema, función de la temperatura, será:

$$H = x_N H_N + x_D H_D = x_D \Delta H = \frac{K}{1+K} \Delta H \quad (4.3)$$

La capacidad calorífica molar, C_p , viene definida por:

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p = \frac{(\partial K / \partial T)_p}{(1+K)^2} \Delta H + \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_p \frac{K}{(1+K)} \quad (4.4)$$

Teniendo en cuenta que la constante de equilibrio, K , varía con la temperatura según la ecuación de van't Hoff:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (4.5)$$

y que, según la ecuación de Kirchoff, $\Delta C_p = (\partial \Delta H / \partial T)_p$, siendo ΔC_p la diferencia de capacidad calorífica entre el estado D y el N, tenemos que

$$C_p = \frac{K}{(1+K)^2} \frac{\Delta H^2}{RT^2} + \Delta C_p \frac{K}{(1+K)} \quad (4.6)$$

donde K y ΔH variarán con la temperatura según las formas integradas de la ecuación de

van't Hoff y la ecuación de Kirchoff respectivamente, considerándose ΔC_p constante con T (Privalov y Khechinashvili, 1974).

Una simulación de C_p según la Ecuación 4.6 nos da una curva como la que se muestra en la Figura 3.15, Apartado 3.6.3, donde se muestra el significado de varios parámetros que intervienen en la ecuación. Vemos en la Ecuación 4.6 que la función $C_p(T)$ consta de dos términos. El primero tiene la forma de un pico más o menos estrecho, dependiendo del valor de ΔH a $T=T_m$ (la temperatura del máximo de la transición). El segundo tiene una forma sigmoideal. La diferencia de altura entre los extremos de la curva coincide con el valor de ΔC_p . En la Figura 4.1 se muestra un termograma de DSC correspondiente a la desnaturalización térmica de la lisozima a pH 2.5 (Privalov, 1979). Vemos la similitud entre las curvas de las dos Figuras, teniendo en cuenta que en ésta última la referencia es la línea base correspondiente al tampón.

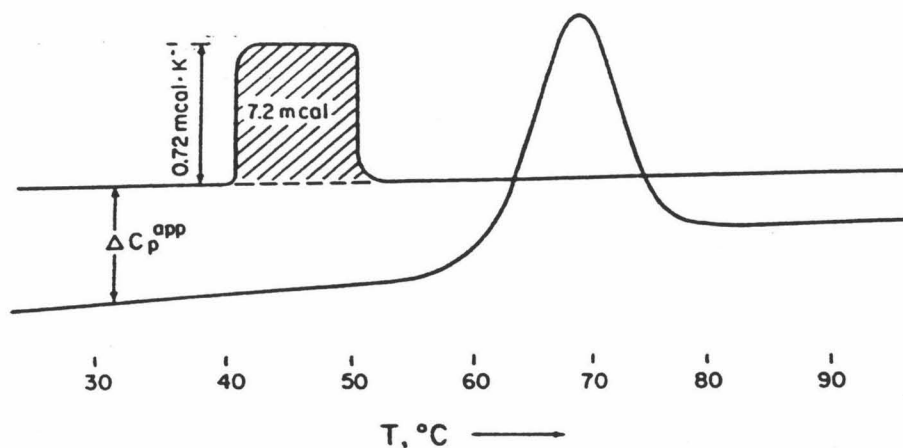


FIGURA 4.1: Registro de DSC de la dependencia de la capacidad calorífica con la temperatura de una disolución de lisozima al 0.152%, pH 2.5, velocidad de barrido 1 K/min (tomado de Privalov, 1980).

Es obvio que mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la ecuación 4.6

a la curva experimental se pueden obtener todos los parámetros termodinámicos del proceso: ΔH , ΔS , ΔG y ΔC_p . Sin embargo, hay casos en que la curva de C_p fuera de los límites de la transición se ve deformada por diversos efectos tales como agregación de moléculas desnaturalizadas, insuficiente estabilidad de línea base, etc., dificultándose sobre todo la determinación de ΔC_p . Se puede en estos casos discernir entre las dos contribuciones a C_p mediante el trazado de línea base química (ver Apartado 3.6.3). Este procedimiento equivale a eliminar empíricamente el segundo término de la Ecuación 4.6, de forma que queda la capacidad calorífica de exceso, $C_p^{ex}(T)$, que es debida exclusivamente a la absorción de calor por el proceso de desplegamiento, sin la contribución debida a ΔC_p . En la Figura 4.2 se muestran varias curvas simuladas de esta forma. El área bajo estas curvas corresponde a ΔH a la temperatura media de desnaturalización (T_m), temperatura que coincide con la del máximo de la transición.

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p^{ex}(T) dT \quad (4.7)$$

donde T_1 y T_2 son temperaturas correspondientes a antes y después de la transición respectivamente.

Al ΔH obtenido mediante determinación del área bajo las curvas de $C_p^{ex}(T)$ se le llama comunmente entalpía calorimétrica ΔH^{cal} . Únicamente mediante DSC es posible medir de forma directa la entalpía del proceso de desplegamiento térmico de una proteína. Una forma indirecta de determinar la entalpía del proceso es utilizar la forma integrada de la ecuación (4.5) que, suponiendo $\Delta C_p=0$ es:

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \quad (4.8)$$

Mediante la llamada "representación de van't Hoff" de $\ln K$ frente a $1/T$ se puede obtener ΔH . La entalpía así calculada se llama entalpía de van't Hoff, ΔH^{vH} . Este método es el que normalmente se utiliza cuando se estudia el desplegamiento térmico reversible de proteínas por técnicas no calorimétricas. También se puede calcular ΔH^{vH} para $T=T_m$ a partir de las curvas de $C_p^{ex}(T)$ mediante la conocida fórmula:

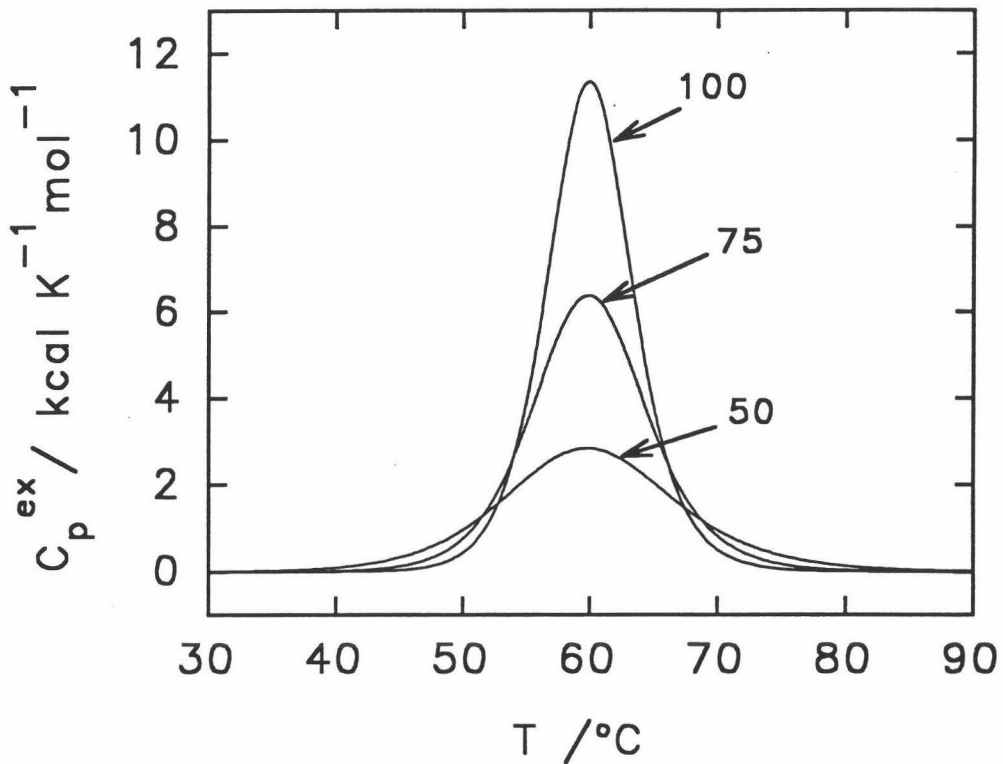


FIGURA 4.2: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ simuladas mediante la Ecuación 4.6, suponiendo $\Delta C_p=0$, para $T_m = 60^\circ\text{C}$ y los valores de ΔH en kcal/mol indicados.

$$\Delta H^{vH} = 4RT_m^2 \frac{C_p^m}{\Delta H^{cal}} \quad (4.9)$$

donde C_p^m es C_p^{ex} en el máximo. Esta ecuación se obtiene aplicando la condición de $K=1$ a $T=T_m$ en la ecuación 4.6, sin el segundo término correspondiente a la contribución del ΔC_p .

Es obvio que, para que el sistema cumpla el modelo de dos estados, ΔH^{cal} y ΔH^{vH} deben coincidir ya que son el mismo parámetro determinado de forma distinta. De hecho ΔH^{vH} definido en la Ecuación 4.9 sólo tiene significado dentro del modelo de equilibrio de dos estados. Sin embargo, la relación $r = \Delta H^{cal} / \Delta H_{vH}$, que en el modelo de dos estados es igual a 1, es un parámetro muy utilizado para comprobar la validez del modelo y, en caso

contrario, orientarnos hacia el tipo de proceso que está ocurriendo, como veremos más adelante.

Una vez que se conocen T_m , ΔH para $T=T_m$ y ΔC_p , dado que $\Delta S(T_m)=\Delta H(T_m)/T_m$, suponiendo ΔC_p constante con T (Privalov y Khechinashvili, 1974), se puede obtener la caracterización termodinámica completa del proceso de desnaturalización de la proteína y calcular los valores de ΔH , ΔS y ΔG en función de la temperatura.

$$\begin{aligned}\Delta H &= \Delta H(T_m) + \Delta C_p (T - T_m) \\ \Delta S &= \Delta S(T_m) + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \\ \Delta G &= \Delta H - T \cdot \Delta S\end{aligned}\tag{4.10}$$

Una representación de $\Delta H(T)$, $T\Delta S(T)$ y $\Delta G(T)$ se muestra en la Figura 4.3 para unos parámetros típicos de una proteína globular pequeña. Puede verse que el incremento de energía libre de Gibbs de desplegamiento tiene valores pequeños (como máximo unas 10-15 kcal/mol), consecuencia de la compensación de los dos grandes términos entálpico y entrópico. Además, el desplegamiento de las proteínas muestra un ΔC_p alto y positivo debido a la interacción de los restos apolares de la proteína con el agua en el estado desplegado. Basado en esto se ha propuesto que la principal fuerza impulsora del plegamiento de la proteínas es el llamado "efecto hidrofóbico" (Privalov, 1979; Privalov y Gill, 1988; Dill, 1990), que consiste en la "aversión" del agua por los grupos apolares de la proteína, plegándose ésta de forma que la superficie hidrofóbica expuesta al medio sea mínima. Por otra parte, ΔG muestra una curvatura más pronunciada cuanto mayor sea el valor de ΔC_p . Presenta un máximo a temperaturas bajas, cercanas a la fisiológica, estando en esas condiciones favorecido el estado nativo. El valor de ΔG a esas temperaturas constituye una medida de la estabilidad de las proteínas. La función ΔG disminuye al incrementarse T hasta pasar por cero a $T=T_m$ donde $K=1$, pasando a T superior a estar favorecido el estado desnaturalizado. A temperaturas bajas ΔG tiende a disminuir de nuevo por lo que podría esperarse que hubiera una desnaturalización de la proteína por "frío" (Brandts, 1964). Evidencia experimental de esto se ha encontrado en años recientes (Privalov et al., 1986; Griko et al., 1988), lo que apoya la validez de los datos de magnitudes termodinámicas determinadas por DSC.

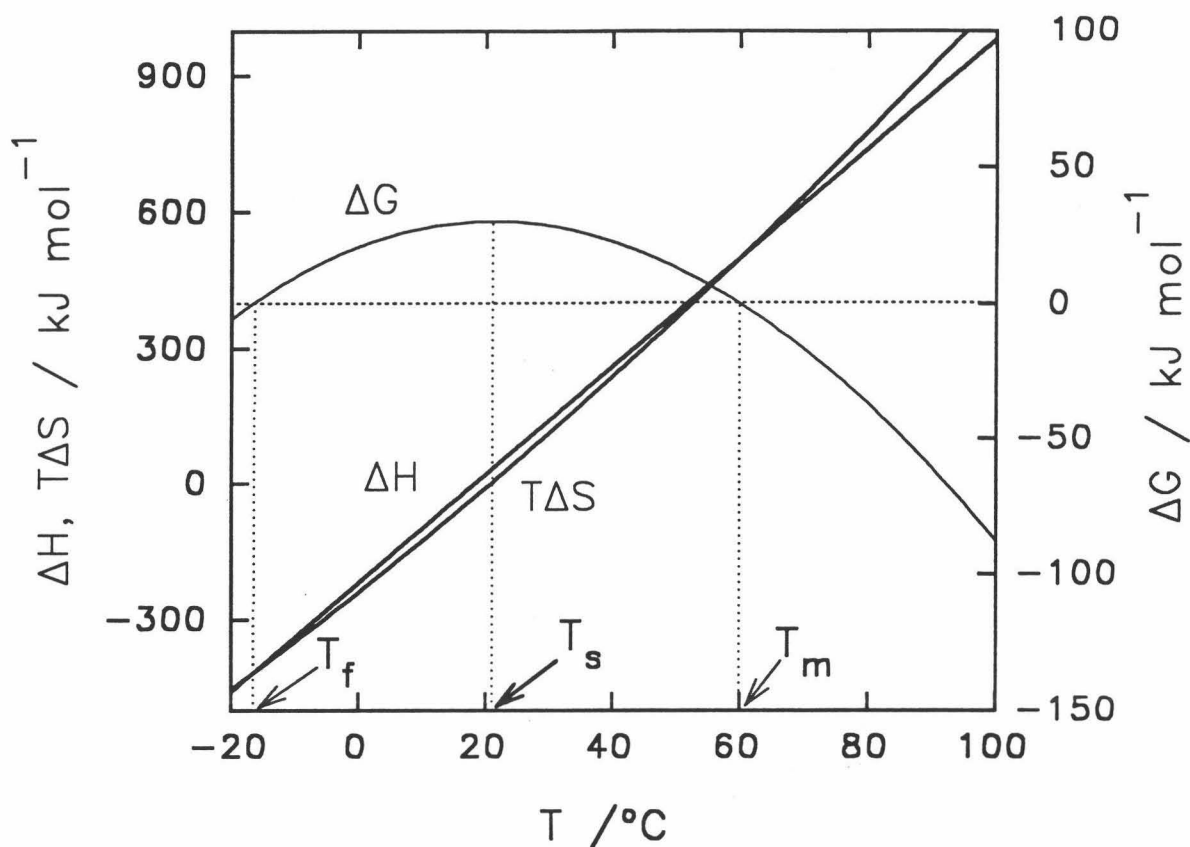


FIGURA 4.3: ΔG , ΔH y $-T\Delta S$ en función de la temperatura calculados mediante las Ecuaciones 4.10 para el desplegamiento térmico de una proteína hipotética con los siguientes parámetros: $T_m = 60^\circ\text{C}$, $\Delta H(T_m) = 500 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta C_p = 12 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. T_f representa la temperatura de desnaturalización por "frío" y T_s la temperatura de máxima estabilidad.

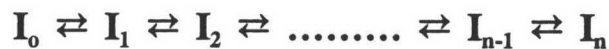
4.1.2 Modelos de equilibrio multiestado.

Hay veces en que los datos de DSC para la desnaturalización térmica reversible de una proteína no puede explicarse mediante el modelo de equilibrio de dos estados. Estos son los casos de proteínas complejas en que aparecen varias transiciones separadas, o bien los casos en que, aunque se obtiene un sólo pico, las dos entalpías anteriormente definidas, ΔH^{cal} y ΔH^{vh} , no son iguales. Esto no quiere decir que haya dos entalpías distintas sino que la Ecuación 4.7 no es aplicable dado que no es válido el modelo de equilibrio de dos estados. En estos casos, el parámetro $r = \Delta H^{\text{cal}} / \Delta H^{\text{vh}}$ anteriormente descrito es de gran utilidad: Si $r > 1$, hay más de dos estados significativamente poblados implicados en el equilibrio de

desnaturalización. En cambio, si $r < 1$, existe cooperatividad intermolecular, es decir, están implicados estados de asociación de la macromolécula superiores al monómero. Inicialmente nos centraremos en el primer caso, dejando el segundo para más adelante.

Esquema secuencial.

Una forma de generalizar el método de análisis de equilibrio de los datos de DSC fue el método propuesto por Freire y Biltonen (1978), en el que se suponen varios estados implicados en el proceso de desnaturalización:



donde se pueden definir n constantes de equilibrio:

$$K_1 = [I_1]/[I_0], K_2 = [I_2]/[I_1], \dots, K_n = [I_n]/[I_{n-1}]$$

I_0 es el estado nativo, I_n es el estado completamente desplegado y existen n-1 estados intermedios.

La función de partición del sistema es:

$$Z(T) = 1 + \sum_{i=1}^{i=n} \exp(-\Delta G_i/RT) \tag{4.11}$$

donde el estado de referencia es el I_0 y $\Delta G_i = G_i - G_0$.

La fracción de moléculas en el estado i

$$x_i = \frac{[I_i]}{\sum_{i=0}^{i=n} [I_i]} = \frac{\exp(-\Delta G_i/RT)}{Z(T)} \tag{4.12}$$

La entalpía de exceso, $\langle H \rangle$, relativa al estado inicial, promedio de las contribuciones de todos los estados presentes, viene dada por:

$$\langle H \rangle = \sum_{i=1}^{i=n} \Delta H_i x_i = \sum_{i=1}^{i=n} \left(\Delta H_i \frac{\exp(-\Delta G_i/RT)}{Z(T)} \right) \tag{4.13}$$

La función $C_p(T)$ puede obtenerse mediante derivación de la Ecuación 4.13 respecto

a T:

$$C_p = \frac{1}{RT^2} \left(\sum_{i=1}^{i=n} \frac{\Delta H_i^2 \exp(-\Delta G_i/RT)}{Z(T)} - \left(\sum_{i=1}^{i=n} \frac{\Delta H_i \exp(-\Delta G_i/RT)}{Z(T)} \right)^2 \right) + \sum_{i=0}^{i=n} \Delta C_{p,i} x_i = \langle \Delta C_p \rangle + \frac{\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2}{RT^2} \quad (4.14)$$

De esta forma se pueden hallar los parámetros termodinámicos de cada estado mediante ajuste no lineal de mínimos cuadrados a la función $C_p(T)$, suponiendo a priori el número de estados presentes en el equilibrio.

Sin embargo, el número de parámetros ajustables puede ser grande y los algoritmos de minimización suelen requerir valores de los parámetros iniciales relativamente cercanos a los reales. A priori, en la mayoría de los casos es difícil hacer buenas estimaciones de los parámetros termodinámicos. Por ello Freire y Biltonen (1978) propusieron un método de deconvolución de las transiciones que, sin hacer ninguna suposición previa acerca del número de estados significativamente poblados en el equilibrio, permite obtener tanto éstos como los parámetros termodinámicos de cada estado. Para ello, derivando la Ecuación 4.11 y haciendo uso de la Ecuación 4.13, se obtiene:

$$d(\ln Z(T)) = \frac{\langle H \rangle}{RT^2} dT \quad (4.15)$$

y por integración directa de esta ecuación se llega a:

$$Z(T) = \exp \int_{T_0}^T \frac{\langle H \rangle}{RT^2} dT \quad (4.16)$$

donde T_0 es una temperatura a la que todas las moléculas se encuentran en el estado inicial. Dado que la dependencia de $\langle H \rangle$ con T se conoce por integración de las curvas de $C_p^{ex}(T)$, podremos determinar la función de partición del sistema, $Z(T)$, de la cual puede obtenerse toda la información termodinámica y el número de estados presentes (ver Freire y Biltonen, 1978, para más detalles). Dado que este método de deconvolución es un proceso recursivo, los parámetros termodinámicos no son determinados con gran precisión pero constituyen, junto con el número de estados, un buen punto de partida para el ajuste no lineal por mínimos cuadrados.

Es importante destacar que este modelo llamado secuencial no hace ninguna suposición acerca de la naturaleza física de los estados intermedios de la macromolécula presentes en el equilibrio.

Un ejemplo de un sistema analizado mediante este método se muestra en la Figura 4.4 para la curva de DSC correspondiente a la desnaturalización térmica del t-RNA^{Phe} (tomado de Gill et al., 1985), donde también se muestran las poblaciones de cada uno de los 6 estados predichos por el método, en función de la temperatura.

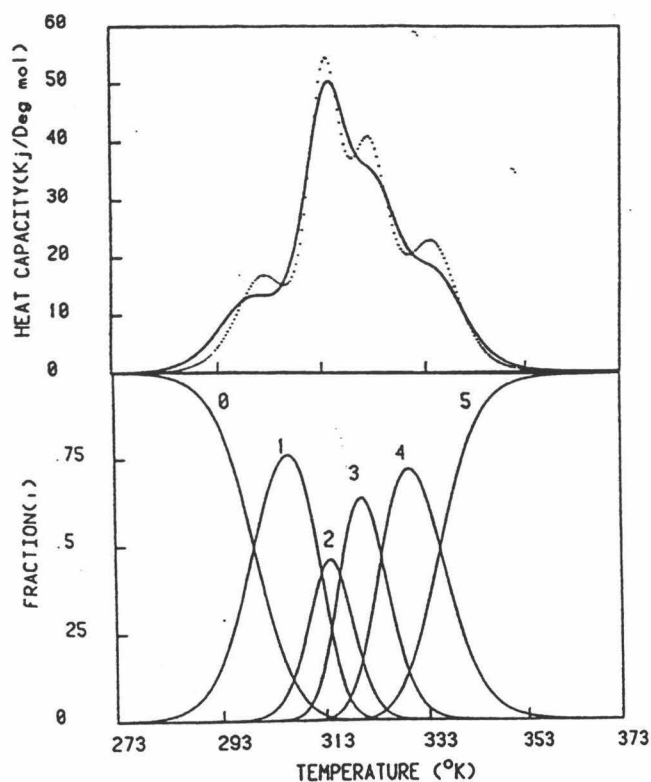


FIGURA 4.4: Desplegamiento térmico del t-RNA^{Phe} en NaCl 20 mM. Figura superior: En línea continua se muestra la curva de $C_p^{ex}(T)$ experimental. En línea discontinua se muestra la curva predicha por el esquema secuencial suponiendo 5 estados significativamente poblados durante el proceso de desplegamiento. La suposición de 6 estados origina una curva teórica indistinguible de la experimental. Figura inferior: Fracciones de estados frente a la temperatura calculadas mediante el modelo secuencial para la curva de $C_p^{ex}(T)$ de la Figura superior (tomado de Gill et al., 1985).

Esquema de transiciones independientes:

La mayoría de las proteínas presentes en la naturaleza son de naturaleza compleja, su estructura está formada por dominios estructurales cooperativos (Wetlaufer, 1981). Estas estructuras cooperativas son más o menos independientes. Es lógico pensar que durante el desplegamiento de una proteína compleja, que presenta estados intermedios significativamente poblados, estos estados se correspondan con situaciones en que unos dominios están plegados y otros desplegados. De esta forma surge un modelo en el cual se supone que las etapas del proceso de desnaturalización de una proteína compleja formada por n dominios consisten en el desplegamiento independiente de cada uno de ellos, de forma que el desplegamiento de uno de ellos no influye en el de los demás. El modelo también supone que cada dominio despliega según el modelo de dos estados. Por ello, el proceso global puede describirse como una suma de etapas de equilibrio de dos estados, y la capacidad calorífica de exceso vendrá dada por:

$$C_p^{ex} = \frac{1}{RT^2} \sum_{i=1}^{i=n} \Delta H_i^2 \frac{K_i}{(1+K_i)^2} \quad (4.17)$$

donde ΔH_i es la entalpía de desplegamiento del dominio i respecto a su estado nativo, y K_i es la constante de equilibrio de dicho desplegamiento. Se cumple que $\Delta H = \Delta H_1 + \Delta H_2 + \dots + \Delta H_n$.

Si se tiene información estructural de la macromolécula, puede corroborarse el modelo obteniendo fragmentos de la misma. En algunos casos es posible aislar el perfil de C_p calorimétrico de los fragmentos por separado, siendo posible correlacionar las transiciones obtenidas con el desplegamiento de regiones o dominios concretos de la macromolécula (Privalov et al., 1981; Privalov, 1982; Potekhin y Privalov, 1982; Privalov y Medved, 1982; Rigell et al., 1985; Tsalkova y Privalov, 1985).

Como ejemplo de este modelo se puede tomar de nuevo el caso del t-RNA^{phc} (Privalov y Filimonov, 1978) (ver Figura 4.5) donde se obtienen mediante este modelo 5 transiciones calorimétricas cuya suma reproduce exactamente la curva experimental.

En este modelo de transiciones independientes se puede apreciar muy bien el hecho de que el valor del parámetro r arriba definido sea > 1 cuando hay estados intermedios en el equilibrio de desnaturalización. Supongamos una proteína hipotética con dos dominios idénticos que sufren desplegamiento independiente. La curva de C_p^{ex} que se obtenga tendrá

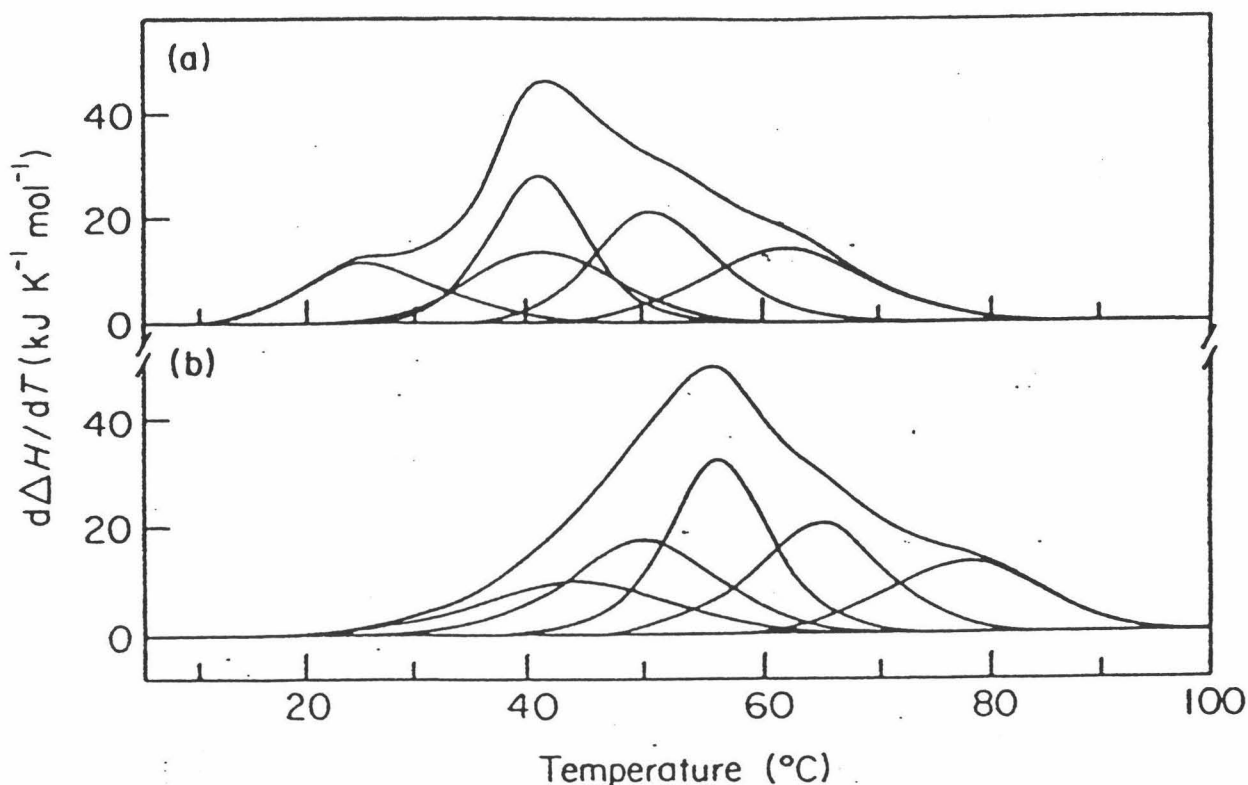


FIGURA 4.5: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes al desplegamiento térmico del t-RNA^{Phe} en NaCl 20 mM (a) y NaCl 150 mM (b). Para ambas curvas, el modelo de transiciones independientes encuentra 5 transiciones de equilibrio de dos estados. La suma de estas cinco transiciones individuales reproduce exactamente las curvas de $C_p^{ex}(T)$ experimentales (tomado de Privalov y Filimonov, 1978).

un sólo "pico" o transición, ya que ambos dominios despliegan de forma idéntica, con la misma K de equilibrio. Por tanto, el valor de ΔH^{vH} calculado para la transición corresponderá al de cada dominio, mientras que el ΔH^{cal} será la suma del ΔH de cada uno, es decir, el doble. Por tanto r tendrá un valor de 2.

Los dos modelos de transiciones múltiples son capaces de explicar las transiciones de DSC obtenidas con macromoléculas complejas. Sin embargo, en el ejemplo expuesto, mientras que el modelo secuencial describe sólo 6 estados significativamente poblados, el de transiciones independientes predice 2^5 estados posibles, pues son 5 los dominios cooperativos. La coincidencia entre ambos modelos se encontró al calcular las fracciones de los estados

significativamente poblados del modelo de transiciones independientes, viéndose que correspondía muy aproximadamente con los 6 estados encontrados en el modelo secuencial (Gill et al., 1985).

En la práctica es de esperar que entre los distintos dominios de las proteínas complejas existan interacciones más o menos fuertes, que no son consideradas por el modelo de transiciones independientes. Recientemente se han desarrollado modelos que cubren esta posibilidad siendo capaces de interpretar los datos de DSC de proteínas con dominios interaccionantes (Brandts et al., 1989; Freire y Murphy, 1991; Freire et al., 1991). La forma de cuantificar las interacciones interdominio consiste en introducir una energía de Gibbs de interacción entre pares de dominios, ΔG_{AB} . Para que la interacción exista se requiere la integridad estructural de ambos dominios, es decir, el desplegamiento de cualquiera de ellos causa que ΔG_{AB} se haga nulo. Este tratamiento coincide con el de transiciones independientes cuando $\Delta G_{AB}=0$, y con el de transiciones secuenciales cuando ΔG_{AB} tiene un valor grande.

4.1.3 Efectos de la concentración de proteína en transiciones con cambios en el estado de asociación.

Existen gran cantidad de proteínas formadas por asociación de varias subunidades (proteínas oligoméricas). Esta asociación es en muchos casos indispensable para su función biológica. Otras proteínas monoméricas tienden a formar oligómeros bajo ciertas condiciones experimentales. En el estudio de la desnaturalización de esas proteínas oligoméricas es lógico pensar que las subunidades se disocian al desplegarse. La primera proteína que mostró mediante DSC un desplegamiento disociante fue el inhibidor de subtilisina de *Streptomyces* (SSI) (Takahashi y Sturtevant, 1981) que es dímérico a temperaturas fisiológicas. Se han estudiado otras proteínas oligoméricas aplicando la termodinámica del equilibrio a la interpretación de los datos de DSC obtenidos (Manly et al., 1985; Edge et al., 1985; Calderon et al., 1985; Sturtevant, 1987). En algunos casos esta manera de proceder fue incorrecta, dada la irreversibilidad de las transiciones de DSC. Sobre este tema se discutirá más adelante en el Capítulo de Resultados y Discusión.

Para la desnaturalización disociante de un n-ámero el modelo de equilibrio podría ser (Takahashi y Sturtevant, 1981; Freire, 1989):



donde la constante de equilibrio del proceso es $K = [D]^n / [N_n]$.

A cualquier temperatura, la fracción de moléculas en el estado D, viene dada por:

$$x_D = \frac{[D]}{[D] + n[N_n]} = \frac{K^{1/n} \cdot [N_n]^{1/n}}{K^{1/n} \cdot [N_n]^{1/n} + n[N_n]} \quad (4.18)$$

De esta expresión puede obtenerse:

$$\frac{x_D}{1-x_D} = \frac{K^{1/n} \cdot [N_n]^{1/n}}{n[N_n]} \quad (4.19)$$

y teniendo en cuenta que $[N_n] = C_T(1-x_D)/n$, donde C_T es la concentración total de proteína:

$$\frac{x_D}{(1-x_D)^{1/n}} = \frac{K^{1/n} \cdot C_T^{\frac{1}{n}-1}}{n^{1/n}} \quad (4.20)$$

y derivando respecto a la temperatura:

$$\frac{dx_D}{dT} = \frac{nx_D(1-x_D)}{n(1-x_D)+x_D} \cdot \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (4.21)$$

donde ΔH está normalizado a la concentración de monómeros de proteína.

La capacidad calorífica de exceso, C_p^{ex} , tomando el estado N_n como referencia y suponiendo $\Delta C_p = 0$ como aproximación:

$$C_p^{ex} = \frac{\partial(\Delta H \cdot x_D)}{\partial T} = \frac{nx_D(1-x_D)}{n(1-x_D)+x_D} \cdot \frac{\Delta H^2}{RT^2} \quad (4.22)$$

Mediante la Ecuación 4.22 tras resolución numérica de la Ecuación 4.20, pueden simularse curvas de $C_p^{ex}(T)$ para distintos valores de n , lo que se muestra en la Figura 4.6. Puede verse que al aumentar el valor de n las transiciones se hacen más agudas y asimétricas. Esto hace que la temperatura del máximo, T_m , deje de coincidir con $T_{1/2}$.

Se puede demostrar que la relación $r = \Delta H^{cal} / \Delta H^{vH} = (n+1)/2n$, donde ΔH^{vH} se calcula mediante la Ecuación 4.9, evaluada para $T = T_{1/2}$. En cambio, para $T = T_m$:

$$\frac{\Delta H^{cal}}{\Delta H^{vH}} = \frac{1}{4} \left(\frac{n-1}{n-\sqrt{n}} \right)^2 \quad (4.23)$$

de donde puede verse que, para $T = T_m$, $r \approx 0.73$ para $n=2$, 0.56 para $n=4$, etc, todos valores

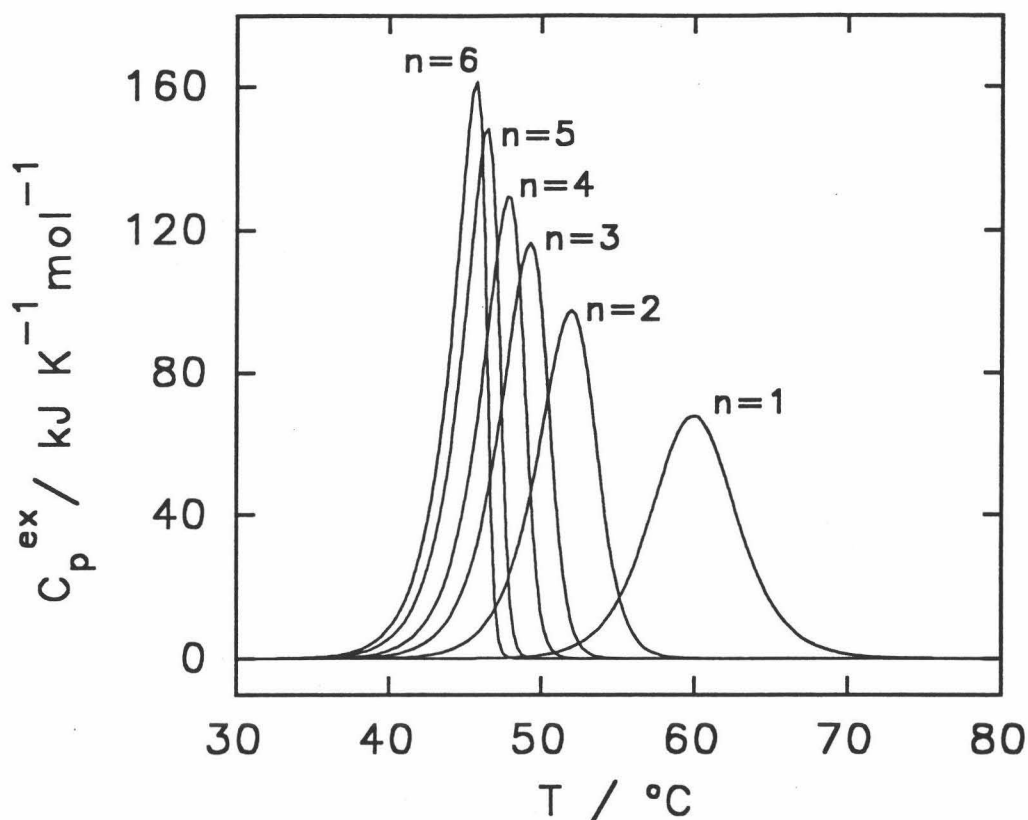


FIGURA 4.6: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ simuladas mediante las Ecuaciones 4.20 y 4.22 con los distintos valores del grado de asociación, n , que se indican, para una proteína cuyo monómero tiene un peso molecular de 12000 dalton, a una concentración de 1 mg/ml. $\Delta H=500$ kJ/mol de monómero y la temperatura a la que la constante de equilibrio, K , vale 1, $T_{(K=1)}=60$ $^{\circ}\text{C}$.

menores que 1, como se indicó más arriba.

Al contrario de lo que ocurre en transiciones isoméricas, las transiciones acopladas a equilibrios de asociación-disociación exhiben dependencia de la concentración. En particular, para este modelo, tras hacer varias aproximaciones, la dependencia de T_m es (Takahashi y Sturtevant, 1981; Freire, 1989):

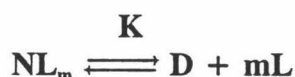
$$\ln C_T = \text{constante} - \frac{n}{n-1} \frac{\Delta H}{RT_m} \quad (4.24)$$

Por tanto estudiando el efecto de la concentración de proteína en la T_m de las

transiciones se puede determinar ΔH , que debe coincidir con el calorimétrico para el valor correcto de n .

4.1.4 Efecto de ligandos en transiciones de equilibrio.

Muchas proteínas, sobre todo las enzimas, requieren para su función biológica la presencia de determinados efectores o ligandos que modulan su actividad. Estos ligandos actúan uniéndose a las proteínas en determinados sitios de unión. Dada la importancia de estos procesos de unión proteína-ligando, su termodinámica ha sido frecuentemente estudiada por multitud de técnicas entre las que está la calorimetría diferencial de barrido. La información sobre el proceso se obtiene del efecto de la concentración de los ligandos en estudio sobre las transiciones de DSC de la proteína. Para que se produzca unión de los ligandos a la proteína, normalmente deben estar conformados los sitios de unión, lo cual ocurre cuando la proteína está en el estado nativo. Por ello, un esquema de desnaturalización térmica de una proteína en presencia de ligandos podría ser (Fukada et al., 1983):

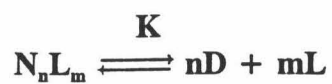


donde m es el número de ligandos unidos a la proteína. Esta pierde los ligandos al desplegarse. Se supone que la concentración de ligando libre, L , es mucho mayor que la de proteína y, por tanto, prácticamente constante. La concentración de proteína en estado nativo sin ligando unido es despreciable. La elaboración matemática del modelo conduce a la siguiente ecuación para el efecto de la concentración del ligando sobre la T_m de las transiciones de DSC:

$$\frac{\Delta H}{RT_m} + m \ln L_t = \text{constante} \quad (4.25)$$

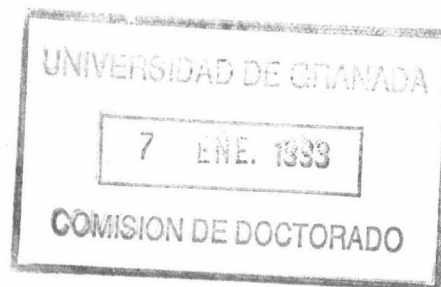
donde L_t es la concentración total de ligando, L , presente en el medio. De esta forma, conocido ΔH en ausencia de ligando, podremos determinar la estequiometría de unión representando $\ln L_t$ frente a $1/T_m$, para experimentos de DSC a varias concentraciones de ligando.

Un modelo que generaliza los efectos de la concentración de proteína y de ligandos sobre las transiciones de equilibrio de dos estados podría ser el siguiente (Fukada et al., 1983), combinación de los dos modelos anteriormente descritos:



Este modelo describe el efecto de la concentración de ligandos y proteína simultáneamente según la siguiente ecuación:

$$\frac{n\Delta H}{(n-1)RT_m} + m \ln L_i + \ln C_i = \text{constante} \quad (4.26)$$



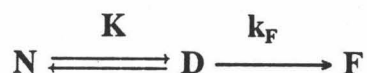
4.2 Modelos cinéticos.

La desnaturalización térmica de la mayoría de las proteínas es, desgraciadamente, irreversible. Esto impide en algunos casos la aplicación de la termodinámica de equilibrio y de los modelos descritos más arriba a los datos de DSC, dado que para ello se requiere que en todo momento esté establecido el equilibrio químico. El criterio de reversibilidad más comunmente empleado en DSC es la reproducibilidad del termograma en un segundo calentamiento de la muestra, tras enfriar rápida e inmediatamente que haya terminado la transición, con el fin de evitar que la alta temperatura inicie cualesquiera procesos irreversibles. Cuando no se obtiene reversibilidad, lo cual ocurre casi siempre, es necesario cambiar el enfoque del estudio del sistema. El proceso en este caso podría no ser de equilibrio y dependiente del tiempo, y estos procesos cinéticos se rigen por ecuaciones de velocidad. Por esto, y como veremos más adelante, la velocidad de barrido empleada en los experimentos de DSC juega un papel importante en el análisis de los datos calorimétricos de desnaturalización irreversible de proteínas.

Sólo muy recientemente se han propuesto modelos teóricos en el Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de Granada, que permiten el análisis de los datos de DSC obtenidos para este tipo de procesos de desnaturalización irreversible de proteínas (Sánchez-Ruiz, et al., 1988a y 1988b; Guzmán-Casado et al., 1990; Galisteo et al., 1991; Conejero-Lara et al., 1991a y 1991b; Sánchez-Ruiz, 1992).

4.2.1 Modelo cinético de dos estados.

La desnaturalización irreversible de proteínas puede ser representada de la forma más simple mediante el modelo de Lumry y Eyring (Lumry y Eyring, 1954):



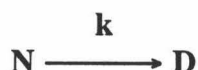
donde F es un estado final alcanzado irreversiblemente desde el estado desplegado, D. El equilibrio químico entre N y D está establecido en todo momento, a través de una constante de equilibrio K. Se supone además que la etapa irreversible es de primer orden, con una constante de velocidad k_F .

Este modelo ha sido ampliamente descrito en cuanto a su aplicación al análisis de los datos de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica irreversible de proteínas (Sánchez-Ruiz, 1992; Galisteo, 1990). Se proponen tres situaciones a considerar dependiendo de la velocidad del proceso irreversible que genera el estado F (Figura 4.7):

Situación A: El proceso irreversible sólo ocurre de manera suficientemente rápida a temperaturas por encima del intervalo de la transición de desplegamiento de la proteína. Si el barrido de DSC progresa hasta esas temperaturas, no se registrará ningún efecto térmico en un segundo barrido con la muestra y la transición se considerará calorimétricamente irreversible. Sin embargo, los datos correspondiente al equilibrio de desplegamiento no serán significativamente alterados por lo que la aplicación de la Termodinámica de equilibrio no conlleva grandes errores.

Situación B: El proceso irreversible es rápido en el intervalo de temperaturas en que ocurre el desplegamiento de la proteína. En este caso la transición de DSC se desvía claramente de la correspondiente a la Termodinámica de equilibrio, por lo que su aplicación puede ocasionar errores significativos. Sin embargo, un tratamiento adecuado de los termogramas permite extraer información termodinámica sobre el proceso de desplegamiento basándose en el efecto de la velocidad de barrido sobre las transiciones (Sánchez-Ruiz, 1992; Freire et al., 1990; Galisteo et al., 1991).

Situación C: El proceso irreversible es rápido incluso a temperaturas en las que el desplegamiento de la proteína ha avanzado poco. La población de proteína desplegada en todo momento será muy baja estando significativamente poblados únicamente los estados N y F a lo largo del barrido de DSC. De esta forma, y dado que los estados N y F no están en equilibrio, el proceso podrá ser descrito mediante un modelo irreversible de dos estados (Sánchez-Ruiz et al., 1988a):



donde la constante de velocidad aparente del proceso de primer orden, k , es igual a $k_F K$, siendo k_F la constante de velocidad del proceso irreversible y K la constante de equilibrio de desplegamiento (Sánchez-Ruiz, 1992). En la Figura 4.7 se muestran simulaciones de $C_p^{ex}(T)$, según este modelo, para las tres situaciones anteriores, donde se ha representado para comparación una transición de equilibrio de dos estados en línea de trazos.

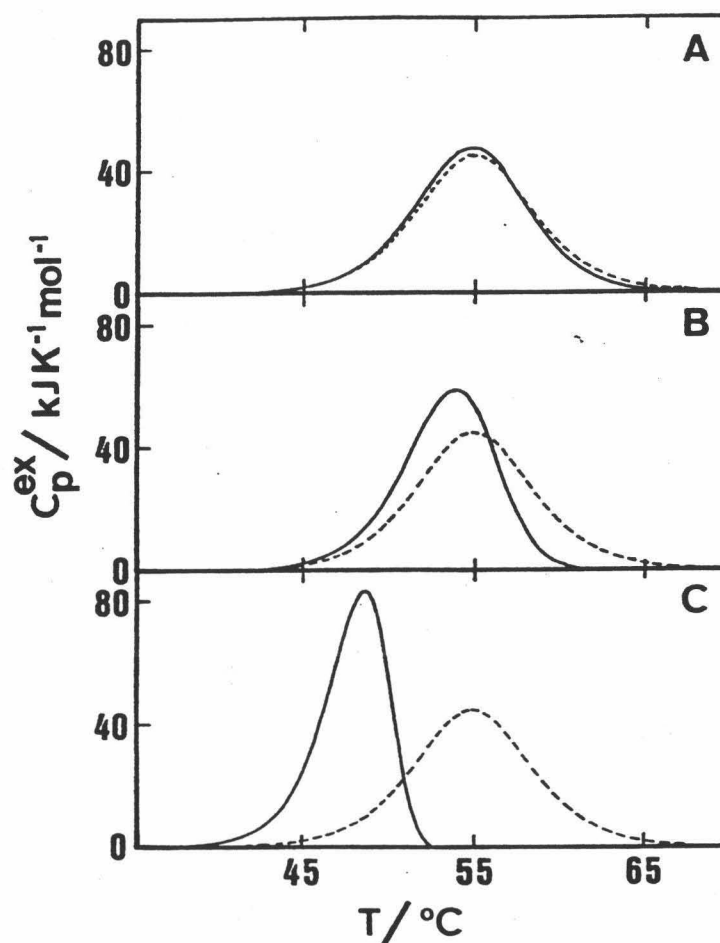


FIGURA 4.7: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ predichas por el modelo de Lumry y Eyring en las tres situaciones que se mencionan en el texto. Los parámetros utilizados son: $\Delta H=400$ kJ/mol; $T_{1/2}=55^\circ\text{C}$; La energía de activación de la etapa irreversible, $E=100$ kJ/mol. La temperatura a la que la constante de velocidad de la etapa irreversible, k_F , es igual a 1: (A) $T_{k=1}=75^\circ\text{C}$; (B) $T_{kF=1}=55^\circ\text{C}$; (C) $T_{kF=1}=25^\circ\text{C}$. La velocidad de barrido, $v=2$ K/min. En todos los casos la línea discontinua representa el desplegamiento reversible de dos estados (tomado de Sánchez-Ruiz, 1992).

La situación C es la que nos interesa sobre todo en esta Memoria, por lo que profundizaremos algo más en el modelo cinético de dos estados que será ampliamente aplicado a lo largo de todo este trabajo.

Un desarrollo matemático del modelo cinético de dos estados fue realizado por Sánchez-Ruiz et al. (Sánchez-Ruiz et al., 1988a) para el análisis de los datos de DSC de la

desnaturalización irreversible de la termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, a pH 7.5. En la Figura 4.8A se muestran las curvas de C_p^{ex} a varias velocidades de barrido. El modelo conduce a una serie de ecuaciones de las que puede calcularse la energía de activación, E. Esta energía de activación controla la variación con la temperatura de la constante de velocidad de primer orden, k, según la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot \exp(-E/RT)$$

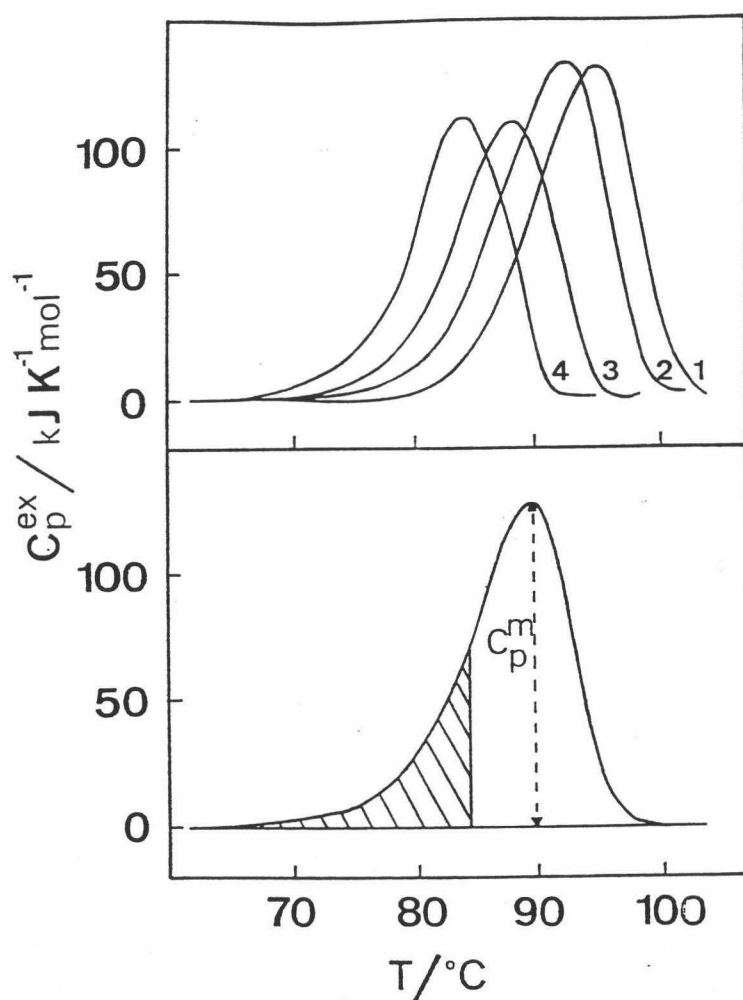


FIGURA 4.8: (A) Curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus rokko* a pH 7.5 obtenidas a 4 velocidades de barrido diferentes: (1) 1.9 K/min; (2) 1.0 K/min; (3) 0.5 K/min; (4) 0.2 K/min. (B) Curva teórica de $C_p^{ex}(T)$ predicha por el modelo cinético de dos estados. El área rayada corresponde al calor, Q , desarrollado a una temperatura, T . C_p^m indica la capacidad calorífica en el máximo de la transición (tomado de Sánchez-Ruiz et al., 1988a).

donde A es el factor de frecuencia.

A) La constante de velocidad de la reacción, a una temperatura dada, puede calcularse utilizando la siguiente ecuación:

$$k = \frac{v \cdot C_p^{ex}}{Q_t - Q} \quad (4.27)$$

donde Q_t es el calor total de la transición, Q es el calor desarrollado a la temperatura T (ver Figura 4.8B), C_p^{ex} es la capacidad calorífica de exceso a esa T y v es la velocidad de barrido. Utilizando la ecuación de Arrhenius, se puede representar $\ln k$ frente a $1/T$ para los valores de k a cada temperatura, representación que debe generar una recta de cuya pendiente, $(-E/R)$, se obtiene la energía de activación. En la Figura 4.9A se muestra la representación de Arrhenius para la termolisina (tomada de Sánchez-Ruiz et al, 1988a). Lo más interesante es que los datos de diferentes velocidades de barrido coinciden en la misma recta, condición indispensable para el cumplimiento del modelo, ya que la constante de velocidad no depende de la velocidad de barrido.

B) El modelo predice que la temperatura del máximo, T_m , cambia con la velocidad de barrido según:

$$\frac{v}{T_m^2} = \frac{A R}{E} \cdot e^{-E/RT_m} \quad (4.28)$$

de forma que representando $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ debe dar una recta de pendiente $-E/R$. Esta representación se muestra para la termolisina en la Figura 4.9B.

C) La dependencia del calor desarrollado a cada temperatura viene dada por:

$$\ln\left(\ln\left(\frac{Q_t}{Q_t - Q}\right)\right) = \frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right) \quad (4.29)$$

por lo que puede obtenerse E de una representación del primer término de la ecuación frente a $1/T$, que debe ser una línea recta, de pendiente $-E/R$. En la Figura 4.9C se muestra dicha representación para la termolisina.

D) E puede también calcularse directamente mediante la ecuación siguiente:

$$E = \frac{e R C_p^m T_m^2}{Q_t} \quad (4.30)$$

Cuando estos cuatro métodos fueron empleados con la termolisina, se obtuvieron

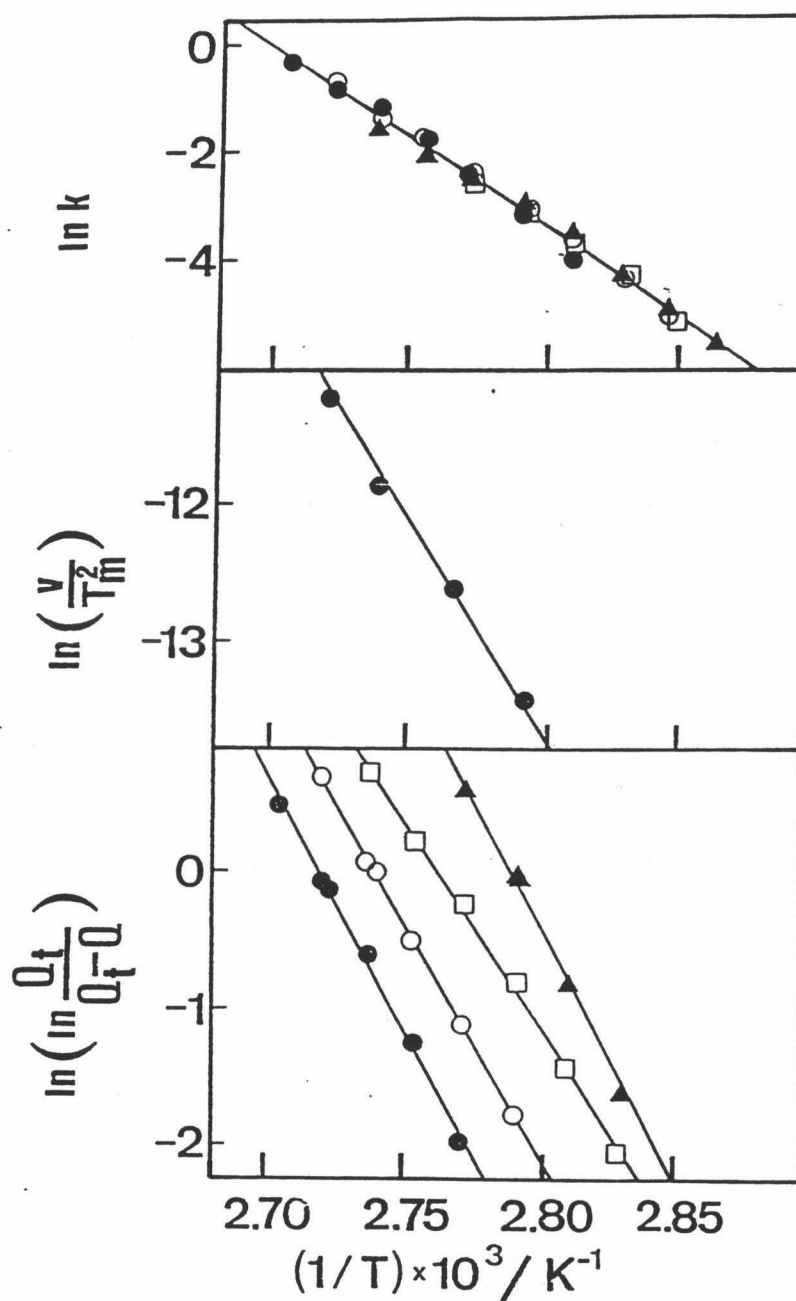


FIGURA 4.9: Aplicación del modelo cinético de dos estados a los datos de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de la termolisina a pH 7.5. (A) Representación de Arrhenius para las constantes cinéticas obtenidas mediante la Ecuación 4.27 a varias velocidades de barrido. (B) Representación de $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ (Ecuación 4.28); cada punto corresponde a una velocidad de barrido. (C) Representaciones correspondientes a la Ecuación 4.29 para varias velocidades de barrido. (Tomado de Sánchez-Ruiz et al., 1988a).

valores coincidentes para la energía de activación, lo cual corrobora el cumplimiento del modelo.

E) Un quinto método se deduce posteriormente derivando la Ecuación 4.23 y teniendo en cuenta la Ecuación 4.24 (Conejero-Lara et al, 1991a):

$$C_p^{ex} = e C_p^m \cdot \exp\left[\frac{E}{RT_m^2}(T-T_m)\right] \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{E}{RT_m^2}(T-T_m)\right]\right\} \quad (4.31)$$

La energía de activación puede obtenerse mediante ajuste no lineal de mínimos cuadrados a los datos experimentales de $C_p^{ex}(T)$.

Hemos visto que las transiciones dependen fuertemente de la velocidad de barrido en este modelo, como se había mencionado antes para procesos de no equilibrio. Esto es una regla completamente general independientemente del modelo que se emplee para explicar los datos de DSC de desnaturalizaciones cinéticamente controladas, por tanto puede emplearse como criterio para la aplicación o no de la Termodinámica de equilibrio cuando se encuentren transiciones calorimétricamente irreversibles.

Este modelo puede parecer poco realista y excesivamente sencillo. Sin embargo, hasta la fecha, describe muy bien los datos de DSC de la termolisina (Sánchez-Ruiz et al., 1988a), carboxipeptidasa A y procarboxipeptidasa A de pancreas de cerdo (Sánchez-Ruiz et al., 1988b), hemocianina de langosta (Guzman-Casado et al, 1990) y, como veremos en esta Memoria, carboxipeptidasa B y procarboxipeptidasa B de pancreas porcino (Conejero-Lara et al., 1991a y 1991b).

Es obvio que únicamente puede extraerse información cinética de la aplicación de este modelo ya que la información termodinámica queda totalmente enmascarada por la presencia del proceso irreversible.

4.2.2 Otros modelos cinéticos más complejos.

Evidentemente, uno puede complicar tanto como quiera el modelo que elija para explicar unos datos de DSC, dentro de las limitaciones matemáticas. Recientemente, Sánchez-Ruiz ha desarrollado modelos matemáticos para el análisis de datos de DSC de desnaturalización irreversible de proteínas en una amplia serie de supuestos, teniendo en cuenta efectos de concentración de proteína y de ligandos, y estableciendo una serie de

criterios de equilibrio muy útiles en DSC de proteínas (Sánchez-Ruiz, 1992).

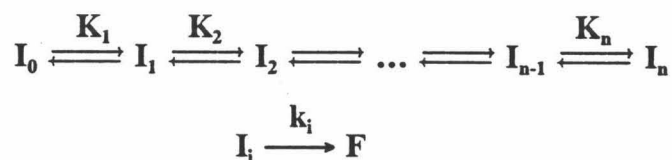
Equilibrios secuenciales seguidos de desnaturalización irreversible:

El esquema de desplegamiento de equilibrio secuencial propuesto por Freire y Biltonen (Freire y Biltonen, 1978) podría ser ampliado para introducir la irreversibilidad según el siguiente esquema (Freire et al., 1990):



Se ha supuesto, como es lógico, que el estado desplegado es el que sufre el proceso irreversible.

Otro esquema más general aún puede ser el siguiente:

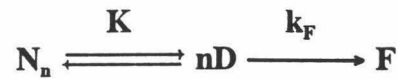


en donde ahora cualquiera de los estados de la proteína que están en equilibrio puede sufrir desnaturalización irreversible.

No vamos a mostrar aquí la elaboración matemática de estos modelos. Simplemente decir que mediante su aplicación, en ciertos casos favorables, es posible discernir, a partir de las transiciones calorimétricas de DSC obtenidas a varias velocidades de barrido, entre la información termodinámica de los estados intermedios significativamente poblados y la información cinética de los procesos irreversibles (Freire et al, 1990; Sánchez-Ruiz, 1992). Puede apreciarse que un caso particular de estos dos modelos es el modelo de Lumry y Eyring y, por tanto, también el modelo cinético de dos estados.

4.2.3 Efectos de concentración de proteína en transiciones irreversibles:

En el Apartado 4.1.3 hemos descrito un modelo que tiene en cuenta efectos de concentración en transiciones de equilibrio. Un esquema similar al de Lumry y Eyring para tener en cuenta irreversibilidad podría ser:



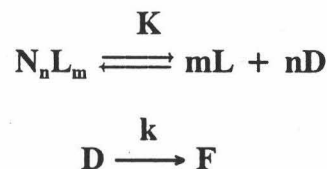
donde se supone una cinética de primer orden para el proceso irreversible. Suponiendo que estamos en la situación C descrita en el anterior Apartado, la elaboración matemática del modelo conduce a que pueden describirse transiciones fuertemente dependientes de la velocidad de barrido que, además, muestran efecto de la concentración de muestra. La ecuación que rige la dependencia de la temperatura del máximo con la concentración de proteína es:

$$\frac{E_{app}}{RT_m} - 2\ln T_m + \frac{n-1}{n} \ln C_t = constante \quad (4.32)$$

donde E_{app} es la energía de activación aparente del proceso. Para valores razonables de E_{app} , el término $2\ln T_m$ cambia mucho más lentamente que E_{app}/RT_m , pudiendo ser tomado como constante, con lo que esta ecuación pasa a ser similar a la Ecuación 4.20, equivalente para el modelo de equilibrio. Por tanto, el efecto de la concentración de proteína en la T_m de las transiciones irreversibles, según este modelo, es similar al predicho por el modelo de equilibrio.

4.2.4 Efectos de concentración de ligandos en transiciones irreversibles:

En el Apartado 4.1.4 vimos un modelo que explicaba el efecto de la concentración de ligandos para transiciones de DSC reversibles. Un esquema similar que además tiene en cuenta la irreversibilidad es (Sánchez-Ruiz, 1992):



modelo que predice un efecto de la concentración de ligando y de proteína en la T_m de las transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de proteínas. La ecuación correspondiente es:

$$\frac{E_{app}}{RT_m} - 2\ln T_m + \frac{n-1}{n} \ln C_t + \frac{m}{n} \ln L_t = \text{constante} \quad (4.33)$$

Así, el efecto de concentración de proteína, C_t , a concentración de ligando, L_t , constante es el mismo que el predicho por la Ecuación 4.27. Además, concentraciones crecientes de ligando incrementan el valor de T_m , igual que ocurre en los modelos de equilibrio. La representación de $\ln L_t$ frente a $1/T_m$ debe de dar una recta de pendiente nE_{app}/mR , ya que el término $2\ln T_m$ puede tomarse como constante.

5. RESULTADOS
Y DISCUSION.

5.1 Estudio de la desnaturalización térmica de la procarboxipeptidasa B, la carboxipeptidasa B y el dominio globular de activación por calorimetría diferencial de barrido.

5.1.1 Procarboxipeptidasa B y carboxipeptidasa B.

Inicialmente se han realizado experimentos de DSC de ambas proteínas, PCPB y CPB, en las siguientes condiciones:

- Fosfato 1 mM, pH 7.5.
- Fosfato 20 mM, pH 7.5.
- Pirofosfato 1 mM, pH 9.0.
- Pirofosfato 20 mM, pH 9.0.

Se han utilizado 4 velocidades de barrido diferentes: 2.0, 1.0, 0.5 y 0.25 K/min.

Estas condiciones experimentales son similares a las utilizadas en un estudio anterior de la PCPA y la CPA (Sánchez-Ruiz et al., 1988b). Todas las disoluciones contenían 1 μM de ZnCl_2 para mantener el ion Zn^{2+} unido al centro activo de ambas proteínas. La concentración de proteína empleada varió entre 0.65 mg/ml y 4.0 mg/ml. Registros originales experimentales de DSC para la CPB y para la PCPB, ambas en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, y a dos velocidades de barrido, se muestran en la Figura 5.1.1, donde se puede apreciar la completa irreversibilidad de las transiciones obtenidas para las dos proteínas, dada la falta de cualquier efecto térmico en el segundo barrido con la muestra, al igual que ocurre para CPA y PCPA. Esta irreversibilidad se encontró en todas las condiciones experimentales investigadas en esta Memoria.

Los valores de T_m y las entalpías de desnaturalización, para CPB y PCPB en los tampones y a los valores de pH y velocidades de barrido indicados, se muestran en la Tabla 5.1.I. Estos valores concuerdan muy bien con los encontrados para CPA y PCPA bajo similares condiciones experimentales. Es evidente que, a pH 7.5, para cualquier velocidad de barrido empleada, el incremento en la fuerza iónica del medio no afecta los valores de T_m para cualquiera de las dos proteínas. A pH 9.0 hay un claro descenso de T_m al aumentar la fuerza iónica, especialmente para la enzima activa. A concentración de tampón constante, los valores de T_m de CPB y PCPB son menores a pH 9.0 que a pH 7.5. A su vez, estos valores

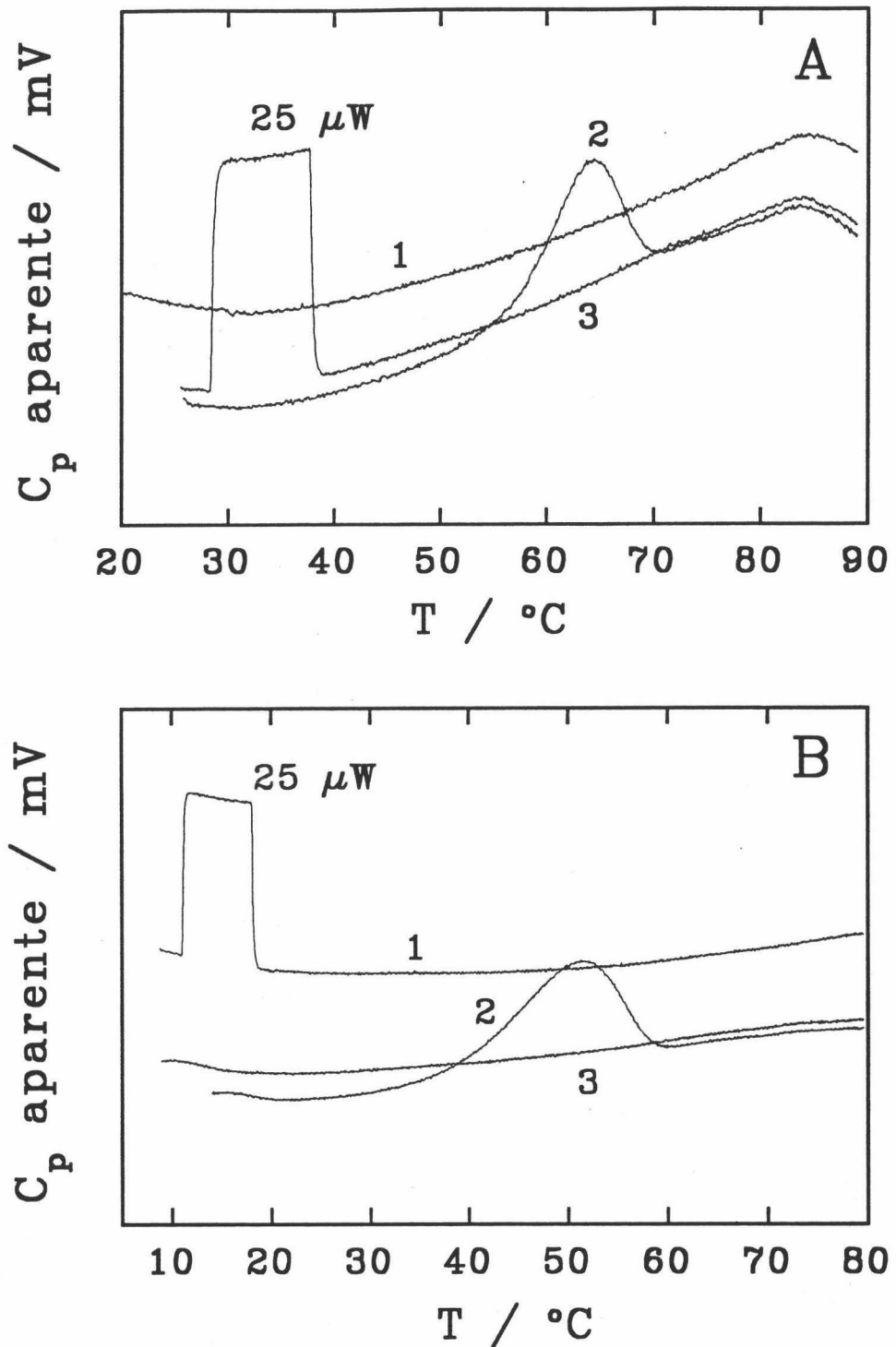


FIGURA 5.1.1: Registros experimentales de DSC obtenidos con: (A) PCPB a una concentración de muestra de 1.1 mg/ml; (B) CPB a una concentración de muestra de 3.5 mg/ml. Las velocidades de barrido utilizadas fueron 1.0 y 0.5 K/min respectivamente. El tampón utilizado en ambas muestras fue pirofosfato 20 mM, pH 9.0. Ambos registros constan de (1) línea base, (2) 1^{er} barrido con la muestra y (3) 2^o barrido. En ambas líneas base se aprecia la señal correspondiente a un calibrado eléctrico de 25 μW de potencia.

de T_m son similares para ambas proteínas a pH 7.5, pero a pH 9.0 la T_m de CPB disminuye mucho más (en Pirofosfato 20 mM, pH 9.0 la diferencia de T_m entre ambas proteínas es de más de 10 °C). Los valores de ΔH de desnaturalización para cada proteína bajan tanto al aumentar el pH como la fuerza iónica.

Los valores de entalpía específica, Δh , son comparativamente mayores para la CPB que para la PCPB, en tendencia opuesta a los valores de T_m . En cuanto a los valores obtenidos para ΔC_p , hay una cierta dispersión en los valores. Es bien sabido que, en algunos casos, pequeñas deformaciones de la curva de $C_p(T)$ a ambos lados de la transición, producidas por efectos indeseados, producen pérdidas apreciables en la precisión con que normalmente se mide esta magnitud a partir de las extrapolaciones de la línea base. En general se obtienen valores similares con las dos proteínas, algo mayores para la PCPB (11 ± 6 kJ/K.mol) que para la CPB (7 ± 3 kJ/k.mol), aunque son bastante más cercanas entre sí las correspondientes magnitudes específicas (0.24 ± 0.13 J/K.g y 0.20 ± 0.09 J/K.g). Estos valores son aproximadamente la mitad de los obtenidos de representar ΔH frente a T_m (29 kJ/K.mol y 12 kJ/K.mol respectivamente).

La irreversibilidad de las transiciones encontradas hizo pensar en un control cinético del proceso de desnaturalización térmica. Este punto se confirmó con los experimentos a diferentes velocidades de barrido (Tabla 5.1.I). En la Figuras 5.1.2-5.1.5 se muestran las curvas de $C_p^{ex}(T)$ para las diferentes condiciones experimentales investigadas, a cuatro velocidades de barrido distintas, para las dos proteínas. Estas curvas han sido corregidas para la línea base instrumental, la línea base química y el tiempo de respuesta del calorímetro (ver Apartado 3.6.3). Puede comprobarse en todos los casos una fuerte dependencia de las transiciones con dicha velocidad de barrido (ver Tabla 5.1.I). Por tanto, la desnaturalización térmica de ambas proteínas está controlada cinéticamente, al menos en alguna extensión.

El modelo teórico más simple que tiene en cuenta esta posibilidad es el modelo cinético de dos estados (Sánchez-Ruiz et al., 1988a) (ver Apartado 4.2.1). Se ha utilizado este modelo para el análisis de las transiciones irreversibles obtenidas para ambas proteínas. La aplicación a la CPB y la PCPB de los métodos A y B del Apartado 4.2.1 para el cálculo de la energía de activación del proceso irreversible se muestra en las Figuras 5.1.6 y 5.1.7, para pH 7.5, en las condiciones experimentales indicadas. Es de destacar la óptima coincidencia entre los valores de k calculados de transiciones de DSC a diferentes velocidades

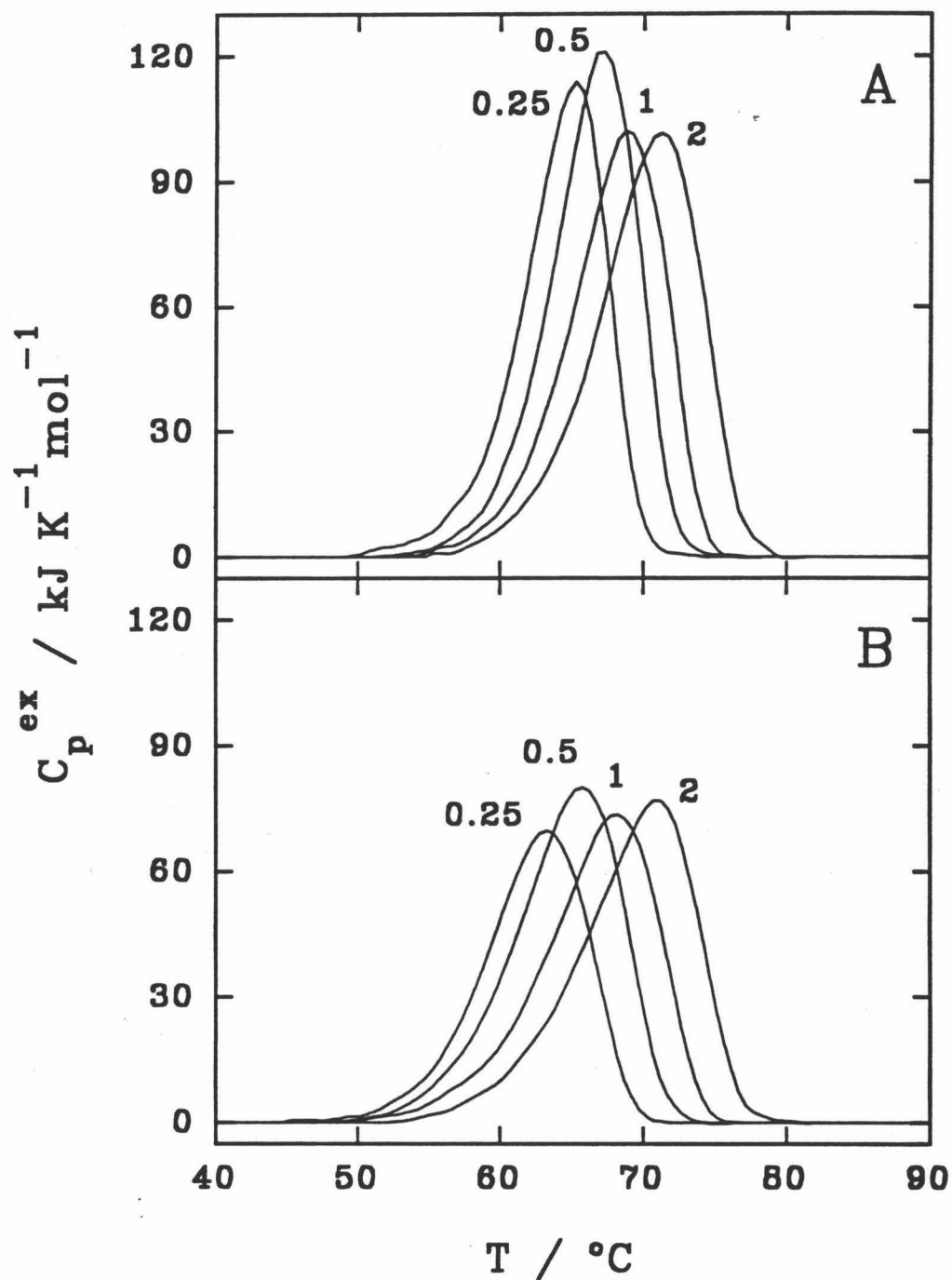


FIGURA 5.1.2: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas con (A) PCPB y (B) CPB en fosfato 1 mM, pH 7.5, a las velocidades de barrido indicadas junto a cada curva.

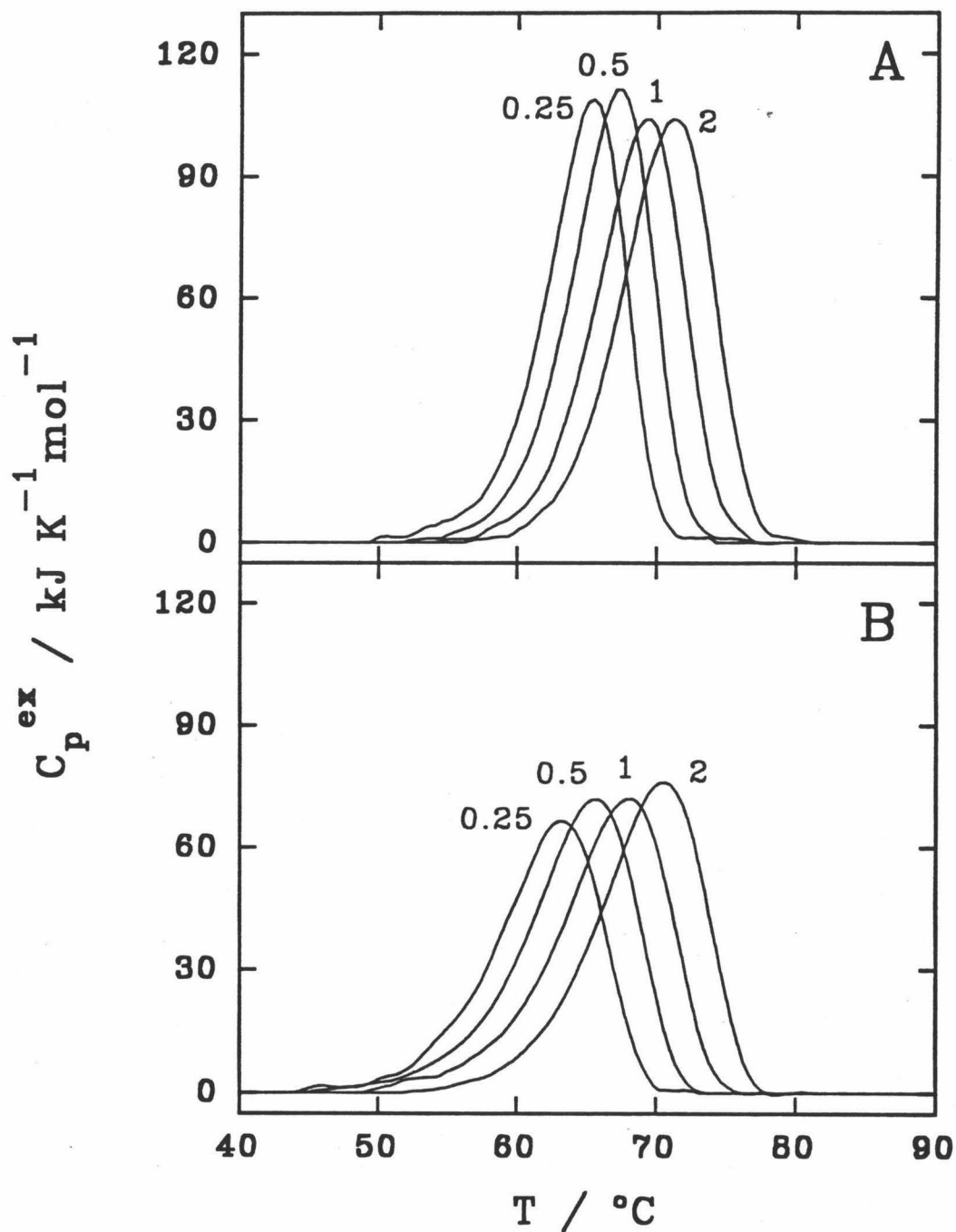


FIGURA 5.1.3: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas con (A) PCPB y (B) CPB en fosfato 20 mM, pH 7.5, a las velocidades de barrido indicadas junto a cada curva.

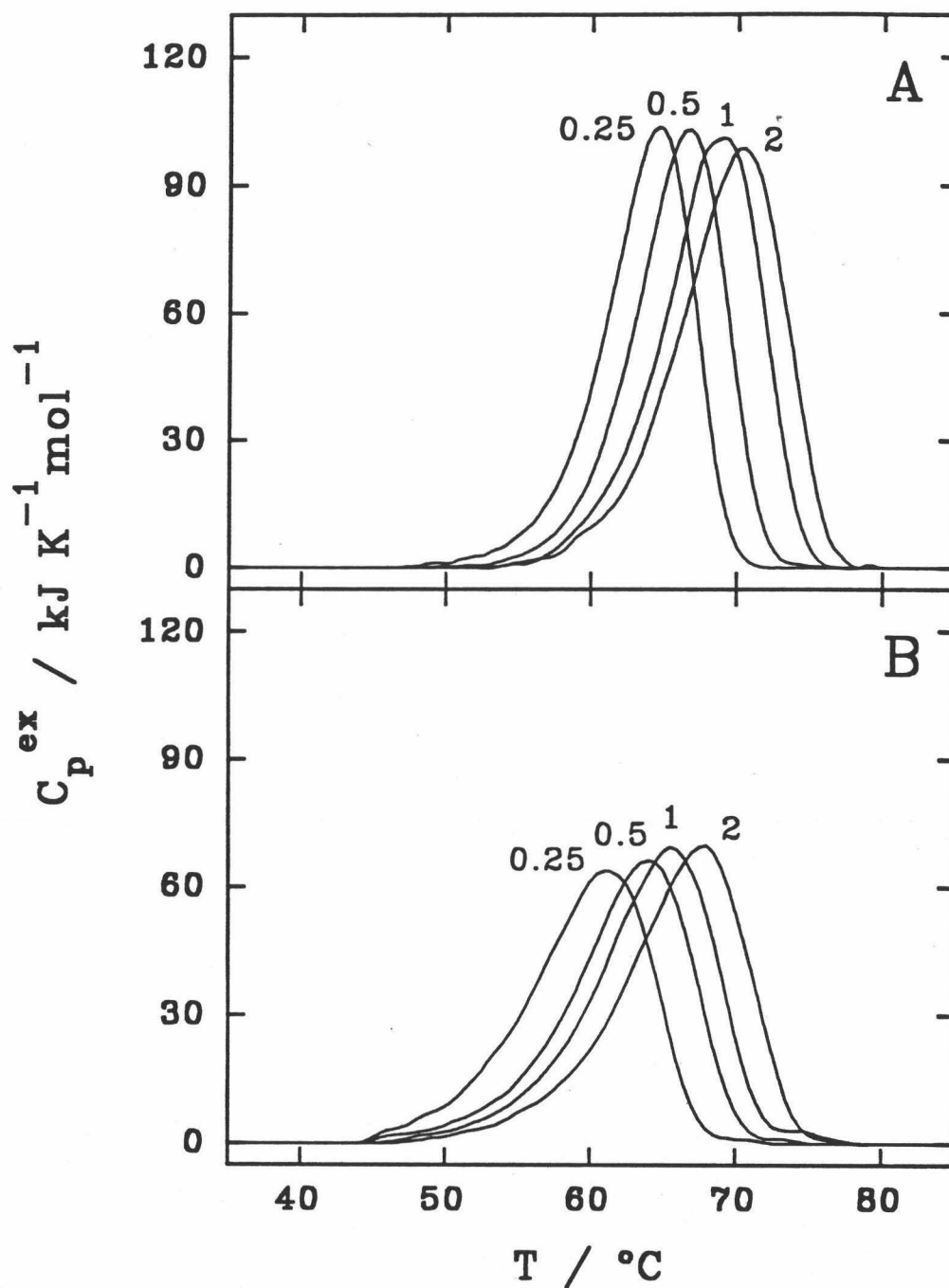


FIGURA 5.1.4: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas con (A) PCPB y (B) CPB en pirofosfato 1 mM, pH 9.0, a las velocidades de barrido indicadas junto a cada curva.

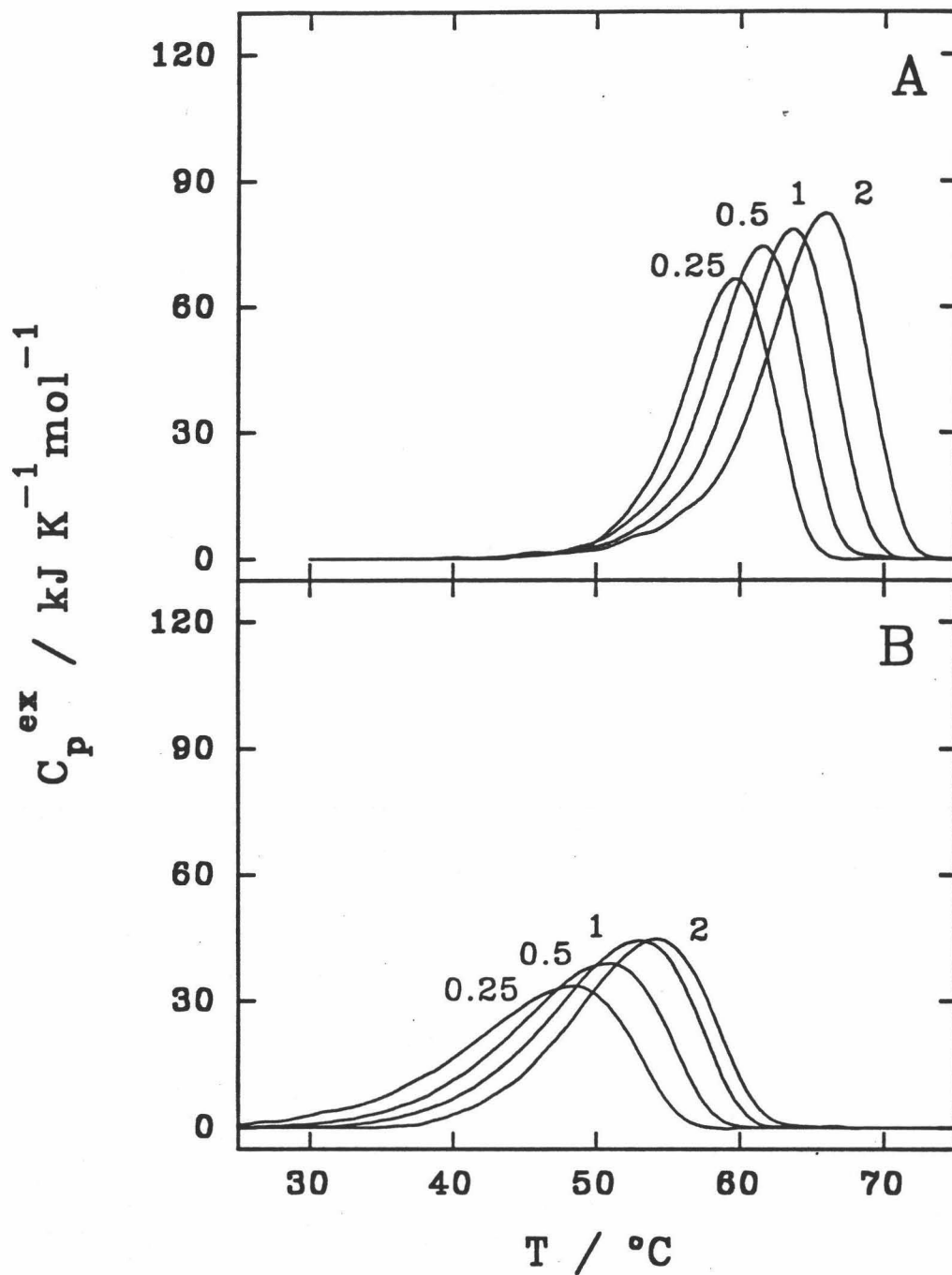


FIGURA 5.1.5: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas con (A) PCPB y (B) CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, a las velocidades de barrido indicadas junto a cada curva.

Tabla 5.1.I

Entalpías molares, ΔH , y específicas, Δh , incremento de capacidad calorífica, ΔC_p , y temperatura de desnaturalización, T_m , para PCPB y CPB en varias condiciones.

Condición	velocidad de barrido K/min	ΔH kJ/mol	Δh J/g	ΔC_p kJ/K.mol	T_m °C
Procarboxipeptidasa B					
Fosfato 1 mM pH 7.5	2	911	20	6.9	71.2
	1	840	19	17.0	68.9
	0.5	912	20	13.2	67.1
	0.25	827	18	18.4	65.3
Fosfato 20 mM pH 7.5	2	855	19	4.8	71.2
	1	815	18	9.8	69.3
	0.5	826	18	19.6	67.3
	0.25	786	17	11.2	65.4
Pirofosfato 1 mM pH 9.0	2	884	19	10.1	70.3
	1	858	19	17.0	69.0
	0.5	802	18	12.2	66.6
	0.25	785	17	15.6	64.6
Pirofosfato 20 mM pH 9.0	2	740	16	7.3	65.9
	1	679	15	9.6	63.6
	0.5	617	14	3.2	61.5
	0.25	524	12	0.2	59.6
Carboxipeptidasa B					
Fosfato 1 mM pH 7.5	2	758	22	4.1	71.0
	1	716	21	12.2	68.1
	0.5	746	21	6.8	65.7
	0.25	625	18	3.4	63.3
Fosfato 20 mM pH 7.5	2	719	21	7.2	70.5
	1	709	21	14.3	68.1
	0.5	696	20	10.7	65.7
	0.25	626	18	4.5	63.2
Pirofosfato 1 mM pH 9.0	2	717	21	3.6	67.8
	1	710	21	4.5	65.6
	0.5	672	19	3.5	64.0
	0.25	665	19	6.6	61.1
Pirofosfato 20 mM pH 9.0	2	526	15	4.3	54.2
	1	557	16	6.8	53.0
	0.5	510	15	5.3	50.8
	0.25	468	14	8.0	48.4

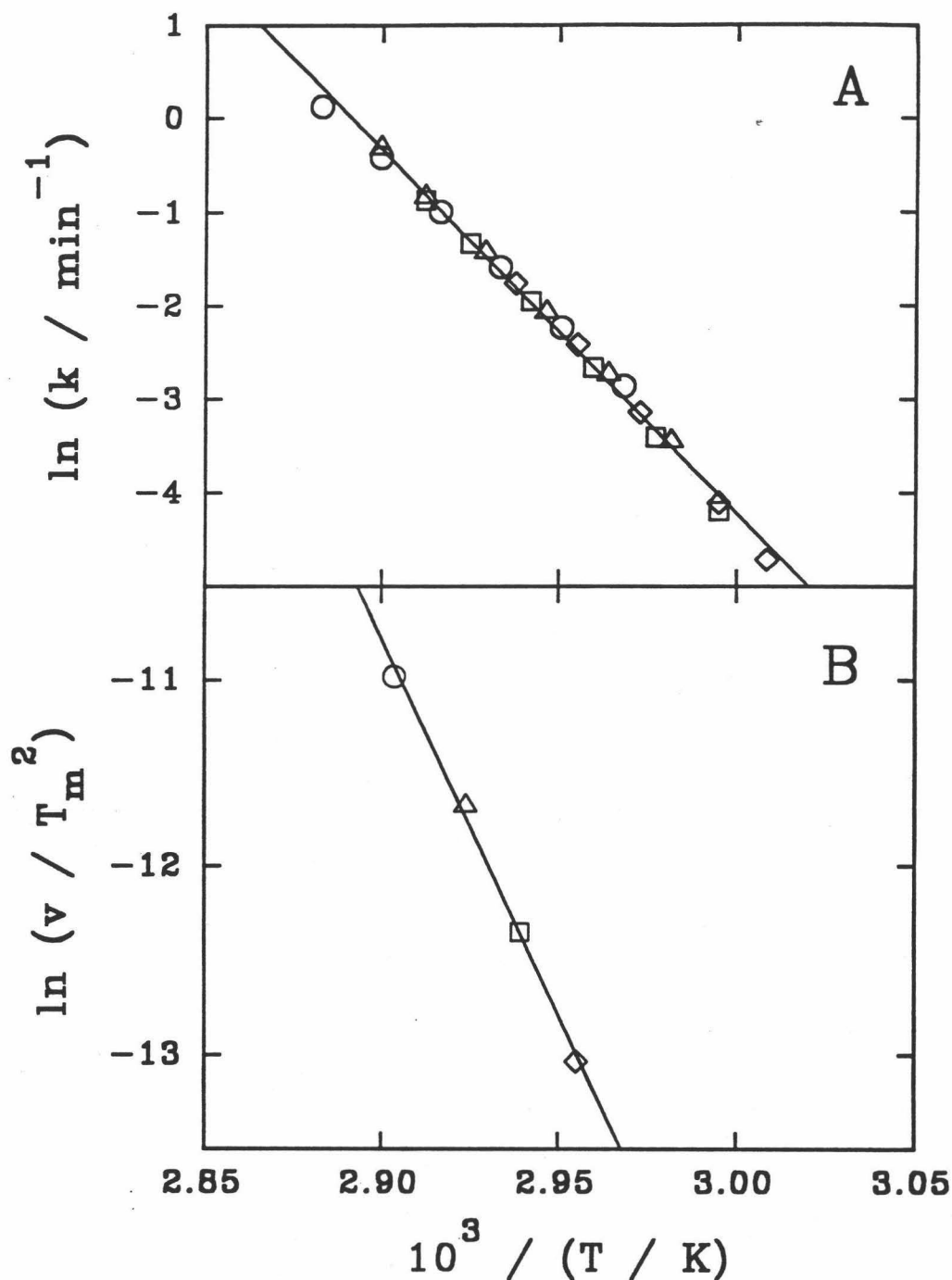


FIGURA 5.1.6: Aplicación del modelo cinético de dos estados a las curvas de $C_p^{\text{ex}}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la PCPB en fosfato 1 mM, pH 7.5 (Figura 5.1.2A). (A) Representación de Arrhenius (método A del modelo; ver Apartado 4.2.1). (B) Representación de $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ (método B del modelo). Los símbolos indican las diferentes velocidades de barrido: (○) 2.0 K/min; (Δ) 1.0 K/min; (□) 0.5 K/min; (◇) 0.25 K/min.

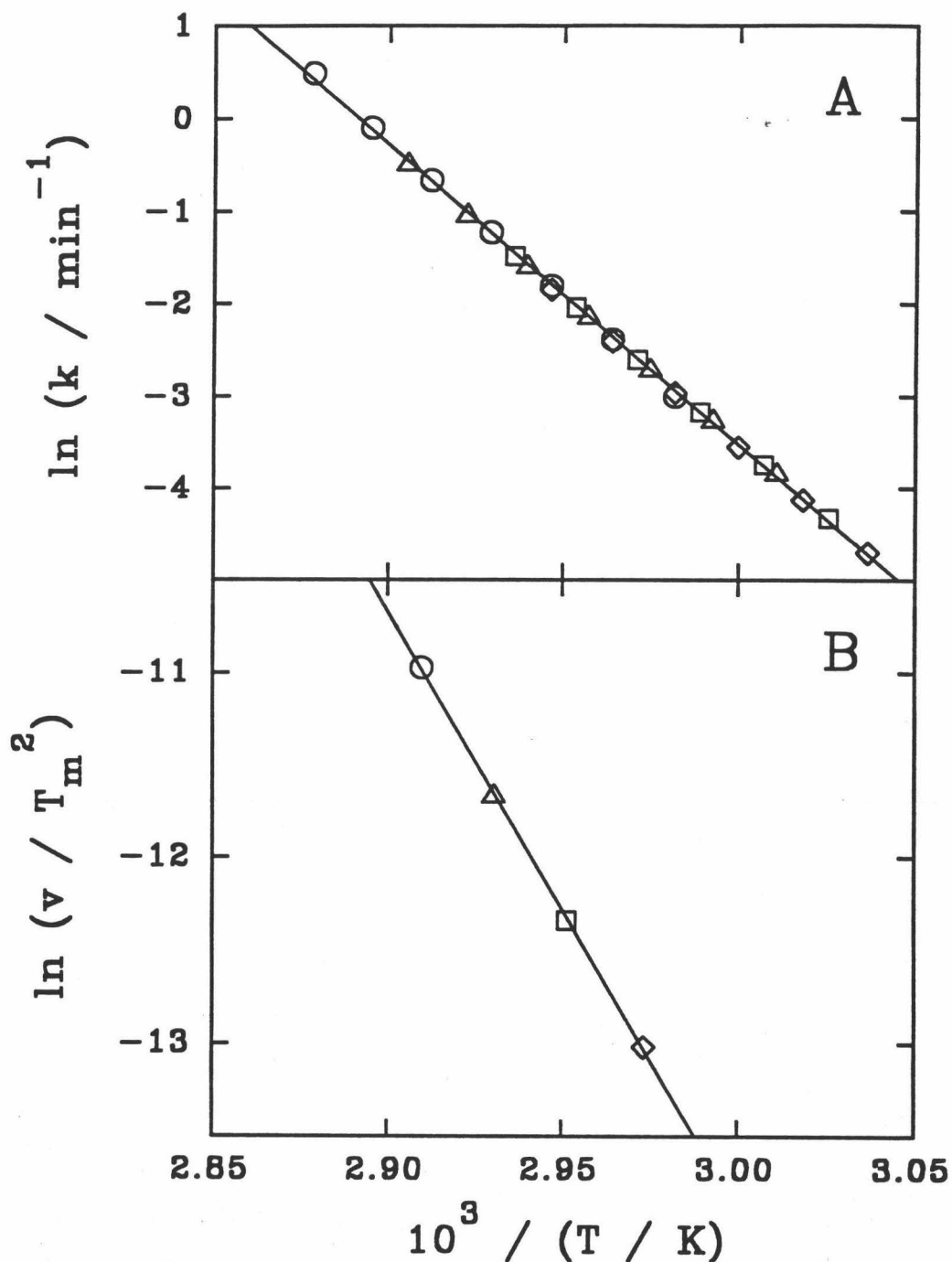


FIGURA 5.1.7: Aplicación del modelo cinético de dos estados a las curvas de $C_p^{\text{ex}}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en fosfato 20 mM, pH 7.5 (Figura 5.1.3B). (A) Representación de Arrhenius (método A del modelo; ver Apartado 4.2.1). (B) Representación de $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ (método B del modelo). Los símbolos indican las diferentes velocidades de barrido: (○) 2.0 K/min; (Δ) 1.0 K/min; (□) 0.5 K/min; (◇) 0.25 K/min.

de barrido. Los ajustes no lineales de mínimos cuadrados de las curvas teóricas de $C_p^{ex}(T)$ predichas por el modelo a las curvas experimentales (método E, Apartado 4.2.1) se muestran en la Figura 5.1.8, donde se puede apreciar la excelente predicción de los datos experimentales que hace el modelo. No se muestra la aplicación del método C por ser bastante equivalente al método E. Para las otras condiciones experimentales, cuyas representaciones no se muestran dado el elevado número de las mismas, los resultados obtenidos son similares, excepto en el caso de la CPB a pH 9.0, tanto en pirofosfato 1 mM como 20 mM. En la Figura 5.1.9 se muestra la aplicación de los métodos A y B del modelo para 20 mM pirofosfato, pH 9.0. Puede verse que en la representación de Arrhenius los valores de k no coinciden tan perfectamente como en las Figuras 5.1.6 y 5.1.7, para las diferentes velocidades de barrido. Aparentemente, el modelo predice correctamente la dependencia de T_m con v , aunque más adelante veremos que no existe concordancia entre los resultados obtenidos con los distintos métodos del modelo para CPB en pirofosfato 1 y 20 mM, pH 9.0. El ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la ecuación teórica a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ (Método E) es peor también en estas condiciones experimentales.

Las energías de activación del proceso cinético calculadas mediante los diferentes métodos deben coincidir si se cumple el modelo, cosa que ocurre, dentro de los errores experimentales, para la PCPB en todas las condiciones investigadas, y para la CPB a pH 7.5 en fosfato 1 mM y 20 mM. No ocurre así, sin embargo, para CPB en pirofosfato 1 y 20 mM, pH 9.0, lo cual corrobora el no cumplimiento del modelo cinético de dos estados como se comentó anteriormente. En la Tabla 5.1.II se muestran los valores de la energía de activación obtenidos para todas las condiciones experimentales investigadas. Puede apreciarse que, para CPB a pH 9.0, tanto en pirofosfato 1 mM como 20 mM del método B, del efecto de la velocidad de barrido en la T_m de las transiciones (método B), se obtiene un valor de energía de activación, E , diferente al obtenido de los demás métodos. Esta diferencia es mucho más evidente para pirofosfato 20 mM, pH 9.0.

En todas las condiciones experimentales investigadas, tanto la CPB como la PCPB desnaturalizan térmicamente de forma irreversible y cinéticamente controlada, pudiéndose describir el proceso en casi todos los casos mediante el modelo cinético de dos estados. Este comportamiento es similar al encontrado previamente para CPA y PCPA (López-Lacomba, 1987; Sánchez-Ruiz et al., 1988b). La presencia en el zimógeno del segmento de activación

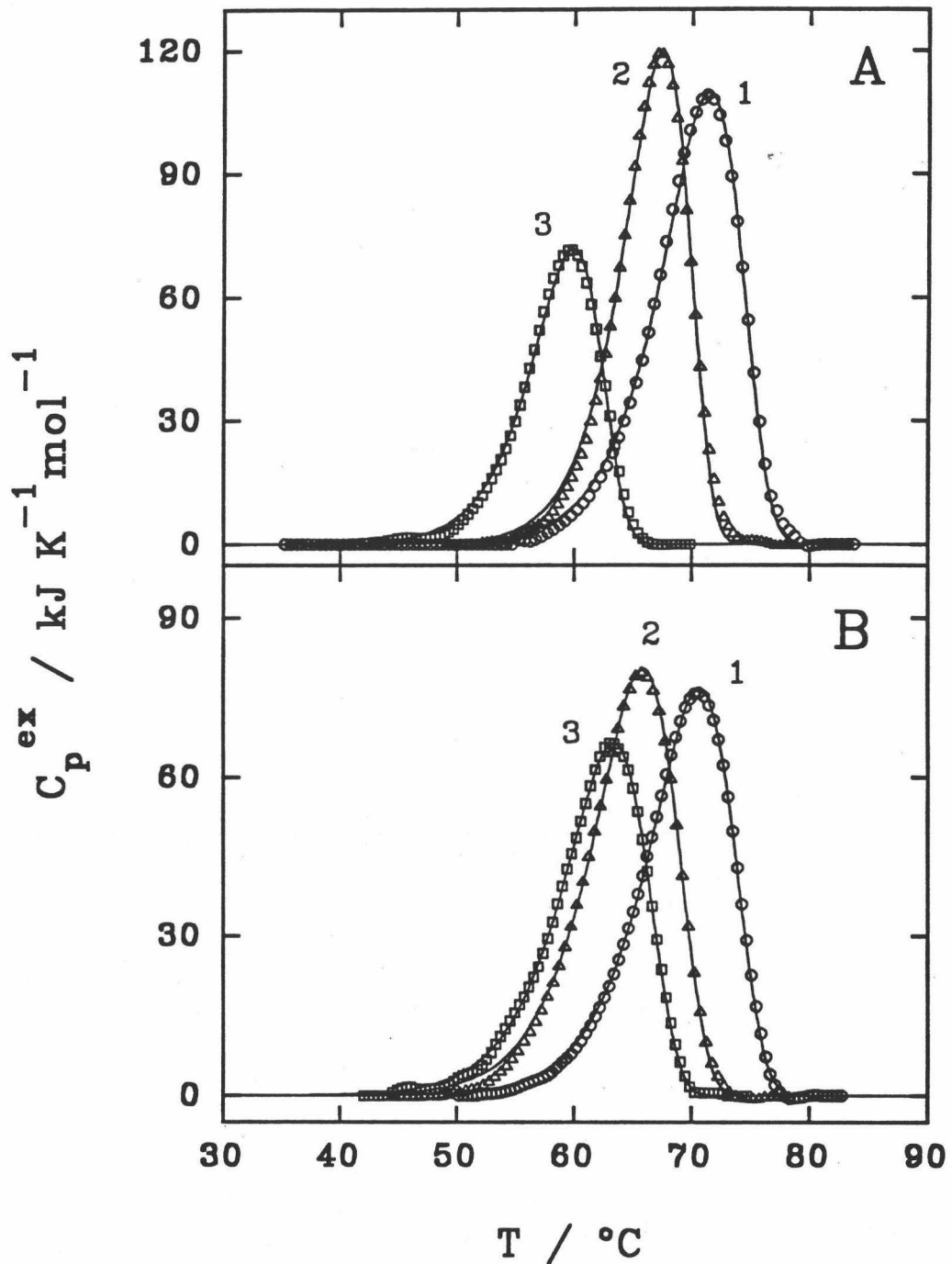


FIGURA 5.1.8: Ajustes no lineales de mínimos cuadrados de las curvas de $C_p^{ex}(T)$ predichas por el modelo cinético de dos estados a las curvas experimentales correspondientes a la desnaturalización térmica de la PCPB y la CPB (método E del modelo). (A) PCPB en (1) fosfato 20 mM, pH 7.5; (2) fosfato 20 mM, pH 7.5; (3) pirofosfato 20 mM, pH 9.0. (B) CPB en: (1) y (3) fosfato 20 mM, pH 7.5; (2) fosfato 1 mM, pH 7.5. Los símbolos indican las velocidades de barrido utilizadas: (O) 2.0 K/min; (Δ) 0.5 K/min; (□) 0.25 K/min.

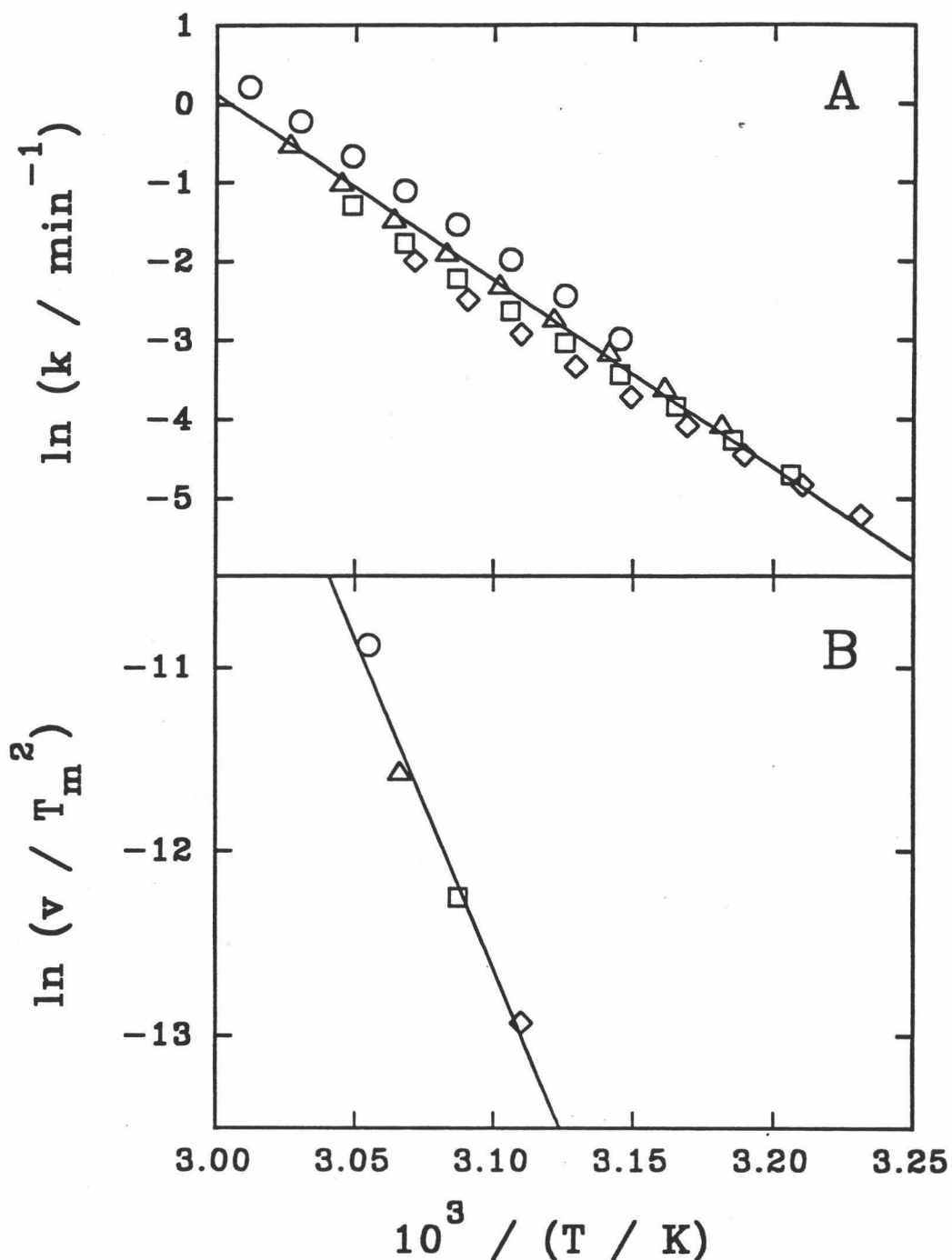


FIGURA 5.1.9: Aplicación del modelo cinético de dos estados a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0 (Figura 5.1.5B). (A) Representación de Arrhenius (método A del modelo; ver Apartado 4.2.1). (B) Representación de $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ (método B del modelo). Los símbolos indican las diferentes velocidades de barrido: (○) 2.0 K/min; (Δ) 1.0 K/min; (□) 0.5 K/min; (◇) 0.25 K/min.

no parece contribuir apreciablemente a su estabilidad térmica, a pesar de que, como veremos más adelante, el dominio de activación aislado (DAB) tiene una T_m mayor que ambas proteínas. Las entalpías específicas, Δh , de CPB y PCPB son también similares bajo las mismas condiciones experimentales indicando que el segmento de activación no introduce un efecto entálpico significativo en la PCPB. Los estudios de difracción de Rayos X indican que, en la PCPB porcina, la parte correspondiente a la enzima activa no difiere prácticamente de la CPB bovina aislada (Coll et al., 1991). La similitud de los parámetros de estabilidad térmica aquí encontrados para ambas proteínas podría estar en cierta consonancia con esta identidad estructural.

En el Apartado 4.2.1 se mencionó que el modelo cinético de dos estados, $N \rightarrow F$, es un caso particular del esquema más general propuesto por Lumry y Eyring, $N \rightleftharpoons U \rightarrow F$, (Lumry y Eyring, 1954), donde se propuso que las proteínas despliegan en equilibrio siendo el estado desplegado el que se altera por el proceso irreversible (ver Apartado 4.2.1).

Klibanov y colaboradores (Klibanov y Ahern, 1987, Volkin y Klibanov, 1989) han revisado recientemente los procesos conformacionales y covalentes responsables de la irreversibilidad de la desnaturalización térmica de las proteínas. Han encontrado que los procesos irreversibles de desnaturalización térmica de proteínas más frecuentes son:

a) Covalentes: Autólisis que suele ocurrir en desnaturalización térmica de proteasas. Hidrólisis de enlaces peptídicos adyacentes a restos de aspártico, que ocurre a valores de pH ligeramente ácidos. Formación incorrecta de puentes disulfuro así como su destrucción por β -eliminación de cistina catalizada por OH^- , que ocurre en condiciones ligeramente alcalinas. Deamidación de restos de asparagina y glutamina, que puede tener lugar a cualquier pH. Oxidación de aminoácidos, especialmente aromáticos, así como metionina, cistina y cisteína.

b) Conformacionales: Agregación por interacción inespecífica intermolecular de superficies hidrofóbicas de la proteína desplegada. Formación de estructuras incorrectamente plegadas cinética o termodinámicamente favorecidas frente al estado nativo. Estos procesos conformacionales pueden estar favorecidos por la formación de puentes disulfuro incorrectos o incluso intermoleculares en el caso de la agregación.

CPA y PCPA mostraron una fuerte turbidez después de los barridos de DSC a pH 7.5, por lo que se propuso que la agregación del estado desplegado fue la responsable de la

Tabla 5.1.II

Energías de activación ,E, en kJ/mol, calculadas según los 5 métodos del modelo cinético de dos estados para la desnaturalización térmica de PCPB y CPB en diferentes condiciones experimentales.

Condición	A	B	C	D	E
Procarboxipeptidasa B					
Fosfato 1 mM pH 7.5	322±26	334±16	345±24	330±26	323±27
					E media= 331±9
Fosfato 20 mM pH 7.5	328±17	341±3	361±5	344±15	338±17
					E media= 342±12
Pirofosfato 1mM, pH 9.0	312±20	337±27	335±18	320±20	314±21
					E media= 324±12
Pirofosfato 20 mM, pH 9.0	295±12	308±8	299±25	302±13	300±10
					E media= 301±5
Carboxipeptidasa B					
Fosfato 1 mM pH 7.5	267±8	255±8	286±14	276±6	271±5
					E media= 271±11
Fosfato 20 mM pH 7.5	266±8	267±3	275±13	272±7	271±6
					E media= 270±4
Pirofosfato 1 mM, pH 9.0	240±6	295±25	251±1	251±6	250±6
Pirofosfato 20 mM, pH 9.0	181±14	299±32	194±23	186±16	185±14

irreversibilidad encontrada (López-Lacomba, 1987). Sin embargo, en el caso de CPB y PCPB las disoluciones de proteínas estaban perfectamente claras, mostrando espectros UV-visible normales, sin el efecto de dispersión de luz observado en muestras con microagregados, por lo que se descartó la agregación como causa de la irreversibilidad. Tampoco la autólisis, frecuente en proteasas, o la rotura de enlaces peptídicos fueron detectadas en forma apreciable, a la vista de la electroforesis en presencia de SDS de las muestras, antes y después del calentamiento.

Los valores de energía de activación del proceso cinético mostrados previamente son mayores para el zimógeno que para la enzima activa. Ambos son comparables a los valores encontrados para otras proteínas como PCPA (300 ± 20 kJ/mol), CPA (250 ± 14 kJ/mol) (Sánchez-Ruiz et al, 1988b), termolisina (282 ± 8 kJ/mol) (Sánchez-Ruiz et al., 1988a), e incluso con una proteína estructuralmente muy diferente, la hemocianina (383 ± 30 kJ/mol) (Guzmán-Casado et al., 1990).

La razón de que CPB no siga el modelo cinético de dos estados a pH 9.0 parece estar relacionada con un interesante efecto del ion Zn^{2+} encontrado como consecuencia de estos primeros experimentos, que ha sido ampliamente estudiado en este trabajo y que será descrito más adelante en esta Memoria (ver Apartado 5.2). Este efecto consiste en la dependencia de las transiciones de DSC de CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, con la concentración de $ZnCl_2$ en el medio. En el Apartado 5.2 se volverá sobre este tema.

Por otra parte, dado que al incrementarse la concentración de pirofosfato de 1 mM a 20 mM la separación de la desnaturalización térmica de la CPB del modelo cinético de dos estados se hace más notoria, se hicieron experimentos de DSC con CPB en pirofosfato 50 mM, pH 9.0, para ver si aumentaba aún más este efecto al incrementarse la fuerza iónica. En la Figura 5.1.10 se muestran las curvas de $C_p^{ex}(T)$ a varias velocidades de barrido en estas condiciones, pudiéndose apreciar que disminuye aún más la estabilidad de la enzima. En la Figura 5.1.11 se muestra la aplicación de alguna de las predicciones del modelo cinético de dos estados en estas condiciones. En la Tabla 5.1.III se exponen los parámetros de las transiciones obtenidas así como los valores de energía de activación calculados.

En este caso, el proceso, que es de nuevo irreversible y cinéticamente controlado, se ajusta muy bien al modelo, coincidiendo los valores de k calculados para distintas velocidades de barrido (ver Figura 5.3.11A). Asimismo, el efecto de la velocidad de barrido en las

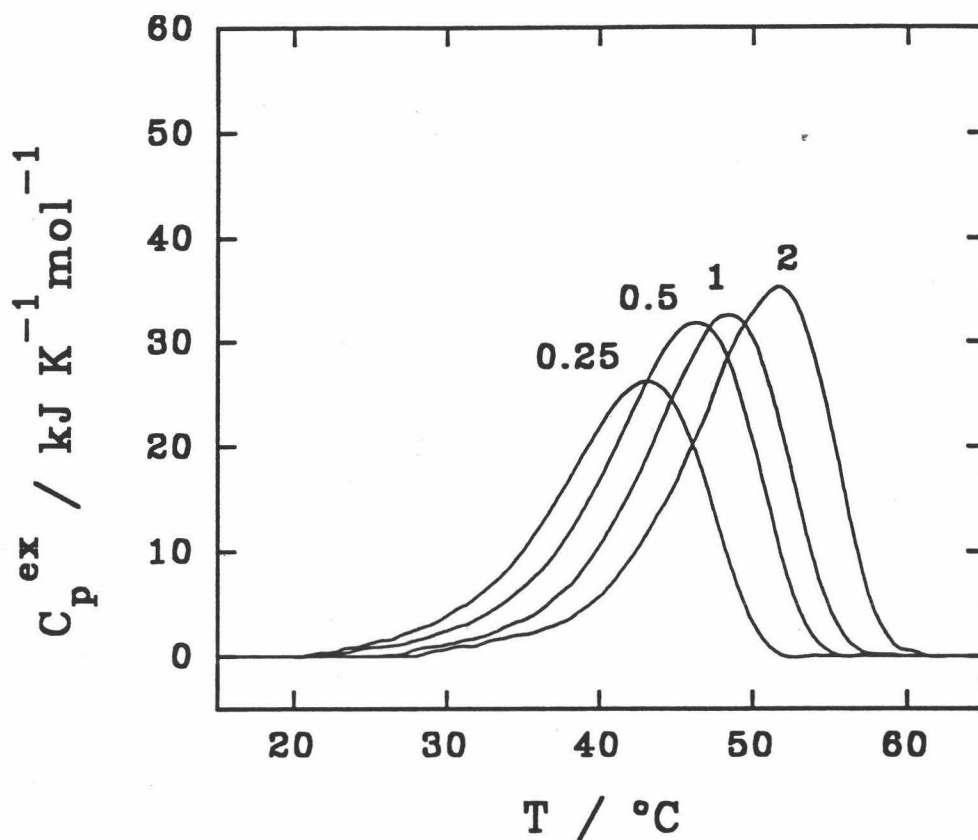


FIGURA 5.1.10: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas con CPB en pirofosfato 50 mM, pH 9.0, a las velocidades de barrido indicadas junto a cada curva.

transiciones da un valor de energía de activación igual al obtenido por los otros métodos. En relación con el hecho de que el proceso pase a describirse por el modelo cinético de dos estados al aumentar la fuerza iónica podría estar el hecho de que apareciera fuerte agregación en las muestras tras los barridos de DSC, cosa que no ocurría a fuerza iónica más baja. El cambio de naturaleza del proceso irreversible daría así lugar a cambios en el mecanismo del proceso de desnaturalización cuya nueva cinética seguiría el modelo que estamos utilizando.

Tabla 5.1.III

Parámetros de las transiciones de DSC obtenidas para CPB en pirofosfato 50 mM, pH 9.0 a varias velocidades de barrido y energías de activación en kJ/mol calculadas mediante aplicación del modelo cinético de dos estados.

Velocidad de barrido K/min	T _m °C	ΔH kJ/mol	Δh J/g	ΔC _p kJ/K.mol
2.02	51.6	403	11.6	8.1
1.01	48.3	376	10.9	5.8
0.5	46.2	390	11.3	6.2
0.25	43.0	321	9.3	3.7

Energías de activación					
A	B	C	D	E	Media
191±11	206	195±10	196±11	195±12	197±6

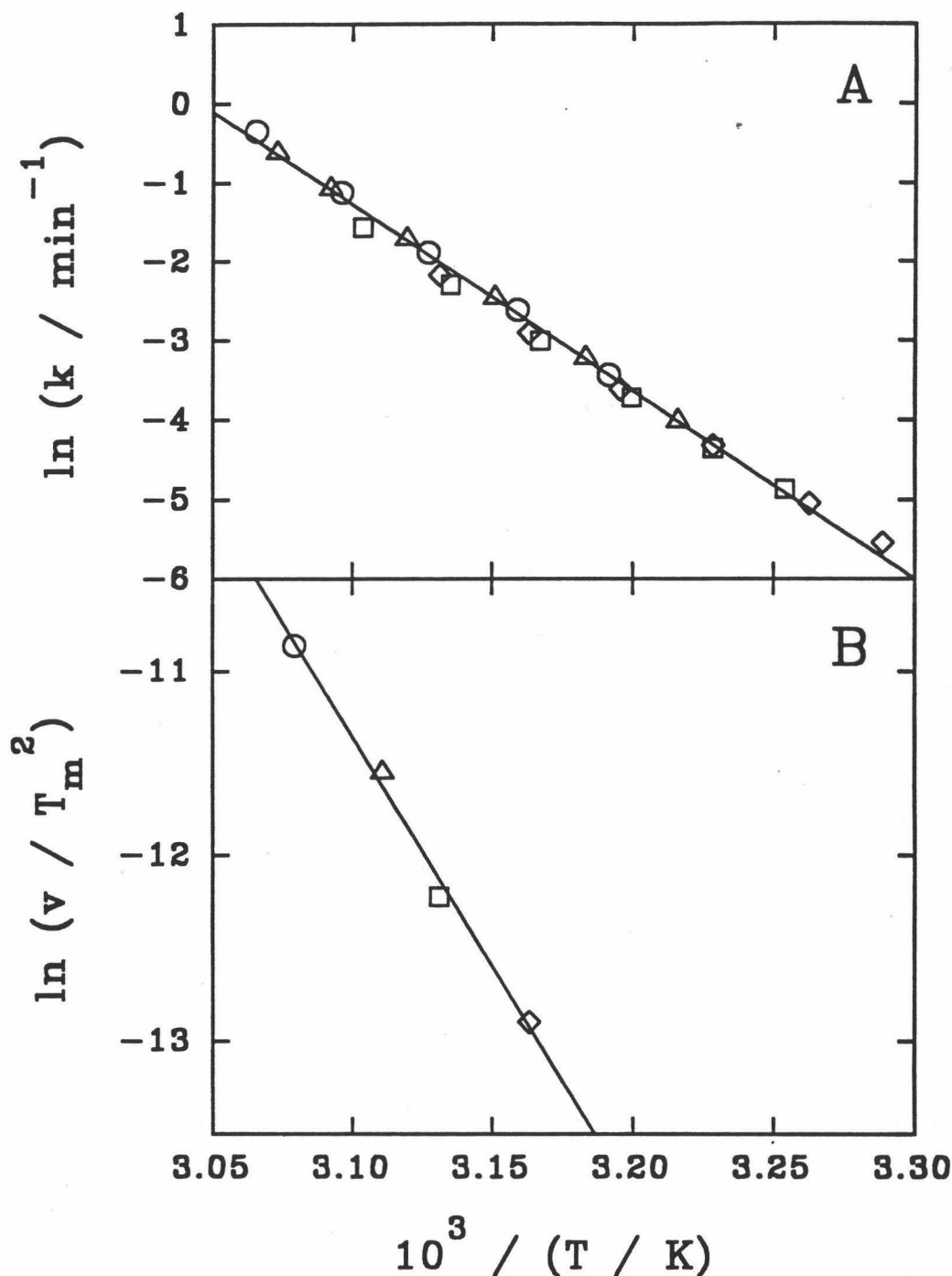


FIGURA 5.1.11: Aplicación del modelo cinético de dos estados a las curvas de $C_p^{\text{ex}}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 50 mM, pH 9.0 (Figura 5.1.10). (A) Representación de Arrhenius (método A del modelo; ver Apartado 4.2.1). (B) Representación de $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ (método B del modelo). Los símbolos indican las diferentes velocidades de barrido: (○) 2.0 K/min; (Δ) 1.0 K/min; (□) 0.5 K/min; (◇) 0.25 K/min.

5.1.2 Dominio globular de activación.

Se ha estudiado el desplegamiento térmico del dominio globular de activación de la PCPB (DAB) por DSC en las condiciones experimentales que se exponen en la Tabla 5.1.IV, variándose tanto el pH como la fuerza iónica. La velocidad de barrido empleada fue de 2 K/min, utilizándose concentraciones de muestra entre 1 y 1.6 mg/ml. En la misma Tabla se muestran los valores de los parámetros característicos de las transiciones obtenidas.

Tabla 5.1.IV

Temperatura de desplegamiento, T_m , entalpía calorimétrica molar, ΔH , relación entalpía calorimétrica/entalpía de van't Hoff, r , e incremento de capacidad calorífica, ΔC_p , para el desplegamiento térmico del dominio globular de activación de procarboxipeptidasa B (DAB) bajo diferentes condiciones experimentales.

Condición	T_m °C	ΔH kJ/mol	r	ΔC_p kJ/K.mol
Fosfato 1 mM, pH 7.5	73.6	313	1.4	2.9
Fosfato 20 mM, pH 7.5	74.2	299	1.1	3.0
Fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5	77.5	332	1.2	2.4
Pirofosfato 1 mM, pH 9.0	67.8	297	1.4	3.4
Pirofosfato 20 mM, pH 9.0	70.6	295	1.1	4.1
Pirofosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 9.0	74.2	300	1.0	3.8
Glicina 20 mM, pH 3.0	83.8	313	1.0	2.8

En la Figura 5.1.12 se muestran los registros originales de los experimentos de DSC realizados con el DAB, en dos de las condiciones investigadas. En las Figuras 5.1.13 y 5.1.14 se muestran los termogramas de $C_p(T)$, una vez restada la línea base instrumental, para todas las condiciones experimentales. Como se puede apreciar en las Figuras, el desplegamiento térmico del DAB es en casi todos los casos bastante reversible en un segundo barrido consecutivo, lo que se toma como indicación de que dicho proceso transcurre en equilibrio, incluso a pH 3.0, cercano al punto isoeléctrico del DAB, 4.3, aunque en este caso

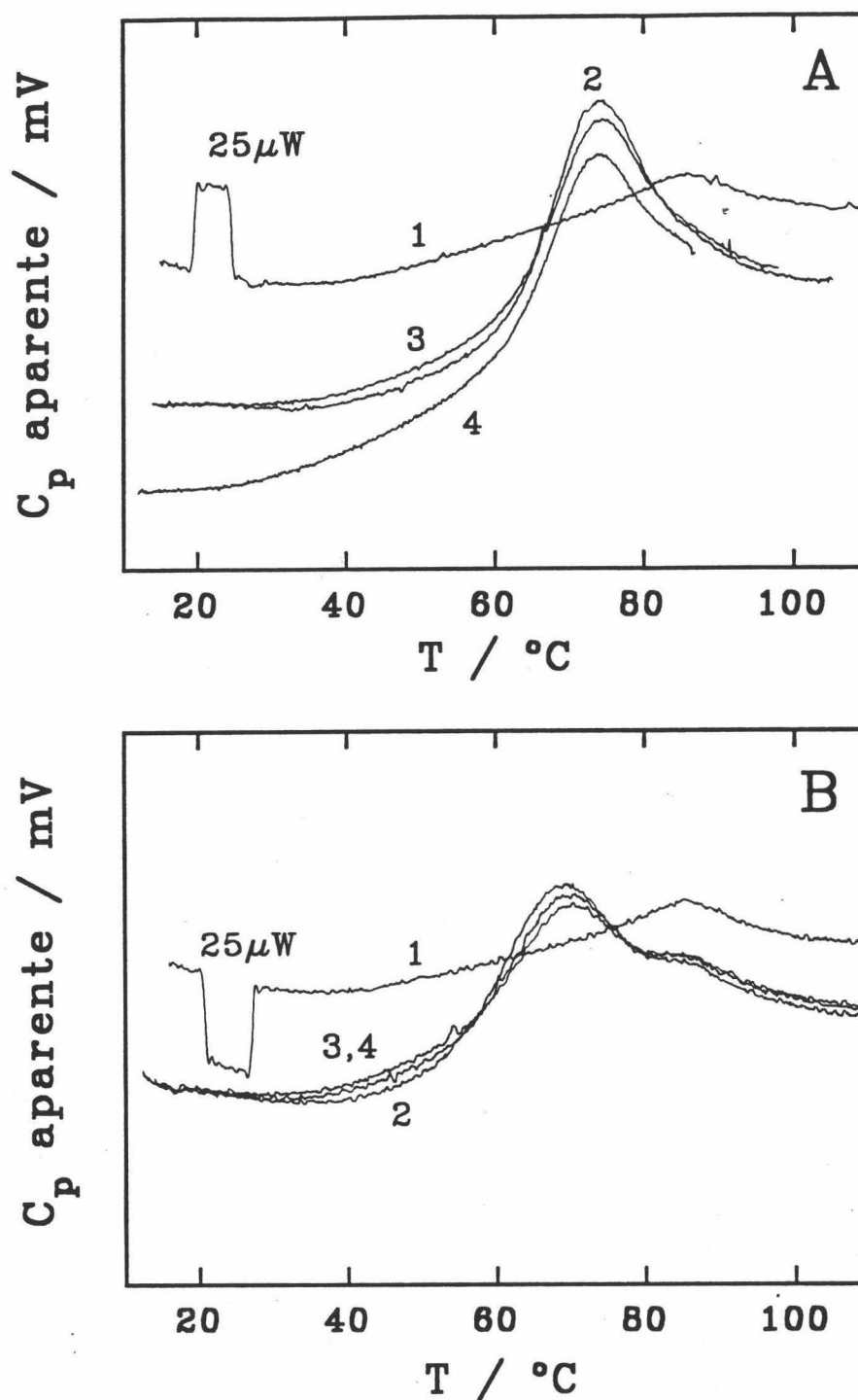


FIGURA 5.1.12: Registros experimentales de DSC obtenidos con DAB en: (A) fosfato 20 mM, pH 7.5, a una concentración de muestra de 1.5 mg/ml; (B) pirofosfato 1 mM, pH 9.0, a una concentración de muestra de 1.2 mg/ml. La velocidad de barrido utilizada fue de 2.0 K/min. Ambos registros constan de (1) línea base, (2) 1^{er} barrido con la muestra, (3) 2^o barrido y (4) 3^{er} barrido. En ambas líneas base se aprecia la señal correspondiente a un calibrado eléctrico de 25 μW de potencia.

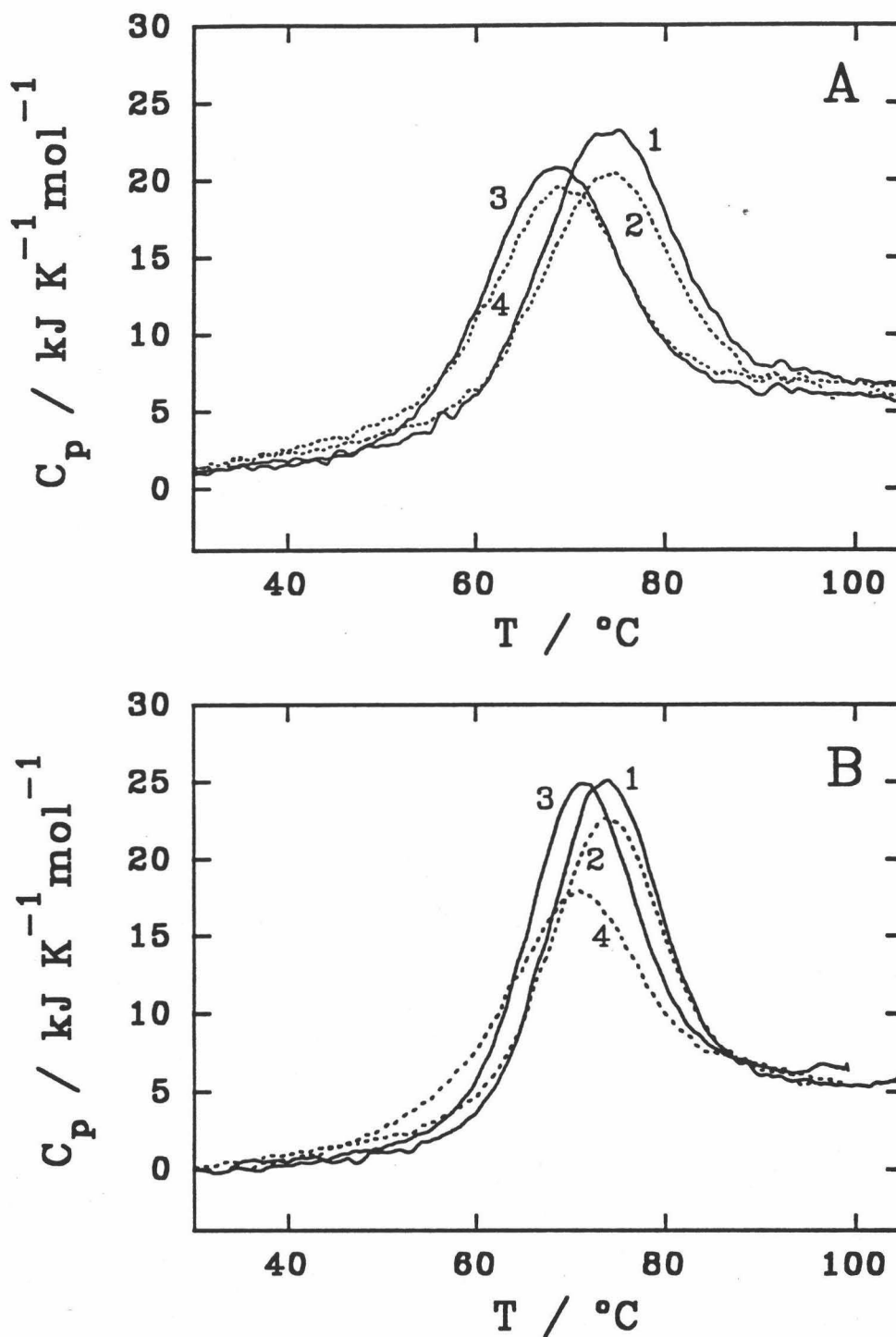


FIGURA 5.1.13: Curvas de $C_p(T)$, una vez restada la línea base instrumental, correspondientes al desplegamiento térmico del DAB en las siguientes condiciones experimentales: (A): (1) fosfato 1 mM, pH 7.5; (2) segundo barrido de (1); (3) pirofosfato 1 mM, pH 9.0; (4) segundo barrido de (3). (B): (1) fosfato 20 mM, pH 7.5; (2) segundo barrido de (1); (3) pirofosfato 20 mM, pH 9.0; (4) segundo barrido de (3).

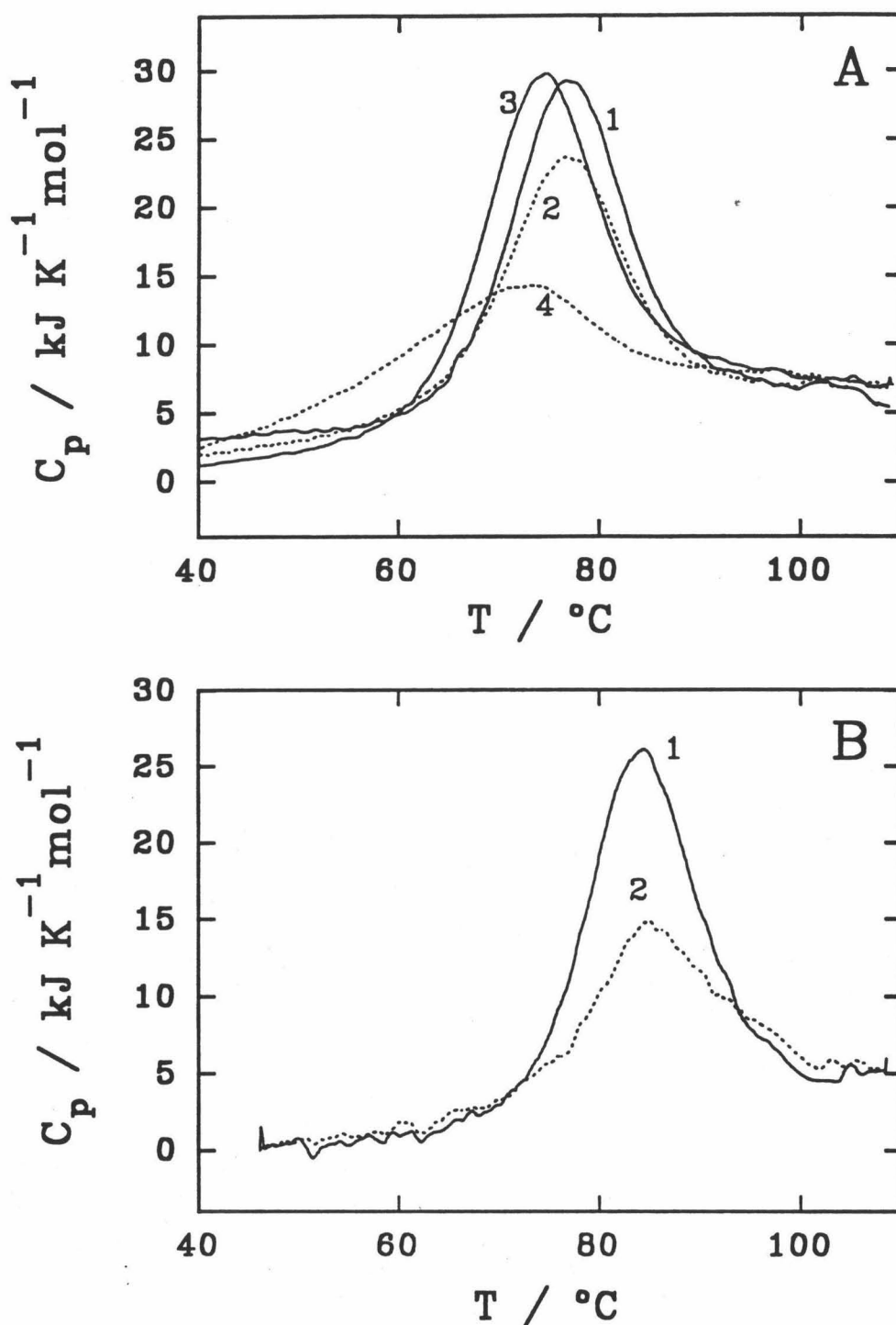


FIGURA 5.1.14: Curvas de $C_p(T)$, una vez restada la línea base instrumental, correspondientes al desplegamiento térmico del DAB en las siguientes condiciones experimentales: (A): (1) fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5; (2) segundo barrido de (1); (3) pirofosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 9.0; (4) segundo barrido de (3). (B): (1) Glicina 20 mM, pH 3.0; (2) segundo barrido de (1).

junto con pH 9.0 y alta fuerza iónica, la reversibilidad es más baja. No hay diferencia alguna en la T_m de la transición al realizar un segundo barrido con la misma muestra a una velocidad de barrido distinta, lo cual corrobora que el proceso es de equilibrio. No se ha encontrado en ningún caso evidencia de precipitación aparente de las muestras tras los barridos.

De los valores de la Tabla 5.1.IV se deduce que la estabilidad térmica del DAB, utilizando como parámetro operativo el valor de T_m correspondiente, disminuye al incrementarse el pH, para la misma concentración de tampón, siendo esta estabilidad térmica en todo caso superior a la encontrada para CPB y PCPB (ver Apartado 5.1.1), tal y como ocurría en el caso del segmento de activación de la PCPA (Sánchez-Ruiz et al., 1988b). Sin embargo, al aumentar la fuerza iónica del medio, para un mismo pH ocurre lo contrario, aumentan los valores de T_m .

Estos resultados confirman la existencia de una conformación plegada para el DAB en disolución acuosa en el amplio rango de pH investigado (3.0-9.0), como había sido previamente propuesto (Burgos, 1989) y ha sido posteriormente confirmado mediante estudios estructurales (Vendrell et al., 1991).

Los valores de r (relación entre la entalpía calorimétrica, ΔH^{cal} y la entalpía de van't Hoff, ΔH^{vH} , calculada con la ecuación 4.9) (Tabla 5.4.IV) indican que el proceso de desplegamiento se aproxima mucho al modelo de equilibrio de dos estados, comportándose el DAB como un único dominio cooperativo excepto a baja fuerza iónica (pH 7.5 y pH 9.0 a 1 mM de concentración de tampón) donde el valor de r es 1.4, claramente distinto a la unidad. Esto apunta la posibilidad de que a baja fuerza iónica existan estados intermedios estables y significativamente poblados durante el desplegamiento, como veremos más adelante.

Los valores de T_m encontrados para el DAB son en general menores que para el dominio de activación de la PCPA (Sánchez-Ruiz et al., 1988b). Este último tiene 94 restos de aminoácido frente a los 81 del DAB. Aunque la homología de las secuencias es de sólo un 31 % (Burgos et al., 1991), la estructura tridimensional de ambos fragmentos de activación, cuando están formando parte del zimógeno correspondiente es bastante similar, poseyendo el mismo motivo estructural aunque con pequeñas diferencias en los extremos N y C terminales y en algunos giros entre estructuras secundarias (Guash et al., 1992). Por ejemplo, el DAB pierde durante la activación de la PCPB la hélice α_3 que une ambos

fragmentos a la enzima activa, hélice que se conserva en dominio de activación A. Esta menor cantidad de estructura secundaria no se correlaciona aparentemente con un menor ΔH de desplegamiento sino con una T_m más baja (Sánchez-Ruiz et al., 1988b).

Los valores de entalpía específica encontrados para DAB (32-36 J/g) son comparables a los descritos por Privalov para proteínas globulares compactas de similar T_m (Privalov, 1979). El incremento de capacidad calorífica de desplegamiento tiene un valor medio de 0.34 ± 0.06 J/K.g, que de nuevo es similar a los de pequeñas proteínas compactas.

Excepto a 1 mM de concentración de ambos tampones, el desplegamiento térmico del DAB se comporta como un proceso de equilibrio de dos estados. En base a este modelo, como se describe en el Apartado 4.1.1, se ha obtenido la descripción termodinámica completa del proceso. En la Figura 5.1.15 se muestran las curvas experimentales de $C_p^{ex}(T)$ para algunas de las condiciones investigadas, junto con los ajustes de las curvas teóricas predichas por el modelo de equilibrio de dos estados. Estos datos corresponden a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ una vez restada la línea base química (ver Apartado 3.6.3 y 4.1.1). Los ajustes han sido excelentes para todas las condiciones en que se aplicó el modelo. Conocido el incremento de capacidad calorífica del proceso, ΔC_p , puede obtenerse, para cualquier condición experimental, una representación de la variación de las funciones termodinámicas del proceso de desplegamiento, ΔG , ΔH y ΔS , con la temperatura (ver Ecuaciones 4.10, Apartado 4.1.1). A modo de ilustración, esto se representa en la Figura 5.1.16 para el DAB en fosfato 20 mM, pH 7.5. A 37 °C, temperatura fisiológica, el valor de la energía de Gibbs de desplegamiento, para todas las condiciones investigadas, varía entre 23 y 29 kJ/mol, valores similares a los descritos para varias proteínas globulares compactas (Privalov, 1979).

En condiciones de baja fuerza iónica, 1 mM de concentración de tampón, a pH 7.5 y 9.0, se ha encontrado un valor de $r=1.4$. Como se menciona en el Capítulo 4, esto indica la presencia de estados intermedios suficientemente poblados durante el desplegamiento térmico. Esto podría resultar llamativo dado lo que hoy se conoce para cadenas polipeptídicas del pequeño tamaño del DAB. Las endotermas de DSC no pueden ajustarse en este caso a un modelo de dos estados lo cual hace necesario emplear un modelo más complejo para explicar los datos. De hecho, utilizando un modelo de equilibrio con un estado intermedio, $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons D$, se logra un excelente ajuste de la curva teórica a los datos experimentales. Esto se muestra en la Figura 5.1.17 para las dos condiciones experimentales citadas. En la

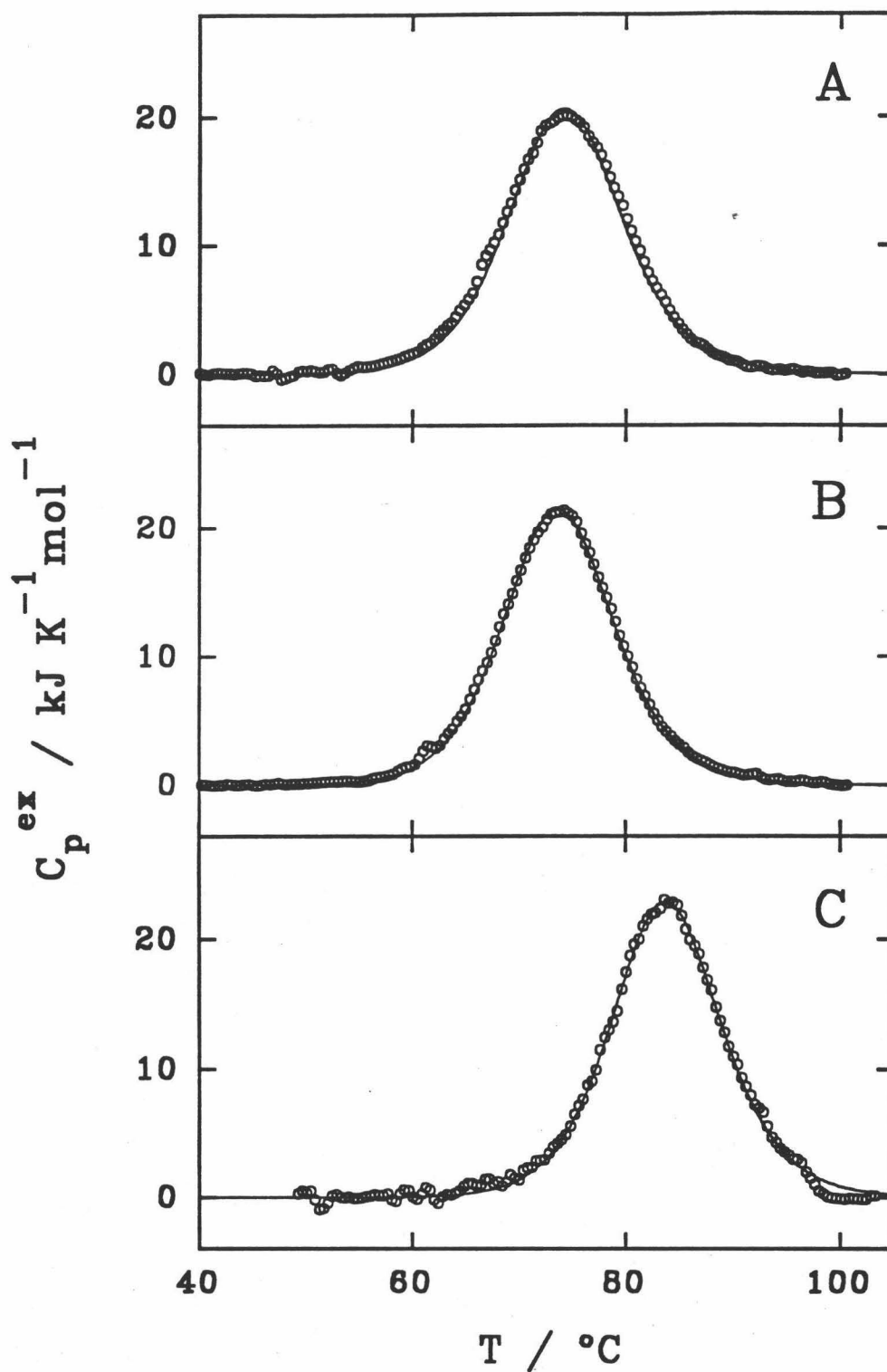


FIGURA 5.1.15: Ajustes no lineales de mínimos cuadrados de la curvas de $C_p^{ex}(T)$ predichas por el modelo de equilibrio de dos estados (—) a las curvas experimentales (○) correspondientes al desplegamiento térmico del DAB en las siguientes condiciones: (A) fosfato 20 mM, pH 7.5. (B) pirofosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 9.0; (C) glicina 20 mM, pH 3.0.

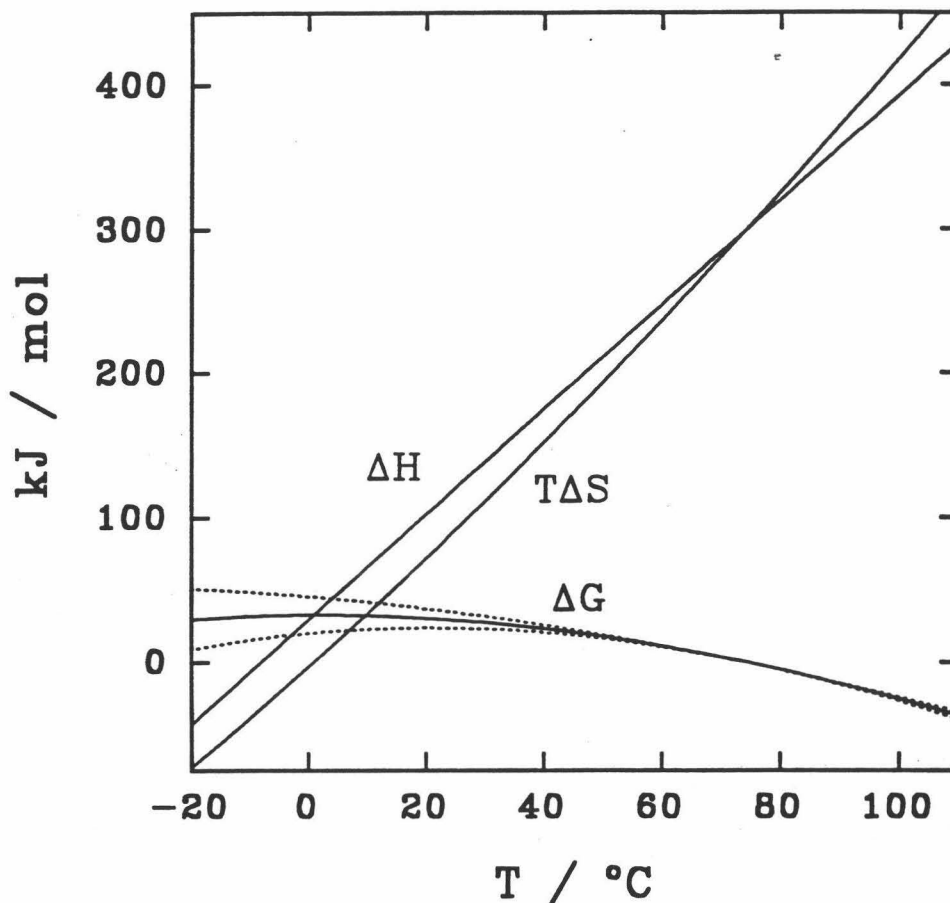


FIGURA 5.1.16: ΔG , ΔH y $T\Delta S$ en función de la temperatura para el desplegamiento térmico del DAB en fosfato 20 mM, pH 7.5, calculados mediante las ecuaciones 4.10 (Apartado 4.1.1), a partir de los valores de la Tabla 5.1.IV. Las líneas de puntos representan la incertidumbre en el cálculo de ΔG debida al error en la determinación del ΔC_p de desplegamiento ($\Delta C_p = 3.2 \pm 0.6 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

Figura 5.1.18 se representan las poblaciones de los estados implicados en el proceso de desplegamiento en función de la temperatura, calculadas a partir de los parámetros obtenidos en los ajustes. Como se observa, la estabilidad del estado plegado y del intermedio es algo mayor a pH 7.5 que a 9.0. En la Tabla 5.1.V se muestran los parámetros termodinámicos de los estados citados para el desplegamiento térmico del DAB.

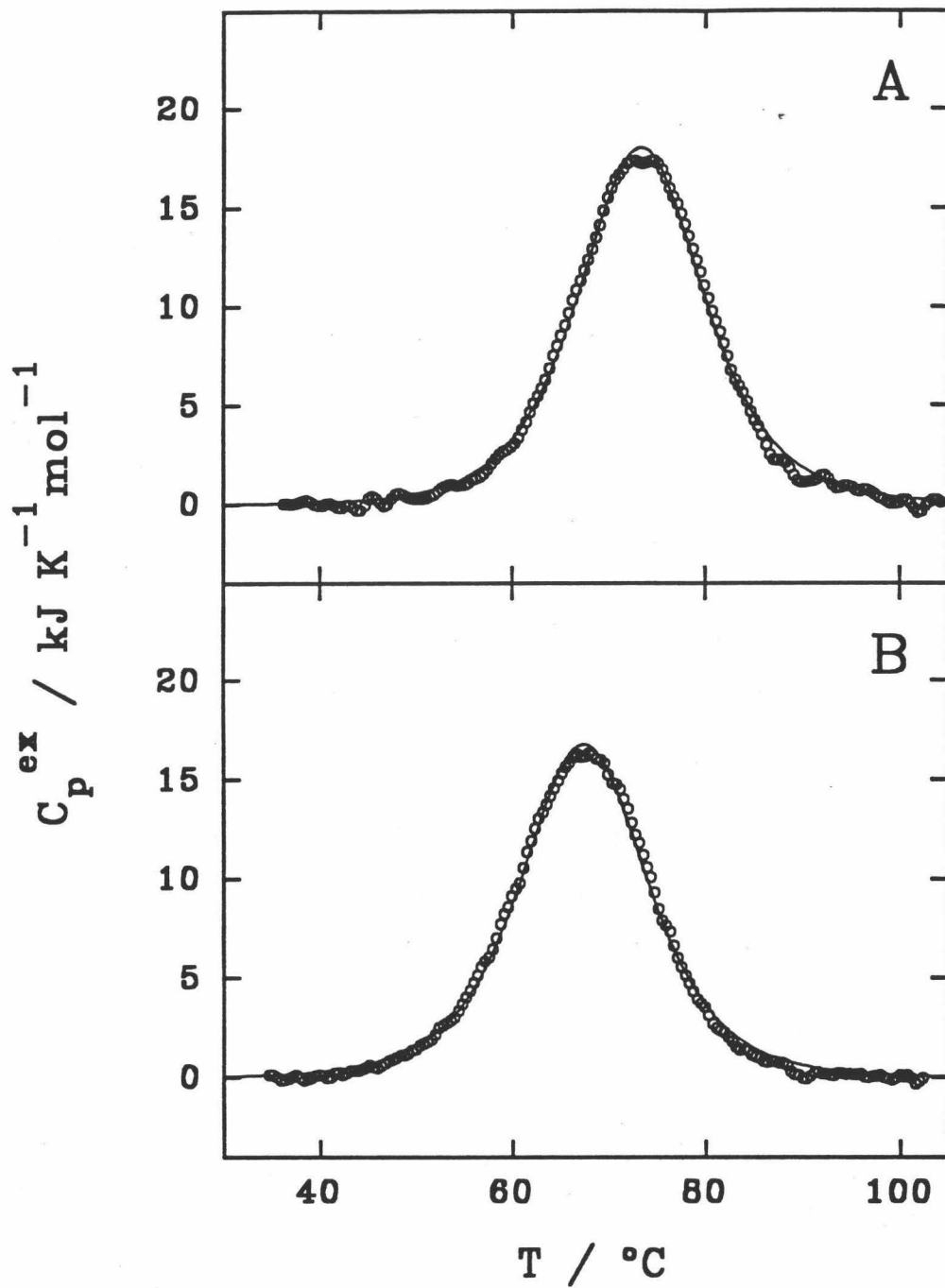


FIGURA 5.1.17: Ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la curva de $C_p^{ex}(T)$ predicha por el modelo de equilibrio de tres estados, $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons D$, (—) a las curvas experimentales (O) correspondientes al desplegamiento térmico del DAB en las siguientes condiciones: (A) fosfato 1 mM, pH 7.5; (B) pirofosfato 1 mM, pH 9.0.

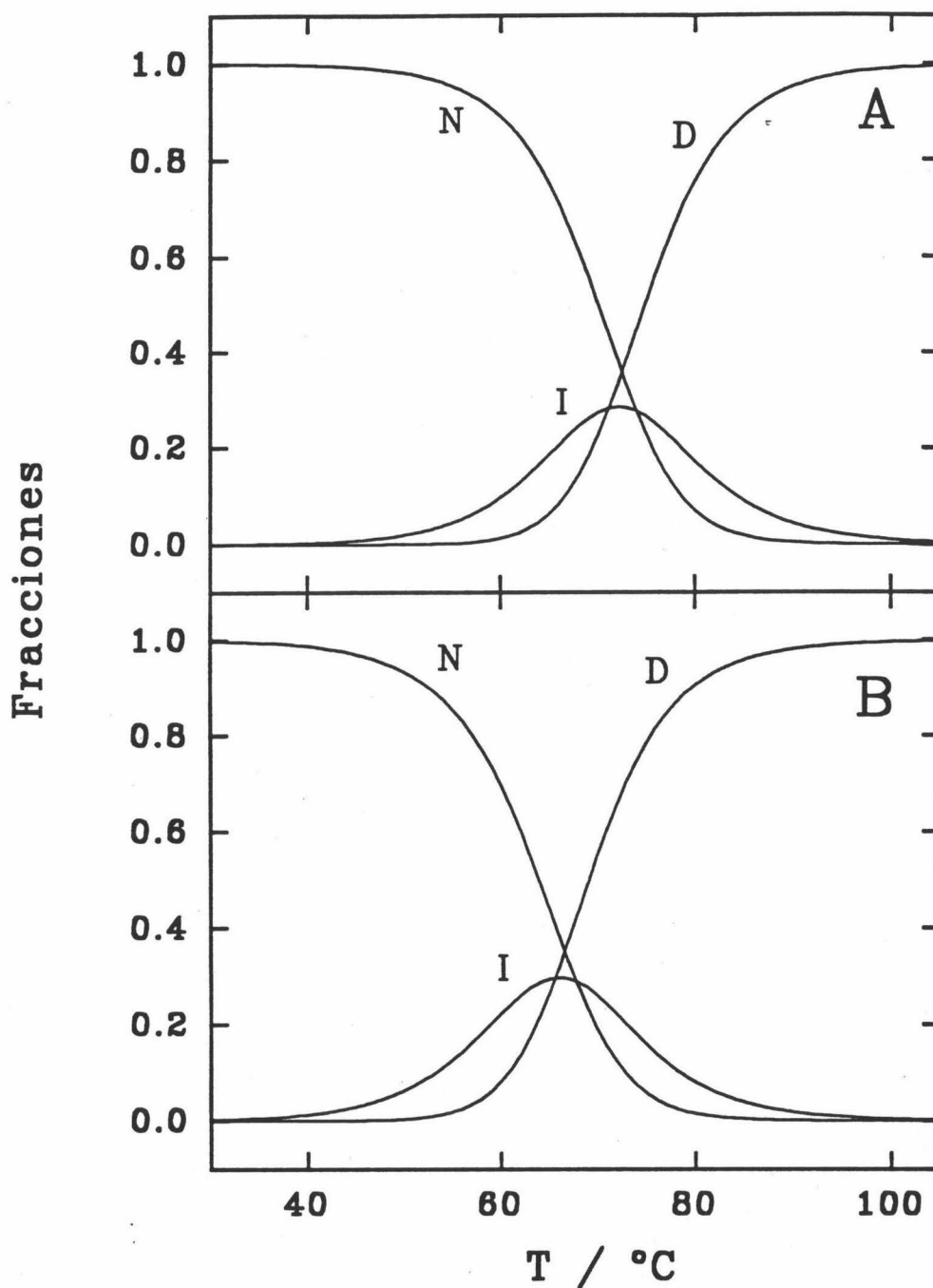


FIGURA 5.1.18: Poblaciones de los estados implicados en el desplegamiento térmico del DAB, en (A) fosfato 1 mM, pH 7.5 y (B) pirofosfato 1 mM, pH 9.0, en función de la temperatura, calculadas a partir de los parámetros termodinámicos obtenidos del ajuste de la Figura 5.1.17, que se muestran en la Tabla 5.1.V. N representa el estado nativo, I un estado intermedio y D el estado desplegado.

Tabla 5.1.V

ΔH_i y ΔS_i a $T=T_m$ de los estados implicados en el desplegamiento térmico del DAB, tomando el estado nativo, N, como referencia.

Condición	Estado I		Estado D	
	ΔH_1 kJ/mol	ΔS_1 J/K.mol	ΔH_2 kJ/mol	ΔS_2 J/K.mol
fosfato 1 mM, pH 7.5	152	438	322	931
pirofosfato 1 mM, pH 9.0	138	405	306	901

El DAB es una cadena polipeptídica ácida, que contiene 19 restos ácidos, Glu o Asp, (24 % del total) frente a 7 restos básicos, Lys o Arg (Burgos, 1989). La estructura tridimensional del DAB consiste en 2 hélices α y una hélice 3_{10} dispuestas sobre una estructura β antiparalela. Existe un cuerpo hidrofóbico en el interior (Vendrell et al., 1990; Vendrell et al. 1991; Coll et al. 1991) (ver Capítulo 2, Figura 2.3). La distribución de los restos de aminoácidos cargados no es regular sino que hay mayor densidad de restos ácidos en las hélices, mientras que los básicos se encuentran en o cerca de la estructura β (Vendrell et al., 1991). A pH 7.5, y aún más a pH 9.0, puede producirse repulsión entre las hélices α debido a los restos ácidos cargados negativamente, lo que explicaría la disminución de estabilidad del DAB al aumentar el pH. Esta repulsión disminuiría al incrementarse la fuerza iónica del medio aumentando la estabilidad. A bajo pH la repulsión de cargas es menor aumentando con ello la T_m . El hecho de que el estado intermedio sólo se manifieste a baja fuerza iónica podría estar relacionado también con este mismo efecto. El aumento de la temperatura podría comenzar afectando al plegamiento de las hélices α , que se repelen más a baja fuerza iónica por estar menos apantalladas las cargas, mientras que la estructura β , más rígida, sería más resistente al desplegamiento térmico. Como apoyo a esta idea es de destacar, de los valores reflejados en la Tabla 5.1.V, que $\Delta H_2 - \Delta H_1 \approx 170$ kJ/mol y $\Delta S_2 - \Delta S_1 \approx 495$ J/K.mol son independientes del pH, mientras que ΔH_1 y ΔS_1 sí que dependen del pH. Esto podría indicar que la primera etapa del desplegamiento está afectada principalmente por efectos electrostáticos, posiblemente la anteriormente mencionada repulsión entre las cargas negativas que se incrementa al aumentar el pH. Este efecto probablemente sea desestabilizante del estado nativo, ya que las diferencias de entalpía y

entropía entre el estado desnaturalizado, D, y el intermedio, I, son constantes con el pH.

5.1.3 Mezclas equimolares de carboxipeptidasas A y B y sus dominios globulares de activación.

En el Capítulo 2 se describió que el dominio de activación de la carboxipeptidasa A interaccionaba con la enzima activa inhibiéndola fuertemente (San Segundo et al., 1982). Esta inhibición no ha sido encontrada sin embargo en el caso de la carboxipeptidasa B (Vendrell et al., 1990a). Con el fin de confirmar mediante DSC estos datos y dado que el estudio mediante DSC de interacciones proteína-proteína es prácticamente inédito hasta la fecha, se abordaron unos experimentos preliminares utilizando mezclas equimolares CPB-DAB y de sus homólogos correspondientes del sistema A.

La preparación de las mezclas equimolares fue como sigue:

-Se prepara una disolución de PCPA o PCPB de la concentración deseada en Tris 50 mM, $ZnCl_2$ 10^{-5} M, pH 7.5, como se describe en el Capítulo de Materiales y Métodos. Se prepara también una disolución de tripsina (3 mg/ml) en HCl 1 mM, $CaCl_2$ 1mM. Se añade a la disolución de proteína a cortar una proporción en peso de tripsina de 1:40 en el caso de la PCPA, y de 1:100 para la PCPB. Se incuba la mezcla en un baño a 25 °C durante 15 minutos, agitando un poco de vez en cuando. Pasado ese tiempo se para la reacción añadiendo un poco de resina de benzamidina-agarosa que retira la tripsina. Se centrifuga y se elimina la resina. Para más seguridad se añade BPTI (inhibidor de tripsina de páncreas bovino) 1:1 en peso de tripsina que inhibirá las trazas de tripsina que queden en la disolución. La mezcla se dializa frente al tampón deseado en bolsas de diálisis de tamaño de poro adecuado (3 kDa) para la realización del experimento de DSC correspondiente. Se realizó SDS-PAGE de las muestras para comprobar que el corte fue completo.

La medida de concentración de las muestras se realizó espectrofotométricamente antes del corte trípico utilizando el coeficiente de extinción de la proenzima correspondiente, por lo que la concentración está referida a PCPA o PCPB según el caso. En el caso de la PCPA se utilizó un $\epsilon^{0.1\%} = 1.55$ a 280 nm (López-Lacomba, 1987). Los experimentos de DSC se realizaron en fosfato 20 mM, pH 7.5 y en pirofosfato 20 mM, pH 9.0.

En la Figura 5.1.19 se muestran los termogramas obtenidos para la mezcla CPB-DAB en las dos condiciones experimentales estudiadas. En la Figura 5.1.20 se exponen los

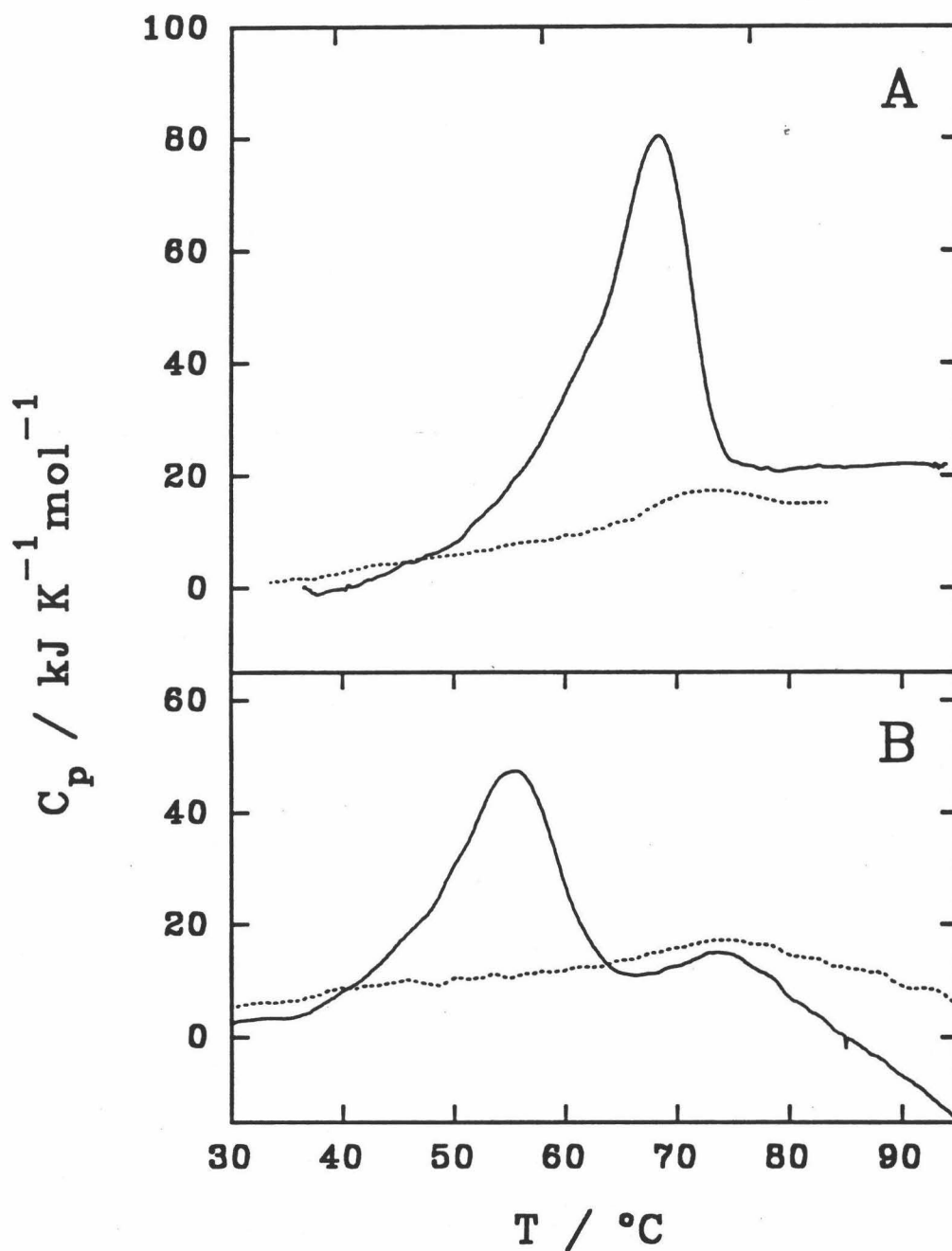


FIGURA 5.1.19: Curvas de $C_p(T)$, una vez restada la línea base instrumental, obtenidas para una mezcla equimolar de CPB y DAB, a una velocidad de barrido de 2 K/min, en las siguientes condiciones y concentraciones de muestra: (A) fosfato 20 mM, pH 7.5, $C = 2.0$ mg/ml; (B) pirofosfato 20 mM, pH 9.0, $C = 2.1$ mg/ml. (—) 1^{er} barrido; (.....) 2^o barrido.

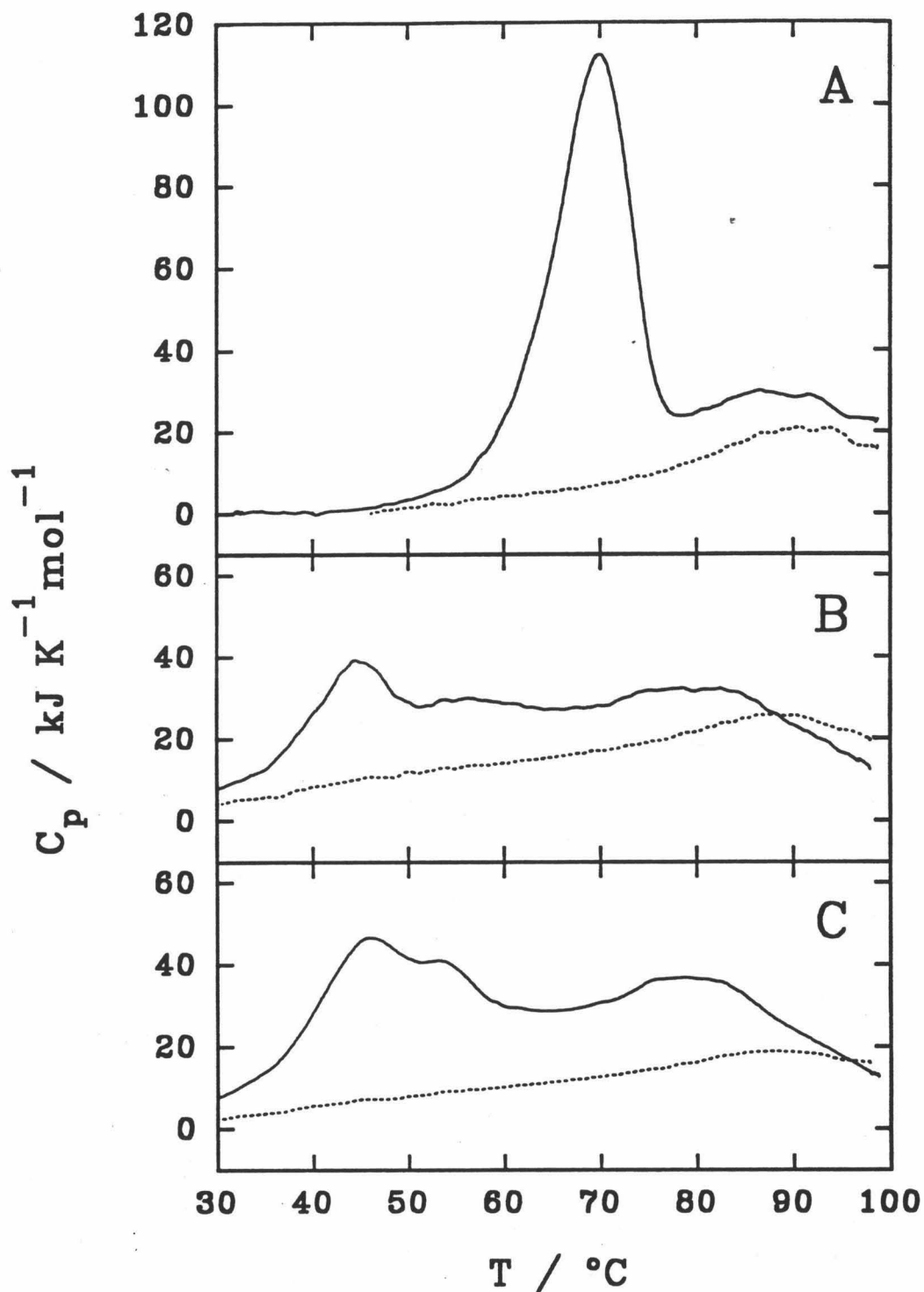


FIGURA 5.1.20: Curvas de $C_p(T)$, una vez restada la línea base instrumental, obtenidas para una mezcla equimolar de carboxipeptidasa A y su correspondiente dominio de activación, a una velocidad de barrido de 2 K/min, en las siguientes condiciones y concentraciones de muestra: (A) fosfato 20 mM, pH 7.5, $C = 2.4$ mg/ml; (B) pirofosfato 20 mM, pH 9.0, $C = 2.4$ mg/ml; (C) pirofosfato 20 mM, pH 9.0, $C = 4.8$ mg/ml. (—) 1^{er} barrido; (.....) 2^o barrido.

experimentos realizados con el sistema A. Los valores de T_m para las transiciones encontradas se muestran en la Tabla 5.1.VI.

Puede apreciarse, sobre todo a pH 9.0 en el que se separan las transiciones, la existencia de la transición irreversible correspondiente a la enzima activa y la reversible del DAB, con sus valores de T_m prácticamente inalterados respecto a los obtenidos en los experimentos aislados. No hay pues evidencia de interacción entre ambas especies, confirmando los resultados de la Bibliografía (Vilanova, et al., 1985; Vendrell et al., 1990a).

Los resultados obtenidos con la mezcla de CPA y su dominio de activación no son tan simples ni admiten una explicación sencilla. A pH 9.0 se presentan peculiaridades dignas de comentar: De las dos transiciones obtenidas en el primer barrido, la primera, correspondiente a la CPA, presenta un hombro, mientras que la segunda, reversible, aparece a una T_m superior en el segundo barrido, precisamente la del dominio de activación aislado (Sánchez-Ruiz et al., 1988b). Existe una fuerte caída del termograma a altas temperaturas, probablemente debido al efecto exotérmico de la agregación de las muestras. Esto puede deformar la transición correspondiente al dominio de activación, bajando su T_m . No está clara la interpretación de estos resultados, pero sí resulta evidente el hecho de que esta mezcla no se comporta en un barrido de DSC como una mezcla de dos especies no interaccionantes, debido muy probablemente a la afinidad existente entre CPA y su dominio de activación (San Segundo et al., 1982; Vilanova et al., 1985). Por otra parte, también resulta claro que el comportamiento térmico en DSC de la PCPA es distinto del de la mezcla de CPA y su segmento de activación, aunque ambas especies interaccionen fuertemente originándose un efecto inhibitorio de la enzima activa (San Segundo et al., 1982).

Tabla 5.1.VI

Valores de T_m encontrados en experimentos de DSC con mezclas equimolares de CPB y CPA con sus correspondientes dominios de activación.

Condición	Barrido	Concentración mg/ml	$T_m(1)$ °C	$T_m(2)$ °C
CPB-DAB				
fosfato 20 mM pH 7.5	1°	2.1	71.2	-
	2°			75
pirofosfato 20 mM pH 9.0	1°	2.0	54.8	73
	2°			74
CPA-DAA				
fosfato 20 mM pH 7.5	1°	2.4	69.6	87
	2°			90
pirofosfato 20 mM pH 9.0	1°	2.4	44.1	≈ 78
	2°			88
pirofosfato 20 mM pH 9.0	1°	4.8	44.8	≈ 79
	2°			87

5.2 Estudio del efecto del Zn^{2+} en la desnaturalización térmica de la carboxipeptidasa B.

5.2.1 Efecto del Zn^{2+} en las transiciones de DSC en pirofosfato 20 mM, pH 9.0.

Como se describe en el Apartado 5.1.1, la desnaturalización térmica de la CPB en tampón pirofosfato 1 y 20 mM, pH 9.0, no sigue los dictados del modelo cinético de dos estados. En un intento de aclarar este comportamiento se investigó la implicación del Zn^{2+} , ya que se encuentra en el sitio activo como cofactor de la enzima.

Se realizaron experimentos de DSC a 2 K/min, en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, con varias concentraciones de $ZnCl_2$ en el medio. Las concentraciones de $ZnCl_2$ se eligieron lo suficientemente altas de forma que el aporte de Zn^{2+} al medio por parte de la CPB al desnaturalizarse no alterase apreciablemente la concentración total de Zn^{2+} libre. Esto ocurre a concentraciones añadidas de Zn^{2+} mucho mayores que la concentración total de proteína. Aquí se llegó así hasta el límite de solubilidad del $ZnCl_2$ en el tampón de trabajo. La concentración de proteína se mantuvo constante a 1.2 mg/ml.

En la Figura 5.2.1 se pueden ver dos registros originales correspondientes a sendos experimentos de DSC con CPB a dos concentraciones de $ZnCl_2$ diferentes. Todas las transiciones obtenidas fueron irreversibles, al igual que en los experimentos con CPB y PCPB descritos en el Apartado 5.1. En la Figura 5.2.2 se muestran los termogramas de DSC, una vez restada la línea base instrumental y corregido el tiempo de respuesta del calorímetro, para varias concentraciones de Zn^{2+} , donde se puede apreciar un fuerte efecto de la concentración del ion libre en el medio sobre la T_m de las transiciones. En la Tabla 5.2.I se exponen los parámetros característicos de las transiciones. El efecto de la concentración de Zn^{2+} sobre los valores de T_m se muestra en la Figura 5.2.3A. Los valores de ΔC_p obtenidos directamente de las transiciones son bastante reproducibles (10 ± 2 kJ/K.mol) y concuerdan bastante bien con los valores encontrados en las otras condiciones experimentales descritas en el Apartado 5.1.

En el Apartado 4.1.4 del Capítulo de Fundamentos Teóricos se expuso que la Termodinámica del Equilibrio predice que, para una proteína monomérica que sufre una desnaturalización térmica reversible con pérdida simultánea de ligandos, los valores de T_m

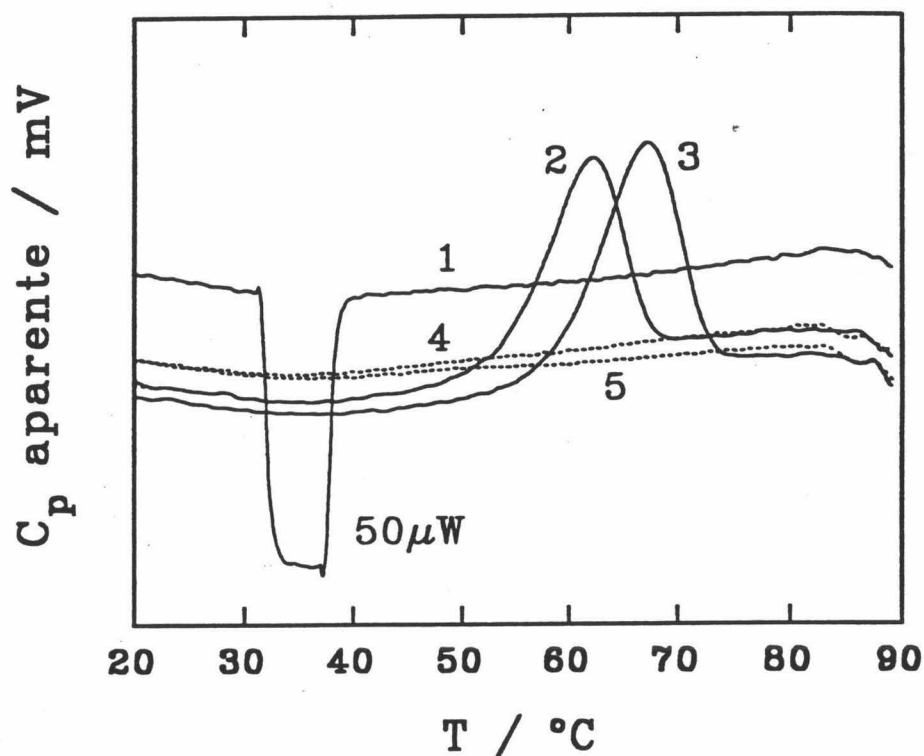


FIGURA 5.2.1: Registros experimentales de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de $ZnCl_2$ en exceso. La velocidad de barrido es de 2 K/min. (1) Línea base instrumental; (2) $ZnCl_2$ 0.37 mM, 1^{er} barrido; (3) $ZnCl_2$ 3.70 mM, 1^{er} barrido; (4) 2^o barrido de (2); (5) 2^o barrido de (3). En la línea base se aprecia un calibrado eléctrico de $50\mu W$.

de las transiciones de DSC cambian con la concentración de ligando libre de acuerdo con la ecuación (ver Apartado 4.1.4) (Fukada et al., 1983):

$$\frac{\Delta H^{vH}}{RT_m} + \nu \ln L_o = constante \tag{5.2.1}$$

donde ΔH^{vH} es la entalpía de van't Hoff o entalpía aparente, L_o es la concentración de ligando y ν es el número de moléculas de ligando unidas a la molécula de proteína nativa. En esta ecuación se supone que la concentración de ligando es mucho mayor que la de proteína, como ocurre en los experimentos de DSC anteriores, así como que el ligando no se une al estado desnaturalizado.

Tabla 5.2.I

Temperatura del máximo de la transición, T_m , incremento de entalpía, ΔH , incremento de capacidad calorífica, ΔC_p , para la desnaturalización térmica de la carboxipeptidasa B en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, a varias concentraciones de $ZnCl_2$ y a una velocidad de barrido de 2 K/min.

[$ZnCl_2$] (mM)	T_m (°C)	ΔH (kJ/mol)	ΔC_p (kJ/K.mol)
0.19	60.0	648	12.0
0.26	60.0	672	11.6
0.37	61.5	633	8.4
0.74	63.5	681	8.6
1.48	63.9	719	12.2
2.22	64.9	702	9.5
2.78	65.8	647	4.8
2.96	65.0	725	11.1
3.70	66.6	710	8.2
5.55	69.1	701	8.9
7.40	72.4	685	12.0

El hecho de que la Ecuación 5.2.1 describa correctamente un efecto de ligandos en la T_m de las transiciones de DSC, proporcionando un valor de ΔH^{vH} análogo al ΔH que se obtiene de las trazas de DSC, se ha propuesto como justificación para el análisis termodinámico de datos de DSC correspondientes a desnaturalización térmica irreversible de proteínas (Manly et al., 1985; Edge et al., 1985; Hu y Sturtevant, 1987 y 1989). En el caso de la CPB el valor de ν es 1 ya que la proteína tiene un solo ion Zn^{2+} unido en el sitio activo. Por tanto, una representación de $\ln[Zn^{2+}]$ frente a $1/T_m$ daría una recta de pendiente $-\Delta H^{vH}/R$. Esta representación se muestra en la Figura 5.2.3B, para los experimentos de la Tabla 5.2.I. La gráfica es una recta, dentro de la dispersión experimental, hasta $[Zn^{2+}] = 3$ mM. De la pendiente de la recta se obtiene un valor para $\Delta H^{vH} = 445 \pm 38$ kJ/mol. Este valor concuerda aceptablemente con el valor obtenido directamente de las transiciones utilizando la Ecuación 4.7 del Apartado 4.1.1 (414 ± 15 kJ/mol). Para $[Zn^{2+}] > 3$ mM los puntos se desvían de la recta. En principio podría explicarse suponiendo que hay un segundo sitio de unión del Zn^{2+} de menor afinidad. Sobre esto se volverá más adelante en este Apartado.

Por lo tanto, el efecto del Zn^{2+} en las transiciones de DSC sigue aparentemente las

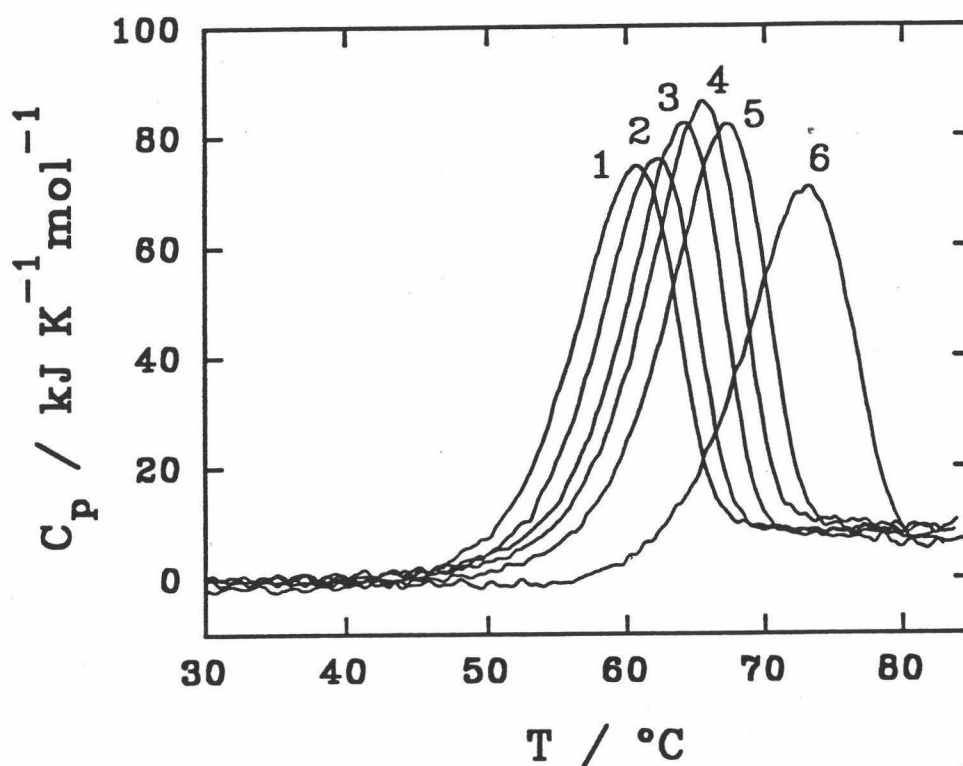


FIGURA 5.2.2: Curvas de capacidad calorífica, C_p , tras restar la línea base instrumental, correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de ZnCl_2 en exceso. La velocidad de barrido es de 2 K/min. Las concentraciones de ZnCl_2 del medio son: (1) 0.19 mM; (2) 0.37 mM; (3) 0.74 mM; (4) 2.22 mM; (5) 3.70 mM; (6) 7.40 mM.

predicciones de la Termodinámica del Equilibrio. Sin embargo, sabemos que las transiciones encontradas son completamente irreversibles. Recientemente se ha motivado alguna controversia en la Bibliografía respecto al análisis de transiciones de DSC irreversibles correspondientes a la desnaturalización térmica de proteínas. Algunos autores consideran usualmente que el proceso que motiva la irreversibilidad de las transiciones no tiene lugar apreciablemente dentro del corto intervalo de tiempo en que ocurre la transición, sino a temperaturas más altas y con un pequeño efecto térmico (ver Apartado 4.2.1, Situación A). Desde este punto de vista, las transiciones de DSC se deberían únicamente al desplegamiento térmico reversible de la proteína y, por tanto, serían analizables mediante la Termodinámica

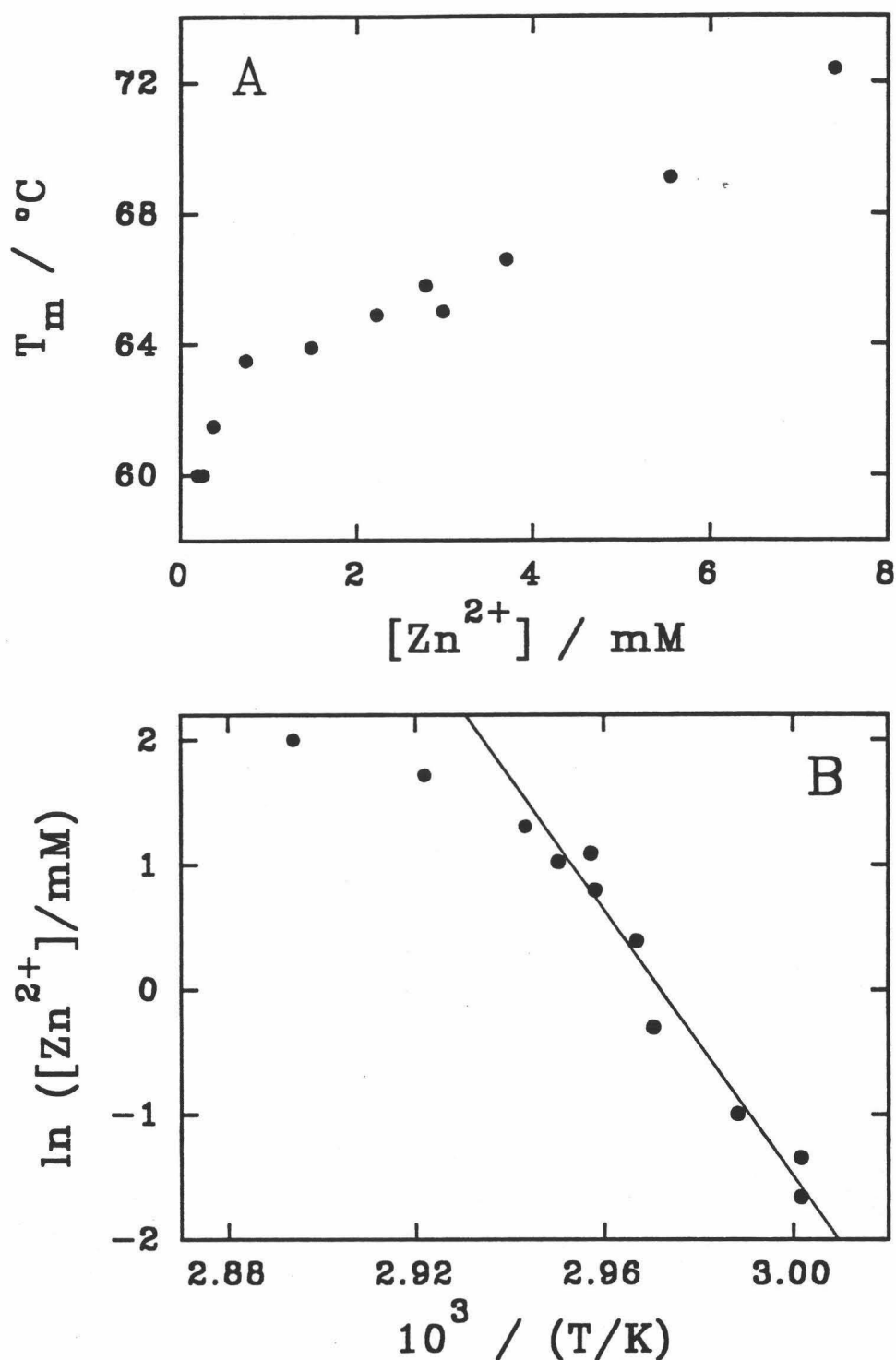


FIGURA 5.2.3: (A) Efecto de la concentración de Zn^{2+} sobre la T_m de las transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, obtenidas a una velocidad de barrido de 2 K/min. (B) Representación de van't Hoff correspondiente a los valores representados en (A). La línea continua corresponde al ajuste por mínimos cuadrados de una recta a los datos correspondientes a $[Zn^{2+}] < 3$ mM. La pendiente de la recta es $(53.5 \pm 4.6) \times 10^3$ K.

del Equilibrio (Privalov, 1982; Privalov y Medved, 1982; Manly et al., 1985; Edge et al., 1985; Hu y Sturtevant, 1987 y 1989; Brandts et al., 1989; Bertazzon et al., 1990). Aunque esto pudiera ocurrir en algunos casos, es frecuente que la etapa irreversible se produzca suficientemente dentro de la transición lo que motiva que las transiciones de DSC sean fuertemente dependientes del tiempo, y, por lo tanto, de la velocidad de barrido (Apartado 4.2.1, Situaciones B y C) (Sánchez-Ruiz et al., 1988a y 1988b; Guzmán-Casado et al., 1990; Morin et al., 1990; Freire et al., 1990; Galisteo et al., 1991 y 1992; Conejero et al., 1991a y 1991b).

Vamos a ver ahora que las transiciones de DSC para la desnaturalización térmica irreversible de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de cantidades milimolares de $ZnCl_2$ dependen fuertemente de la velocidad de barrido y además proceden conforme al modelo cinético de dos estados (Apartado 4.2.1, Situación C; Sánchez-Ruiz et al., 1988a), tal como se ha descrito anteriormente para pH 7.5, con 1 μM de $ZnCl_2$ (Apartado 5.1). Se han realizado experimentos de DSC a 2, 1 y 0.5 K/min, para varias concentraciones de $ZnCl_2$. La Figura 5.2.4 muestra el efecto de la velocidad de barrido sobre los termogramas. Las transiciones se han corregido para el ligero tiempo de respuesta del calorímetro. Por el fuerte efecto encontrado puede deducirse que la desnaturalización térmica de la CPB está, al menos en parte, bajo control cinético. En la Tabla 5.2.II se muestran los parámetros característicos de las transiciones encontradas a varias velocidades de barrido.

Se ha aplicado el modelo cinético de dos estados (Sánchez-Ruiz et al., 1988a) al análisis de las transiciones. La Figura 5.2.5 muestra este análisis para varias concentraciones de $ZnCl_2$, donde se aplican los Métodos A y B del modelo para el cálculo de la Energía de activación del proceso (Apartado 4.2.1). Puede apreciarse en la Figura 5.2.5A la perfecta coincidencia entre los valores de la constante de velocidad del proceso de primer orden obtenidos a diferentes velocidades de barrido. En las Figura 5.2.6 se muestran los ajustes no lineales correspondientes al Método E del modelo. De las Figuras 5.2.5 y 5.2.6 se deduce que el modelo cinético de dos estados describe cuantitativamente las transiciones de DSC. Las energías de activación obtenidas de la aplicación del modelo se exponen en la Tabla 5.2.III, donde se puede apreciar el excelente acuerdo entre los valores obtenidos por los diferentes métodos.

De estos resultados se deduce que las transiciones de DSC correspondientes a la

Tabla 5.2.II

Temperatura del máximo de la transición, T_m , incremento de entalpía, ΔH , incremento de capacidad calorífica, ΔC_p , para la desnaturalización térmica de la carboxipeptidasa B en pirofosfato 20 mM, pH 9.0 a varias concentraciones de $ZnCl_2$ y a varias velocidades de barrido.

[$ZnCl_2$] (mM)	v (K/min)	T_m (°C)	ΔH (kJ/mol)	ΔC_p (kJ/K.mol)
0.26	2	60.0	672	11.6
	1	57.9	650	11.7
	0.5	55.6	594	10.6
1.48	2	63.9	719	12.2
	1	61.5	686	12.0
	0.5	59.5	630	12.4
2.78	2	65.8	647	4.8
	1	63.5	619	5.5
	0.5	61.0	645	11.8
2.96	2	65.0	725	11.1
	1	62.8	637	9.8
	0.5	60.5	671	12.0
5.55	2	69.1	701	8.9
	1	66.8	692	8.8
	0.5	64.0	650	9.8

desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia diversas concentraciones de $ZnCl_2$ en gran exceso respecto de la concentración de proteína, transcurren irreversiblemente y bajo control cinético, siguiendo el modelo cinético de dos estados. Este comportamiento ya se ha descrito para CPB y PCPB en otras condiciones experimentales en el Apartado 5.1.

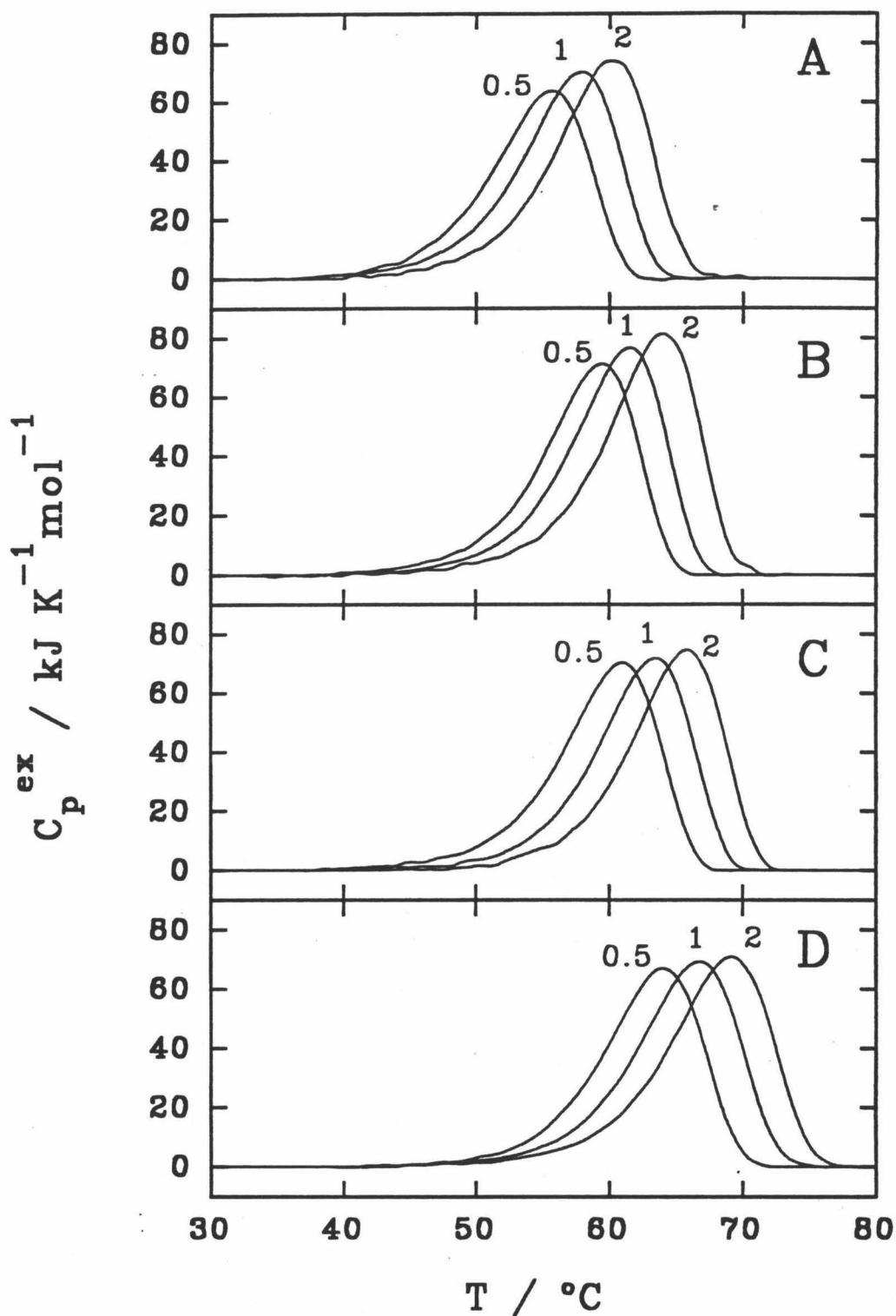


FIGURA 5.2.4: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, obtenidas a las velocidades de barrido indicadas. Las concentraciones de Zn^{2+} de medio fue: (A) 0.26 mM; (B) 1.48 mM; (C) 2.78 mM; (D) 5.55 mM.

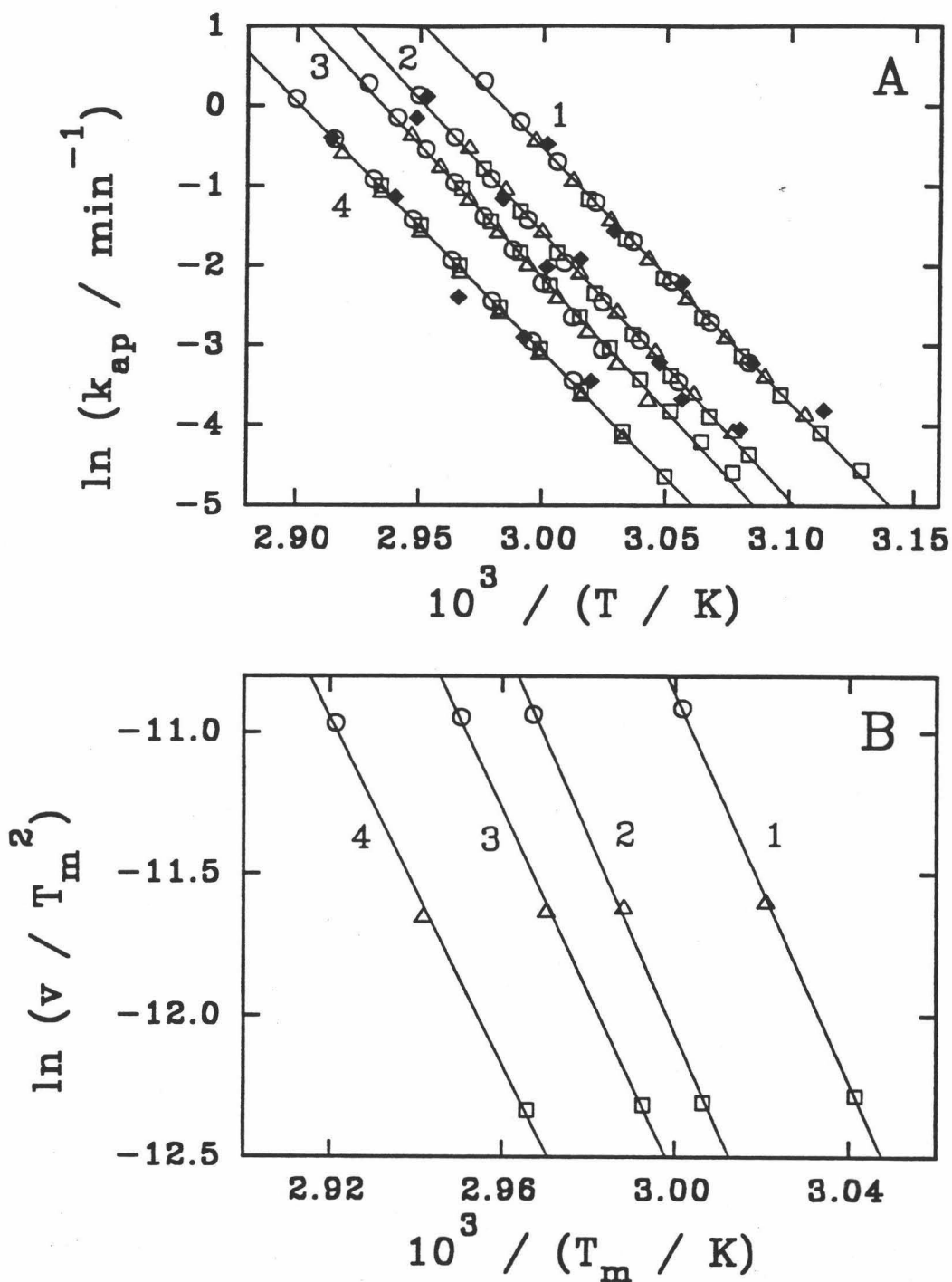


FIGURA 5.2.5: Aplicación del modelo cinético de dos estados a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, a varias concentraciones de Zn^{2+} . (A) Representación de Arrhenius (método A del modelo; ver Apartado 4.2.1). (B) Representación de $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ (método B del modelo). Los símbolos huecos indican las diferentes velocidades de barrido: (O) 2.0 K/min; (Δ) 1.0 K/min; (□) 0.5 K/min. El símbolo (◆) indica los valores obtenidos de los experimentos de inactivación térmica. Las concentraciones de Zn^{2+} son: (1) 0.26 mM; (2) 1.48 mM; (3) 2.78 mM; (4) 5.55 mM.

Tabla 5.2.III

Energías de activación, E, en kJ/mol, y temperaturas, T*, a las que la constante de velocidad, $k_{ap}=1 \text{ min}^{-1}$, en °C, obtenidas por aplicación del modelo cinético de dos estados a las transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, a varias concentraciones de ZnCl_2 .

Método de cálculo	[ZnCl ₂] (mM)				
	0.26	1.48	2.78	2.96	5.55
A	262±8	278±5	282±13	278±7	260±2
B	286±4	289±13	269±8	284±8	256±
C	265±5	273±2	290±19	277±9	259±6
D	270±5	284±5	289±13	284±5	266±3
E	267±5	284±4	286±11	284±6	265±2
E media:	270±9	282±6	283±9	281±4	261±4
T*:	62.2±0.3	65.6±0.2	67.5±0.2	66.8±0.2	71.5±0.2

5.2.2 Cinéticas de inactivación térmica de CPB a temperatura constante.

Según el modelo empleado para el análisis de las transiciones de DSC, la cinética aparente del proceso de desnaturalización térmica de la CPB es de primer orden. Con el fin de corroborar este resultado, se han llevado a cabo experimentos de inactivación térmica de la CPB a temperatura constante en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, a varias concentraciones de ZnCl_2 , siguiendo la pérdida de actividad enzimática a determinadas temperaturas, dentro del intervalo de las transiciones obtenidas por DSC (ver Apartado 3.4). Estas cinéticas de inactivación se muestran en las Figuras 5.2.7-5.2.9 para varias temperaturas y varias concentraciones de ZnCl_2 . Como era de esperar del seguimiento del modelo cinético de dos estados por las transiciones de DSC, las curvas de actividad enzimática frente al tiempo no dependen de la concentración total de proteína (entre 0.1 y 1.5 mg/ml). Además se obtienen ajustes excelentes a la ecuación de velocidad de primer orden en su forma integrada (en línea continua en las Figuras 5.2.7-5.2.9):

donde A y A₀ son las actividades enzimáticas a tiempo t y tiempo cero, respectivamente. f

$$f = A/A_0 = \exp(-k_{ap}t) \quad (5.2.2)$$

es la fracción de proteína que queda sin desnaturizar irreversiblemente. k_{ap} es la constante de velocidad aparente de primer orden del proceso. Los valores obtenidos para k_{ap} están representados en la Figura 5.2.5A, donde se puede apreciar que están en buena concordancia con los calculados de las transiciones de DSC utilizando la Ecuación 4.22, lo que corrobora la cinética aparente de primer orden del proceso de desnaturización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, a concentraciones de $ZnCl_2$ mucho mayores que la de proteína.

De estos resultados de inactivación térmica, junto con el análisis de los termogramas de DSC mediante el modelo cinético de dos estados, se puede concluir que, aunque existe un fuerte efecto del Zn^{2+} sobre el proceso de desnaturización que aparentemente se comporta como predice por la Termodinámica del Equilibrio:

A) Sólo el estado nativo y el estado final (irreversiblemente desnaturizado) están significativamente poblados durante la desnaturización.

B) El equilibrio químico entre esos dos estados no está establecido en ningún momento, y, por tanto, las transiciones de DSC no pueden analizarse, bajo ninguna suposición, de acuerdo con modelos de la Termodinámica del Equilibrio.

C) La conversión del estado nativo al estado desnaturizado está determinada mediante una constante cinética de primer orden, k_{ap} , que puede determinarse a cualquier temperatura tanto de las transiciones de DSC como a partir de las cinéticas de inactivación térmica.

Hasta ahora se han mostrado unos resultados experimentales que permiten extraer valiosas conclusiones sobre la aplicabilidad de la termodinámica de equilibrio a las transiciones de DSC irreversibles. En adelante nos centraremos en la explicación del efecto de la concentración Zn^{2+} , en gran exceso respecto a la concentración de proteína, sobre las transiciones de DSC obtenidas para la desnaturización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0. Hay que decir que el modelo cinético que se describe en el Apartado siguiente sólo es capaz de explicar el efecto encontrado para una concentración de $ZnCl_2 < 3mM$, por lo que en adelante, los cálculos y representaciones que se realizan corresponden solamente a los resultados obtenidos para $[ZnCl_2] < 3mM$, salvo que se indique lo contrario.

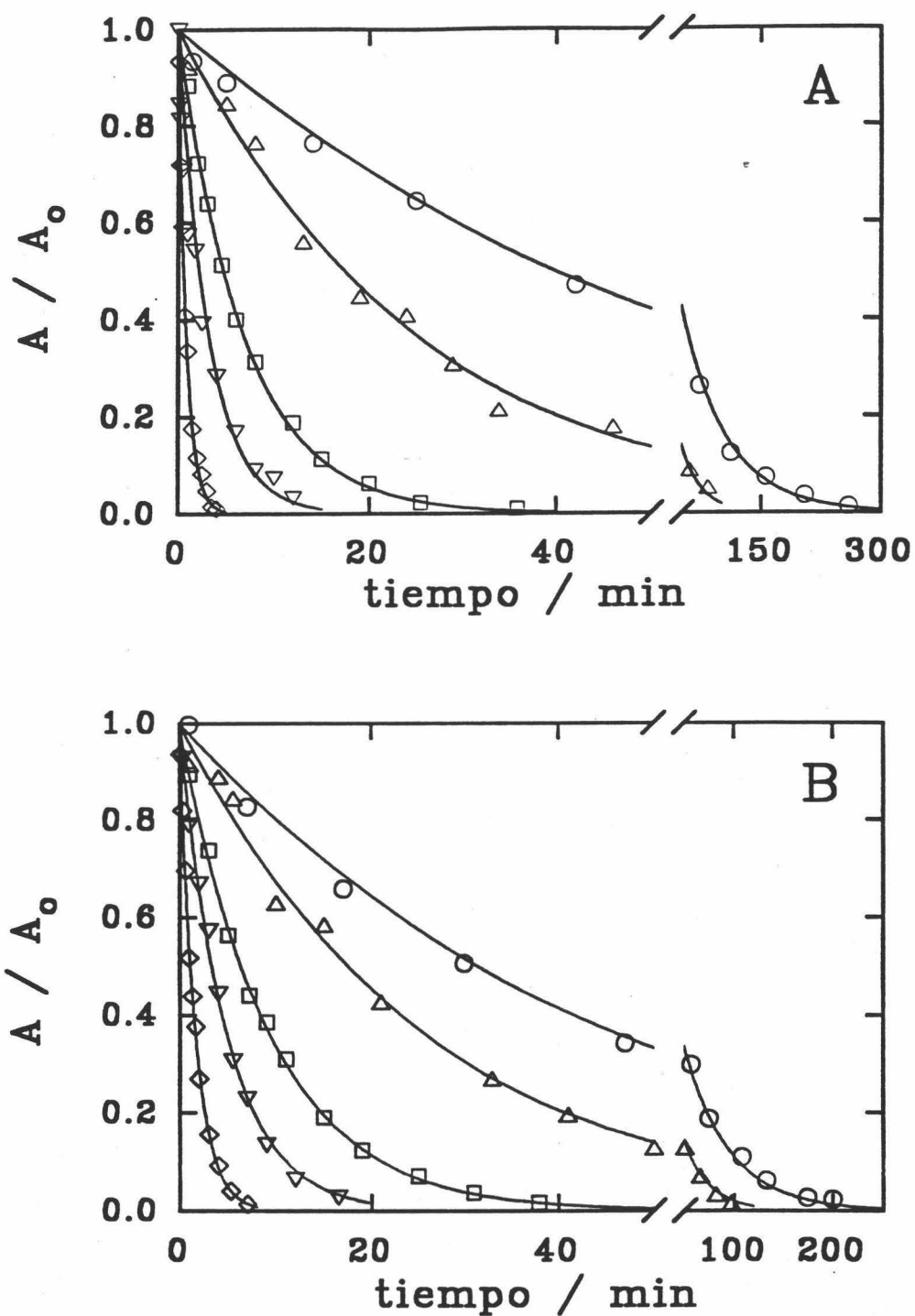


FIGURA 5.2.7: Cinéticas de inactivación térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0. (A) $ZnCl_2$ 1.48 mM. Las temperaturas de trabajo son: (○) 51.5°C, (Δ) 55.0°C, (□) 58.5°C, (▽) 62.0°C, (◇) 65.5°C. (B) $ZnCl_2$ 0.26 mM. Las temperaturas de trabajo son: (○) 48.0°C, (Δ) 51.0°C, (□) 54.0°C, (▽) 57.0°C, (◇) 60.0°C. Las líneas continuas representan los mejores ajustes a una curva exponencial de primer orden (Ecuación 5.2.2).

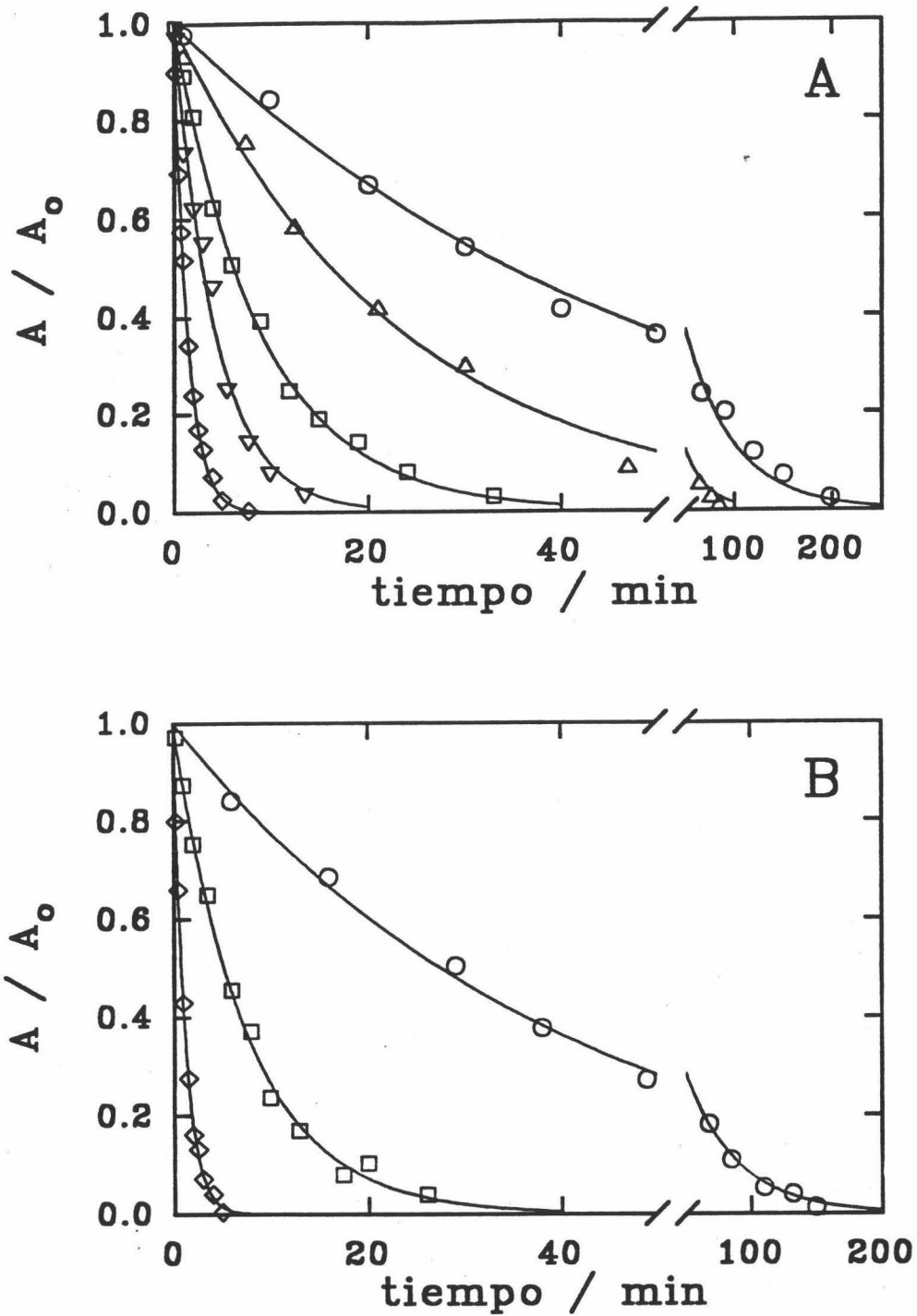


FIGURA 5.2.8: Cinéticas de inactivación térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0. (A) $ZnCl_2$ 2.98 mM. Las temperaturas de trabajo son: (○) 53.0°C, (△) 56.0°C, (□) 59.0°C, (▽) 62.0°C, (◇) 65.0°C. (B) $ZnCl_2$ 2.78 mM. Las temperaturas de trabajo son: (○) 54.0°C, (□) 60.0°C, (◇) 66.0°C. Las líneas continuas representan los mejores ajustes a una curva exponencial de primer orden (Ecuación 5.2.2).

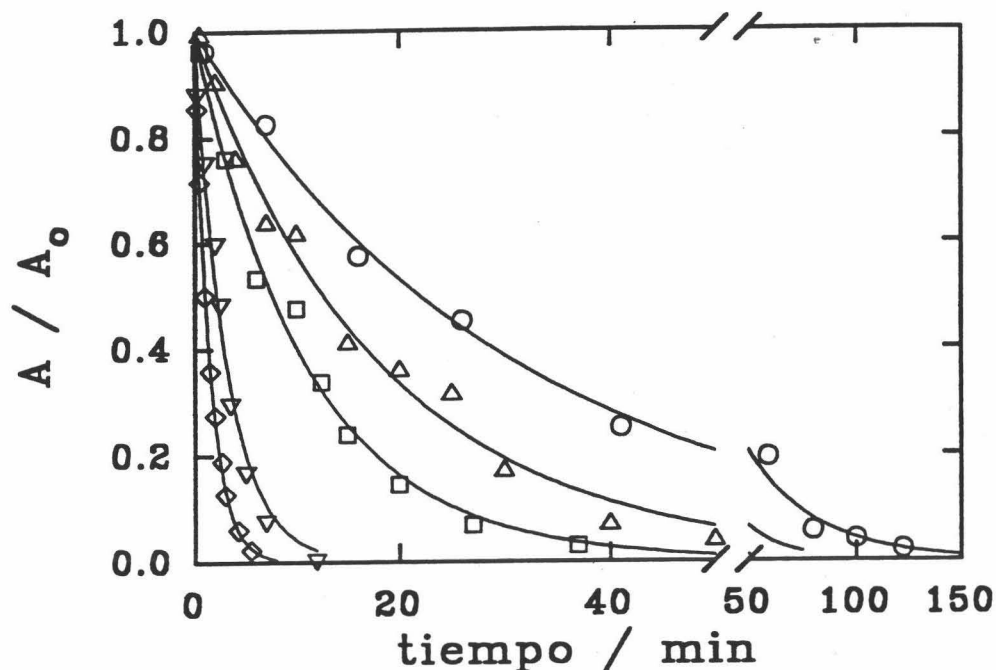
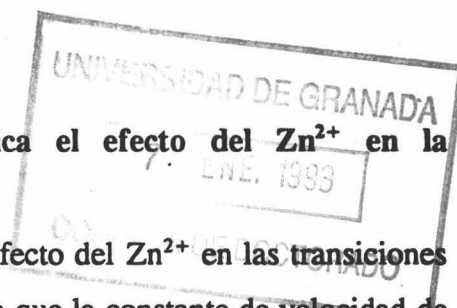


FIGURA 5.2.9: Cinéticas de inactivación térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, ZnCl₂ 5.55 mM. Las temperaturas de trabajo son: (○) 58.0°C, (Δ) 61.0°C, (□) 64.0°C, (▽) 67.0°C, (◇) 70.0°C. Las líneas continuas representan los mejores ajustes a una curva exponencial de primer orden (Ecuación 5.2.2).

5.2.3 Un modelo cinético sencillo que explica el efecto del Zn²⁺ en la desnaturalización térmica de la CPB.

Está claro, de las anteriores conclusiones, que el efecto del Zn²⁺ en las transiciones de DSC (ver Figuras 5.2.2 y 5.2.3) sólo puede atribuirse a que la constante de velocidad de primer orden, k_{ap} , depende de la concentración de Zn²⁺ presente (ver Figura 5.2.5A).

Vimos en el Apartado 4.2.4 que el modelo cinético más sencillo que es capaz de explicar un efecto de ligandos sobre transiciones de DSC irreversibles consiste en una extensión del modelo de Lumry y Eyring (1954) (Sánchez-Ruiz, 1992). En el caso que nos



ocupa el esquema podría escribirse de la siguiente forma:



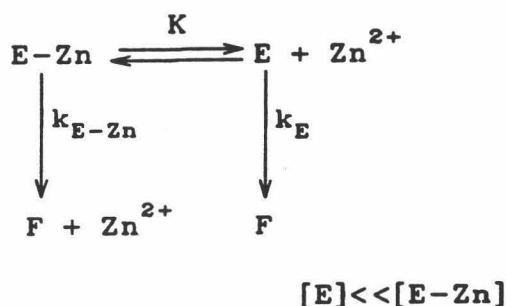
$$[\text{E}] \ll [\text{E-Zn}]$$

donde E es un estado de la proteína que ha perdido el Zn^{2+} , en equilibrio con la enzima con Zn^{2+} unido, E-Zn. K es la constante de equilibrio de disociación del Zn^{2+} , y k_E es la constante cinética de primer orden de desnaturalización irreversible de E, que genera el estado F. Dado que hemos visto que la desnaturalización térmica de la CPB en estas condiciones sigue el modelo cinético de dos estados, estaremos en la Situación C del modelo de Lumry y Eyring (ver Apartado 4.2.1), es decir, la constante k_E tiene valores altos a las temperaturas en que ocurre la transición y, por tanto, la concentración de E es muy baja, estando sólo E-Zn y F significativamente poblados. Para este caso, la ecuación 4.33, que describe el efecto de ligandos sobre la T_m de las transiciones se puede escribir:

$$\frac{E_{ap}}{RT_m} - 2\ln T_m + \ln[\text{Zn}^{2+}] = \text{constante} \quad (5.2.3)$$

donde el término $-2\ln T_m$ se puede considerar prácticamente constante con la temperatura dentro del estrecho intervalo en que ocurren las transiciones (Sánchez-Ruiz, 1992). La energía de activación aparente del proceso de primer orden, E_{ap} , se puede obtener de la pendiente de una representación de $\ln[\text{Zn}^{2+}]$ frente a $1/T_m$. Esta representación se ha mostrado ya en la Figura 5.2.3B. Se obtuvo una recta, dentro de la dispersión experimental, hasta una concentración de $\text{Zn}^{2+} < 3\text{mM}$. A partir de éste valor, los puntos se desvían apreciablemente del comportamiento rectilíneo. El valor para E_{ap} obtenido de la pendiente es de $445 \pm 38 \text{ kJ/mol}$, mucho mayor que los valores obtenidos por el modelo cinético de dos estados (entre 260 y 283 kJ/mol). Esto indica que el efecto de la concentración de Zn^{2+} sobre la T_m de las transiciones no puede explicarse simplemente mediante el modelo de Lumry y Eyring, por lo que esta representación del proceso de desnaturalización de la CPB en estas condiciones experimentales no es válida. Es necesaria pues una ampliación del modelo que permita explicar los resultados encontrados.

Se ha encontrado que la dependencia de las transiciones de DSC con la concentración de Zn^{2+} puede explicarse correctamente utilizando el siguiente modelo cinético:



En este modelo el estado nativo de la CPB es la proteína plegada con Zn^{2+} unido en su centro activo, $E-Zn^{2+}$, aunque, igual que en el esquema anterior, una pequeña cantidad de CPB sin Zn^{2+} unido, E , está presente en equilibrio con $E-Zn^{2+}$. En este modelo, a diferencia del anterior, ambas formas pueden desnaturalizarse irreversiblemente produciendo el estado final, F , de acuerdo con constantes de velocidad de primer orden, k_{E-Zn} y k_E , respectivamente. La constante de equilibrio de disociación del Zn^{2+} , K es:

$$K = \frac{[E] [Zn^{2+}]}{[E-Zn]} \tag{5.2.4}$$

Nótese que se supone que $[E] \ll [E-Zn]$ y, por tanto, sólo dos estados, $E-Zn$ y F , están significativamente poblados durante la desnaturalización.

La velocidad de formación del estado F viene dada por:

$$\frac{d[F]}{dt} = k_{E-Zn}[E-Zn] + k_E[E] \tag{5.2.5}$$

Teniendo en cuenta la Ecuación 5.2.4 y que $d[F]/dt \approx -d[E-Zn]/dt$ (dado que la concentración de E es siempre muy baja), la Ecuación 5.2.5 se puede escribir:

$$\frac{d[E-Zn]}{dt} = -\left(k_{E-Zn} + \frac{k_E K}{[Zn^{2+}]}\right) [E-Zn] \tag{5.2.6}$$

La concentración de Zn^{2+} en cada uno de los experimentos de DSC e inactivación térmica es mucho mayor que la concentración total de proteína; por tanto, la $[Zn^{2+}]$ puede

tomarse como constante e igual a la concentración total de Zn^{2+} . La Ecuación 5.2.6 indica que la cinética de desnaturalización es de primer orden, con una constante de velocidad aparente dada por:

$$k_{ap} = k_{E-Zn} + \frac{k_E K}{[Zn^{2+}]} \quad (5.2.7)$$

La Ecuación 5.2.7 predice que una representación de k_{ap} frente a $1/[Zn^{2+}]$ para una temperatura determinada debe ser lineal (dentro de la dispersión experimental de los datos) como puede verse en la Figura 5.2.10 donde se han representado los datos para varias temperaturas.

De la intersección con el eje de ordenadas y de la pendiente de las rectas pueden calcularse k_{E-Zn} y $k_E K$ respectivamente. Estos dos valores siguen una dependencia con la temperatura según las ecuaciones siguientes, del tipo de la de Arrhenius:

$$\ln(k_{E-Zn}/\text{min}^{-1}) = \frac{E_{E-Zn}}{R} \left(\frac{1}{T_{E-Zn}^*} - \frac{1}{T} \right) \quad (5.2.8)$$

$$\ln(k_E K/mM \text{ min}^{-1}) = \frac{E_{kK}}{R} \left(\frac{1}{T_{kK}^*} - \frac{1}{T} \right) \quad (5.2.9)$$

donde E_{E-Zn} y E_{kK} son las energías de activación de las etapas cinéticas individuales, y T_{E-Zn}^* y T_{kK}^* son las temperaturas a las que $k_{E-Zn} = 1 \text{ min}^{-1}$ y $k_E K = 1 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. En la Figura 5.2.11 se muestran estas representaciones. Los parámetros obtenidos son los siguientes:

$$\begin{aligned} E_{E-Zn} &= 300 \text{ kJ/mol.} & T_{E-Zn}^* &= 67.3^\circ\text{C.} \\ E_{kK} &= 259 \text{ kJ/mol.} & T_{kK}^* &= 68.3^\circ\text{C.} \end{aligned}$$

Nótese que $k_E K$ es el producto de una constante de velocidad y una constante de equilibrio. El hecho de que $k_E K$ siga una dependencia de Arrhenius con la temperatura puede explicarse bajo la hipótesis de que, dentro del intervalo de temperatura estudiado, k_E sigue la Ecuación de Arrhenius y K la Ecuación de van't Hoff con un cambio de entalpía constante. De esta forma:

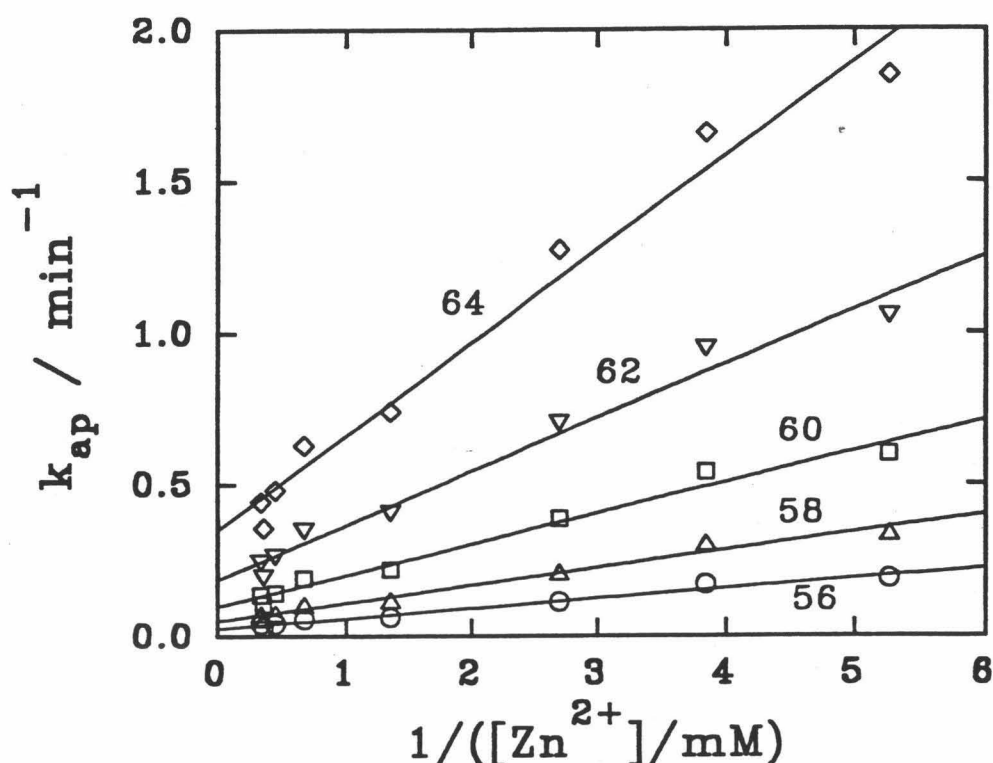


FIGURA 5.2.10: Variación de la constante de velocidad aparente de primer orden, k_{ap} , correspondiente a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, con la concentración de Zn^{2+} a las diferentes temperaturas que se indican junto a los puntos. Los valores de k_{ap} se han calculado a partir de las curvas de $C_p^{ex}(T)$ mediante el modelo cinético de dos estados (Ecuación 4.27; Apartado 4.2.1). Las líneas continuas representan las rectas de ajuste por mínimos cuadrados a los puntos experimentales (Ecuación 5.2.7).

$$k_E K = \exp\left[\frac{\Delta H_{Zn}}{R} \left(\frac{1}{T_{K-1}} - \frac{1}{T}\right)\right] \cdot \exp\left[\frac{E_E}{R} \left(\frac{1}{T_E^*} - \frac{1}{T}\right)\right] = \exp\left(\frac{\Delta H_{Zn}}{RT_{K-1}} + \frac{E_E}{RT_E^*}\right) \cdot \exp\left(\frac{-(\Delta H_{Zn} + E_E)}{RT}\right) \tag{5.2.10}$$

Claramente la energía de activación aparente del proceso para $k_E K$ es $\Delta H_{Zn} + E_E$, donde ΔH_{Zn} es la entalpía de disociación del Zn^{2+} y E_E es la energía de activación correspondiente a la etapa irreversible $E \longrightarrow F$.

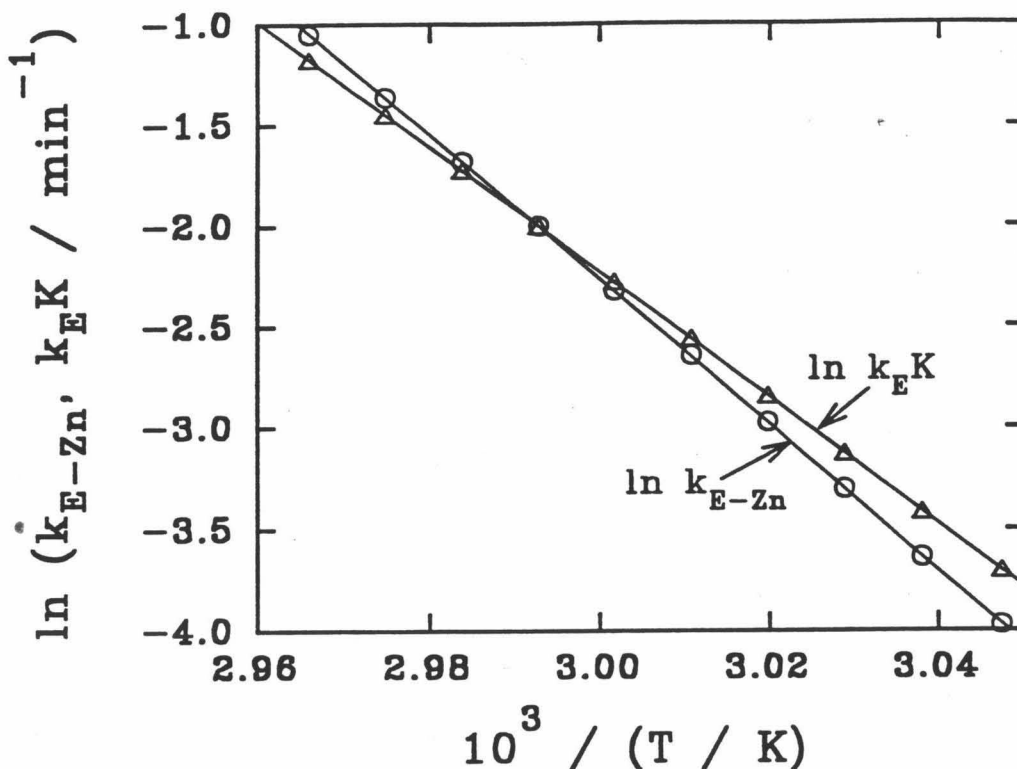


FIGURA 5.2.11: Representación de Arrhenius para los valores de k_{E-K} y k_{E-Zn} . Los valores representados por símbolos se han calculado a partir de la pendiente y la ordenada en el origen de las rectas de ajuste representadas en la Figura 5.2.10 (ver Ecuación 5.2.7). Las líneas continuas representan las rectas de ajuste de mínimos cuadrados.

Dado que k_{E-Zn} y k_{E-K} cambian con la temperatura en una forma exponencial, podría esperarse alguna curvatura en las gráficas de $\ln k_{ap}$ frente a $1/T$, para una concentración dada de Zn^{2+} (ver Ecuación 5.2.7). Sin embargo, al hacer simulaciones numéricas de la dependencia de k_{ap} con la temperatura, utilizando las ecuaciones 5.7-5.9, se demuestra que la curvatura es demasiado pequeña para detectarse en el estrecho intervalo de temperatura de las transiciones de DSC, lo cual explica que los valores experimentales de k_{ap} sigan la Ecuación de Arrhenius (Figura 5.2.5A). Los valores de E_{ap} y T^* obtenidos de la representación de Arrhenius de los valores de k_{ap} calculados a partir de las ecuaciones 5.7-5.9 se muestran en la Tabla 5.2.IV. Puede verse la buena coincidencia de estos valores

calculados con los obtenidos de las transiciones calorimétricas (ver Tabla 5.2.III).

Tabla 5.2.IV

Energías de activación, E_{ap} , en kJ/mol, y temperaturas, T^* , a las que la constante de velocidad, $k_{ap}=1 \text{ min}^{-1}$, en °C, obtenidas a partir de los valores de k_{ap} calculadas según las ecuaciones 5.7-5.9.

	[ZnCl ₂] (mM)			
	0.26	1.48	2.78	2.96
E_{ap}	266	282	289	289
$T^*(k_{ap}=1)$	62.5	65.9	66.5	66.6

La Ecuación 5.2.6 nos da la dependencia con el tiempo de la concentración de enzima nativa (E-Zn) para un experimento cinético llevado a cabo a temperatura constante. Para un experimento de DSC, en el cual la temperatura y el tiempo cambian simultáneamente de acuerdo con una velocidad de barrido, v , la ecuación diferencial relevante es:

$$\frac{d[E-Zn]}{dT} = -\frac{k_{ap}}{v}[E-Zn] \quad (5.2.11)$$

En la temperatura del máximo de la transición ($T=T_m$), $d^2[E-Zn]/dT^2=0$ y, por tanto:

$$-\frac{k_{ap,m}}{v} \left(\frac{d[E-Zn]}{dT} \right)_m - \frac{1}{v} \left(\frac{dk_{app}}{dT} \right)_m [E-Zn]_m = 0 \quad (5.2.12)$$

Y teniendo en cuenta de nuevo la Ecuación 5.2.11, la condición de máximo de las transiciones de DSC puede escribirse:

$$k_{ap,m} = v \left(\frac{d \ln k_{ap}}{dT} \right)_m \quad (5.2.13)$$

donde $k_{ap,m}$ y $(d \ln k_{ap}/dT)_m$ son los valores respectivos a $T=T_m$. Las Ecuaciones 5.7-5.9 para los valores de E_{E-Zn} , T_{E-Zn}^* , E_{kK} y T_{kK}^* dan la dependencia de k_{ap} con la temperatura. Por tanto, la Ecuación 5.2.13 puede resolverse numéricamente para obtener el valor de T_m correspondiente, para valores dados de velocidad de barrido y de concentración de Zn^{2+} .

Esos valores de T_m se comparan con los experimentales de las Tablas 5.2.I y 5.2.II, obtenidos de las transiciones de DSC, en la Figura 5.2.12. Está bien claro que el modelo cinético propuesto explica perfectamente tanto el efecto de la concentración de Zn^{2+} como el efecto de la velocidad de barrido en los valores de T_m de las transiciones de DSC. Hay que resaltar que ningún modelo de equilibrio puede explicar un efecto de la velocidad de barrido sobre transiciones de DSC.

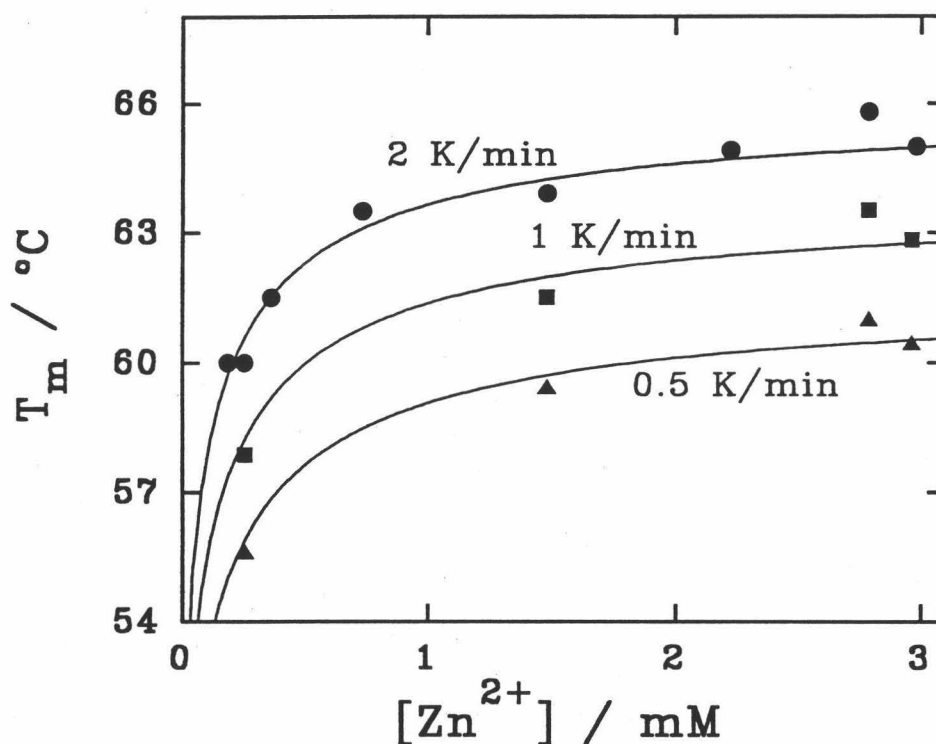


FIGURA 5.2.12: Efecto del Zn^{2+} en la T_m de las transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, a las velocidades de barrido indicadas en la gráfica. Comparación entre los datos experimentales (símbolos) y la variación predicha por el modelo (línea continua) obtenida a partir de la resolución numérica de la Ecuación 5.2.13 (ver texto).

Con respecto a los experimentos de DSC con CPB en pirofosfato 1 y 20 mM, pH 9.0 en presencia de $1\mu M$ $ZnCl_2$, descritos en el Apartado 5.1, la razón de que no siguieran el modelo cinético de dos estados puede ahora explicarse fácilmente. El ligero exceso de $ZnCl_2$

fue añadido con el fin de preservar el ion Zn^{2+} en el centro activo. Es de suponer que al desnaturalizarse las proteínas liberen el Zn^{2+} al medio. Dado que la concentración de proteína normalmente utilizada en los experimentos de DSC osciló entre 10 y 100 μM , el Zn^{2+} que aportaban al medio era considerablemente superior al puesto previamente en el tampón, por lo que durante el barrido se produce un aumento continuo de la concentración de Zn^{2+} libre. De acuerdo con la Ecuación 5.2.7, esto hace que la variación de la constante de velocidad aparente de primer orden, k_{ap} , del proceso de desnaturalización, a lo largo de la transición dependa de la concentración de proteína desnaturalizada (que ha liberado Zn^{2+}) y no sólo de la temperatura. Esto motiva la desviación encontrada en estas condiciones respecto del modelo cinético de dos estados. La racionalización cuantitativa del efecto a $1\mu M$ de $ZnCl_2$ no ha sido abordada dada la dificultad que plantea la variabilidad de la concentración del Zn^{2+} .

5.2.4 Desnaturalización térmica de CPB en presencia de 1,10-fenantrolina.

La 1,10-fenantrolina es un complejante del Zn^{2+} que actúa como inhibidor de la CPB, extrayéndolo del centro activo (Folk et al., 1960). Parece pues coherente que las transiciones de DSC obtenidas en presencia de este inhibidor correspondan a la desnaturalización térmica de la proteína sin Zn^{2+} unido (E).

Se han hecho experimentos de DSC con CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de 1,10-fenantrolina 5 mM (concentración muy superior a la necesaria para que la actividad de la CPB sea cero), a 2, 1 y 0.5 K/min. La pérdida de la actividad enzimática de la CPB se comprobó previamente a estos experimentos de DSC. Las transiciones obtenidas también se han encontrado completamente irreversibles y fuertemente dependientes de la velocidad de barrido, como puede verse en la Figura 5.2.13 y en la Tabla 5.2.V.

La aplicación del modelo cinético de dos estados se muestra en la Figura 5.2.14. Los parámetros cinéticos obtenidos se recogen en la Tabla 5.2.V. Se puede apreciar que las transiciones se describen adecuadamente mediante el citado modelo, coincidiendo los valores de la constante de velocidad, k_{ap} , obtenidos a diferentes velocidades de barrido.

De los valores de la Tabla 5.2.V se aprecia que la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de 1,10-fenantrolina 5mM, es decir, sin Zn^{2+} unido, se desestabiliza mucho, bajando la T_m de las transiciones hasta valores cercanos a las temperaturas

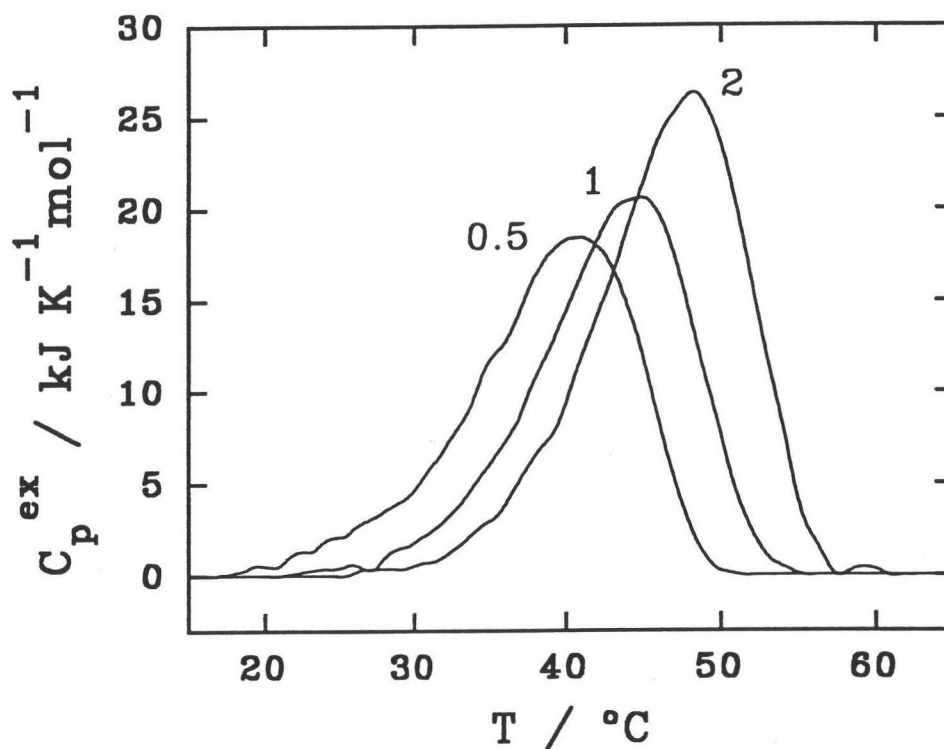


FIGURA 5.2.13: Curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de 5 mM 1,10-fenantrolina, obtenidas a las velocidades de barrido indicadas.

fisiológicas. Como dato significativo basta decir que en estas condiciones, a 37 °C, la constante de velocidad de desnaturalización tiene un valor de 0.045 min^{-1} , o dicho de otra forma, a esta temperatura la proteína se desnaturaliza con una vida media de 20 minutos.

Para corroborar estos resultados se realizaron experimentos de inactivación térmica a temperatura constante. Previamente a estos experimentos se comprobó que diluyendo la proteína, inactivada por la presencia de la 1,10-fenantrolina, en un tampón con un exceso de Zn^{2+} , se recuperaba la actividad enzimática tal y como se describe en la Bibliografía (Folk et al., 1960). Los resultados de los experimentos de inactivación térmica se muestran en la Figura 5.2.15, donde se puede apreciar que no hay efecto de la concentración de proteína en las cinéticas de desnaturalización térmica, y que los ajustes a la ecuación de velocidad

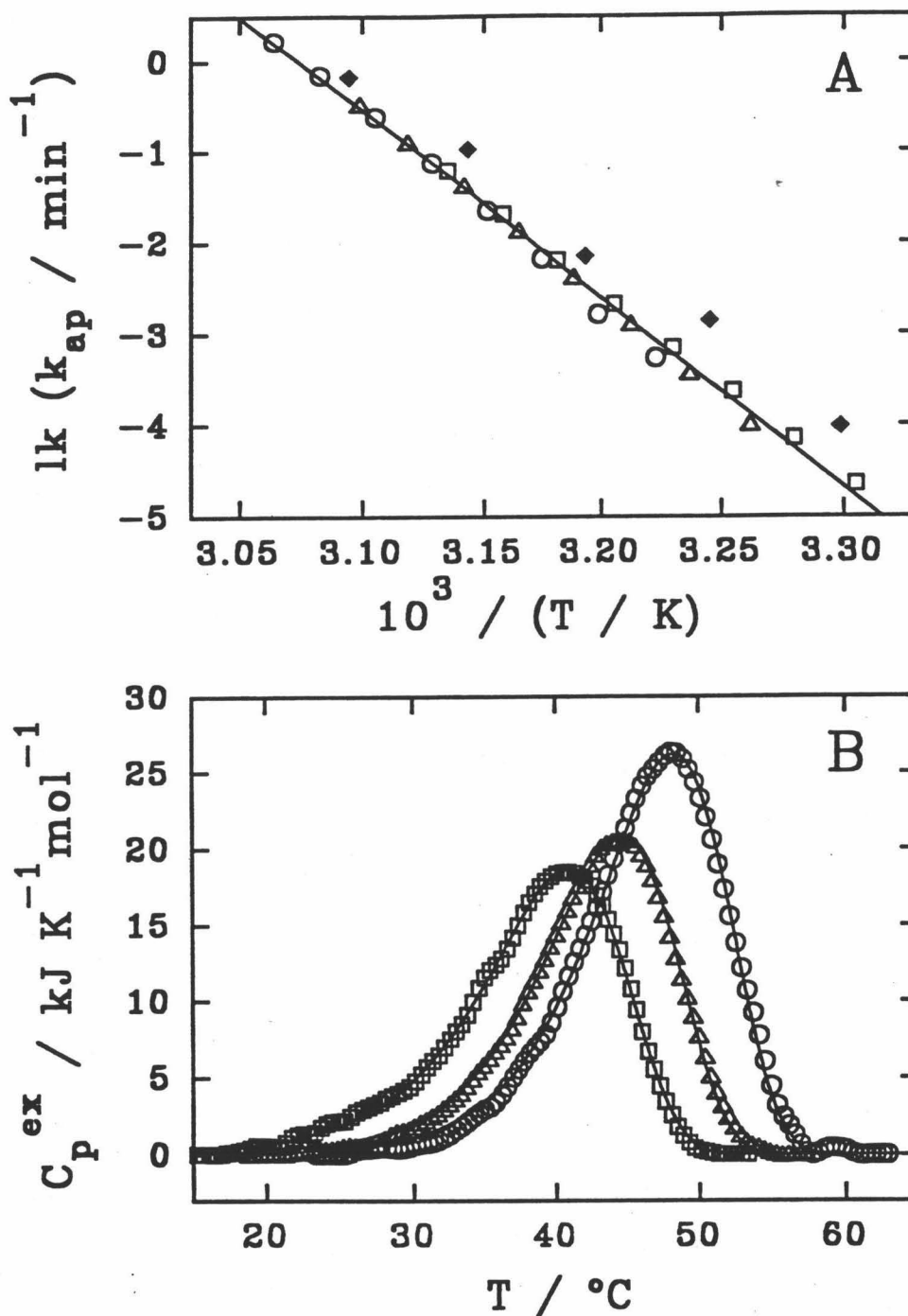


FIGURA 5.2.14: Aplicación del modelo cinético de dos estados a las curvas de $C_p^{\text{ex}}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de 1,10-fenantrolina. (A) Representación de Arrhenius (método A del modelo; ver Apartado 4.2.1). (B) Ajustes no lineales de mínimos cuadrados de las curvas de $C_p^{\text{ex}}(T)$ predichas por el modelo (Ecuación 4.31, Apartado 4.2.1) a las obtenidas experimentalmente (método E del modelo). Los símbolos huecos indican las diferentes velocidades de barrido: (○) 2.0 K/min; (Δ) 1.0 K/min; (□) 0.5 K/min. El símbolo (◆) indica los valores obtenidos de los experimentos de inactivación térmica.

Tabla 5.2.V

Temperatura del máximo de la transición, T_m , incremento de entalpía, ΔH , e incremento de capacidad calorífica, ΔC_p , para la desnaturalización térmica de la carboxipeptidasa B en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de 1,10-fenantrolina 5 mM, y a varias velocidades de barrido.

v (K/min)	T_m (°C)	ΔH (kJ/mol)	ΔC_p (kJ/K.mol)
2	48.1	292	4.6
1	44.5	242	1.6
0.5	41.0	232	2.4

Energías de activación, E, y temperaturas, T^* , a las que la constante de velocidad, $k_{ap}=1 \text{ min}^{-1}$, en °C, obtenidas por aplicación del modelo cinético de dos estados a las transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de 1,10-fenantrolina 5 mM, y a varias velocidades de barrido.

Método de cálculo:	A	B	C	D	E
E (kJ/mol):	177±10	159±1	190±15	184±13	182±11
	$E_{\text{media}}: 178\pm12$		$T^*: 52.1\pm0.3 \text{ °C}$		

integrada (Ecuación 5.2.2) son excelentes. Los valores de la constante de velocidad de primer orden obtenidos se han representado en la Figura 5.2.14A. Aunque hay una ligera desviación sistemática de estos valores, están en buen acuerdo con los obtenidos a partir de las transiciones calorimétricas.

Hemos supuesto que las transiciones de DSC obtenidas en presencia de 1,10-fenantrolina son debidas a la desnaturalización térmica de CPB sin Zn^{2+} unido, y hemos encontrado que esa desnaturalización térmica es un proceso irreversible con una cinética de primer orden. Parece razonable pensar que las constantes de velocidad calculadas de las transiciones de DSC corresponden a la constante k_E :

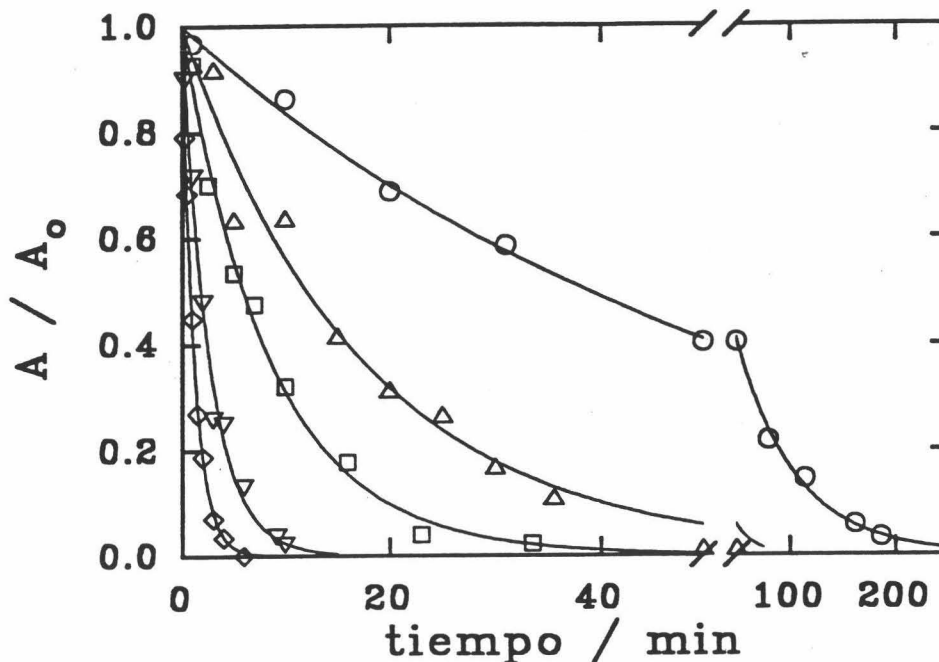
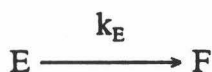


FIGURA 5.2.15: Cinéticas de inactivación térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de 1,10-fenantrolina. Las temperaturas de trabajo son: (○) 30.0°C, (Δ) 35.0°C, (□) 40.0°C, (▽) 45.0°C, (◇) 50.0°C. Las líneas continuas representan los mejores ajustes a una curva exponencial de primer orden (Ecuación 5.2.2).

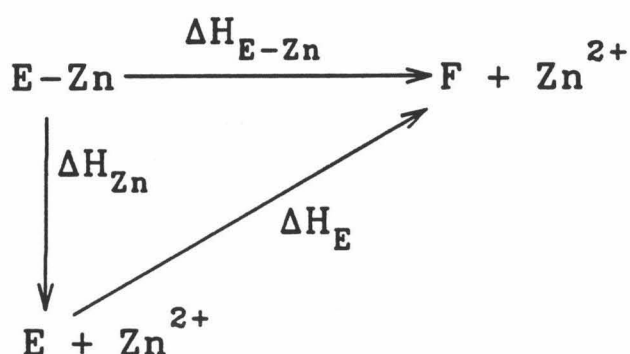


que aparecía en el esquema del Apartado 5.2.3.

Los valores obtenidos aquí para k_E , junto con los de $k_E K$ previamente determinados, nos permiten determinar la constante de equilibrio de disociación del Zn^{2+} , K . Sin embargo, este cálculo sólo puede ser aproximado, ya que implica la extrapolación de las dependencias de Arrhenius de k_E y $k_E K$ fuera de los intervalos de temperatura en que fueron determinadas, ya que esos intervalos no solapan entre sí. No obstante, es interesante que los valores aproximados de K calculados de esta forma indican que en presencia de las concentraciones

de Zn^{2+} empleadas en los experimentos calorimétricos (0.19-3.0 mM) la concentración de E (sin Zn^{2+} unido) es muy baja, tal y como se había supuesto en un principio ($K=0.0009$ mM a 27 °C, $K=0.01$ mM a 53 °C, y $K=0.06$ mM a 72 °C).

Una estimación aproximada del incremento de entalpía de disociación del Zn^{2+} , ΔH_{Zn} , se puede obtener de la dependencia con la temperatura de la constante de equilibrio, K, utilizando la Ecuación de van't Hoff. El valor obtenido de esta forma para ΔH_{Zn} es de 82 kJ/mol. Puede entonces plantearse el siguiente ciclo termodinámico:



La relación entre los incrementos de entalpía que aparecen en el esquema es la siguiente:

$$\Delta H_{E-Zn} = \Delta H_E + \Delta H_{Zn} \tag{5.2.14}$$

Cada uno de los valores de incremento de entalpía del ciclo termodinámico anterior ha sido determinado como sigue:

-Los valores de ΔH_{E-Zn} se determinan de las transiciones de DSC obtenidas en presencia de concentraciones de Zn^{2+} mucho mayores que la concentración de proteína (valores de ΔH de las Tablas 5.2.I y 5.2.II).

-Los valores de ΔH_E se obtienen de las transiciones de DSC obtenidas en presencia de 1,10-fenantrolina 5 mM.

-Los valores de ΔH_{Zn} se han calculado de la dependencia de K con la temperatura como anteriormente se ha descrito.

Nótese que los valores de ΔH_{E-Zn} y ΔH_E corresponden a diferentes temperaturas (temperatura del máximo de la transición de DSC, T_m). Podemos calcular los valores para ΔH_{E-Zn} para las temperaturas correspondientes a la T_m de las transiciones obtenidas en presencia de 1,10-fenantrolina mediante la Ecuación 5.2.14 y los correspondientes valores

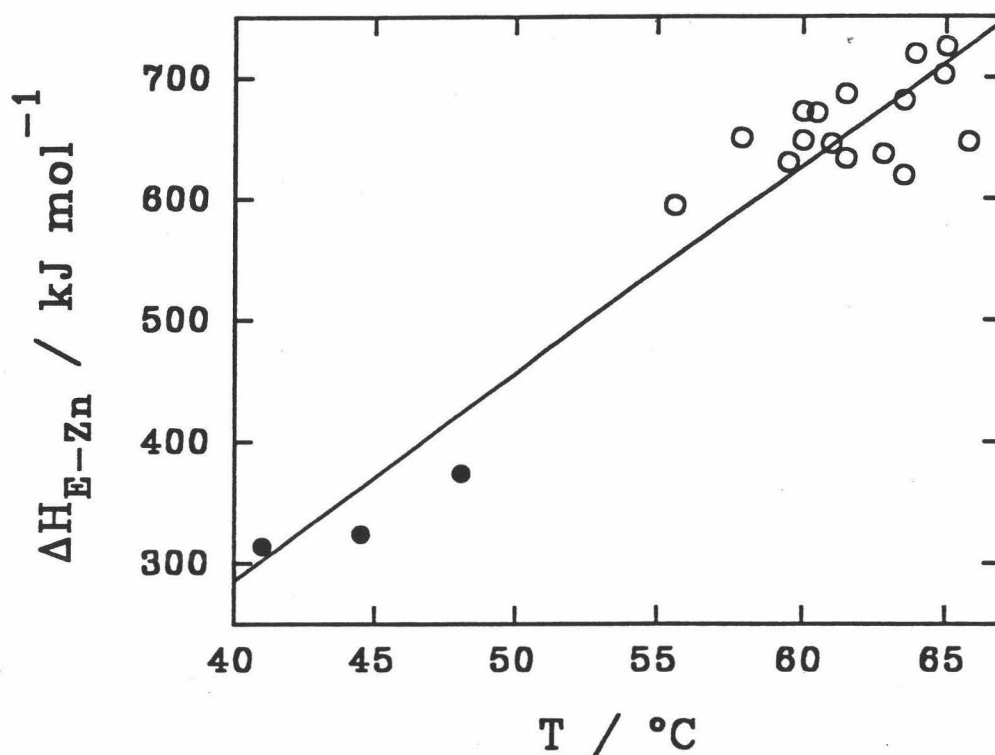


FIGURA 5.2.16: Representación de ΔH_{E-Zn} frente a la temperatura para la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0. Los símbolos huecos (○) representan los valores experimentales de la Tabla 5.2.II. Los símbolos rellenos (●) representan los valores obtenidos a partir de la Ecuación 5.2.14, utilizando los valores de la Tabla 5.2.V, asignados a ΔH_E , y el valor de ΔH_{Zn} estimado de 82 kJ/mol (ver texto). La línea continua representa la recta de ajuste de mínimos cuadrados a todo el conjunto de puntos. El ΔC_p obtenido de la pendiente de este ajuste es $17 \pm 2 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

de ΔH_E y el valor de ΔH_{Zn} anteriormente determinado (82 kJ/mol) (ΔH_{Zn} se ha supuesto independiente de la temperatura). En la Figura 5.2.16 se muestra la representación de los valores de ΔH_{E-Zn} calculados de esta forma junto a los experimentales. El ajuste lineal a una recta proporciona un ΔC_p de desnaturalización de $17 \pm 2 \text{ kJ/K.mol}$, valor que está en acuerdo razonable con la media de los valores de ΔC_p determinados de las transiciones individuales de DSC ($10 \pm 2 \text{ kJ/K.mol}$). Naturalmente, este análisis es sólo aproximado, basado en un valor estimado para ΔH_{Zn} que se ha supuesto independiente de la temperatura. Además hemos

supuesto que el estado desnaturalizado irreversiblemente, F, es un único estado macroscópico. Este análisis debe entenderse únicamente como indicativo de que el valor estimado de ΔH_{Zn} resulta consistente con los valores de entalpía calorimétrica de desnaturalización determinados de las transiciones de DSC.

El modelo cinético aquí propuesto sólo es capaz de explicar el efecto del Zn^{2+} encontrado hasta una concentración de $Zn^{2+} < 3mM$. A partir de esta concentración el efecto se desvía del comportamiento predicho por el modelo propuesto (ver Figura 5.2.17). En cualquier caso, a $[Zn^{2+}] = 5.55 mM$, las transiciones de DSC siguen el modelo cinético de dos estados y las cinéticas de inactivación térmica son de primer orden con constantes de velocidad que concuerdan muy bien con las obtenidas de las transiciones calorimétricas (ver Figura 5.2.5). Los datos de T_m para $[Zn^{2+}] > 3 mM$ sugieren que a esas concentraciones el ion Zn^{2+} interaccionaría en otros sitios de unión de la CPB con menor afinidad, tal y como está descrito para la enzima homóloga CPA (Larsen y Auld, 1989). Simulaciones de la dependencia de T_m con $[Zn^{2+}]$ para un modelo cinético que tiene en cuenta una interacción adicional con Zn^{2+} predicen un incremento de T_m similar al encontrado. Este modelo predice asimismo una cinética aparente de primer orden, con una constante de velocidad aparente, k_{ap} , con una dependencia compleja con el Zn^{2+} . Sin embargo, dado que el límite de solubilidad del Zn^{2+} en el tampón utilizado está en $\approx 8-10 mM$, este efecto no ha podido investigarse en profundidad.

En resumen, se puede decir que las transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, en presencia de concentraciones de Zn^{2+} mucho mayores que la concentración de proteína son calorimétricamente irreversibles. Pueden describirse cuantitativamente mediante el modelo cinético de dos estados, con una cinética de primer orden (Sánchez-Ruiz et al., 1988a). Por tanto, la absorción de calor que genera las transiciones de DSC está determinada completamente por la velocidad de formación del estado final (irreversiblemente desnaturalizado) y ninguna información termodinámica (excepto el incremento de entalpía total de desnaturalización) puede derivarse de las transiciones.

El efecto de la concentración de Zn^{2+} (hasta 3 mM) en las transiciones de DSC se ha

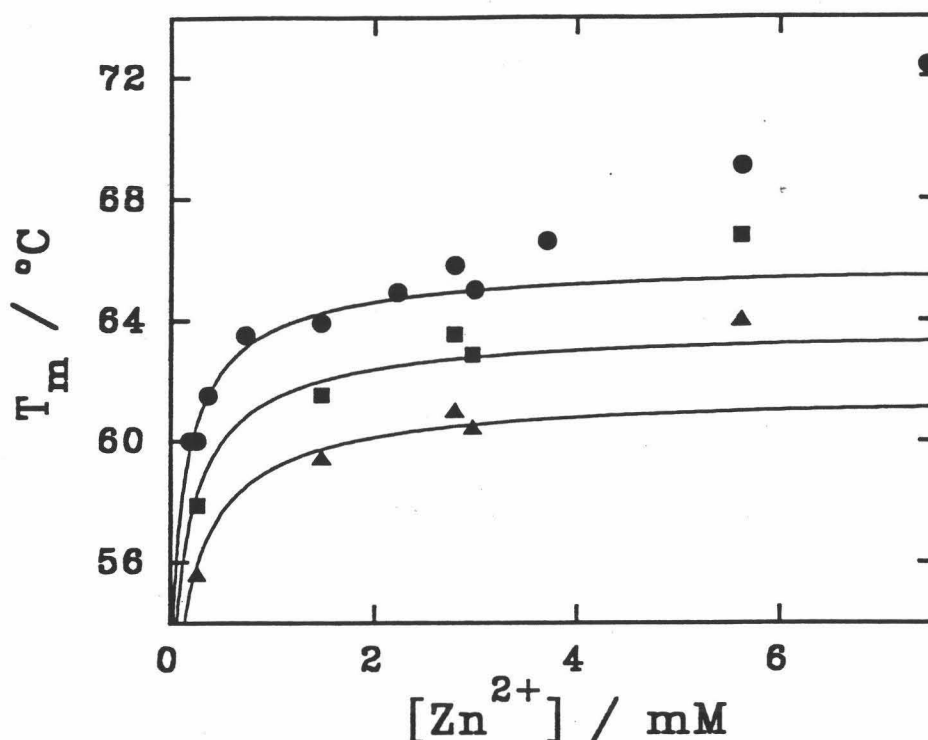


FIGURA 5.2.17: Efecto de la concentración de Zn^{2+} , para valores mayores de 3mM, en la T_m de las transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0. Los símbolos indican las velocidades de barrido: (○) 2.0 K/min; (□) 1.0 K/min; (Δ) 0.5 K/min. Comparación entre los datos experimentales (símbolos) y la variación predicha por el modelo cinético desarrollado en el Apartado 5.2.3 (línea continua) obtenida a partir de la resolución numérica de la Ecuación 5.2.13 (ver texto).

explicado mediante un modelo cinético muy sencillo. Por supuesto, este modelo puede modificarse o incluso rechazarse a la luz de nueva información experimental. Sin embargo, independientemente de las hipótesis específicas de este modelo cinético, algunos puntos importantes se derivan de los resultados aquí expuestos:

A) Contrariamente al punto de vista expresado por varios autores en la Bibliografía reciente (Manly et al., 1985; Edge et al., 1985; Hu y Sturtevant, 1987; Sturtevant, 1987) el hecho de que el efecto de ligandos en los valores de T_m parezca seguir la Ecuación de van't Hoff no constituye evidencia alguna en apoyo a la aplicación de la Termodinámica del Equilibrio al análisis de transiciones irreversibles de DSC.

B) El efecto de ligandos en transiciones irreversibles de DSC puede explicarse utilizando modelos cinéticos que incluyen la disociación del ligando como etapa de equilibrio

previa.

C) Independientemente del modelo cinético propuesto, la razón inmediata del efecto del Zn^{2+} sobre la desnaturalización térmica de la CPB es el hecho de que al incrementarse la concentración del Zn^{2+} se produce una disminución de la velocidad de desnaturalización irreversible de la proteína.

5.3 Estudio de la desnaturalización térmica de la termolisina por calorimetría diferencial de barrido.

Como se describe en el Capítulo 2, los estudios de la desnaturalización térmica de la termolisina (TLN) previos a este Trabajo, tanto mediante DSC como por otras técnicas, se caracterizan por una completa irreversibilidad del proceso. En un estudio anterior realizado mediante DSC en este Departamento, se obtuvo que la desnaturalización irreversible de la TLN, a pH neutro, sigue el modelo cinético de dos estados (Sánchez-Ruiz et al., 1988a). Se ha propuesto que la razón de dicha irreversibilidad es el proceso de autólisis a temperaturas elevadas de un estado de la proteína total o parcialmente desplegado. En esta Memoria se ha extendido el estudio por DSC de la desnaturalización térmica de la TLN, incidiendo principalmente en la investigación de condiciones experimentales que puedan afectar al proceso de autólisis inducida térmicamente e intentando racionalizar la forma en que se modifica la estabilidad de la proteína en las diversas condiciones de trabajo.

En principio se pensó que si se consiguiera eliminar la autólisis del proceso de desnaturalización, podrían incluso encontrarse condiciones experimentales para un desplegamiento reversible de la TLN, con las múltiples ventajas que esto conlleva en el estudio de la estabilidad y el desplegamiento de las proteínas. Al inicio de este estudio el fin que se perseguía era la realización de un estudio termodinámico completo de la estabilidad térmica de la TLN en conjunción con el estudio de algunos de sus fragmentos aislados (que se describirá posteriormente en el Apartado 5.4). Sin embargo, adelantamos ahora que la desnaturalización térmica de la termolisina, en todas y cada una de las condiciones investigadas en esta Memoria, ha sido completamente irreversible y cinéticamente controlada, lo que imposibilita el abordaje termodinámico previsto, de forma que, en el mejor de los casos, sólo es posible extraer información cinética del proceso.

Dada la limitación termodinámica, debe hacerse notar que la finalidad de este estudio con la TLN no ha sido tanto explicar exhaustiva y cuantitativamente los diversos procesos y mecanismos irreversibles que pueda experimentar la proteína bajo las diversas condiciones experimentales probadas, sino más bien conocer y racionalizar en qué sentido y medida estas condiciones (pH, concentración de proteína, presencia de inhibidores, concentración de

caciones esenciales) modifican su estabilidad, así como el posible efecto que tienen en los procesos responsables de la irreversibilidad global del proceso térmico.

5.3.1 Efecto del pH en la desnaturalización térmica de la termolisina.

Como primera variable a modificar en el estudio por DSC de la termolisina se eligió el pH del medio. Estudios previos del efecto del pH en la actividad peptidásica de la TLN frente a los sustratos normalmente utilizados, indican que a temperatura ambiente dicha actividad baja prácticamente a cero a pH 5.0 y a pH 9.0, exhibiendo máxima actividad a pH neutro (Feder y Schuck, 1970). Por otra parte, está descrito que, en valores pH comprendidos entre 6 y 10, la proteína es completamente estable al dializarse durante 96 horas a temperatura ambiente y a una concentración de muestra de ≈ 1 mg/ml, produciéndose sin embargo degradación autolítica apreciable de la proteína por debajo de pH 6 (Holmquist y Vallee, 1974). Los autores de este estudio atribuyen esta inestabilidad de la TLN a la pérdida a pH ácido del efecto protector de los iones Ca^{2+} frente a la autólisis. Es bien sabido que los iones Ca^{2+} protegen diversos giros de la cadena expuestos al medio frente a la proteólisis uniéndose a restos de aspártico y glutámico situados en esos giros (Colman et al., 1972). Estos restos tienden a protonarse a pH ácido debilitando la unión del ion Ca^{2+} y por tanto su efecto protector. Por tanto, la disminución de actividad enzimática de la TLN a baja temperatura y a pH ácido parece deberse a su autodegradación proteolítica.

La autólisis a alta temperatura debe depender de la actividad enzimática de la TLN. Si el control de la velocidad del proceso cinético de desnaturalización térmica es debido total o parcialmente a la autólisis, es lógico pensar que modificando el pH, al modificarse la actividad enzimática, debe afectarse la estabilidad térmica de la proteína.

Se han realizado experimentos de DSC a 2 K/min con muestras dializadas previamente frente a tampones de pH 3.0, 4.0, 4.5 y 5.0, con el fin de comprobar la existencia o no de transiciones de DSC a estos valores ácidos de pH. Además se han realizado experimentos de DSC a varias velocidades de barrido a pH 7.5, utilizado como referencia, y a pH 9.0, donde la enzima es prácticamente inactiva a baja temperatura frente a los sustratos usuales de ensayo.

A pH 3.0 y 4.0 no se encontró ninguna transición calorimétrica en un barrido de DSC entre 10 y 110°C. A pH 4.5 se obtuvo una transición irreversible de entalpía muy pequeña.

SDS-PAGE realizada con las muestras que habían sido dializadas a 4°C en esos medios, previamente al experimento de DSC, mostró que a pH 3.0 y 4.0 no aparece ninguna banda en el gel de electroforesis, lo que indica que en estos medios la proteína no es estable a baja temperatura, produciéndose una autodigestión completa y explicándose así la no aparición de transición en los experimentos de DSC. A pH 4.5 en SDS-PAGE aparece la banda correspondiente a TLN, junto con bandas correspondientes a fragmentos de degradación, de peso molecular menor. Parece que a este pH también existe degradación autolítica a baja temperatura, aunque más lenta e incompleta por lo que aparece una transición pequeña. Estos mismos experimentos de SDS-PAGE a pH 5.0 mostraron sólo la banda correspondiente a TLN indicando que a este pH la degradación de la TLN durante las 24 horas de diálisis a 4°C es muy lenta y no ha procedido en forma significativa.

Los experimentos de DSC a pH 5.0, 7.5 y 9.0 se realizaron en los siguientes medios y concentraciones de TLN:

-Acetato sódico 10 mM, acetato cálcico 10 mM, NaCl 0.1 M, pH 5.0. $C_{TLN}=0.56$ mg/ml.

-HEPES 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.5. $C_{TLN}=0.72$ mg/ml.

-Tetraborato sódico 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 0.1 M, pH 9.0. $C_{TLN}=1.5$ mg/ml.

Se añadió $ZnCl_2$ 100 μ M a todas las disoluciones con el fin de mantener un exceso de Zn^{2+} en el medio, ya que el Zn^{2+} es cofactor de la TLN como ocurría con la CPB. En experimentos en los que no se añadió $ZnCl_2$ en exceso, los resultados fueron extraños e irreproducibles con la aparición de transiciones deformadas o bien con más de un máximo.

En la Figura 5.3.1 se muestran registros experimentales de DSC a 2 K/min, tras restar la línea base instrumental y realizar la corrección dinámica, obtenidos en las condiciones arriba mencionadas. Todas las transiciones obtenidas fueron completamente irreversibles. Este resultado ya se había obtenido en un trabajo anterior en este Departamento con TLN a pH 7.5 en las mismas condiciones aquí utilizadas (Sánchez-Ruiz et al., 1988a). Nosotros hemos repetido estos mismos experimentos a pH 7.5 a modo de control, obteniendo resultados similares a los publicados.

Lo primero que se aprecia a simple vista de la Figura 5.3.1 es que al subir el pH la entalpía de las transiciones, ΔH , aumenta, mientras que disminuye la temperatura del máximo, T_m . En la Tabla 5.3.I se muestran los parámetros calorimétricos de estas

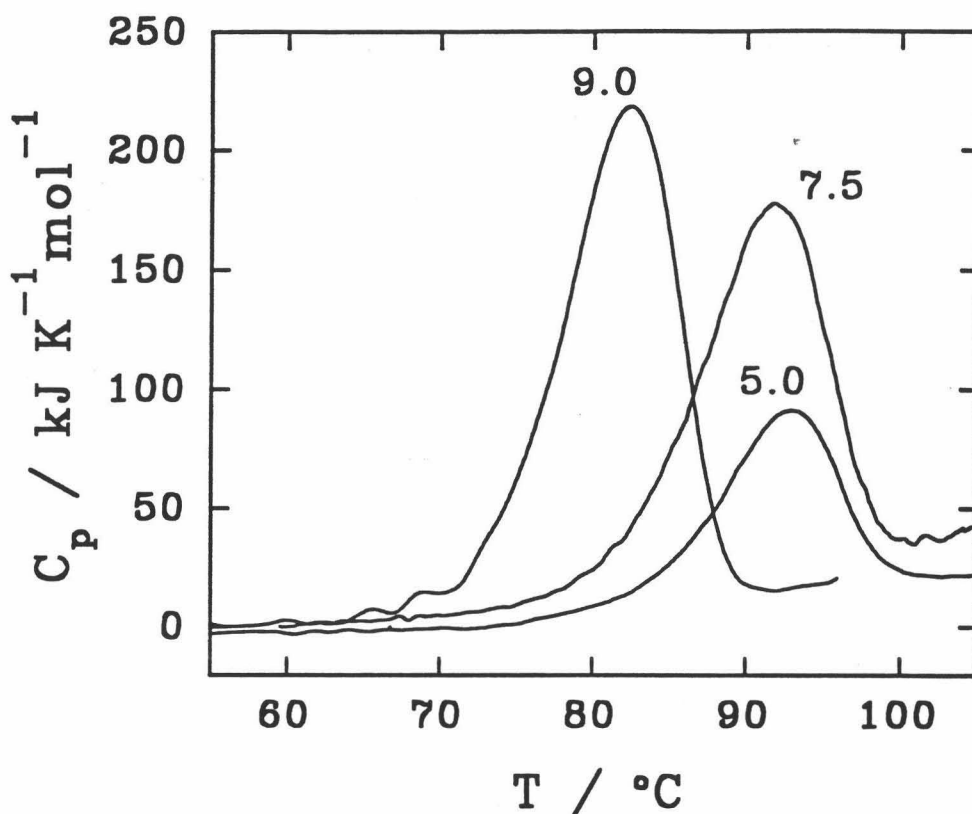
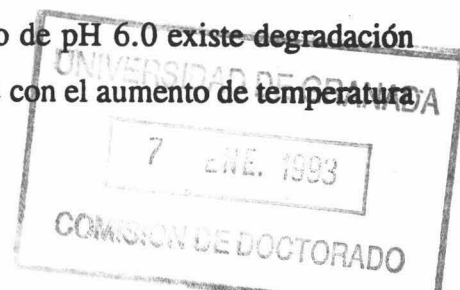


FIGURA 5.3.1: Efecto del pH en la desnaturalización térmica de la TLN. Curvas de $C_p(T)$ tras restar la línea base instrumental para los valores de pH indicados junto a las curvas. Los experimentos se realizaron a una velocidad de barrido de 2 K/min, en las condiciones descritas en el texto.

transiciones. Los valores de ΔC_p obtenidos de las transiciones son en general grandes y positivos. Esto podría indicar que la entalpía del proceso de desnaturalización en este caso no sólo depende de la temperatura sino que también depende fuertemente del pH del medio. La entalpía específica obtenida a pH 7.5 concuerda muy bien con la descrita para proteínas globulares compactas (Privalov, 1979). A pH 9.0 este valor es incluso algo superior, quedando a pH 5.0, sin embargo, bastante por debajo de lo esperado para la temperatura a la que ocurre la transición, y cercano a los valores descritos para proteínas menos compactas. Como hemos mencionado antes, está descrito que por debajo de pH 6.0 existe degradación autolítica a baja temperatura, que lógicamente debe acelerarse con el aumento de temperatura.



durante un barrido. Esto sugiere claramente que cuando ocurre la transición, la concentración real de proteína presente ha disminuido ostensiblemente, obteniéndose una transición de entalpía sensiblemente inferior a la real para la concentración inicial de muestra, aunque a pH 5.0 se hayan obtenido los valores de T_m más elevados.

Tabla 5.3.I

Entalpía molar, ΔH , y específica, Δh , temperatura del máximo, T_m , e incremento de capacidad calorífica, ΔC_p , para la desnaturalización de la termolisina a varios valores de pH y varias velocidades de barrido.

pH	v K/min	ΔH KJ/mol	Δh J/g	T_m °C	ΔC_p kJ/K.mol
5.0	2	814	23.5	92.5	23
	1	567	16.4	90.0	13
	0.5	390	11.2	87.9	17
7.5	2	1865	53.9	91.1	23
	1	1608	46.4	88.7	23
	0.5	1794	51.8	86.1	33
9.0	2	2009	58.1	82.2	15
	1	2135	61.7	80.1	19
	0.5	2052	59.3	77.9	-

Dado que la irreversibilidad de las transiciones de DSC encontrada sugiere un posible control cinético del proceso de desnaturalización, se han realizado experimentos de DSC a 3 velocidades de barrido. Las curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas, eliminada la contribución de la línea base química, se muestran en la Figura 5.3.2 y en la Tabla 5.3.I se incluyen los parámetros característicos de dichas transiciones para diferentes velocidades de barrido. Puede apreciarse el fuerte efecto de la velocidad de barrido en la T_m de las transiciones en los tres valores de pH investigados, tal y como se esperaba, de forma que la desnaturalización térmica de la TLN es un proceso irreversible cinéticamente controlado, por lo que las transiciones de DSC en ningún caso son analizables desde el punto de vista termodinámico. A pH 7.5 ya se sabía que la cinética aparente del proceso es de primer

orden, dado que las transiciones de DSC siguen el modelo cinético de dos estados, con una energía de activación de 282 ± 10 kJ/mol (Sánchez Ruiz et al., 1988a), lo cual se confirma con nuestros resultados a la concentración de TLN utilizada (0.7 mg/ml) (ver Figura 5.3.3). A pH 9.0 hemos encontrado igual comportamiento, es decir, el proceso térmico sigue cuantitativamente ese modelo, con una energía de activación para el proceso cinético de primer orden de 303 ± 14 kJ/mol (Figura 5.3.3).

A pH 5.0 hay una gran disminución de la entalpía de las transiciones al bajar la velocidad de barrido. Este efecto en la entalpía no se puede justificar únicamente por el efecto del ΔC_p al disminuir la temperatura a la que ocurren las transiciones, por lo que parece que el calor absorbido por el proceso de desnaturalización depende del tiempo que transcurre durante el barrido de DSC. Esto es de nuevo coherente con que a pH 5.0 exista una degradación autolítica del estado nativo de la proteína a lo largo del barrido de temperatura y previamente a la transición calorimétrica, degradación que es más extensa lógicamente cuanto menor es la velocidad de barrido. La existencia de diferentes "camino" para la desnaturalización térmica de proteínas, junto con su dependencia con factores como el pH, ha sido descrita recientemente (Klibanov y Ahern, 1987; Volkin y Klibanov, 1989) y comentada anteriormente en el Apartado 5.1.1.

No se detecta efecto térmico alguno previamente a la transición que sea reflejo del proceso de degradación a baja temperatura. Esto podría entenderse si suponemos que la rapidez con que se incrementa la velocidad de degradación del estado nativo de la TLN con el aumento de la temperatura a lo largo del barrido es pequeña, es decir, la energía de activación del proceso, es muy baja. Esto produciría que el calor puesto en juego en la desnaturalización por autólisis del estado nativo se distribuya a lo largo del gran intervalo de temperatura existente entre el comienzo del barrido y la transición calorimétrica. Esta situación sería similar a la que se produce para procesos de equilibrio no cooperativos, cuyas anchas transiciones no son detectables mediante DSC.

Las transiciones obtenidas a pH 5.0 siguen el modelo cinético de dos estados, obteniéndose una energía de activación del proceso $E=302 \pm 23$ kJ/mol (ver Figura 5.3.3). Esto indica que la cinética aparente del proceso de desnaturalización a alta temperatura, responsable de la aparición de la transición, es de primer orden. Es conveniente hacer notar que la concentración de proteína "real" que produce la transición de DSC no interviene en

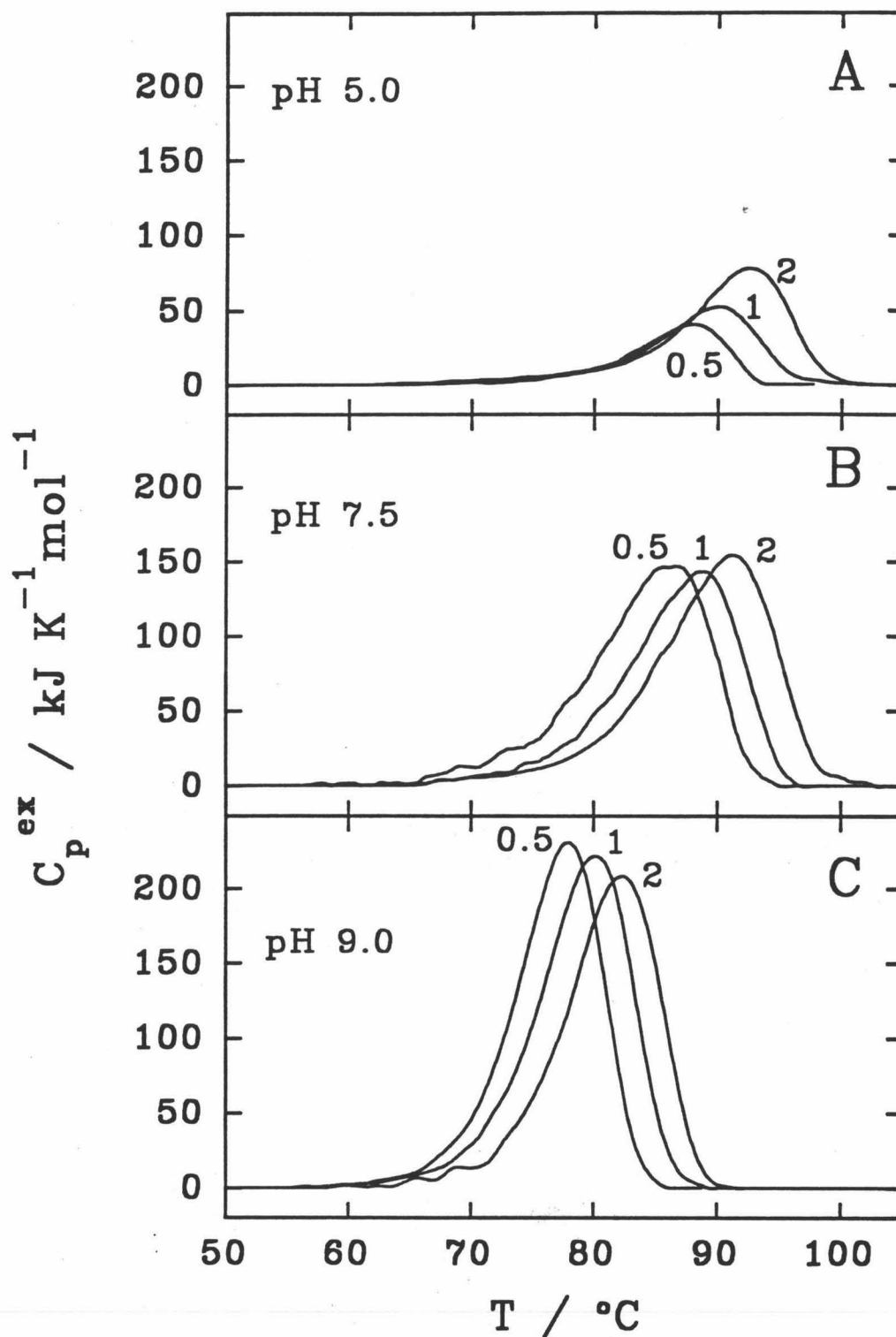


FIGURA 5.3.2: Efecto de la velocidad de barrido en la desnaturalización térmica de la TLN. Curvas de capacidad calorífica de exceso, $C_p^{ex}(T)$, obtenidas a las velocidades de barrido, en K/min, que se indican junto a las curvas, para los valores de pH siguientes: (A) pH 5.0; (B) pH 7.5; (C) pH 9.0. Las condiciones en que se realizaron los experimentos se describen en el texto.

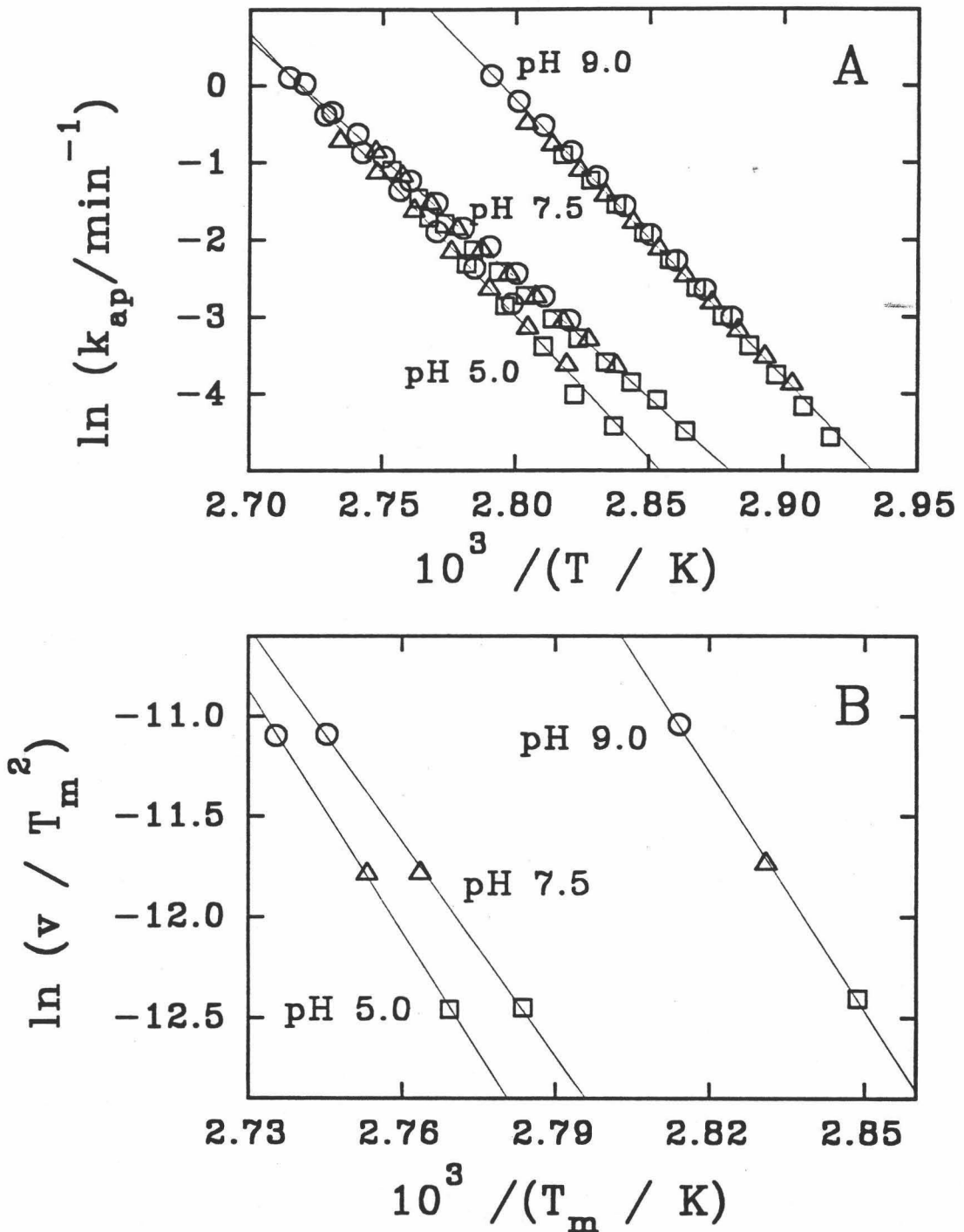


FIGURA 5.3.3: Aplicación del modelo cinético de dos estados a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ mostradas en la figura 5.3.2. (A) Representación de Arrhenius para las constantes de velocidad de primer orden calculadas por el modelo (método A; ver Apartado 4.2.1). (B) Representación de $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ (método B del modelo). Los símbolos indican las diferentes velocidades de barrido: (O) 2.0 K/min; (Δ) 1.0 K/min; (\square) 0.5 K/min. En las gráficas se indican los valores de pH a los que corresponden los datos.

ningún momento al aplicar el modelo cinético de dos estados, dadas las premisas del modelo (cinética de desnaturalización de primer orden).

Por tanto, se proponen dos procesos paralelos para la desnaturalización térmica irreversible de la TLN a pH 5.0:

-(Proceso 1): Autólisis del estado nativo, previa al desplegamiento, que puede ocurrir desde bajas temperaturas y que probablemente sea un proceso con una baja energía de activación, no detectable por DSC.

-(Proceso 2): Desplegamiento térmico seguido de la autólisis del estado desplegado, que ocurre a altas temperaturas y es responsable de la transición obtenida por DSC. Tiene una cinética aparente de primer orden y una energía de activación aparente elevada (del orden de 300 kJ/mol).

Al aumentar el pH se observa que la entalpía de las transiciones obtenidas se incrementa mucho, llegando a los 60 J/g a pH 9.0. Además, conforme sube el pH estos valores de entalpía dependen menos de la velocidad de barrido. En cambio, los valores de T_m disminuyen con el aumento del pH. A pH 7.5 y pH 9.0 la cinética aparente de la desnaturalización térmica es también de primer orden como se ha mencionado anteriormente. El hecho de que la entalpía de desnaturalización obtenida a pH 7.5 sea menor que a pH 9.0 podría atribuirse a que a pH 7.5 subsiste cierta autólisis del estado nativo (proceso 1) previa a la transición (análogamente aunque en mucha menor medida que la que ocurre a pH 5.0). La coexistencia de los dos procesos paralelos antes mencionados podría constituir, como veremos más adelante, un mecanismo general en la desnaturalización térmica de la TLN.

5.3.2 Efecto de la concentración de proteína.

La autólisis es un proceso bimolecular puesto que requiere la interacción entre dos moléculas de proteína. Anteriormente se ha establecido que la desnaturalización térmica de la TLN a alta temperatura sigue una cinética aparente de primer orden a las concentraciones de muestra utilizadas en esos experimentos. Sin embargo, sería lógico pensar que si la cinética del proceso de desnaturalización térmica estuviera total o parcialmente controlada por la cinética del proceso de autólisis, la concentración de muestra debería afectar a dicha cinética y, por tanto, a la estabilidad de la proteína. Al aumentar la concentración de proteína se favorecería en general la autólisis, conduciendo a una desestabilización de la TLN.

Por esta razón se han realizado experimentos de DSC a 2 K/min en HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 100 μ M, pH 7.5, modificando la concentración de TLN entre 0.3 y 3.7 mg/ml, este último valor muy cercano al límite de solubilidad de la TLN. Asimismo se ha estudiado el efecto de la velocidad de barrido a una concentración de muestra relativamente elevada (2.1 mg/ml). En la Figura 5.3.4 se muestran las curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas. Los parámetros característicos de las transiciones se exponen en la Tabla 5.3.II.

Tabla 5.3.II

Entalpía molar, ΔH , y específica, Δh , temperatura del máximo, T_m , e incremento de capacidad calorífica, ΔC_p , para la desnaturalización de la termolisina a varias concentraciones de muestra y varias velocidades de barrido.

C mg/ml	v K/min	ΔH KJ/mol	Δh J/g	T_m $^{\circ}$ C	ΔC_p kJ/K.mol
0.32	2	1953	56.4	90.5	34
0.56	2	1824	52.7	90.5	24
0.72	2	1865	53.9	91.1	23
0.88	2	1701	49.2	91.2	23
1.76	2	1627	47.0	91.3	19
2.10	2	1624	46.9	91.3	28
3.71	2	1373	39.7	91.6	20
0.72	1	1608	46.8	88.7	23
2.10	1	1549	44.8	89.2	24
0.72	0.5	1794	51.8	86.1	33
2.10	0.5	1367	39.5	86.8	24

Claramente se aprecia, tanto a la vista de la Figura 5.3.4A como de los valores de la Tabla, una dependencia de T_m y sobre todo de ΔH con la concentración de proteína en cada una de las velocidades de barrido. Mientras que el efecto en T_m es pequeño y quizá poco significativo, el efecto en ΔH es bastante apreciable. La disminución de entalpía al aumentar la concentración de muestra sugiere que la competencia entre los dos procesos de desnaturalización irreversible descritos en el Apartado anterior está presente también a pH

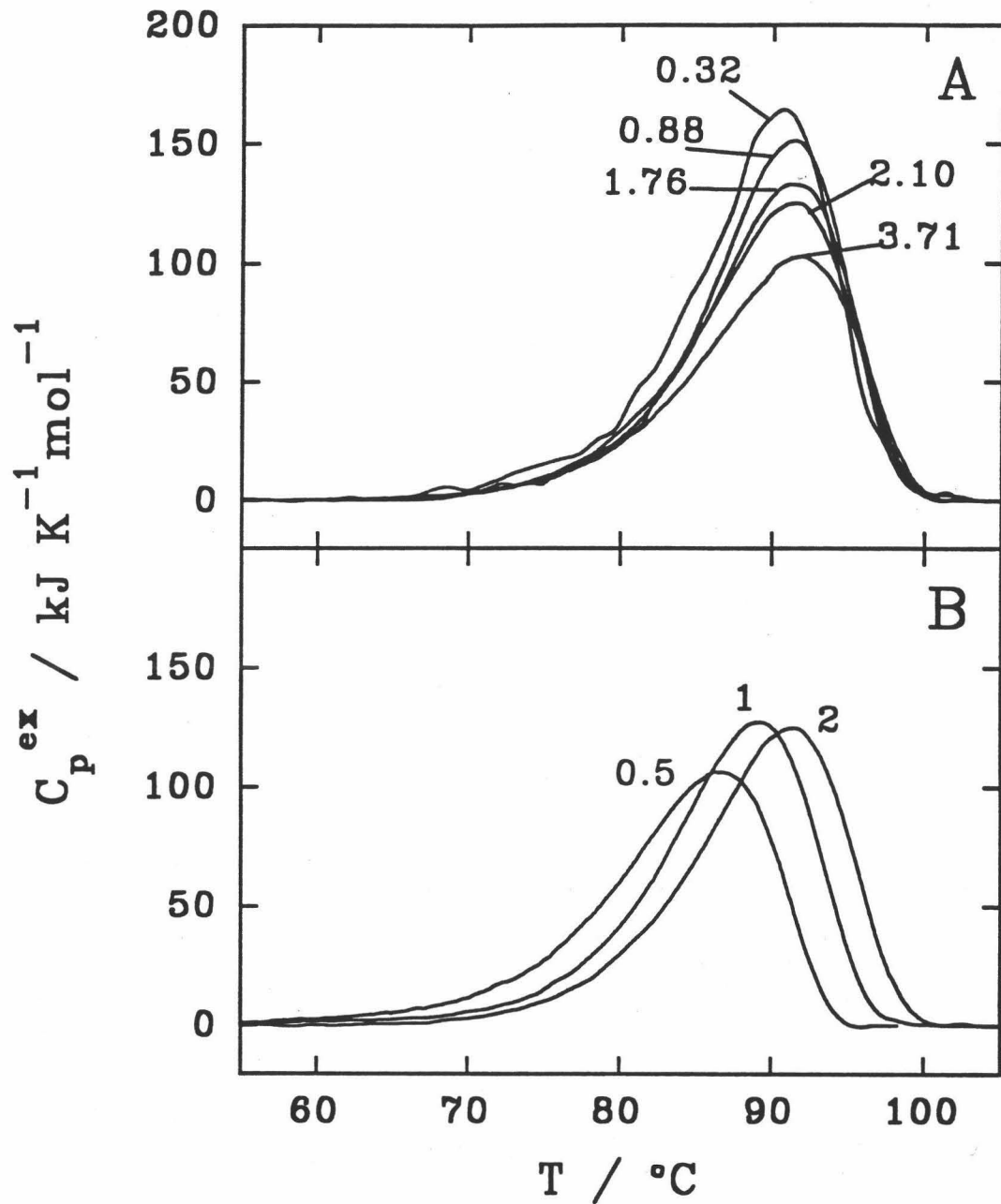


FIGURA 5.3.4: (A) Efecto de la concentración en las curvas de $C_p^{\text{ex}}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, CaCl_2 10 mM, pH 7.5. Los valores de concentración de muestra se indican junto a las curvas en mg/ml. (B) Efecto de la velocidad de barrido en las curvas de $C_p^{\text{ex}}(T)$ en las mismas condiciones de (A), obtenidas a una concentración de TLN de 2.1 mg/ml. Las velocidades de barrido están indicadas en la gráfica en K/min.

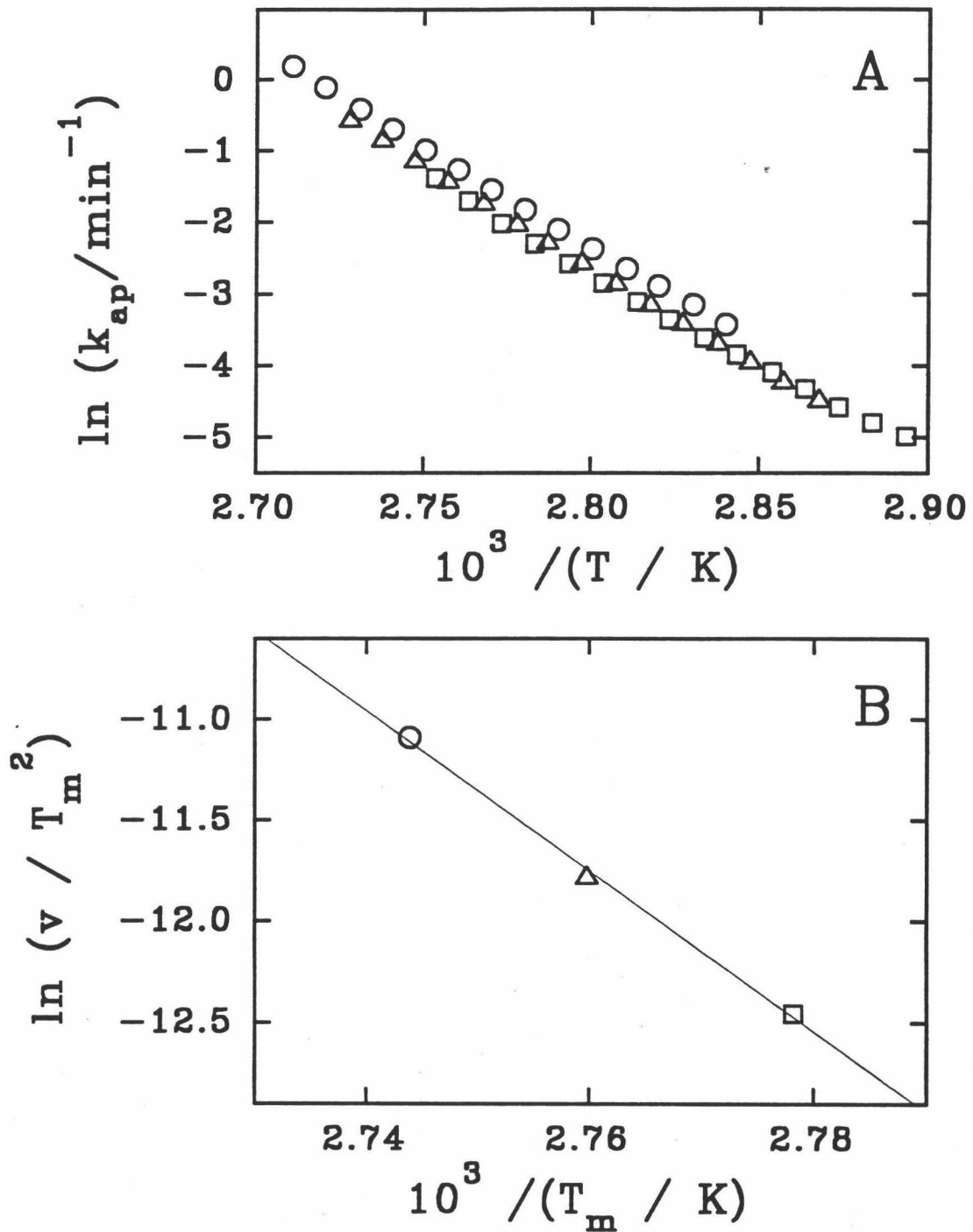


FIGURA 5.3.5: Aplicación del modelo cinético de dos estados a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ mostradas en la figura 5.3.4B, obtenidas a una concentración de TLN=2.1 mg/ml. (A) Representación de Arrhenius para las constantes de velocidad de primer orden calculadas por el modelo (método A; ver Apartado 4.2.1). (B) Representación de $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ (método B del modelo). Los símbolos indican las diferentes velocidades de barrido: (○) 2.0 K/min; (Δ) 1.0 K/min; (□) 0.5 K/min.

7.5, siendo esa competencia dependiente de la concentración de proteína.

En el Apartado anterior y en la Bibliografía se ha encontrado que el proceso de desnaturalización térmica de TLN a pH 7.5 sigue el modelo cinético de dos estados, con una cinética aparente de primer orden (Fujita et al., 1979; Sánchez-Ruiz et al., 1988a). El efecto de la concentración de proteína aquí encontrado es, en principio, contrario a aquel resultado si bien los estudios de la Bibliografía y el del Apartado 5.3.1 se han realizado a concentraciones de muestra inferiores a 1 mg/ml. El estudio del efecto de la velocidad de barrido en las transiciones de DSC a 2.1 mg/ml se muestra en la Figura 5.3.4B. Al aplicar el modelo cinético de dos estados a estas transiciones (ver Figura 5.3.5) se obtiene una desviación apreciable de lo predicho por el modelo. Por ejemplo, la energía de activación calculada de la pendiente de la representación de Arrhenius (Método A, Apartado 4.2.1) es de 228 ± 8 kJ/mol, mientras que la obtenida del efecto de la velocidad de barrido sobre la T_m de las transiciones (Método B) es de 326 kJ/mol. Además, puede apreciarse en la Figura 5.3.5A que los valores de la constante de velocidad aparente calculados según el modelo no coinciden muy bien para diferentes velocidades de barrido. Por lo tanto, existe una modificación de la cinética del proceso de desnaturalización de TLN al aumentar la concentración de la misma hasta valores próximos a su límite de solubilidad, siendo aparentemente de primer orden a baja concentración de muestra.

Es evidente que la propuesta de un mecanismo cinético alternativo que justifique cuantitativamente estos resultados exigiría un estudio más amplio del efecto de la concentración de la enzima y, posiblemente, experimentos complementarios por técnicas no calorimétricas. Sin embargo, a partir de estos resultados preliminares, junto con el efecto del pH anteriormente descrito, pueden hacerse diversas consideraciones, siempre desde un punto de vista cinético, respecto del posible mecanismo de desnaturalización térmica de la TLN.

Voordouw y Roche (1975) encontraron que la degradación autolítica de la TLN a temperatura ambiente (proceso 1), a pH 9.0 y baja concentración de ion Ca^{2+} , sigue una cinética de segundo orden. Esta degradación a baja temperatura parece acelerarse conforme baja el pH (disminuye la afinidad de los iones Ca^{2+} por sus sitios de unión) (Holmquist y Vallee, 1974). Fassina et al. (1986) han descrito que la autólisis a temperatura ambiente de la TLN en presencia de EDTA a pH 7.5 se produce específicamente sobre ciertas posiciones de la cadena polipeptídica del estado nativo de la proteína, generando un complejo de

fragmentos ("Nicked"-TLN). Por otra parte, el proceso de desnaturalización térmica a alta temperatura (proceso 2), al menos a concentraciones de proteína bajas, tiene una cinética aparente de primer orden (Voordouw y Roche, 1975; Fujita et al., 1979; Sánchez-Ruiz et al., 1988a) estando implicada al parecer la autólisis que afecta al estado desplegado de la proteína.

La competencia entre los dos procesos descritos podría estar establecida en todo momento durante un barrido de DSC, constituyendo un mecanismo general en la desnaturalización térmica de la TLN, en condiciones en que es posible la autólisis. De acuerdo con nuestros resultados estaría más favorecido el proceso 1 (de segundo orden) al bajar el pH y subir la concentración de proteína, mientras que el proceso 2 (de primer orden) predominaría a valores de alcalinos pH y bajas concentraciones de proteína.

La autólisis del estado nativo parece ser específica sobre determinados puntos de la cadena sensibles a la proteólisis, que se encuentran protegidos por iones Ca^{2+} . Al bajar el pH, como antes se ha mencionado, el efecto protector del Ca^{2+} disminuye, acelerándose la degradación del estado nativo. En cambio, el efecto de la concentración es puramente cinético; al ser el proceso 1 de segundo orden, un incremento de concentración acelera la velocidad de autólisis del estado nativo.

El proceso 2, que hemos visto que tiene una cinética aparente de primer orden, corresponde al desplegamiento térmico de la TLN, seguido de la autólisis inespecífica del estado desplegado (Voordouw y Roche, 1975; Sánchez-Ruiz et al., 1988a; Sánchez-Ruiz, 1992). La transición calorimétrica, debida principalmente a este proceso, ocurre a temperaturas superiores conforme baja el pH, lo que indica que la constante de velocidad aparente, k_{ap} , de este proceso disminuye al bajar el pH. En el Apartado 4.2.1, se describió que el modelo cinético de dos estados puede ser un caso particular del modelo de Lumry y Eyring (1954) (Situación C), y que la constante de velocidad aparente del proceso es $k_{ap} = k_f K$, siendo k_f la constante cinética del proceso irreversible y K la constante de equilibrio de desplegamiento (Sánchez-Ruiz, 1992). El efecto del pH sobre el proceso 2 podría deberse a una modificación de la estabilidad intrínseca de la estructura de la proteína frente al desplegamiento térmico (modificando el valor de K), o bien a una ralentización del proceso de autólisis inespecífica del estado desplegado (modificando el valor de k_f). Experimentos de intercambio hidrógeno-tritio en apotermolisina (sin Zn^{2+} unido) (Voordouw

y Roche, 1975) indican una superior rigidez estructural a pH 7.0 frente a pH 9.0, lo que está de acuerdo con la estabilización de la estructura al bajar el pH.

El pequeño efecto de la concentración de la proteína sobre la T_m de las transiciones, así como la desviación del cumplimiento del modelo cinético de dos estados a alta concentración sugieren que la presencia creciente del proceso 1, de segundo orden, modifica apreciablemente la cinética global y afecta a la forma de las transiciones, sobre todo en su parte inicial (ver Figura 5.3.4). Sin embargo, la energía de activación del proceso 2 es mucho mayor y su constante de velocidad aumenta mucho más rápidamente que la del proceso 1 (del que hemos supuesto una energía de activación baja). Además la concentración de proteína nativa va disminuyendo conforme progresa la transición, por lo que en la parte final de las transiciones el proceso 1 es completamente predominante, minimizándose el efecto de la concentración sobre las curvas de DSC, las cuales tienden a superponerse.

5.3.3 Efecto de la presencia de inhibidores de la actividad de TLN.

Una manera muy directa de afectar el proceso de autólisis, primer responsable de la irreversibilidad en la desnaturalización térmica de la TLN, es añadir al medio inhibidores de su actividad proteolítica. Los dos inhibidores de TLN más conocidos y aquí utilizados son la 1,10-fenantrolina y el phosphoramidon (N-(α -L-rhamno-piranosil-oxihidroxifosfinil)-L-leucil-L-triptófano). El primero es un agente quelante del ion Zn^{2+} , que es capaz de retirarlo del sitio activo de la TLN, inactivándola. Se ha descrito una inactivación completa a una concentración de 1,10-fenantrolina 1 mM (Holmquist y Vallee, 1974). El phosphoramidon es un potente inhibidor de la TLN ($K_i = 2.8 \times 10^{-8} M$) cuyo complejo con la misma se parece al estado de transición catalítico propuesto para la hidrólisis de dipéptidos por la TLN (Weaver et al., 1977).

Los experimentos de DSC se han realizado en el mismo tampón previamente descrito para pH 7.5: HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, $CaCl_2$ 10 mM.

Se utilizó por una parte una concentración de 5 mM de 1,10-fenantrolina. En los experimentos en presencia de phosphoramidon se puso una concentración de $4.3 \times 10^{-4} M$ de este agente y se añadió también $100 \mu M$ de $ZnCl_2$. Estas concentraciones de inhibidores son muy superiores a las necesarias para asegurar una inhibición de la TLN del 100%, al menos a temperatura ambiente. Suponemos en principio que lo son también a las temperaturas en

que ocurre la desnaturalización térmica de la TLN.

Se ha utilizado una concentración de proteína de 1.0 mg/ml para los experimentos en presencia de 1,10-fenantrolina, y de 0.7 mg/ml para los experimentos en presencia de phosphoramidon. Además se ha realizado el estudio del efecto de la velocidad de barrido en ambos casos.

Los resultados se muestran en la Figura 5.3.6, donde se observa que las transiciones obtenidas son completamente irreversibles y dependen fuertemente de la velocidad de barrido. Para comparación, se ha incluido en la Figura la transición obtenida a 2 K/min en ausencia de inhibidores. En la Tabla 5.3.III se incluyen los parámetros obtenidos para las transiciones.

Tabla 5.3.III

Entalpía molar, ΔH , y específica, Δh , y temperatura del máximo, T_m , para la desnaturalización de la termolisina en presencia de inhibidores, a varias velocidades de barrido.

v K/min	ΔH KJ/mol	Δh J/g	T_m °C
1,10-fenantrolina 5 mM			
2	1305	37.7	92.0
1	1293	37.4	89.9
0.5	1324	38.3	87.9
phosphoramidon $4.3 \times 10^{-4} M$			
2	1530	44.2	93.7
1	1564	45.2	92.2
0.5	1394	40.2	90.5

De los valores de T_m se deduce que ambos inhibidores estabilizan ligeramente la TLN. Sin embargo algo mucho más evidente es el hecho de que las transiciones se hacen mucho más estrechas, comenzando por tanto a temperaturas bastante más elevadas, lo que supone en cierta medida una estabilización adicional dado el carácter cinético de los procesos de desnaturalización. Todo esto está más acentuado en el caso del phosphoramidon.

En cuanto al proceso responsable de la irreversibilidad en presencia de estos

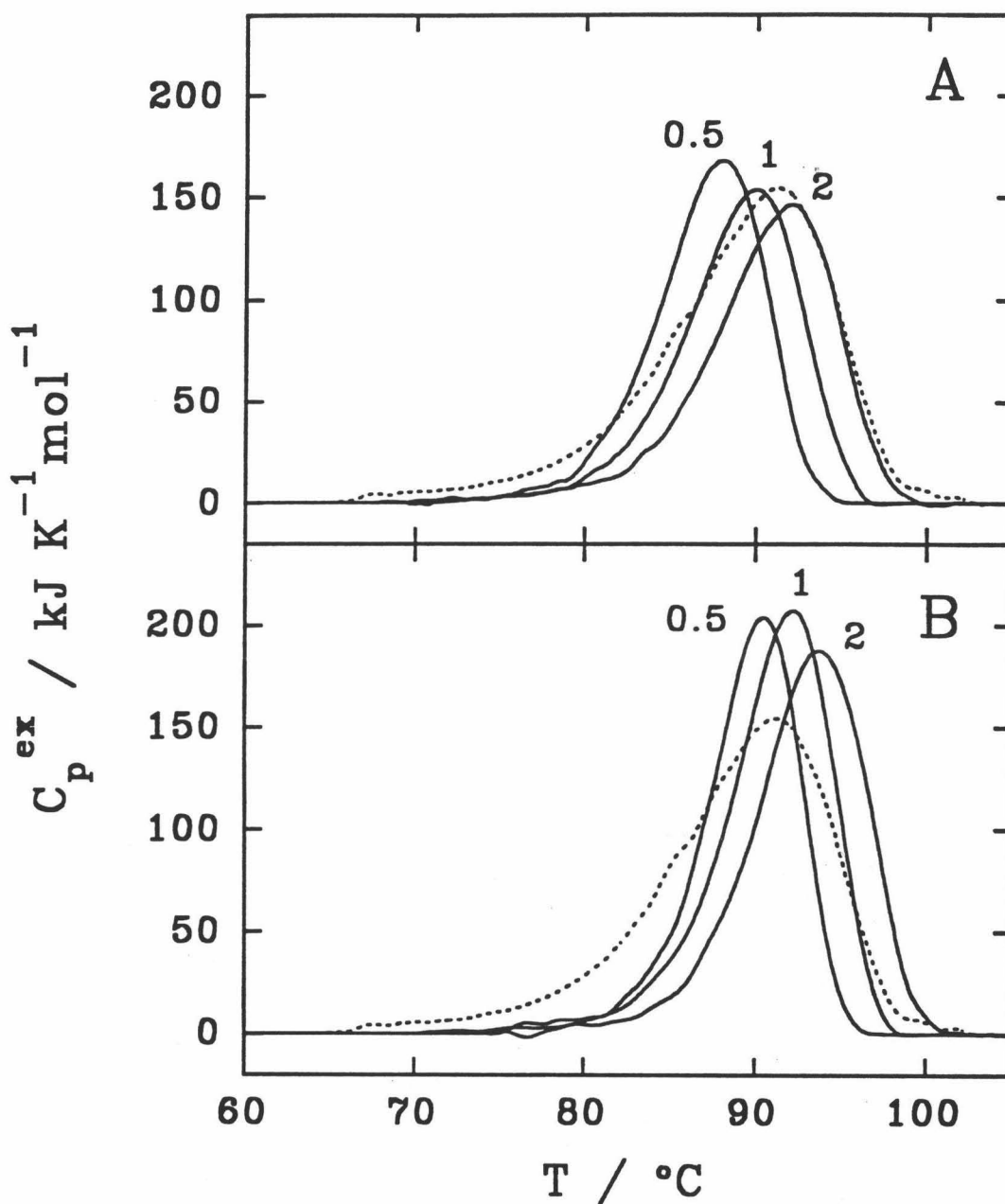


FIGURA 5.3.6: Efecto de la presencia de inhibidores en las curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la TLN a pH 7.5 en HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, $CaCl_2$ 10 mM, a varias velocidades de barrido. (A) 1,10-fenantrolina 5 mM; (B) fosforamidon 4.3×10^{-4} M. Las velocidades de barrido se indican junto a cada curva en K/min. Para comparación, en línea discontinua se muestra la curva correspondiente a las mismas condiciones, a 2 K/min, en ausencia de inhibidores.

inhibidores, en primer lugar se observó que las muestras con phosphoramidon, sacadas del calorímetro tras el calentamiento, presentaban una fuerte turbidez lo que indica agregación de la proteína. Este proceso de agregación inespecífica parece en este caso el responsable de la irreversibilidad encontrada. En los experimentos en presencia de 1,10-fenantrolina no hay evidencia de agregación fuerte de las muestras, que permanecen transparentes tras el calentamiento. La autólisis en cambio ha desaparecido o se ha minimizado en los dos casos, como se comprueba mediante SDS-PAGE de las muestras calentadas.

La representación de Arrhenius correspondiente a la aplicación del modelo cinético de dos estados a las transiciones obtenidas a diferentes velocidades de barrido se muestra en la Figura 5.3.7 para ambos inhibidores. En ambos casos se puede apreciar que las constantes de velocidad aparentes de primer orden calculadas mediante el citado modelo coinciden bastante bien, por lo que la cinética aparente parece ser de primer orden. Esto no es contradictorio con el hecho de que, en presencia de phosphoramidon, el proceso de agregación pueda tener una cinética de orden superior ya que si la agregación es muy rápida, la etapa limitante de la cinética podría ser una etapa previa de primer orden dentro del proceso de desplegamiento (Galisteo et al, 1991). Esta cinética aparente de primer orden se ha encontrado anteriormente para la CPB en pirofosfato 50 mM, pH 9.0 descrito en el Apartado 5.1.1, que también sufre agregación fuerte en esas condiciones.

Las energías de activación del proceso ($E_{ap}=360\pm 9$ kJ/mol en presencia de 5 mM de 1,10-fenantrolina y $E_{ap}=414\pm 33$ kJ/mol en presencia de phosphoramidon) son bastante superiores a la obtenida en ausencia de inhibidores a baja concentración de TLN lo que es coherente con la diferente naturaleza de los procesos irreversibles implicados.

De acuerdo con estos resultados, es razonable pensar que la estabilización de la TLN por la presencia de los inhibidores se deba principalmente a la atenuación o eliminación de un proceso irreversible más que a una estabilización de la estructura tridimensional de la proteína.

5.3.4 Efecto de los iones Zn^{2+} y Ca^{2+} .

La TLN tiene 4 sitios para la unión de Ca^{2+} en diversas partes de su estructura y un Zn^{2+} en el sitio activo (ver Figura 2.4, Apartado 2.2.1). Se ha descrito que el Zn^{2+} unido al centro activo no contribuye a la alta estabilidad térmica de la TLN, sino que sólo tiene una

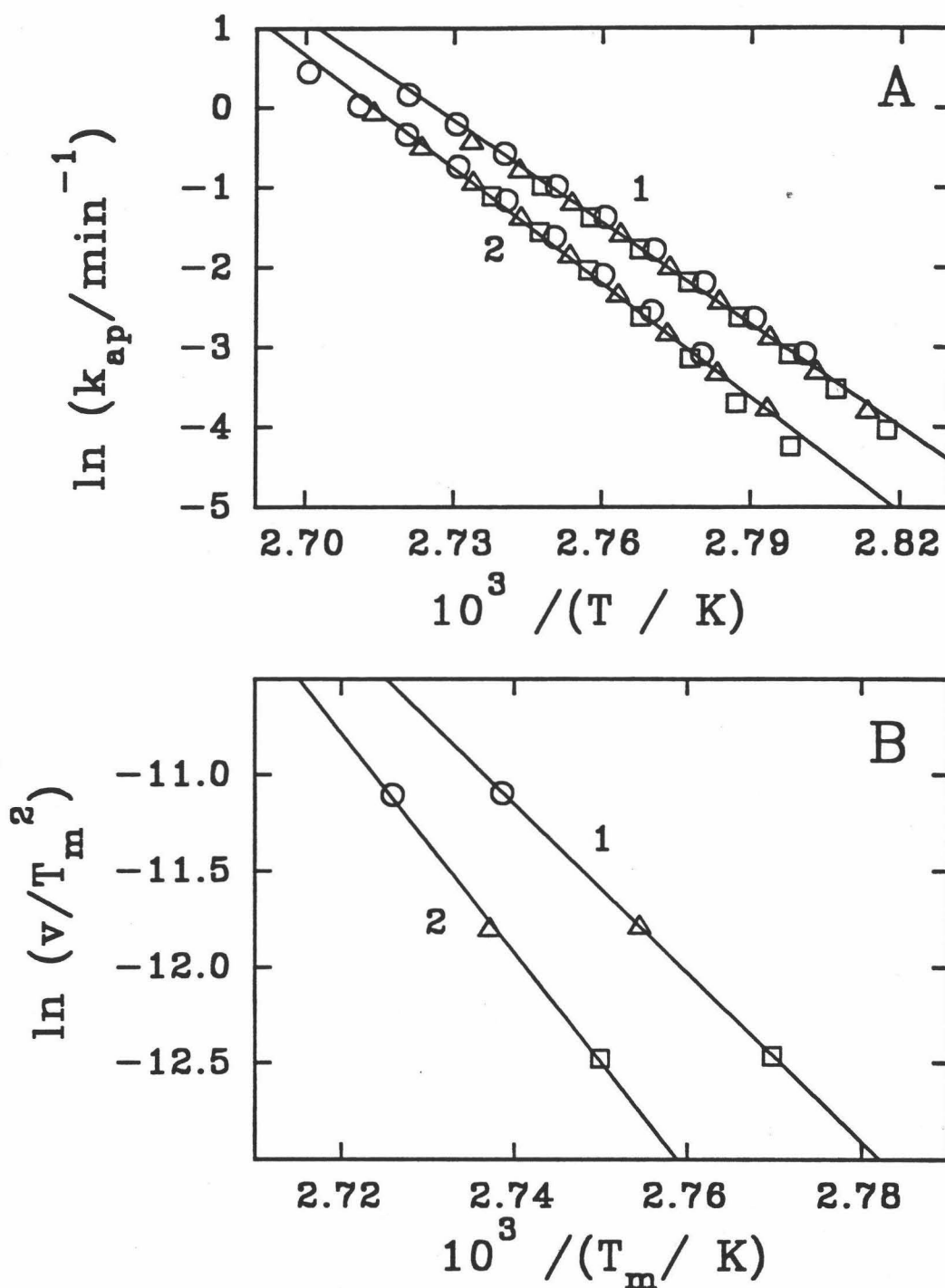


FIGURA 5.3.7: Aplicación del modelo cinético de dos estados a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ mostradas en la figura 5.3.6: (1) 1,10-fenantrolina 5 mM; (2) phosphoramidon 4.3×10^{-4} M. (A) Representación de Arrhenius para las constantes de velocidad de primer orden calculadas por el modelo (método A; ver Apartado 4.2.1). (B) Representación de $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ (método B del modelo). Los símbolos indican las diferentes velocidades de barrido: (O) 2.0 K/min; (Δ) 1.0 K/min; (\square) 0.5 K/min.

función catalítica, mientras que un exceso de Zn^{2+} en el medio inhibe acusadamente la actividad enzimática (Holmquist y Vallee, 1974). Hemos visto anteriormente que la extracción del Zn^{2+} estabiliza algo la enzima térmicamente, aunque esta estabilización parece deberse a causas cinéticas y no a una estabilización de la estructura de la TLN. Los iones Ca^{2+} , en cambio, parece que tienen la función de estabilizar la estructura tridimensional de la proteína y/o de prevenir su degradación autolítica (Voordouw y Roche, 1975; Fassina et al., 1986). De hecho está descrito que existe un fuerte efecto de la concentración de Ca^{2+} en la estabilidad de la TLN frente a su desnaturalización térmica (Voordouw y Roche, 1975; Fujita et al., 1979).

En los experimentos presentados en los apartados anteriores, la concentración en exceso de Zn^{2+} y de Ca^{2+} se mantuvo constante. En este Apartado se presentan experimentos en HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.5, modificando ambas concentraciones en exceso de $ZnCl_2$ y $CaCl_2$, con el fin de comprobar su influencia en la estabilidad de la TLN. Todos los experimentos se realizaron a 2 K/min y a una concentración de muestra de 0.7 mg/ml. Los efectos encontrados se pueden ver en la Figura 5.3.8, donde se representan algunas de las curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas cuando se varía la concentración de un ion, manteniendo constante la del otro. Todas las transiciones fueron irreversibles como ocurre en todos los experimentos con TLN descritos en esta Memoria. En la Figura 5.3.9 se han representado los valores de T_m obtenidos, frente a la concentración del ion correspondiente. Dado que se han realizado gran cantidad de experimentos, omitiremos los parámetros de las transiciones; únicamente decir que los valores de ΔH y ΔC_p obtenidos no presentan ninguna tendencia apreciable frente al error experimental, siendo valores similares a los obtenidos en presencia de $ZnCl_2$ 100 μM , $CaCl_2$ 10 mM.

En la Figura 5.3.8A y 5.3.9A puede verse el efecto estabilizante del Ca^{2+} para $[Zn^{2+}] = 100 \mu M$, que concuerda con el encontrado por otras técnicas, habiéndose atribuido al Ca^{2+} un papel de simple estabilizador del estado nativo por acción de masas en el equilibrio de desplegamiento térmico (ver Apartado 4.2.2 en Fundamentos Teóricos), ya que únicamente moléculas altamente desplegadas actuarían como sustratos de autólisis (Fujita et al., 1979, Voordouw y Roche, 1975). Además, en la Figura 5.3.9A se muestra también el efecto del Ca^{2+} cuando están presentes los inhibidores utilizados en el Apartado anterior, encontrándose un efecto estabilizante similar al obtenido sin inhibidores. Esto demuestra que

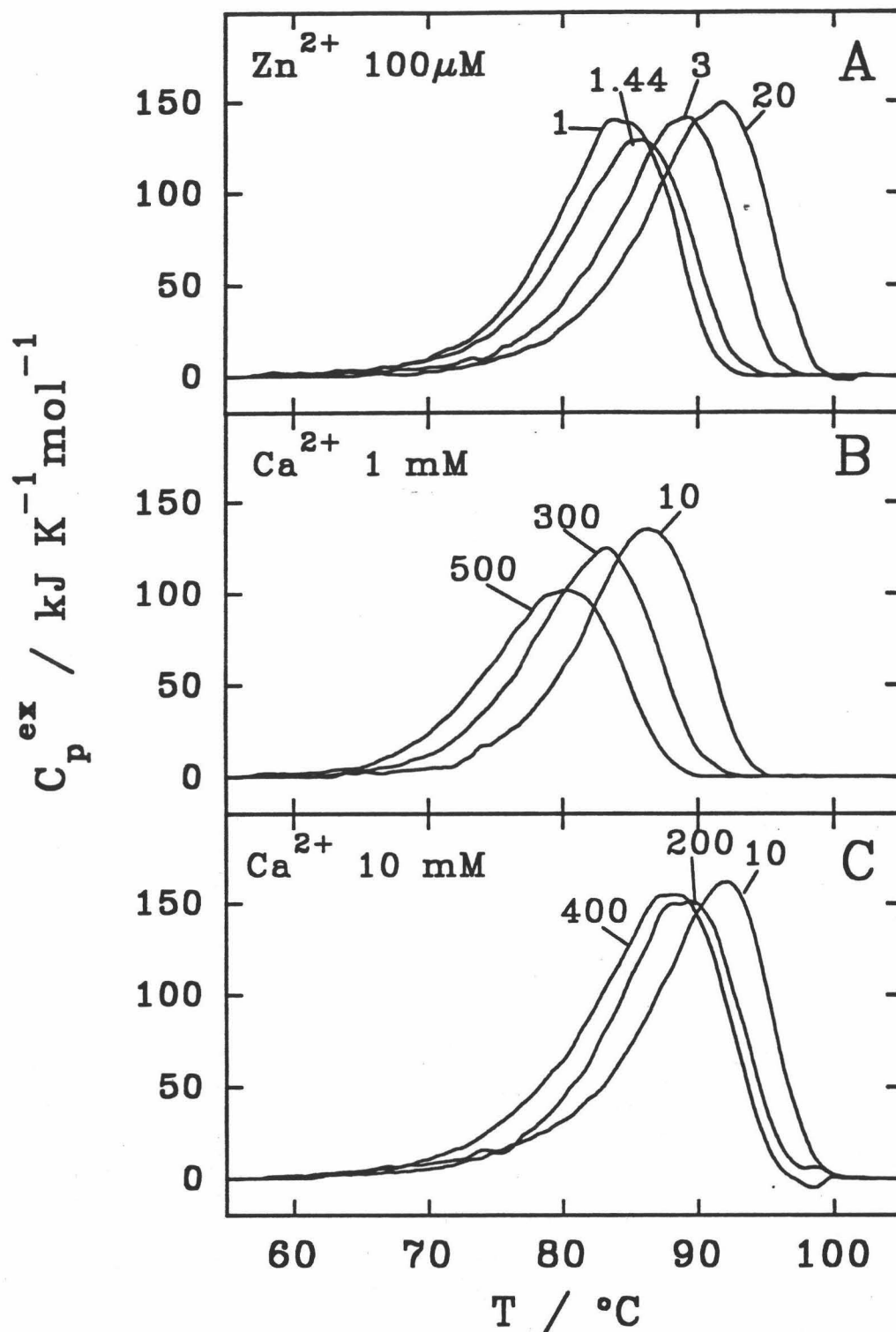


FIGURA 5.3.8: Efecto de la concentración de iones Ca^{2+} y Zn^{2+} en las curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes a la desnaturalización térmica de la TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.5. (A) Efecto de la concentración de Ca^{2+} indicada en mM junto a las curvas para $[\text{Zn}^{2+}] = 100 \mu\text{M}$. (B) y (C) Efecto de la concentración de Zn^{2+} indicada en μM junto a las curvas para $[\text{Ca}^{2+}] = 1 \text{ mM}$ (B) y $[\text{Ca}^{2+}] = 10 \text{ mM}$ (C). La velocidad de barrido utilizada en todos los experimentos fue de 2 K/min.

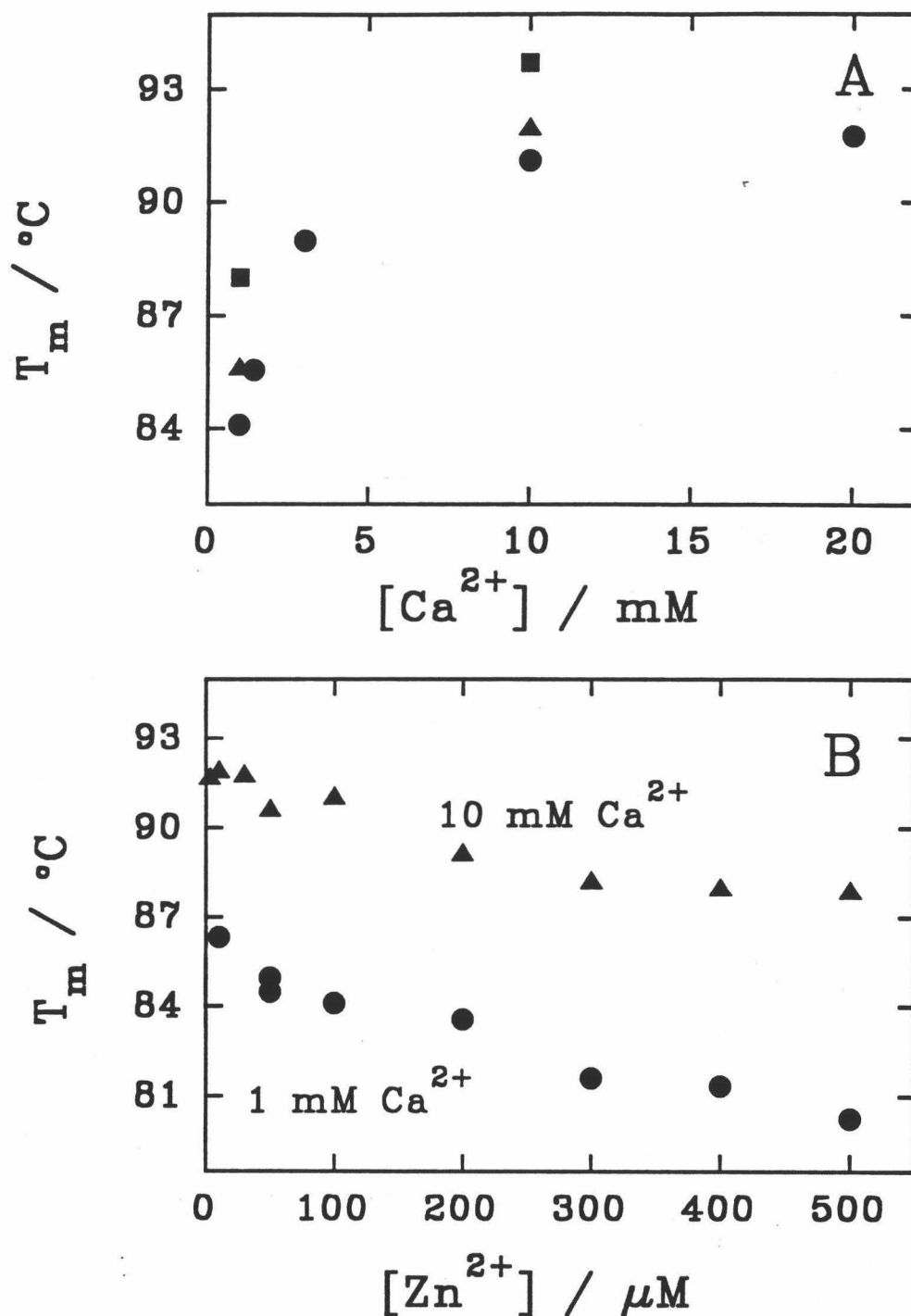


FIGURA 5.3.9: Efecto de la concentración de Ca^{2+} y Zn^{2+} en la T_m de las transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de la TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.5. (A) Efecto de $[Ca^{2+}]$ en presencia de: (●) $[Zn^{2+}] = 100 \mu M$; (▲) 1,10-fenantrolina 5 mM; (■) phosphoramidon 4.3×10^{-4} M. (B) Efecto de $[Zn^{2+}]$ en presencia de: (▲) Ca^{2+} 10 mM; (●) Ca^{2+} 1 mM. La velocidad de barrido utilizada fue en todos los casos de 2 K/min.

el ion Ca^{2+} actúa como estabilizante de la estructura nativa de la TLN frente al desplegamiento térmico, como han propuesto otros autores (Voordouw y Roche, 1975).

Por otra parte, se ha descrito que la TLN es protegida frente a la autólisis específica en ciertas posiciones de su secuencia por el Ca^{2+} (Fassina et al., 1986). Nosotros hemos propuesto en el Apartado 5.3.2 que ambos procesos de autólisis podrían estar implicados en la desnaturalización térmica de la TLN, con cinéticas diferentes. Sin embargo, dado que estos experimentos se han realizado a 0.7 mg/ml de concentración de TLN y pH 7.5, estaríamos en las condiciones en que está favorecido el proceso de autólisis del estado desplegado (proceso 2 del Apartado 5.3.2), con una cinética aparente de primer orden. Por lo tanto, el efecto del Ca^{2+} encontrado en las transiciones de DSC en estas condiciones indica que el papel del Ca^{2+} en la TLN es el de incrementar la estabilidad conformacional de la termolisina. Sin embargo, no es descartable que a concentraciones bajas de Ca^{2+} y elevadas de proteína sea también importante el papel de protector específico de la cadena frente a la proteólisis del estado nativo, lo cual no es obviamente contradictorio con nuestra conclusión anterior.

Si suponemos que la desnaturalización térmica de la TLN en estas condiciones puede describirse mediante el modelo de Lumry y Eyring en la Situación C del Apartado 4.2.1, el efecto del Ca^{2+} en la T_m de las transiciones podría describirse en una forma aproximada mediante la Ecuación 4.33 del Apartado 4.2.2 (Sánchez-Ruiz, 1992), siendo m el número de iones Ca^{2+} que se liberan al desplegarse la proteína. Se puede hacer el siguiente cálculo estimativo representando $\ln[\text{Ca}^{2+}]$ frente a $1/T_m$. En esta gráfica se obtiene, aproximadamente una recta de pendiente, $-E_{ap}/mR$, igual a 53×10^3 K. Tomando un valor para la E_{ap} de 282 kJ/mol (Sánchez-Ruiz et al., 1988a), se obtiene $m=0.64$. Voordouw y Roche (1975) obtuvieron por otras técnicas $m=1$ para $[\text{Ca}^{2+}] < 10^{-3}$ M, desviándose a valores inferiores a 1 para $[\text{Ca}^{2+}] > 10^{-3}$ M. Estos autores interpretan que sólo un ion Ca^{2+} es responsable de la estabilización térmica de la enzima y han atribuido la desviación de m de la unidad a la unión del Ca^{2+} al estado desplegado de la TLN con baja afinidad. Puede verse que el efecto del Ca^{2+} sobre las transiciones de DSC encontrado es pues consistente con lo descrito en la Bibliografía utilizando otras técnicas no calorimétricas.

En las Figuras 5.3.8B y 5.3.9B se puede apreciar que un exceso de ion Zn^{2+} tiene, al contrario que el Ca^{2+} , un efecto desestabilizante sobre la TLN frente a su desnaturalización

térmica. Este efecto no parece estar acoplado al del Ca^{2+} dado el paralelismo de las curvas de T_m frente a $[\text{Zn}^{2+}]$ a diferente $[\text{Ca}^{2+}]$, por lo que ambos efectos, en principio, parecen deberse a fenómenos independientes entre sí. Esto está de acuerdo a su vez con el hecho de que en presencia de 1,10-fenantrolina, sin ion Zn^{2+} libre presente, exista un efecto del ion Ca^{2+} similar al descrito anteriormente en presencia de Zn^{2+} (ver Figura 5.3.9A).

Suponiendo que la cinética aparente de desnaturalización térmica de la TLN en todas las concentraciones de Zn^{2+} y a la concentración de muestra utilizada es de primer orden, al igual que ocurre para $100\mu\text{M}$ de Zn^{2+} , el incremento de la concentración de Zn^{2+} en exceso produce, para cualquier temperatura, un incremento en el valor de la constante de velocidad aparente que controla el proceso.

Para un modelo de desnaturalización como el que se describe en el Apartado 4.2.2, la unión del Zn^{2+} al estado nativo sólo podría justificar un efecto estabilizante del Zn^{2+} . El efecto desestabilizante encontrado se podría explicar suponiendo la existencia de una unión preferente del Zn^{2+} al estado desplegado, lo que incrementaría la velocidad global del proceso de desnaturalización. Sin embargo, parece poco probable una unión de tan alta afinidad de un ion por el estado desplegado de la enzima.

Por otra parte está descrito que, a temperatura ambiente, un exceso de Zn^{2+} por encima de 4 veces la concentración molar de TLN produce una drástica inhibición reversible de la actividad enzimática (Holmquist y Vallee, 1974). Esta inhibición, cuando $[\text{Zn}^{2+}] \gg [\text{TLN}]$ es independiente de esta última concentración, siendo coherente con la unión de un ion Zn^{2+} adicional a la TLN. La constante de inhibición encontrada a temperatura ambiente es de $1.8 \times 10^{-5} \text{M}$. De nuevo la unión del Zn^{2+} al estado nativo no justificaría el efecto desestabilizante encontrado. Incluso la inhibición que produciría el Zn^{2+} en exceso debería ralentizar el proceso de autólisis responsable de la irreversibilidad con la consiguiente estabilización. Para comprobar que la autólisis procede, sin embargo, más rápidamente al aumentar la concentración de Zn^{2+} , se hicieron experimentos de calentamiento de muestras que contenían $300\mu\text{M}$ y $500\mu\text{M}$ de Zn^{2+} , a velocidad de barrido constante de 0.94 K/min , en un baño termostático, extrayendo alícuotas a lo largo del barrido de temperatura que tras enfriarse rápidamente fueron analizadas por SDS-PAGE. El resultado se muestra en la Figura 5.3.10, donde se han representado las intensidades de las bandas de SDS-PAGE correspondientes a la TLN en función de la temperatura. Se muestran también

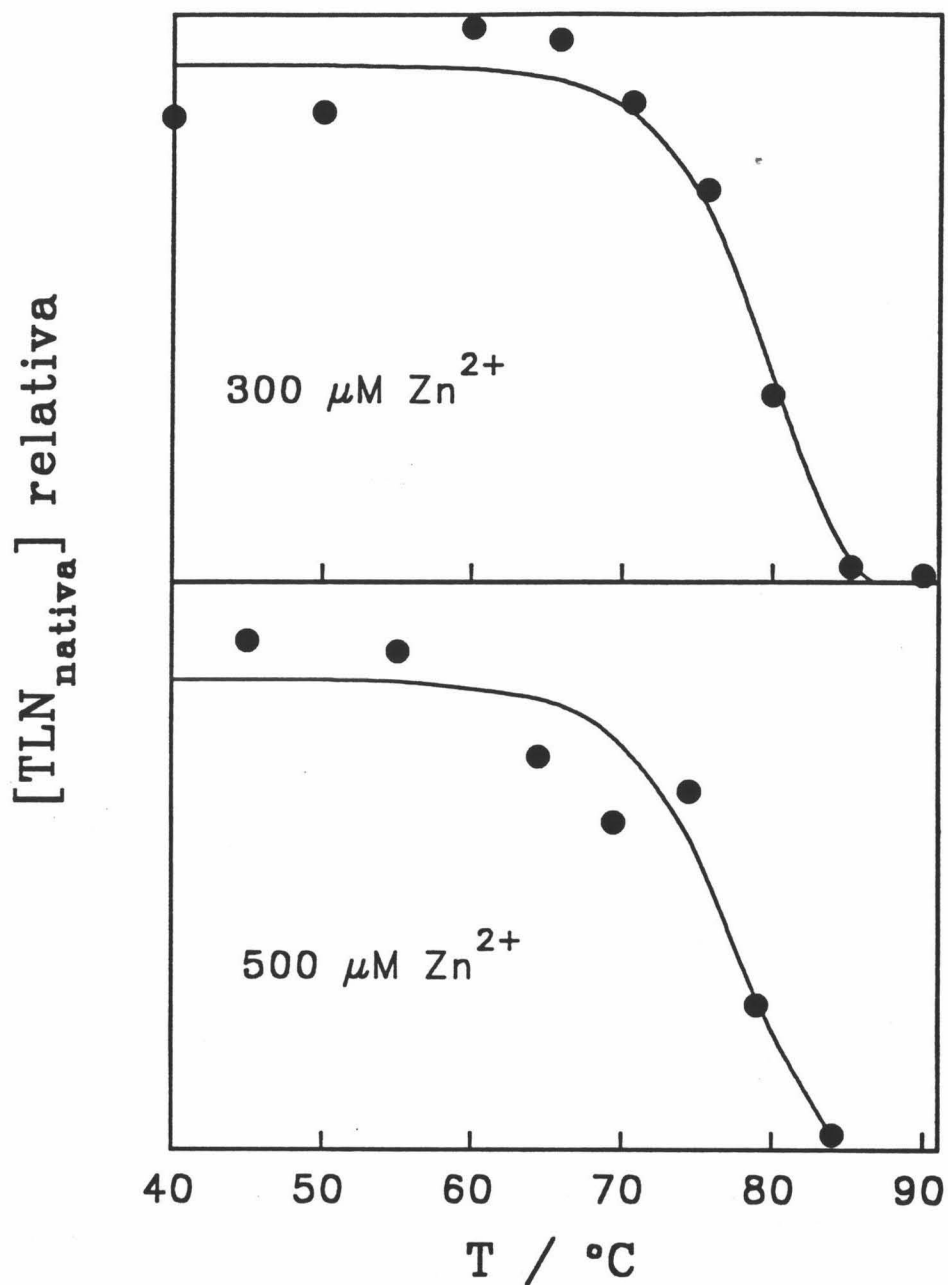


FIGURA 5.3.10: Representaciones de la pérdida de intensidad de la banda de SDS-PAGE correspondiente a TLN en función de la temperatura para experimentos de calentamiento en un baño termostático, a una velocidad de barrido constante de 0.94 K/min, de muestras de TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.1M, CaCl₂ 1 mM, pH 7.5, para las concentraciones de Zn²⁺ indicadas en cada gráfica: (●) Puntos experimentales. (—) Curvas de ajuste predichas por el modelo cinético de dos estados utilizando los valores de energía de activación obtenidos de las transiciones de DSC (ver texto).

las curvas de desaparición de la TLN en función de la temperatura predichas por el modelo cinético de dos estados. Para estos ajustes se asignaron como parámetros fijos los valores de la energía de activación obtenidos de las transiciones de DSC correspondientes a las mismas condiciones experimentales, ajustando los valores de T_m . Aunque el método de tinción de los geles es semicuantitativo, los valores de T_m obtenidos (80.3°C para Zn^{2+} $300\mu\text{M}$ y 78.4°C para Zn^{2+} $500\mu\text{M}$) concuerdan muy bien con las T_m de las transiciones de DSC (ver Figura 5.3.9), teniendo en cuenta que la velocidad de calentamiento de las muestras en el baño fue de 0.94 K/min, frente a los 2 K/min de los experimentos de DSC, lo que supone una disminución en los valores de T_m , debida al efecto de la velocidad de barrido, de unos 2.5°C . Estos resultados demuestran que el proceso de autólisis ocurre simultáneamente a la desnaturalización y que la inhibición por exceso de Zn^{2+} a temperatura ambiente no tiene influencia sobre la autólisis de la TLN a alta temperatura, indicando que la constante de inhibición del Zn^{2+} debe disminuir drásticamente al aumentar la temperatura.

Se ha propuesto que el ion Zn^{2+} muestra una gran afinidad por el sitio activo de la proteína incluso a las temperaturas en que comienza la desnaturalización térmica (Khan et al., 1978). Sin embargo, el efecto desestabilizante del Zn^{2+} encontrado parece indicar que en cualquier caso esta afinidad del ion Zn^{2+} por el sitio activo disminuye con la temperatura. A las temperaturas en las que ocurre la transición, quedarían así menos moléculas de termolisina con Zn^{2+} unido (activas), capaces de provocar el proceso de autólisis responsable de la irreversibilidad. Un incremento de la concentración de Zn^{2+} en el medio aumentaría por tanto la proporción de moléculas de TLN con capacidad catalítica, incrementando la velocidad del proceso de autólisis global y, consecuentemente, disminuyendo el valor de T_m .

* * *

Como puede apreciarse a la vista de todos estos resultados, la alta estabilidad térmica de la TLN está condicionada por multitud de factores. Parece obvio que, en general, la autodegradación proteolítica inducida térmicamente es el proceso responsable principal de la completa irreversibilidad de la desnaturalización térmica de la TLN encontrada en condiciones de actividad enzimática.

Del efecto del pH y la concentración de la proteína se ha deducido que dos mecanismos paralelos de desnaturalización de la TLN podrían estar presentes en condiciones en que la autólisis de la TLN es posible. Ambas variables experimentales modifican la

incidencia de cada uno de los mecanismos, variando así la estabilidad térmica de la enzima y habiéndose racionalizado estos efectos desde un punto de vista completamente cinético. La presencia de inhibidores de la actividad proteolítica de la TLN elimina o atenúa el proceso de autólisis, aunque aparecen otros procesos irreversibles diferentes. No obstante se produce una estabilización adicional de la proteína debida más bien a la ralentización de la alteración irreversible del estado desplegado de la TLN que a una estabilización del estado nativo. Totalmente opuesto al de los inhibidores podría ser el efecto de la concentración de Zn^{2+} , que aceleraría la velocidad de autólisis del estado desplegado debido a la mayor proporción de moléculas de TLN activas. En cambio, y en buen acuerdo con lo propuesto en la Bibliografía, el papel del Ca^{2+} parece ser el de producir un aumento de la estabilidad conformacional del estado nativo. Algo común a todos los resultados aquí presentados es que se han racionalizado en términos de estabilidad cinética, dado que casi todos los efectores investigados actúan modificando las velocidades de los procesos irreversibles implicados en el proceso global de desnaturalización térmica de la TLN.

En definitiva, el estudio de la estabilidad térmica de la TLN aquí presentado, sólo puede abordarse usando modelos cinéticos del proceso de desnaturalización, dado el carácter de no equilibrio encontrado para el proceso de desnaturalización térmica de la TLN. Por lo tanto los datos de DSC no aportan información termodinámica acerca del proceso de desplegamiento de la proteína, al igual que ocurre con la CPB y la PCPB. Este hecho ha limitado en enorme medida la posibilidad de correlacionar el estudio mediante DSC de la TLN con el de los fragmentos globulares obtenidos de ella mediante proteólisis controlada, estudio que será descrito seguidamente.

5.4 Estudio del desplegamiento térmico de los fragmentos TLN-255-316 y TLN-205-316.

Como se describió en el Apartado 2.2 del Capítulo de Antecedentes Bibliográficos, los fragmentos de termolisina TLN-205-316 y TLN-255-316 que aquí se estudian presentan, de acuerdo con estudios previos por técnicas no calorimétricas, estructura globular (ver Figura 2.5) y un desplegamiento térmico reversible, por lo que se ha propuesto que constituyen dominios aislados de la termolisina (Vita et al., 1979; Vita y Fontana, 1982; Dalzoppo et al., 1985; Vita et al., 1985b; Vita et al., 1989). En esta Memoria se ha abordado el estudio por DSC del desplegamiento térmico de ambos fragmentos, que resultó ser reversible y, por tanto, analizable termodinámicamente. Este estudio se habría potenciado enormemente de haberse encontrado condiciones para la desnaturalización térmica reversible de la TLN, lo que habría permitido un análisis comparativo del plegamiento y la estabilidad de una proteína y sus dominios estructurales, al igual que se ha hecho para un número muy limitado de proteínas (Privalov et al., 1981; Privalov y Medved, 1982; Potekhin y Privalov, 1982; Brzeska et al., 1983; Novokhatni et al., 1984), aunque ya se comentó en el Apartado anterior que no se encontraron dichas condiciones. No obstante el estudio desarrollado supone una aportación importante al estudio del plegamiento/desplegamiento de proteínas, al ser estos fragmentos dominios estructurales de la TLN y existir contados ejemplos de este tipo de investigación en la Bibliografía. Además, como veremos más adelante, el análisis del efecto de la concentración de muestra sobre las transiciones de DSC que hemos encontrado nos permite mostrar aspectos prácticamente inéditos en el estudio del desplegamiento térmico de proteínas interaccionantes.

5.4.1 Efecto de la concentración de muestra en las transiciones de DSC del fragmento TLN-255-316.

El fragmento TLN-255-316, de peso molecular 6630 dalton, ha sido identificado en trabajos anteriores como el fragmento de TLN de menor tamaño que es capaz de plegarse en una estructura estable similar a la nativa (Dalzoppo et al., 1985). Estudios de sus propiedades hidrodinámicas demuestran que el fragmento dimeriza a concentraciones superiores a 0.1 mg/ml, y muestra un desplegamiento térmico reversible con transiciones

dependientes de la concentración de proteína según un estudio muy reciente mediante dicroísmo circular (Vita et al., 1989).

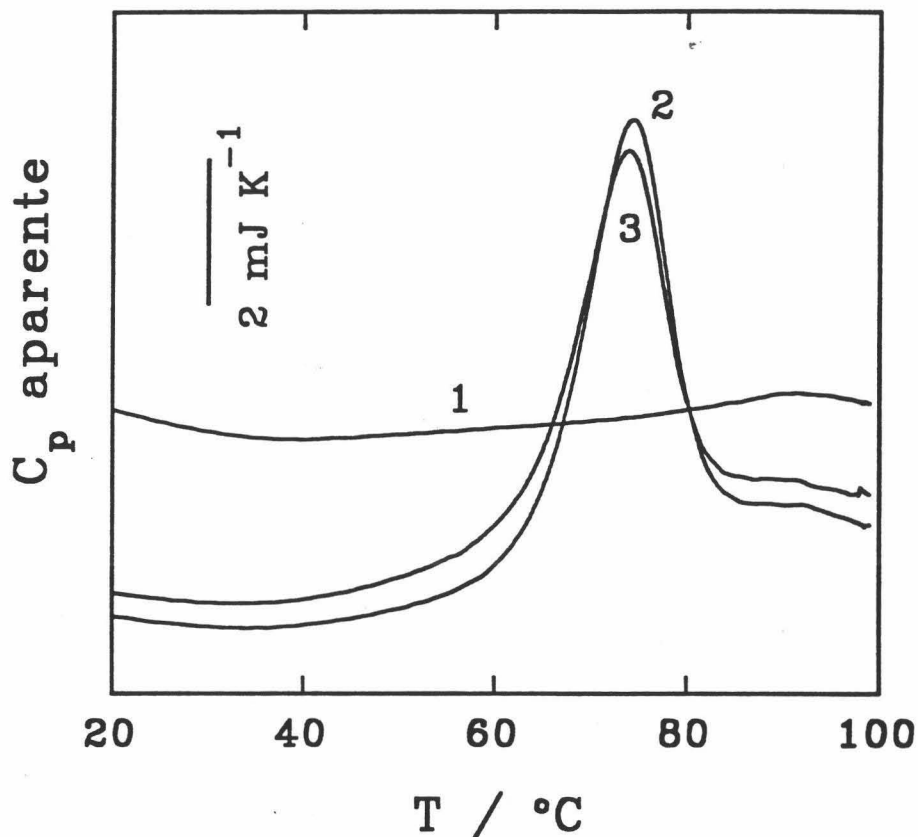


FIGURA 5.4.1: Registro experimental de DSC obtenido con TLN-255-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5, a una velocidad de barrido de 2.0 K/min y una concentración de muestra de 4.55 mg/ml. (1) línea base instrumental; (2) 1^{er} barrido con la muestra; (3) 2^o barrido.

En este Trabajo se ha estudiado el desplegamiento de TLN-255-316 mediante DSC, en tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.5, a diferentes concentraciones de muestra, C_i (entre 0.19 y 4.55 mg/ml), utilizando normalmente una velocidad de barrido de 2 K/min. La Figura 5.4.1 muestra un registro experimental de DSC en el que se aprecia que el desplegamiento térmico de TLN-255-316 es altamente reversible. Esta prueba es considerada

normalmente suficiente para suponer que el proceso transcurre en equilibrio. Más concluyente es, sin embargo, la ausencia de efecto de la velocidad de barrido encontrada en las transiciones. En la Figura 5.4.2 se muestran las curvas de $C_p^{ex}(T)$, obtenidas a diferentes concentraciones de muestra, observándose un fuerte efecto de la concentración en la T_m de las transiciones, que se ha representado en la Figura 5.4.3, donde se observa la independencia de la T_m con la velocidad de barrido (uno de los experimentos fue realizado a 0.5 K/min mientras que los demás fueron a 2 K/min). En la Tabla 5.4.I se encuentran los parámetros característicos de las transiciones obtenidas.

Tabla 5.4.I

Entalpía calorimétrica molar, ΔH , y específica, Δh , entalpía de van't Hoff, ΔH^{vH} , temperatura del máximo, T_m , e incremento de capacidad calorífica, ΔC_p , para el desplegamiento térmico de TLN-255-316 a varias concentraciones de muestra, C_t .

C_t (mg/ml)	ΔH kJ/mol	Δh J/g	$\Delta H^{vH(a)}$ kJ/mol	T_m °C	ΔC_p kJ/K.mol
0.19	177	26.6	307	67.1	-
0.29	200	30.2	306	68.0	-
0.72	176	26.5	352	70.2	-
0.94	204	30.8	320	70.7	1.8
1.08	178	26.8	318	70.9	3.2
1.37	170	25.6	349	71.4	2.0
2.21	199	30.0	346	72.4	2.4
4.55	199	30.0	363	73.7	2.4
Media ^(b) :	192±13	29±2	347±22		2.4±0.5

^aCalculada con la ecuación 4.9.

^bMedias ponderadas por la concentración de muestra.

El fragmento TLN-255-316 muestra una elevada termoestabilidad, aunque bastante menor que la de la TLN nativa. La entalpía específica obtenida a la T_m correspondiente concuerda muy bien con los valores descritos para proteínas globulares compactas. Lo mismo ocurre con el valor del incremento de capacidad calorífica específica de desplegamiento, $\Delta c_p = 0.087 \pm 0.018$ cal/K.g (Privalov, 1979). Estos resultados demuestran la capacidad que

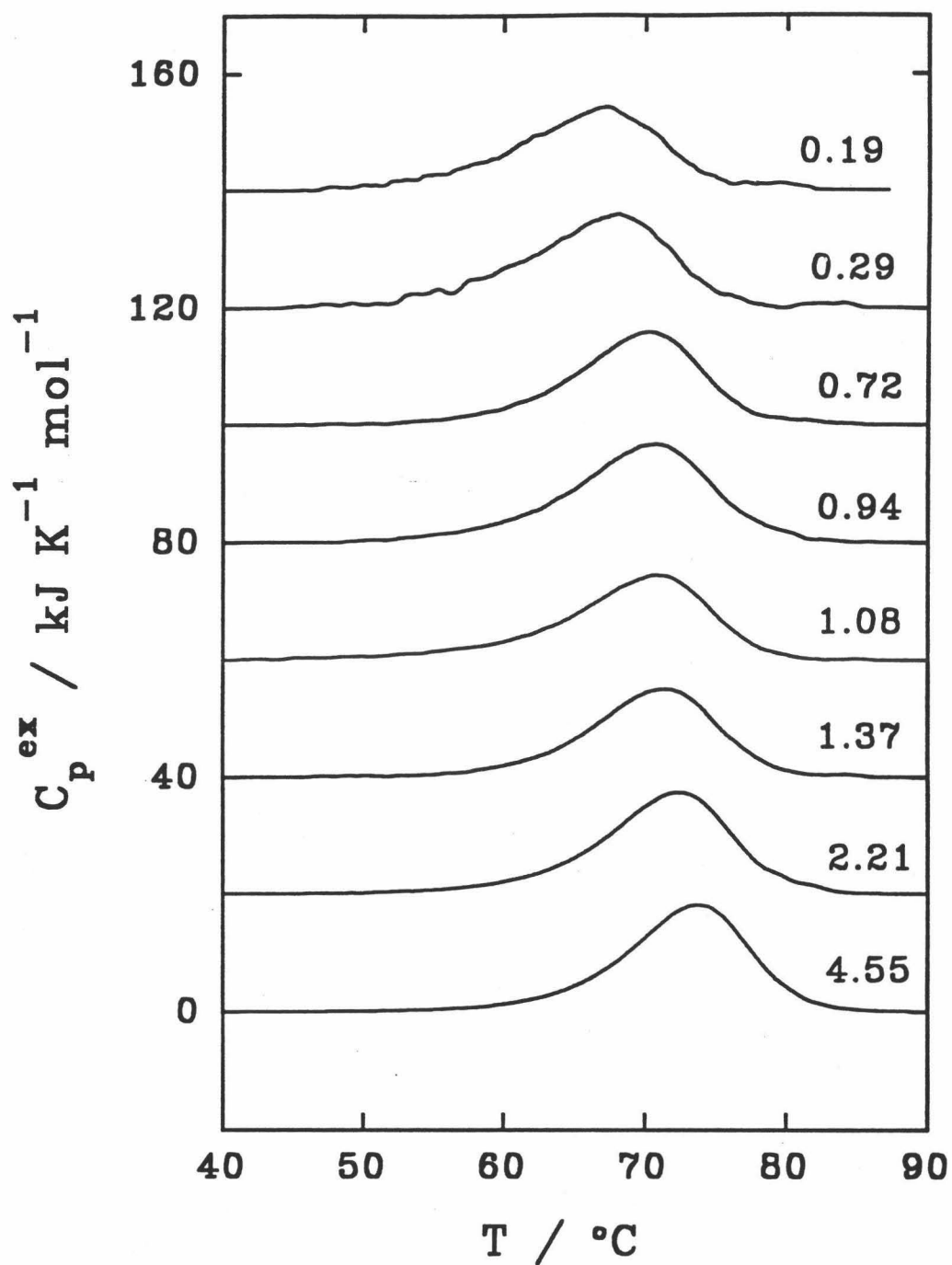


FIGURA 5.4.2: Efecto de la concentración de muestra en las curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes al desplegamiento térmico del fragmento TLN-255-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5. Las concentraciones de muestra se indican junto a cada curva en mg/ml.

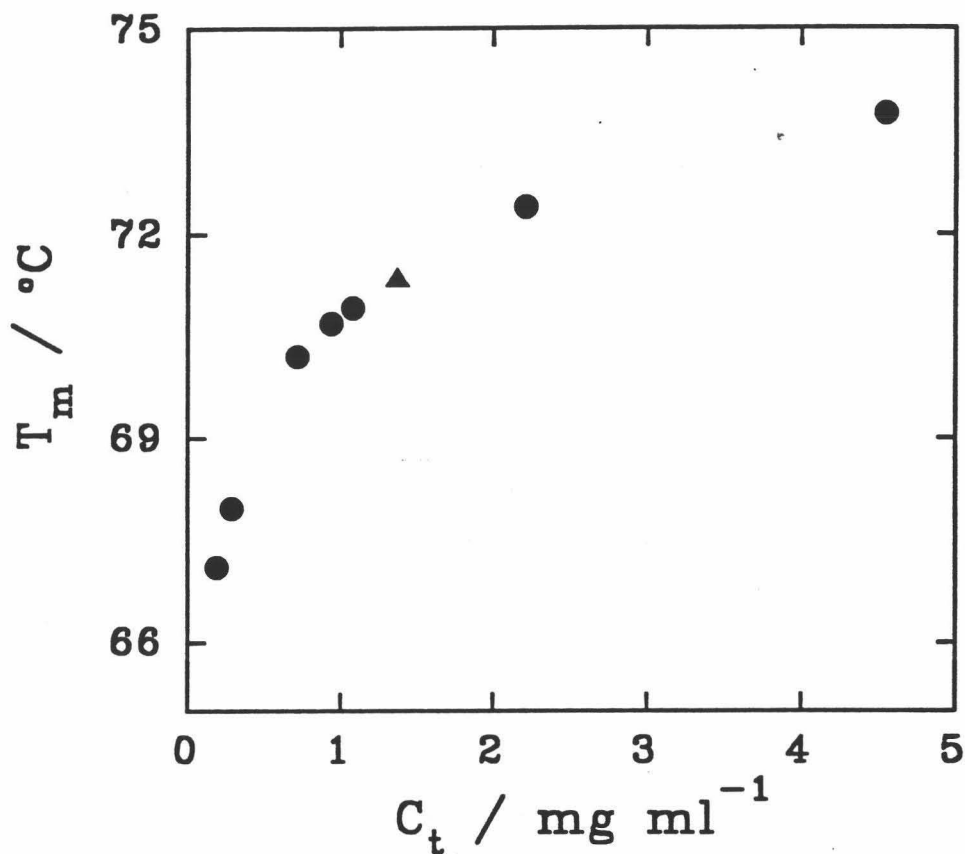
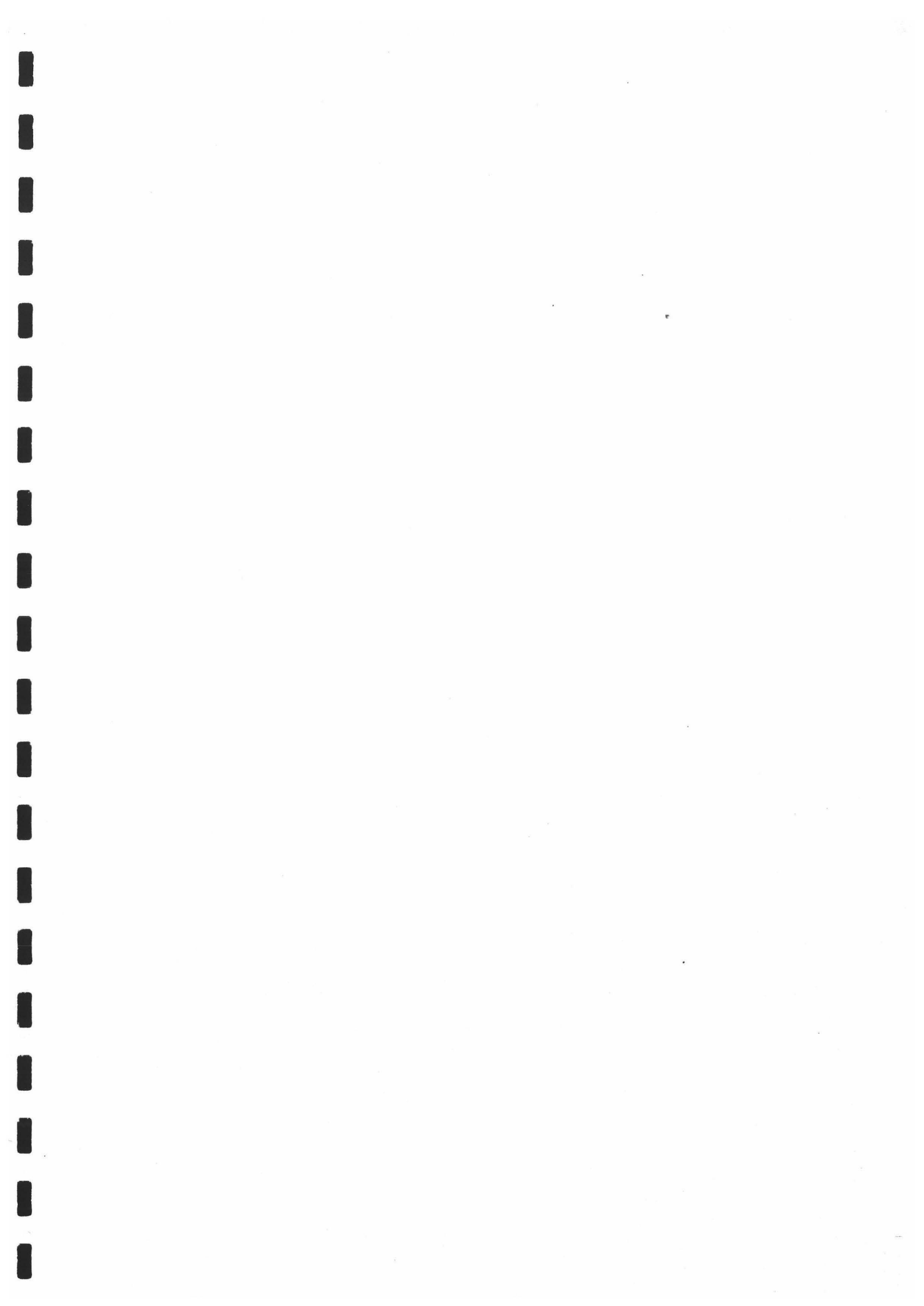


FIGURA 5.4.3: Efecto de la concentración de muestra en la T_m de las transiciones de DSC correspondientes al desplegamiento térmico del fragmento TLN-255-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5. Los símbolos indican las diferentes velocidades de barrido: (●) 2 K/min y (▲) 0.5 K/min.

muestra esta pequeña cadena polipeptídica de 62 aminoácidos para plegarse formando una estructura globular altamente compacta.

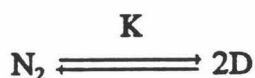
El valor de la relación, r , entre la entalpía calorimétrica ΔH y la entalpía de van't Hoff, calculada según la ecuación 4.9 es de 0.55 ± 0.04 , lo que sugiere que existe un cambio en el estado de asociación (disociación) de la proteína en el desplegamiento. Para el paso de 100% de dímero nativo a 100% de monómero desnaturalizado el valor teórico de r es de 0.73, mientras que el valor que hemos obtenido correspondería en principio más bien a la disociación de un tetrámero (ver Apartado 4.1.3).

No obstante, vamos a ver que el efecto de la concentración de muestra en la





temperatura de desplegamiento, ya descrito anteriormente para este fragmento (Vita et al., 1989), puede explicarse cuantitativamente de acuerdo con el siguiente modelo (ver Apartado 4.1.3):



El modelo predice una dependencia de la T_m de las transiciones con la concentración de muestra que viene dada por la ecuación (corresponde a la Ecuación 4.24 para $n=2$):

$$\ln C_i = \text{constante} - \frac{2\Delta H}{RT_m} \quad (5.1)$$

donde ΔH es la entalpía de desplegamiento por monómero de proteína, C_i es la concentración de muestra y T_m es la temperatura del máximo de las transiciones. Más correcto sería utilizar $T_{1/2}$ (temperatura a la que la muestra ha absorbido la mitad del calor de la transición) pero la diferencia en el resultado con esta actuación es mínima, siendo más fiables los valores de T_m . Representando $\ln C_i$ frente a $1/T_m$ se debe obtener una recta de pendiente $-2\Delta H/R$. Esta representación se muestra en la Figura 5.4.4. De la pendiente se obtiene un valor para ΔH de 231 kJ/mol, que es cercano al obtenido del área de las transiciones (192 ± 13 kJ/mol), aunque este último queda un poco por debajo. Si aplicamos la ecuación 4.24 para $n > 2$ (n es el grado de asociación) a la representación de la Figura 5.4.4, la desviación de la entalpía obtenida de la pendiente respecto a la calorimétrica es aún mayor.

Por otra parte, las ecuaciones 4.20 y 4.22 del Apartado 4.1.3, para $n=2$, correspondiente a un dímero, nos permiten describir cuantitativamente las curvas de $C_p^{ex}(T)$ experimentales. En la Figura 5.4.5 se muestran los excelentes ajustes obtenidos, y en la Tabla 5.4.II se exponen los parámetros obtenidos para cada una de las transiciones. En los ajustes se ha distinguido entre la entalpía calorimétrica, ΔH^{cal} , que viene dada por el área de las transiciones y entalpía efectiva, ΔH^{ef} , que controla la forma de las mismas. Puede verse que no hay una coincidencia entre ambos parámetros que son en definitiva el mismo y sin embargo la forma de las transiciones es perfectamente descrita por el modelo. Intentos de ajustar los datos para valores de $n > 2$ no dieron buen resultado ya que las ecuaciones teóricas predicen mayor asimetría de las transiciones que la encontrada en las curvas experimentales de $C_p^{ex}(T)$ (ver Figura 5.4.5).

Por tanto puede verse que el modelo de desplegamiento dímero nativo-monómero

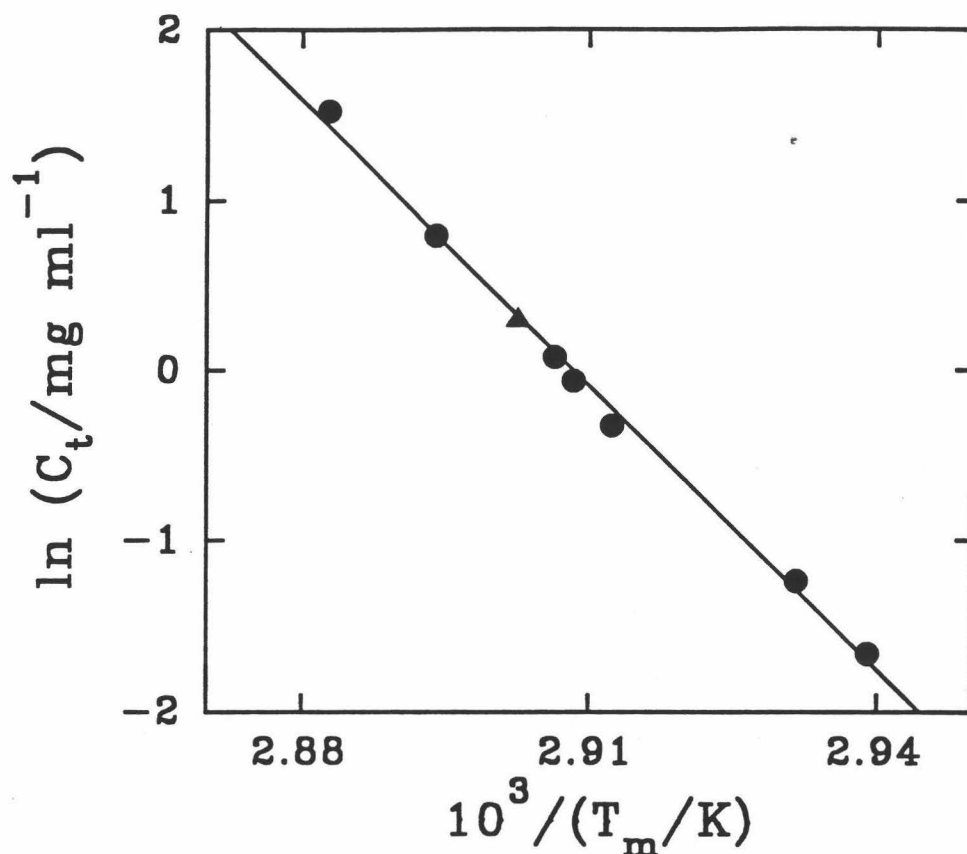


FIGURA 5.4.4: Representación de $\ln C_t$ frente a $1/T_m$ (ver Ecuaciones 5.1 y 4.24) correspondiente a los valores representados en la Figura 5.4.3. Los símbolos corresponden a diferentes velocidades de barrido: (●) 2 K/min y (▲) 0.5 K/min.

desplegado es el que mejor explica los datos de DSC encontrados y solamente los valores de entalpía calorimétrica son algo más bajos de los esperado. Esto podría ser debido muy probablemente a que no todo el fragmento presente en las muestras se encuentre al comienzo del experimento en estado "nativo", quizás porque el método de su obtención y purificación pudiera ser excesivamente agresivo (ver Apartado 3.2.7 del Capítulo de Materiales y Métodos).

Estos resultados son perfectamente coherentes con lo publicado hasta la fecha para el fragmento TLN-255-316, del que está descrito que dimeriza por encima de 0.1 mg/ml, según estudios de ultracentrifugación analítica (Vita et al., 1989). estudios muy recientes de la estructura tridimensional del fragmento mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Tabla 5.4.II

Parámetros correspondientes al ajuste de las ecuaciones teóricas del modelo $N_2 \rightleftharpoons 2D$ a las transiciones de DSC correspondientes al desplegamiento térmico de TLN-255-316 a diferentes concentraciones de muestra.

C_i mg/ml	ΔH^{cal} kJ/mol	ΔH^{ef} kJ/mol	$T_{1/2}$ °C	$T(K=1)$ °C	ΔS J/K.mol
0.19	176	216	65.8	90.5	594
0.29	198	219	66.5	89.7	604
0.72	175	256	69.3	87.5	710
0.94	205	230	69.6	89.2	635
1.08	174	234	69.6	88.7	647
1.37	170	256	70.5	87.5	710
2.21	198	252	71.4	87.7	707
4.55	199	264	72.9	87.2	733
Media:	$191 \pm 14^{(a)}$	$253 \pm 18^{(a)}$		87.8 ± 1.2	$701 \pm 54^{(a)}$

^(a)Medias ponderadas por la concentración de muestra.

demuestran éste que se encuentra en disolución en forma de dímero, con una estructura de los monómeros muy similar a la que tiene el fragmento en la TLN nativa (Jiménez et al., 1991).

El fragmento TLN-255-316 se estabiliza en disolución como dímero, probablemente para cubrir la superficie hidrofóbica que tiene el monómero expuesta al medio (Vita et al., 1989), como consecuencia de la pérdida de la parte de la cadena que en la TLN nativa interaccionan con el interior hidrofóbico del fragmento TLN-255-316 (véase en la Figura 2.5 cómo la hélice 235-246 interacciona con las 3 hélices del fragmento TLN-255-316). Vita et al. (1989) han obtenido un valor para la constante de asociación del fragmento de $(2 \pm 1) \times 10^4$ M^{-1} a 20°C, con lo que se puede calcular un incremento de energía de Gibbs de estabilización por dimerización, $\Delta G_D = -24 \pm 2$ kJ/mol de dímero a 20°C. Este es un valor grande comparado con el incremento de energía de Gibbs que hemos obtenido para el desplegamiento del dímero ($\Delta G = 30 \pm 3$ kJ/mol de monómero a 20 °C), de forma que, teniendo en cuenta el pequeño tamaño del fragmento, las interacciones que se producen entre las superficies de los dos monómeros deben ser muy importantes.

En definitiva, el fragmento C-terminal TLN-255-316 muestra una estructura globular s altamente compacta en disolución. Tiene una fuerte tendencia a formar un dímero a

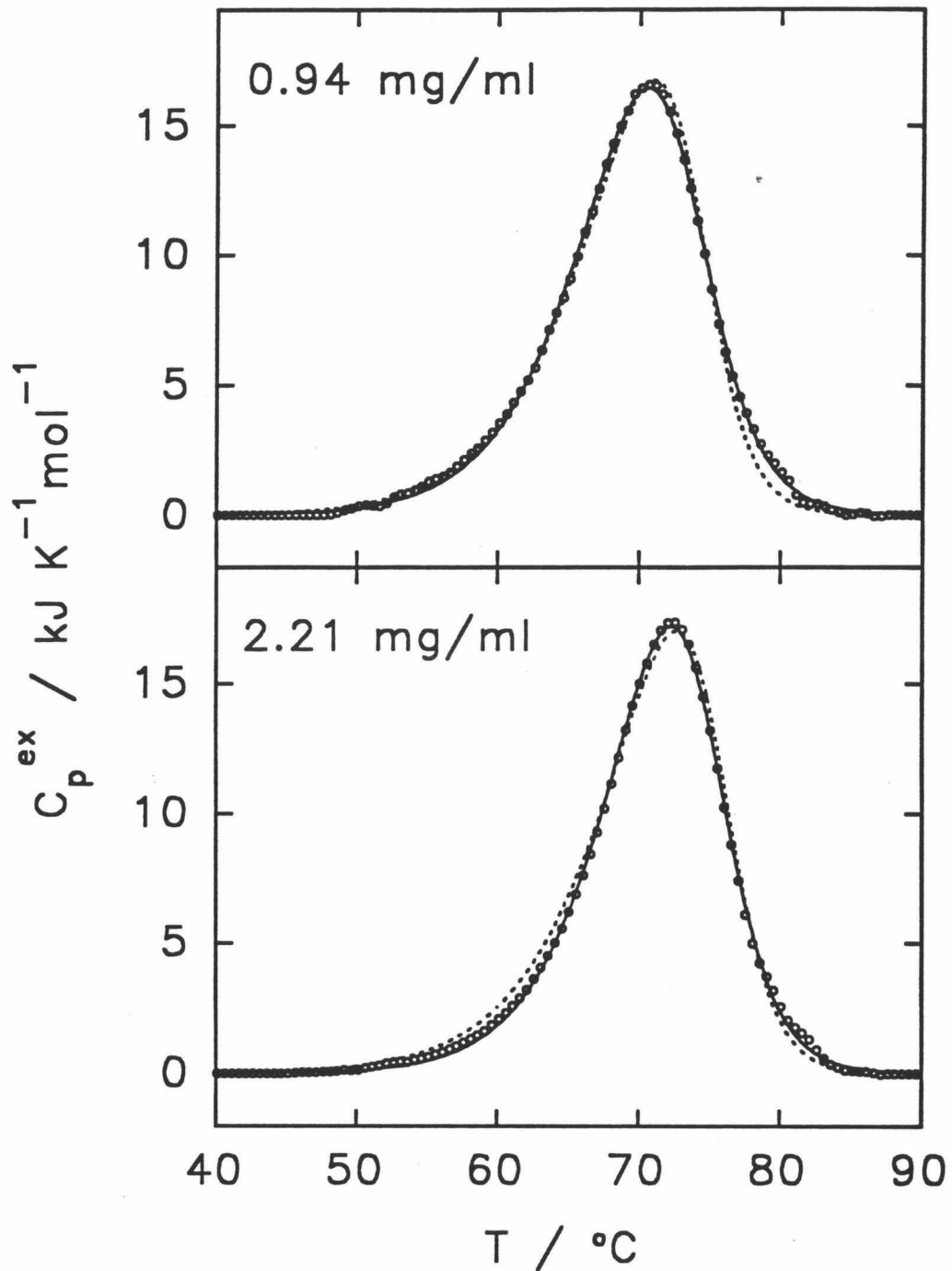


FIGURA 5.4.5: Ajustes no lineales de mínimos cuadrados de la curvas de $C_p^{ex}(T)$ teóricas predichas por el modelo $N_n \rightleftharpoons nD$ a los datos experimentales correspondientes al fragmento TLN-255-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5, a dos concentraciones de muestra diferentes: (A) 0.94 mg/ml; (B) 2.21 mg/ml. Los puntos (o) representan los datos experimentales; las líneas continuas (—) representan los mejores ajustes obtenidos para $n=2$ (modelo $N_2 \rightleftharpoons 2D$); Las líneas discontinuas representan los mejores ajustes para $n=3$ (modelo $N_3 \rightleftharpoons 3D$).

concentraciones por encima de 0.1 mg/ml, estabilizándose apreciablemente. El dímero se despliega térmicamente siguiendo el esquema de equilibrio $N_2 \rightleftharpoons 2D$, con una temperatura de transición en torno a los 70 °C. Estos resultados apuntan la posibilidad de que este fragmento podría constituir uno de los núcleos de plegamiento de la TLN, dada su capacidad de plegarse espontáneamente. Como se sabe, el empaquetamiento y asociación de dominios con el fin de minimizar la superficie accesible al medio parecen estar implicados en el mecanismo común del plegamiento de las proteínas (Jaenicke, 1991). El fragmento TLN-255-316 muestra una tendencia a cubrir la superficie hidrofóbica que expone al medio, con lo que, en la TLN nativa, seguiría generando estructura a lo largo de la cadena. Como veremos más adelante, el fragmento TLN-205-316, que contiene una hélice α adicional sigue manteniendo estructura globular en disolución similar a que posee en la TLN nativa, constituyendo un motivo estructural muy frecuente: el "manejo de 4 hélices α ".

5.4.2 Efecto de la concentración de muestra en las transiciones de DSC del fragmento TLN-205-316.

Análogamente al estudio realizado con el fragmento TLN-255-316, se ha llevado a cabo una investigación similar con el fragmento TLN-205-316, de peso molecular 11978, obtenido mediante autólisis controlada de la TLN, como se describe en el Capítulo 3 de Materiales y Métodos. Como veremos, se ha encontrado que este fragmento presenta a su vez interacciones intermoleculares (procesos de asociación/disociación) dependientes de la temperatura, experimentando también un desplegamiento térmico reversible. Este fragmento es análogo al TLN-206-316, que posee un aminoácido más (metionina), y que se obtiene por reacción de la TLN con bromuro de cianógeno. Este segundo fragmento ha sido ya estudiado por técnicas no calorimétricas (Vita et al., 1979; Vita y Fontana, 1982; Vita et al., 1985; Vita et al., 1989), mostrando una estructura globular similar a la que presenta en la TLN nativa. Los autores de estos trabajos concluyen que este fragmento, a 20 °C, consiste en un monómero libre en disolución. Este comportamiento aparentemente contradictorio en cuanto a su estado de asociación, para dos fragmentos prácticamente idénticos, se justificará, entre otros resultados, a lo largo del presente Apartado del análisis de nuestros resultados.

Los experimentos de DSC con el fragmento se realizaron en fosfato 20 mM, pH 7.5, variando la concentración de proteína, C_0 , entre 0.1 y 3.7 mg/ml. La velocidad de barrido

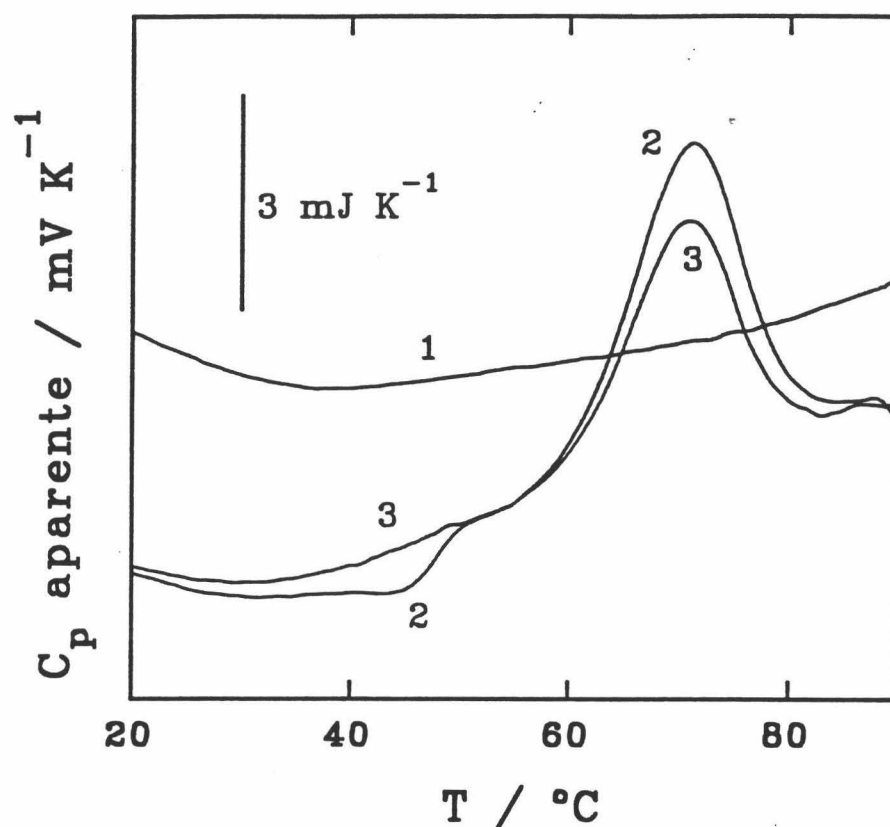


FIGURA 5.4.6: Registro experimental de DSC obtenido con TLN-205-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5, a una velocidad de barrido de 2.0 K/min y una concentración de muestra de 2.84 mg/ml. (1) línea base instrumental; (2) 1^{er} barrido con la muestra; (3) 2^o barrido.

empleada normalmente fue de 2 K/min, aunque se hicieron algunos experimentos a 1.0 y 0.5 K/min. Un registro experimental correspondiente a uno de los experimentos de DSC ($C_1=2.84$ mg/ml) se muestra en la Figura 5.4.6. Se puede apreciar a primera vista que el desplegamiento térmico del fragmento TLN-205-316 es altamente reversible indicando que el proceso transcurre en equilibrio. La insensibilidad de los valores de T_m que se ha encontrado a la modificación de la velocidad de barrido (2.0, 1.0 y 0.5 K/min) confirma que la transición transcurre en equilibrio. Por tanto, se puede concluir que el fragmento TLN-205-316 muestra un desplegamiento térmico reversible, tal como ocurre con el TLN-255-316 que tiene una hélice α menos, y como también se ha descrito en la Bibliografía para el TLN-206-316 (también llamado FII) (Vita y Fontana, 1982).

Una inspección más minuciosa de la Figura 5.4.6 nos permite apreciar un detalle importante: La existencia en el primer barrido con la muestra de una pequeña exoterma claramente distinguible, entre 30°C y 50°C aproximadamente, previa a la transición principal. Esta exoterma es irreversible dado que no aparece en el segundo barrido, incluso si se calienta únicamente hasta 50 °C (ver Figura 5.4.7A), mientras que la transición principal sí es reversible. Esta irreversibilidad era de esperar dado que un proceso exotérmico de equilibrio no puede inducirse incrementando la temperatura. Por tanto esta exoterma debe corresponder a un proceso de no equilibrio. Precisamente cuando se realizan experimentos modificando la velocidad de barrido, la exoterma muestra una dependencia con este parámetro lo que confirma el control cinético del proceso que está ocurriendo (ver Figura 5.4.7B). Si suponemos que este proceso es debido exclusivamente al fragmento TLN-205-316 y no a alguna impureza dado que es una muestra homogénea, el fragmento debe encontrarse antes del barrido en un estado metastable (de no equilibrio) que evoluciona al equilibrio al calentarse por encima de 50 °C. En el segundo barrido, después de calentar la muestra hasta 50 °C (Figuras 5.4.7A y 5.4.8), no sólo desaparece la exoterma sino que incluso se aprecia una pequeña endoterma sobre los 40 °C. El significado físico de ambas transiciones será comentado a lo largo de este Apartado.

Con el fin de comprobar que la presencia de este proceso exotérmico no es debida a algún efecto imprevisto del tampón fosfato utilizado (es bien sabido que el tampón fosfato tiene cierta tendencia a interaccionar con algunas proteínas), se realizó un experimento de DSC en PIPES 20 mM, NaCl 0.1M, pH 7.5 a 1K/min y $C_1=3.12$ mg/ml. El resultado se muestra en la Figura 5.4.8, observándose idéntico comportamiento que en tampón fosfato, lo que descarta la influencia del tampón en el proceso.

La existencia de esta exoterma dificulta mucho el análisis de la transición principal, que corresponde al desplegamiento térmico del fragmento, sobre todo a la hora del trazado de la línea base química con el fin de obtener los valores de la entalpía de desnaturalización, ΔH . Además imposibilita la obtención del incremento de capacidad calorífica de desnaturalización, ΔC_p . El trazado de línea base química que se ha realizado se muestra en la Figura 5.4.9 para una de las curvas de $C_p(T)$. Se han utilizado las extrapolaciones de la curva de $C_p(T)$ correspondientes a la traza anterior al comienzo de la exoterma y posterior a la transición principal como bases para la obtención de la línea base química por el método

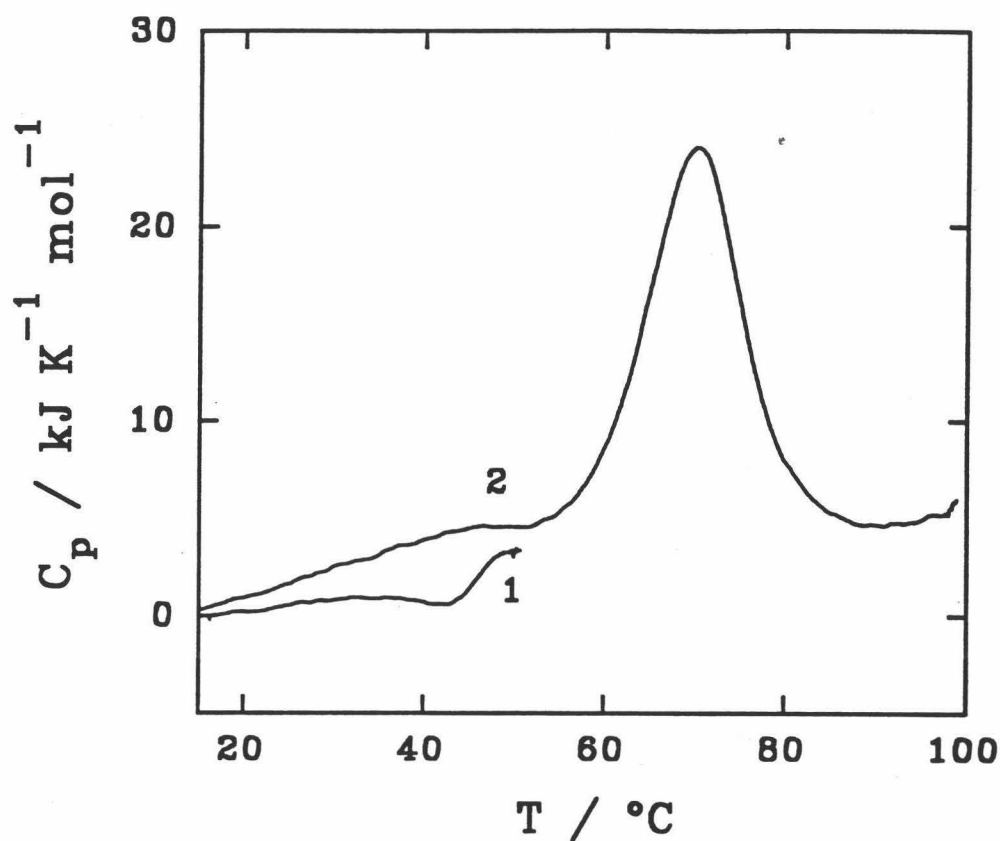


FIGURA 5.4.8: Curvas de capacidad calorífica en función de la temperatura, $C_p(T)$, obtenidas tras restar la línea base instrumental, correspondientes al fragmento TLN-205-316 en PIPES 20 mM, pH 7.5. (1) Primer barrido calentando hasta $\approx 50^{\circ}\text{C}$; (2) segundo barrido calentando hasta 100°C , tras el enfriamiento después de (1).

de Takahashi y Sturtevant (1981). Las curvas de $C_p^{\text{ex}}(T)$ resultantes se muestran en las Figura 5.4.10 para varias concentraciones de muestra. Dado que solapan la exoterma y la transición principal, sólo es posible dar valores estimativos de ΔH , que se muestran en la Tabla 5.4.III. Este procedimiento de trazado de la línea base química se siguió también para las curvas de $C_p(T)$ de muestras precalentadas a 50°C (sin la exoterma), cuyos parámetros resultantes se incluyen también en la Tabla 5.4.III.

Observando los valores de la Tabla 5.4.III marcados con un asterisco, se aprecia que la entalpía medida del área de las transiciones es en general algo más baja. En estos barridos ha desaparecido la exoterma previa a la transición principal, modificándose la forma de la

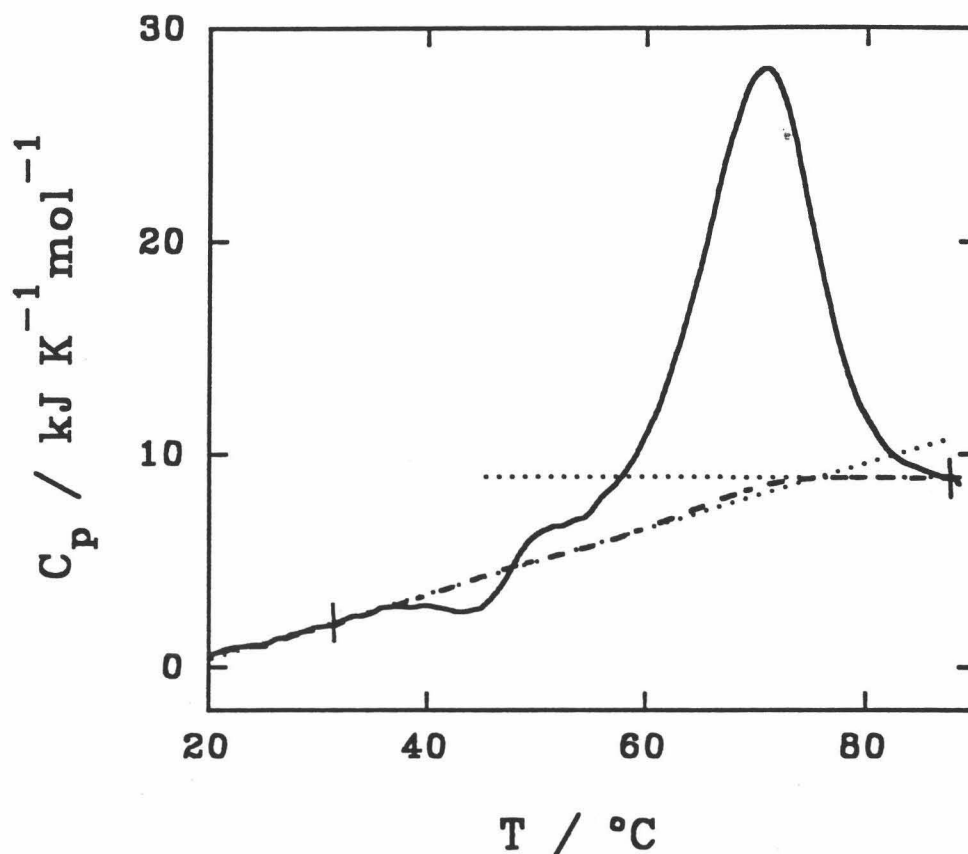


FIGURA 5.4.9: Ilustración del método de trazado de línea base química sobre las curvas de $C_p(T)$, en línea continua(—), obtenidas tras restar la línea base instrumental. Las líneas de puntos (.....) representan las extrapolaciones de la curva desde ambos lados de las transiciones utilizadas para la aplicación del método de Takahashi y Sturtevant (1981), correspondientes a la $C_p(T)$ de los estados nativo y desplegado. La línea discontinua (---) representa la línea base química calculada por el método.

curva de $C_p(T)$ a la izquierda de la transición. Esto parece ser que influye mucho en el trazado de la línea base química por lo que, como antes hemos mencionado, los valores de ΔH sólo pueden tomarse como estimativos. Sin embargo, hay que decir que los valores de la entalpía de desnaturalización específica (21.9 ± 1.6 J/g) para una T_m de $\approx 70^{\circ}\text{C}$ están sólo ligeramente por debajo de los valores descritos para proteínas globulares compactas, con alta densidad de contactos hidrofóbicos y puentes de hidrógeno en su estructura (Privalov, 1979).

Puede apreciarse de los valores de ΔH obtenidos (el valor medio ponderado por la concentración de muestra utilizando sólo valores de muestra sin calentamiento previo a 50°C

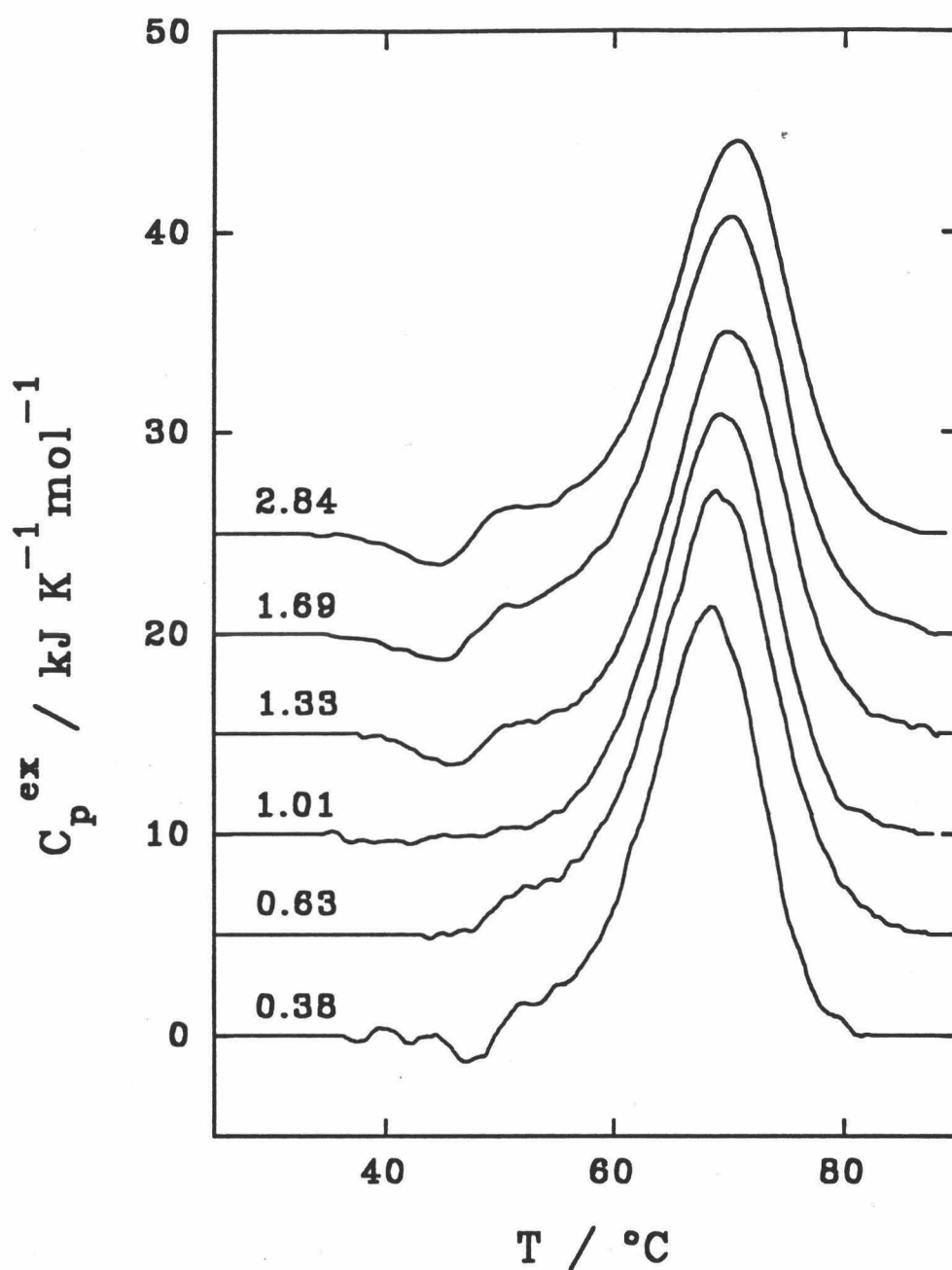


FIGURA 5.4.10: Efecto de la concentración de la muestra en las curvas de capacidad calorífica de exceso, $C_p^{ex}(T)$, correspondientes al desplegamiento térmico del fragmento TLN-205-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5. Las concentraciones de muestra se indican junto a cada curva en mg/ml.

Tabla 5.4.III

Entalpía calorimétrica molar, ΔH , y específica, Δh , entalpía de van't Hoff, ΔH^{vH} , y temperatura del máximo, T_m , para el desplegamiento térmico de TLN-205-316 a varias concentraciones de muestra, C_t .

C_t mg/ml	v K/min	ΔH kJ/mol	Δh J/g	$\Delta H^{vH(a)}$ kJ/mol	T_m °C
0.15	2.0	-	-	-	68.0
0.38	2.0	257	21.4	322	68.47
0.47	2.0	269	22.4	307	68.99
0.63	2.0	306	25.5	280	69.10
0.85 ^(*)	2.0	280	23.3	287	69.39
1.01	2.0	261	21.8	311	69.40
1.33	2.0	248	20.7	314	70.00
1.53	0.5	243	20.3	280	69.50
1.69	2.0	278	23.2	292	70.10
1.69 ^(*)	2.0	213	17.8	327	70.09
1.78	2.0	270	22.5	296	70.59
2.84	2.0	254	21.2	302	70.61
3.61 ^(*)	2.0	230	19.2	306	70.82
3.61 ^(*)	1.0	211	17.6	347	71.37
3.61 ^(*)	0.5	212	17.7	323	70.38

^(a)Calculada mediante la ecuación 4.9.

^(*)Barridos obtenidos tras el calentamiento de las muestras a 50°C durante \approx 10 minutos.

es de 262 ± 19 kJ/mol) y los valores de la entalpía de van't Hoff calculados mediante la Ecuación 4.9 (300 ± 15 kJ/mol) que la relación entre ambos valores es menor que la unidad ($r=0.87$) lo que indica la probabilidad de que exista un proceso de cambio en el estado de asociación acompañando al desplegamiento térmico del fragmento TLN-205-316 (ver Capítulo 4).

Por otra parte, se ha encontrado un ligero efecto de la concentración de la muestra sobre las transiciones de DSC como se puede ver en la Tabla 5.4.III y en la Figura 5.4.10. El incremento de la concentración hace que suba ligeramente la T_m de las transiciones. Este efecto de la concentración, junto con el valor medio de la relación entre la entalpía calorimétrica y la entalpía de van't Hoff, hacen pensar que este fragmento tenga tendencia a asociarse en estado nativo, disociándose al desplegarse. Hemos visto anteriormente que esto

mismo ocurría con el fragmento TLN-255-316, que es un dímero en disolución.

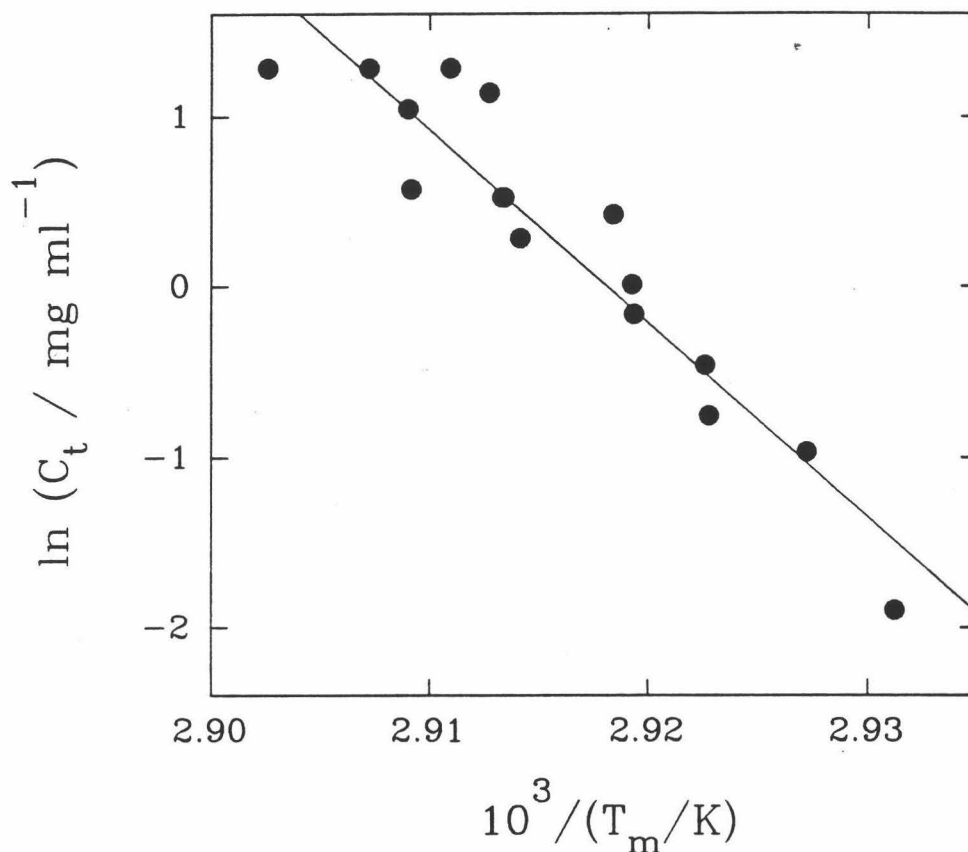


FIGURA 5.4.11: Representación de $\ln C_t$ frente a $1/T_m$ (ver Ecuación 4.24) para los valores de T_m y las concentraciones de muestra, C_t , que se exponen en la Tabla 5.4.III. La línea continua representa la recta de ajuste por mínimos cuadrados, cuya pendiente es -113400 K .

En cuanto al efecto de la concentración de muestra encontrado, una representación de $\ln(C_t)$ frente a $1/T_m$ se muestra en la Figura 5.4.11. Como ya hemos visto en el Apartado anterior y el Capítulo 4 de Fundamentos Teóricos, si se supone un modelo de desplegamiento del tipo $N_n \rightleftharpoons nD$, de esta representación se debe obtener una recta de pendiente $-n\Delta H/(n-1)R$, donde ΔH es la entalpía del proceso por mol de monómero (Ecuaciones 4.24 y 5.1). De la representación de la Figura 5.4.11 se obtiene una pendiente de -113400 K , que corresponde a una entalpía, para $n=2$, de 471.5 kJ/mol de monómero. Este valor es excesivamente alto comparado con el experimental y se desvía aún más para $n > 2$. Además, el valor encontrado para la relación $r = \Delta H/\Delta H^{\text{H}} = 0.88$, aunque aproximado, es claramente

mayor que lo previsto para un modelo de desplegamiento $N_2 \rightleftharpoons 2D$ (0.73) y menor que el valor de 1 correspondiente al modelo $N \rightleftharpoons D$. Parece pues que la situación es intermedia entre los dos casos por lo que podría proponerse en primera instancia el siguiente modelo de desplegamiento para TLN-205-316:



Centrándonos de nuevo en la pequeña exoterma previa a la transición principal, se ha observado que muestra una ligera dependencia con la concentración de la muestra, C_1 (ver Figura 5.4.10), desplazándose ligeramente el valor del mínimo hacia menor temperatura al incrementarse C_1 . Esto sugiere que el proceso irreversible responsable de la exoterma no es monomolecular, como posteriormente se justificará.

5.4.3 Experimentos de Cromatografía de Exclusión Molecular con el fragmento TLN-205-316.

Anteriormente se ha mencionado la probable existencia de un estado metastable a baja temperatura que evolucionaría al equilibrio a partir de $\approx 50^\circ\text{C}$. Además existe la posibilidad de que coexistan dímeros y monómeros durante el calentamiento de la muestra. Con el fin de investigar estas posibilidades se han realizado experimentos de Cromatografía de Exclusión Molecular en una columna de Sephadex G-75SF de 1 cm x 40 cm., en las mismas condiciones de los experimentos de DSC (fosfato 20 mM, NaCl 0.1M, pH 7.5), y a diferentes concentraciones de muestra. Las condiciones de los experimentos se describen en el Apartado 3.5. La temperatura de trabajo elegida fue de 20°C , dado que a esa temperatura la exoterma aún no ha comenzado. En la Figura 5.4.12A se muestran los cromatogramas correspondientes a muestras de TLN-205-361 disueltas en agua y dializadas frente al tampón de trabajo, a 3 concentraciones diferentes. También se incluye el cromatograma obtenido utilizando tampón PIPES 20 mM, NaCl 0.1M, pH 7.5. Se observa la presencia en todos los casos de 2 picos correspondientes a diferente peso molecular (o radio de Stokes). Las dos especies presentes no se encuentran en equilibrio rápido entre sí, dado que si lo estuvieran sólo aparecería un pico a un volumen de retención intermedio (ver Apartado 3.5).

La determinación del peso molecular aparente de ambos picos se realizó utilizando

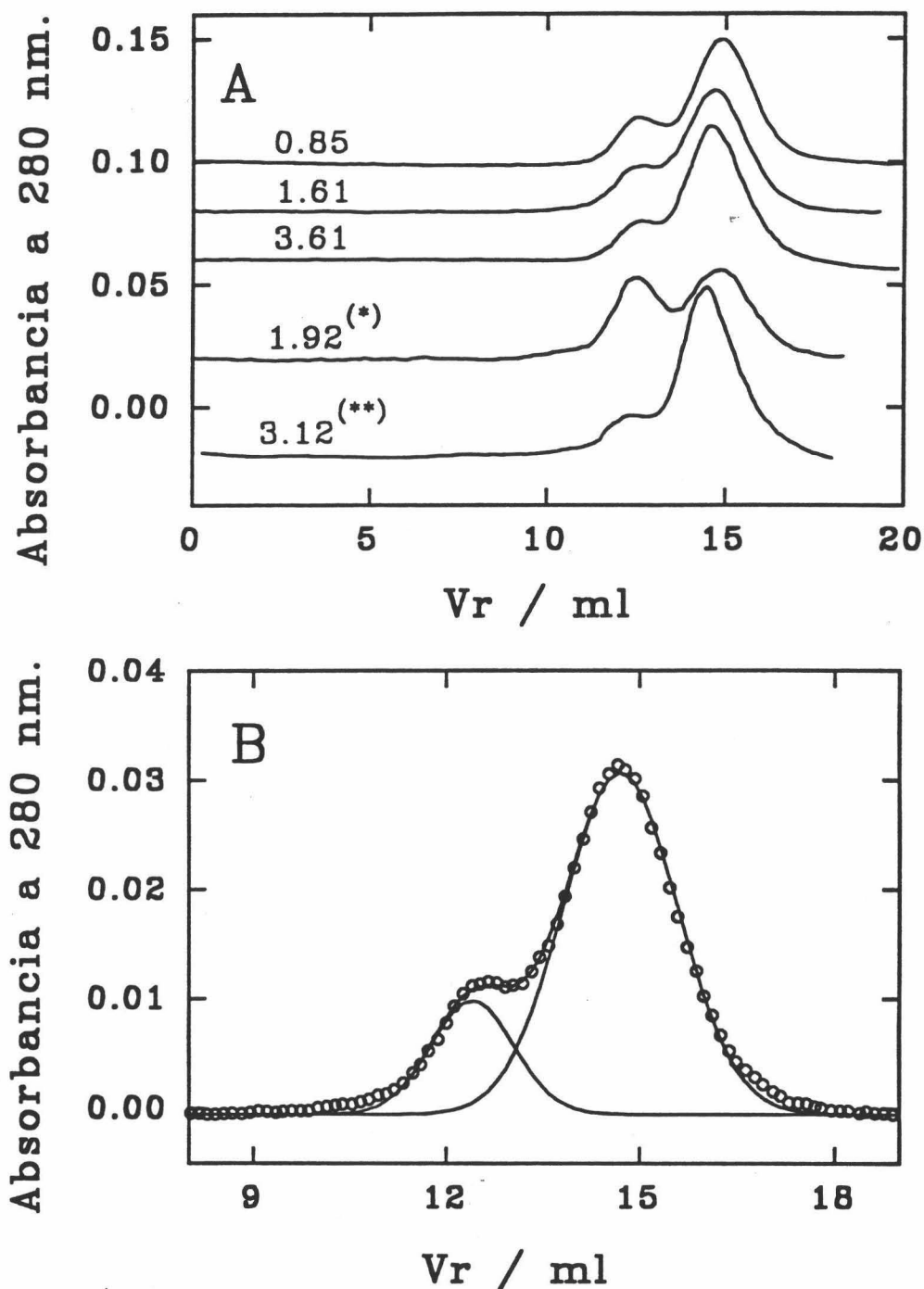
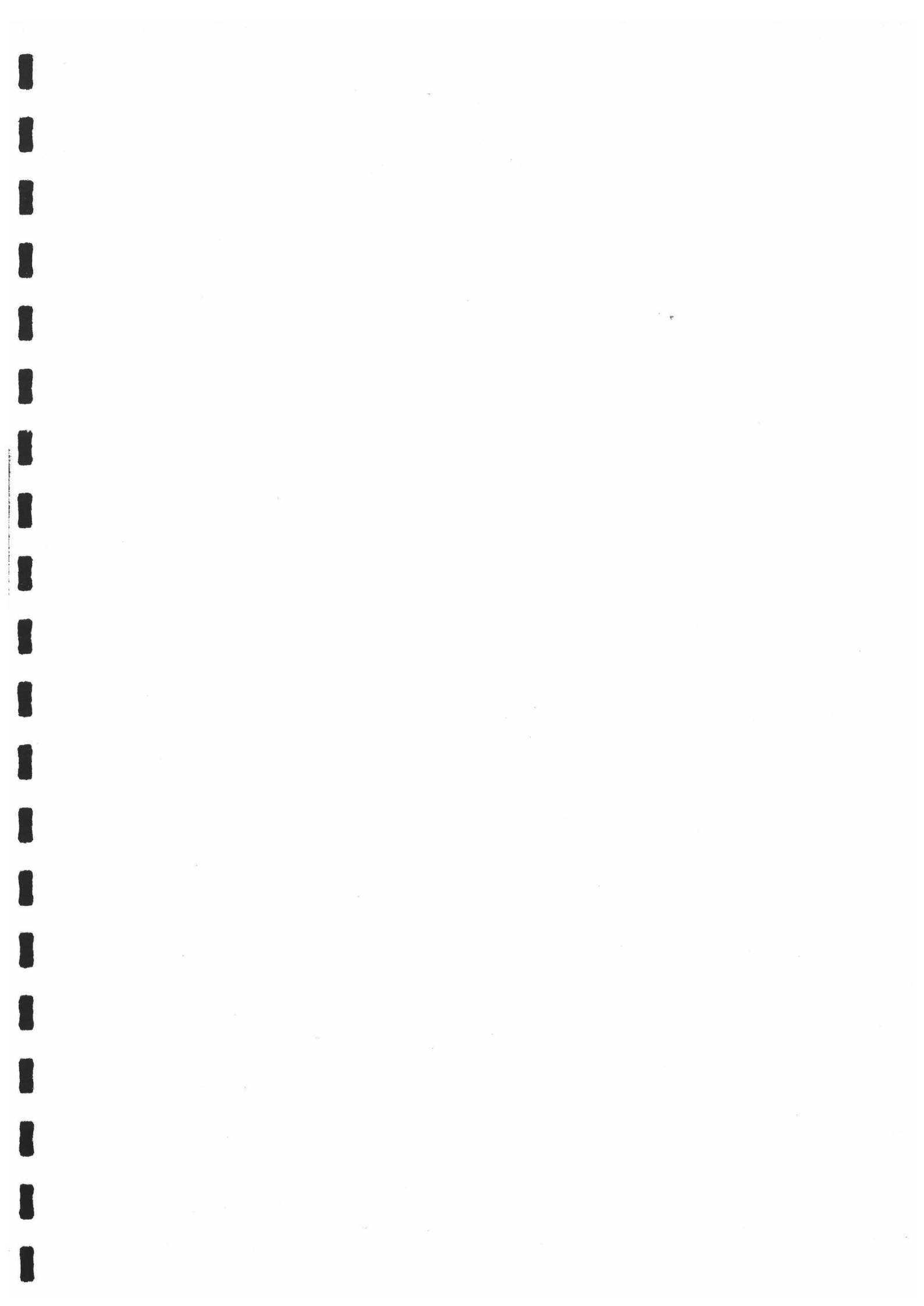


FIGURA 5.4.12: (A) Cromatografías de exclusión molecular obtenidas a 20°C con fragmento TLN-205-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5, a las concentraciones de muestra que se indican junto a las curvas, en mg/ml. Los experimentos sin marcar con asterisco corresponden a muestras que fueron preparadas disolviendo el fragmento liofilizado en agua y dializando posteriormente frente al tampón. (*) corresponde a una muestra que se preparó disolviendo el liofilizado en GuHCl 6M y dializando posteriormente. (**) corresponde a un experimento realizado en PIPES 20 mM, pH 7.5. (B) Ilustración del método utilizado para la determinación de las áreas correspondientes a cada pico cromatográfico. Los puntos (O) representan un cromatograma experimental. Las líneas continuas representan el mejor ajuste a las suma de dos curvas Lorentzianas (las dos componentes y la envolvente).



una recta de calibrado obtenida con proteínas patrones de peso molecular como se describe en el Apartado 3.5. La determinación de la fracción molar de cada pico, referida a moles de monómero se calculó mediante el ajuste no lineal de mínimos cuadrados a una curva formada por la suma de 2 Lorentzianas, utilizando un programa cedido por el Dr. Ernesto Freire, de la Universidad de Johns Hopkins (Baltimore). Un ajuste de este tipo se muestra en la Figura 5.4.12B. La fracción del área total que aporta cada Lorentziana fue asignada a la fracción molar de cada especie. Los resultados se muestran en la Tabla 5.4.IV. No se muestran los resultados correspondientes a tampón PIPES puesto que el calibrado no es en este caso válido al haberse reequilibrado la columna en el nuevo tampón, aunque los valores son similares.

Tabla 5.4.IV

Volúmenes de retención, V_r , de los picos obtenidos de los experimentos de Cromatografía de Exclusión Molecular con muestras dializadas de TLN-205-316 de diferentes concentraciones, C_t , sin calentar. Determinación del peso molecular aparente, P.M., de las especies presentes y de las poblaciones relativas, x_1 y x_2 , referidas a moles de monómero.

C_t mg/ml	$V_r(1)$ ml	$V_r(2)$ ml	P.M.(1) g/mol	P.M.(2) g/mol	x_1	x_2
0.85	12.60	14.90	21375	10938	0.20	0.80
0.85	12.58	15.20	21712	10105	0.22	0.78
1.61	12.67	14.67	20950	12088	0.20	0.80
3.61	12.60	14.90	21586	11030	0.14	0.86
1.92 ^(*)	12.45	14.85	22553	11192	0.39	0.61
Medias:			21600±700	11100±800		

^(*)Muestra preparada disolviendo en GuHCl 6M y posterior diálisis frente al tampón de trabajo.

Dado que el peso molecular del fragmento TLN-205-316, obtenido de su secuencia de aminoácidos es 11978 g/mol, puede deducirse de los resultados mostrados en la Figura 5.4.12 y en la Tabla 5.4.IV, que, a 20 °C, el fragmento TLN-205-316 se encuentra en disolución en una mezcla de monómeros y dímeros que no están en equilibrio. Posiblemente, la barrera energética que debe salvarse en la dimerización es excesivamente alta a 20 °C. Las poblaciones de cada especie parecen variar más o menos linealmente con la concentración de muestra, pero claramente dependen del método de preparación de la misma, a juzgar por

las poblaciones obtenidas con una muestra que fue disuelta en GuHCl 6 M y posteriormente dializada frente al tampón de trabajo (ver Figura 5.4.12A y Tabla 5.4.IV).

Si asociamos el proceso de asociación-disociación con la exoterma que aparece en las curvas de $C_p(T)$, al sobrepasarse los 50°C el sistema debe evolucionar a otro estado, posiblemente al equilibrio, ya que a partir de esa temperatura las curvas de $C_p(T)$ se muestran independientes de la velocidad de barrido. Se han realizado experimentos de Cromatografía de Exclusión Molecular en las mismas condiciones anteriores, a 20 °C, pero con muestras calentadas durante 10 minutos a 50 °C y rápidamente enfriadas en un baño de hielo. En la Figura 5.4.13 se muestran los cromatogramas correspondientes a una serie de concentraciones de muestra. Puede observarse que aparecen de nuevo 2 picos resueltos en todos los cromatogramas, lo que indica que el sistema de nuevo no está en equilibrio tras el calentamiento y el posterior enfriamiento rápido. Sin embargo, se aprecia un cambio en el área relativa de cada pico respecto de los cromatogramas mostrados en la Figura 5.4.12A. En la Tabla 5.4.V se exponen los resultados de la determinación del peso molecular aparente y de las poblaciones relativas de las especies correspondientes a cada pico para los cromatogramas de la Figura 5.4.13.

Los valores de la Tabla 5.4.V demuestran que al calentar a 50 °C ha habido una modificación de las poblaciones relativas de monómero y dímero de TLN-205-316, evolucionando éstas probablemente a las poblaciones de equilibrio. Al enfriar rápidamente a bajas temperaturas, ambas especies vuelven a no estar en equilibrio, con lo que quedan "congeladas" las poblaciones correspondientes al equilibrio de disociación a 50 °C, que pueden determinarse a 20°C cromatográficamente. Si esta descripción es correcta, puede calcularse para cada concentración, C_i en moles de monómero/litro, la constante del proceso de disociación, K_D , a 50°C:

$$K_D = \frac{[N]^2}{[N_2]} = \frac{2C_i x_N^2}{x_{N_2}} \quad (5.2)$$

donde x_N y x_{N_2} son las fracciones de monómero y dímero respectivamente, referidas ambas a moles de monómero. C_i es la concentración molar de monómeros total. Los valores de K_D a 50°C obtenidos de esta forma se incluyen en la Tabla 5.4.V. Se puede ver que la coincidencia de estos valores a diferentes concentraciones es buena. De esta forma se obtiene un valor para la constante de disociación de TLN-205-316, a 50 °C, de $(1.2 \pm 0.5) \times 10^{-4} M$.

Tabla 5.4.V

Volúmenes de retención, V_r , de los picos obtenidos de los experimentos de Cromatografía de Exclusión Molecular con muestras dializadas de TLN-205-316 de diferentes concentraciones, C_t , calentadas a 50°C durante 10 minutos y enfriadas rápidamente en hielo. Determinación del peso molecular aparente, P.M., de las especies presentes y de las poblaciones relativas, x_1 y x_2 , referidas a moles de monómero, así como de la constante de equilibrio de disociación a 50 °C, K_D .

C_t mg/ml	$V_r(1)$ ml	$V_r(2)$ ml	P.M.(1) g/mol	P.M.(2) g/mol	x_1	x_2	$K_D \cdot 10^4$ M
0.10	12.66	15.32	21212	9758	0.15	0.85	0.797
0.30	12.65	15.09	21273	10435	0.29	0.71	0.855
0.50	12.62	15.05	21460	10557	0.34	0.66	1.076
0,85	12.53	14.93	21590	10938	0.42	0.58	1.130
1.61	12.46	14.83	22026	11160	0.55	0.45	0.959
1.92	12.42	14.75	22751	11524	0.56	0.44	1.132
2.70	12.71	14.81	20904	11323	0.61	0.39	1.132
3.61	12.70	14.95	21586	10870	0.55	0.45	2.247
Medias:			21600±600	10800±600			1.2±0.5

La influencia del fosfato utilizado como tampón en las disoluciones no parece tener influencia en estos resultados puesto que éstos fueron idénticos al realizar los mismos experimentos utilizando tampón PIPES 20 mM, NaCl 0.1M, pH 7.5, como se puede ver en las Figuras 5.4.12A y 5.4.13.

5.4.4 Un modelo sencillo que explica las curvas de $C_p(T)$ correspondientes al desplegamiento térmico del fragmento TLN-205-316.

Hasta ahora disponemos de la siguiente información sobre el desplegamiento térmico del fragmento TLN-205-316:

1.- Información calorimétrica:

-Una transición reversible centrada alrededor de 70°C, independiente de la velocidad de barrido, que muestra en cambio una dependencia con la concentración de muestra compatible con la coexistencia en el estado nativo de dímeros y monómeros en equilibrio.

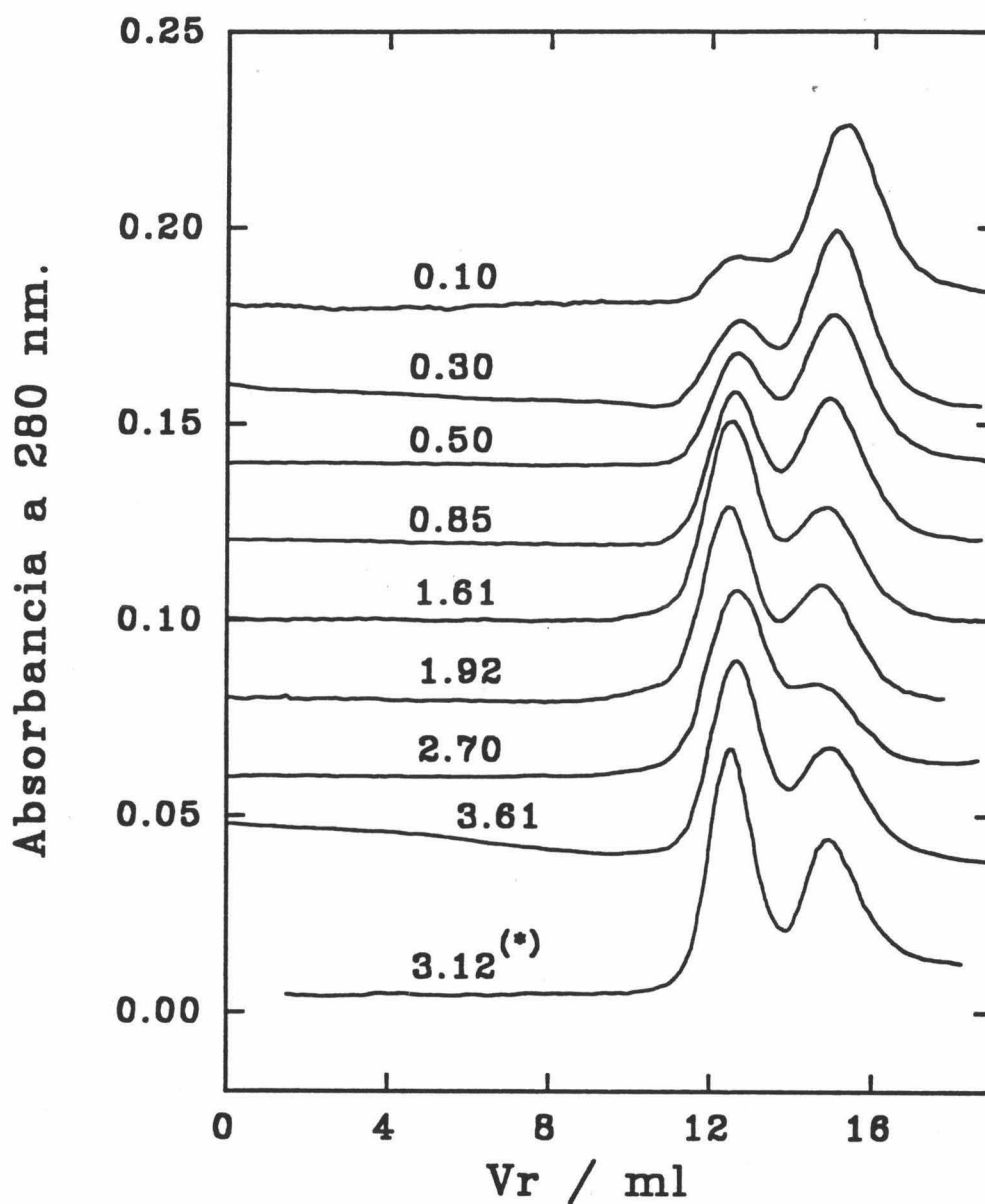


FIGURA 5.4.13: Cromatografías de exclusión molecular obtenidas a 20°C con muestras de fragmento TLN-205-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5, calentadas previamente a 50°C durante ≈ 10 min y enfriadas rápidamente en un baño de hielo. Las concentraciones de muestra se indican junto a las curvas, en mg/ml. (*) corresponde a un experimento realizado en PIPES 20 mM, pH 7.5.

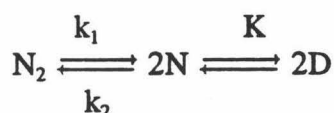
-Una pequeña exoterma irreversible entre 30 y 50 °C, dependiente de la velocidad de barrido y de la concentración de muestra, que indica la existencia de un estado metastable por debajo de 30 °C, el cual evoluciona al equilibrio mediante un proceso exotérmico.

2.- Información cromatográfica:

-El estado metastable a baja temperatura consiste en una mezcla de monómeros y dímeros de TLN-205-316 que no se encuentran en equilibrio (o más bien que éste es demasiado lento a 20°C frente al tiempo de separación cromatográfica). La población inicial relativa de cada especie parece ser que depende del método de preparación de la muestra y de la concentración de la misma.

-Esta mezcla metastable evoluciona al equilibrio con el calentamiento por encima de ≈50°C. Las poblaciones de equilibrio a esa temperatura pueden congelarse mediante enfriamiento rápido y determinarse cromatográficamente, obteniéndose una estimación de la constante de equilibrio de disociación, K_D , a 50 °C.

Toda esta información es compatible con el siguiente modelo:



donde k_1 y k_2 son las constantes de velocidad individuales de los procesos de asociación-disociación, y K es la constante de equilibrio de desplegamiento del monómero. Las constantes de equilibrio de disociación, K_D , y de desplegamiento, K , son:

$$K_D = \frac{[N]^2}{[N_2]} = \frac{k_1}{k_2} \quad ; \quad \ln K_D = \ln k_1 - \ln k_2 \tag{5.3}$$

$$K = \frac{[D]}{[N]}$$

Tendremos dos situaciones en las que puede encontrarse nuestro sistema, dependiendo de la temperatura:

Situación A: El equilibrio de disociación es lento. El proceso estará gobernado por las constantes de velocidad individuales, k_1 y k_2 , que tienen valores bajos, interpretándose en términos cinéticos. Esto parece ocurrir a temperaturas inferiores a ≈50°C.

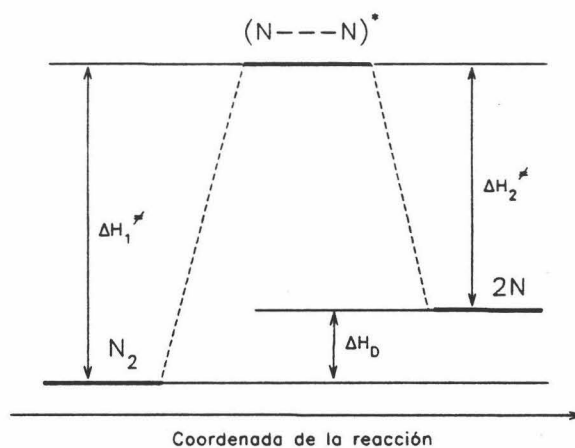
Situación B: Las constantes k_1 y k_2 toman valores suficientemente altos como para que

el equilibrio se considere rápido. El proceso global es de equilibrio.

El criterio, totalmente arbitrario pero razonable, que se ha adoptado para distinguir las dos situaciones es que el valor de las constantes de velocidad sea mayor o menor, según el caso, de 10^5 min^{-1} para k_1 y $10^5 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ para k_2 .

Situación A:

Para desarrollar este modelo vamos a utilizar por conveniencia la formulación de la teoría del estado de transición. Entre el estado dimérico y el monomérico de TLN-205-316 existe una barrera energética, en cuyo máximo se encuentra el complejo activado. El siguiente esquema ilustra las diferencias de entalpía entre N_2 , $2N$ y el complejo activado o estado de transición.



donde ΔH_1^* es la entalpía de activación del proceso de disociación, ΔH_2^* es la entalpía de activación del proceso de asociación y ΔH_D es el incremento de entalpía de disociación, todas expresadas por mol de dímero. Obviamente, estos tres parámetros, junto con el incremento de entalpía de desplegamiento del monómero, ΔH , controlan las variaciones con la temperatura de k_1 , k_2 , K_D y K , respectivamente de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \frac{d \ln k_1}{dT} &= \frac{\Delta H_1^* + RT}{RT^2} \\ \frac{d \ln k_2}{dT} &= \frac{\Delta H_2^* + RT}{RT^2} \\ \frac{d \ln K_D}{dT} &= \frac{\Delta H_D}{RT^2} \\ \frac{d \ln K}{dT} &= \frac{\Delta H}{RT^2} \end{aligned} \tag{5.4}$$

y además, se cumple que $\Delta H_D = \Delta H_1^* - \Delta H_2^*$. La equivalencia con la formulación de Arrhenius es que $\Delta H_i^* = E_i + RT$, siendo E_i la energía de activación del proceso i .

La velocidad de formación de N, expresada como fracción de monómeros, es:

$$\frac{dx_N}{dt} = k_1 x_{N_2} - 2k_2 C_i x_N^2 \tag{5.5}$$

donde x_N y x_{N_2} son las fracciones de monómeros y dímeros respectivamente, referidas a moles de monómeros, y C_i es la concentración total de muestra en moles monómero/litro.

Puesto que $x_N + x_{N_2} + x_D = 1$ y $K = x_D/x_N$, y teniendo en cuenta la velocidad de barrido, $v = dT/dt$, la variación de x_N con la temperatura queda:

$$\frac{dx_N}{dT} = \frac{1}{v} (k_1 [1 - x_N(1+K)] - 2k_2 C_i x_N^2) \tag{5.6}$$

donde k_1 , k_2 y K son funciones de la temperatura. Esta ecuación diferencial no tiene solución analítica (o es excesivamente costosa su resolución) por lo que es necesario resolverla numéricamente. Para ello es necesario conocer x_N a una temperatura inicial y las dependencias con la temperatura de k_1 , k_2 y K .

El valor de x_N a una temperatura inicial lo hemos determinado con los experimentos de Cromatografía de Exclusión Molecular de muestras sin calentar. Vimos que seguía una variación aproximadamente lineal con C_i , por lo que podemos construir una tabla de valores de x_{N0} para diferentes concentraciones de muestra, C_i , sin cometer demasiado error, dado que x_{N0} varía en un intervalo muy pequeño (ver Tabla 5.4.IV).

En cuanto a la variación de las constantes con la temperatura, nos es más conveniente

expresar k_1 como k_2K_D , ya que conocemos el valor de K_D a 50°C .

En este punto es necesario hacer una aclaración: Como se ha mencionado anteriormente, no es posible la determinación del incremento de capacidad calorífica de desplegamiento, ΔC_p , debido al solapamiento de las dos transiciones. Por ello hemos supuesto $\Delta C_p=0$, utilizando para el análisis las curvas de $C_{pex}(T)$, una vez restada la línea base química como se describió antes. Esto elimina la contribución del ΔC_p de desplegamiento a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ y no es posible por tanto, a partir de éstas, la determinación de esta magnitud del desplegamiento térmico, ya que, dado que todas las transiciones ocurren con valores de T_m muy cercanos, no disponemos en nuestros resultados de información que nos permita determinarla de una representación de ΔH frente a T_m .

Sin embargo, como se verá más adelante, únicamente es posible explicar todos los efectos observados (forma de la exoterma, valor de K_D a 50°C , forma de la transición principal, efecto de la concentración en la T_m de la transición principal y efecto de la velocidad de barrido en la exoterma) si se supone un valor negativo para el incremento de capacidad calorífica de disociación, ΔC_{pD} . Las implicaciones de este valor negativo para ΔC_{pD} se discutirán más adelante.

Mediante integración de las Ecuaciones 5.4 se obtienen las variaciones de k_2 , K_D y K :

$$\begin{aligned} \ln k_2 &= -\frac{\Delta H_2^*(T_2)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_2} \right) + \ln \left(\frac{T}{T_2} \right) + \frac{\Delta C_{p2}^*}{R} \left[\ln \left(\frac{T}{T_2} \right) + \frac{T_2}{T} - 1 \right] \\ \ln K_D &= \ln K_D(T_d) - \frac{\Delta H_D(T_d)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_d} \right) + \frac{\Delta C_{pD}}{R} \left[\ln \left(\frac{T}{T_d} \right) + \frac{T_d}{T} - 1 \right] \\ \ln K &= -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{1/2}} \right) \end{aligned} \quad (5.7)$$

donde T_2 es la temperatura a la que k_2 vale $1 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$, T_d es una temperatura a la que se conoce el valor de $K_D(T_d)$ (en nuestro caso 50°C) y $T_{1/2}$ es la temperatura a la que la constante de equilibrio de desplegamiento vale 1. ΔC_{p2}^* es el incremento de capacidad calorífica de activación para el proceso de dimerización. Este incremento de capacidad calorífica de activación es una necesidad matemática del modelo debido a la inclusión de ΔC_{pD} (ver esquema previo), puesto que si ΔH_D varía con la temperatura a través de ΔC_{pD} ,

ΔH_1^\ddagger y ΔH_2^\ddagger deben hacerlo también a través de sendos valores de incrementos de capacidad calorífica de activación, cumpliéndose que $\Delta C_{pD} = \Delta C_{p1}^\ddagger - \Delta C_{p2}^\ddagger$.

Para la resolución numérica de la Ecuación 5.6 se ha utilizado el método de resolución numérica de Runge-Kutta, que consiste en lo siguiente:

Para una ecuación diferencial del tipo:

$$y' = f(x, y) \tag{5.8}$$

conocido el valor $y(x_0) = y_0$, podemos calcular cada valor de la curva de $y(x)$ utilizando el valor del punto anterior mediante la fórmula:

$$y_{n+1} = y_n + \frac{h}{6}(k_{n1} + 2k_{n2} + 2k_{n3} + k_{n4}) \tag{5.9}$$

donde $y_n = y(x_n)$ e $y_{n+1} = y(x_n + h)$, y $h = x_{n+1} - x_n$. Además:

$$\begin{aligned} k_{n1} &= f(x_n, y_n) \\ k_{n2} &= f\left(x_n + \frac{1}{2}h, y_n + \frac{1}{2}hk_{n1}\right) \\ k_{n3} &= f\left(x_n + \frac{1}{2}h, y_n + \frac{1}{2}hk_{n2}\right) \\ k_{n4} &= f(x_n + h, y_n + hk_{n3}) \end{aligned} \tag{5.10}$$

Para obtener buenos resultados es necesario utilizar un valor lo suficientemente pequeño de h .

Conocido $x_N(T)$, podemos calcular la función entalpía de exceso, $\langle H \rangle(T)$, para el proceso:

$$\begin{aligned} \langle H \rangle &= \frac{1}{2} \Delta H_D(T) x_N + \left(\frac{1}{2} \Delta H_D(T) + \Delta H \right) K x_N \\ \Delta H_D(T) &= \Delta H_D(T_d) + \Delta C_{pD}(T - T_d) \end{aligned} \tag{5.11}$$

Se ha tomado el estado N_2 como estado de referencia.

La capacidad calorífica de exceso, $C_p^{ex}(T)$:

$$C_p^{ex}(T) = \frac{d\langle H \rangle(T)}{dT} = \left[\frac{1}{2} \Delta H_D(T) + K \left(\frac{1}{2} \Delta H_D(T) + \Delta H \right) \right] \frac{dx_N}{dT} + \left[\frac{1}{2} \Delta C_{pD}(1+K) + \left(\frac{1}{2} \Delta H_D(T) + \Delta H \right) K \frac{\Delta H}{RT^2} \right] x_N \quad (5.12)$$

Con la Ecuación 5.12 podremos obtener la curva de $C_p^{ex}(T)$ conociendo los siguientes parámetros:

1. $-\Delta H_D$: Incremento de entalpía de disociación, por mol de dímero.
2. $-\Delta C_{pD}$: Incremento de capacidad calorífica de disociación, por mol de dímero.
3. $-K_D(T_d)$: Constante de equilibrio de disociación a $T=T_d$ (50°C).
4. $-\Delta H_2^\ddagger$: Entalpía de activación para el proceso de dimerización, por mol de dímero.
5. $-\Delta C_{p2}^\ddagger$: Incremento de capacidad calorífica de activación para el proceso de dimerización, por mol de dímero.
6. $-T_2$: Temperatura a la que $k_2 = 1 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$.
7. $-\Delta H$: Incremento de entalpía de desplegamiento.
8. $-T_{1/2}$: Temperatura a la que $K = 1$.

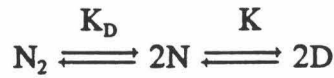
Además se utilizan las siguientes variables experimentales:

- v: Velocidad de barrido (K/min).
- C_i : Concentración de muestra en moles de monómero/ litro.
- x_{NO} : Fracción de monómero inicial a una temperatura en que no hayan ocurrido las transiciones ($< 30^\circ\text{C}$).

En teoría se podría calcular con estas ecuaciones la curva completa de $C_p^{ex}(T)$. Sin embargo, conforme va aumentando el valor de temperatura, llega un momento en que los valores de k_1 y k_2 toman valores muy grandes, produciéndose errores debido a la falta de precisión numérica con que el computador maneja las variables. Además, la exactitud con que se calcula x_N va disminuyendo conforme aumenta T ya que se van acumulando los pequeños errores cometidos. Para resolver este problema, cuando k_1 y k_2 superan un cierto valor ($10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ y 10^5 min^{-1} respectivamente) se supone que el sistema se encuentra en equilibrio rápido (situación B) y se adoptan las ecuaciones correspondientes a dicho equilibrio.

Situación B:

En este caso el modelo pasa a ser:



Dado que el sistema se encuentra ahora en equilibrio, para cualquier temperatura se cumple que:

$$x_{N_2} + x_N + x_D = 1$$

$$\frac{2C_t}{K_D} x_N^2 + (1+K)x_N - 1 = 0 \tag{5.13}$$

Resolviendo esta ecuación de segundo grado:

$$x_N = \frac{1}{C_t} \left(-\frac{K_D}{4} - \frac{K_D K}{4} + \sqrt{\frac{K_D^2}{16} + \frac{K_D^2 K^2}{16} + \frac{K_D^2 K}{8} + \frac{K_D C_t}{2}} \right) \tag{5.14}$$

y derivando respecto a la temperatura:

$$\begin{aligned} \frac{dx_N}{dT} = & \frac{1}{C_t} \left(-\frac{1}{4} \frac{dK_D}{dT} - \frac{1}{4} \frac{dK_D}{dT} K - \frac{1}{4} K_D \frac{dK}{dT} \right) + \\ & \frac{1}{C_t} \left(\frac{1}{8} K_D \frac{dK_D}{dT} + \frac{1}{8} K_D K^2 \frac{dK_D}{dT} + \frac{1}{8} K_D^2 K \frac{dK}{dT} + \frac{1}{4} K_D K \frac{dK_D}{dT} + \frac{1}{8} K_D^2 \frac{dK}{dT} + \frac{C_t}{2} \frac{dK_D}{dT} \right) \\ & + \frac{2 \sqrt{\frac{K_D^2}{16} + \frac{K_D^2 K^2}{16} + \frac{K_D^2 K}{8} + \frac{K_D C_t}{2}}}{C_t} \end{aligned} \tag{5.15}$$

En las ecuaciones 5.14 y 5.15, K, K_D, dK/dT y dK_D/dT vienen definidas en las ecuaciones 5.7 y 5.4.

Una vez conocidos x_N y dx_N/dT, podemos calcular la curva de C_p^{ex}(T) mediante la Ecuación 5.12.

La coincidencia entre las dos situaciones descritas, cuando los valores de las constantes k₁ y k₂ comienzan a ser lo suficientemente grandes, se confirma por la perfecta continuidad encontrada en la curvas de C_p^{ex}(T) calculadas en la frontera entre las dos

situaciones.

Una vez realizado el desarrollo matemático del modelo, se procedió al análisis de las curvas experimentales de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas para el fragmento TLN-205-316, mediante las ecuaciones obtenidas. Para ello se implementó un programa de ordenador para realizar un ajuste multidimensional de las ecuaciones obtenidas a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas para diferentes concentraciones de muestra, con el fin de determinar los parámetros comunes anteriormente relacionados.

Previamente se realizaron ajustes a curvas de $C_p^{ex}(T)$ individuales con el fin de obtener unas estimaciones iniciales de los parámetros. Para estos ajustes sólo se emplearon curvas obtenidas a una concentración superior a 1.0 mg/ml, debido a que la pequeña exoterma solo está bien definida respecto al error experimental de la línea base en esos experimentos. Se fijó un valor para $K_D = 1.2 \times 10^{-4}$ M, correspondiente al valor obtenido de los experimentos de Cromatografía de Exclusión Molecular. Además, se dejaron variar independientemente en el ajuste la entalpía calorimétrica, ΔH^{cal} , correspondiente al área bajo la transición principal, y la entalpía efectiva del proceso de desplegamiento, ΔH^{ef} , con el fin de que los errores experimentales tuvieran menor influencia en el ajuste. De todas formas, como se verá, ambos parámetros resultan prácticamente iguales en los ajustes obtenidos. En la Tabla 5.4.VI se exponen los parámetros obtenidos para los experimentos de DSC a diferentes concentraciones de muestra. Sólo se han utilizado en los ajustes las curvas de DSC obtenidas con muestra sin calentar ya que únicamente en esos casos conocemos el valor de x_{N0} (a baja temperatura) de los experimentos de cromatografía (Tabla 5.4.IV). En la Figura 5.4.14 se muestran dos de los ajustes obtenidos de esta forma. Puede apreciarse que el modelo explica perfectamente la forma completa de la curva calorimétrica, dada la excelencia de los ajustes obtenidos. En la Figura 5.4.14 también se muestra el mejor ajuste obtenido con el modelo si suponemos ΔC_{pD} y ΔC_{p2}^{\neq} iguales a cero, demostrándose que los termogramas obtenidos se explican peor si no se supone un valor negativo para el incremento de capacidad calorífica de disociación.

Los parámetros medios obtenidos de estos ajustes individuales se han utilizado como estimaciones iniciales para un ajuste múltiple simultáneo a todas las curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas a diferentes concentraciones de muestra, C_i , (entre 0.38 mg/ml y 3.61 mg/ml). Los parámetros resultantes se incluyen también en la Tabla 5.4.VI. El ajuste múltiple simultáneo

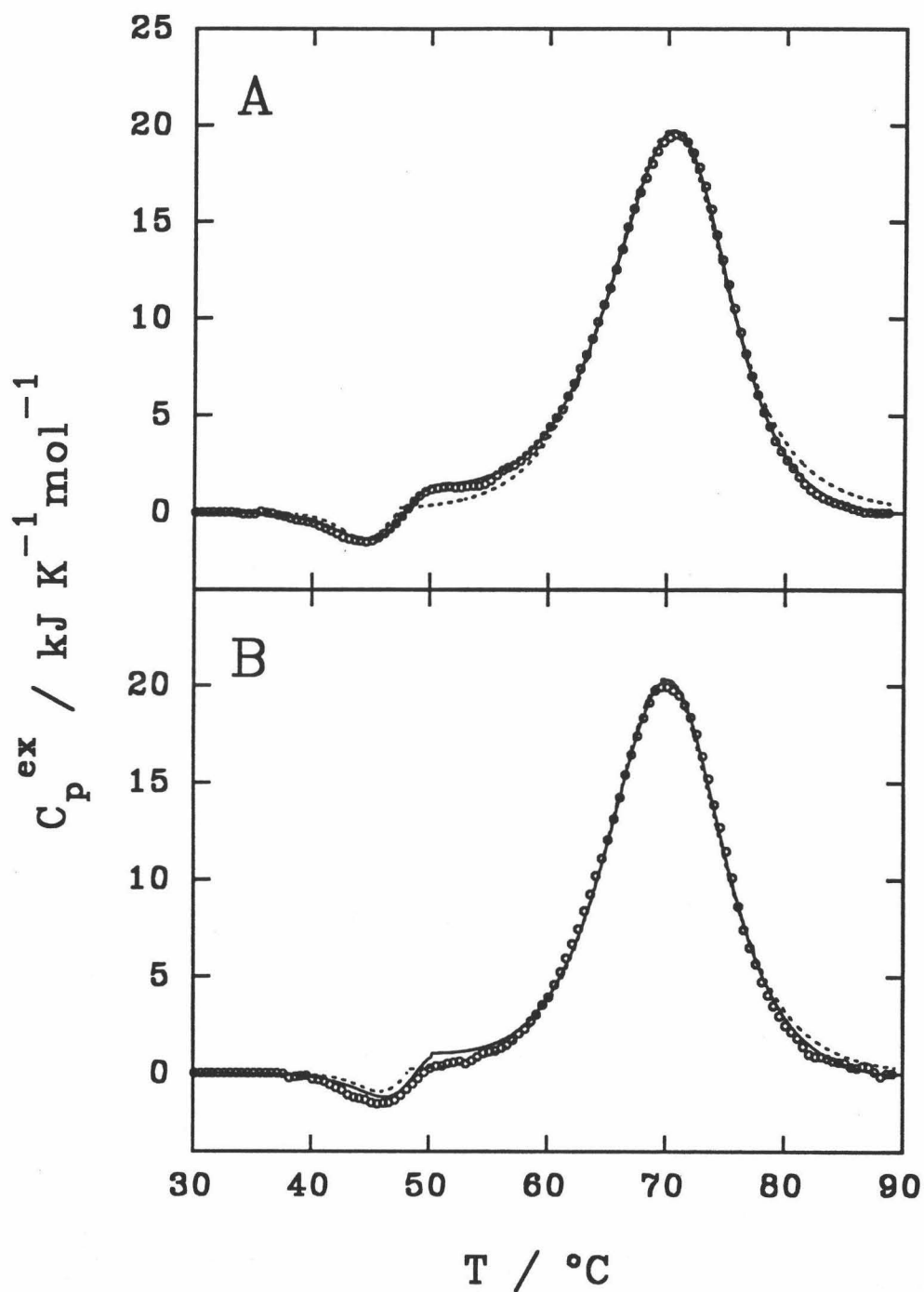


FIGURA 5.4.14: Ajustes individuales de la curva de $C_p^{ex}(T)$ (—), predicha por el modelo desarrollado en el texto, a los datos experimentales (\square) correspondientes al desplegamiento térmico del fragmento TLN-205-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5, a las concentraciones de muestra: (A) 2.84 mg/ml; (B) 1.33 mg/ml. En línea discontinua se muestra también el mejor ajuste obtenido si suponemos $\Delta C_{pD} = 0$ y $\Delta C_{p2} \neq 0$.

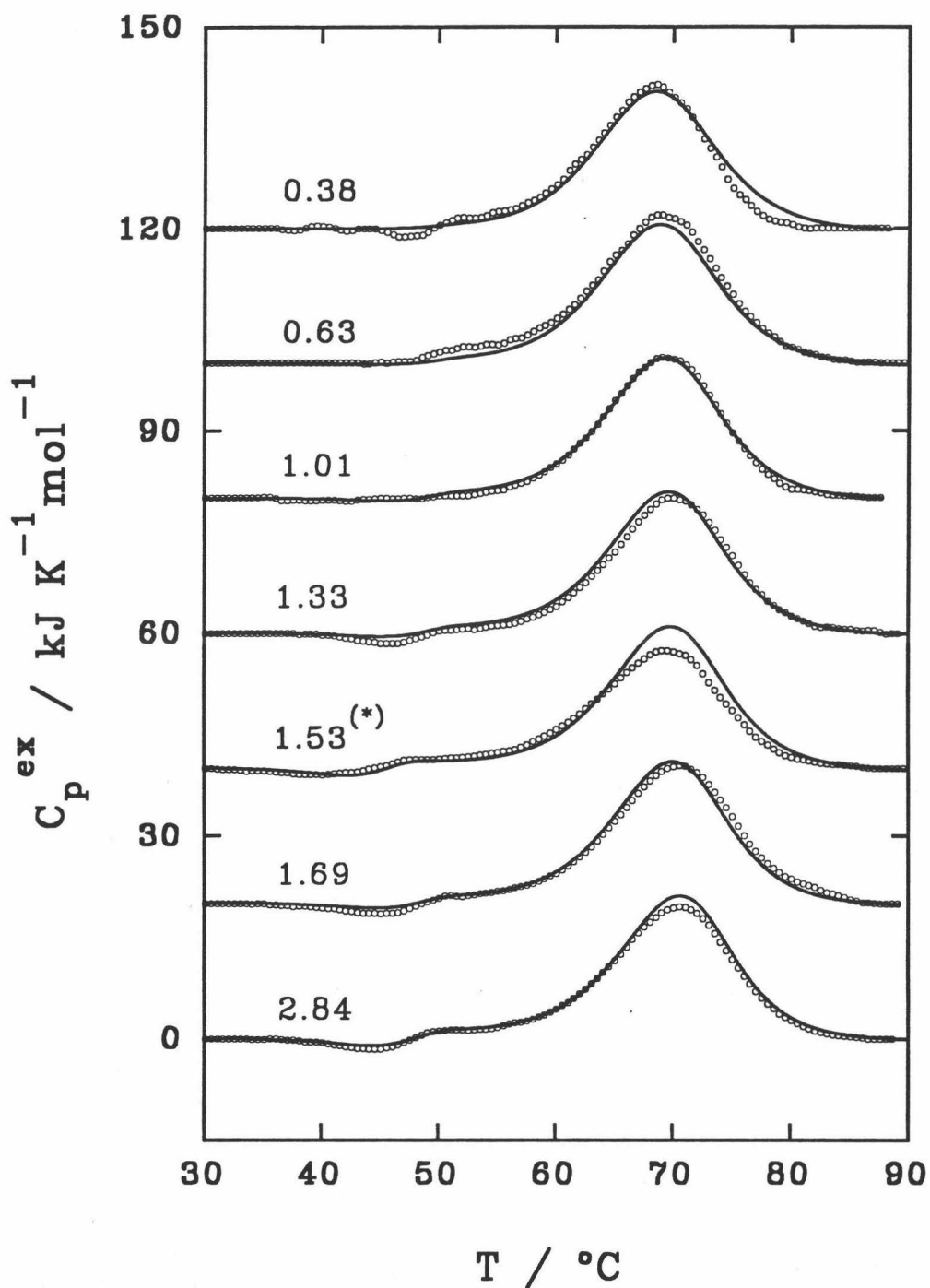


FIGURA 5.4.15: Ajuste múltiple de las curvas de $C_p^{ex}(T)$, predichas por el modelo (—), a varias curvas experimentales (\square). Las curvas de $C_p^{ex}(T)$ experimentales fueron obtenidas a las diferentes concentraciones de muestra que se indican junto a cada curva, en mg/ml, y a diferentes velocidades de barrido (todas corresponden a 2.0 K/min, excepto la marcada (*) que corresponde a 0.5 K/min).

Tabla 5.4.VI

Parámetros resultantes de los ajustes no lineales de mínimos cuadrados, individuales y conjunto, a las curvas de $C_p^{ex}(T)$ correspondientes al fragmento TLN-205-316, a varias concentraciones de muestra. Se fijó un valor para la constante de disociación a 50°C, $K_D(50)$, de $1.2 \times 10^{-4} M^{-1}$.

C_t mg/ml	v K/min	x_{NO}	ΔH_D (a)	ΔC_{pD} (b)	ΔH_2^{\neq} (a)	ΔC_{p2}^{\neq} (b)	T_2 °C	ΔH^{ef} (c)	$T_{1/2}$ °C	ΔH^{cal} (c)
1.01	2.0	0.80	38.2	-5.5	289	1.16	34.6	286	67.8	284
1.33	2.0	0.81	55.2	-3.9	386	1.37	31.4	277	68.8	265
1.53	0.5	0.81	22.8	-5.7	262	0.83	25.6	266	66.8	261
1.69	2.0	0.81	49.4	-6.3	319	0.70	28.2	272	67.8	295
1.78	2.0	0.82	63.6	-4.5	297	1.33	27.6	260	68.8	284
2.84	2.0	0.84	41.4	-4.7	346	1.39	29.9	271	67.7	268
Media:			45	-5.1	317	1.1	30	272	68.0	276
			± 14	± 0.9	± 44	± 0.3	± 3	± 9	± 0.8	± 13
Ajuste múltiple:			38	-4.4	292	1.0	27.7	273	67.8	282

(a) kJ/mol de dímero; (b) kJ/K.mol de dímero; (c) kJ/mol de monómero.

a todas las curvas se muestra en la Figura 5.4.15, donde puede apreciarse que el modelo interpreta perfectamente los termogramas obtenidos en todo el intervalo de concentraciones investigado. Esto no es posible en cambio si suponemos ΔC_{pD} y ΔC_{p2}^{\neq} iguales a cero, así como tampoco es posible explicar correctamente bajo esta suposición el efecto de la concentración de muestra sobre la T_m de las transiciones.

El efecto de la velocidad de barrido encontrado en la exoterma irreversible se explica de forma excelente, como se puede apreciar en la Figura 5.4.16, donde se representan dos curvas de $C_p^{ex}(T)$ obtenidas con muestras idénticas de $C_t=3.61$ mg/ml a 2.0 y 0.5 K/min respectivamente, calentando sólo hasta unos 50°C, junto con las curvas predichas por el modelo para los parámetros obtenidos del ajuste múltiple que se exponen en la Tabla 5.4.VI y para las variables experimentales correspondientes a estos dos experimentos ($v = 2.0$ y 0.5 K/min; $C_t = 3.61$ mg/ml; $x_{NO} = 0.86$).

En la Figura 5.4.17 se representan los valores experimentales obtenidos para la T_m de las transición principal en función de la concentración de muestra C_t . En trazo continuo se muestra la dependencia que predice el modelo para los parámetros resultantes del análisis.

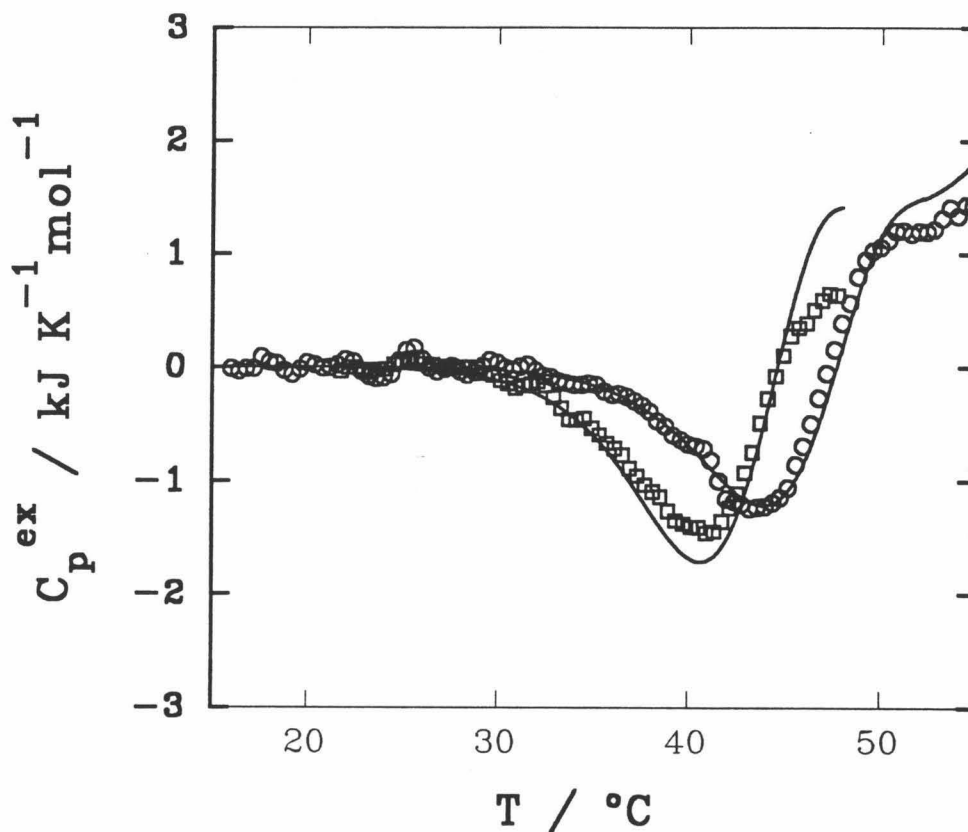


FIGURA 5.4.16: Explicación del efecto de la velocidad de barrido sobre las exotermas encontradas en las curvas de $C_p^{ex}(T)$. La concentración de muestra en estos experimentos fue de 3.61 mg/ml. Los símbolos representan los datos experimentales: (O) 2.0 K/min; (\square) 0.5 K/min. Las líneas (—) representan las curvas predichas por el modelo utilizando los parámetros obtenidos en el ajuste múltiple que se muestran en la Tabla 5.4.VI.

La concordancia entre los valores experimentales y los calculados es muy buena, teniendo en cuenta el estrecho intervalo de temperaturas en que varían dichos valores.

La irreversibilidad de la exoterma es fácilmente explicable si tenemos en cuenta que en el primer barrido de DSC la muestra alcanza el equilibrio de disociación a temperaturas cercanas a 50°C , partiendo de unas poblaciones de monómeros respecto a los dímeros superiores en general a las de equilibrio. Se produce, por tanto, en el primer calentamiento la dimerización de los monómeros que hay en exceso y, puesto que el incremento de entalpía de dimerización es negativo, aparece la exoterma observada. Durante el posterior enfriamiento, al bajar la temperatura por debajo de 50°C , el sistema tiende a evolucionar

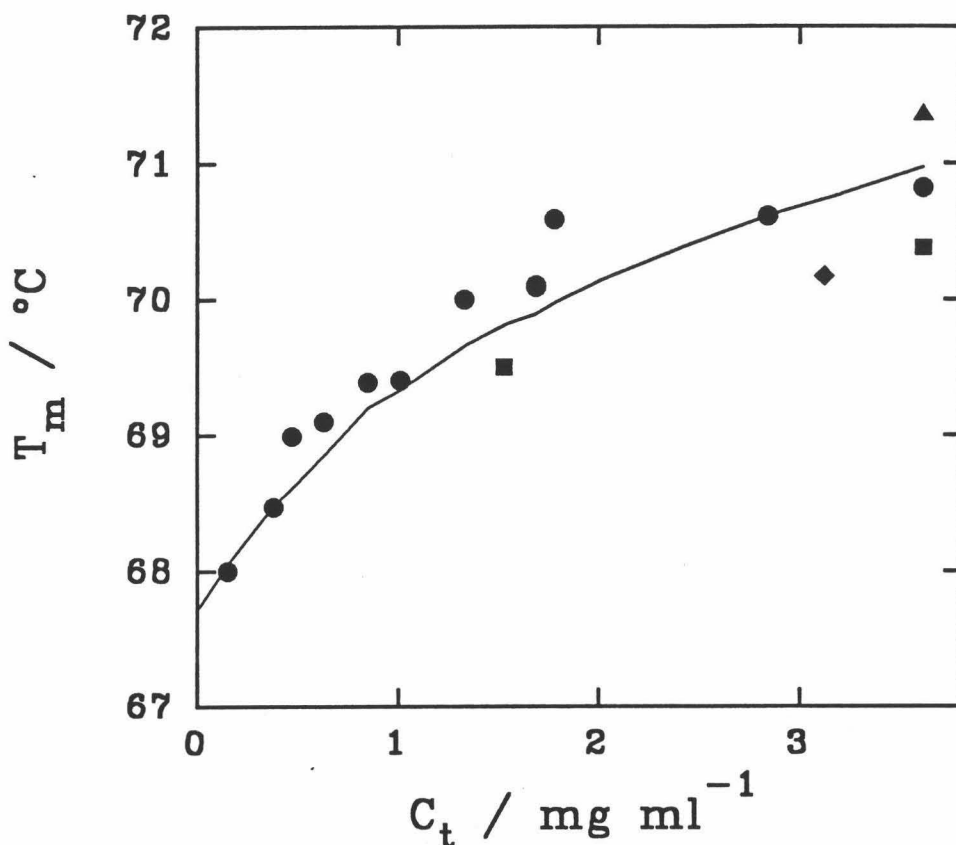


FIGURA 5.4.17: Explicación del efecto de la concentración de muestra sobre la T_m de las transiciones principales correspondientes al desplegamiento térmico del fragmento TLN-205-316 en fosfato 20 mM, pH 7.5. Los símbolos indican las diferentes velocidades de barrido en los datos experimentales: (●) 2.0 K/min; (▲) 1.0 K/min; (■) 0.5 K/min. (◆) indica un experimento realizado en PIPES 20 mM, pH 7.5. La línea continua representa el efecto que predice el modelo para los parámetros obtenidos del ajuste múltiple, que se muestran en la Tabla 5.4.VI.

de acuerdo con la variación de la constante de equilibrio de disociación, K_D , pero este equilibrio comienza a ser lento, congelándose por debajo de unos 30 °C, por lo que el cambio en las poblaciones que se produce es pequeño y, en todo caso, en el sentido de la dimerización. En el segundo barrido el sistema evoluciona de nuevo al equilibrio a 50 °C, pero desde unas poblaciones iniciales cercanas a las de equilibrio por lo que no aparece exoterma. Incluso es posible observar una ligera endoterma en los segundos barridos obtenidos a altas concentraciones, de acuerdo con la tendencia lógica del sistema a dimerizar

durante el enfriamiento, por lo que al volver a calentarse la muestra se producirá en este caso la disociación endotérmica del pequeño exceso de dímeros que se haya formado. Por otra parte, el modelo predice un efecto pequeño de la concentración de muestra en la posición y el tamaño de la exoterma, de acuerdo con lo encontrado experimentalmente (ver Figura 5.4.10).

* * *

Como hemos visto hasta ahora, el modelo propuesto es capaz de explicar todos y cada uno de los efectos encontrados en el estudio por DSC del desplegamiento térmico del fragmento TLN-205-316. Por tanto puede afirmarse que este modelo describe de manera completa el proceso y que los parámetros obtenidos son, al menos, estimaciones bastante acertadas de las diferentes funciones termodinámicas que representan. De esta forma hemos obtenido la descripción termodinámica detallada del proceso de disociación-desplegamiento del fragmento TLN-205-316, así como una información muy valiosa sobre la cinética del proceso de asociación-disociación.

Si comparamos el estudio aquí realizado con el fragmento TLN-205-316 con los estudios publicados del fragmento TLN-206-316, también llamado FII, (con una metionina menos) (ver Capítulo 2 de esta Memoria) existe una primera e importante diferencia: No se ha descrito ninguna evidencia de dimerización en el caso del FII, al menos hasta una concentración de muestra de 1.8 mg/ml (Vita et al., 1989). Dado que la única diferencia entre ambos fragmentos es la presencia de una metionina en el extremo C-terminal, no es razonable que se produzca un cambio tan drástico en sus comportamientos. Nosotros hemos encontrado que, por debajo de 30 °C, en muestras sin calentar, el fragmento se encuentra en un estado metastable con la población de monómero bastante favorecida respecto a la de equilibrio (80% aproximadamente), y que además esta población parece depender del método de preparación de las muestras (al disolver en GuHCl 6M y dializar posteriormente se obtienen poblaciones iniciales bastante diferentes, ver Tabla 5.4.IV). Por lo tanto, parece muy probable que la diferencia de comportamiento entre TLN-205-316 y FII se deban más bien a diferencias en la preparación de las muestras que a diferencias intrínsecas entre las dos especies. Por otra parte, los valores de T_m y de ΔH encontrados para la transición principal correspondiente al desplegamiento térmico de TLN-205-316 (68-71°C y 278 kJ/mol respectivamente) concuerdan bastante bien con los valores descritos para FII, determinados

por técnicas no calorimétricas ($T_{media}=66^{\circ}\text{C}$ y $\Delta H=272\text{ kJ/mol}$) (Vita y Fontana, 1982).

Del modelo propuesto y de los parámetros termodinámicos y cinéticos encontrados se pueden extraer conclusiones importantes:

La primera es la confirmación de que el fragmento TLN-205-316 aislado se pliega, en disolución a pH neutro, formando una estructura globular altamente estable con las propiedades termodinámicas típicas de una proteína globular pequeña. El monómero sufre un desplegamiento térmico de dos estados, de acuerdo con la concepción general que se tiene de un dominio de una proteína como una estructura altamente cooperativa.

Una segunda conclusión es que el fragmento TLN-205-316 tiene tendencia a formar dímeros en disolución a las concentraciones de muestra utilizadas en este Trabajo. Esto mismo ocurre con el fragmento TLN-255-316 como se ha expuesto anteriormente. Sin embargo, para TLN-255-316 no disponemos de información termodinámica separada del desplegamiento y la disociación, ya que, a las concentraciones que pueden emplearse en DSC, el estado monomérico de TLN-255-316 no está significativamente poblado a lo largo de un barrido.

En el caso del fragmento 205-316, se ha encontrado un valor para el incremento de capacidad calorífica de disociación, $\Delta C_{pD}=-4.4\text{ kJ/K.mol}$ de dímero. Recientemente Privalov y Makhatazde (1992) han reanalizado las contribuciones al incremento de capacidad calorífica de desplegamiento de proteínas utilizando los datos de capacidad calorífica para la transferencia de compuestos modelo en agua. Proponen que una gran parte del ΔC_p de desplegamiento (aproximadamente un 70%) se debe a la hidratación de los grupos de la proteína (polares y apolares) expuestos al agua. La contribución de los grupos apolares al ΔC_p global es positiva, como ya se suponía, mientras que la de los grupos polares tiene signo negativo, siendo su valor menor, con lo que el balance entre ambas contribuciones es de signo positivo, como se observa en general experimentalmente. De acuerdo con esto y suponiendo que con la disociación se incrementa lógicamente la superficie total expuesta al medio, el alto valor negativo del ΔC_{pD} obtenido para la disociación del fragmento TLN-205-316 sugiere que la superficie que se expone al medio al disociarse sería principalmente de naturaleza polar. El incremento de capacidad calorífica específica, $\Delta c_{pD} = -0.18\text{ J/K.g}$, es alrededor del 60% menor que la contribución de los grupos polares al ΔC_p de desplegamiento calculado para varias proteínas globulares (Privalov y Makhatazde, 1992).

Esto es de esperar puesto que el cambio de superficie expuesta al medio es mucho menor en una disociación que en un desplegamiento y además es lógico pensar que la contribución de la exposición de grupos hidrofóbicos al medio disminuya el valor total de ΔC_{pD} en términos absolutos. El valor de ΔH_D a 50 °C es de 38 kJ/mol de dímero. El elevado ΔC_{pD} negativo hace que, a una temperatura sólo 8.6 °C superior, ΔH_D pase a tomar valores negativos. Sin embargo, a 25°C, $\Delta H_D=148$ kJ/mol, valor similar al encontrado para la interacción entre los dos fragmentos de la Ribonucleasa S: residuos 1-15 y 21-124 ($\Delta H_D=168$ kJ/mol) (Varadarajan et al., 1992). La energía de Gibbs de estabilización debida a la formación del dímero se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_D(T_d) + \Delta C_{pD}(T-T_d) - T \left[\frac{\Delta H_D(T_d) + RT \ln K_D(T_d)}{T_d} + \Delta C_{pD} \ln \left(\frac{T}{T_d} \right) \right] \quad (5.16)$$

donde $T_d=50^\circ\text{C}$. A 25°C, el incremento de energía de Gibbs de disociación, $\Delta G_D=29.7$ kJ/mol de dímero, lo que supone que la dimerización conlleva una estabilización bastante alta, similar a la anteriormente descrita para el fragmento 255-316 y cercana a la energía de estabilización de plegamiento de las proteínas globulares a 25°C (20-80 kJ/mol). Puesto que no hemos podido determinar el ΔC_p de desplegamiento, por las razones anteriormente expuestas, no nos es posible estimar la energía de Gibbs de estabilización por plegamiento del fragmento TLN-205-316 a 25 °C.

Otra conclusión importante a deducir de estos resultados es que el equilibrio de monomerización-dimerización es lento por debajo de 50°C. Se ha interpretado la cinética de los procesos individuales de acuerdo con la Teoría de Estado de Transición. Los parámetros de activación para el proceso de dimerización que se han obtenido ($\Delta H_2^\ddagger=292$ kJ/(mol de dímero); $\Delta C_{p2}^\ddagger=1.0$ kJ/K.(mol de dímero)) pueden dar alguna idea sobre la naturaleza del estado transitorio. El alto valor de la entalpía de activación (50% aproximadamente del ΔH de desplegamiento) sugiere que el estado de transición ha sufrido grandes cambios conformacionales con respecto al monómero o al dímero y existe una barrera energética alta para el proceso de asociación-disociación del fragmento, haciendo necesario al menos un desplegamiento suficientemente extenso de la estructura del monómero. Esta conclusión nos lleva a otra muy importante: las conformaciones del fragmento en el monómero y en el

dímero deben ser muy probablemente claramente diferentes, ya que no tiene mucho sentido que sea necesario un desplegamiento extenso de la estructura terciaria para producir una asociación/disociación simple, sin cambios en la conformación del monómero. Este cambio conformacional, que podría ser simplemente un cambio en la organización de los elementos de estructura secundaria (4 hélices α por monómero), sería inducido probablemente por el establecimiento con la dimerización de interacciones intermonómero de naturaleza preferentemente polar, como se ha discutido previamente.

El comportamiento de este dominio estructural de la termolisina en cuanto a su asociación/disociación y su desplegamiento térmico podría representar una imagen aproximada de cómo se produce el ensamblaje de las estructuras secundarias, subdominios o dominios preformados en los intermediarios del plegamiento de las proteínas. Las interacciones que se producen entre dominios adyacentes de una proteína podrían ser en algunos casos preferentemente de naturaleza polar, frente a las interacciones mayoritariamente hidrofóbicas, generalmente admitidas como la principal fuerza impulsora del plegamiento de cada dominio estructural. El establecimiento de estas interacciones favorables interdominio podría ser uno de los principales conductores de los cambios conformacionales necesarios en las estructuras de los intermedios durante el plegamiento, con el fin de alcanzar la estructura nativa. En un trabajo muy reciente (Baker et al., 1992) se ha descrito un ejemplo en el que la reacción de plegamiento de una proteína (la proteasa α -lítica) está bajo control cinético. El plegamiento *in vitro* de esta proteasa en su estructura nativa desde condiciones desnaturalizantes sólo es posible cinéticamente en presencia de un dominio adicional aislado de 166 aminoácidos que está presente en el precursor de su síntesis. En ausencia de este fragmento, la proteína queda atrapada en un estado intermedio no nativo, que presenta características de "molten globule", estando separados este estado y el nativo por una alta barrera energética (27 kcal/mol). La similitud de este sistema y el nuestro radica en que el establecimiento de interacciones interdominio parece ser en ambos casos responsable de la conducción del plegamiento hacia una conformación nativa o no nativa de la cadena polipeptídica. En ambos casos existe una barrera energética que separa diferentes regiones del espacio conformacional de ambas proteínas. La existencia de altas barreras energéticas como éstas pueden hacer lenta o incluso cinéticamente inviable la formación de estas interacciones y el plegamiento correcto. El proceso de plegamiento acabaría desviándose

hacia estados cinéticamente favorecidos, siendo el plegamiento incorrecto de su cadena una de las causas de irreversibilidad en el desplegamiento térmico de proteínas (Klibanov y Ahern, 1987; Volkin y Klibanov, 1989).

Por último, hay que mencionar que existen hasta la fecha muy pocos estudios mediante DSC de desplegamiento de proteínas con cambios del estado de asociación, y aún menos en que se pueda hacer una descripción termodinámica completa y separada de ambos procesos. También son contados los estudios por DSC de dominios individuales de proteínas como fragmentos aislados de las mismas. Si tenemos en cuenta que además se ha encontrado que las cinéticas de dimerización y monomerización del fragmento son lentas, y que también se han podido describir adecuadamente, puede decirse que éste es un caso completamente inédito en la Bibliografía y que supone una aportación original al campo del estudio del plegamiento-desplegamiento de proteínas y de los efectos e interacciones que los gobiernan.

5.5 Estudio de la desnaturalización térmica de la "nicked"-termolisina.

En el Apartado anterior se ha mostrado un estudio mediante DSC del desplegamiento térmico de dos fragmentos del extremo carboxilo terminal de la termolisina. Es posible aislar otros fragmentos en disolución correspondientes al extremo C-terminal cuyo estudio no ha sido abordado en esta Memoria (ver Apartado 2.2.2 de Antecedentes Bibliográficos). Sin embargo, de los fragmentos que contienen parte del lóbulo N-terminal de la TLN (ver Figura 2.4) sólo el fragmento TLN-121-205, que exhibe una estructura de hélices α inducida por Ca^{2+} , ha podido aislarse en disolución presentando una estructura similar a la que tiene en la TLN nativa (Vita et al., 1979) (Este fragmento contiene todos los restos implicados en la unión del Zn^{2+} y de 3 de los 4 Ca^{2+}). En cambio, el fragmento TLN-1-120, que se obtiene de la reacción de TLN con bromuro de cianógeno, no presenta orden conformacional en disolución. El fragmento TLN-1-196 contiene todo el lóbulo N-terminal de la TLN y forma parte, junto con TLN-197-204 y TLN-205-316 estudiado en esta Memoria, de la "nicked"-TLN (N-TLN) que se obtiene mediante autólisis controlada en presencia de EDTA. Pero el fragmento TLN-1-196, aislado por los métodos descritos, tiene una fuerte tendencia a precipitar haciéndose insoluble, lo que, hasta ahora, ha impedido su estudio por separado.

Como se describió en el Capítulo 2, la N-TLN es un complejo de estos tres fragmentos que mantiene una conformación muy parecida a la de la TLN, habiendo perdido su actividad enzimática frente a los sustratos usuales de ensayo (Fassina et al., 1986). En esta Memoria se presentan una serie de experimentos preliminares de la N-TLN mediante DSC. Se persigue con este primer estudio el asentamiento de ciertas bases experimentales para un estudio posterior más amplio y ambicioso de este sistema con el fin de intentar extraer información sobre el desplegamiento térmico del dominio N-terminal de la TLN y sobre las interacciones que hay establecidas entre los fragmentos que forman esta N-TLN. Asimismo, como veremos más adelante, se podrían aclarar algunas incógnitas sobre los factores que motivan la elevada estabilidad de la TLN.

Como se describe en el Apartado 3.2.5, en la preparación de la N-TLN no nos ha sido posible reproducir el método descrito en la Bibliografía para la separación mediante cromatografía de afinidad de las trazas de TLN no reaccionada. Estas trazas de TLN pueden

interferir en el estudio calorimétrico debido a su actividad enzimática, puesto que podrían degradar proteolíticamente los fragmentos constituyentes de la N-TLN que se despliegan térmicamente durante el barrido de temperatura, impidiendo su posible replegamiento posterior. Además, añadiría un proceso irreversible tras el desplegamiento que podría alterar los datos calorimétricos y enmascarar información sobre los procesos que se pretenden estudiar. Por este motivo, en muchos de los experimentos que se presentan se han añadido los inhibidores habituales de la TLN (1,10-fenantrolina y phosphoramidon). Todos los experimentos se realizaron a una velocidad de barrido de 2 K/min.

Los primeros experimentos de DSC se realizaron en tampón HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, pH 7.5, en ausencia de inhibidores, añadiendo un exceso de Zn²⁺ de 5 μM y 100 μM en experimentos distintos. La preparación de las muestras de N-TLN se describió en el Apartado 3.2.5 de Materiales y Métodos. Un análisis mediante SDS-PAGE de las muestras previamente a su introducción en el calorímetro (ver Figura 5.5.1(A)) mostró que la reacción de autólisis controlada en presencia de 35 mM de EDTA transcurre casi completamente en las condiciones normalmente utilizadas (Tris/HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, pH 7.2 y concentración de TLN > 2 mg/ml), no quedando más que trazas de TLN nativa. Sin embargo, al cambiar el tampón de la muestra por el utilizado en los experimentos de DSC (mediante una columna de Sephadex G25) la banda correspondiente al fragmento 1-196 disminuye mucho de intensidad, apareciendo una banda de ≈ 15 kDa de peso molecular. Esto indica que el cambio de medio induce posterior degradación de la N-TLN a nivel del fragmento TLN-1-196. Fontana et al. (1986) describen que a concentraciones de EDTA más bajas (1 mM) se favorece la autólisis en otros puntos de la cadena generando un complejo que comprende los fragmentos TLN-1-129, TLN-130-187 y TLN-205-316. Esto sugiere que con el cambio de tampón se genera el fragmento TLN-1-129 que corresponde a la banda de ≈ 15 kDa y el TLN-130-187, no detectable por SDS-PAGE en las condiciones utilizadas, junto con el 205-316 cuya banda electroforética no varía de intensidad.

Dado que está descrito que esta especie "nicked" con cortes adicionales generada subsiste también en disolución como un complejo no disociado (Fontana et al., 1986), se han realizado los experimentos de DSC, que se muestran en la Figura 5.1.1(B). Pueden apreciarse dos transiciones claramente separadas, la primera mucho mayor que la segunda,

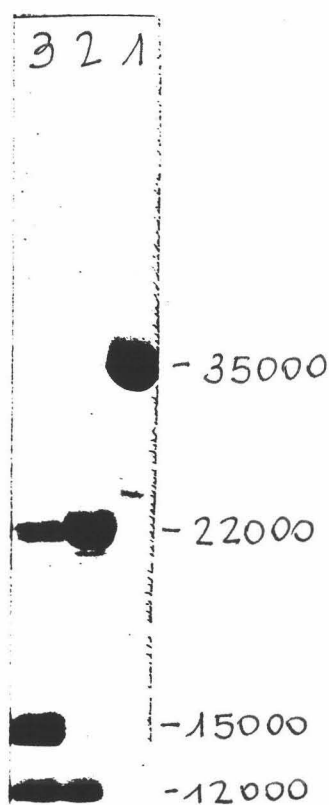


FIGURA 5.5.1(A): Análisis por SDS-PAGE de las siguientes muestras: (1) TLN antes de la autólisis. (2) N-TLN después de la reacción de autólisis en Tris/HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, EDTA 35 mM, pH 7.2. (3) N-TLN tras el cambio de tampón por HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 100 μ M, pH 7.5. Junto a las bandas de indican los pesos moleculares aproximados.

que son completamente irreversibles en un segundo calentamiento. Los valores de T_m y entalpías aproximadas por mol de TLN se muestran en la Tabla 5.5.I.

En un principio se puede decir que la primera transición muestra un incremento de su T_m con el aumento de la concentración de Zn²⁺ puesta en exceso en el medio, efecto contrario al encontrado para la TLN nativa (ver Apartado 5.3). Esta estabilización por el Zn²⁺, junto con el valor de entalpía encontrado para esta transición, sugiere que ésta corresponde a la disociación del complejo de fragmentos junto al desplegamiento y desnaturalización irreversible de la mayor parte de ellos. El efecto del Zn²⁺ encontrado indica que la esta "nicked"-TLN es capaz de unir Zn²⁺, muy probablemente en el sitio activo, contribuyendo a la estabilidad del complejo de fragmentos.

En cuanto a la transición que se aprecia a alta temperatura, tiene un área en torno al 15-20% del área de la transición mayor. Presenta también una estabilización por el Zn²⁺, y en un principio podría corresponder a la N-TLN menos degradada (la formada por

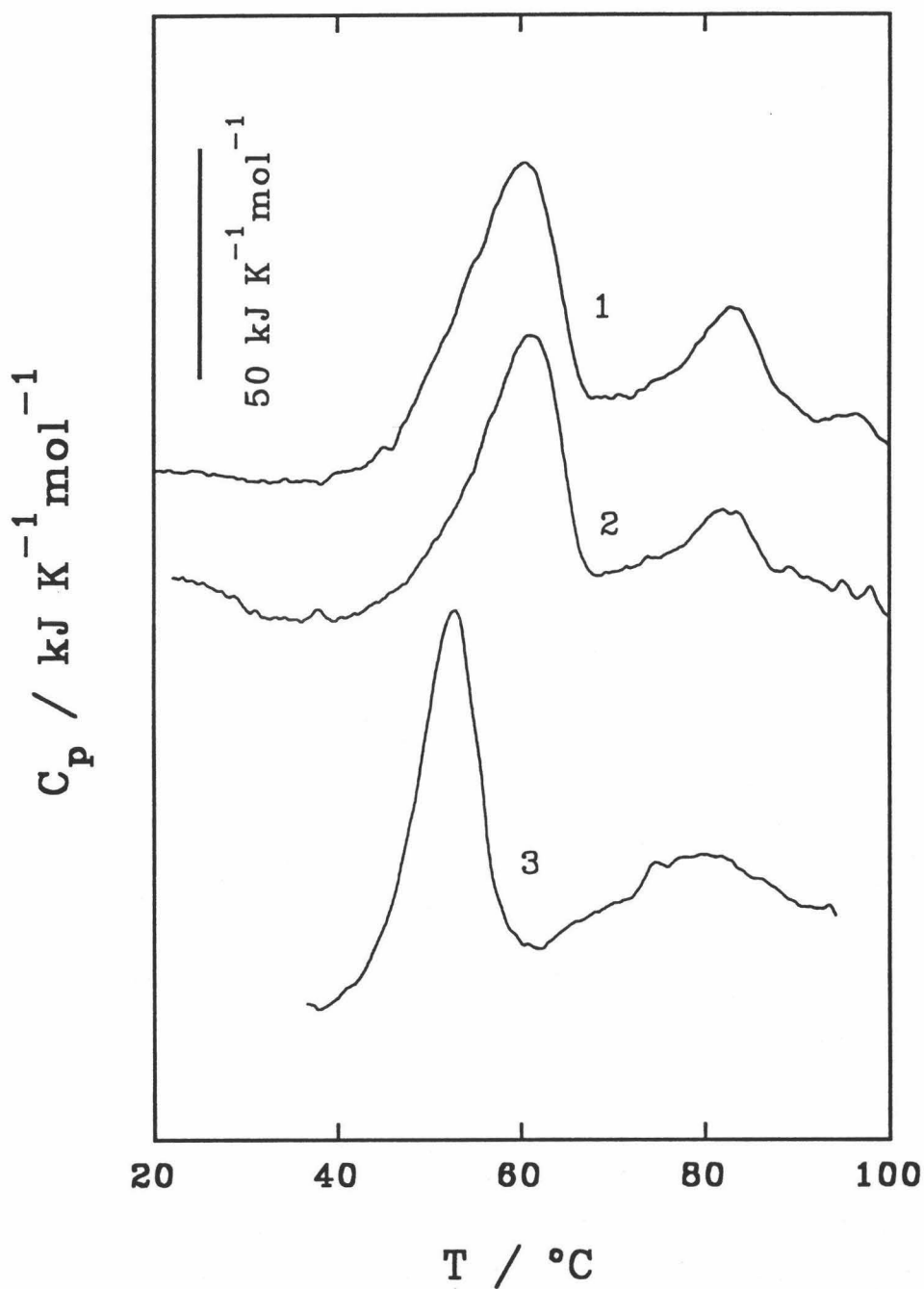


FIGURA 5.5.1(B): Perfiles de capacidad calorífica, $C_p(T)$, para la desnaturalización térmica de muestras de N-TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, CaCl_2 10 mM, pH 7.5, obtenidos a una velocidad de barrido de 2 K/min. (1) y (2) ZnCl_2 100 μM ; (3) ZnCl_2 5 μM . El segmento indica la magnitud del eje de ordenadas en $\text{kJK}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

Tabla 5.5.I

Parámetros de las transiciones obtenidas en los experimentos de DSC con muestras de "nicked"-TLN en HEPES 10 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.5 bajo las diversas condiciones experimentales indicadas y a una velocidad de barrido de 2 K/min.

Condiciones Experimentales	[Zn ²⁺] μM	C _t mg/ml	T _m (1) °C	T _m (2) °C	ΔH(1) kJ/mol	ΔH(2) kJ/mol
NaCl 0.1 M	100	0.8	60.6	83.0	747	179
	100	0.9	61.2	82.3	664	114
	5	0.6	52.8	79.8	661	258
NaCl 0.1 M phosphoramidon 5x10 ⁻⁴ M	100(*)	0.8	63.5	93.0	879	243
	100(**)	0.5	66.0	93.3	988	199
	100(**)	1.0	66.1	93.4	1000	267
NaCl 0.1 M 1,10-fenantrolina 5 mM		0.8	54.5	72.3		878(total)
NaCl 0.5 M	100	1.1	60.6	80.7	631	148
NaCl 0.5 M EDTA 35 mM		1.4	56.1	68.5		586(total)
		2.6	56.2	68.7		686(total)
NaCl 0.5 M EDTA 35 mM 1,10-fenantrolina 5 mM		1.0	52.4	69.2		-

(*) phosphoramidon añadido después del cambio del tampón de autólisis.

(**) phosphoramidon añadido antes del cambio del tampón de autólisis.

TLN-1-196, TLN-197-204 y TLN-205-316), presentando una elevada termoestabilidad (T_m ≈ 83°C con 100 μM Zn²⁺).

Cuando a una muestra de N-TLN de las mismas características (con el corte adicional en 129-130) se le añade phosphoramidon 5x10⁻⁵M, se obtienen de nuevo dos transiciones pero con las T_m incrementadas (ver Figura 5.5.2(B)-1 y Tabla 5.5.I), indicando que las especies

responsables de ambas transiciones son capaces de unir el inhibidor. Dado que este inhibidor se une en el sitio activo de una forma similar a los dipéptidos (sustratos de la TLN), el sitio activo en las especies "nicked" debe permanecer conformado al menos parcialmente, aunque está descrito que la N-TLN es inactiva (Fassina et al., 1986).

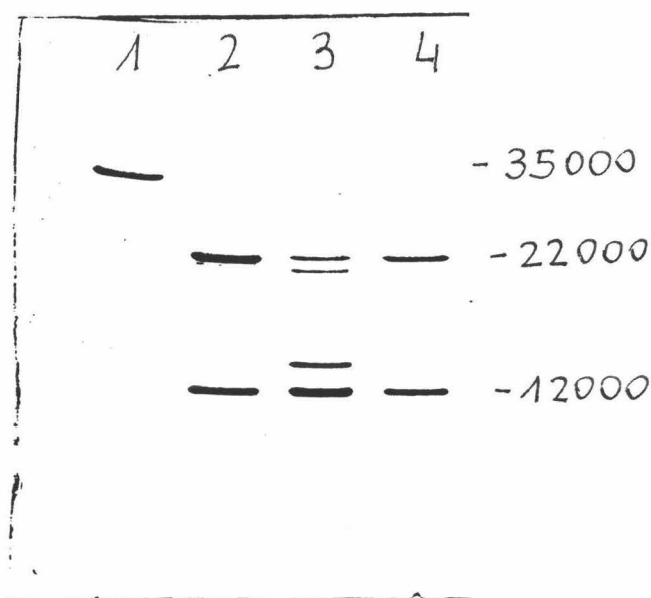


FIGURA 5.5.2(A): Análisis por SDS-PAGE de las siguientes muestras: (1) TLN antes de la autólisis. (2) N-TLN después de la reacción de autólisis en Tris/HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, EDTA 35 mM, pH 7.2. (3) N-TLN tras el cambio de tampón por HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 100 μ M, pH 7.5, sin phosphoramidon (4) N-TLN tras el cambio al mismo tampón en presencia de phosphoramidon 5x10⁻⁴ M. Junto a las bandas de indican los pesos moleculares aproximados.

Cuando el cambio del tampón de obtención de la N-TLN por el de experimentación se realiza en presencia de phosphoramidon 5x10⁻⁵M, la degradación adicional de la N-TLN se minimiza (ver Figura 5.5.2(A)). Los termogramas de DSC obtenidos con estas muestras (en presencia de phosphoramidon) (Figura 5.5.2(B)-2 y -3)) contienen de nuevo dos transiciones irreversibles. La primera tiene una T_m y un ΔH ligeramente superiores a los que se habían obtenido anteriormente (ver Tabla 5.5.I). La segunda tiene parámetros muy parecidos a los del termograma mostrado en la Figura 5.5.2(B)-1. Dado que la proporción entre la N-TLN y la especie "nicked" con cortes adicionales ha variado en los análisis

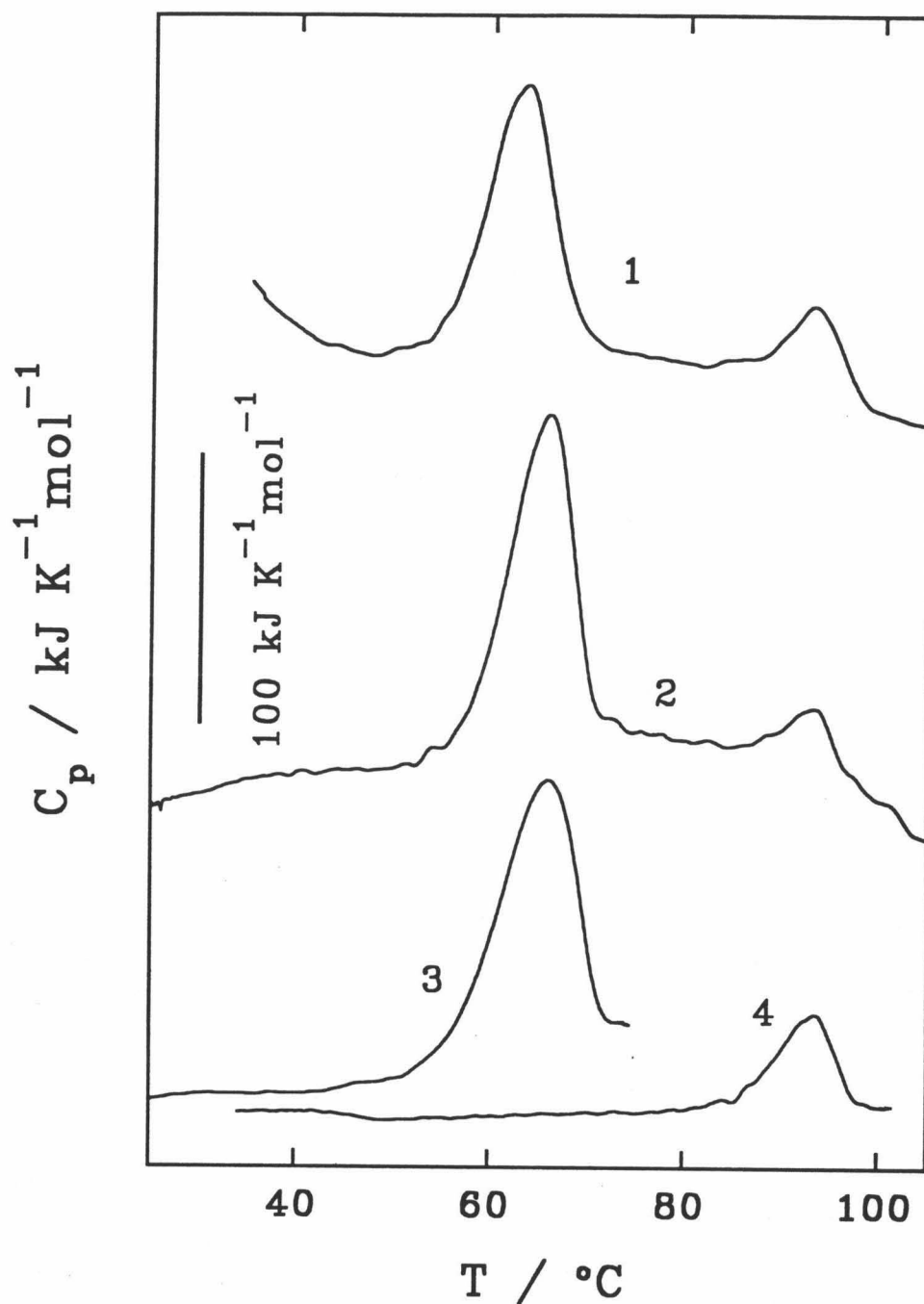


FIGURA 5.5.2(B): Perfiles de capacidad calorífica, $C_p(T)$, para la desnaturalización térmica de muestras de N-TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, CaCl_2 10 mM, pH 7.5, obtenidos a una velocidad de barrido de 2 K/min. (1) añadiendo phosphoramidon 5×10^{-4} M a una muestra a la que se ha cambiado el tampón en ausencia del inhibidor; (2) muestra a la que se ha cambiado el tampón en presencia de phosphoramidon 5×10^{-4} M; (3) igual que (2) pero parando el calentamiento tras la primera transición; (4) segundo calentamiento después de (3). El segmento indica la magnitud del eje de ordenadas en $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$.

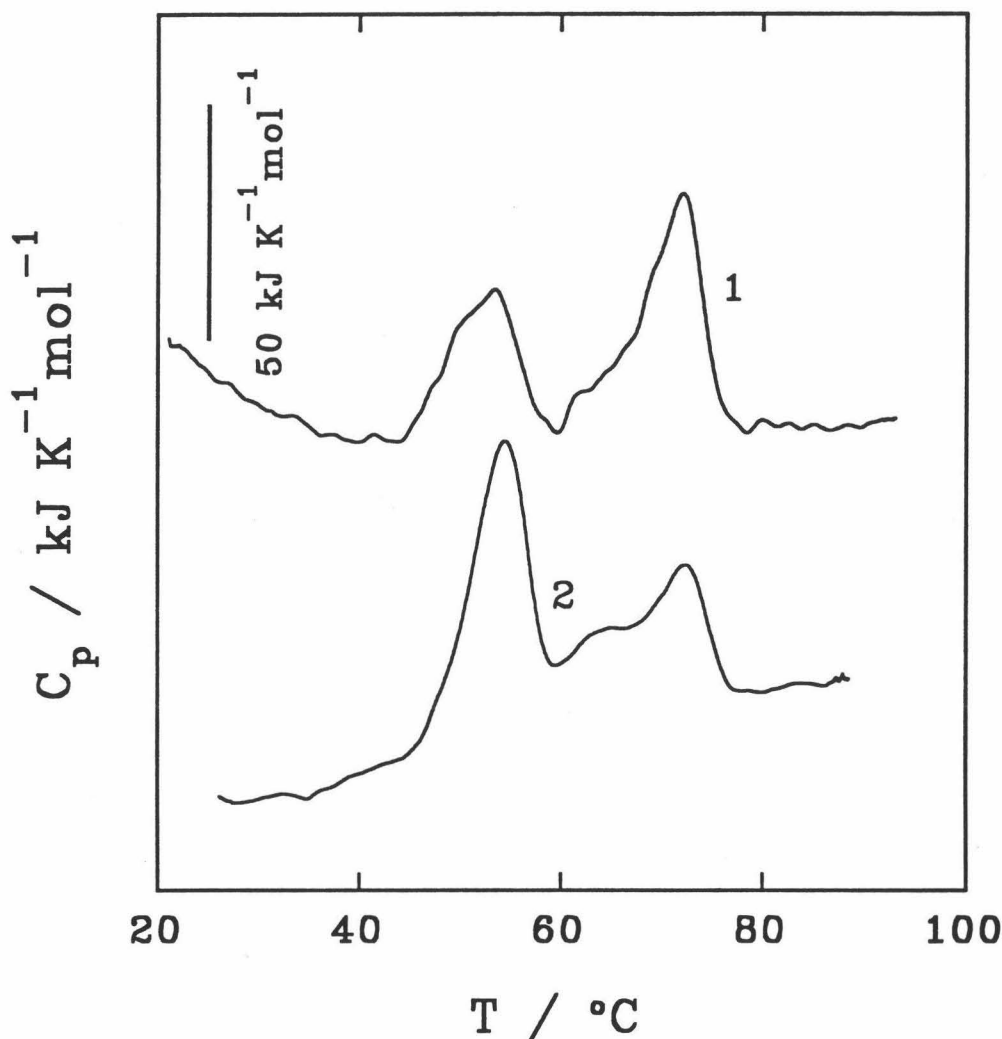


FIGURA 5.5.3(B): Perfiles de capacidad calorífica, $C_p(T)$, para la desnaturalización térmica de muestras de N-TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.1 M, CaCl_2 10 mM, 1,10-fenantrolina 5 mM, pH 7.5, obtenidos a una velocidad de barrido de 2 K/min. (1) a una concentración de muestra de 0.25 mg/ml; (2) a una concentración de muestra de 0.8 mg/ml. El segmento indica la magnitud del eje de ordenadas en $\text{kJK}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

éste no se produce una degradación posterior de la N-TLN, que presenta el patrón de fragmentación descrito en la Bibliografía (ver Figura 5.5.3(A)). El termograma de DSC obtenido con esta muestra se expone en la Figura 5.5.3(B). Contiene principalmente las dos transiciones descritas anteriormente (aunque hay un pequeño hombro a $\approx 65^{\circ}\text{C}$) pero con valores de T_m bastante inferiores, indicando que la ausencia de Zn^{2+} desestabiliza bastante los complejos, como es de esperar del efecto de la unión de un ligando al estado nativo de

la proteína.

Cuando la muestra de N-TLN se pasó a un tampón de mayor fuerza iónica (HEPES 10 mM, CaCl_2 10 mM, 0.5 M NaCl, ZnCl_2 100 μM , pH 7.5), mostró muy poca degradación del fragmento 1-196 a pesar de la ausencia de inhibidores, como se aprecia en la Figura 5.5.3(A). El termograma de DSC correspondiente (Figura 5.5.4) contiene de nuevo las dos transiciones, que tienen parámetros muy parecidos a los obtenidos con las primeras muestras estudiadas sin inhibidores (con 0.1M NaCl). Sólo la transición superior sufre una pequeña disminución en su T_m al aumentar la fuerza iónica.

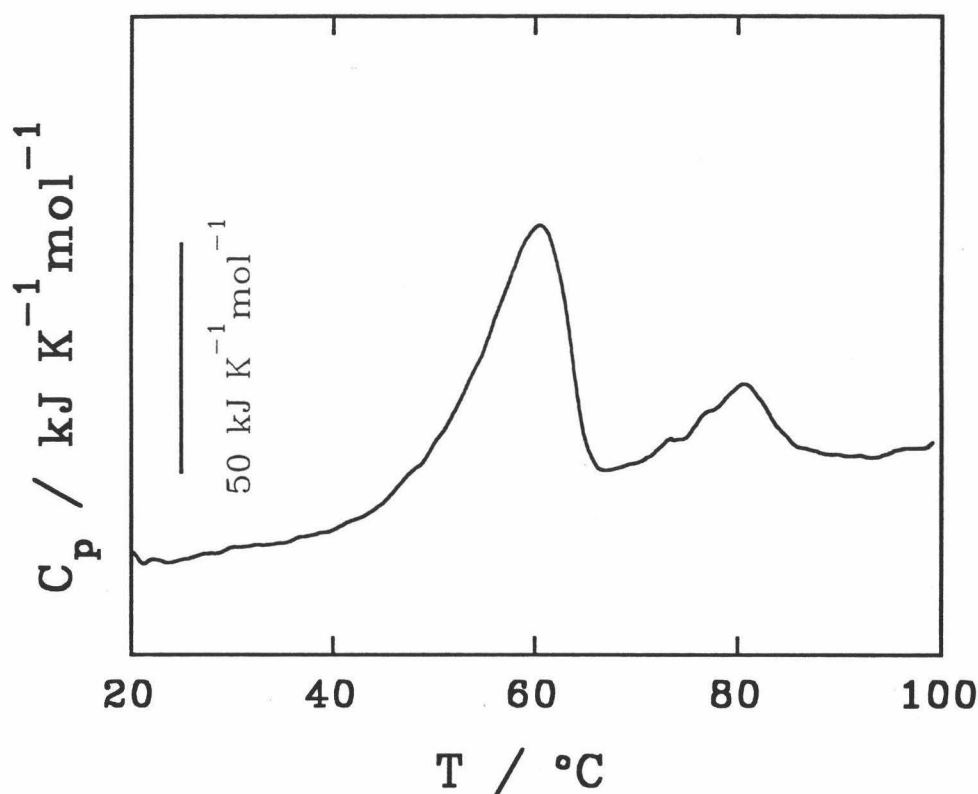


FIGURA 5.5.4: Perfiles de capacidad calorífica, $C_p(T)$, para la desnaturalización térmica de muestras de N-TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.5 M, CaCl_2 10 mM, ZnCl_2 100 μM , pH 7.5, obtenidos a una velocidad de barrido de 2 K/min. El segmento indica la magnitud del eje de ordenadas en $\text{kJK}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

En última instancia se realizó la autólisis de la TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.5 M,

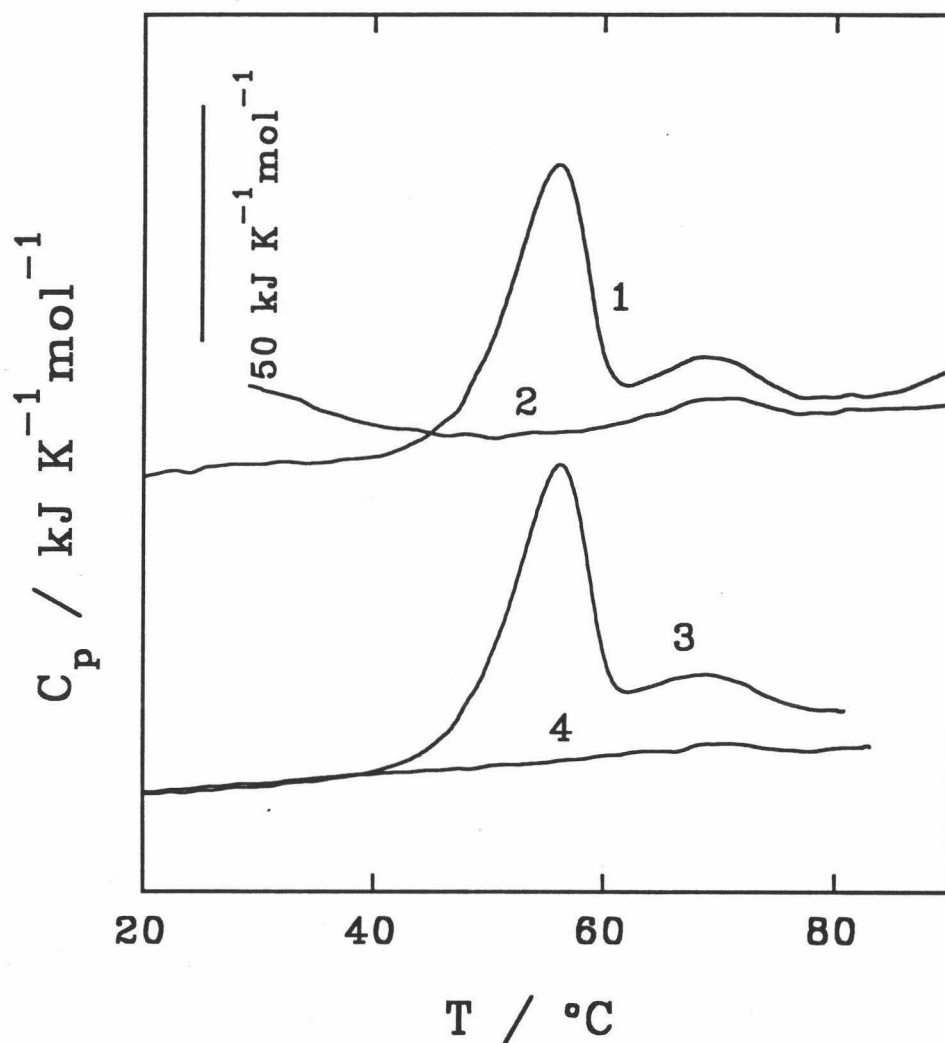


FIGURA 5.5.5: Perfiles de capacidad calorífica, $C_p(T)$, para la desnaturalización térmica de muestras de N-TLN en HEPES 10 mM, NaCl 0.5 M, CaCl_2 10 mM, EDTA 35 mM, pH 7.5, obtenidos a una velocidad de barrido de 2 K/min. (1) a una concentración de muestra de 1.4 mg/ml; (2) segundo barrido de (1); (3) a una concentración de muestra de 2.6 mg/ml; (4) segundo barrido de (3). El segmento indica la magnitud del eje de ordenadas en $\text{kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

CaCl_2 10 mM, EDTA 35 mM, pH 7.5, utilizando directamente las muestras sin cambiar el tampón, para los experimentos de DSC. El patrón de fragmentación obtenido en este nuevo medio de autólisis es también el típico de la N-TLN. La Figura 5.5.5 muestra los termogramas de DSC obtenidos a dos concentraciones de proteína diferentes. En la Tabla 5.5.I se exponen los parámetros de las transiciones. La transición mayor en estas condiciones

baja su T_m (por la presencia del EDTA), mientras que aparece la transición menor a $\approx 68.5^\circ\text{C}$ y parcialmente reversible (sobre todo a menor concentración). Este es el único caso en que se ha observado reversibilidad de alguna de las transiciones encontradas. Esta reversibilidad sugiere que esta transición no se debe a un complejo de fragmentos sino al desplegamiento térmico de equilibrio de uno de los fragmentos constituyentes, previamente disociado en la primera transición. Puesto que se observó agregación fuerte de las muestras tras el barrido, éste parece ser el proceso responsable de la parcial irreversibilidad de esta segunda transición, más acentuada a mayor concentración de muestra, como es lógico. La T_m de la transición reversible sugiere que el fragmento responsable es el TLN-205-316 (ver Apartado 5.4.2), que por otra parte tiene mucha mayor tendencia a replegarse que el TLN-1-196.

La no presencia de otra transición a alta temperatura debida a una especie menos fragmentada podría deberse al diferente medio de obtención de la N-TLN (en HEPES 10 mM y 0.5 M NaCl), aunque una posibilidad diferente y que constituiría una línea interesante a investigar sería el hecho de que la presencia del EDTA disminuya mucho la concentración de Ca^{2+} libre del medio. Dado que el Ca^{2+} estabilizaría en mucha mayor medida a una N-TLN con un sólo corte (probablemente en el enlace 204-205) que a la N-TLN con dos cortes ya que se mantendría el sitio 4 del Ca^{2+} menos alterado (en la unión del $\text{Ca}(4)$ están implicados Tyr193, Thr194, Ile197 y Asp200; Matthews et al., 1974). La disminución drástica del Ca^{2+} libre en el medio por efecto del EDTA haría que la estabilización adicional que aporta la unión del Ca^{2+} al sitio 4 desapareciera, haciéndose muy similares en estas condiciones las estabilidades de las dos especies (con 1 ó 2 cortes). Este razonamiento implica que una gran parte de la elevada estabilidad térmica de la TLN residiría precisamente en el sitio 4 de unión del Ca^{2+} . Recientemente Toma et al. (1991) han modificado mediante mutagénesis dirigida la cadena polipeptídica de la proteasa neutra de *Bacillus subtilis*, cambiando el giro 188-194 de la forma nativa por el giro con forma de Ω de 10 restos (región 192-201) de la TLN, que forma el sitio 4 de unión del Ca^{2+} . La proteasa neutra mutante une un Ca^{2+} en el nuevo giro y muestra una estabilidad térmica muy incrementada y fuertemente dependiente de la concentración de Ca^{2+} del medio.

En la Tabla 5.5.I se muestran también los valores de T_m de las dos transiciones correspondientes al experimento de DSC realizado con una muestra en presencia de EDTA

35 mM y 1,10-fenantrolina 5 mM (en ausencia de Zn^{2+} y a $[Ca^{2+}]$ muy baja). Se puede apreciar de estos valores que la disminución drástica de la concentración de Ca^{2+} no supone apenas una desestabilización para la transición mayor respecto a lo encontrado en las mismas condiciones, pero en presencia de 10 mM Ca^{2+} , lo que está en buen acuerdo con la hipótesis de que esta transición corresponde a la desnaturalización de especies "nicked" con 2 ó mas cortes (sitio 4 alterado). La segunda transición debe corresponder al fragmento TLN-205-316, ya que no presenta efecto de la concentración de Ca^{2+} libre, como se corresponde con la ausencia de sitios de unión del Ca^{2+} de este fragmento.

Aunque se ha propuesto para el sitio 4 de unión de Ca^{2+} un papel principal de protector frente a la autólisis a baja temperatura a través de la rigidificación de la cadena polipeptídica (Weaver et al., 1976; Fassina et al., 1986; Fontana et al., 1986), parece ser que también juega un papel de estabilizador frente a la desnaturalización térmica a alta temperatura. En el Apartado 5.3 referente al estudio de la TLN nativa se propuso la existencia de dos mecanismos paralelos de desnaturalización: autólisis del estado nativo y desplegamiento seguido de autólisis de la cadena desplegada. El Ca(4) podría intervenir como estabilizante frente a ambos mecanismos: protegiendo el giro 185-210 frente a la autólisis y estabilizando el estado plegado de la proteína por efecto de acción de masas en el equilibrio de desplegamiento previo a la autólisis a alta temperatura.

En definitiva, a pesar de que los patrones de fragmentación que hemos obtenido en la preparación de la N-TLN son idénticos a los descritos en la Bibliografía (Fassina et al., 1986; Fontana et al., 1986), parece ser que las muestras obtenidas mediante el método utilizado pueden estar constituidas por mezcla de especies "nicked" con 1 ó 2 cortes (o más de dos en ausencia de inhibidores). Todas estas especies se mantienen en disolución como un complejo de los fragmentos constituyentes a juzgar por el único pico obtenido en la misma posición que la TLN nativa, mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-100HR.

Se propone aquí que la transición mayor que se obtiene entre 52 y 66 °C es debida a la disociación y desnaturalización irreversible de las especies "nicked" con 2 ó más cortes en la cadena, que han perdido total o parcialmente el efecto estabilizador del Ca(4). En cambio, la transición obtenida a alta temperatura, correspondería a una especie "nicked" con un solo corte (probablemente en el enlace 204-205) cuya estabilidad térmica se asemeja

mucho a la de la TLN nativa. Todas las especies "nicked" muestran, al contrario que la TLN nativa, un efecto estabilizante del Zn^{2+} y son capaces de unir phosphoramidon, por lo que deben mantener el sitio activo, al menos, parcialmente conformado. Sorprendente es el papel estabilizante del Zn^{2+} sobre las especies "nicked", después de conocer lo descrito en la Bibliografía y lo encontrado en esta Memoria para la TLN nativa. Esto corrobora lo mencionado en el Apartado 5.3.4 acerca de que la unión del Zn^{2+} al estado nativo de la TLN sólo puede dar como resultado una estabilización de la proteína. Otro resultado distinto solamente es explicable en términos de velocidades de los procesos de desnaturalización térmica que puedan estar implicados, como ya se discutió en el Apartado 5.3.

Hay que decir que este es un estudio preliminar del sistema que aporta una valiosa información de partida para estudios posteriores más completos. Como aspectos realmente interesantes sobre los que incidir proponemos la identificación y separación de las especies "nicked" con 1 y 2 cortes y la investigación del efecto estabilizante del Ca^{2+} sobre cada una de ellas con el fin de aclarar aún más el papel del sitio 4 de unión de Ca^{2+} en la estabilidad de la TLN. También podría ser interesante incidir en la investigación, una vez puesta a punto la obtención de especies "nicked" homogéneas, de los perfiles de DSC bajo diversas condiciones experimentales, investigando cómo se afectan las interacciones entre los fragmentos constituyentes con variables como el pH, fuerza iónica, agentes desnaturalizantes, iones esenciales y otros ligandos, etc.

5.6 Resumen.

En los resultados expuestos en los Apartados anteriores de este Capítulo se distinguen dos tipos de comportamiento de las especies investigadas en cuanto a su desnaturalización térmica:

1. Desplegamiento reversible que se ha encontrado para los tres fragmentos de proteínas investigados en esta Memoria: El dominio globular de activación de la procarboxipeptidasa B (DAB) y los fragmentos de termolisina TLN-205-316 y TLN-255-316.
2. Desnaturalización irreversible que sufren la procarboxipeptidasa B (PCPB), la carboxipeptidasa B (CPB), la termolisina (TLN) y la termolisina "nicked" (N-TLN).

La primera situación es de todo punto la más favorable dado que es posible, mediante el análisis de los datos de DSC, la descripción termodinámica completa de los procesos involucrados en el despliegamiento térmico de estas especies. Para ello es condición indispensable, como ya se discutió en Apartados anteriores, que los sistemas se encuentren en equilibrio durante la transición, algo que se ha cumplido en nuestros resultados, dada la inexistencia de efecto de la velocidad de barrido en las transiciones de DSC obtenidas.

De esta forma, se ha caracterizado la influencia de las condiciones experimentales (pH y fuerza iónica) en la estabilidad y el despliegamiento térmico del DAB (Apartado 5.1), encontrándose que esta pequeña cadena polipeptídica de 81 aminoácidos se comporta como un único dominio estructural altamente cooperativo a fuerza iónica media y alta, tal y como era de esperar dado su pequeño tamaño. No ocurre así a baja fuerza iónica (1 mM de concentración de tampón), tanto a pH 7.5 como a pH 9.0, en que ha sido detectada la presencia de un estado intermedio significativamente poblado en el equilibrio de despliegamiento. Dado que el DAB tiene gran cantidad de restos ácidos (su punto isoeléctrico es 4,3; Burgos, 1989), esto podría deberse probablemente a la repulsión electrostática entre la gran cantidad de cargas negativas existentes principalmente en las hélices α del DAB a esos valores de pH (Vendrell et al., 1991). Esta alta densidad de restos ácidos en el DAB parece tener una clara influencia en su estabilidad térmica, puesto que a pH alto y baja fuerza iónica su estabilidad es menor, como se corresponde con las mayores fuerzas repulsivas que se darían en estas condiciones. En cambio, la mayor estabilidad se da a pH 3.0, por debajo

y cerca del punto isoeléctrico, donde la repulsión entre cargas debe ser menor.

El desplegamiento térmico de los fragmentos de TLN, TLN-205-316 y TLN-255-316, ha mostrado unas características bastante peculiares, que se han descrito en el Apartado 5.4. A pH 7.5, ambos fragmentos presentan una dependencia de las transiciones de DSC con la concentración de proteína, lo que se ha interpretado con éxito en términos de la existencia de una disociación de estados diméricos de los fragmentos previa o simultáneamente al desplegamiento. Es decir, ambos fragmentos no sólo muestran una completa cooperatividad en sus estructuras sino que además muestran cooperatividad intermolecular, más acusada en el fragmento TLN-255-316 que es mucho más pequeño. Esta tendencia a asociarse formando dímeros en el estado nativo estabilizándose podría tener importancia en el establecimiento de interacciones interdominio o entre subdominios en la estructura nativa de la TLN.

Por otra parte, ambos fragmentos han exhibido, al igual que el DAB, una importante termoestabilidad, aunque mucho menor que la TLN, proteína de la que proceden. Los parámetros termodinámicos del desplegamiento térmico de ambos fragmentos de TLN, en términos específicos, son similares entre sí y a los del DAB, enmarcándose muy bien los de todos ellos en los valores descritos para pequeñas proteínas globulares compactas (Privalov, 1979). Hay que hacer notar que estos tres fragmentos tienen una elevada cantidad de estructura secundaria organizada en motivos estructurales comunes (ver Capítulo 2), que permiten un buen empaquetamiento interno y una elevada cantidad de puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos.

Anteriormente se ha mencionado que es necesario que en todo momento se encuentre establecido el equilibrio entre los estados de la proteína presentes durante el barrido de DSC, para poder realizar el análisis termodinámico de los datos obtenidos. Como ya se ha expuesto en el Apartado 5.4, el fragmento TLN-205-316 tiene un comportamiento un tanto especial en este sentido, dado que presenta una disociación de su estado dimérico, previa a su desplegamiento, cuyo equilibrio es lento a baja temperatura (por debajo de $\approx 50^{\circ}\text{C}$). Para el análisis de los datos de DSC obtenidos con este fragmento, apoyados por experimentos de Cromatografía de Exclusión Molecular, ha sido necesaria la utilización de un modelo mixto (cinético y termodinámico; ver Apartado 5.4). Este modelo nos ha permitido, además de la descripción termodinámica del proceso de disociación y desplegamiento, la obtención de los

parámetros de activación que controlan las cinéticas de dimerización/monomerización a temperaturas por debajo de 50°C. La obtención de estos parámetros de activación es de gran relevancia ya que, dada su magnitud (el ΔH^\ddagger para la dimerización es de 292 kJ/(mol de dímero)), indican la existencia de una alta barrera energética entre el estado monomérico y el dimérico del fragmento TLN-205-316. Esto sugiere que ambos estados muy probablemente podrían poseer conformaciones claramente diferentes, puesto que el estado transitorio debe corresponder a una conformación extensamente desplegada. La existencia de estas barreras energéticas entre diferentes plegamientos estables de una cadena polipeptídica ha sido descrita recientemente en la literatura (Baker et al., 1992) y supone una evidencia adicional de que el plegamiento correcto de las proteínas en su estado nativo puede requerir del establecimiento de interacciones estabilizantes que lo conduzcan adecuadamente hacia el estado nativo. Es bien sabido que una de las principales causas de irreversibilidad en la desnaturalización térmica de las proteínas es el replegamiento incorrecto de la cadena, debido probablemente a que estados mal plegados están favorecidos cinéticamente frente al nativo.

Por otra parte, los resultados obtenidos con las proteínas propiamente dichas de este Trabajo, es decir, pro- y carboxipeptidasa B (PCPB y CPB), termolisina (TLN) y "nicked"-termolisina (N-TLN), han sido completamente diferentes: La irreversibilidad de la desnaturalización térmica en todas las condiciones experimentales investigadas ha sido un patrón de comportamiento común a todas ellas.

En el Apartado 5.1 se ha descrito que la desnaturalización térmica seguida por DSC de la PCPB y la CPB a pH 7.5 y pH 9.0, a diferentes valores de fuerza iónica, es calorimétricamente irreversible y las transiciones de DSC han resultado fuertemente dependientes de la velocidad de barrido. El modelo cinético de dos estados (Sánchez-Ruiz et al., 1988a) explica cuantitativamente estas transiciones de DSC, excepto para el caso de la CPB a pH 9.0 cuya desviación del modelo puede racionalizarse, como se discute en el Apartado 5.2, en términos del efecto de la concentración de Zn^{2+} sobre las transiciones. Mediante la aplicación del modelo se obtienen los parámetros de activación que controlan la cinética aparente de primer orden del proceso, siendo estos parámetros comparables a los descritos para otras proteínas. En general esta situación es similar a la encontrada para el sistema homólogo de la procarboxipeptidasa A y la carboxipeptidasa A (Sánchez-Ruiz et al.,

1988b). Estos resultados muestran que la absorción de calor debida a la desnaturalización térmica de ambas proteínas está completamente determinada por la velocidad de formación del estado final (desnaturalizado irreversiblemente). Esto impide cualquier tipo de análisis termodinámico del proceso térmico de forma que no puede obtenerse ningún parámetro termodinámico (excepto el incremento de entalpía de desnaturalización) sobre el proceso de desnaturalización térmica de estas proteínas.

Se ha descrito en el Apartado 5.2 que el efecto de la concentración de Zn^{2+} sobre las transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de la CPB en pirofosfato 20 mM, pH 9.0, se comporta aparentemente conforme a lo predicho por la ecuación de van't Hoff, lo que podría suponer una evidencia en apoyo de la aplicación de la termodinámica de equilibrio al análisis de los datos de DSC (Manly et al., 1985; Edge et al., 1985; Hu y Sturtevant, 1987; Sturtevant, 1987). Sin embargo, se ha estudiado el efecto de la velocidad de barrido en las transiciones de DSC, junto con experimentos de cinéticas de inactivación térmica. Las transiciones de DSC siguen cuantitativamente el modelo cinético de dos estados (Sánchez-Ruiz et al., 1988a), siendo las cinéticas de inactivación térmica a temperatura constante de primer orden. Por lo tanto, el proceso de desnaturalización térmica de la CPB a pH 9.0, en pirofosfato 20 mM, está completamente controlado por la cinética aparente de primer orden de formación del estado irreversiblemente desnaturalizado de la proteína. El efecto del Zn^{2+} ha sido interpretado cuantitativamente mediante un modelo cinético que incluye una etapa previa de equilibrio de disociación del Zn^{2+} , pero en el que los estados implicados en el proceso de desnaturalización que están significativamente poblados no se encuentran en ningún momento en equilibrio. Este es el modelo más sencillo que permite explicar el efecto del Zn^{2+} sobre la desnaturalización térmica irreversible de la CPB.

El estudio por DSC de la desnaturalización térmica irreversible de la TLN, que se describe en el Apartado 5.3, muestra el efecto de una variedad de condiciones experimentales y efectores (pH, concentración de muestra, inhibidores, iones esenciales) en su estabilidad térmica. En todas las condiciones experimentales investigadas la desnaturalización térmica de la TLN resultó ser irreversible y cinéticamente controlada, ajustándose los datos de DSC al modelo cinético de dos estados, como ya se había descrito anteriormente (Fujita et al., 1979; Sánchez-Ruiz et al., 1988a). Como se describe en el Apartado 5.3, los efectos de las condiciones investigadas sobre la estabilidad térmica de la TLN únicamente pueden

racionalizarse en base a que tienen una influencia puramente cinética en la estabilidad de la TLN, ya que actúan modificando la velocidad de termoinactivación irreversible.

Independientemente de los modelos cinéticos que se utilicen para explicarlos, los resultados del Apartado 5.1 obtenidos con la CPB y la PCPB a pH 7.5 y pH 9.0, en ausencia de un exceso de Zn^{2+} , el efecto del Zn^{2+} en las transiciones de DSC de la CPB a pH 9.0, descrito en el Apartado 5.2, y la influencia de algunas condiciones experimentales y efectores en la estabilidad térmica de la TLN (Apartado 5.3), implican una serie de conclusiones muy importantes en el ámbito del análisis de datos de DSC encaminado a la caracterización de la estabilidad térmica de la proteínas:

-Contrariamente a la opinión de algunos autores (Manly et al., 1985; Edge et al., 1985; Hu y Sturtevant, 1987; Sturtevant, 1987), el hecho de que un efecto de ligandos en los valores de T_m de transiciones de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica irreversible de una proteína, tal como el obtenido con el Zn^{2+} en la CPB a pH 9.0, siga aparentemente los dictados de la Ecuación de van't Hoff no constituye evidencia alguna en apoyo de la aplicación de la Termodinámica de equilibrio al análisis de los datos de DSC. En cambio, el efecto de ligandos puede explicarse correctamente mediante la utilización de modelos cinéticos que incluyan la disociación del ligando como una etapa de equilibrio previa.

-Independientemente del modelo cinético utilizado para el análisis de los resultados, los efectos de ligandos, condiciones experimentales u otros efectores en la desnaturalización térmica de no equilibrio de las proteínas está motivado por el hecho de que motivan cambios en la velocidad de la desnaturalización irreversible de la proteína.

-Los procesos de desnaturalización térmica de no equilibrio, que ocurren muy a menudo para una gran cantidad de proteínas, no permiten, como ya hemos visto, un análisis termodinámico directo. Es posible, sin embargo, un abordaje desde un punto de vista cinético que permita la caracterización de la estabilidad de proteínas que desnaturalizan irreversiblemente, en términos de velocidades de los procesos cinéticos de termoinactivación. Esta estabilidad "cinética" puede tener en muchos casos una importancia fundamental en los intentos cada vez más frecuentes de incrementar la estabilidad térmica de proteínas mediante mutagénesis dirigida o modificación química.

La mayoría de los parámetros cinéticos obtenidos a lo largo de este Trabajo vienen dados en términos de la Ecuación de Arrhenius, es decir, como energías de activación y factores de frecuencia, excepto en el caso de las cinéticas de dimerización/monomerización del fragmento TLN-205-316. Sin embargo, a la hora de realizar un análisis comparativo de los datos cinéticos es conveniente basarse en la formulación termodinámica de la teoría de velocidades absolutas o del estado de transición. A partir de los parámetros de Arrhenius es posible calcular los valores de los parámetros de activación, ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger , mediante las ecuaciones:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

$$\Delta H^\ddagger = E - RT$$

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T}$$

donde k es la constante de velocidad de la reacción y k_B y h son las constantes de Boltzmann y Planck respectivamente. La primera de las ecuaciones predice una dependencia de la constante de velocidad con la temperatura, prácticamente idéntica a la de la Ecuación de Arrhenius, al menos dentro de un intervalo de temperatura no demasiado amplio. En la Tabla 5.6.I se resumen los parámetros cinéticos obtenidos para los sistemas estudiados en esta Memoria, junto con los descritos en la Bibliografía para otras proteínas a partir de estudios similares de DSC (Sánchez-Ruiz et al., 1988a y 1988b; Guzmán-Casado et al., 1990; Galisteo, 1990). En la Tabla también se incluyen los parámetros de activación de la cinética del proceso de dimerización del fragmento TLN-205-316.

De los valores de los parámetros de activación de la Tabla se puede apreciar algo importante: Existe una clara compensación entre los términos entálpicos y entrópicos en la energía de Gibbs de activación. ΔH^\ddagger y $T\Delta S^\ddagger$ son relativamente grandes en comparación con ΔG^\ddagger , existiendo además compensación entre las variaciones de ΔH^\ddagger y $T\Delta S^\ddagger$, que lo hacen en un intervalo de cientos de kJ/mol, mientras que los valores de ΔG^\ddagger varían muy poco (entre 80 y 91.5 kJ/mol) entre sistemas tan diferentes como son los mostrados en la Tabla (únicamente la dimerización de TLN-205-316 presenta un ΔG^\ddagger algo menor de 73.7 kJ/mol). La existencia de esta compensación entálpico-entrópica se puede apreciar mejor en la Figura

Tabla 5.6.I

Parámetros cinéticos obtenidos para los procesos de desnaturalización térmica irreversible de varias proteínas. Los valores se han asignado a la temperatura, T^* , a la que la constante cinética es igual a 1 min^{-1} . Se incluyen también los valores obtenidos para la cinética de dimerización del fragmento TLN-205-316.

Proteína y condiciones	T^* (K)	E kJ/mol	ΔG^\ddagger kJ/mol	ΔS^\ddagger J/K.mol	ΔH^\ddagger kJ/mol
PCPB					
fosfato 1 mM, pH 7.5	346.0	331	85.2	702	328
fosfato 20 mM, pH 7.5	346.1	342	85.2	734	339
pirofosfato 1 mM, pH 9.0	345.7	324	85.1	683	321
pirofosfato 20 mM, pH 9.0	340.8	300	83.8	626	297
CPB					
fosfato 1 mM, pH 7.5	346.1	271	85.2	529	268
fosfato 20 mM, pH 7.5	346.0	270	85.2	526	267
pirofosfato 50 mM, pH 9.0	328.6	197	80.7	346	194
CPB + Zn^{2+}, pirofosfato 20 mM, pH 9.0					
E-Zn \rightarrow F	340.5	300	83.8	627	297
E-Zn \rightleftharpoons E \rightarrow F	341.5	259	84.0	504	256
E \rightarrow F (+1,10 fenantrolina)	325.2	178	79.9	293	175
TLN					
HEPES, pH 7.5	370.7	282	91.5	506	279
Acetato, pH 5.0	368.1	300	90.8	560	297
tetraborato, pH 9.0	357.8	303	88.2	592	300
pH 7.5 + phosphoramidon	368.5	414	90.9	869	411
pH 7.5 + 1,10-fenantrolina	366.9	360	90.5	726	357
TLN-205-316					
dimerización	300.9	-	73.7	240	146
CPA, pH 7.5^(a)					
PCPA, pH 7.5 ^(a)	345.8	250	85.1	469	247
HCN, pH 7.2 ^(b)	346.8	300	85.4	611	297
BR, pH 9.5 ^(c)	338.8	383	83.3	876	380
	356.9	410	87.9	894	407

^(a) Sánchez-Ruiz et al., 1988b.

^(b) Guzmán-Casado et al., 1990.

^(c) Galisteo, 1990.

5.6.1, donde se representan los valores de ΔH^\ddagger frente a ΔS^\ddagger . Se han incluido también en esta representación los parámetros de activación obtenidos por Pohl (Pohl, 1968 y 1969) para las cinéticas de desnaturalización térmica de varias proteínas (quimotripsina,

quimotripsinógeno, tripsina, elastasa y ribonucleasa) en agua a pH 2.0 y en soluciones de urea 8M, a pH 7.2. En la Figura se aprecian tres correlaciones casi paralelas y claramente diferenciables: La obtenida por Pohl en condiciones de baja estabilidad de las proteínas; la correlación que se puede observar para los parámetros de activación de la carboxipeptidasa A (CPA), la procarboxipeptidasa A (PCPA), la hemocianina, y nuestros datos para CPB y PCPB en varias condiciones experimentales, todos ellos procedentes de proteínas de organismos mesofílicos; y una tercera correlación entre los parámetros de activación de la TLN en varias condiciones y la bacteriorrodopsina, ambas proteínas especialmente termoestables y procedentes de microorganismos que viven en condiciones extremas.

Fenómenos de compensación entalpía-entropía tal como los que se muestran en la Figura 5.6.1 aparecen frecuentemente, tanto en el estudio de reacciones entre moléculas pequeñas en disolución como en procesos en que están implicadas macromoléculas biológicas (para una revisión general, ver Lumry y Gregory, 1986). Generalmente este tipo de compensaciones lineales se encuentran para una serie de procesos relacionados entre sí en los que se modifica alguna variable (composición del solvente, pH, efectores, diferentes sistemas homólogos de una familia,...). La explicación que se da a estos fenómenos de compensación es la existencia de un subproceso común a todos los miembros de la serie de procesos que intervienen en la correlación, aunque este subproceso común puede ocurrir en mayor o menor extensión, dando lugar a diferentes valores de entalpía y entropía, aunque correlacionados. La pendiente de la correlación, T_c , o temperatura de compensación, es característica del subproceso común y puede servir para identificarlo en procesos diferentes pero relacionados.

La correlación entre ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger encontrada por Pohl ha sido interpretada por Lumry y Gregory (1986) en términos de su teoría de los nudos ("knots") y las matrices. A partir del análisis de diagramas de probabilidad de las velocidades de intercambio isotópico de protón en algunas proteínas, proponen que en la estructura de la proteína existen tres tipos de regiones que sufren intercambio a velocidades claramente distinguibles: 1) La superficie de la proteína, que sufren el intercambio muy rápidamente; 2) zonas de la proteína no demasiado rígidas, denominadas matrices, que intercambian a velocidad intermedia; 3) zonas muy rígidas de la estructura, llamadas nudos, que sufren el intercambio muy lentamente. Las cinéticas de intercambio de las zonas 2) y 3) presentan correlaciones entre la entalpía y la

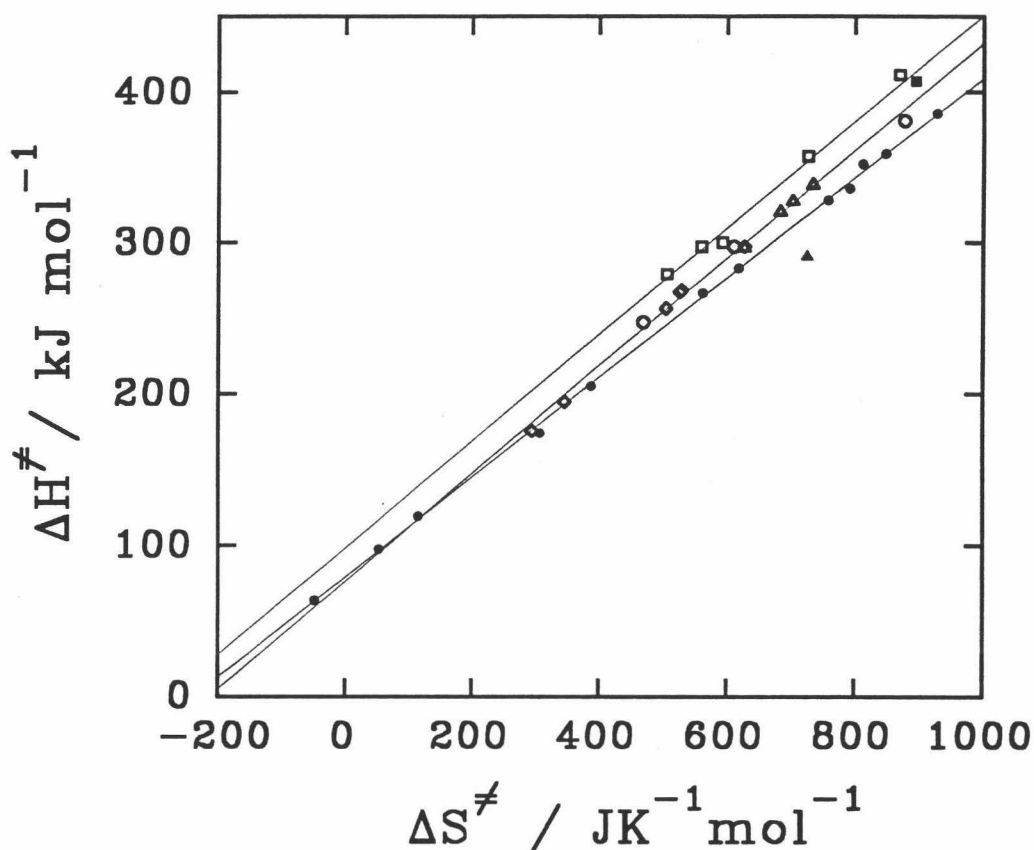


FIGURA 5.6.1: Correlación entre la entalpía de activación, ΔH^\ddagger , y la entropía de activación, ΔS^\ddagger , para la desnaturalización térmica de varias proteínas en diversas condiciones experimentales (datos de la Tabla 5.6.I). (○) procarboxipeptidasa A, carboxipeptidasa A y hemocianina; (■) bacteriorrodopsina; (◇) carboxipeptidasa B; (△) procarboxipeptidasa B; (□) termolisina; (●) datos de Pohl (1968 y 1969) de desnaturalización térmica de varias proteínas globulares en urea 8 M y en disolución acuosa a pH 2.0; (▲) parámetros de activación obtenidos para la dimerización del fragmento TLN-205-316 (ver Apartado 5.4). Las líneas rectas corresponden a las tres correlaciones diferentes en que se han agrupado los datos (ver texto).

entropía de activación, pero con temperaturas de correlación T_c diferentes. Para las matrices se obtiene una $T_c = 470$ K, mientras que para los nudos $T_c = 340-360$ K.

Del análisis de medidas de intercambio de protón mediante difracción de neutrón, proponen que los nudos poseen una estructura ordenada de enlaces de hidrógeno y un número relativamente grande de contactos entre grupos no polares, estando normalmente situados en el interior de zonas en que existe empaquetamiento y interiores hidrofóbicos entre estructuras

secundarias (hélices sobre láminas β , hélice sobre hélices o láminas sobre láminas). En cambio, las matrices corresponden a zonas desordenadas de la proteína, giros β y partes polares de las hélices. Volviendo a la Figura 5.6.1, la correlación obtenida por Pohl presenta una temperatura de compensación, T_c , de 324 K, muy cercana a la T_c encontrada para la expansión y apertura de los nudos. Basándose en esto, Lumry y Gregory (1986) concluyen que éste es el subproceso común en la desnaturalización térmica y que los nudos tienen un papel fundamental en la dinámica de la estructura de las proteínas así como en su estabilidad cinética, entendida como la energía de Gibbs de activación de la expansión cooperativa de los nudos, y pueden contribuir a la estabilidad termodinámica de las proteínas apreciablemente. El tamaño de los nudos parece ser bastante variable y parece, a juzgar por los datos de diferentes proteínas, que la energía de Gibbs de activación para la expansión cooperativa de los nudos aumenta con su tamaño, siendo éste determinante de la cinética de desplegamiento.

Para nuestros datos se han obtenido correlaciones con temperaturas de compensación (356 K y 353 K) similares a los obtenidos por Pohl, mostrando que la desnaturalización térmica irreversible de las proteínas y las cinéticas de desplegamiento reversible tienen un mismo subproceso común, que es la expansión de la estructura de la proteína. Algo significativo en los datos presentados en la Figura 5.6.1 son las diferencias en ΔG^\ddagger (ordenada en el origen de cada recta) entre las tres compensaciones mostradas, que podrían proceder de diferencias en la extensión y fortaleza de los nudos de cada grupo de proteínas. El menor valor de ΔG^\ddagger que, como hemos discutido anteriormente, corresponde a un estado extensamente desplegado, se obtiene para la dimerización del fragmento TLN-205-316 (ver Tabla 5.6.I) que debe tener, como es lógico, la estructuración menos extensa. Un valor intermedio de ΔG^\ddagger se obtiene para los datos de Pohl y los parámetros de activación correspondientes a CPA, PCPA, CPB, PCPB, y hemocianina todas ellas proteínas de organismos mesofílicos, con estabilidades térmicas intermedias. El mayor valor de ΔG^\ddagger se obtiene para la correlación de la TLN y la bacteriorrodopsina, ambas proteínas altamente termoestables y procedentes de microorganismos que viven en condiciones fuertemente adversas. La pregunta es si este comportamiento es realmente significativo y en qué medida está relacionado con la extensión de estas zonas rígidas de la estructura proteica llamadas nudos en los diferentes tipos de proteínas. Si esto fuera cierto la extensión de los nudos

podría ser una de las causas de la conocida estabilidad de las proteínas procedentes de organismos termofílicos.

6. CONCLUSIONES.

A partir de la interpretación y discusión de los resultados experimentales obtenidos y los modelos y desarrollos teóricos propuestos en esta Memoria se proponen las siguientes conclusiones:

1.- El dominio de activación de la procarboxipeptidasa B presenta estructura globular en disolución. Su desplegamiento térmico a pH 3.0, 7.5 y 9.0 transcurre reversiblemente y en equilibrio, con una elevada estabilidad térmica. A media y alta fuerza iónica sigue el modelo de equilibrio de dos estados, con unos parámetros termodinámicos similares a los descritos para proteínas globulares compactas. A baja fuerza iónica y pH 7.5 y 9.0, el desplegamiento térmico se aparta del modelo de equilibrio de dos estados, siendo coherente con la presencia de un estado intermedio significativamente poblado en el equilibrio de desplegamiento.

2.- La desnaturalización térmica de la procarboxipeptidasa B y la carboxipeptidasa B, a pH 7.5 y 9.0 transcurre irreversiblemente, bajo control cinético y de acuerdo con el modelo cinético de dos estados. La estabilidad térmica de ambas es menor que la del dominio de activación. Dado su carácter de no equilibrio sólo es posible un análisis cinético de los resultados, obteniéndose unos parámetros de activación similares a los descritos para la desnaturalización térmica de otras proteínas.

3.- Se ha encontrado un efecto estabilizante del ion Zn^{2+} sobre la desnaturalización térmica de la carboxipeptidasa B en pirofosfato 20 mM, pH 9.0. A pesar de que este efecto sigue aparentemente los dictados de la ecuación de van't Hoff, no es analizable en términos de la Termodinámica del Equilibrio. Muy al contrario, la desnaturalización térmica es irreversible y presenta una cinética aparente de primer orden. El efecto del Zn^{2+} ha sido interpretado cuantitativamente (hasta $[Zn^{2+}] < 3mM$) mediante un modelo cinético en el que los estados significativamente poblados presentes no están en ningún momento en equilibrio químico. Se concluye que, en contra de la opinión de algunos autores, un efecto de ligandos sobre transiciones irreversibles de DSC que siga aparentemente la ecuación de van't Hoff no es una justificación válida para el análisis termodinámico de los datos, siendo posibles sin

embargo interpretaciones puramente cinéticas de los efectos de ligandos.

4.- La desnaturalización térmica de la termolisina, bajo una gran variedad de condiciones experimentales, es irreversible y transcurre en general de acuerdo con el modelo cinético de dos estados. Los efectos de las condiciones experimentales (pH, concentración de muestra, presencia de inhibidores e iones esenciales) sobre su estabilidad térmica han sido racionalizados en términos de su influencia en la velocidad de los procesos de termoinactivación de la termolisina.

5.- Se ha estudiado mediante DSC el desplegamiento térmico del fragmento de termolisina TLN-255-316 a pH 7.5, encontrándose que el proceso es reversible y de equilibrio. Estos resultados están de acuerdo con la capacidad descrita para este fragmento de adquirir una estructura globular plegada. El efecto de la concentración de muestra sobre las transiciones de DSC es coherente con el modelo $N_2 \rightleftharpoons 2D$, indicando que el fragmento TLN-255-316 se encuentra en disolución a temperatura ambiente en forma de dímero.

6.- El fragmento de termolisina TLN-205-316 muestra también, a pH 7.5, un desplegamiento térmico reversible, lo que indica igualmente para este fragmento una conformación plegada en disolución. El proceso, estudiado por DSC y cromatografía de exclusión molecular, ha podido describirse adecuadamente mediante el desarrollo de un modelo inédito, del tipo $N_2 \rightleftharpoons 2N \rightleftharpoons 2D$, donde los procesos de dimerización-monomerización son lentos a temperaturas por debajo de 50°C. Es posible aislar a baja temperatura poblaciones de no equilibrio de monómeros y dímeros del fragmento. El análisis de los datos mediante el modelo propuesto ha demostrado la existencia de una alta barrera energética entre los estados monómero y dímero del fragmento, que muy probablemente tengan conformaciones distintas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Baker, D., Sohl, J.L. y Agard, D.A. (1992) *Nature* 356, 263-265.
- Bertazzon, A., Tian, G.H., Lamblin, A. y Tsong, T.Y. (1990) *Biochemistry* 29, 291-298.
- Blackburn, S. (1976) en *Enzyme Structure and Function* (ed. Marcel Dekker, New York) vol. 3, p. 169.
- Blumberg, S. (1979) *Biochemistry* 18, 2815-2820.
- Blumberg, S., Holmquist, B. y Vallee, B.L. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 987-992.
- Blumberg, S. y Vallee, B.L. (1975) *Biochemistry* 14, 2410-2419.
- Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Brandts, J.F. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 4291-4301.
- Brandts, J.F., Hu, C.Q., Lin, L.N. y Mas, M.T. (1989) *Biochemistry* 28, 8588.
- Brzeska, H., Venyaminov, S.V., Grabarek, Z. y Drabikowski, W. (1983) *FEBS Lett.* 153, 169-173.
- Burgos, F. J. (1989) *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Burgos, F. J., Villegas, V., Salvà, M., Soriano, F., Mendez, E. y Avilés F. X. (1991) *Biochemistry* 30, 4082-4089.
- Calderon, R.O., Stolowich, N.J., Gerlt, J.A. y Sturtevant, J.M. (1985) *Biochemistry* 24, 6044-6049.
- Clauser, E., Gardell, S.J., Craik, C.S., McDonald, R.J. y Rutter, W.J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 17837-17845.
- Coll, M., Guasch, A., Avilés, F. X. y Huber R. (1991) *EMBO J.* 10, 1-9.
- Colman, P.M., Jansonius, J.N. y Matthews, B.W. (1972) *J. Mol. Biol.* 70, 701.
- Conejero-Lara, F., Sánchez-Ruiz, J.M., Mateo, P.L., Burgos, F.J., Vendrell, J. y Avilés, F.X. (1991a) *Eur. J. Biochem.* 200, 663-670.
- Conejero-Lara, F., Mateo, P.L., Avilés, F.X. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1991b) *Biochemistry* 30, 2067-2072.
- Dalzoppo, D., Vita, C. y Fontana, A. (1985) *J. Mol. Biol.* 182, 331-340.
- Dill, K.A. (1987) en *"Protein Engineering"* (Oxender, D.L. & Fox, C.F. eds.) pp. 187-192, Alan R. Liss, New York.

- Dill, K.A. (1990) *Biochemistry*, 29, 7133-7155.
- Edge, V., Allewell, N.M. y Sturtevant, J.M. (1985) *Biochemistry* 24, 5899-5906.
- Edge, V., Allewell, N.M. y Sturtevant, J.M. (1988) *Biochemistry* 27, 8081.
- Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., Zambonin, M. y Fontana, A. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 221-228.
- Feder, J., Garrett, L.R. y Wildi, B.S. (1971) *Biochemistry* 10, 4552.
- Feder, J. y Schuck, J.M. (1970) *Biochemistry* 9, 2784-2791.
- Folk, J.E. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3541-3542.
- Folk, J.E. y Gladner, J.A. (1958) *J. Biol. Chem.* 231, 379-386.
- Folk, J.E. y Gladner, J.A. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 48, 139-147.
- Folk, J.E., Piez, K.A., Carroll, W.R. y Gladner, J.A. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2272-2277.
- Folk, J.E. y Schirmer (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3884-3894.
- Fontana, A. (1988) *Biophys. Chem.* 29, 181-193.
- Fontana, A., Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M. y Zambonin, M. (1986) *Biochemistry* 25, 1847-1851.
- Freire, E. (1989) *Comments Mol. Cell. Biophys.* 6, 123-140.
- Freire, E. y Biltonen, R.L. (1978) *Biopolimers* 17, 463.
- Freire, E. y Murphy, K.P. (1991) *J. Mol. Biol.* 222, 687-698.
- Freire, E., Murphy, K.P., Sánchez-Ruiz, J.M., Galisteo, M.L. y Privalov, P.L. (1991) *Biochemistry* 31, 250-256.
- Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 159-188.
- Fujita, S.C., Go, N. y Imahori, K. (1979) *Biochemistry* 18, 24-28.
- Fukada, H., Sturtevant, J.M. y Quioco, F.A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 13193-13198.
- Galisteo, M.L. (1990) *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- Galisteo, M.L., Conejero-Lara, F., Nuñez, J., Sánchez-Ruiz, J.M. y Mateo, P.L. (1992) *Thermochimica Acta* 199, 147-157.
- Galisteo, M.L., Mateo, P.L. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1991) *Biochemistry* 30, 2061-2066.

- Gill, S.J., Richey, B. Bishop, G. y Wyman, J. (1985) *Biophys. Chem.* 21, 1.
- Griko, Y.V., Privalov, P.L., Sturtevant, J.M. y Venyaminov, S.Y. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3343-3347.
- Guasch, A., Coll, M., Avilés, F.X. y Huber, R. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 141-157.
- Guzmán-Casado, M., Parody-Morreale, A., Mateo, P.L. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Eur. J. Biochem.* 188, 181-185.
- Holmquist, B. y Vallee, B.L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 4601-4609.
- Hu, C.Q. y Sturtevant, J.M. (1987) *Biochemistry* 26, 178-182.
- Hu, C.Q. y Sturtevant, J.M. (1989) *Biochemistry* 28, 813-818.
- Jaenicke, R. (1991) *Biochemistry* 30, 3147-3161.
- Jiménez, M.A., González, C. y Rico, M. (1991) en *III Congreso de la Sociedad de Biofísica de España*. Madrid, 4-7 de Diciembre de 1991. P13.
- Khan, S.M., Birnbaum, E.R. y Darnall, D.W. (1978) *Biochemistry* 17, 4669-4674.
- Khan, S.M. y Darnall, D.W. (1978) *Anal. Biochem.* 86, 332-336.
- Khan, S.M., Darnall, D.W. y Birnbaum, E.R. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 624, 1-12.
- Kim, P.S. y Baldwin, R.L. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* 59, 631-660.
- Klibanov, A.M. y Ahern, T.J. (1987) en "*Protein engineering*" (Oxender, D.L. & Fox, C.F. eds.) pp. 213-218, Alan R. Liss, New York.
- Kuwajima, K. (1989) en "*Proteins: Structure, Function and Genetics*" 6, 87-103.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
- Larsen, K.S. y Auld, D.S. (1989) *Biochemistry* 28, 9620-9625.
- Latt, S.A., Holmquist, B. y Vallee, B.L. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 333-339.
- Lechuga, A. (1986) *Tesina de Licenciatura*. Universidad de Granada.
- López-Lacomba, J.L. (1987) *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- López-Mayorga, O. (1983) *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- López-Mayorga, O. y Freire, E. (1987) *Biophys. Chem.* 87, 87.
- Lumry, R. y Eyring, H. (1954) *J. Phys. Chem.* 58, 110.
- Lumry, R. y Gregory, R.B. en "*The Fluctuating Enzyme*" (Welch, G.R., ed.), capt.

1, p. 1, Wiley-Interscience, New York.

Martínez, M.C., Avilés, F.X., San Segundo, B. y Cuchillo, C.M. (1981) *Biochem. J.* 197, 141-147.

Manly, S.P., Matthews, K.S. y Sturtevant, J.M. (1985) *Biochemistry*, 24, 3842-3846.

Mateo, P.L. (1984) en "*Thermochemistry and its Applications to Chemical and Biochemical Systems*" (Ribeiro da Silva, M.A.V., Ed.) p.541. Reidel, Holland.

Matthews, B.W., Weaver, L.H. y Kester, W.R. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 8030-8044.

Mitchinson, C. y Wells, J.A. (1989) *Biochemistry* 28, 4807-4815.

Morin, P.E., Diggs, D. y Freire, E. (1990) *Biochemistry* 29, 781-788.

Nichol, L.W. y Winzor, D.J. (1972) en "*Migration of Interacting Systems*". Clarendon Press. Oxford.

Novokhatni, V.V., Kudinov, S.A. y Privalov, P.L. (1984) *J. Mol. Biol.* 122, 33-42.

Ornstein, L. (1964) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 121, 321.

Pace, C.N. (1975) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 3, 1.

Pace, C.N. (1990a) *Trends Biochem. Sci.* 15, 14-17.

Pace, C.N. (1990b) *TIBTECH*, 8, 93-98.

Pantoliano, M.W., Whitlow, M. Wood, J.F., Rollence, M.L., Finzel, B.C., Gilliland, G.L., Poulos, T.L. y Bryan, P.N. (1988) *Biochemistry* 27, 8311-8317.

Pantoliano, M.W., Whitlow, M. Wood, J.F., Dodd, J.W., Hardman, K.D., Rollence, M.L. y Bryan, P.N. (1989) *Biochemistry* 28, 7205-7213.

Pohl, F.M. (1968) *Eur. J. Biochem.* 4, 373.

Pohl, F.M. (1969) *FEBS Lett.* 3, 60.

Potekhin, S.A. y Privalov, P.L. (1982) *J. Mol. Biol.* 159, 519.

Privalov, P.L. (1979) *Adv. Prot. Chem.*, 33, 167-241.

Privalov, P.L. (1980) *Pure and Appl. Chem.* 52, 479.

Privalov, P.L. (1982) *Adv. Prot. Chem.* 35, 1-104.

Privalov, P.L. (1989) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18, 47-69.

Privalov, P.L. y Filimonov, V.V. (1978) *J. Mol. Biol.* 122, 447.

Privalov, P.L. y Gill, S.J. (1988) *Adv. Prot. Chem.* 39, 191-234.

Privalov, P.L., Griko, Y.V., Venyaminov, S.Y. y Kutysenko, V.P. (1986) *J. Mol.*

Biol. 190, 487.

Privalov, P.L. y Khechinashvili, N.N. (1974) *J. Mol. Biol.* 86, 665-684.

Privalov, P.L. y Makhatazde, G.I. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 715-723.

Privalov, P.L., Mateo, P.L., Khechinashvili, N.N., Stephanov, V. y Revina, L. (1981) *J. Mol. Biol.* 152, 445.

Privalov, P.L. y Medved, L.V. (1982) *J. Mol. Biol.* 159, 665.

Privalov, P.L. y Plotnikov, V.V. (1989) *Thermochimica Acta* 139, 257-277.

Privalov, P.L. y Pothekin, S.A. (1986) *Methods Enzymol.* 131, 4-51.

Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zerovnik, E. y Razgulyaev, O.I. (1990) *FEBS Lett.* 262, 20-24.

Ramsay, G. y Freire, E. (1990) *Biochemistry* 29, 8677-8683.

Rashin, A.A. (1981) *Nature*, 291, 85.

Rashin, A.A. (1984) *Biochemistry*, 23, 5512.

Regan, L. y DeGrado, W.F. (1988) *Science* 241, 976-978.

Rigell, C.W., de Saussure, C. y Freire, E. (1985) *Biochemistry* 24, 5638.

Rudolph, R., Siebendritt, R., Nesslauer, G., Sharma, A.K. y Jaenicke, R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4625-4629.

Sánchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.* 61, 921-935.

Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M. y mateo P.L. (1988a) *Biochemistry* 27, 1648-1652.

Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Mateo, P.L., Vilanova, M., Serra, M.A. y Avilés, F.X. (1988b) *Eur. J. Biochem.* 176, 225-230.

San Segundo, B., Martínez, M.C., Vilanova, M., Cuchillo, C.M. y Avilés, F.X. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 707, 74-80.

Schellman, J.A. (1987) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16, 115-137.

Schmid, M.F. y Herriott, J.R. (1976) *J. Mol. Biol.* 103, 175-190.

Sturtevant, J.M. (1987) *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38, 463-488.

Sturtevant, J.M., Yu, M.H., Haase-Pettingell, C. y King, J. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 10693.

Takahashi, K. y Sturtevant (1981) *Biochemistry* 20, 6185.

Titani, K., Ericsson, L.H., Walsh, K.A. y Neurath, H. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 72, 1666-1670.

Titani, K., Hermodson, M.A. Ericson, L.H., Walsh, K.A. y Neuralth, H. (1972) *Nature New Biology* 238, 41.

Toma, S., Campagnoli, S., Margarit, I., Gianna, R., Grandi, G., Bolognesi, M., De Filippis, V. y Fontana, A. (1991) *Biochemistry*, 30, 97-106.

Tsalkova, T.M. y Privalov, P.L. (1985) *J. Mol. Biol.* 181, 533.

Varadarajan, R., Connelly, P.R., Sturtevant, J.M. y Richards, F.M. (1992) *Biochemistry* 31, 1421-1426.

Vendrell, J., Billeter, M., Wider, G.S., Avilés, F.X. y Wuthrich, K. (1991) *EMBO J.* 10, 11-15.

Vendrell, J., Cuchillo, C.M. y Avilés, F.X. (1990a) *J. Biol. Chem.*, 265, 6949-6953.

Vendrell, J., Wider, G.S., Avilés, F.X. y Wuthrich, K. (1990b) *Biochemistry* 29, 7515-7522.

Vilanova, M., Burgos, F.J., Cuchillo, C.M. y Avilés, F.X. (1985) *FEBS Lett.* 191, 273-277.

Vita, C., Dalzoppo, D. y Fontana, A. (1984) *Biochemistry* 23, 5512-5519.

Vita, C., Dalzoppo, D. y Fontana, A. (1985) *Biochemistry* 24, 1798-1806.

Vita, C. y Fontana, A. (1982) *Biochemistry* 21, 5196-5202.

Vita, C., Fontana, A. y Chaiken, I.M. (1985b) *Eur. J. Biochem.* 151, 191-196.

Vita, C., Fontana, A. y Jaenicke, R. (1989) *Eur. J. Biochem.* 183, 513-518.

Vita, C., Fontana, A., Seeman, J.R. y Chaiken, I.M. (1979) *Biochemistry* 18, 3023-3031.

Volkin, D.B. y Klibanov, A.M. (1989) en "*Protein Function. A Practical Approach*" (T.E. Creighton, ed.) pp.1-24. IRL Press, Oxford University, England.

Voordouw, G. Milo, C. y Roche, R.S. (1976) *Biochemistry* 15, 3716-3723.

Voordouw, G. y Roche, R.S. (1974) *Biochemistry* 13, 5017-5024.

Voordouw, G. y Roche, R.S. (1975) *Biochemistry* 14, 4667-4673.

Walsh, K.A., Burstein, Y. y Pangburn, M.K. (1974) *Methods Enzymol.* 34, 435-440.

Weaver, L.H., Kester, W.R. y Matthews, B.W. (1977) *J. Mol. Biol.* 114, 119-132.

Weber, P.C. y Salemme, F.R. (1980) *Nature* 287, 82-84.

Weissman, J.S. y Kim, P.S. (1991) *Science* 253, 1386-1393.

Wetlaufer, D.B. (1981) *Adv. Prot. Chem.* 34, 61-89.

Wodak, S.J. y Janin, J. (1981) *Biochemistry*, 20, 6544.

Zale, S.E. y Klibanov, A.M. (1986) *Biochemistry* 25, 5432-5444.