

1200. T-15/1

T
12
125

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias



Departamento de Química Física

ESTUDIO CALORIMETRICO DE LA ESTABILIDAD TERMICA DE PEQUEÑAS PROTEINAS GLOBULARES Y FRAGMENTOS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 30-3-95
ENTRADA NUM. 870

Ana Isabel Azuaga Fortes

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 69664047
Nº Copia 212/3318

TESIS DOCTORAL

GRANADA
1995

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Física

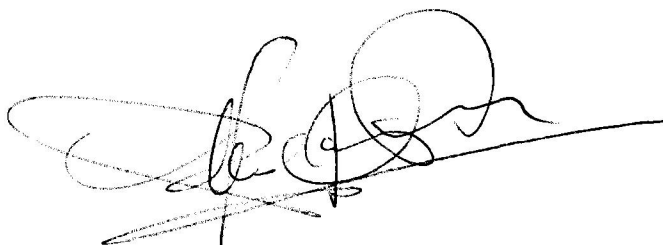
Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección de Químicas



Firmado: Ana Isabel Azuaga Fortes
Licenciada en Ciencias Químicas

Visado en Granada, a 20 de Marzo de 1995.

LOS DIRECTORES DE LA TESIS



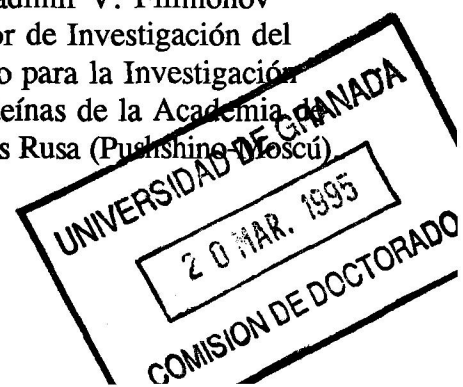
Firmado:

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



Firmado:

Dr. Vladimir V. Filimonov
Profesor de Investigación del
Instituto para la Investigación
de Proteínas de la Academia
Ciencias Rusa (Pushchino Moscú)



INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	3
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	11
2.1 β -LACTOGLOBULINA B	11
2.1.1 Introducci3n	11
2.1.2 Estructura	12
2.1.3 Estudios de asociaci3n	13
2.1.4 Estabilidad	19
2.2 FRAGMENTO DE TERMOLISINA 205-316	25
2.2.1 Introducci3n	25
2.2.2 Estudios de plegamiento-desplegamiento	27
2.3 DOMINIOS SH3	31
2.3.1 Introducci3n	31
2.3.2 Funci3n biol3gica	32
2.3.3 Estructura	32
2.3.4 Uni3n a ligandos	35
2.3.5 Estabilidad dominios SH3	39
3. MATERIALES Y METODOS	43
3.1 MATERIALES	43
3.1.1 Reactivos	43
3.1.2 Muestras biol3gicas	44
3.1.3 Instrumentaci3n	44
3.2 PREPARACION DE LAS MUESTRAS	46
3.2.1 β -Lactoglobulina B	46
3.2.2 Fragmento de Termolisina 205-316	48
3.2.3 Dominios SH3	51
3.3 TECNICAS DE ANALISIS DE MUESTRA	55
3.3.1 HPLC de fase reversa analftica	55
3.3.2 Electroforesis SDS-PAGE	55
3.4 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO	57

3.4.1	Introducción	57
3.4.2	Instrumentación	58
3.4.3	Experimento calorimétrico	60
3.4.4	Análisis de los datos	61
3.5	DICROISMO CIRCULAR	64
3.5.1	Introducción	64
3.5.2	Instrumentación	65
3.5.3	Experimento de dicroísmo circular	66
3.6	ULTRACENTRIFUGACION ANALITICA	69
3.6.1	Introducción	69
3.6.2	Instrumentación	71
3.6.3	Experimento de sedimentación	73
4.	FUNDAMENTOS TEORICOS	79
4.1	MODELO DE EQUILIBRIO DE DOS ESTADOS	79
4.2	TRANSICIONES DE EQUILIBRIO CON CAMBIOS EN EL ESTADO DE ASOCIACION	88
4.3	INTERACCION PROTEINA-LIGANDO EN UN EQUILIBRIO DE DOS ESTADOS	92
4.4	MODELO DE LUMRY Y EYRING	96
5.	RESULTADO Y DISCUSION	105
5.1	DESPLÉGAMIENTO TÉRMICO DE β -LACTOGLOBULINA B	105
5.1.1	Desplegamiento térmico de β -Lactoglobulina B a pH ácido	105
5.1.2	Desplegamiento térmico de β -Lactoglobulina B en presencia de cloruro de guanidina	124
5.2	DESPLÉGAMIENTO TÉRMICO DEL FRAGMENTO DE TERMOLISINA 205-316 A pH ACIDO	133
5.3	DESPLÉGAMIENTO TÉRMICO DE LOS DOMINIOS SH3 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LIGANDOS	153
5.3.1	Desplegamiento térmico de los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 en función del pH	154

5.3.2 Interacción de los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3

con los péptidos 3BP1 y 3BP1-M4Y 162

6. RESUMEN 175

7. CONCLUSIONES 185

8. BIBLIOGRAFIA 189

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1-1	14
FIGURA 2.1-2	15
FIGURA 2.2.1-1	26
FIGURA 2.2.2-1	28
FIGURA 2.3.3-1	33
FIGURA 2.3.4-1	37
FIGURA 2.3.4-2	38
FIGURA 3.2.1-1	47
FIGURA 3.2.2-1	49
FIGURA 3.2.2-2	50
FIGURA 3.2.3-1	53
FIGURA 3.2.3-2	54
FIGURA 3.4.2-1	59
FIGURA 3.4.4-1	63
FIGURA 3.6.2-1	72
FIGURA 3.6.2-2	73
FIGURA 3.6.3-1	75
FIGURA 4.1-1	83
FIGURA 4.1-2	87
FIGURA 4.2-1	91
FIGURA 4.3-1	95
FIGURA 4.4-1	100
FIGURA 5.1.1-1	106
FIGURA 5.1.1-2	109
FIGURA 5.1.1-3	110
FIGURA 5.1.1-4	112
FIGURA 5.1.1-5	114
FIGURA 5.1.1-6	116
FIGURA 5.1.1-7	117
FIGURA 5.1.1-8	118
FIGURA 5.1.1-9	121
FIGURA 5.1.1-10	122
FIGURA 5.1.1-11	123
FIGURA 5.1.2-1	126
FIGURA 5.1.2-2	128
FIGURA 5.1.2-3	130
FIGURA 5.1.2-4	131
FIGURA 5.2-1	134
FIGURA 5.2-2	135
FIGURA 5.2-3	138
FIGURA 5.2-4	146
FIGURA 5.2-5	148
FIGURA 5.2-6	150
FIGURA 5.2-7	152
FIGURA 5.3.1-1	156
FIGURA 5.3.1-2	157
FIGURA 5.3.1-3	159

FIGURA 5.3.1-4	161
FIGURA 5.3.2-1	166
FIGURA 5.3.2-2	167

INDICE DE TABLAS

TABLA 5.1.1-I	108
TABLA 5.2-I	137
TABLA 5.2-II	139
TABLA 5.2-III	144
TABLA 5.3.1-I	155
TABLA 5.3.2-I	165

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Es generalmente aceptado que la secuencia de aminoácidos de una proteína determina su única estructura tridimensional nativa, la cual es necesaria para su función biológica (Anfinsen, 1973; Anfinsen y Scheraga, 1975). Actualmente, la estructura de unas 500 proteínas globulares ha sido resuelta por cristalografía de Rayos X; esta abundancia de información estructural ha mostrado los diferentes caminos por los cuales las cadenas de aminoácidos se pliegan en estructuras globulares estables (Richardson, 1981). Uno de los problemas claves en la bioquímica y biofísica moderna es la comprensión químico-física de las interacciones, que originan el plegamiento de las proteínas. Puesto que estas interacciones son fundamentalmente de naturaleza no covalente, bien podría decirse que el estudio molecular de las especies y procesos biológicos no consiste sino en la racionalización del papel que estas interacciones no covalentes desempeñan en la estructura de las macromoléculas biológicas. Este problema, que ha sido investigado extensivamente en el pasado por un gran número de investigadores y usando una gran variedad de técnicas experimentales, métodos teóricos y compuestos modelos (Creighton 1978, 1985, 1988; Ghélis y Yon 1982; Jaenicke, 1987), ha incrementado su interés progresivamente hasta el presente. Solamente la solución del problema del plegamiento de proteínas y su estabilidad hará posible la predicción de la estructura tridimensional de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos, así como el desarrollo racional de nuevas proteínas, mutantes y de novo, con las propiedades biológicas y físico-químicas deseadas (Salemme, 1985; Oxender y Fox, 1987; Goldenberg, 1988).

La estabilidad neta de la proteína plegada es tan pequeña, incluso bajo condiciones óptimas, que la mayoría de las proteínas pueden desplegarse y en su caso replegarse con modificaciones mínimas en dichas condiciones. El replegamiento de la mayoría de las proteínas puede ser demostrado colocando la proteína desplegada en aquellas condiciones en las cuales el estado nativo sea estable. El replegamiento es un proceso de ensamblaje, en el que toda la información requerida está presente en la secuencia de aminoácidos, y ocurre espontáneamente bajo condiciones adecuadas. Las proteínas que una vez desplegadas no repliegan *in vitro* generalmente han sufrido alguna interferencia por modificación covalente,

pérdida de un cofactor requerido para el estado plegado, o agregación y posible precipitación del estado desplegado. Algunas proteínas, sin embargo, requieren la presencia de factores biológicos *in vivo* para plegarse, principalmente para prevenir agregaciones, como es el caso de las "chaperoninas".

El plegamiento espontáneo de las proteínas es algo sorprendente si tenemos en cuenta que las cadenas polipeptídicas pueden adoptar un número astronómico de conformaciones, un número tan grande que no sería factible para cualquier proteína intentar adoptar todas sus posibles conformaciones en una escala de tiempo práctica. Por ejemplo, una cadena polipeptídica de 100 aminoácidos tendría 10^{100} conformaciones diferentes posibles (una media de 10 conformaciones por residuo) y para pasar de una conformación a otra requeriría unos 10^{13} s. De esta forma, para probar todas las conformaciones tardaría 10^{77} años. No obstante, se ha observado que las proteínas tanto *in vivo* como *in vitro* se pliegan entre 10^1 y 10^3 s. La conclusión directa es que las proteínas no pliegan intentando encontrar aleatoriamente la conformación de menor energía libre; de hecho, para tener lugar en una escala de tiempo tan corta, el proceso de plegamiento debe de estar dirigido.

La estructura plegada de las proteínas indica que probablemente se estabilizan por combinación de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. En cualquier caso, la contribución neta a la estabilidad de la estructura plegada, es la diferencia entre la fortaleza de las interacciones en el estado plegado y las interacciones de los mismos grupos en el estado desplegado, incluyendo su solvatación por el agua. La opinión clásica es que la principal fuerza impulsora del plegamiento de las proteínas es el llamado "efecto hidrofóbico", que se debe a la tendencia que presenta el agua a evitar el contacto con los grupos apolares de la cadena polipeptídica, escondiéndose éstos en el interior de la estructura plegada de la proteína. En cualquier caso, existe discrepancia sobre la importancia relativa de las diversas fuerzas impulsoras del plegamiento/desplegamiento, no estando todavía claras las bases moleculares del proceso.

La estabilidad y el plegamiento de las proteínas están íntimamente relacionadas, y está

comúnmente aceptado que la minimización de energía en términos de un balance sutil entre interacciones débiles estabilizantes y desestabilizantes, constituye la fuerza conductora de la formación de la estructura (Jaenicke, 1991). Existen diferentes caminos experimentales para medir la estabilidad de las proteínas (Shellman y Hawkes, 1980). Un procedimiento común es el exponer la proteína a condiciones desnaturizantes específicas (pH ácido o alcalino, agentes desnaturizantes, detergentes, etc.) y posteriormente controlar la recuperación de la actividad biológica o de otra propiedad químico-física observable de la proteína nativa. Sin embargo, el estudio calorimétrico del desplegamiento térmico de proteínas es el método más directo y uno de los más utilizados para caracterizar su estabilidad térmica. Esto se debe al desarrollo instrumental y del análisis de datos de la microcalorimetría diferencial de barrido (DSC), que proporciona la capacidad calorífica, C_p , del sistema en función de la temperatura. El análisis termodinámico permite, en principio, la descripción completa de todas las funciones termodinámicas del desplegamiento reversible de proteínas. Este enfoque es válido y enormemente informativo siempre que el proceso de desnaturización térmica transcurra en el equilibrio (Privalov, 1979 y 1982; Mateo, 1984; Sánchez-Ruiz y Mateo, 1987). Esto se comprueba fácilmente en experimentos de DSC mediante la realización de dos barridos consecutivos con la muestra en estudio, obteniéndose para procesos reversibles termogramas análogos. Además, los procesos de plegamiento-desplegamiento son normalmente lo suficientemente rápidos como para permitir que el equilibrio termodinámico se encuentre establecido en todo momento. Esto puede comprobarse mediante experimentos a diferentes velocidades de barrido. El estudio de proteínas globulares sencillas y algunas complejas mediante DSC ha conducido, por ejemplo, a la definición estructural de los dominios cooperativos, como unidades de plegamiento de las proteínas (Privalov, 1982). Para proteínas globulares pequeñas está establecido que éstas se despliegan térmicamente de acuerdo con el modelo de equilibrio de dos estados (Privalov, 1979), constituyendo dominios estructurales únicos, altamente cooperativos. Sin embargo, existen muchas otras proteínas cuya desnaturización térmica es 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 irreversible no deseados que alteran el estado desplegado de la proteína, impidiendo su posterior plegamiento (Zale y Klibanov, 1986; Klibanov y Ahern, 1987; Vokin y Klibanov, 1989). Proteínas globulares constituidas por más de 100

aminoácidos, suelen estar compuestas de varios dominios estructurales, subunidades o ambos. Estos dominios individuales, aislados, son normalmente tan estables como cuando se encuentran en la proteína intacta y constituyen usualmente unidades estructurales independientes dentro de la proteína. Actualmente está tomando auge el estudio del desplegamiento térmico de dichos dominios reconocidos simplemente por inspección visual de la estructura tridimensional de la proteína o por ayuda de algoritmos utilizando las coordenadas de los C α dados por rayos X. Estos dominios son aislados normalmente mediante proteólisis limitada o mediante semisíntesis, aunque más recientemente, si se conoce el gen que codifica la proteína, suelen obtenerse a través de métodos genéticos de ADN recombinante, que consisten en la expresión de la secuencia de ADN que codifica al dominio en células bacterianas (Vita y Fontana, 1982; Vita et al., 1984; Musacchio et al., 1994). 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 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 estructuración completa (Jaenicke, 1991). Un mejor conocimiento de esta organización estructural es necesario para racionalizar con éxito la caracterización de la estabilidad de proteínas.

En esta Memoria, se ha afrontado el estudio por DSC, bajo una serie de condiciones experimentales, de dos sistemas que constituyen dominios estructurales de proteínas mayores. El primer sistema, el fragmento C-terminal de termolisina 205-316 (TLN 205-316), como su propio nombre indica, es un fragmento aislado mediante autólisis del extremo carboxílico terminal de la proteína termolisina correspondiente a los restos 205-316. El segundo sistema lo constituyen los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 que forman parte de las tirosina quinasas con el mismo nombre y que han sido expresados en células de *E. coli*. Los dos sistemas constituyen dominios o subdominios estructurales de especies mayores. Esto hace interesante en principio su estudio por DSC, enmarcado en el análisis del plegamiento y la estabilidad de dominios estructurales. Otro de los sistemas estudiados es la proteína β -Lactoglobulina B, como sistema de referencia de una proteína globular de pequeño tamaño. Mediante el

estudio por DSC de estos sistemas podremos estudiar su desplegamiento térmico, caracterizar su energética y comprobar la creencia actual de que proteínas o dominios pequeños despliegan según un modelo de equilibrio de dos estados.

La función biológica de la gran mayoría de las proteínas depende de su interacción con otras moléculas. Las proteínas pueden unirse firme y específicamente a otras proteínas, generando grandes complejos; a ácidos nucleicos, especialmente cuando controlan su replicación y expresión; a polisacáridos, especialmente a aquellos que se encuentran en la superficie de las membranas; y a lípidos, cuando son incorporadas dentro de las membranas. Cada aspecto de la estructura, crecimiento, y replicación de un organismo depende de tales interacciones. Por lo tanto, el estudio de las interacciones de las proteínas con otras macromoléculas es de gran interés. En este sentido y con objeto de intentar contribuir al conocimiento todavía muy limitado de las interacciones proteína-proteína, se ha llevado a cabo en esta Memoria el estudio mediante DSC de la interacción de los dos dominios SH3 citados anteriormente, con péptidos que constituyen las secuencias diana en la interacción de estos dominios con otras proteínas, como modelo de estudio de dicha interacción y reconocimiento intermolecular.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1. β -LACTOGLOBULINA

2.1.1 Introducción

La β -Lactoglobulina (β -Lg) es una proteína presente en la leche de muchos mamíferos entre los que se incluyen las especies bovina y ovina, ciervos, caballos, perros, cerdos, delfines, etc. (Pervaiz, 1985). Es la proteína presente en mayor proporción en la leche de vaca, donde se encuentra en cantidades de 2 a 3 g/l. Su posible presencia en la leche humana ha sido muy discutida. Así, Liberatori y colaboradores (1979) llevaron a cabo experimentos de reacción antígeno-anticuerpo con sueros de conejo concluyendo que esta proteína se encuentra presente en la leche humana. En la misma línea apuntan otros trabajos como el realizado por Brignon y colaboradores (1985). Sin embargo existen otros autores que niegan la existencia de la proteína en la leche humana, como es el caso de Bell and McKenzie(1964).

Los estudios realizados sobre la proteína después de que ésta fuera aislada por Palmer en 1934, fueron muy confusos debido a las grandes heterogeneidades existentes en las muestras. Aschaffenburg y Drewry (1955) descubrieron la principal causa de esta heterogeneidad, encontrando que esta proteína tiene dos variantes genéticas con diferentes movilidades electroforéticas a pH 8.6. Estos autores nombran a estas dos variantes como β_1 y β_2 -Lg, siguiendo la nomenclatura propuesta por Polis y colaboradores (1950), y más tarde denominaron las variantes genéticas como β -Lg A (en vez de β_1) y β -Lg B (en vez de β_2), para hacerla más acorde con su anotación genética.

En 1962 Bell observó que ciertas vacas de la especie Jersey producen leche que tiene una variante genética diferente de la A y la B. Bell (1962, 1963, 1964, 1966) designa este tercer tipo como β -Lg C. Cada uno de los tipos de variantes genéticas se pueden presentar tanto solas como juntas en las seis posibles combinaciones que se pueden dar. Cuando dos de las variantes se encuentran presentes en la leche, normalmente lo hacen en igual concentración. En general las variantes genéticas mayoritarias son las variantes A y B.

β -Lactoglobulina B

La función de esta proteína es todavía incierta, aunque la similitud de su estructura con la de las proteínas del plasma que unen retinol (vitamina A) y la identificación de un posible sitio de unión de éste a la proteína, indican una posible función como transportadora de vitamina A desde la madre al neonato (Papiz et al., 1986).

A pH fisiológico y a temperatura ambiente la β -Lg existe como dímero, con subunidades idénticas de peso molecular 18500 daltons, cada una correspondiéndose con una cadena polipeptídica de 162 aminoácidos (Green et al., 1979). Es una proteína notablemente resistente a valores ácidos de pH, siendo el tratamiento con HCl hasta pH 2 parte de un procedimiento de obtención y purificación ampliamente usado (Aschaffenburg y Drewry, 1957); mientras que se desnaturaliza irreversiblemente a pH básico (Wausbluth y Grieger, 1974; Frushor y Koenig, 1975).

2.1.2. Estructura

Son muchos los autores que han dilucidado la composición de aminoácidos de las variantes genéticas. Piez y colaboradores (1961) y Gordon y colaboradores (1961), estudiaron la composición de aminoácidos de las variantes A y B de vaca. Otros autores (Bell et al., 1966; McKenzie, 1965; Bell y McKenzie, 1964) han estudiado también la composición de las variantes genéticas de diferentes especies. El 51.8% son aminoácidos apolares, 32.1% aminoácidos polares no cargados y 28.4% aminoácidos polares cargados. Las diferencias que existen entre las tres variantes son las siguientes: la variante genética A se diferencia de la B en dos restos de aminoácidos, teniendo la variante A un aspártico y una valina en las posiciones 64 y 118 respectivamente, mientras que la B posee en estas posiciones una glicina y una alanina; mientras que la variante C difiere de la B en una histidina en vez de un glutámico en la posición 68 (Bell et al., 1981).

La estructura secundaria esta formada sólo por una hélice α (formada por los aminoácidos del 130 al 140) y un corazón de estructuras β antiparalelas formadas por 9 hebras que dan lugar a una forma de cáliz como se observa en la Figura 2.1-1 (Papiz et al.,

β -Lactoglobulina B

1986). Asimismo, en la Figura 2.1-2 se muestra la estructura tridimensional de la proteína en forma de cinta realizada mediante un programa de modelación molecular Insight II en un ordenador Silicon Graphics utilizando para ello las coordenadas tridimensionales de la proteína cedidas gentilmente por el Dr. Sawyer. La estructura beta cercana al carboxilo terminal, constituida por los aminoácidos 145 al 150, parece estar implicada en las interacciones que dan lugar a la formación de dímeros (Papiz et al., 1986).

El monómero presenta dos puentes disulfuro entre las posiciones 119 con 106 y 66 con 160. Asimismo existe una cisteína con su grupo sulfhidrilo libre en la posición 121, cercana a uno de los puentes disulfuro, y dado que la distancia entre los átomos de azufre es de 10.5 Å, cualquier intercambio sólo sería posible con una flexibilidad conformacional importante. Uno de los puentes disulfuro está en contacto con el medio externo, mientras que el otro está en el interior de la molécula junto a la cisteína libre, como se observa en la Figura 2.1-1.

De los dos triptófanos presentes en la molécula, el correspondiente a la posición 61 se encuentra expuesto al medio y el de la posición 19 está en el interior de la molécula.

2.1.3. Estudios de asociación

La β -Lg es una proteína que puede sufrir procesos de asociación-disociación dependiendo del pH, fuerza iónica y temperatura. Para entender su comportamiento en este sentido es necesario conocer algo de su curva de valoración. La curva completa de valoración para esta proteína fue determinada por primera vez por Cannan (1942). Más tarde Nozaki y colaboradores (1959) redeterminaron la curva para la mezcla de variantes genéticas, y Tanford y Nozaki (1959) determinaron la curva de valoración para ambas variantes genéticas procedentes de leche de vaca.

Tanford y colaboradores mostraron que el punto isoeléctrico de β -Lg A y B en agua pura era de 5.35 y 5.45 respectivamente y que decrecía cuando se le añadía cloruro de

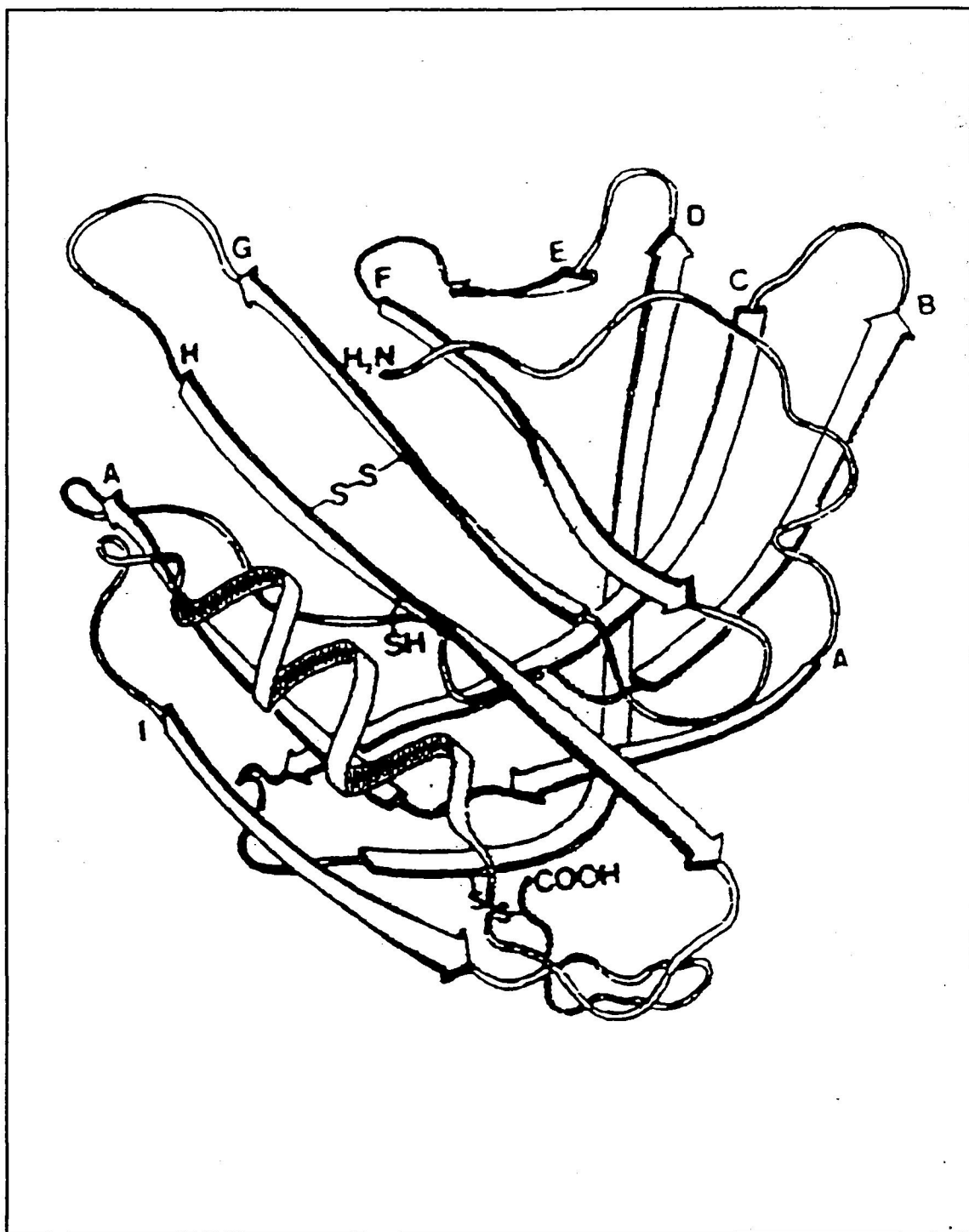


Figura 2.1-1: Estructura de β -Lactoglobulina en donde se muestran las posiciones de los puentes disulfuros y el grupo SH libre, así como la disposición de cada una de las estructuras secundarias (tomado de Papiz et al., 1986)

β -Lactoglobulina B

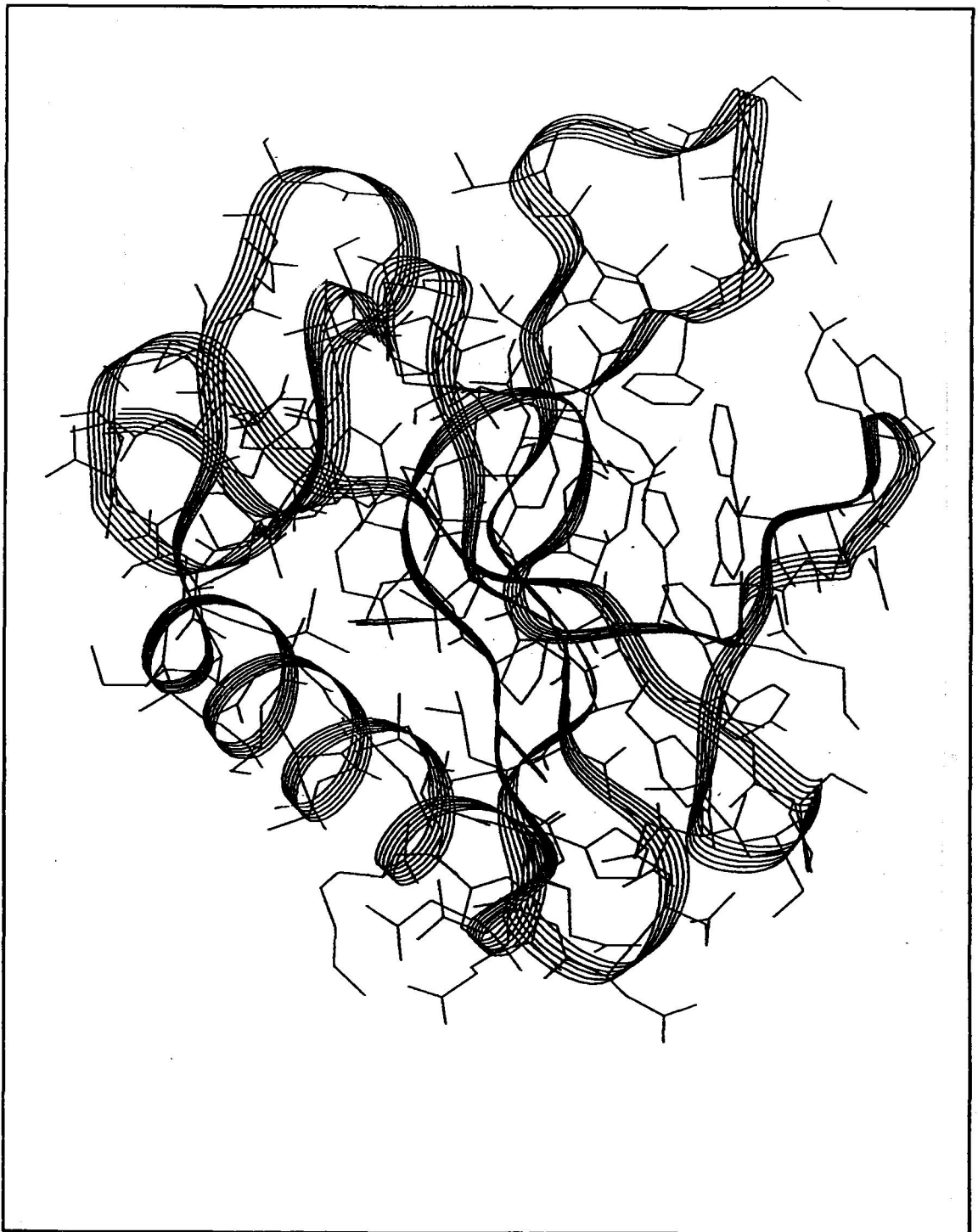


Figura 2.1-2: Estructura tridimensional de β -Lg en forma de cinta (ver texto).

β -Lactoglobulina B

potasio o de calcio. La curva de valoración era reversible entre el punto ácido final y pH 9.7, incluyendo los cambios conformacionales que ocurrían a pH 7.5. El comportamiento más significativo obtenido del análisis de la curva es que la proteína nativa parece contener seis grupos imidazoles por dímero de proteína comparado con los cuatro que presenta la molécula en estado monomérico. Por otra parte, sólo son valorados 2 grupos carboxilo de los cuatro que presenta la proteína, por lo que es evidente que dos de los grupos carboxilo que presenta la proteína nativa son valorados con un pK característico de los grupos imidazol. Este efecto es común para ambas variantes genéticas A y B, por lo que los dos grupos carboxílicos extras que presenta la variante A, no son los responsables de este comportamiento.

Las distintas variantes de β -Lg presentan una gran variedad de estados de agregación como ya indicamos anteriormente. A continuación se citan los estudios realizados a los diferentes intervalos de pH:

a) **pH 1.8 a 3.5:** Townend y Timasheff (1957) fueron los primeros en apuntar la disociación de mezclas de β -Lactoglobulinas bovinas. Posteriormente Townend (1960) midió la constante de disociación por difusión de luz, y Timasheff y Townend (1961a) estudiaron la disociación de las dos variantes genéticas A y B.

Timasheff y colaboradores observaron que los coeficientes de sedimentación para la mezcla β -Lg y para las dos variantes genéticas β -Lg A y B decrecían conforme disminuía el pH desde 6 a 1.8. También encontraron que la viscosidad intrínseca permanecía constante en este intervalo de pH. Por tanto esto indicaba que la disociación era mayor conforme se acidificaba el pH. Medidas de pesos moleculares promedio por el método de sedimentación de Archibald y difusión de la luz apoyan esta hipótesis. El pico simple que aparece en medidas de velocidad de sedimentación y el efecto de la concentración sobre el coeficiente de sedimentación indican que el equilibrio monómero-dímero es rápido.

En general, tanto para la β -Lg A y la β -Lg B, que son las variantes genéticas más estudiadas, se comprueba que a pH ácido el dímero tiende a monomerizar tanto más cuanto

β -Lactoglobulina B

menor es el pH, menor es la fuerza iónica y más elevada es la temperatura. Así, Timasheff y colaboradores (1964) concluyen, por estudios de Dispersión Óptica Rotatoria sobre el efecto de pH en las variantes A, B y C, que a baja fuerza iónica ($I=0.01M$), $pH=2.7$ y $25^{\circ}C$, la proteína está esencialmente disociada en monómeros. Posteriormente Viser y colaboradores (1972) estudiaron la variación de K_d con la temperatura en el intervalo $5-35.5^{\circ}C$ para la β -Lg B a $pH 2.64$, $I=0.16M$, y encuentran también que la disociación es endotérmica, obteniendo a $25^{\circ}C$ los siguientes valores : $K_d=5.2 \cdot 10^{-5} M$; $\Delta H^{\circ}=10.4$ kcal/mol.

b) **pH 3.7 a 5.2:** Ogston y Tilley (1955) observaron que la β -Lg se asocia reversiblemente en la región de $pH 3.5$ a 5.2 , siendo máxima la asociación entre $pH 4.40$ y 4.65 . Townend y colaboradores (1960) investigaron esta asociación mediante ultracentrifugación y electroforesis, encontrando que la agregación era máxima a $pH 4.40$ y 4.65 para descender a $pH 4.70$ y dependía fuertemente de la temperatura. A $pH 4.65$ y $25^{\circ}C$ no existe prácticamente asociación mientras que ésta es máxima a $0^{\circ}C$.

Para determinar la estequiometría de la reacción estos mismos autores (Townend y Timasheff, 1960) llevaron a cabo experimentos de difusión de la luz. Determinaron que el proceso de asociación es rápido alcanzándose el equilibrio en los dos primeros minutos y que la estequiometría es un equilibrio monómero-tetrámero, calculando las constantes de asociación a diferentes temperaturas (Kumosinski y Timasheff, 1966).

En estos estudios observaron diferente comportamiento entre las dos variantes genéticas, pues la variante β -Lg A se asocia formando tetrámeros y la β -Lg B no puede formar agregados mayores del dímero, si bien en presencia de la variante A es capaz de agregar dando lugar a tetrámeros. Además, mientras que la β -Lg A se asocia un 90%, sólo un 30% de la B puede tetramerizar en presencia de la A formando tetrámeros mixtos. Sin embargo, Adams y Lewis (1968) proponen un modelo de asociación indefinida para la β -Lg A a $pH 4.3$, $I=0.2$, frente al modelo monómero-dímero-tetrámero de Timasheff y

β -Lactoglobulina B

colaboradores.

La dependencia de la agregación con el pH sugiere que los grupos carboxilo juegan un papel importante en el mecanismo de unión, dado que el pH de máxima agregación se corresponde con el pK de ionización de los mismos (Timasheff y Townend, 1961). Esta hipótesis está apoyada por experimentos realizados con agentes que bloquean los grupos carboxilo que interfieren fuertemente el proceso de agregación (Armstrong y McKenzie, 1964). El mecanismo más probable, es la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos COOH protonados en los residuos de ácido aspártico y glutámico de la superficie de la cadena polipeptídica. Conforme el pH decrece por debajo de su pI, los grupos COO⁻ son protonados y la formación de puentes de hidrógeno es mayor (por ello la asociación es máxima entre pH 4.40 y pH 4.65). Sin embargo, llega un momento que al bajar el pH se producen repulsiones electrostáticas que dan lugar a la disociación, de tal manera que conforme aumenta la fuerza iónica la disociación es menor.

c) **pH 5.4 a 9.2:** Linderstron-Lang y Jacobsen (1940) encontraron que la proteína desnaturizaba rápidamente a pH 8.3 a 0°C. Groves y colaboradores (1951) también estudiaron la reacción por encima de pH 8 y encontraron cambios reversibles e irreversibles los cuales dependían del pH. Macheboenf y Robert (1953) y Calvin (1954) concluyen que los cambios irreversibles son debidos, al menos en parte, a la oxidación del grupo SH presente en cada monómero y ruptura de los puentes disulfuros. Got y colaboradores (1963) obtuvieron evidencia de disociación de la proteína a pH 7 por medidas de pesos moleculares por el método de Archibald. McKenzie y colaboradores (1972) comprobaron que la agregación de la proteína en medio alcalino se debía en parte a la oxidación de grupos -SH y reacciones de intercambio tiol/disulfuro. La presencia de reactivos específicos de grupos -SH entre pH 6 y 8 conduce a la disociación a monómeros. Estos reactivos reaccionan muy lentamente con los -SH a pH ácido. Estudios de infrarrojo en transformada de Fourier (FTIR) (Casal et al., 1988) mostraron que la desnaturización alcalina ocurre en dos etapas, de pH 8 a 11 y de pH 11 a 13, existiendo aún estructura secundaria remanente a este último pH.

β-Lactoglobulina B

Por lo tanto, por encima de pH 5.4 existen una serie de asociaciones-disociaciones hasta pH 8.3, por encima del cual existen cambios conformacionales y, finalmente, desnaturalización alcalina de la proteína. En general, la presencia de alcoholes (metanol, glicol, glicerina) facilita la disociación (monomerización) de la proteína (Kientz y Bigetow, 1966; Casal et al., 1988).

2.1.4. Estabilidad

Son abundantes los estudios sobre la estabilidad térmica de la proteína a diferentes pHs y mediante técnicas diferentes. Gouch y Jennes (1962) estudiaron la desnaturalización térmica de esta proteína a pH 6.7 y $I=0.1M$, por medidas de solubilidad a pH 5, reactividad de los grupos sulfhidrilos y rotación óptica específica, encontrando por los tres métodos que ésta era un proceso irreversible y que las variantes genéticas se comportaban de forma diferente, siendo la desnaturalización de la variante genética B más rápida que la A.

Estudios llevados a cabo por Dupont (1965) a pH 6.85 por medidas de Dispersión Óptica Rotatoria, mostraron también la existencia de dos etapas en el proceso de desnaturalización. Una primera etapa muy rápida y una segunda etapa más lenta que da lugar a agregación de la proteína. También vieron que la primera etapa es reversible y rápida, mientras que la segunda etapa es irreversible.

Sawyer (1968) llevó a cabo un estudio de la desnaturalización térmica de la proteína a pH 7 mediante electroforesis, velocidad de sedimentación, cromatografía en sephadex y estudios de turbidez, encontrando al igual que los anteriores autores, que el proceso era de dos etapas. La primera etapa está favorecida a temperaturas de $97^{\circ}C$ en la cual se forman agregados debido a la oxidación de los grupos SH o por intercambios de puentes disulfuros, como demuestran los experimentos que llevó a cabo en presencia de β -mercaptoetanol, que impide la formación de dichos agregados. La segunda etapa está favorecida a temperaturas más bajas ($75^{\circ}C$) y da lugar a agregados mayores que en la etapa anterior, formándose éstos a expensas de los productos de la primera reacción en la que no intervienen los puentes

disulfuro.

En 1971 Sawyer y colaboradores (1971) llevaron a cabo un estudio mediante medidas de polarimetría, dispersión óptica rotatoria y dicroísmo circular, estudiando el proceso de desnaturalización y su cinética, concluyendo que la desnaturalización de ambas variantes genéticas a pH 6.6, I=0.1M, incluye al menos dos reacciones consecutivas de primer orden, posiblemente asociadas con un aumento de estructura β y desaparición de hélices α , y etapas de agregación posteriores que dependen del tiempo y de la temperatura. Estos autores también concluyen que la forma B se desnaturaliza más rápidamente que la A.

Existen estudios mediante medidas de fluorescencia del efecto de la temperatura sobre la proteína a pH 6.5 (Mills, 1975), en donde se observa que los dos triptófanos presentes en la molécula de proteína, en el estado nativo, se encuentran en un ambiente hidrofóbico, de tal manera que cuando la temperatura aumenta se produce una exposición de los triptófanos a ambientes polares y, por tanto, accesibles al disolvente. Esta exposición que acompaña al proceso de desnaturalización, también se da en dos etapas: en la primera, por debajo de 70°C, tiene lugar la exposición de uno de los triptófanos y es un proceso reversible; por encima de los 70°C, se da la segunda etapa que esta constituida por un proceso irreversible lento que lleva a la exposición del otro triptófano y en donde, por electroforesis, se ha observado que tiene lugar la formación de agregados por medio de puentes disulfuro.

Existen también estudios realizados mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). En esta línea, De Wit y Swinkels (1980) estudiaron la desnaturalización térmica de la proteína a pH 6.5, proceso irreversible cuya temperatura de desnaturalización dependía de la velocidad de calentamiento siendo su valor extrapolado a velocidad de barrido cero de 70.4 ± 0.5 °C, con una entalpía de 239 ± 15 kJ/mol. Análisis cinéticos de las curvas de DSC muestran que éstas siguen una cinética de primer orden entre las temperaturas de 65 a 72°C con una energía de activación de 343 kJ/mol. Por encima de 70°C la cinética se modifica dando lugar a agregados. Estos autores citan el trabajo de Pantaloni que observó un tiempo muerto de varios minutos entre 70 y 76°C antes del comienzo de la agregación. Estos

β -Lactoglobulina B

resultados los interpretan como debidos a una transición monomolecular previa desde un estado desplegado reversible a uno irreversible. En general, la temperatura de 70°C parece ser crítica para la desnaturalización de la proteína, a pH neutro, por encima de esta temperatura el comportamiento de desnaturalización cambia debido probablemente a procesos de agregación.

Kwan Hwa Park y Lund (1980) realizaron un estudio también por DSC en el intervalo de pH 4 a 9. Por estudios cinéticos encontraron que entre pH 6 y 9 se puede describir la desnaturalización mediante una cinética de segundo orden, mientras que por debajo de pH 5 lo es por una de tercer orden.

Los datos de la bibliografía señalan globalmente un comportamiento complicado de la proteína al desnaturalizarse por efecto de la temperatura en el intervalo de pH cercano a la neutralidad. En principio, parece claro que la desnaturalización tiene lugar en dos etapas, una de ellas reversible y la otra irreversible como consecuencia de la formación de agregados, en los que parecen jugar un cierto papel los puentes disulfuro.

Ananthanarayana y colaboradores (1977) llevaron a cabo un estudio mediante rotación óptica, dicroísmo circular y viscosidad del efecto de la temperatura sobre la proteína a pH 2, I=0.1M. Parece ser que la desnaturalización térmica no conduce a un estado completamente desplegado de la molécula, conservando ésta entre un 15 a un 20% de estructura ordenada que desaparece al añadir cloruro de guanidina, lo que da lugar a una transición cooperativa. La desnaturalización es reversible, sin embargo cuando el tiempo de calentamiento se prolonga, se convierte en irreversible.

La desnaturalización por calor en presencia de etilenglicol provoca una disminución notable de la temperatura de la transición. Así, la adición de un 50% de etilenglicol no causa cambios en el proceso de desnaturalización en sí mismo, es decir, obtenemos el mismo estado desnaturalizado que el observado a altas temperaturas en ausencia de etilenglicol. Sin embargo, la adición de cantidades superiores al 50% origina cambios en la conformación de

la proteína que resulta más ordenada que la molécula nativa.

El análisis de los resultados lo realizaron en base al modelo de equilibrio de dos estados encontrando unos valores para el ΔC_p de 7.4 kJ/K mol para la desnaturalización térmica y de 9 kJ/K mol para la desnaturalización con cloruro de guanidina. El ΔC_p en presencia de cloruro de guanidina es superior ya que con cloruro de guanidina se alcanza un estado completamente desplegado de la proteína, al que no se llega por efecto de la temperatura en donde aún permanece una estructura residual ordenada del 15 al 20%. A 25°C la desnaturalización por cloruro de guanidina se produce con un punto medio (50% de desnaturalizado) para 3.4 M de este agente.

Harwalkar (1980a) realizó un estudio con diversas técnicas, entre las que se incluyó DSC, de la desnaturalización térmica a pH 2.5. Como consecuencia del tratamiento con la temperatura este autor propone que se producen dos especies moleculares, una de ellas indistinguible de la nativa, y la otra resulta irreversiblemente alterada a juzgar por los datos de cambios en solubilidad, disminución del volumen de elución por cromatografía en gel y ausencia de endoterma en DSC. Los datos de electroforesis y de velocidad de sedimentación indican, sin embargo, que la proteína en este estado final no se encuentra agregada.

En un trabajo posterior Harwalkar (1980b) llevó a cabo un estudio de la cinética de desnaturalización en un intervalo de temperaturas de 60 a 130 °C. Por encima de 75°C existe un proceso irreversible con una temperatura de transición de 83 a 84°C, por encima de la cual se llega a un estado completamente desplegado, tanto más cuanto mayor es el tiempo de calentamiento y la temperatura. Los cambios irreversibles que se producen son de naturaleza intramolecular sin asociación intermolecular.

Estudios posteriores (Lapanje y Polkar, 1989) mediante dicroísmo circular y calorimetría, mostraron que la desnaturalización térmica de esta proteína tiene una etapa reversible y una etapa irreversible por encima de los 85°C coincidiendo con lo expuesto anteriormente. Estos autores sin embargo apuntan la existencia de agregación en el estado final. Asimismo indicaron que el estado final alcanzado por el tratamiento térmico no está

β -Lactoglobulina B

totalmente desplegado, manteniendo parte de la estructura plegada. Encontraron que la transición térmica es de dos estados para la β -Lg a pH 2.0 con un ΔC_p de 0.288 J/K·g (5.3 kJ/K·mol), que no depende del pH ni de la temperatura. A partir del valor de ΔH (414 kJ/mol) y T_m (83.2°C) estos autores obtuvieron la variación de ΔG de desnaturalización con la temperatura, utilizando un calorímetro Setaran con concentraciones de muestra en célula de entre 10 a 20 mg/ml.

Una serie de autores han investigado el efecto de diversas sustancias presentes en la leche, incluyendo azúcares como lactosa, o proteínas como k-caseína, en la estabilidad de la β -Lg. Son trabajos más bien cualitativos en los que los calorímetros utilizados no son de alta sensibilidad (vease, por ejemplo, Rüg et al., 1977; Park y Lund, 1980; Schawrz, 1990; Relkin et al., 1992). Por su parte, Kella y Kinsella (1988) encontraron, utilizando espectroscopía diferencial a 293 nm, que la T_m de la β -Lg aumenta al ir de pH 7.5 a 6.5, y de pH 3.0 a 1.5, sin efecto aparente de la fuerza iónica en la T_m . Por otra parte, Brown y colaboradores (1983) indicaron que la secuencia de la β -Lg es análoga a la de las proteínas de membrana, es decir, altamente hidrofóbica (de hecho con un índice de hidrofobicidad intermedio entre el de las proteínas intrínsecas y las periféricas de membrana). Utilizando CD, fluorescencia, RMN y microscopía electrónica, estos autores estudiaron la incorporación de moléculas de β -Lg a vesículas de DPPC, observando a pH 3.7 un incremento en el contenido de hélice α en estos complejos lípido-proteína.

Finalmente, los artículos que merecen un comentario aparte son el de Pace y Tanford (1968) y el de Griko y colaboradores (1992), pues ambos están relacionados con el tema de la desnaturalización por "frío" de la β -Lg. Los primeros autores estudian la desnaturalización a pH 3.0, I=0.15M, de la variante A por urea en el intervalo 5-55°C como un proceso de dos estados. Encuentran así que la constante de desnaturalización aumenta tanto al subir la temperatura como también al bajarla, con un valor mínimo a unos 35°C donde ΔH es cero y con un ΔH menor que cero a bajas temperaturas y mayor que cero a temperaturas elevadas; lo que no hace sino indicar la presencia de dos procesos de desnaturalización, uno a alta temperatura y otro a baja temperatura, hecho que en 1968 no pasaba de ser una especulación.

β -Lactoglobulina B

Estos autores proponen incluso que el ΔC_p cambia de signo por debajo de 10°C , con un valor para ΔC_p a 25°C de $2100 \text{ cal/K}\cdot\text{mol}$. Por medidas de ultracentrifugación encontraron, además, que a pH 3.0 la proteína era una mezcla en equilibrio de monómeros y dímeros y que la presencia de urea lo desplazaba hacia los monómeros. La desnaturalización por urea (o guanidina) resulta ser reversible, aunque, según indican, al aumentar el tiempo en que se tiene la muestra en urea, el proceso se hace irreversible. Es también interesante el que, en presencia de bajas concentraciones de guanidina, la desnaturalización no resulta del tipo dos estados.

Por otra parte, el trabajo de Griko y colaboradores (1992) es similar a una parte de la investigación realizada en esta Memoria, solo que ellos utilizaron únicamente la variante A a pH 2.0, y el efecto de la urea en vez del cloruro de guanidina. Utilizando CDB de alta sensibilidad demostraron la desnaturalización por frío de la proteína y realizaron diversas consideraciones sobre la naturaleza y propiedades termodinámicas de la proteína desnaturalizada. Este artículo, se publicó simultáneamente con un primer artículo nuestro sobre la desnaturalización por frío de la β -Lg B (Azuaga et al., 1992).

2.2 FRAGMENTO 205-316 DE TERMOLISINA.

2.2.1 Introducción

La Termolisina (TLN) es una endopeptidasa de origen bacteriano, concretamente del *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, bacteria que forma parte del grupo de los microorganismos termofílicos. Se conoce su secuencia de aminoácidos (Titani et al., 1972). Tiene un peso molecular de 34600 con una sola cadena polipeptídica y ningún puente disulfuro. La estructura tridimensional de la TLN ha sido determinada por difracción de rayos X a una resolución de 2.3 Å (Figura 2.2-1) (Colman et al., 1972; Matthews et al., 1974). Dicha estructura presenta dos dominios o lóbulos con el sitio activo en la hendidura que queda entre ellos, en donde se encuentra un ión Zn^{2+} , indispensable para su actividad proteolítica. Para una óptima estabilidad, la TLN necesita la presencia de iones Ca^{2+} en el medio, aunque no están implicados directamente en la actividad catalítica de la enzima. Los sitios Ca(1) y Ca(2) están sólo a 3.8 Å entre sí, formando un sitio doble que es completamente cooperativo. 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 y se encuentran unidos al Asp-57 y Asp-200 respectivamente. El papel de estos iones calcio, tanto en la desnaturalización de la enzima como en su autólisis, ha sido ampliamente investigado (Matthews et al., 1972; Matthews et al., 1974; Colman et al., 1972). Probablemente todos los sitios de unión de los iones calcio contribuyen a la alta estabilidad térmica de la enzima. Los estudios de desnaturalización térmica realizados con TLN muestran, para todas las condiciones investigadas, que el proceso es irreversible, 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., 1988).

Dada la peculiar morfología de bilóbulos que presenta la TLN 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

Fragmento termolisina

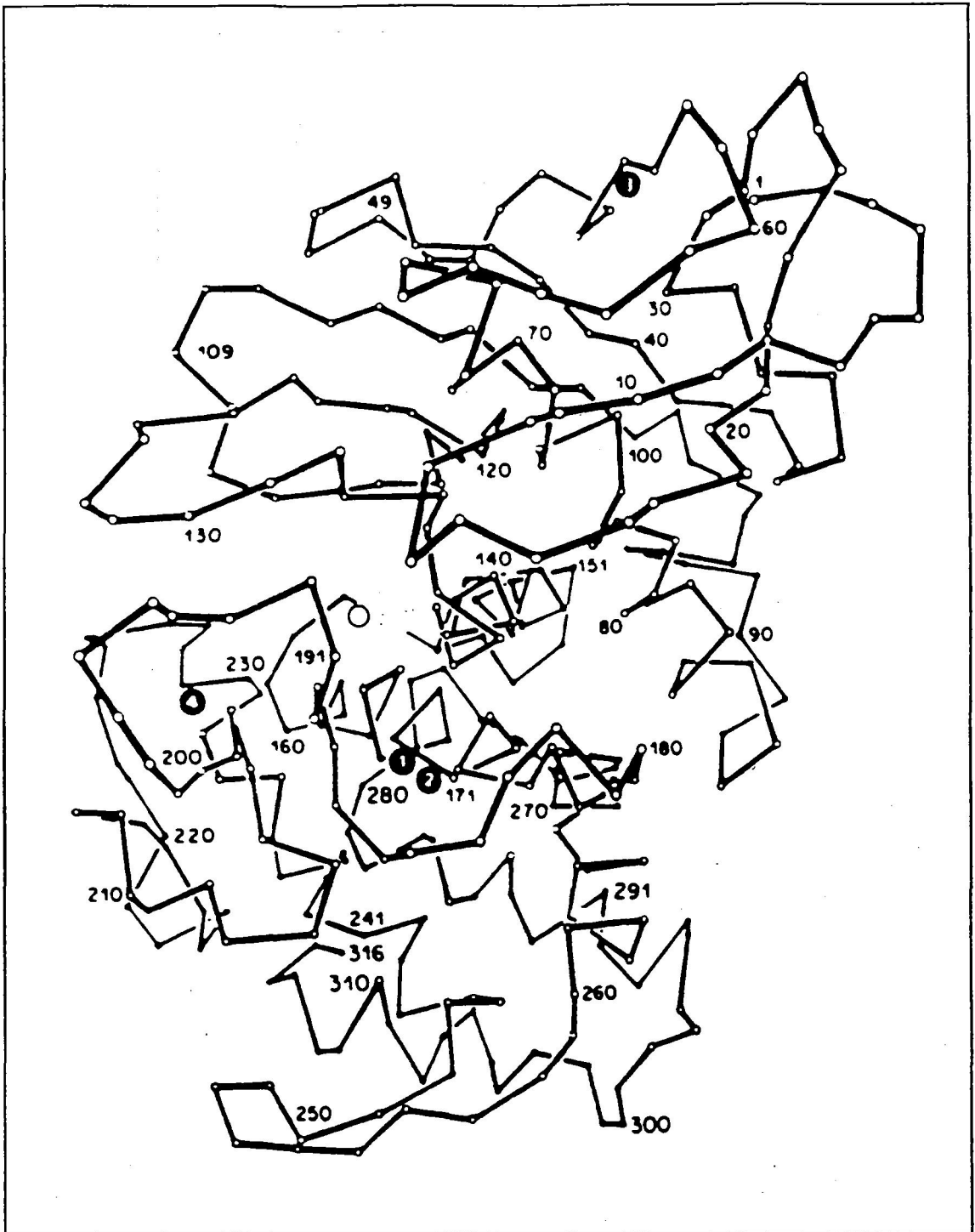


Figura 2.2.1-1: Modelo del esqueleto de la estructura cristalográfica de la TLN. El ion Zn^{2+} (○) y los cuatro iones Ca^{2+} (●) que se unen a la TLN están representados en la estructura. (tomado de Fontana, 1988)

Fragmento termolisina

de dominios de plegamiento (Vita et al., 1979; Vita y Fontana, 1982; Dalzoppo et al., 1985; Vita et al., 1985; Vita et al., 1989). Asimismo, en nuestro Departamento se han realizado estudios de estabilidad térmica (Conejero, 1993; Conejero et al., 1994). Estos dominios se han predicho mediante algoritmos de ordenador utilizando las coordenadas de la estructura tridimensional, obtenidas mediante cristalografía de rayos X y, más recientemente, por medidas de las áreas de superficies de las moléculas (Rashin, 1981; Wodak y Janin, 1981; Rashin, 1984).

Se han aislado una serie de fragmentos (casi todos del extremo C-terminal) que, de acuerdo con su análisis de estructura secundaria mediante 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. Mediante proteólisis 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). Por otro lado la TLN en presencia de EDTA y/o bajas concentraciones de iones calcio sufre autólisis dando lugar a una serie de fragmentos entre los que se encuentra el fragmento TLN 205-316 cuyo desplegamiento térmico a valores de pH ácido ha sido estudiado en esta memoria.

2.2.2 Estudios de plegamiento-desplegamiento.

El fragmento TLN 205-316 tiene un peso molecular de 11978, sólo se diferencia en un aminoácido del TLN 206-316 por lo que sus propiedades deben ser prácticamente idénticas. Su estructura tridimensional en la TLN nativa se corresponde con un motivo estructural llamado "manejo de 4 hélices α " (four α -helix bundle) (Figura 2.2.2-1), muy comúnmente encontrado en otras proteínas (Weber y Salemme, 1980), por lo cual, el estudio de las propiedades del plegamiento-desplegamiento de este fragmento aislado es de gran

Fragmento termolisina

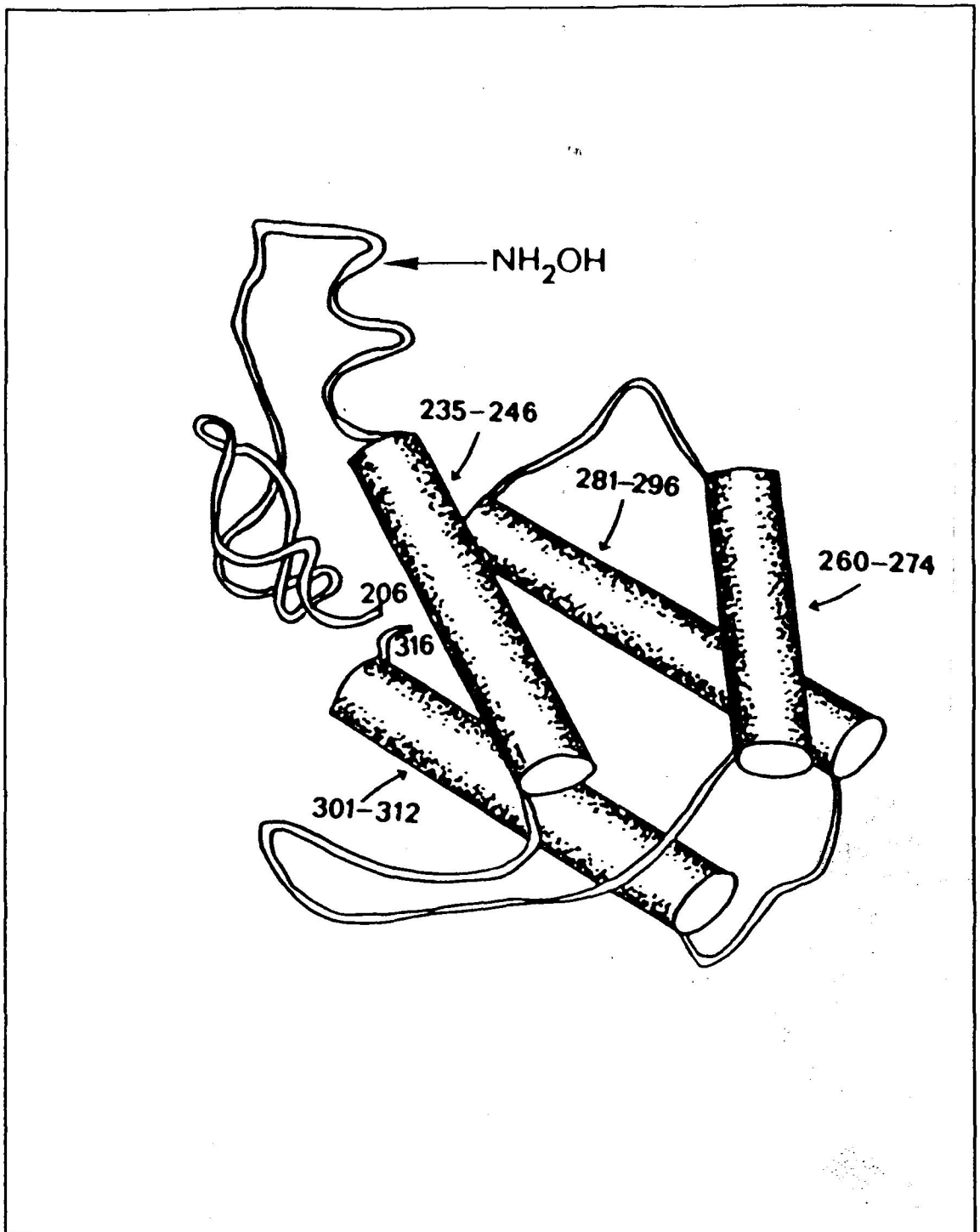


Figura 2.2.2-1: Modelo esquemático del esqueleto de la estructura terciaria que presenta el fragmento TLN 206-316 en TLN nativa. Los números indican los segmentos que forman las 4 hélices presentes, representadas por cilindros (tomado de Vita et al., 1974)

Fragmento termolisina

interés. El desplegamiento del fragmento TLN 206-316 por temperatura y agentes desnaturalizantes se ha estudiado mediante técnicas espectroscópicas (CD y espectrometría UV-visible), encontrándose que es reversible, con una temperatura media de desplegamiento (T_m) de 66 °C (Vita y Fontana, 1982). Para el análisis termodinámico de las transiciones admitieron un proceso de equilibrio de dos estados, mostrando propiedades termodinámicas propias de una proteína globular pequeña. Análisis de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica muestran que el fragmento se comporta como una especie monomérica a todos los valores de pH estudiados (desde pH 2 a 12), si bien, a pH ácido y básico el coeficiente de sedimentación es menor que a pH neutro, lo cual implica una expansión de la conformación. Según los autores, este cambio es debido al incremento de la carga neta a valores de pH extremos produciendo un cambio conformacional (Vita et al., 1989). Este cambio conformacional se ha observado también mediante CD (Dalzoppo et al., 1985), estudiando el efecto del pH sobre la conformación del fragmento, se observó cómo a pH 1.0 el fragmento se encuentra en un estado H (denominado así por los autores) con gran contenido en hélice α estabilizado por puentes salinos y a baja temperatura, el cual se caracteriza por ser "un ensamblaje de hélices α fluctuantes". Conforme aumenta el pH existe una transición con aumento de la elepticidad del fragmento centrada en 2.5, lo cual indica que la transición está inducida por protonación de los grupos carboxilatos de los ácidos aspárticos y glutámicos, los cuales presentan un pK anormalmente bajo como es de esperar al estar implicados en la formación de puentes salinos con residuos de cargas positivas de la cadena. A pH 4.0 se alcanza una conformación similar a la nativa (estado N) correspondiente a pH 8.3. De forma análoga, a pH alcalino existe otra transición inducida por la desprotonación de los grupos básicos, aumenta la elepticidad debido a que los grupos ϵ -amino de las Lys están desprotonados reduciéndose las cargas positivas del fragmento y permitiendo de esta forma a un segmento o giro adquirir una estructura secundaria específica (de hélice). Estos autores consideran que el estado H es un intermedio en el plegamiento del fragmento, ya que este estado se caracteriza por tener un alto contenido en estructura secundaria y bajo o ningún contenido en terciaria, lo cual se traduce en una estructura flexible y dinámica.

Concretamente, con el fragmento 205-316 se han realizado estudios de DSC a pH

Fragmento termolisina

neutro (Conejero, 1993). El desplegamiento a este pH es un tanto especial, ya que presenta una disociación de su estado dimérico, previa a su desplegamiento, cuyo equilibrio es lento a baja temperatura (por debajo de ≈ 50 °C), por lo que para su análisis se utilizó un modelo mixto (cinético y termodinámico) para la descripción de las transiciones. El desplegamiento es reversible y existe un pequeño efecto de la concentración de muestra sobre las transiciones calorimétricas.

2.3 DOMINIOS SH3

2.3.1 Introducción

La comparación de las secuencias de varias tirosinas quinasas, tal como Src, con el producto del oncogen Crk (fosfolipasas C γ , α -spectrina, etc.) llevó a la identificación de unos dominios conservados a los cuales se les denominó "dominios de homología Src" (SH) 2 y 3 (Lento et al., 1988; Mayer et al., 1988; Stahl et al., 1988).

SH2 y SH3 son pequeños dominios de proteínas compuestos de aproximadamente de 100 y 60-85 aminoácidos respectivamente. Se encuentran en una gran variedad de proteínas implicadas en el control de la señalización y arquitectura celular y frecuentemente juntos en la misma proteína. Sin embargo, ciertas proteínas contienen solamente un tipo de dominio, mientras que otras contienen varias copias de ambos. Aún cuando los dominios no son parejas obligadas, en las proteínas señales, los dominios SH3 están siempre acompañados por dominios SH2. La localización de los dominios dentro de una proteína también varía.

Las proteínas que contienen SH2 y SH3 han sido divididas en dos grupos principales. El primer grupo lo constituyen proteínas que contienen diferentes actividades enzimáticas o funciones conocidas. Este grupo incluye enzimas tales como tirosinas quinasas citoplasmáticas (Src, Abl, Syk, Csk), fosfolipasa C γ , Ras-GAP, tirosinas fosfatasas (PTPIC y Syp/PTPID) y p91 componente del factor transcripcional ISGF-3 (Montminy M., 1993). El segundo grupo son proteínas adaptadoras compuestas casi exclusivamente de dominios SH2 y SH3. Los mejores ejemplos de este grupo son c-Crk (un dominio SH2 y dos dominios SH3), Grb2 (un dominio SH2 franqueado por dos dominios SH3) y Nck (un dominio SH2 y tres SH3).

A diferencia del dominio SH2, el dominio SH3 se encuentra también presente en organismos unicelulares como levaduras y amebas. Esto indica que el dominio tiene una larga historia evolutiva y que está implicado en procesos celulares vitales.

Dominios SH3

2.3.2 Función biológica

Aún cuando el papel fisiológico de los dominios SH2 está relativamente bien establecido, como mediadores de la interacción con receptores activados y con proteínas fosforiladas citoplasmáticas por reconocimiento de tirosinas fosforiladas, menos se conoce a cerca de la función biológica de los dominios SH3. La visión actual es que los dominios SH3 funcionan, en parte, como módulos de unión a proteínas, y que están implicados en la unión de las señales transmitidas desde la superficie celular hacia las proteínas efectoras en el interior de las células. La delección de éstos dominios de tirosinas quinasas c-Src o c-Abl conduce a la activación de la capacidad oncogénica, presumiblemente por una pérdida de regulación de su actividad quinasa e interacción con otras proteínas (Hirai et al, 1990; Jackson et al, 1990, Seidel-Dugan et al,1992). Por tanto, se cree que los dominios SH3 de estas tirosinas quinasas citoplasmáticas tienen un papel regulador, mediando las interacciones entre las quinasas y las proteínas con función reguladora. Esta idea es consistente con la identificación de una proteína denominada 3BP-1, que se une *in vitro* a el dominio SH3 de la quinasa citoplasmática c-Abl y que también tiene una región con una secuencia homóloga a el Rho-GAP (Cicchetti et al., 1992). El sitio de unión de 3BP-1 al dominio SH3 es una región de unos 9 a 10 aminoácidos ricos en prolinas (ver apartado 2.3.4). Un estudio reciente muestra que el dominio SH3 de PLC- γ 1 y Grb2 son responsables de la unión intracelular de estas proteínas a los microfilamentos y los rizos de membrana respectivamente (Bar-Sagi et al., 1993). Además, el dominio SH3 de v-Src une a la quinasa PI3, una enzima implicada en la regulación del tráfico de proteínas (Liu et al, 1993). Es por tanto posible que, como los dominios SH2, los dominios SH3 puedan estar implicados en dirigir las proteínas señales a su sitio de acción en la membrana plasmática u otros compartimientos celulares, y al mismo tiempo regulen el movimiento de proteínas dentro de la célula.

2.3.3 Estructura

Las estructuras de varios dominios SH3 han sido determinadas mediante cristalografía de Rayos X y espectroscopía de RMN (Musacchio et al., 1992; Yu et al., 1992; Booker et

Dominios SH3

al., 1993; Nobel et al., 1993, etc.). El plegamiento de los diferentes dominios es prácticamente el mismo, aún cuando la identidad entre las secuencias es baja. Así, la superposición de los carbonos α de los dominios SH3 de espectrina y de Fyn tiene una desviación cuadrática media de 1.1 Å (Noble et al., 1993).

En la Figura 2.3.3-1 se muestra la topología de estos dominios indicándose la nomenclatura de las hebras β y de los tres giros.

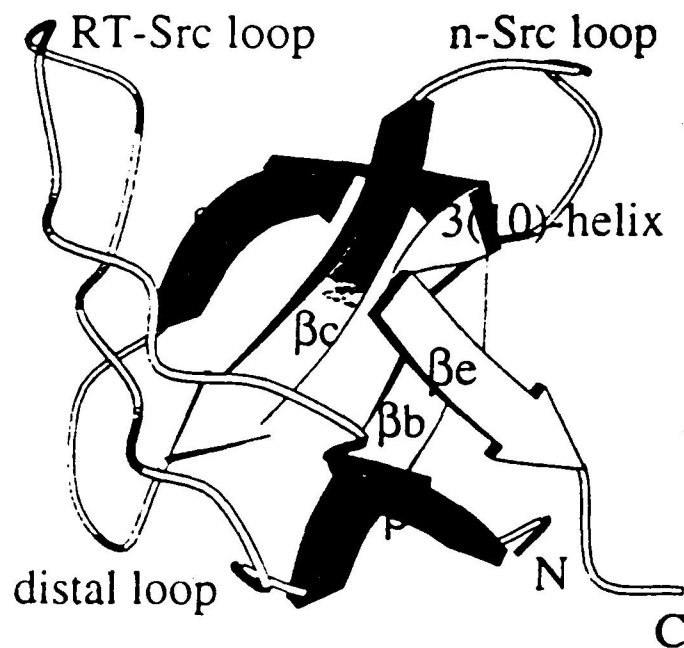


Figura 2.3.3-1: Diagrama en cinta de la estructura de los dominios SH3 (Mussachio et al., 1994b).

Dominios SH3

El plegamiento básico de estos dominios consiste en dos láminas β constituidas por 5 ó 6 hebras β antiparalelas, plegadas una sobre otras. Los dominios tienen una forma globular con un diámetro de unos 30 Å. Los extremos amino y carboxilo terminal se encuentran próximos en el espacio, como es usual en módulos estructuralmente independientes. Esto también es cierto para los dominios SH2 (Overduin et al., 1992; Waksman et al., 1992), y explica la capacidad de estos dominios para insertarse en posiciones variables en un número diferente de proteínas.

La hebra a en espectrina y en Fyn SH3 esta compuesta de 4 aminoácidos (posiciones 3-6), y está conectada con la hebra b (25-26) por un giro largo denominado "RT-loop" (Figura 2.3.3-1). La hebra b en espectrina, Fyn, Src y PLC- γ puede ser dividida en dos mitades b1 y b2 que participan en diferentes láminas β y que se encuentran conectados por el giro denominado "n-Src loop". Las hebras c y d (36-41 y 46-50) están conectadas por un estrecho giro en espectrina, mientras que en los dominios de Fyn y Src existen dos aminoácidos insertados. A esta región se la denomina "distal-loop", denominada de esta manera por ser el más lejano al sitio de unión de los péptidos ricos en prolina (ver sección 2.3.4) a estos dominios. Finalmente una hélice 3_{10} que comienza con el aminoácido conservado Pro 51 (51-54), conecta la hebra d con la hebra e (55-58). En resumen el plegamiento básico de los dominios SH3 es un sandwich β de dos láminas β . La primera lámina está constituida por las hebras a, b1 y e, y la segunda por b2, c y d.

En cuanto a los dominios estudiados en esta tesis Abl-SH3 y Fyn-SH3 sus estructuras han sido determinadas por cristalografía de Rayos X. Para el caso concreto de Fyn (Noble et al., 1993), la unidad cristalográfica asimétrica consiste en dos monómeros que no están relacionados por un eje binario. Estos monómeros corresponden en la secuencia de la proteína Fyn humana a los residuos 84-142.

En la superficie del dominio Fyn-SH3, y al igual que ocurre para los demás, existe una serie de aminoácidos conservados que en su centro contiene cuatro residuos aromáticos con sus cadenas laterales expuestas que en el caso de Fyn son Tyr-91+Tyr-137 (par inferior)

Dominios SH3

y Trp-119+Tyr-132 (par superior). La superficie exterior es un 53% hidrofílica y para espectrina del 54%, calculado a partir de la contribución de los átomos hidrofóbicos (sólo C) y átomos polares (N y O) de la superficie. Dichos valores están en el rango normal para proteínas globulares (Janin et al., 1988; Wierenga et al., 1992).

Los residuos cuyas cadenas laterales se encuentran en el interior, formando parte del corazón hidrofóbico de la molécula de Fyn-SH3, son Ala-89, Phe-103, Phe-109, Ala-122, Ile-133 y Val-138. En espectrina estos residuos son Ala-11, Met-25, Leu-31, Val-44, Val-53 y Val-58. Aparentemente, el volumen del corazón hidrofóbico no está conservado; en Fyn (23 cadenas laterales) es significativamente mayor que en espectrina (18 cadenas laterales). En contraste, los aminoácidos de la superficie de unión son bastantes conservados.

2.3.4 Unión a ligando.

En 1992 se identificaron dos proteínas denominadas 3BP-1 y 3BP-2 que se unían específicamente al dominio SH3 de la tirosina quinasa Abl, mediante la utilización de una librería de expresión cDNA de λ gt11 y una proteína de fusión que contenía Glutathion-S-Transferasa (GST) fusionada con el dominio SH3 de Abl (Cicchetti et al., 1992). La proteína 3BP-1 es similar en su secuencia a la región carboxi-terminal del polipéptido humano Bcr, a la proteína neuronal n-Chimerina y a la proteína de activación guanósina trifosfato de rho (GAP-rho) indicando una posible actividad GAP de 3BP-1. La proteína 3BP-2 no está relacionada con 3BP-1; contiene un dominio SH2 y un dominio pH (plekstrin homology).

Posteriormente, Ren et al. en 1993, identificaron la secuencia de aminoácidos de las proteínas 3BP-1 y 3BP-2 que se unía al dominio SH3 (Ren et al., 1993). Aislaron varios fragmentos de diferente longitud que interaccionaban con los dominios, bajando su afinidad conforme disminuía la longitud del mismo. El fragmento mas pequeño que unía a los dominios SH3 es de unos 10 residuos con una secuencia rica en prolinas (P). Mutaciones en dicho fragmento llevaron a la determinación de una secuencia general: XPXXPPP Ψ XP,

Dominios SH3

donde X representa cualquier aminoácido, Ψ es un aminoácido hidrofóbico. Asimismo, establecieron que las prolinas en las posiciones 2, 7 y 10 parecen ser cruciales para la afinidad de la unión, siendo las demás posiciones menos importantes.

Aunque los dominios SH3 en cuanto a su secuencia son muy diversos, en todos ellos el sitio de unión se encuentra en una zona de la superficie molecular rico en aminoácidos aromáticos, dando lugar a una región hidrofóbica muy conservada (Booker et al., 1993; Yu et al., 1994). El corazón de esta superficie hidrofóbica está constituida por los aminoácidos en las posiciones 8, 36, 49, 54, así como la Pro-51 y rodeados por los giros n-Src y RT (Musacchio et al., 1994a). En espectrina el residuo 49 es Phe mientras que en Src y Fyn es Tyr y en el caso de PI3K un Asp. La diversidad en esta posición podría ser importante en la modulación de la afinidad de unión de los dominios SH3 a sus respectivos substratos. Los aminoácidos carboxílicos en las posiciones 9, 17 y 24, y las Gly en las posiciones 23 y 48 forman también parte de la superficie de unión. La modulación de la especificidad de la unión podría venir determinada por las interacciones de los residuos de los péptidos ricos en prolinas con las cadenas laterales de los aminoácidos de los giros n-Src y RT del dominio SH3.

Se ha determinado la conformación de varios de los péptidos ricos en prolinas que se unen a los dominios, mediante Rayos X (Musacchio et al., 1994b) y por Dicroísmo Circular (Vigera et al., 1994). Los péptidos ricos en prolinas en disolución acuosa se encuentran en una conformación de hélice poliprolina II (PPII) caracterizada por los siguientes ángulos: $w=180^\circ$, $\phi=-78^\circ$ y $\Psi=149^\circ$ y por tener tres aminoácidos por vuelta. De tal forma que los aminoácidos i e $i+3$ se encuentran en la misma cara de la hélice y separados por unos 6.5 Å. Dos de los residuos críticos para la unión en el dominio SH3, el Trp-36 y la Tyr-54 son aproximadamente coplanares con una distancia interplanar similar. Tanto la identidad como la disposición de estos residuos en los dominios es muy conservada. Por lo tanto, los dominios SH3 presentan en su superficie unas crestas paralelas que se oponen a las crestas de la cara de la hélice PPII. Un posible mecanismo de reconocimiento entre los dominios y los péptidos ricos en prolinas consistiría en las dos superficies moleculares empaquetadas

Dominios SH3

juntas, como una máquina de engranaje con sus dientes intercalados (Lim y Richards, 1994).

Musacchio et al. (1994b) han determinado la estructura cristalográfica de los dominios Abl-SH3 Y Fyn-SH3 con dos péptidos 3BP-1 (de secuencia APTMPPPLPP) y 3BP-2 (PPAYPPPPVP). Los péptidos unidos a estos dominios presentan los dos primeros aminoácidos en conformación extendida, en el tercero se produce un giro haciendo que los siguientes (del cuarto al décimo) se encuentren en conformación de hélice PPII con tres residuos por vuelta. En la primera vuelta de la hélice, los anillos de Pro-6 y Pro-7 se intercalan en un bolsillo formado por las cadenas laterales de Trp-41, Pro-56, Tyr-59 y Phe-13. En la segunda vuelta las cadenas laterales de Pro-9 (Val-9 para el caso del ligando 3BP-2) y Pro-10 se enfrentan a las cadenas laterales de Tyr-11 y Tyr-59. Las cadenas laterales de Pro-5 y Leu-8 (Pro-8 en 3BP-2) están orientadas hacia el solvente. La flexión del péptido en la posición tercera, conduce a un completo enterramiento del Trp-41, y el ligero empaquetamiento de la Pro-2 en el bolsillo formado por Trp-41 y Trp-54 (Tyr-54 en Fyn-SH3). Dos puentes de hidrógeno se encuentran presentes entre el oxígeno carbonilo de las cadenas principales de Met-4 (Tyr-4 en 3BP-2) y Pro-7 y el nitrógeno indólico de la cadena lateral del Trp-41 y el nitrógeno amino de la cadena lateral de Asn-58, respectivamente. En la Figura 2.3.4-1 se ha representado la superposición de ambos péptidos y los residuos de aminoácidos de ambos dominios con los que interaccionan, en la figura 2.3.4-2 se observa la disposición de los péptidos en su unión a cada uno de los dominios.

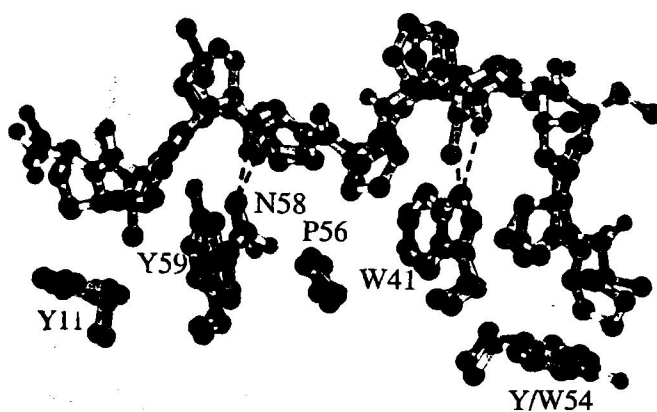


Figura 2.3.4-1 Superposición de los péptidos 3BP-1 y 3BP-2 y los residuos de aminoácidos del los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 con los que interaccionan.

Dominios SH3

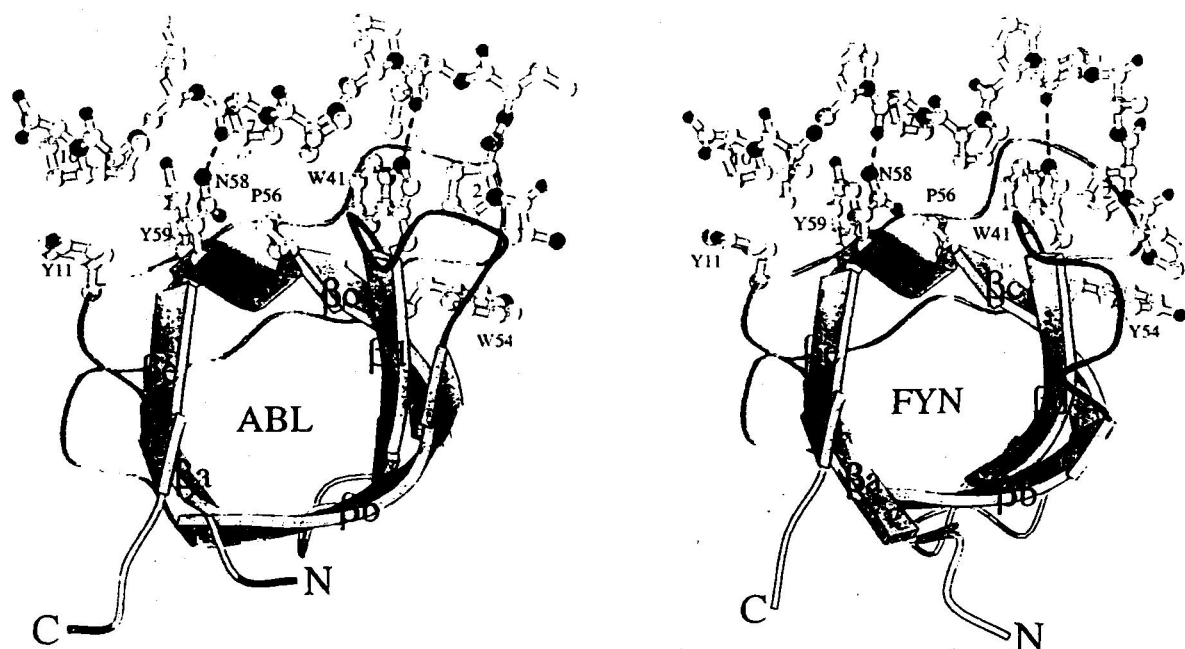


Figura 2.3.4-2: A, interacción del péptido 3BP-1 con el dominio Abl-SH3. B, interacción del péptido 3BP-2 con el dominio Fyn-SH3. El código de colores empleado es: gris para los átomos de carbono, rojo para los oxígenos, azul para los nitrógenos.

La complementariedad geométrica determina la unión del dominio SH3 a péptidos ricos en prolinas. Abl y Fyn-SH3 tienen tres sitios mayoritarios de contacto con el ligando. Dos de ellos enfrentados a la hélice PPII y unen con el mismo espaciado y orientados que los residuos de los péptidos en las posiciones i e $i+1$, e $i+3$ e $i+4$, que en el caso de 3BP-1 corresponde a las posiciones 6-7 y 9-10. El tercer sitio es un bolsillo formado por las cadenas laterales de Trp-41 y Tyr-54. Este sitio no está alineado con los otros, dando lugar a un rizo del ligando en la tercera posición. El área de superficie que es enterrada por el péptido en el caso de Abl-SH3 es de 466 \AA^2 y para Fyn-SH3 de 436 \AA^2 .

Las constantes de disociación de varios péptidos ricos en prolinas han sido determinadas por fluorescencia, en su interacción a diferentes dominios SH3 (Viguera et al.,

Dominios SH3

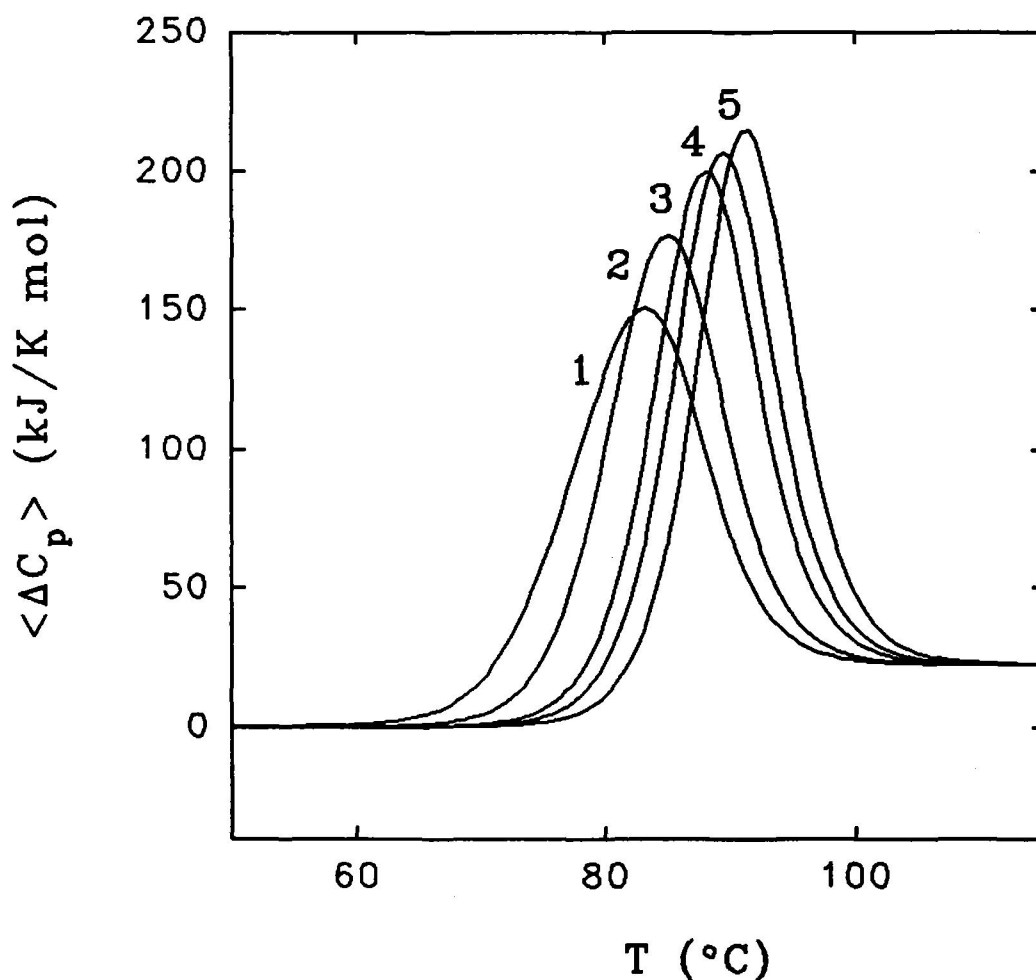
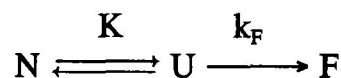


Figura 4.3-1: Perfiles simulados de capacidad calorífica para una proteína que desnaturaliza según el modelo de dos estados en presencia de diferentes concentraciones de ligando: (1) 0 mM; (2) 1 mM; (3) 3 mM; (4) 5 mM ; (5) 10mM. Los parámetros de desplegamiento de la proteína son $\Delta H = 300$ kJ/mol, $\Delta C_p = 4$ kJ/K mol y $T_m = 72$ °C. Para la interacción se han considerado unos valores de 10^5 para la constante de disociación, 40 kJ/mol para la entalpía de la interacción y $\Delta C_{p,d} = 0.5$ kJ/K mol.

4.4 Modelo de Lumry y Eyring.

La mayoría de las 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 no deseados que alteran el estado desplegado de la proteína, tales como agregación, autólisis, deamidación, rotura o formación incorrecta de puentes disulfuro etc. (Zale y Klivanov 1986; Klivanov y Ahern, 1987; Volkin y Klivanov, 1989).

La forma más sencilla de desplegamiento irreversible de proteínas puede ser representada mediante el **modelo de Lumry y Eyring** (Lumry y Eyring, 1954)



donde F es un estado final alcanzado irreversiblemente desde el estado desplegado, U. El equilibrio químico entre N y U 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 . Tanto la constante de equilibrio, como la constante de velocidad de primer orden, dependen de la temperatura. La dependencia de K viene dada por la ecuación van't Hoff, en la que consideramos que la entalpía de desplegamiento, ΔH , es constante, es decir, $\Delta C_p = 0$:

$$K = \frac{[U]}{[N]} = \exp \left[\frac{-\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{1/2}} \right) \right] \quad (4.33)$$

donde $T_{1/2}$ es la temperatura a la que $K=1$. La constante de velocidad, cambia con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius,

$$k_F (\text{min}^{-1}) = \exp \left[\frac{-E}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*} \right) \right] \quad (4.34)$$

donde E es la energía de activación y T^* es la temperatura a la que $k_F=1 \text{ min}^{-1}$ (el factor de frecuencia es igual a $\exp(E/RT^*)$).

La ecuación de velocidad de formación del estado F es:

$$\frac{d[F]}{dt} = k_F [U] \quad (4.35)$$

Si dividimos ambos términos de la ecuación anterior por la concentración de proteína total ($[N] + [U] + [F]$) tenemos que

$$\frac{dX_F}{dt} = k_F X_U \quad (4.36)$$

donde X_U y X_F son las fracciones molares de los estados plegado y final, respectivamente. La constante de equilibrio en función de las fracciones molares viene dada por $K = X_U/X_N$ (donde X_N es la fracción molar del estado nativo), por lo que $X_U = (X_N + X_U) K / (1 + K) = (1 - X_F) K / (1 + K)$, ya que $X_N + X_U + X_F = 1$. La ecuación 4.4-4 puede escribirse como:

$$\frac{dX_F}{dt} = \frac{k_F K}{(1+K)} (1-X_F) \quad (4.37)$$

Esta ecuación muestra que, a temperatura constante, X_F varía con el tiempo siguiendo una cinética de primer orden con una constante de velocidad aparente igual a $k_F K / (1+K)$. En un experimento de calorimetría diferencial de barrido, tanto el tiempo como la temperatura varían simultáneamente según una velocidad de barrido constante ($v = dT/dt$). En este caso, la ecuación diferencial anterior se convierte en:

$$\frac{dX_F}{dT} = \frac{1}{v} \frac{k_F K}{(1+K)} (1-X_F) \quad (4.38)$$

Separando variables e integrando desde una temperatura suficientemente baja, T_0 (a la que la velocidad de reacción es prácticamente cero y $X_F = 0$), hasta una temperatura T , obtenemos:

$$X_F = 1 - \exp \left[-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{k_F K}{(1+K)} dT \right] \quad (4.39)$$

Teniendo en cuenta que $K = X_U/X_N$, y que $X_U = (1-X_F) K/(1+K)$, las fracciones molares de los estados desplegado y nativo vendrán dadas por las siguiente ecuaciones:

$$X_U = \frac{K}{(1+K)} \exp \left[-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{k_F K}{(1+K)} dT \right] \quad (4.40)$$

$$X_N = \frac{1}{(1+K)} \exp \left[-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{k_F K}{(1+K)} dT \right] \quad (4.41)$$

Las ecuaciones 4.4-7, 4.4-8 y 4.4-9 proporcionan la dependencia de X_N , X_U y X_F con la temperatura, para un experimento realizado a una velocidad de barrido, v . La entalpía de exceso, $\langle \Delta H \rangle$, que es un promedio sobre todos los estados presentes, viene dada por:

$$\langle \Delta H \rangle = X_U \Delta H_U + X_F \Delta H_F \quad (4.42)$$

donde ΔH_U y ΔH_F son, respectivamente, las entalpías de los estados U y F (tomando el estado N como referencia). Si consideramos que el efecto térmico de la etapa irreversible es nulo, $\Delta H_U = \Delta H_F$ y ambas son iguales a la entalpía total de la transición calorimétrica, ΔH . La ecuación 4.4-10 puede reescribirse como :

$$\langle \Delta H \rangle = -\Delta H (X_U + X_F) = \Delta H (1 - X_N) \quad (4.43)$$

y la capacidad calorífica de exceso, $\langle \Delta C_p^{ex} \rangle$, teniendo en cuenta que hemos supuesto ΔH constante, vendrá dada por:

$$\langle \Delta C_p^{ex} \rangle = - \Delta H \frac{dX_N}{dT} \quad (4.44)$$

Finalmente podemos obtener dX_N/dT de la ecuación 4.4-9, y sustituyendo en la ecuación 4.4-12 tenemos que:

$$\langle \Delta C_p^{ex} \rangle = \frac{K \Delta H}{(1+K)^2} \left[\frac{k_F}{V} + \frac{\Delta H}{R T^2} \right] \exp \left[- \frac{1}{V} \int_{T_0}^T \frac{k_F K}{(1+K)} dT \right] \quad (4.45)$$

La ecuación 4.4-13 puede utilizarse para simular trazas de DSC para unos valores dados de los parámetros ΔH , $T_{1/2}$, E , T^* y v . Los resultados que se obtienen dependen de los valores elegidos para los parámetros; se proponen tres situaciones a considerar dependiendo de la velocidad del proceso irreversible que genera el estado F (Figura 4.4-1):

Situación A: El proceso irreversible sólo ocurre de manera suficientemente rápida a temperatura **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 considera calorimétricamente irreversible. Sin embargo, los datos correspondientes 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).

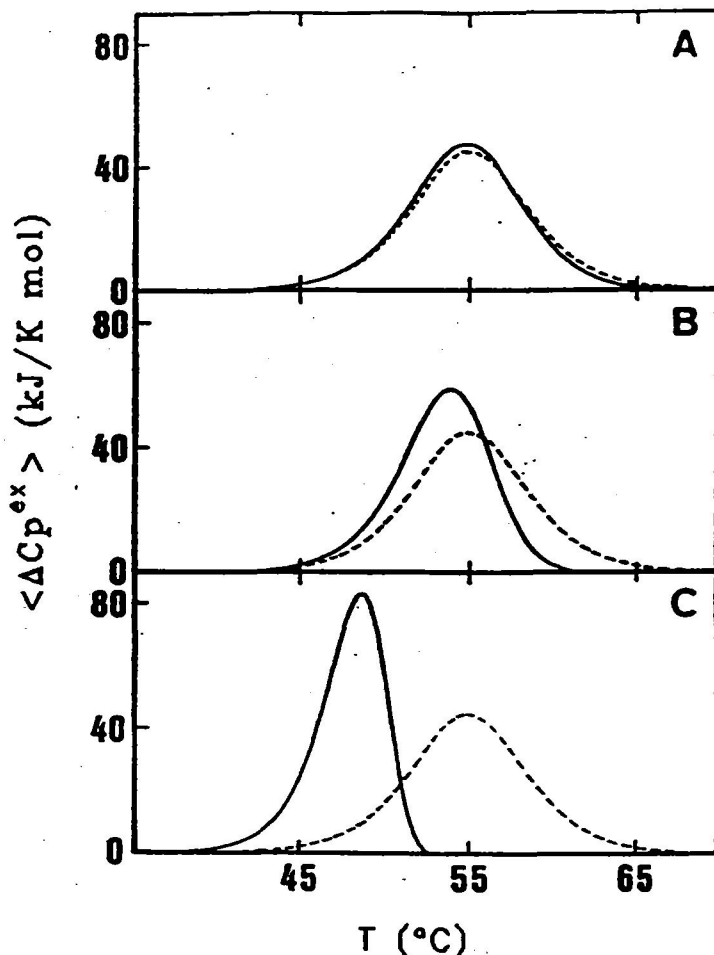
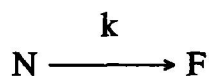


Figura 4.4-1: Curvas de $\langle \Delta C_p^{ex} \rangle$ predichas por el modelo de Lumry y Eyring en las tres situaciones que se mencionan en el texto. Los parámetros utilizados son: $\Delta H=400$ kJ/mol; $T_{1/2}=55$ °C; la energía de activación de la etapa irreversible, $E=100$ kJ/mol. La temperatura a la que la constante de velocidad de la etapa irreversible, k_F , es igual a 1: (A) $T_{k=1}=75$ °C; (B) $T_{k=1}=55$ °C; (C) $T_{k=1}=25$ °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).

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 F 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., 1988):



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 4.4-1 se muestran simulaciones de $\langle \Delta C_p^{ex} \rangle$, 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.

1994; Lim et al., 1994). La afinidad de los péptidos a los dominios es relativamente baja, en el rango de micromolar, sobre todo, en comparación a otras interacciones entre proteínas y péptidos implicadas en las señales de transducción. Si estos valores tienen un significado fisiológico se desconoce. Es posible que las interacciones entre los dominios SH3 y los péptidos ricos en prolinas tengan lugar en una zona de la célula donde la concentración local sea alta, por ejemplo, cerca de la membrana o en el citoesqueleto. También, es posible que los péptidos libres no representen exactamente la región de unión de las proteínas dianas porque otros residuos de la proteína o incluso otros compuestos, estén implicados en el complejo.

En cuanto a la selectividad, se ha visto que Abl-SH3 tiene una buena afinidad sólo con 3BP-1 y 3BP-2. Los experimentos que se han realizado (Viguera et al., 1994) sugieren que el aminoácido en la cuarta posición del péptido es crítico para la unión del los péptidos ricos en prolinas a este dominio. En el caso de espectrina no se ha encontrado hasta el momento ningún ligando que se una a este dominio. La espectrina es una proteína del citoesqueleto, y es concebible que su pareja fisiológica pueda ser diferente a la de los dominios SH3 de tirosinas quinasas. Fyn-SH3 es el dominio más promiscuo de todos lo estudiados. Une a todos los péptidos con unas constantes de disociación más bajas de $100\mu\text{M}$. La constante más baja la presenta para el péptido p85 α -2 (KPRPPRPLPVA) el cual presenta una carga positiva de 3+. Esto concuerda con la observación de que en la proximidad del sitio de unión en el dominio hay una densidad de carga negativa de 5- (Brochert et al., 1994).

2.3.5 Estabilidad de los dominios SH3

Pocos son los estudios realizados hasta la fecha sobre la estabilidad térmica y, en general, del plegamiento-desplegamiento de los dominios SH3. Para el dominio SH3 de espectrina se ha realizado dicho estudio utilizando diferentes técnicas como CD, fluorescencia y DSC en función de la temperatura, pH y diferentes concentraciones de un agente desnaturizante (como urea) (Viguera et al., 1994). Estos estudios han puesto de manifiesto

Dominios SH3

que el desplegamiento de este dominio es consistente con un modelo de equilibrio de dos estados mayoritarios (estado plegado y desplegado) sin que se hayan detectado otros intermediarios de plegamiento mediante estudios cinéticos. Viguera et al. (1994a), llevaron a cabo la caracterización termodinámica completa de este dominio a diferentes valores de pH; a pH 3.5 y 298 K encuentran un valor de energía libre de desplegamiento de 13 kJ/mol. La estabilidad del dominio a este pH es baja comparada con la mayoría de las proteínas globulares, con un valor de 50 kJ/mol (Privalov y Gill, 1988). Sin embargo, dicho pH es bastante alejado del pH óptimo de máxima estabilidad del dominio, que se encuentra entre pH 5.0 y 8.0; y, además, al ser un dominio de una proteína y no una proteína aislada, las interacciones con otros dominios de la proteína podrían estabilizarlo.

Otro dominio para el cual se han realizado estudios de estabilidad térmica y química, es el dominio SH3 de la proteína Sem-5 de *Caenorhabditis elegans* (Lim et al., 1994). Mediante dicroísmo circular en función de la temperatura a diferentes valores de pH, encuentran estos autores, que el desplegamiento del dominio al igual que en el caso de espectrina, sigue un modelo de equilibrio de dos estados. A pH 7.3 la temperatura de desplegamiento (T_m) es de 73.4 °C, lo que demuestra que este dominio, a pesar de su pequeño tamaño y la ausencia de puentes disulfuro, es extremadamente termoestable. Sin embargo, la desnaturalización por cloruro de guanidina muestra que este dominio tiene un valor de ΔG de sólo 17 kJ/mol (al igual que ocurre con espectrina), lo que demuestra que a pesar de ser resistente a la temperatura, no es muy estable a temperatura ambiente. Este extraordinario comportamiento es similar al observado para otras unidades pequeñas independientemente plegadas como es el caso del dominio B1 de unión a IgG de la proteína G (Alexander et al., 1992). Los dominios pequeños tienden a tener valores de ΔS y ΔC_p de desplegamiento relativamente pequeños, lo que lleva a perfiles de estabilidad (ΔG vs. T) anchos y planos, ya que $-\Delta S$ es la pendiente y $\Delta C_p/T$ es la curvatura, de dichas curvas de estabilidad. Por lo tanto, sí una proteína globular pequeña tiene la misma estabilidad a 25 °C que una grande, la proteína pequeña tendrá usualmente una temperatura de desplegamiento mayor.

Dominios SH3

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos.

Fosfato monosódico y disódico, glicina, acetato sódico, hidróxido sódico, cloruro sódico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fórmico, usados para preparar disoluciones tampón, fueron de la casa MERCK (para análisis). El Tris y el EDTA disódico de la casa SIGMA, el cloruro de guanidina de la casa PIERCE y el sulfato sódico de MERCK.

La columna de HPLC de fase reversa que se usó en la purificación del fragmento de termolisina 205-316 era de la casa Vydac. Acetonitrilo para HPLC se obtuvo de CARLO ERBA. El ácido trifluoroacético fue de FLUKA.

El medio de cultivo LB, utilizado para el crecimiento de las células para la obtención de los dominios SH3 estaba compuesto de (para 1l):

- 10 g de Bactotripton, de la casa DIFCO.
- 5 g de Extracto de levadura de la casa DIFCO.
- 1 g de cloruro sódico de la casa MERCK.
- 1 g de glucosa de la casa MERCK.

Como inductor de la producción de los dominios SH3 se utilizó Isopropil β -D-Thiogalactopiranosido (IPTG) de la casa SIGMA.

La columna de FPLC utilizada para la purificación de los diferentes dominios SH3 era de la casa PHARMACIA.

Las membranas de diálisis utilizadas eran de Spectrapore. El agua utilizada para la preparación de las disoluciones fue destilada, desionizada mediante un desionizador Milli-Q (Millipore). Todas las disoluciones se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 μ m.

Otros reactivos utilizados a lo largo de este trabajo y que no se hayan mencionado, han sido siempre de la máxima calidad disponible.

3.1.2 Muestras biológicas.

Las muestras de β -Lactoglobulina B fue adquirida de la casa SIGMA como muestra tres veces cristalizada. La pureza de la misma fue comprobada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y HPLC.

La termolisina (protease Type X) utilizada para la purificación del fragmento 205-316 fue adquirida de la casa SIGMA.

Los dominios SH3 fueron purificados en el laboratorio del Dr. Luis Serrano del EMBL (Heidelberg, Alemania) por Ana Rosa Viguera y en una estancia breve en su laboratorio por nosotros mismos.

Los péptidos 3BP1 y 3BP1-M4Y fueron suministrados por el Departamento de Síntesis del EMBL (Heidelberg, Alemania).

3.1.3 Instrumentación.

Las medidas de concentración de las muestras de proteínas estudiadas, se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-70 de haz simple, obteniéndose los espectros de las mismas.

Para la obtención del agua ultrapura, tanto para HPLC como para la preparación de las diferentes disoluciones empleadas, se utilizó un equipo de purificación de Milli-Q (Millipore). Las medidas de los valores de pH se realizaron con electrodos combinados Ingold con sensibilidad de ± 0.01 unidades y pHmetros Crison los cuales fueron calibrados con tampones estándar de pH 7.02 y 4.00 de la marca Crison. Para la centrifugación de muestras pequeñas se utilizó una centrífuga para tubos eppendorf Heraeus Chryst.

La purificación del fragmento 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 el caso de los dominios SH3 se utilizó un equipo de FPLC de la casa Pharmacia/LKB equipado con dos bombas P-500 controladas por una unidad de programación GP-250 Plus, un colector de fracciones FRAC-200, un detector UV-visible U Vicord SII, inyector Valve V-7 de 5 MPa y un registro gráfico REC-102.

Las centrífugas empleadas para el fraccionamiento y obtención de los dominios fueron: una ultracentrífuga Beckman L-70 para las centrifugaciones a 40000 y 35000 rpm, una centrífuga Sorvall RC-5b de la casa DUPONT para 4000 rpm.

Para los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se utilizó un microcalorímetro DASM-4 de fabricación soviética (Privalov, 1980; Privalov y Potheikin, 1986; Privalov y Plotnikov, 1989) cuyas características se describen en el apartado 3.3.2. 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. Los programas de adquisición y tratamiento de datos fueron desarrollados en este Departamento, utilizándose también programas cedidos por el Dr. E. Freire de la Universidad Johns Hopkins de Baltimore (USA).

Los experimentos de Dicroísmo Circular fueron realizados en un espectropolarímetro Jasco-720 de la casa Japan Electronic Inc, controlado a través de el software suministrado por la casa. Las características de dicho aparato se describen en el apartado 3.4.2.

La centrífuga analítica empleada para los experimentos con el fragmento de termolisina 205-316 y β -Lactoglobulina, es de la casa Beckman Instruments Inc. modelo XL-A cuya descripción se realiza, asimismo, en el apartado 3.5.2.

3.2 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

3.2.1 β -Lactoglobulina

La proteína, tal como es adquirida de la casa comercial, está cristalizada. Para la preparación de cada una de las disoluciones se sigue el siguiente procedimiento:

Se pesa la cantidad apropiada, según la concentración que se desea y, a continuación, se disuelve en el volumen apropiado de tampón filtrado previamente y ajustado el pH. Mediante una pipeta Pasteur se introduce la disolución en la membrana de diálisis anteriormente preparada, la cual se cierra mediante unas pinzas especiales para tal fin (de Spectrum Medical Industries), dejando un poco de aire. Se coloca la bolsa en un recipiente con un volumen de tampón aproximadamente 400-500 veces mayor que el de la muestra y se deja agitar con un agitador magnético durante 6 a 8 horas a 4 °C. Posteriormente se cambia el baño de diálisis y se deja continuar la diálisis unas 12 horas a la misma temperatura. Transcurrido ese tiempo se extrae la disolución de proteína de la bolsa de diálisis con una pipeta Pasteur y se centrifuga en un tubo Eppendorf durante unos 10 minutos a 10000 g, para eliminar cualquier residuo insoluble. Una vez preparada la disolución, se determina la concentración de la misma, para lo cual se mide su absorbancia a 278 nm con un coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{278}(1\%)=9.6$ (Tanford et al, 1959). En la Figura 3.2.1-1 se muestra un espectro de la misma.

Una vez realizado esto la muestra está preparada para llevar a cabo los experimentos de calorimetría o de dicroísmo circular.

β -Lactoglobulina con GuClH.

La preparación de la proteína para los experimentos con GuClH se lleva a cabo de la misma forma que anteriormente se ha expuesto.

En cuanto a la preparación de GuClH se realiza de la siguiente manera:

La cantidad deseada de GuClH, junto con la cantidad adecuada de tampón sólido, se

disuelve en agua desionizada y se ajusta el pH . Al pesar inicialmente la guanidina y el tampón y disolverse hasta el volumen final, se evita la dilución causada al disolverse la guanidina. Una vez preparada la disolución se filtra a través de filtros Millipore HAWPO 2500 (con tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$). Las disoluciones de GuClH se preparan al doble de la concentración deseada, ya que al mezclarlas con la disolución de proteína se lleva a cabo una dilución a la mitad.

Las medidas de concentración de dichas disoluciones se realiza por medidas del índice de refracción, mediante un refractómetro y trabajando a temperatura constante (con un baño de termostatación M3 Lauda) (Nozaki, 1972).

La adición de la disolución de GuClH a la proteína y su mezcla se hace lo más rápidamente posible, evitándose de esta manera que al añadir concentraciones elevadas de GuClH localmente se produzca desnaturalización de la proteína.

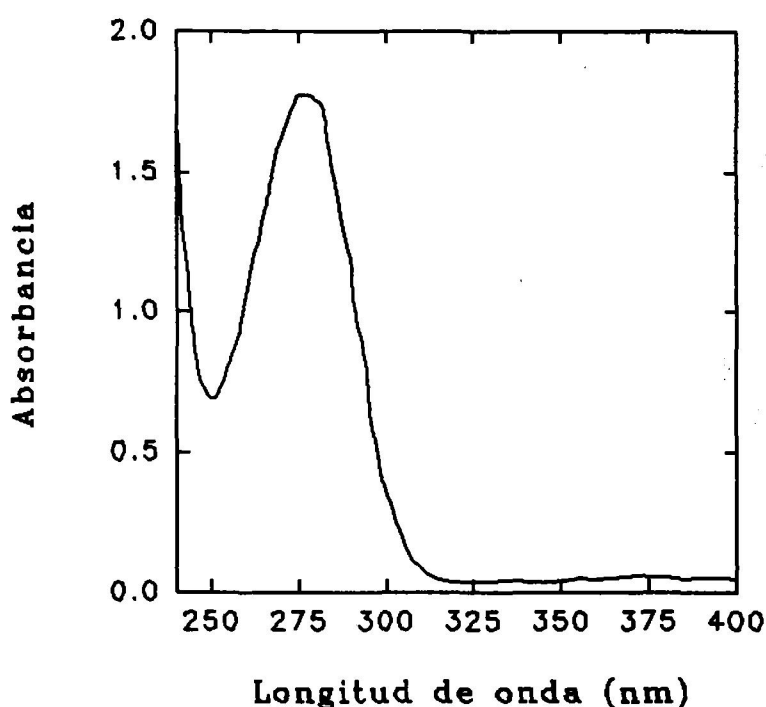


Figura 3.2.1-1: Espectro ultravioleta-visible de β -Lg B en fosfato sódico 20 mM pH 1.5.

3.2.2. Fragmento de TLN 205-316.

Purificación:

La purificación del fragmento TLN 205-316 se realizó directamente a partir de la proteína 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, transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se filtra a través de un filtro Millipore de 0.45 μm teniendo precaución con la formación de espuma que se produce durante el proceso.

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 TLN cortada, 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 de reacción, se deja a 4 °C toda la noche 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 junto con 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 preparativa (RP-HPLC). El liofilizado en porciones de 5 mg disuelto en 2 ml de cloruro de guanidina 6 M con 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA) se filtró mediante un cicofiltro Millex de 0.22 μm de Millipore.

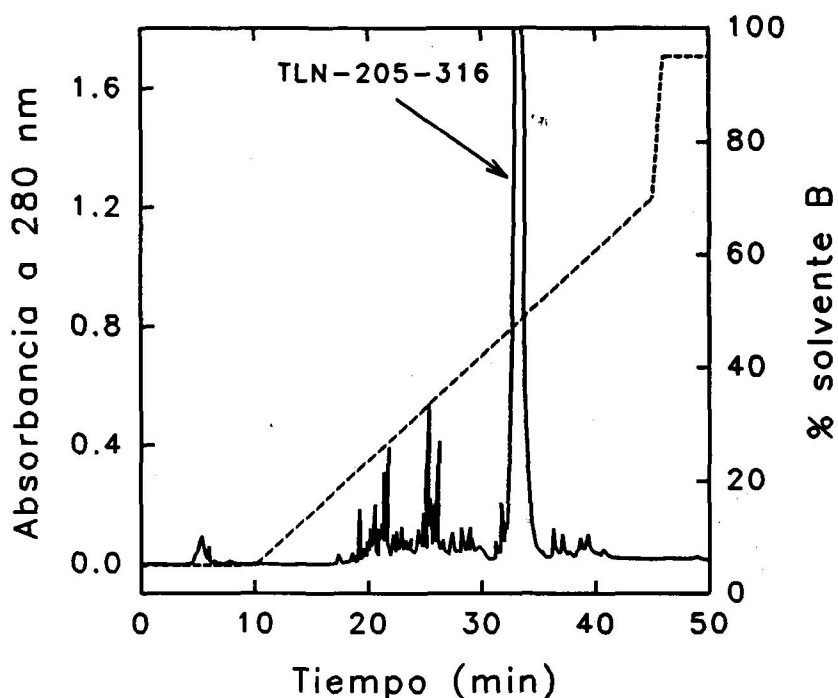


FIGURA 3.2.2-1: Cromatograma de RP-HPLC correspondiente a la purificación final del fragmento TLN-205-316, en columna Vydac C_{18} , en las condiciones que se describen en el texto. La línea discontinua representa el gradiente del solvente B (acetonitrilo + 0.05% TFA).

Para la purificación por RP-HPLC se empleó una columna de fase reversa C_{18} 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: H_2O + 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 280 nm, recogiendo manualmente TLN 205-316 purificado. Estas disoluciones se congelaron, liofilizaron y almacenaron bajo desecación a -20 °C. En la figura 3.2.2-1 se muestra un cromatograma correspondiente a la purificación del fragmento.

Preparación de las muestra:

El liofilizado de TLN 205-316 no se disuelve directamente en los tampones que se han empleado en los experimentos posteriores. Por ello se disolvió previamente en agua y se dializó posteriormente en membranas de diálisis de 3.5 kDa, frente al tampón deseado durante 24 horas. La medida de la concentración de muestra se realizó mediante un espectro UV-visible, midiéndose la absorbancia a 280 nm. En la figura 3.2.2-2 se muestra el espectro de TLN 205-316. Se utilizó un valor para $\epsilon_{0.1\%} = 0.86$ (Vita et al., 1979).

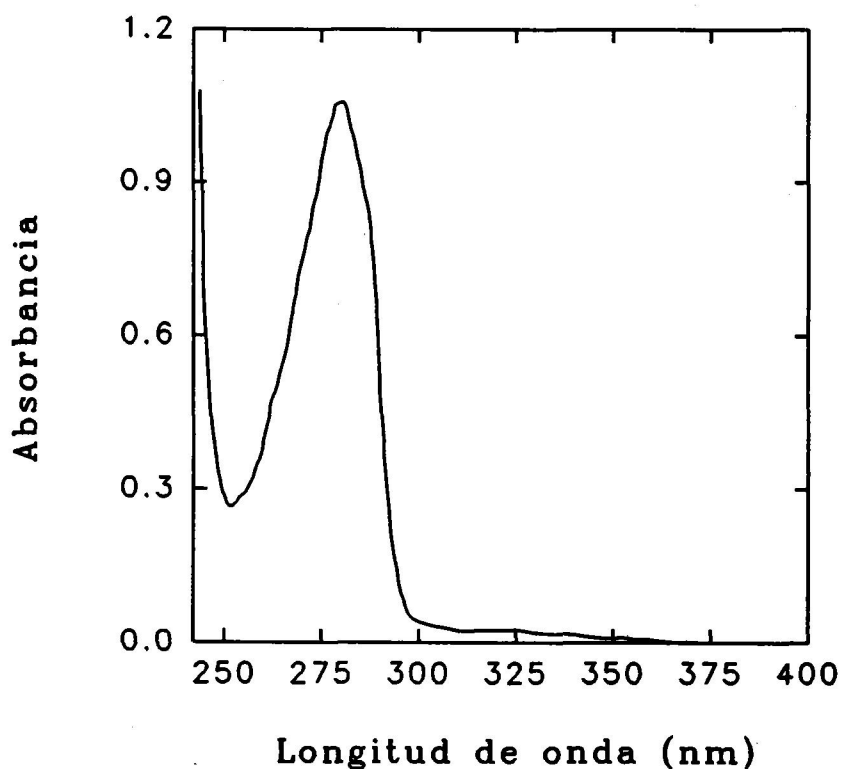


FIGURA 3.2.2-2: Espectro de absorción ultravioleta-visible del fragmento TLN 205-316 a pH 5.0.

3.2.3 Dominios SH3.

Purificación:

Los diferentes dominios SH3 son clonados en diferentes plásmidos pET3d donde se han introducido tras cortes con enzimas de restricción y expresados en células de la cepa BL21 de *E. coli* (Musacchio et al, 1992).

A partir de una placa de Petri con células que contienen el plásmido correspondiente, se preparan inóculos de 3 ml con medio de cultivo LB más ampicilina, los cuales se dejan crecer a una temperatura de 35 °C durante aproximadamente de 3 a 5 horas con agitación. Cuando se observa turbidez en los inóculos, se añaden sobre un litro de medio de cultivo. Se incuban los diferentes matraces a 35 °C con agitación hasta conseguir una absorbancia a 600 nm de aproximadamente 0.4. Se induce la producción de los dominios con la adición de IPTG (1ml de concentración 40 mg/ml para cada matraz) y se incuba durante toda la noche.

Las células se centrifugan a 4000 rpm durante 35 min, en una centrífuga Sorvall RC-3B PLUS con un rotor RA3. Del sobrenadante se toma una pequeña cantidad para realizar una electroforesis. El precipitado en donde se encuentran las células, se resuspende en unos 20 ml de tampón fosfato sódico 5 mM pH 7.0 y se toma una muestra para electroforesis.

Se rompen las células con tres ciclos de congelación (N_2 líquido) y descongelación (40°C) y se centrifugan a 40000 rpm durante 1 hora en una ultracentrífuga BECKMAN L-70 y rotor 45 Ti. El sobrenadante (normalmente toda la proteína se encuentra en él) se precipita con concentraciones de sulfato amónico del 50 y 75%. El precipitado se resuspende en urea 6M y se toma una muestra para electroforesis.

Cuando se precipita con sulfato amónico al 50% la proteína queda en el sobrenadante, precipitando prácticamente todo al 75%. En cada una de las precipitaciones, la muestra se centrifuga a 35000 rpm durante 15 min en la ultracentrífuga. El precipitado del 50% se disuelve en 1 ml de tampón fosfato sódico 5mM pH 7.0 y se guarda para realizar una electroforesis. El sobrenadante se precipita al 75% y se vuelve a centrifugar. Del

sobrenadante de esta última precipitación se toma una muestra para electroforesis y el precipitado (toda la proteína se encuentra aquí) se resuspende en una cantidad variable de tampón en torno de 7 a 15 ml. Se centrifuga de nuevo a 35000 rpm durante 2 horas en ultracentrífuga, de esta manera se obtiene lo que se denomina el "crudo" de la proteína a partir del cual por FPLC se purificará el dominio deseado. Un esquema de los pasos de la purificación se recogen en la Figura 3.2.3-1.

Con todas las muestras recogidas a lo largo del proceso, se realiza una electroforesis en presencia de SDS al 15 % de acrilamida para llevar a cabo un control de la expresión de las células y de las diferentes fracciones en donde se encuentra el dominio.

El "crudo" filtrado a través de filtros de 0.2μ , se pasa a través de una columna de Superdex 75 de Pharmacia, en fracciones de 3 a 5 ml y a una velocidad de 2 ml/min, recogiendo las fracciones cada 4 ml. Normalmente sales en las fracciones 58-62 (232-248 ml). Dichas fracciones se unen y se concentran posteriormente en concentradores de Amicon de corte 3000 daltons hasta un volumen menor de 3 ml.

Los diferentes dominios una vez obtenidos puros de los diferentes pasos a través de la columna, se guardan en alícuotas de 1 a 2 ml y se congelan a -80°C para su posterior utilización.

Preparación de las muestras:

Se toma una alícuota y se dializa frente a tampón deseado durante 24 horas. El procedimiento que se sigue es el mismo que para la preparación de las muestras de β -Lactoglobulina. La medida de la concentración se realizó midiéndose la absorbancia a 280 nm. El coeficiente de extinción utilizado para cada uno de los dominios fue: Abl-SH3 $\epsilon^{1\%} = 2.20$, Fyn-SH3 $\epsilon^{1\%} = 2.41$ y Src-SH3 $\epsilon^{1\%} = 2.41$ (Viguera et al, 1994?). Un espectro uv-visible para el dominio Fyn-SH3 a pH 2.0 se recoge en la Figura 3.2.3-3.

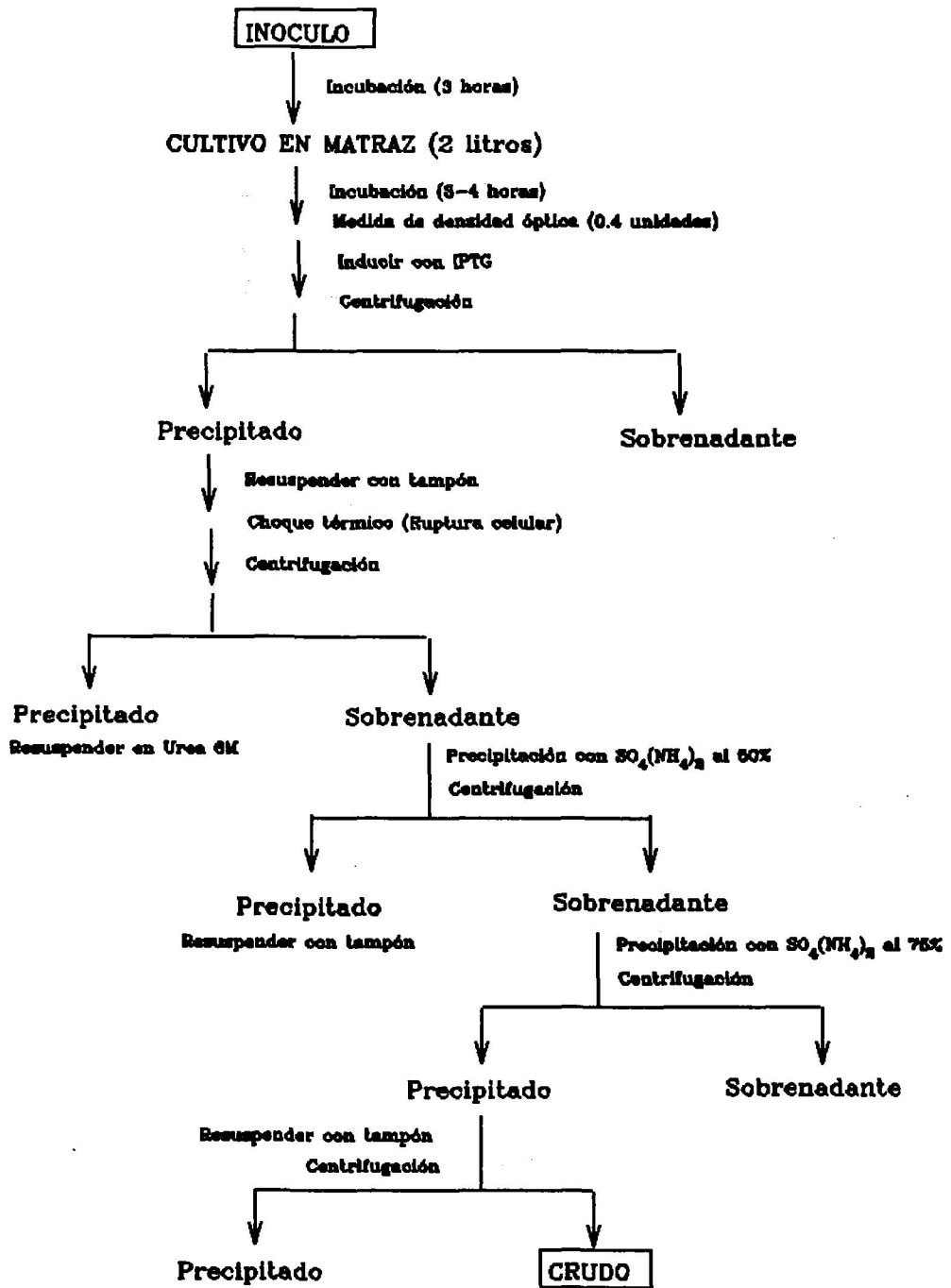


Figura 3.2.3-1: Esquema de la purificación de los dominios SH3.

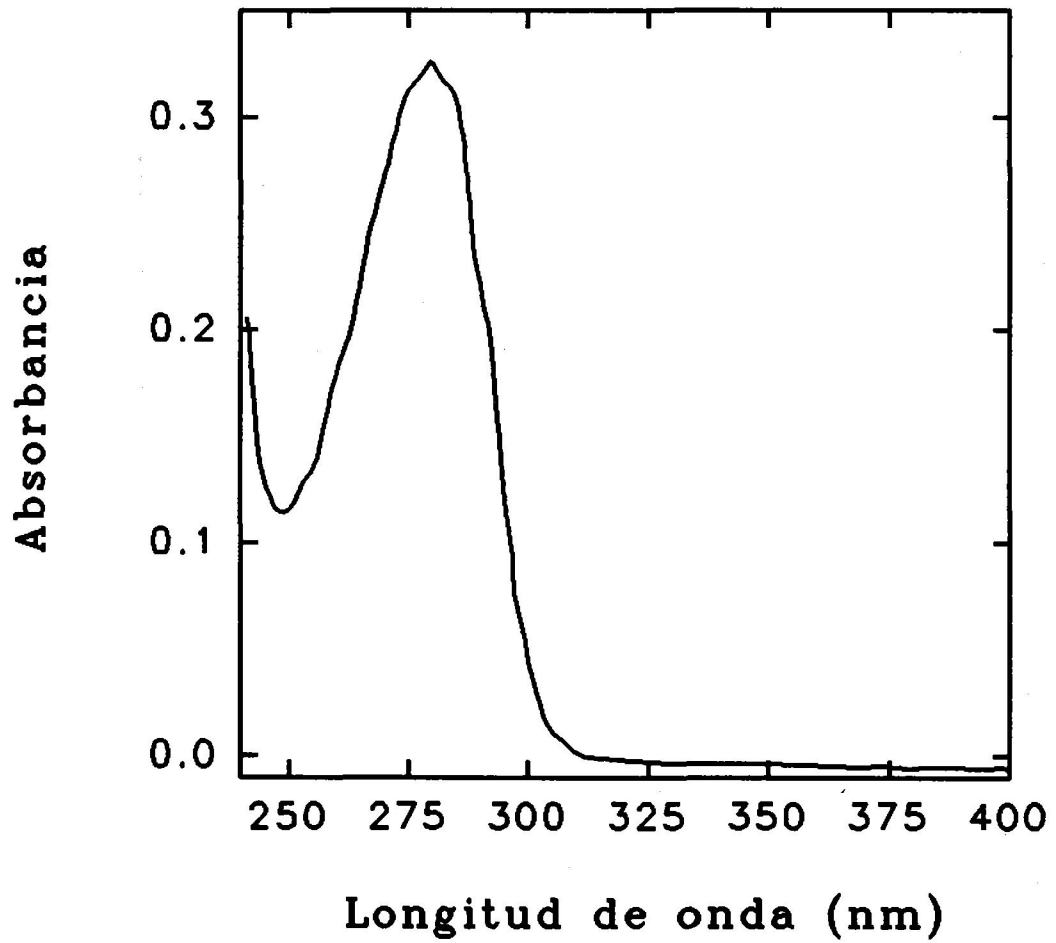


Figura 3.2.3-2: Espectro ultravioleta-visible del dominio Fyn-SH3 en tampón glicina 10mM a pH 2.0.

3.3 TECNICAS DE ANALISIS 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 del fragmento TLN 205-316. 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 μm, 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 μl, utilizando un "loop" de 200 μl. La detección a la salida de la columna fue mediante absorción a 280.

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

SDS-PAGE se realizó en un 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 prpoteínas (Ornstein, 1964). Consistió en utilizar un gel de 1 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 8 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 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 5 minutos para que el SDS despliegue las cadenas de las proteínas completamente. Se aplican entre 5 y 20 μ g de proteína en cada calle del gel apilador.

El tampón de desarrollo de la electroforesis se compone de Tris/Glicina, SDS al 0.5%, pH 8.3. La intensidad de corriente aplicada por lámina es de 20 mA durante el transcurso de la electroforesis.

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 si el colorante. Los geles se conservan secos, plastificados con papel de celofán.

3.4 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO

3.4.1 Introducción

Los microcalorímetros diferenciales de barrido proporcionan la capacidad calorífica relativa de un sistema, C_p , en función de la temperatura. Es por tanto una técnica fundamental para estudiar cambios conformacionales inducidos por la temperatura de sistemas biológicos tales como proteínas (Privalov y Khechinashvili, 1974; Pfeil y Privalov 1976), ácidos nucleicos (Privalov y Filimonov, 1978), biomembranas y modelos de las mismas (Mabrey y Sturtevant, 1978; Bach y Chapman, 1980). Un cambio conformacional de indudable importancia en proteínas es su desplegamiento térmico, transición desde el estado nativo altamente organizado al desplegado, el cual suele aproximarse al de cadena estadística o al azar. Este proceso, al menos en principio, es análogo termodinámicamente (aunque inverso) al plegamiento in vivo de la cadena polipeptídica una vez que se ha sintetizado en los ribosomas, y de ahí su gran interés. Por otra parte, el estudio termodinámico del desplegamiento de una proteína es el camino más directo para caracterizar su estabilidad.

Una transición conformacional inducida por la temperatura, como sería el caso anteriormente expuesto, se manifiesta por un pico en la gráfica de C_p frente a la T correspondiente a un proceso endotérmico de acuerdo con la ley de Le Chatelier (supuesto el proceso de equilibrio). La entalpía del proceso vendrá dada, por tanto, por la integral de C_p . Puede también obtenerse la entalpía de van't Hoff, así como los valores de ΔG y ΔS del proceso si éste transcurre en equilibrio.

Esta técnica es la única que permite la caracterización termodinámica completa del proceso de desplegamiento, de ahí su gran interés, ya que permite el estudio del desplegamiento de macromoléculas sin necesidad de hacer suposiciones sobre el proceso que tiene lugar.

3.4.2 Instrumentación.

Los experimentos de calorimetría se han realizado con un microcalorímetro diferencial de barrido DASM-4 de fabricación rusa diseñado por el Dr. P.L. Privalov (Privalov, 1980). Sus características esenciales son:

Volumen de las células	0.477 ml
Intervalo de temperatura de operación	250-400 K
Velocidad de barrido	0.125-2 K/min
Nivel de ruido	0.2 μ W
Reproducibilidad sin volver a llenar las células	0.5 μ W
Reproducibilidad volviendo a llenar las células	0.05 mJ/K
Erro relativo en la capacidad calorífica	0.005 %

Es un calorímetro diferencial con dos células idénticas, 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 dos corazas metálicas en forma de "sombbrero", como se ilustra en la Figura 3.4.2-1. Entre las dos células se encuentra una termopila de 200 uniones bimetal, que actúa como termosensor.

Para producir el barrido de temperatura se suministra a dos resistencias eléctricas (de idéntico valor), que están en íntimo contacto con la superficie de cada célula, la misma intensidad de corriente, cuyo valor está fijado por la velocidad de barrido seleccionada. A través de los termosensores y efectores apropiados, el sistema de control analógico del calorímetro establece, en todo momento, la igualdad de las temperaturas correspondientes a las dos células y a las corazas interna y externa, de manera que las células en su conjunto forman un sistema adiabático. Cuando se produce algún efecto térmico (desplegamiento de una proteína, fusión de una bicapa lipídica, etc.), el control en lazo cerrado del instrumento responde realizando una compensación simétrica de potencias en ambas células, manteniendo

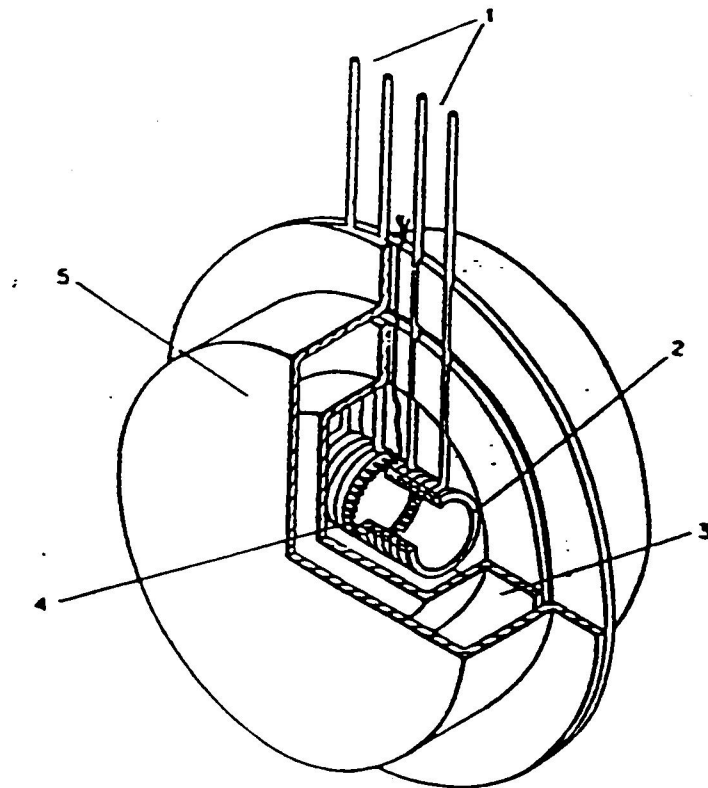


Figura 3.4.2-1: Bloque calorimétrico del microcalorímetro diferencial de barrido DASM-4. (1) Entrada de los capilares, (2) calentador de las células capilares, (3) coraza interna, (4) termopila, (5) coraza externa.

así la igualdad de temperaturas en ellas. Una señal eléctrica proporcional a la 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.

3.4.3 Experimento calorimétrico.

El experimento calorimétrico se inicia con el llenado de ambas células con el tampón en el cual va disuelta la muestra biológica. Este primer registro corresponde a la denominada línea base instrumental. Dado que las células no pueden construirse exactamente iguales, hay que restar la contribución a la capacidad calorífica (C_p) debida a la diferencia existente entre las mismas, de ahí la necesidad de este primer registro. A continuación se vacía la célula de muestra y se seca lo más posible para que no se produzca ninguna dilución al introducir la disolución de macromolécula a estudiar. A las células se les proporciona una sobre presión de 1.5-2 atmósferas para evitar la desgasificación de las disoluciones durante el calentamiento y su ebullición cuando se trabaja a temperaturas superiores a 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 para su posterior procesamiento. Estos datos contienen la información correspondiente a la función capacidad calorífica del sistema en estudio.

Una vez realizado el 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 desplegamiento detectados, lo cual es de gran interés para el análisis posterior de los datos según un modelo de equilibrio o un modelo cinético. En el caso de procesos reversibles, es aconsejable realizar el experimento a dos velocidades de barrido diferentes, con el objeto de asegurar que el proceso transcurre en el equilibrio.

Para transformar los datos de voltaje (mV) en valores de capacidad calorífica (J/K) hay que calcular el valor de la constante de calibrado (k) del aparato. Para ello se realiza un calibrado eléctrico que consiste en suministrar 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. La constante de calibrado es una característica propia del calorímetro. Esta capacidad calorífica en J/K puede ser transformada en capacidad calorífica molar kJ/Kmol,

normalizando para el número de moles de la macromolécula presentes, utilizando el volumen de las células del calorímetro, la concentración de macromolécula y su peso molecular.

$$f = \frac{k(\mu W/mV) * 60(s/min) * 10^{-3}(kJ/J)}{v(K/min) * C(mg/ml) * V(ml) * 10^{-3}(g/mg) * Pm^{-1}(mol/g)}$$

Las potencias que se disponen para calibración en un DASM-4 son 25, 50 y 100 μW .

Una vez concluido el experimento, es necesario limpiar exhaustivamente la células con objeto de evitar interferencia entre diferentes experimentos por acumulación de muestra en las mismas.

3.4.4 Análisis de los datos.

Después de restar la línea base instrumental a los termogramas obtenidos y transformar las unidades de mV a J/K, existen dos contribuciones a la C_p de la proteína: a) la capacidad calorífica de exceso, C_p^{ex} , debida a la absorción de calor por el proceso de desplegamiento, dando lugar a un "pico" o transición, y b) la capacidad calorífica intrínseca, C_p^q , de la mezcla de macroestados de la proteína, la cual viene dada por :

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

donde $C_{p,i}$ es la capacidad calorífica del estado i a una temperatura dada y X_i es la fracción presente del estado i a esa misma temperatura. Esta capacidad calorífica intrínseca es responsable de que normalmente en los termogramas de DSC exista una diferencia en altura entre el tramo inicial y final de la transición. Esta diferencia es el incremento de capacidad calorífica entre el estado nativo y el desplegado de la proteína (ΔC_p), ya que a bajas temperaturas toda la proteína está en el estado nativo y a altas temperaturas toda se encuentra desplegada. Se denomina línea base química a la variación con la temperatura de la C_p^q en el intervalo de la transición, la cual puede determinarse, bien suponiendo un modelo para el proceso de desplegamiento en cuyo caso no es necesario su posterior substracción, bien

empíricamente utilizando una función que conecte suavemente los valores de la transición a baja y alta temperatura se consideran una buena aproximación a la variación de C_{pq} con la temperatura. 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 3.4.4-1). Calculada la línea base química, se resta su contribución obteniéndose la capacidad calorífica de exceso total, $\langle \Delta C_p^{ex} \rangle$.

Dado que, como todo instrumento de medida, el calorímetro tiene un cierto tiempo de respuesta, las curvas de $\langle \Delta C_p^{ex} \rangle (T)$ 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 termogras para la respuesta dinámica del instrumento. El calorímetro presenta una dinámica de primer orden, reduciéndose la corrección a realizar la siguiente operación:

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

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 $\langle \Delta C_p^{ex} \rangle (T)$ que nos proporciona los parámetros característicos de la transición del proceso de desnaturalización, tales como T_m , ΔH , etc.

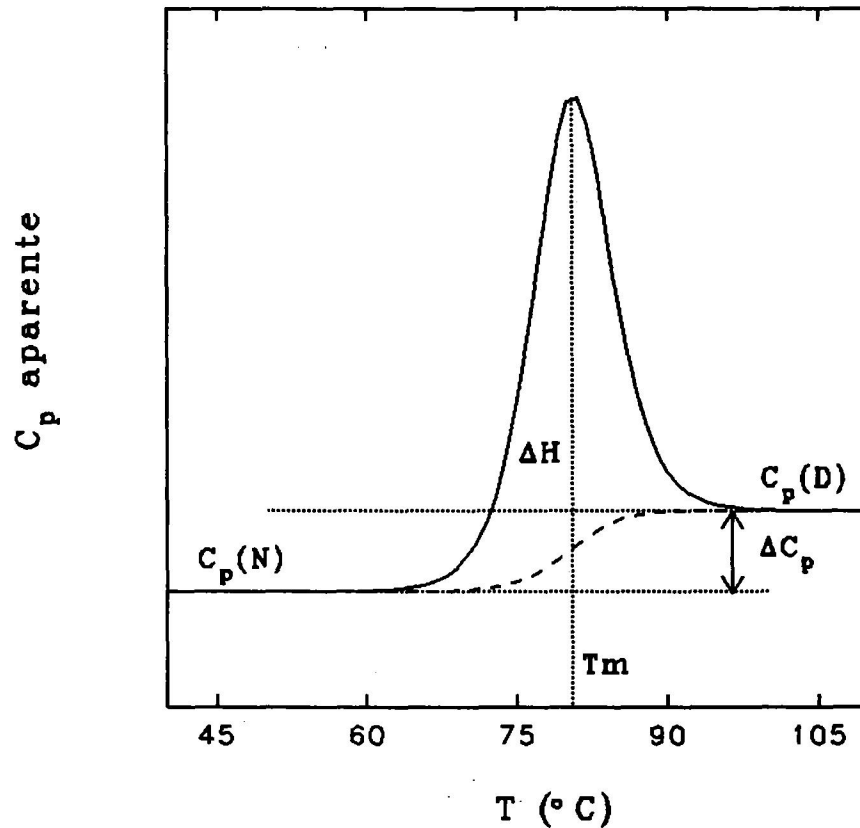


FIGURA 3.4.4-1: Curva de capacidad calorífica (trazo continuo) en función de la temperatura calculada para una proteína hipotética que despliega según el modelo de equilibrio de dos estados. $C_p(N)$ representa la capacidad calorífica del estado nativo y $C_p(D)$ la del estado desplegado. $\Delta C_p = C_p(D) - C_p(N) = 7 \text{ kJ/K mol}$; $\Delta H = 400 \text{ kJ/mol}$; $T_m = 80 \text{ }^\circ\text{C}$. Línea base química (trazo discontinuo), $C_p^q(T)$. El área encerrada entre las dos curvas equivale a la entalpía de desplegamiento, ΔH .

3.5 DICROISMO CIRCULAR

3.5.1 Introducción.

El dicroismo circular (CD) es una técnica espectroscópica con importantes aplicaciones en el estudio de sistemas bioquímicos. Esta técnica tiene la cualidad específica de ser sensible a la forma y simetría de las moléculas. Es bien sabido que una molécula que contenga un simple átomo de carbono asimétrico es ópticamente activa y exhibe el fenómeno de rotación óptica. La propiedad de asimetría es universal en sistemas biológicos: aminoácidos (generalmente de conformación L), nucleótidos (conteniendo azúcar, D-ribosa y D-desoxirribosa) y carbohidratos (conformación D y L) son las unidades de las cuales se forman las proteínas, polinucleótidos y polisacáridos. Dado que las unidades básicas son asimétricas las macromoléculas derivadas de ellas son también asimétricas y por tanto éstas poseen actividad óptica. Una molécula ópticamente activa interacciona de forma distinta con la radiación circularmente polarizada a derechas o a izquierdas. Esta interacción diferente origina el fenómeno del CD, que se observa usualmente para transiciones electrónicas.

El dicroismo circular es una técnica usada para obtener información acerca de propiedades conformacionales de moléculas biológicas de interés, propiedades que incluyen:

- a) Estructura de macromoléculas, contenido en estructura secundaria y terciaria, y grado de movilidad de ciertos compuestos.
- b) Transiciones estructurales, como por ejemplo procesos de replegamiento y desplegamiento de estructuras desnaturalizadas y nativas, respectivamente.
- c) Cambios conformacionales inducidos por la unión de pequeñas moléculas, como son substratos, coenzimas, etc.

El análisis de los espectros de CD raramente proporciona información absoluta sobre la estructura de proteínas debido a que el cromóforo está asimétricamente perturbado por los grupos vecinos, hecho que se agrava porque el principal componente del espectro de CD, el enlace peptídico, se presenta en una gran cantidad de conformaciones, dependiendo de su

localización en la proteína. El espectro que se obtiene es pues un resultado promedio de parámetros de cada conformación, y siempre es necesario realizar comparaciones con compuestos estandar cuyas estructuras se conocen gracias a difracción con rayos X. No obstante, el CD es extraordinariamente sensible a los cambios de conformación; si se produce cualquier cambio en un espectro, es que hay un cambio de conformación. Por ello, incluso si no se conoce la estructura y la curva de CD es virtualmente ininterpretable, el análisis de CD puede seguir siendo una forma muy sensible de medir el efecto de cualquier interacción o agente que ocasione cambios conformacionales. Es más, puede hacerse semicuantitativamente observando determinados caracteres de un espectro. Es decir, es un observable muy adecuado y utilizado para seguir un cambio conformacional dado, originado por la temperatura, pH, cosolvente, etc., cuya variación es posible controlar.

En nuestro caso esta técnica se ha utilizado para seguir los cambios conformacionales inducidos por la temperatura en la proteína β -Lactoglobulina B en presencia de cloruro de guanidina. De esta manera se confirmó la desnaturalización por frío de la proteína inicialmente detectada por DSC.

Asimismo, se realizaron espectros de CD de muestras de TLN 205-316 a diferentes valores de pH comprendidos entre 2.5 y 5, para poder observar los cambios conformacionales debidos a la variación del pH en la muestra.

3.5.2 Instrumentación

El aparato utilizado para realizar los experimentos de CD ha sido un espectropolarímetro Jasco 720 de la casa Japan Spectroscopy CO, LTD. Las especificaciones de dicho aparato son:

- Fuente de luz, lámpara de xenon de 450W, refrigerada por agua.
- Intervalo de medida de longitud de onda del monocromador de 170 a 800 nm.
- Exactitud de la longitud de onda: ± 0.2 nm de 170 a 180 nm

± 0.1 nm de 180 a 250 nm

± 0.3 nm de 250 a 500 nm

± 0.8 nm de 500 a 800 nm

-Estabilidad de la longitud de onda con la temperatura: menos de 0.02 nm/°C a 300 nm y menos de 0.1 nm/°C a 600 nm.

-Anchura de banda espectral.

-Abertura controlada manualmente, que puede ser seleccionada entre 0.01 y 3 nm.

-Velocidad de barrido, 1, 2, 5, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 nm/min.

-La atmosfera en el monocromador y en el compartimento de muestra es de nitrógeno.

-Dimensiones del compartimento de muestra, 310 mm de ancho x 420 mm de profundidad x 210 mm de alto.

Las cubetas utilizadas para llevar a cabo las medidas de las muestras de β -Lactoglobulina, fueron cilíndricas y con longitud de paso de luz seleccionada, en cada caso, según el intervalo de longitud de onda a medir; así, para la región entre 250-190 nm (ultravioleta lejano) se utilizaron cubetas de 0.5 mm de paso de luz, mientras que para la región comprendida entre 320-250 nm (ultravioleta cercano) se utilizaron cubetas de 1 mm de paso de luz. En el caso de las muestras de TLN 205-316 se utilizaron cubetas cuadradas de 0.1 mm de paso de luz para el ultravioleta lejano y 10 mm para el ultravioleta cercano.

La temperatura en el compartimento de cubetas se controla mediante un baño programable con etilenglicol para poder bajar la temperatura por debajo de 0°C.

3.5.3 Experimento de Dicroísmo Circular

La preparación de la muestra se realizó según se indica en el apartado 3.2. Tanto la muestra como el tampón en el cual va disuelta se filtraron, ya que en las medidas de dicroísmo es muy importante que no existan partículas en suspensión.

Para cada experimento a las diferentes temperaturas, lo primero que se realiza es un espectro del tampón en el cual va disuelta la muestra, lo que vamos a llamar el blanco. Posteriormente se introduce la muestra en la cubeta y una vez en el dicrógrafo se la deja alcanzar la temperatura seleccionada con anterioridad.

A. Adquisición de datos

La adquisición de datos se lleva a cabo mediante un ordenador IBM 386 conectado directamente al dicrógrafo, mediante un programa de adquisición de datos suministrado por la misma casa comercial (Japan Spectroscopic). Dicho programa permite seleccionar una serie de parámetros que controlan el funcionamiento del dicrógrafo, como son:

- Anchura de la banda espectral
- Sensibilidad
- Tiempo de respuesta
- Intervalo de longitud de onda
- Resolución del paso
- Velocidad de barrido
- Acumulaciones

Hemos de destacar el hecho de que es posible, como arriba se ha indicado, acumular más de un espectro de la muestra, con lo cual si se realizan N medidas, la medida es $N^{\frac{1}{2}}$ mejor que la medida individual, ganándose de esta manera precisión y mayor sensibilidad al disminuir el nivel de ruido. Sin embargo, hay que llegar a una situación de compromiso entre el número de espectros acumulados y el tiempo que es necesario para realizarlos. De tal manera que cuando se trabaja a muy bajas temperaturas donde haya problemas de posible congelación de las muestras, es conveniente no acumular más de dos o tres espectros; asimismo a altas temperaturas, donde existen problemas de evaporación de las muestras, es conveniente utilizar una acumulación no superior a dos espectros. Para el resto de las temperaturas es aconsejable utilizar una acumulación de cuatro.

B. Procesamientos de los espectros

Una vez obtenidos los espectros, tanto de los tampones en los que van disueltas las distintas muestras como los de éstas, se realiza el procesamiento de los mismos.

En primer lugar se subtrae a cada espectro el espectro correspondiente al tampón. La elipticidad observada(ϕ) viene dada en milésimas de grado, mientras que normalmente se suelen expresar los datos en términos de elipticidad molar ($[\phi]$) en grado $\text{dmol}^{-1} \text{cm}^2$, para lo cual se utiliza la siguiente ecuación

$$[\phi] = \frac{\phi}{\frac{C}{P_m} * l * 10 * n} \quad (3.5.3-1)$$

donde C es la concentración de proteína expresada en g/l, l es la longitud del camino recorrido en cm, P_m es el peso molecular de la proteína en g/mol y n es el número de residuos.

Los espectros resultantes tienen el mismo formato que los de partida y son compatibles con el mismo programa, el cual es capaz de obtener información a partir de ellos, del tanto por ciento de cada uno de los tipos de estructura secundaria presentes en las proteínas. En nuestro caso, sin embargo, esto no se puede llevar a cabo en el caso de β -Lactoglobulina debido a la presencia en la proteína de abundante estructura β , lo cual dificulta el ajuste de los espectros para obtener el tanto por ciento de cada una de las estructuras, debido a que esta técnica no es capaz de distinguirla suficientemente bien. No obstante se pueden apreciar cambios conformacionales, como en nuestro caso han sido los cambios conformacionales a baja y alta temperatura en presencia de guanidina para esta proteína.

3.6 ULTRACENTRIFUGACION ANALITICA.

3.6.1 Introducción

La medida y el análisis de equilibrio de sedimentación es una de las técnicas más potentes para la caracterización de asociaciones macromoleculares reversibles e irreversibles en disolución. El estudio de las asociaciones reversibles es muy importante para la caracterización de los ensamblajes supramacromoleculares de proteínas y/o ácidos nucleicos, y para la caracterización de mecanismos de regulación en bioquímica y biología molecular. La necesidad de caracterizar tales asociaciones tanto cuantitativa como cualitativamente ha sido recientemente indicada (Maddox, 1992). En muchos casos no es suficiente conocer que una sustancia se une consigo misma o con otra; a demás es necesario conocer la estequiometría de la unión, la fuerza de la unión (constante de equilibrio) y como varía ésta con la composición y variables del ambiente.

Numerosos métodos han sido desarrollados para el estudio cuantitativo de asociaciones biomoleculares reversibles (Hirs et al, 1985). Las técnicas de ultracentrifugación de velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación son los métodos más informativos y flexibles que pueden ser usados para estudiar los procesos de asociación que tienen lugar en solución.

En un experimento de equilibrio de sedimentación clásico, una solución que contiene una o más especies macromoleculares es centrifugada a relativa baja velocidad hasta alcanzar un equilibrio entre sedimentación y difusión. En el equilibrio, la dependencia de la concentración de cada especie con la posición radial es determinada por el empuje de las especies y las interacciones entre moléculas de esas especies y otras moléculas en solución. La estequiometría de la asociación y los valores de las constantes de equilibrio son determinados por modelos matemáticos de la medida de los gradientes de concentración o por modelado de la dependencia de la composición del peso molecular promedio derivado de la medidas del gradiente.

Ultracentrifugación analítica



Desde un punto de vista experimental la ultracentrifugación analítica presenta una serie de ventajas sobre otras técnicas para caracterizar asociaciones:

a) Cada experimento produce datos sobre un amplio rango de composición de una solución bastante más grande que para una solución simple, por tanto, son necesarios pocos experimentos para caracterizar completamente un sistema de asociación.

b) Las medidas no son destructivas, por lo que las muestras pueden ser recuperadas para futuros estudios.

c) Las medidas están libres de complicaciones debidas a interacciones no específicas entre soluto y gel, columna o matrices de filtros.

d) Solamente se requiere una pequeña cantidad de muestra (en algunos casos menos de 1 μg de proteínas por célula de centrífuga).

e) Experimentos de equilibrio en columnas cortas, pueden ser completados en prácticamente una hora.

f) Y posiblemente la más importante, la cocentración local de cada soluto que puede estar en equilibrio con otras especies presentes simultáneamente, satisface las condiciones tanto químicas como de equilibrio de sedimentación-difusión en todos los puntos de la célula. Por tanto, la cuantificación de los gradientes de solutos en equilibrio de sedimentación da información rigurosa a cerca del equilibrio de asociación, libre de tener que suponer nada a cerca del efecto o pérdida de él, de perturbaciones del equilibrio.

Los experimentos de ultracentrifugación analítica presentados en esta memoria fueron realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, por Dr. D. Germán Rivas. Dichos experimentos nos permitieron determinar el estado de asociación para β -Lactoglobulina B en el intervalo de pH ácido estudiado. En el estado nativo la proteína es monomérica y la proteína desplegada a altas temperaturas se encuentra en equilibrio con peptidos procedentes de la ruptura de ella misma.

Se realizaron también, experimentos con el fragmento TLN 205-316 caracterizándose el estado de asociación del mismo en el estado nativo a diferentes valores de pH ácido. El fragmento se encuentra en un equilibrio monómero-dímero, habiéndose determinado las

Ultracentrifugación analítica

constantes de asociación para los diferentes valores de pH. Estos datos fueron de gran utilidad para el análisis de las transiciones calorimétricas obtenidas para el fragmento.

3.6.2 Instrumentación.

Los experimentos de sedimentación se llevaron a cabo en una ultracentrífuga analítica XL-A de la casa Beckman Instruments Inc., que junto con un sistema óptico, un rotor analítico y un sistema de colección de datos automáticos, es capaz de realizar dos tipos de barridos: radial, en el cual se mide la absorbancia como una función de la distancia radial; y de longitud de onda, determinando niveles de absorbancia como una función de la longitud de onda a una distancia radial preseleccionada. Ambos tipos de barridos pueden llevarse a cabo tanto de forma continua como en etapas; sin embargo, el modo de barrido en etapas es recomendado para barridos de longitud de onda.

Las características generales de esta ultracentrífuga son las siguientes:

- Rango de longitud de onda 190 a 800 nm
- Rango de visualización fotométrica 0 a 3 A
- Etapas de barridos
 - Modo de barrido radial hasta 100 datos/barrido
incremento radial tamaño
de etapa mínimo 0.001,
máximo 0.01 cm.
 - Modo de longitud de onda hasta 1000 datos por
barrido; incremento
de longitud de onda
por etapa 1.0 nm.
- Velocidad de datos una lectura de absorbancia
cada 20 ms dependiendo de
la velocidad del rotor.

- Velocidad máxima 60000 rpm (en modo analítico).

Sistema óptico

El sistema óptico (Figura 3.6.2-1) está contenido completamente dentro del compartimento del rotor. La lámpara de destello de xenón de alta intensidad produce luz en el espectro de 190 a 800 nm. La luz pasa a través del monocromador a la longitud de onda establecida. Un detector de luz incidente en el monocromador mide la intensidad de la luz antes de que pase a través de la célula, normalizando los datos para variaciones de centelleo a centelleo de la intensidad de la lámpara. Para barridos por encima de 400 nm, existe un filtro en el monocromador que puede ser ajustado a través del haz de salida.

Conforme el rotor gira, la luz primero atraviesa el sector de referencia para en la próxima rotación pasar a través del sector de muestra. Las lecturas son obtenidas por un tubo fotomultiplicador. El fotomultiplicador detecta la intensidad de luz en el sector de muestra de la célula relativa a la intensidad de luz en el sector de referencia. Esta señal se transforma en valores de absorbancia por el software del ordenador.

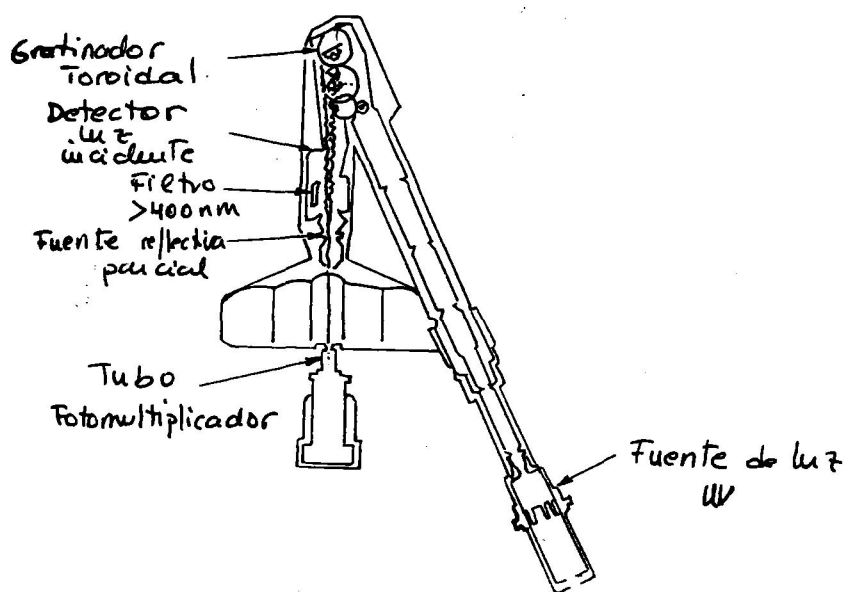


Figura 3.6.2-1: Esquema del sistema óptico de la ultracentrífuga Beckman XL-A.

Rotor y células

Se empleó un rotor An-60 Ti y columnas cortas ($50\mu\text{l}$) y centerpieces de seis canales de epon-charcoal de 12 mm (Figura 3.6.2-2).

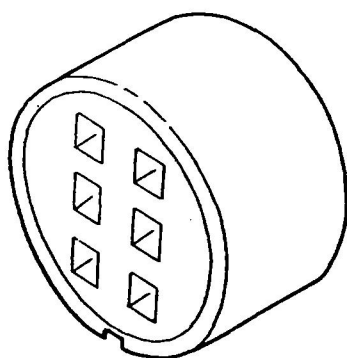


Figura 3.6.2-2: Esquema de un centerpiece de seis canales.

Sistema automático de datos

La ultracentrífuga XL-A está controlada a través de un ordenador PC. Mediante el paquete del software de operación se introducen los parámetros de la centrífuga, se pueden comenzar barridos y pararlos, así como introducir los parámetros para cada barrido, guardar los datos e imprimirlos, etc. Después de que los datos son almacenados, es posible leerlos con cualquier software apropiado que puede leer información en formato ASCII.

3.6.3 Experimento de sedimentación

Un vez montadas las células de ultracentrifugación, se introducen en el sector de referencia el tampón correspondiente y en el sector de muestra la sustancia a analizar. Con el objeto de alcanzar el equilibrio se dejan durante 6 horas a la velocidad seleccionada después de lo cual se mide a intervalos de 1 hora la absorbancia a 280 y 300 nm de las

muestras en función de la distancia radial hasta que no se observó diferencias significativas entre medidas sucesivas (condición de equilibrio).

Adquisición y procesamiento de los datos

Los datos son acumulados por el mismo programa que lleva a cabo el control de la ultracentrífuga. Una gráfica típica en absorbancia de los datos recogidos es la representada en la Figura 3.6.3-1, en donde se representa la absorbancia en función de la distancia radial. No todos los datos obtenidos son útiles, así la zona correspondiente a la región centrípeta aire-aire de la solución y el solvente de la columna, la región del menisco y los datos de la parate superior de la célula no son necesarios incluirlos en el análisis. El programa nos permite seleccionar la región deseada para posteriormente llevar a cabo su análisis.

Los datos obtenidos se pueden ajustar a diferentes modelos. El ajuste no lineal de las diferentes curvas a la ecuación siguiente, nos permite determinar un peso molecular promedio y darnos un idea sobre la existencia de asociaciones de la macromolécula:

$$A(r) = A(r_0) [\Phi M(r^2 - r_0^2)] + \delta \quad (3.6.3-1)$$

donde $A(r)$ es la absorbancia a radio r , $A(r_0)$ es la absorbancia al radio de referencia r_0 , $\Phi = (1 - \nu\rho) \omega^2 / 2RT$ siendo ν el volumen molar parcial de la macromolécula (ml/g), ρ la densidad del solvente (ml/g) y ω la velocidad angular del rotor (radianes/sg), M es el peso molecular promedio de la macromolécula y finalmente δ es la compensación de la línea base.

En el caso del fragmento de TLN 205-316 con objeto de obtener la constante de asociación, los datos globales a los diferentes valores de pH se ajustaron conjuntamente, empleando un método de mínimos cuadrados no lineales (Johnson et al., 1981), al siguiente modelo de asociación monómero-dímero (Yoo y Lewis, 1992):

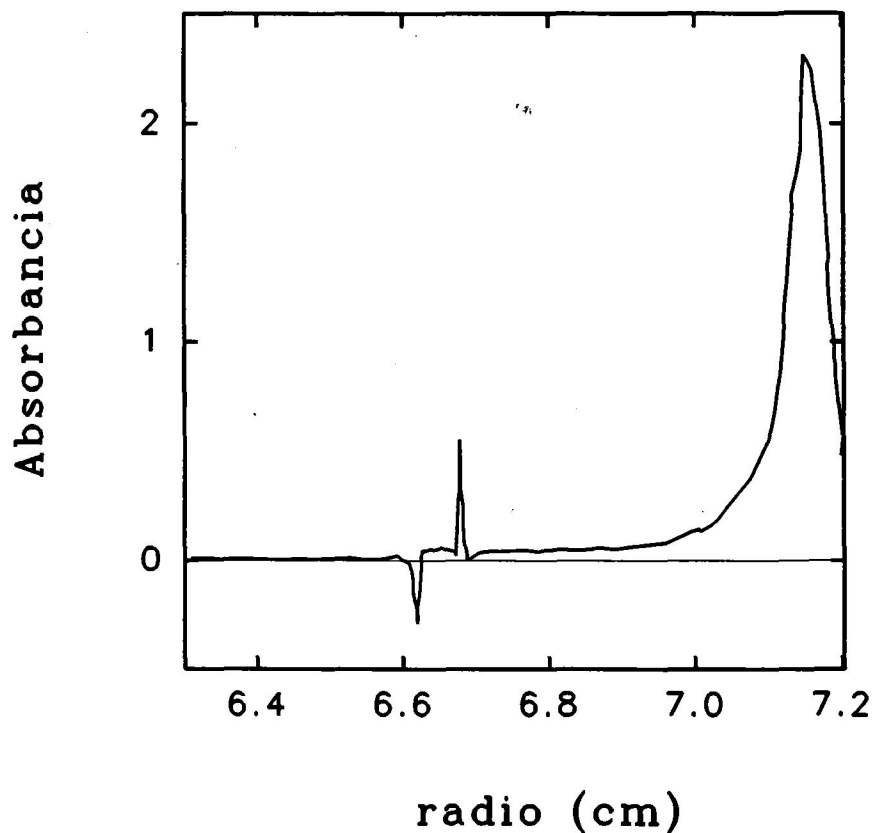


Figura 3.6.3-1: Gráfica de absorbancia frente a la distancia radial para el caso de Hemoglobina en tampón fosfato sódico 5mM y 0.1 M de NaF.

$$A(r) = A(r_0) \exp[\phi M_1 (r^2 - r_0^2)] + A(r_0)^2 \exp[\ln K_2^A + 2 \phi M_1 (r^2 - r_0^2)] + \delta \quad (3.6.3-2)$$

donde K_2^A es la constante de asociación para el equilibrio monómero dímero.

4. FUNDAMENTOS TEORICOS

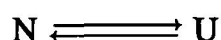
4. FUNDAMENTOS TEORICOS

Bajo ciertas condiciones experimentales de pH, fuerza iónica, etc., el desplegamiento de muchas proteínas simples de bajo peso molecular y algunas proteínas complejas es reversible (Privalov, 1979; 1982), es decir, la proteína recupera su estructura nativa cuando se elimina el agente desnaturizante. Sin embargo, para la gran mayoría de las proteínas el proceso es irreversible no alcanzándose de nuevo el estado plegado al eliminar el agente desnaturizante.

A continuación, se describen los modelos teóricos de equilibrio utilizados en esta memoria para el análisis de las transiciones calorimétricas. Para realizar el análisis termodinámico de las mismas, es necesario que el proceso investigado transcurra en equilibrio termodinámico a lo largo de todo el intervalo de temperatura. Asimismo, se describe el modelo más simple para el tratamiento de procesos irreversibles.

4.1. Modelo de equilibrio de dos estados.

En muchos casos las proteínas globulares pequeñas que despliegan reversiblemente, presentan únicamente dos estados poblados significativamente: el estado nativo (N) con una estructura plegada, y el estados desnaturizado o desplegado (U) (los estados N y U son en realidad "macroestados" formados probablemente por multitud de "microestados" que difieren muy poco en entalpía). Por tanto, el desplegamiento de los mismos, puede describirse adecuadamente según el siguiente esquema:



Los estados N y U se encuentran en equilibrio en todo momento durante el proceso inducido térmicamente. La constante de equilibrio aparente, K, será:
Puesto que no se utilizan actividades en la definición de K, ésta y las demás funciones

$$K = \frac{[U]}{[N]} \quad (4-1)$$

termodinámicas asociadas deben entenderse como aparentes. Las concentraciones molares de proteínas son en cualquier caso muy pequeñas por lo que el valor de estos parámetros aparentes será muy próximo al valor de los verdaderos parámetros termodinámicos.

En general, las propiedades físicas de un sistema dependen del número de moléculas que pueblan cada uno de sus estados accesibles. En el caso de dos estados, las poblaciones relativas o fracciones de las moléculas en el estado nativo y desplegado son:

$$X_N = \frac{[N]}{[N]+[U]} = \frac{1}{(1+K)} \quad X_U = \frac{[U]}{[N]+[U]} = \frac{K}{(1+K)} \quad (4-2)$$

Cualquier propiedad física, $\langle y \rangle$, proporcional a la fracción de moléculas en cada estado que cumpla el principio de superposición, producirá un observable promedio dado por:

$$\langle y \rangle = \langle y_N \rangle X_N + \langle y_U \rangle X_U$$

donde $\langle y_N \rangle$ e $\langle y_U \rangle$ son los valores de la propiedad física para el estado nativo y el desplegado respectivamente.

En el caso de calorimetría diferencial de barrido (DSC), el observable físico es la capacidad calorífica a presión constante, $\langle C_p \rangle$; por integración de la misma, obtenemos la entalpía como observable proporcional a las poblaciones:

$$\langle H \rangle = \langle H_N \rangle X_N + \langle H_U \rangle X_U = \langle H_N \rangle + (\langle H_U \rangle - \langle H_N \rangle) X_U \quad (4-3)$$

teniendo en cuenta que $X_N + X_U = 1$.

Si tomamos como estado de referencia el estado nativo, obtendremos la entalpía

de exceso que vendrá dada por la siguiente ecuación:

$$\langle \Delta H \rangle = \Delta H X_U = \Delta H \frac{K}{(1+K)} \quad (4-4)$$

donde $\langle \Delta H \rangle = \langle H \rangle - \langle H_N \rangle$ y $\Delta H = \langle H_U \rangle - \langle H_N \rangle$ la cual es la entalpía de desnaturalización, definida como la diferencia entre las entalpías del estado desnaturalizado y del estado nativo.

La magnitud que se mide directamente en DSC, la capacidad calorífica a presión constante del sistema, C_p , es la derivada respecto a la temperatura del observable entalpía:

$$\langle C_p \rangle = \left[\frac{\delta \langle H \rangle}{\delta T} \right]_P \quad (4-5)$$

La capacidad calorífica de exceso, al igual que definimos la entalpía de exceso, será:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \langle C_p \rangle - \langle C_p(N) \rangle = \Delta H \left[\frac{\partial X_U}{\partial T} \right]_P + X_U \left[\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right]_P \quad (4-6)$$

o bien:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \Delta H \left[\frac{\partial X_U}{\partial T} \right]_P + X_U \Delta C_p \quad (4-7)$$

donde $\Delta C_p = \langle C_p(U) \rangle - \langle C_p(N) \rangle$, siendo $\langle C_p(U) \rangle$ y $\langle C_p(N) \rangle$ las capacidades caloríficas de los estados U y N, es decir, el valor de las derivadas de las correspondientes entalpías $\langle H_U \rangle$ y $\langle H_N \rangle$.

Sustituyendo en la ecuación anterior las fracciones en función de la constante de equilibrio, a partir de las ecuaciones 4.2, tenemos:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \frac{\Delta H}{(1+K)^2} \left[\frac{\partial K}{\partial T} \right]_P + \frac{K}{(1+K)} \Delta C_p \quad (4-8)$$

y si consideramos que K varía con la temperatura según la ecuación de van't Hoff

$$\left[\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right]_P = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (4-9)$$

tendríamos finalmente:

$$\langle C_p \rangle = \frac{K}{(1+K)^2} \frac{\Delta H^2}{RT^2} + \frac{K}{(1+K)} \Delta C_p \quad (4-10)$$

donde K y ΔH varían 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 la temperatura (Privalov y Khechinashvili, 1974). En la deducción de esta ecuación, hemos aceptado que la entalpía de desnaturalización, ΔH , y de van't Hoff, ΔH^{vH} , son idénticas.

Estas capacidades caloríficas y sus parámetros característicos están representados en la Figura 4.1-1. Como vemos en dicha ecuación, la función $\langle \Delta C_p \rangle$ consta de dos términos. El primero tiene la forma de un pico más o menos estrecho dependiendo del valor de ΔH a $T=T_m$. El segundo es una curva sigmoide con una altura dada por el valor del ΔC_p .

Un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de los datos experimentales a la ecuación 4-10, nos permite determinar los parámetros termodinámicos del proceso T_m , ΔH , ΔS , ΔG y ΔC_p . Sin embargo, hay casos en que la curva de $\langle \Delta C_p \rangle$ experimentales, fuera de los límites de la transición, se ve deformada por diversos efectos tales como agregación de moléculas desnaturalizadas, insuficiente estabilidad en la línea base, etc., dificultándose sobre todo la determinación del ΔC_p . Se puede en estos casos eliminar de forma empírica el término sigmoidal de la ecuación 4-10

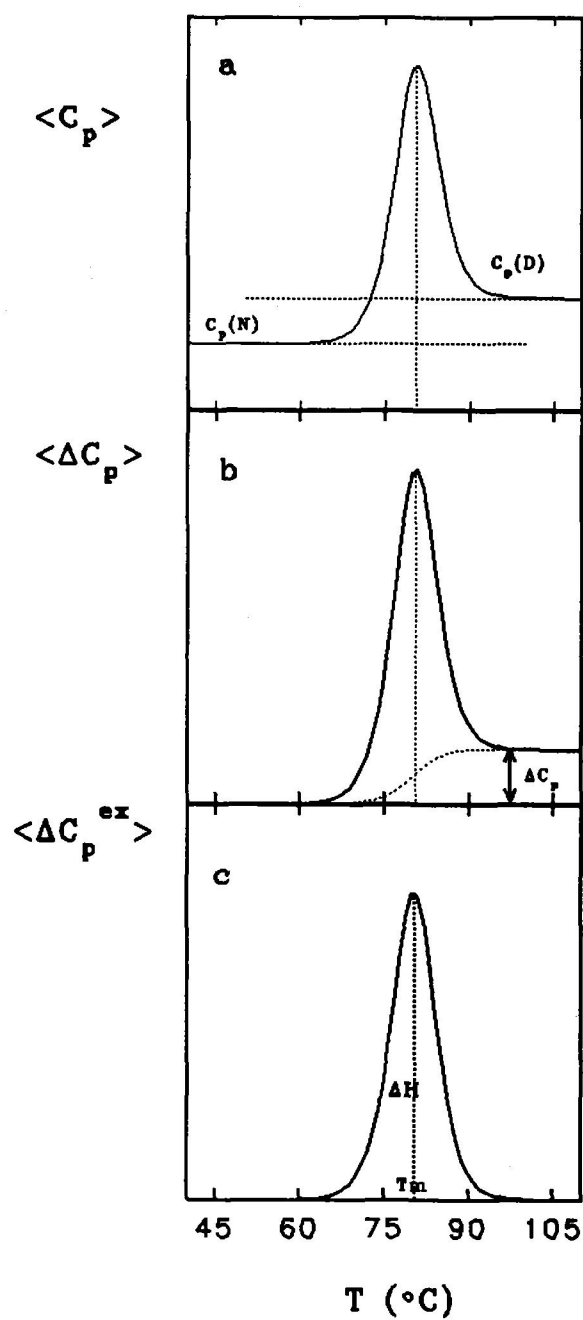


FIGURA 4.1-1: Capacidades caloríficas en el sistema $N \rightleftharpoons D$

mediante el trazado de la línea base química (ver apartado 3.3.4). La función que resulta de esta operación es la capacidad calorífica de exceso total $\langle \Delta C_p^{ex} \rangle$, debida exclusivamente a la absorción de calor por el proceso de desplegamiento de la proteína, sin la contribución debida al ΔC_p (Figura 4.1-1 c). Hemos de hacer notar la diferencia entre la capacidad calorífica de exceso, $\langle \Delta C_p \rangle$ (Figura 4.1-1 d), calculada tomando como referencia el estado nativo como se vio anteriormente, y esta última obtenida mediante la substracción de la línea base química que daría lugar a la capacidad calorífica de exceso total.

$$\langle \Delta C_p^{ex} \rangle = \frac{K}{(1+K)^2} \frac{\Delta H^2}{RT^2} \quad (4-11)$$

En la figura 4.1-1 se muestra la forma simétrica de esta función cuyo máximo corresponde a la temperatura de desplegamiento, T_m . La integración e esta curva extendida a toda la región de la transición se le llama comúnmente entalpía calorimétrica, ΔH^{cal} .

Si no aceptamos a priori la igualdad entre ΔH^{cal} y ΔH^{VH} , la ecuación anterior se debería escribir como

$$\langle \Delta C_p^{ex} \rangle = \frac{K}{(1+K)^2} \frac{\Delta H^{cal} \Delta H^{VH}}{RT^2} \quad (4-12)$$

Teniendo en cuenta que cuando $T=T_m$, $X_D = 0.5$, es decir $K=1$, la capacidad calorífica de exceso presenta su máximo valor

$$\Delta C_p^{máx} = \frac{\Delta H^{cal} \Delta H^{VH}}{4 R T_m^2} \quad (4-13)$$

despejando ΔH^{VH} :

$$\Delta H^{vH} = 4 R T_m^2 \frac{\Delta C_P^{m\acute{a}x}}{\Delta H^{cal}} \quad (4-14)$$

Es decir, es posible calcular la entalpía de van't Hoff a partir de los parámetros que determinan la forma y posición de la curva de capacidad calorífica de exceso total, sin necesidad de conocer la cantidad de masa ni el peso molecular de la proteína que experimenta el cambio conformacional. Únicamente mediante DSC es posible medir de forma directa la entalpía del proceso de desplegamiento térmico de una proteína. Mediante técnicas no calorimétricas sólo es posible determinar la entalpía de van't Hoff, obtenida de la pendiente de la representación del $\ln K$ vs. $1/T$ según la siguiente ecuación:

$$\ln K = - \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \quad (4-15)$$

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 diferente. De hecho, ΔH^{vH} sólo tiene significado físico 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, proporciona una orientación acerca del tipo de proceso que está ocurriendo, como veremos más adelante. Cuando hablemos por lo tanto de entalpía de van't Hoff, nos referiremos siempre a la calculada para un proceso monomolecular.

Una vez que se conocen T_m , ΔH y ΔC_p , dado que $\Delta S(T_m) = \Delta H(T_m) / T_m$, se puede obtener la caracterización termodinámica completa del proceso de desplegamiento de la proteína; así, la DSC nos permite determinar $\langle \Delta C_p \rangle$ como una función continua de la temperatura y calcular los valores de ΔH , Δs y ΔG de

desplegamiento a cualquier temperatura:

$$\begin{aligned}\Delta H(T) &= \Delta H(T_m) + \int_{T_m}^T \Delta C_p(T) dT \\ \Delta S(T) &= \frac{\Delta H(T_m)}{T_m} + \int_{T_m}^T \Delta C_p(T) d \ln T \\ \Delta G(T) &= \Delta H(T) - T \Delta S(T)\end{aligned}\tag{4-16}$$

Si suponemos que ΔC_p es constante con la temperatura (Privalov y Kechinashvili, 1974), las integrales anteriores se resuelven fácilmente para dar:

$$\begin{aligned}\Delta H(T) &= \Delta H(T_m) + \Delta C_p (T - T_m) \\ \Delta S(T) &= \Delta S(T_m) + \Delta C_p \ln \left[\frac{T}{T_m} \right] \\ \Delta G(T) &= \Delta H(T) - T \Delta S(T)\end{aligned}\tag{4-17}$$

Estas funciones están representadas en la Figura 4.1-2 para unos parámetros típicos de una proteína globular pequeña. El incremento de energías de Gibbs de desplegamiento tiene valores pequeños (como máximo unos 50-60 kJ/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 las proteínas es el llamado "Efecto hidrofóbico" (Privalov, 1979; 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, tanto más cuanto mayor es el valor de ΔC_p . El máximo de ΔG se presenta a temperaturas bajas (T_s), cercanas a las fisiológicas, estando en estas condiciones favorecido el estado nativo. El valor de ΔG a esas

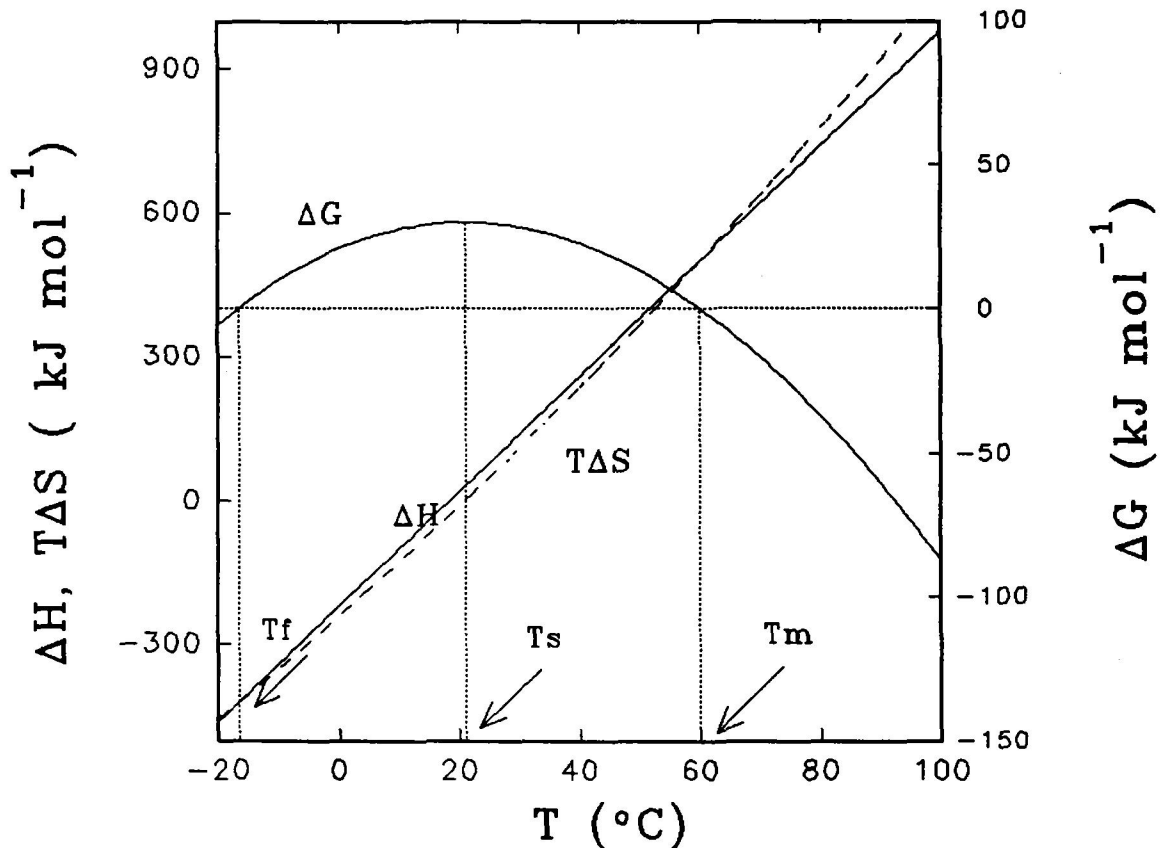


Figura 4.1-2: ΔG , ΔH y ΔS en función de la temperatura calculados mediante las ecuaciones 4.13 para el desplegamiento térmico de una proteína hipotética con los siguientes parámetros: $T_m = 60$ °C, $\Delta H(T_m) = 500$ kJ/mol, $\Delta C_p = 12$ kJ/ K mol. T_f representa la temperatura de desnaturalización "por frío" y T_s la temperatura de máxima estabilidad.

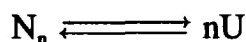
temperaturas constituye una medida de la estabilidad de las proteínas. La curva, corta al eje de abscisas en un valor de $T > T_s$ que corresponde a la temperatura T_m ya definida (para $K(T_m) = 1$). Para valores de T mayores que esta temperatura de transición, la energía de Gibbs de desplegamiento es negativa, lo que implica una desnaturalización espontánea de la proteína. Este cambio de signo en ΔG se produce también en la otra intersección de la curva con el eje de abscisas para la temperatura inferior, T_f , por lo que el enfriamiento del sistema a una temperatura suficientemente baja, da lugar a la denominada desnaturalización "por frío" de la biomolécula (Brandts, 1964). Evidencia experimental de esto se ha encontrado en años recientes

(Privalov et al., 1986; Griko et al., 1988; Azuaga et al., 1992) lo que apoya la validez de los datos de magnitudes termodinámicas determinadas por DSC.

4.2 Transiciones de equilibrio con cambios en el estado de asociación.

Como anteriormente dijimos, la relación $r = \Delta H^{cal}/\Delta H^{vH}$ para un modelo de equilibrio de dos estados es siempre igual a la unidad. Sin embargo, existen casos de transiciones de equilibrio reversibles en donde dicha relación es diferente a la unidad. Así, un valor de $r > 1$, significa que 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. Existen gran cantidad de proteínas formadas por asociación de varias subunidades (proteínas oligoméricas). Esta asociación es en muchos casos indispensable par su función biológica. Otras proteínas monoméricas tienden a formar oligómeros bajo ciertas condiciones experimentales.

Para la desnaturalización disociante de un n-ámero el modelo de equilibrio podría ser (Takahashi y Sturtevant, 1981; Privalov y Pothekin, 1986; Freire, 1989):



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

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

$$X_U = \frac{[U]}{[U] + n[N]} = \frac{K^{1/n} [N_n]^{1/n}}{K^{1/n} [N_n]^{1/n} + n[N_n]} \quad (4.18)$$

De esta expresión puede deducirse la siguiente:

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

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

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

y derivando respecto a la temperatura:

$$\frac{dX_U}{dT} = \frac{nX_U(1-X_U)}{n(1-X_U)+X_U} \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (4.21)$$

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

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

$$\langle \Delta C_p^{ex} \rangle = \frac{\partial(\Delta H X_U)}{\partial T} = \frac{nX_U(1-X_U)}{n(1-x_U)+X_U} \frac{\Delta H^2}{RT^2} \quad (4.22)$$

Mediante la Ecuación 4.22 tras resolución numérica de la Ecuación 4.20, pueden simularse curvas de $\langle \Delta C_p^{ex} \rangle$ para distintos valores de n , lo que se muestra en la Figura 4.2-1. Puede verse que al aumentar el valor de n las transiciones se hacen más agudas y asimétricas. Esto hace que la temperatura del máximo de la transición, T_m , deje de coincidir con $T_{1/2}$, siendo $T_{1/2}$ la temperatura a la que está desnaturalizada la mitad de la proteína.

Se puede demostrar que la relación $r = \Delta H^{cal}/\Delta H^{vH} = (n+1)/2n$, 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 menores que 1, como se indicó anteriormente.

Este tipo de 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):

$$\ln C_T = \text{constante} - \frac{n}{n-1} \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (4.24)$$

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 .

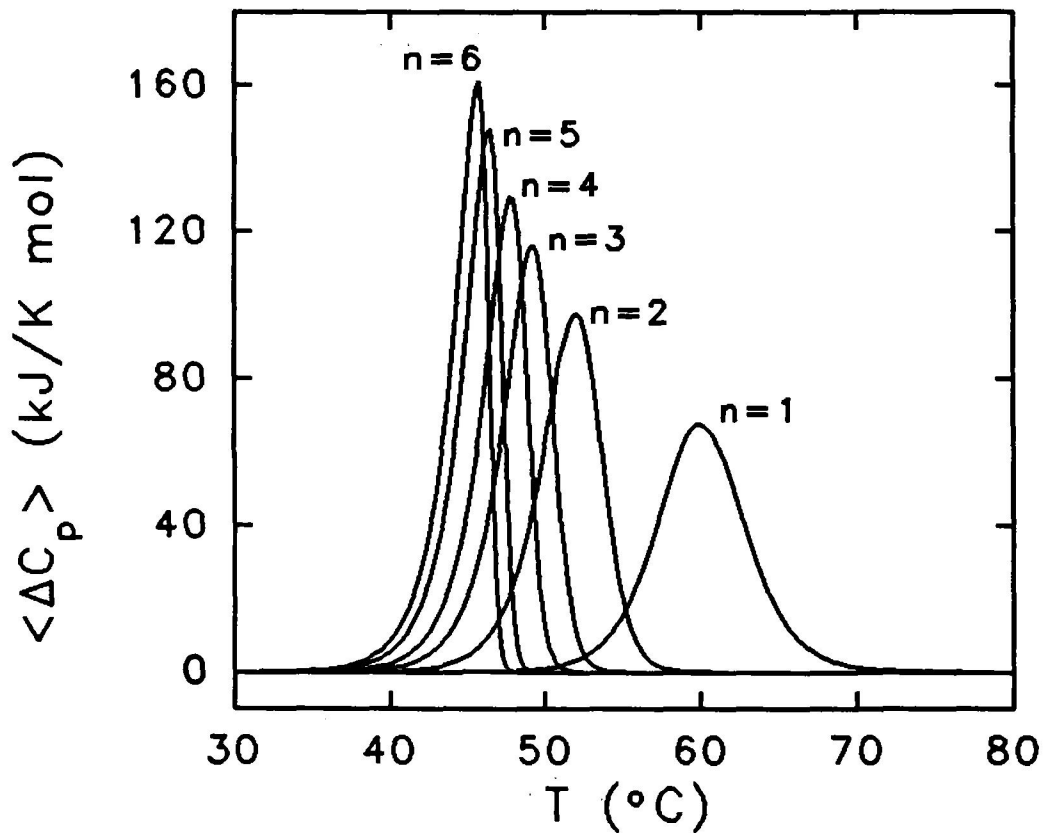


Figura 4.2-1: Curvas de $\Delta C_p, exc$ simuladas mediante las Ecuaciones 4.20 y 4.22 con los distintos valores del grado de asociación, n , que se indican, para una proteína cuyo monómero tiene un peso molecular de 12000 dalton, a una concentración de 1 mg/m., $\Delta H = 500$ kJ/mol de monómero y la temperatura a la que la constante de equilibrio, K , vale 1, $T_{(K=1)} = 60$ °C.

4.3 Interacción proteína-ligando en un equilibrio de dos estados.

La interacción de ligandos a proteínas se puede estudiar desde un punto de vista termodinámico con técnicas desarrolladas para tal fin como la calorimetría de reacción que permite determinar tanto los calores de interacción y variaciones en la capacidad calorífica, como constantes de asociación. Mediante técnicas como fluorescencia, diálisis en el equilibrio etc., se pueden determinar las constantes de la interacción e, incluso, hacer alguna estimación sobre la energética de la interacción, pero en cualquier caso, no hacen una medida directa de la misma.

A partir de los trabajos publicados por Robert et al. (1988), Shrake y Ross (1990; 1992), Brandts y Lin (1990), Straume y Freire (1992), es posible utilizar la calorimetría diferencial de barrido para obtener información termodinámica a cerca de las interacciones proteína-ligando. Estos métodos son indirectos, ya que las constantes de unión, se calculan a partir del efecto de la concentración de ligando sobre la temperatura máxima de la transición, lo que implica el uso de modelos para el proceso de desplegamiento de la proteína.

Existen una serie de ventajas de la técnica de DSC frente al resto de las técnicas de equilibrio. Por un lado y como apuntan Brandts et al. (1989). Estudios sobre proteína multidominios, donde el dominio de unión y un dominio regulador contribuyen a los procesos de unión a ligando, es posible mediante DSC obtener la contribución individual a la energía libre de cada dominio a la constante de unión. Esto permite disponer de información para proteínas de estas características o para otras que tengan dos substratos diferentes como las quinasas. La segunda ventaja, es la medida de constantes de unión muy grandes. En este sentido, los métodos "directos" de equilibrio necesitan que, al menos un 10% del ligando añadido permanezca libre en disolución, lo que requiere que se trabaje con concentraciones de proteína y ligando muy pequeñas y técnicas de detección con una gran sensibilidad.

El DSC a pesar de ser una técnica indirecta, se pueden medir constantes tan grandes como 10^{50} M^{-1} ya que no necesita la existencia de tanta concentración de ligando libre, por lo que no es necesario trabajar a concentraciones anormalmente bajas (Brandts y Lin, 1990).

El modelo que a continuación desarrollamos, es para el caso de una proteína con un único sitio de unión para un ligando y que dicho ligando no presenta transición en DSC.

El proceso que tiene lugar es:



donde PL representa la proteína unida al ligando, L el ligando y P y U la proteína en su estado nativo y desplegado respectivamente. K_d es la constante de disociación y K_U la constante del equilibrio de desplegamiento:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad K_U = \frac{[U]}{[P]} \quad (4.25)$$

Las fracciones de proteína para cada uno de los estados presentes será:

$$X_{PL} = \frac{[PL]}{P_t} \quad X_P = \frac{[P]}{P_t} \quad X_U = \frac{[U]}{P_t} \quad (4.26)$$

donde P_t es la concentración de proteína total. Teniendo en cuenta que $X_{PL} + X_P + X_U = 1$ y haciendo uso de las constantes tenemos que:

$$X_{PL} = \frac{[L]}{K_d Q} \quad X_P = \frac{1}{Q} \quad X_U = \frac{K_U}{Q} \quad (4.27)$$

Q es la función de partición del sistema y es igual a $Q = 1 + K_U + [L]/K_d$.

La concentración de ligando libre se puede calcular teniendo en cuenta que:

$$\begin{aligned} P_t &= [P] + [PL] + [U] \\ [PL] &= L_t - [L] \end{aligned} \quad (4.28)$$

L_t es la concentración de ligando total de tal manera que:

$$[L] = \frac{-B + \sqrt{B^2 + 4C}}{2} \quad (4.29)$$

siendo $B = P_t - L_t + K_d + K_U K_d$ y $C = L_t K_d (1 + K_U)$.

La entalpía del proceso tomando como referencia el estado PL viene dado por

$$\langle \Delta H \rangle = \Delta H_d X_P + (\Delta H_d + \Delta H_U) X_U \quad (4.30)$$

siendo

$$\begin{aligned} \Delta H_d &= \Delta H_d(T^*) + \Delta C_{p,d}(T - T^*) \\ \Delta H_U &= \Delta H_U(T_m) + \Delta C_{p,U}(T - T_m) \end{aligned} \quad (4.31)$$

donde T^* es una temperatura de referencia, $\Delta C_{p,d}$ la capacidad calorífica de disociación y $\Delta C_{p,U}$ es la capacidad calorífica de desplegamiento de la proteína sin ligando.

Finalmente la variación de la capacidad calorífica $\langle \Delta C_p \rangle$ con la temperatura será, tal como definimos anteriormente

$$\langle \Delta C_p \rangle = \left(\frac{\partial \langle \Delta H \rangle}{\partial T} \right)_P \quad (4.32)$$

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 DESPLEGAMIENTO TÉRMICO DE β -LACTOGLOBULINA B.

El desplegamiento térmico de β -Lactoglobulina ha sido bastante estudiado en años anteriores mediante técnicas ópticas (Ananthanarayanan et al., 1977, Harwalidar, 1980b) y DSC (Lapanje y Poklar, 1989, Harwalidar, 1980a), en todo momento el desplegamiento a pH ácido ha sido tratado como un proceso reversible de dos estados. Sólo en algún caso se apunta que, dependiendo de la temperatura que se alcanza y el tiempo de permanencia en ella, el proceso puede hacerse irreversible. Hay que indicar, no obstante, que la gran mayoría de estos estudios se realizaron con instrumentos no muy sensibles que requerían elevadas concentraciones de muestra (> 10 mg/ml) con una limitada fiabilidad en la medida.

En esta memoria realizaremos un estudio del desplegamiento de la variante genética β -Lg B mediante DSC de alta sensibilidad, para evitar las limitaciones de la DSC convencional, verificando en su caso, el carácter dos estados para la desnaturalización a pH ácido.

Por otro lado, y dado el carácter hidrofóbico que presenta esta proteína, llevaremos a cabo experimentos en presencia de un agente desnaturalizantes, como el cloruro de guanidina, para poder obtener la denominada desnaturalización "por frío". Una vez detectada mediante DSC la presencia de una segunda endoterma a bajas temperaturas, confirmaremos mediante CD la existencia de la misma.

5.1.1 Desplegamiento térmico de β -Lactoglobulina a pH ácido.

Se realizaron experimentos de calorimetría a pH ácido en el intervalo 1.5 a 3.0 en tampón fosfato 20 mM, para la variante genética β -Lactoglobulina B (β -Lg B). La desnaturalización térmica a todos los valores de pH estudiado, es reversible como se observa al realizar un segundo barrido de la muestra sin sacarla de la célula calorimétrica (Figura 5.1.1-1) y no existe efecto de la velocidad de barrido sobre la posición del pico de las transiciones calorimétricas. Por lo tanto el desplegamiento en estas condiciones transcurre

β -Lactoglobulina B

en el equilibrio.

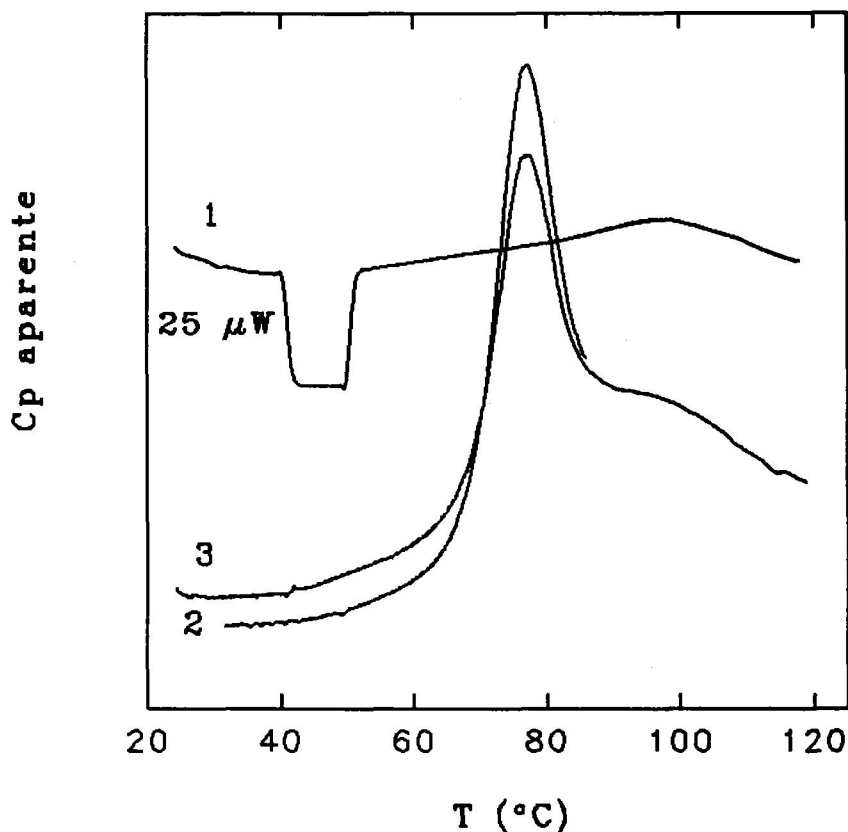


Figura 5.1.1-1: Registros experimentales de DSC. (1) Línea base instrumental con fosfato 20 mM, pH 1.5. Incluye un calibrado eléctrico de 25 μW (2) Primer barrido de la muestra β -Lg B en fosfato 20 mM, pH 1.5 y concentración de muestra 6.4 mg/ml. (3) Segundo barrido con la misma muestra. Todos los registros se han obtenido a una velocidad de 2.0 K/min.

Los parámetros termodinámicos obtenidos del análisis de las transiciones se recogen en la Tabla 5.1.1-I. Como se observa claramente en la misma, conforme aumenta el pH, aumenta ΔH y la T_m , y por tanto la estabilidad de la proteína. La relación de la entalpía calorimétrica a la de van't Hoff (r) calculada para el modelo de dos estados monomolecular, en todos los casos es próxima o igual a la unidad (Tabla 5.1.1-I). No existe efecto de concentración sobre las transiciones calorimétricas, lo cual indica que el proceso que tiene lugar es monomolecular, hecho confirmado por ultracentrifugación analítica y por el valor

β -Lactoglobulina B

de r que es próximo a la unidad y no menor como ocurre en procesos de asociación molecular. En la Tabla siguiente se recogen los valores medios obtenidos para cada uno de los pH:

pH	T _m (°C)	ΔH(kJ/mol)	ΔC _p (kJ/Kmol)
1.5	76.3	368	15.0
2.0	79.5	395	12.5
2.5	84.7	402	14.5
3.0	87.8	411	9.7

En la Figura 5.1.1-2 se representa la capacidad calorífica molar parcial para la proteína a diferentes valores de pH, calculada a partir de la ecuación:

$$C_{p,p}(T) = C_{p,s}(T) \frac{V_p(T)}{V_s(T)} - \frac{\Delta C_p^{\text{ap}}(T)}{m_p(T)}$$

en la que $C_{p,p}$ y $C_{p,s}$ son las capacidades caloríficas de la proteína y del solvente respectivamente, V_p y V_s los volúmenes molares parciales de proteína y solvente, ΔC_p^{ap} es la diferencia de capacidad calorífica entre la célula que contiene la muestra y la célula que contiene la proteína, y finalmente m_p es la cantidad de proteína en la célula calorimétrica (Privalov y Potekhin, 1986). El volumen molar parcial utilizado es de 0.73 mL/mg (valor medio para proteínas globulares compactas) (Privalov y Kechinashvili, 1974).

La capacidad calorífica específica parcial de la proteína a 20 °C es (1.5 ± 0.2) J/K g, calculada a partir del tramo inicial de las transiciones calorimétricas, que concuerda con los valores dados en la bibliografía para proteínas globulares (1.3 ± 0.2) J/K g (Privalov y Khechinashvili, 1974). La variación de la capacidad calorífica del estado nativo, $C_p(N)$, es una función lineal de la temperatura con pendiente $6.7 \cdot 10^{-3}$ J/K² g mientras que el valor

TABLA 5.1.1-I

Parámetros termodinámicos de la desnaturalización térmica de la variante genética B a diferentes concentraciones y pH en tampón fosfato 20mM, velocidad de barrido 2 K/min.

pH	C (mg/ml)	T _m (°C)	ΔH^{cal} (kJ/mol)	ΔH^{vH} (kJ/mol)	r	ΔC_p (kJ/K mol)
1.5	3.65	76.5	374	380	0.98	15
	6.40	76.2	366	368	0.99	13*
	6.75	76.1	364	375	0.97	16
2.0	4.00	79.9	404	397	1.02	12
	5.22	79.8	395	395	1.00	13
	5.25	79.3	388	403	0.96	12
	10.24	79.2	394	410	0.96	13*
2.5	7.00	84.9	400	397	1.01	14
	7.50	84.6	405	406	1.00	15
3.0	4.18	88.2	394	380	1.04	9.5
	4.85	87.4	389	419	0.93	6.3
	4.35	88.0	425	378	1.13	10
	5.22	88.0	417	416	0.99	8.5
	5.74	87.8	433	408	1.06	12
	8.10	87.6	410	414	1.01	12

* Experimentos realizados a una velocidad de barrido de 1 K/min.

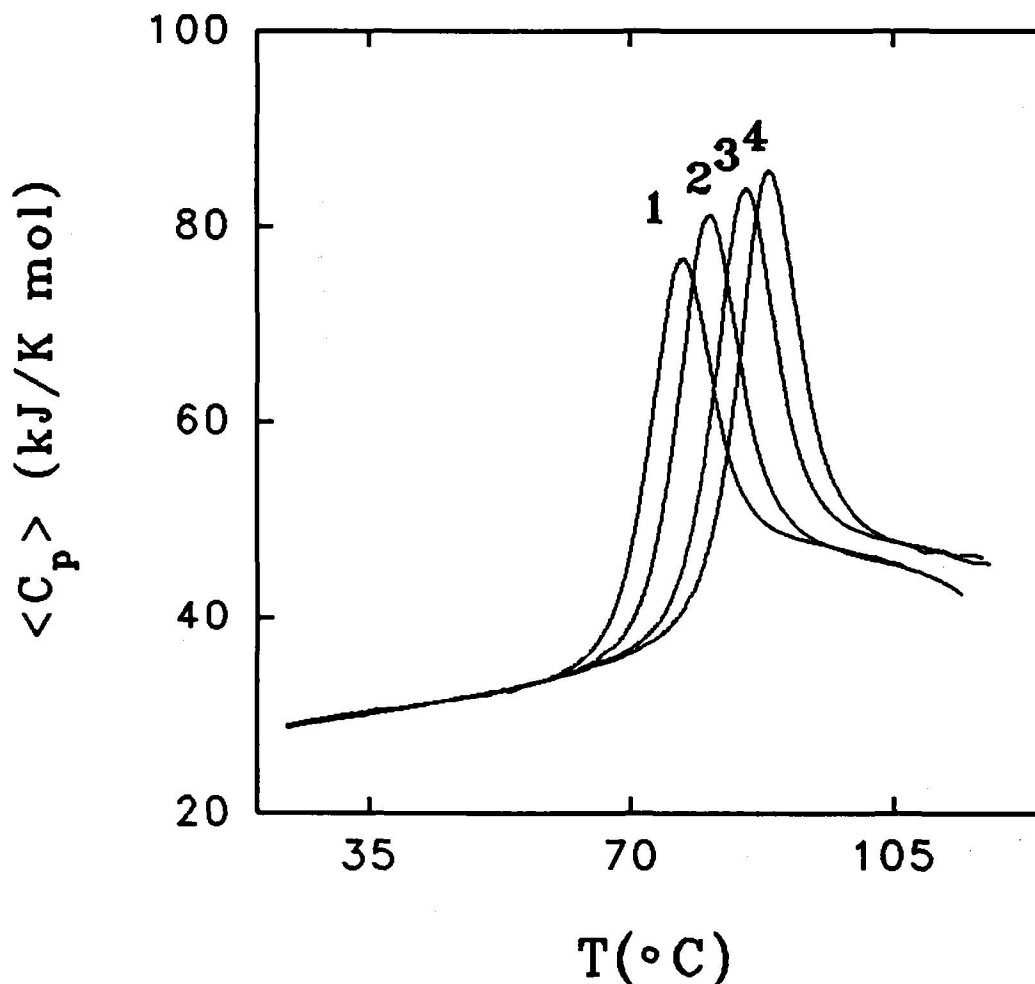


Figura 5.1.1-2: Capacidad calorífica molar parcial de la variante genética B en fosfato 20 mM, velocidad de barrido 2 K/min, a diferentes valores de pH: (1) 1.5; (2) 2.0; (3) 2.5; y (4) 3.0.

medio para proteínas globulares es de $(7.5 \pm 2) \text{ J/K}^2 \text{ g}$ (Privalov et al, 1989). A la vista de estos resultados, se puede concluir, en principio, que el comportamiento de β -Lg B antes de la transición calorimétrica es similar al de otras proteínas globulares.

La variación de la entalpía calorimétrica con la temperatura (Figura 5.1.1-3), es una función no es lineal de la misma. La pendiente a una temperatura dada corresponde al incremento de la capacidad calorífica. Esto significa que el cambio de capacidad calorífica

β -Lactoglobulina B

de desplegamiento de la proteína es también una función dependiente de la temperatura, la

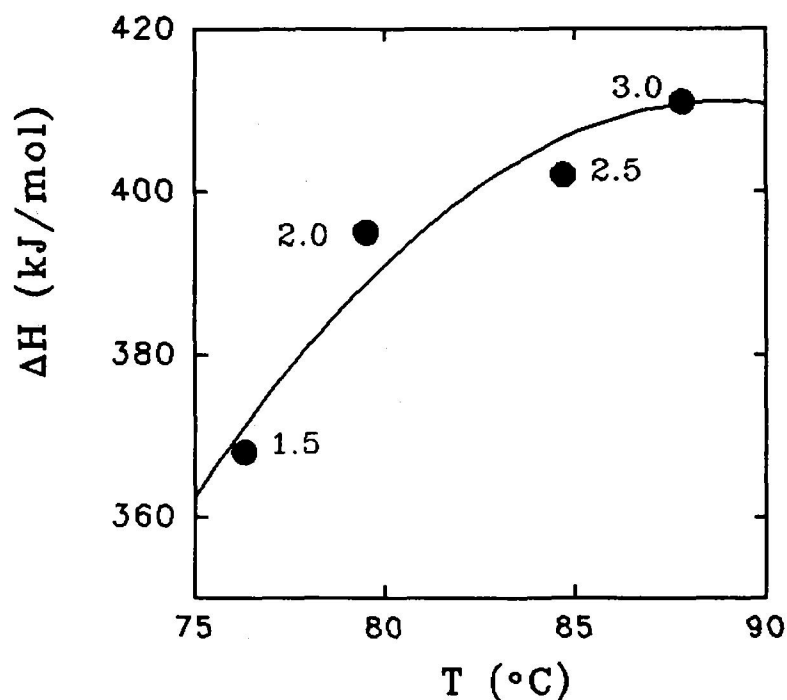


Figura 5.1.1-3: Dependencia de la entalpía de desnaturalización en función de la temperatura. Los círculos representan los datos experimentales para los diferentes valores de pH indicados. La línea representa la regresión lineal a un polinomio de segundo grado.

cual decrece conforme aumenta ésta. Esta variación de C_p ha sido descrita para otras proteínas (Privalov et al., 1990; Privalov et al., 1992). Sin embargo, la curvatura que muestra la entalpía de desplegamiento con la temperatura es muy pronunciada, teniendo en cuenta el intervalo tan estrecho de temperatura. En la Figura 5.1.1-3 se ha realizado un ajuste a una función cuadrática a modo de ejemplo, pero, cualquier otra función podría ajustar los datos satisfactoriamente. Por otro lado, hemos de hacer notar, que los valores de entalpía encontrado para esta proteína son bajos comparados con otras proteínas de tamaño parecido. Así, Mioglobina (17.9 Kda) tiene una entalpía de desplegamiento a una temperatura de 90 °C de 4.2 kJ/K (mol de residuo) (Privalov y Kechinasvili, 1974), mientras que β -Lg B a esa misma temperatura es sólo de 2.5 kJ/K (mol de residuo). Claramente este valor de entalpía es muy bajo, por lo que debe existir algún proceso concomitante con el proceso de

β -Lactoglobulina B

desplegamiento que origine esta disminución en el valor de ΔH .

El número de protones que se liberan en el desplegamiento de la proteína, puede ser calculado a partir de la variación de la temperatura de transición (T_m) con el pH (Privalov et al., 1969), según la ecuación:

$$\Delta_i \nu = - \frac{\Delta H^{cal} (T_m)}{2.303RT_m^2} \frac{d T_m}{d pH}$$

Para el caso de β -Lg B a una temperatura media de 83 °C, el valor obtenido fue de 1.3 ± 0.2 , que de acuerdo con March et al. (1982), el grupo titulado en este rango de pH es el grupo carboxilo-terminal. El efecto de la ionización de ese grupo está compensada por los efectos de ionización del tampón utilizado (Privalov y Pothekin, 1986; Privalov et al., 1986). Además, los tampones utilizados en los experimentos tienen entalpías de ionización cercanas a cero. Esto significa que la medida experimental de la entalpía corresponde únicamente a la entalpía de la transición conformacional y no incluye efectos de ionización.

En una primera aproximación, las transiciones calorimétricas se ajustaron al modelo más sencillo posible, es decir, se ajustaron al modelo de equilibrio de dos estados, ya que el proceso de desplegamiento es reversible, r es próximo a la unidad y no existe efecto de concentración sobre las transiciones calorimétricas, siendo un proceso monomolecular como se ha propuesto y aceptado en la bibliografía (Anantharayanan et al, 1977; Harwalkar, 1980a; Lapanje y Poklar, 1989; Griko y Privalov, 1992). Los ajustes al modelo se representan en la Figura 5.1.1-4, donde se puede observar que son relativamente buenos, aunque existen desviaciones a bajas y altas temperaturas. En la Tabla siguiente se recogen los parámetros obtenidos de tales ajustes, que concuerdan muy bien con los experimentales:

pH	C(mg/ml)	T_m (°C)	ΔH (kJ/mol)
1.5	6.40	76.5	365
2.0	5.22	80.1	391
2.5	7.50	84.5	402
3.0	5.74	87.8	418

β -Lactoglobulina B

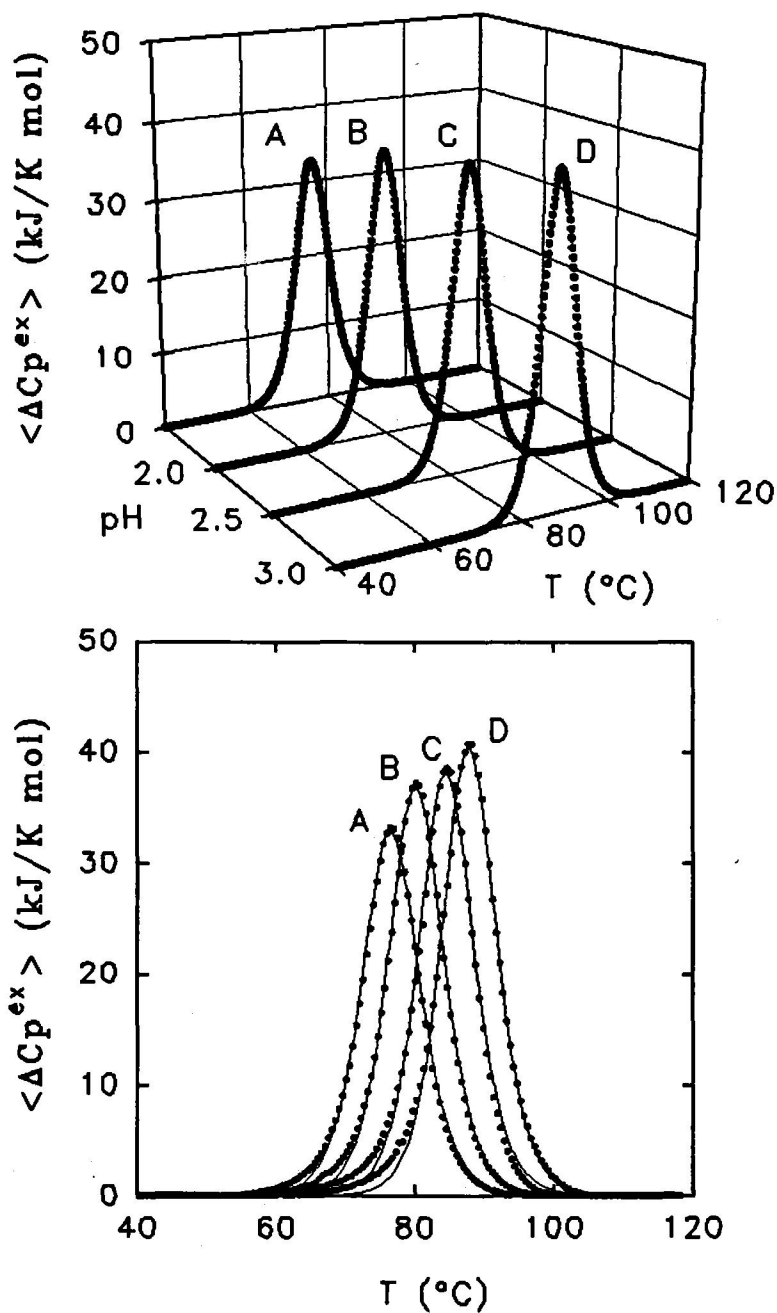


Figura 5.1.1-4: Capacidad calorífica de exceso de β -Lg B en fosfato 20 mM a diferentes valores de pH: A, 1.5; B, 2.0; C, 2.5; D, 3.0. Gráfica superior: representación tridimensional de las curvas ajustadas al modelo de dos estados. Gráfica inferior: datos experimentales (curvas de puntos) y curvas teóricas ajustadas al modelo de dos estados (curvas de trazo continuo).

β -Lactoglobulina B

Un hecho significativo que se observa en la Tabla 5.1.1-I es la variación del ΔC_p con el pH, lo cual es contrario a lo descrito en bibliografía (Privalov y Kechinashvili, 1974). Además, su valor es muy elevado comparado con otras proteínas globulares (0.16 cal/K g para mioglobina y 0.19 cal/K g para β -Lg B) y con la entalpía calorimétrica del proceso, que como indicamos anteriormente es muy pequeña para una proteína del tamaño de β -Lg y de su compacidad. Por otro lado, de la representación de ΔH frente a T_m , se obtiene de la regresión lineal a la misma, una pendiente de 4 kJ/K mol, valor mucho más bajo que el que se obtiene del análisis de las transiciones calorimétricas. β -Lg es una proteína muy hidrofóbica, semejante a mioglobina, pero el ΔC_p determinado de las transiciones calorimétricas es demasiado elevado para ser justificado sólo teniendo en cuenta su carácter hidrofóbico. De tal manera que, si se realiza una simulación con los parámetros de la Tabla anterior, según el modelo de equilibrio de dos estados (Figura 5.1.1-5) se observa la aparición de un segundo pico a menor temperatura correspondiente a la denominada desnaturalización "fría".

Este segundo pico, aparecería a temperaturas superiores a los 20°C, temperatura accesible caloriméricamente, sin embargo como se observa en la Figura 5.1.1-2 no está presente en los experimentos realizados a los diferentes valores de pH. Esto indica, que los valores de entalpía y de ΔC_p no son correctos, y que tanto la entalpía del proceso de desplegamiento como este último valor están afectados por otro proceso que tiene lugar a altas temperaturas como ya apuntamos anteriormente.

Es posible a partir de la estructura tridimensional de la proteína, calcular los parámetros termodinámicos de su desplegamiento (Murphy et al, 1992), mediante el cálculo de las superficies accesibles polares (A_{pol}) y apolares (A_{ap}) según las siguientes ecuaciones:

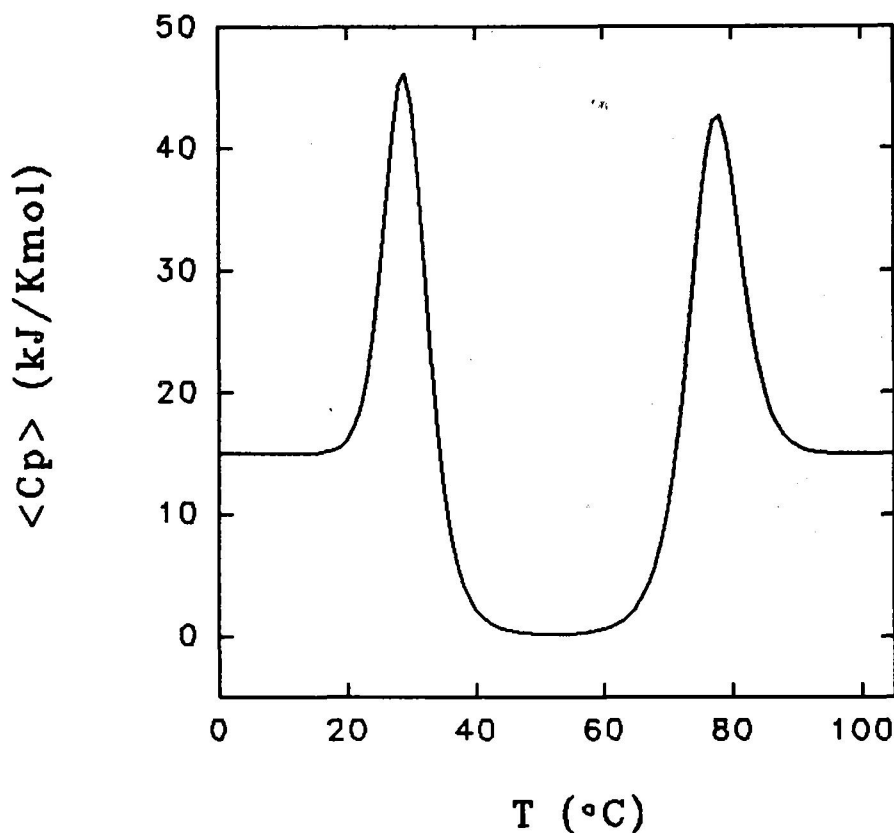


Figura 5.1.1-5: Curva de capacidad calorífica simulada con los parámetros de desplegamiento de β -Lg B a pH 1.5, según el modelo de equilibrio de dos estados.

$$\Delta c_p = (0.45 \pm 0.002) \text{ cal K}^{-1} (\text{mol} \cdot \text{Å}^2)^{-1} \Delta A_{ap} + (-0.26 \pm 0.003) \text{ cal K}^{-1} (\text{mol} \cdot \text{Å}^2)^{-1} \Delta A_{pol}$$

$$\Delta H = (34.3 \pm 1) \text{ cal} (\text{mol} \cdot \text{Å}^2)^{-1} \Delta A_{pol} + \Delta C_p (T - 100^\circ \text{C})$$

$$\Delta S = (4.3 \pm 0.1) \text{ cal K}^{-1} (\text{mol} \cdot \text{Å}^2)^{-1} N_{resid.} + \Delta C_p \ln(T/112^\circ \text{C})$$

donde ΔA_{pol} y ΔA_{ap} son el incremento en superficies internas polares y apolares. Para el caso de β -Lg B el cálculo de las mismas se realizó con los programas ACCES y JUMRSF en el

β -Lactoglobulina B

laboratorio de E. Freire (Baltimore, U.S.A.), obteniéndose los valores de $6329.8 \text{ (mol-Å}^2\text{)}^{-1}$ y $8695.6 \text{ (mol-Å}^2\text{)}^{-1}$ respectivamente.

Los valores obtenidos para esta proteína según las ecuaciones anteriores fueron: ΔC_p de 9 kJ/K mol y los valores del ΔH a cada pH se recogen en la siguiente Tabla:

pH	T _m (°C)	ΔH (kJ/Kmol)
1.5	76.5	685
2.0	80.1	719
2.5	84.5	761
3.0	87.8	792

Si se compara esta Tabla con los datos experimentales, se aprecia claramente como el valor de ΔC_p es menor que el encontrado experimentalmente y como los valores de ΔH son sin embargo superiores a los mismos. Confirmando lo anteriormente dicho, aunque hay que tener en cuenta que estos valores son meramente orientativos.

Todo lo expuesto anteriormente, nos lleva a la conclusión que el desplegamiento de esta proteína es mucho más complicado que el "todo o nada" del modelo de equilibrio de dos estados. Dado que el comportamiento a bajas temperaturas es aparentemente coherente con el de otras proteínas globulares, debe existir un proceso a altas temperaturas que está ocasionando la desviación del desplegamiento de la proteína del modelo de equilibrio de dos estados.

Se llevaron a cabo una serie de experimentos para intentar conocer la naturaleza del proceso que ocurre a altas temperaturas. Cuando la proteína se calienta sólo hasta 97 °C , se enfría y se vuelve a calentar, el proceso es reversible; sin embargo, cuando el calentamiento se realiza hasta 120 °C el proceso es irreversible (Figura 5.1.1-6).

β -Lactoglobulina B

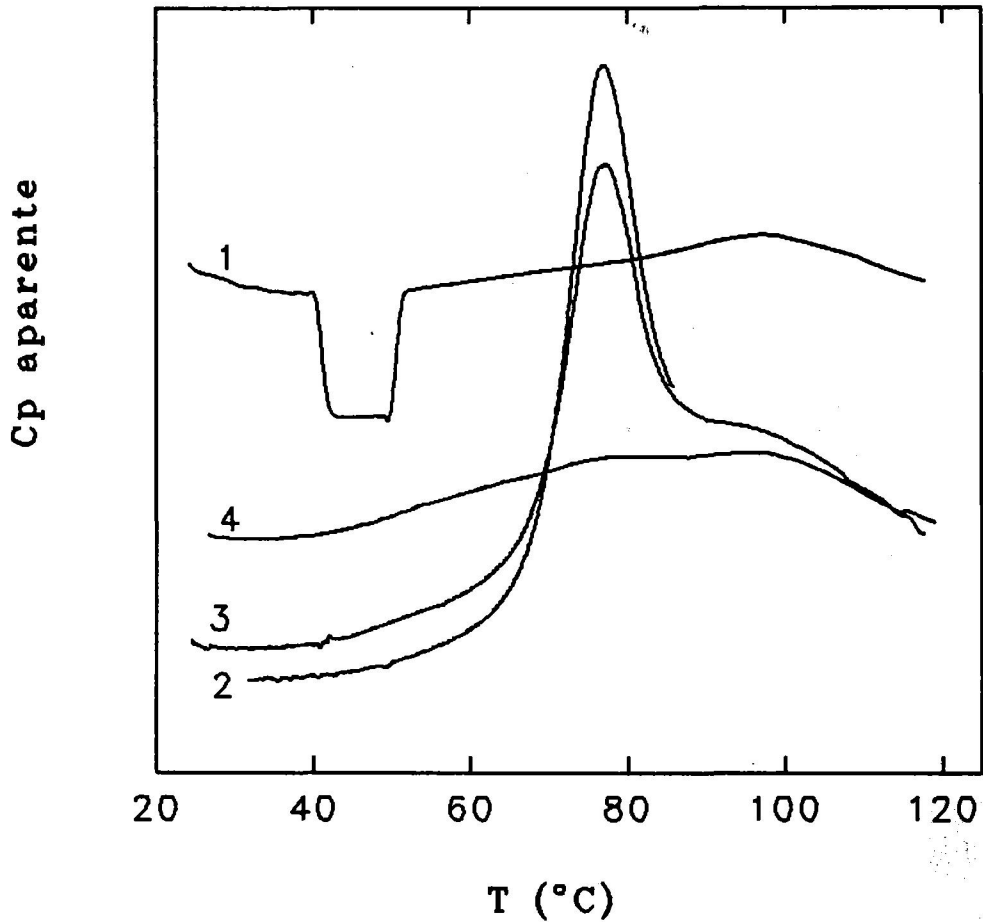


Figura 5.1.1-6: Registros experimentales de DSC. (1) Línea base instrumental obtenida con tampón fosfato 20 mM, pH 1.5. Contiene un calibrado de 25 μ W; (2) primer barrido con la muestra de β -Lg B en fosfato 20 mM, pH 1.5, hasta 87 °C; (3) segundo barrido con la muestra hasta 120 °C; (4) tercer barrido con la misma muestra.

Este proceso irreversible debe de estar controlado cinéticamente. En la Figura 5.1.1-7, se muestra el efecto de la velocidad de barrido sobre el desplegamiento de β -Lg B a pH 3.0. Si bien, no existe efecto apreciable sobre el máximo de la transición (como se indicó anteriormente), si se observa como la pendiente de la misma a altas temperaturas se va haciendo cada vez mayor. Esto, en principio, indicaría que existe un proceso irreversible,

β -Lactoglobulina B

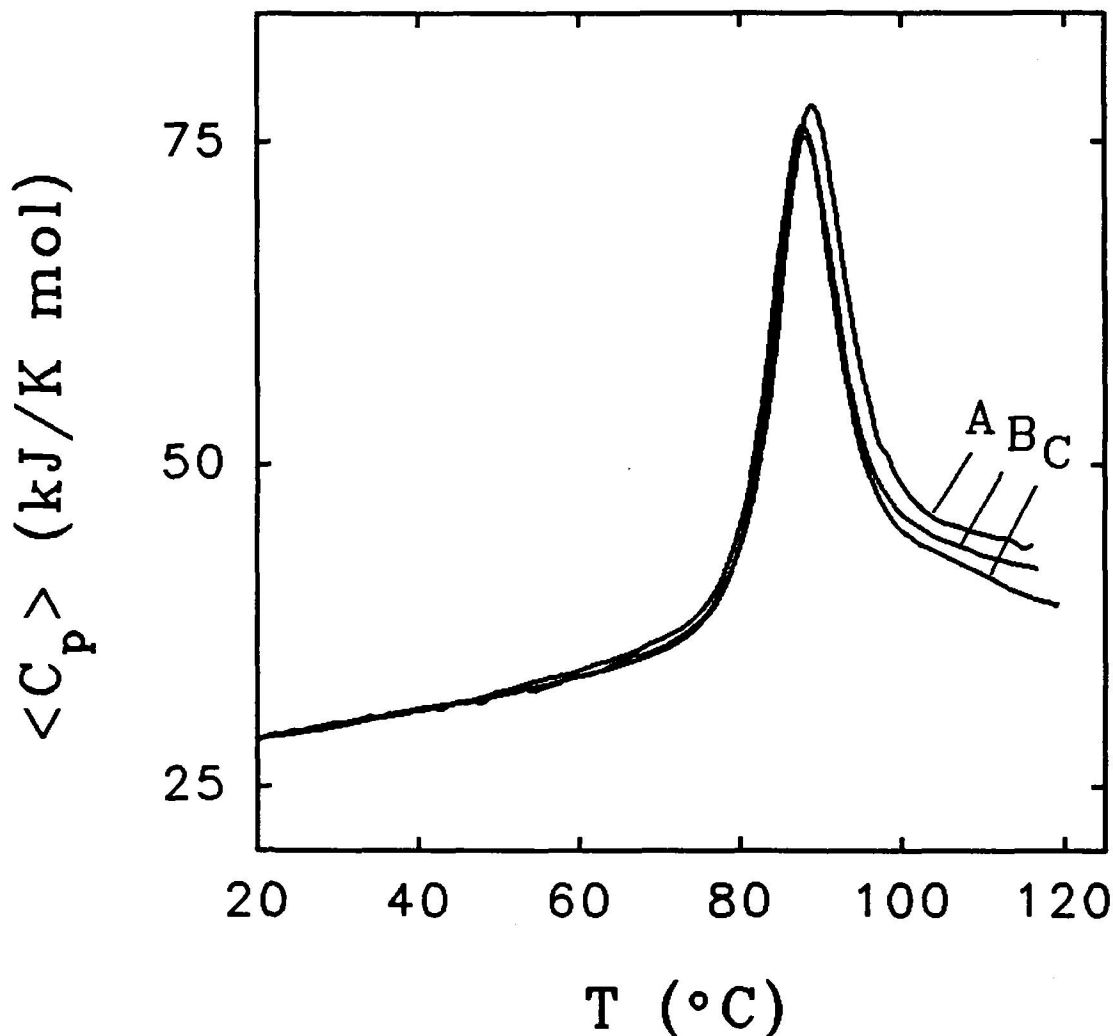


Figura 5.1.1-7: Capacidad calorífica molar parcial de β -Lg B en fosfato 20 mM, pH 3.0, concentración 5.88 mg/ml y diferentes velocidades de barrido: A, 2 K/min.; B, 1 K/min y C, 0.5 K/min.

y por tanto controlado cinéticamente, de carácter exotérmico a altas temperaturas que afectaría al desplegamiento de la proteína.

Experimentos de electroforesis en SDS (Figura 5.1.1-8) y de ultracentrifugación analítica de la proteína calentada a diferentes temperaturas, muestran como al subir por encima de los 100 $^{\circ}\text{C}$, tiene lugar la aparición de péptidos de menor peso molecular, tanto

β -Lactoglobulina B

más cuanto mayor es la temperatura a la cual se calienta la proteína. Posiblemente a estas temperaturas se produce una hidrólisis ácida de la proteína. Sin embargo, esto no justifica desde un punto de vista energético la pendiente negativa de las transiciones calorimétricas.

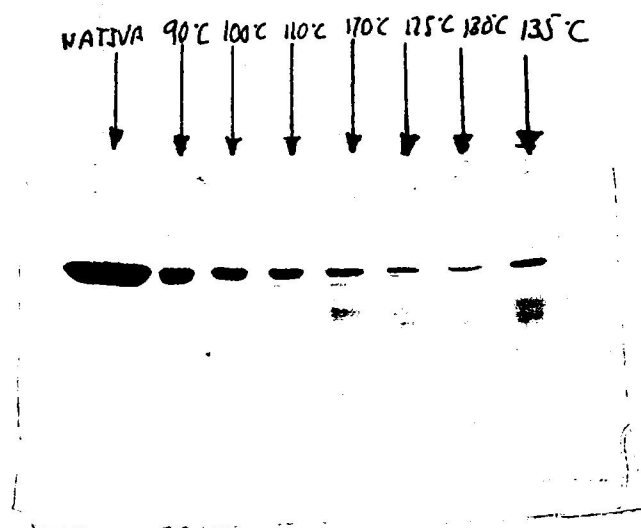


Figura 5.1.1-8: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de β -Lg B calentada a diferentes temperaturas.

Un modelo posible de análisis de estas transiciones podría ser el modelo de Lumry-Ewing:



según el cual a parte del proceso de equilibrio tipo dos estados, tendríamos un proceso irreversible desde el estado U al estado final F. Este modelo se había aplicado hasta el momento, suponiendo una entalpía para la etapa irreversible despreciable. Sin embargo, hemos ampliado el desarrollo matemático, considerando la existencia de un efecto térmico en de la etapa irreversible. De tal manera que la entalpía de exceso, del proceso global vendrá dada por:

β -Lactoglobulina B

$$\langle \Delta H \rangle = X_U \Delta H_U + X_F (\Delta H_F + \Delta H_U) \quad (5.1.1-1)$$

y teniendo en cuenta que $X_N + X_U + X_F = 1$, nos queda

$$\langle \Delta H \rangle = \Delta H_U (1 - X_N) + X_F \Delta H_F \quad (5.1.1-2)$$

La capacidad calorífica de exceso será por tanto:

$$\langle \Delta C_p^{ex} \rangle = - \Delta H_U \frac{dX_N}{dT} + \Delta H_F \frac{dX_F}{dT} \quad (5.1.1-3)$$

y teniendo en cuenta la variación de las fracciones molares con la temperatura según las ecuaciones 4.4-7 y 4.4-8, finalmente se obtiene:

$$\begin{aligned} \langle \Delta C_p^{ex} \rangle = & \left[\frac{K \Delta H_U}{(1+K)^2} \left(\frac{K}{V} + \frac{\Delta H_U}{R T SUBP 2} \right) + \Delta H_F \frac{1}{V} \frac{k_F K}{(1+K)} \right] * \\ & * \exp \left(- \frac{1}{V} \int_{T_0}^T \frac{k_F K}{(1+K)} dT \right) \end{aligned} \quad (5.1.1-4)$$

Recientemente este mismo desarrollo ha sido aplicado al caso de la proteína Azorin (Milardi et al., 1994).

Simulaciones realizadas según este modelo (ecuaciones desarrolladas en el apartado 4.4), suponiendo una entalpía negativa para el proceso irreversible distinta de cero, dado que nuestras transiciones calorimétricas presentan pendientes de salida negativas que corresponden a un proceso exotérmico, se muestran en la Figura 5.1.1-9. En esta Figura se puede apreciar, como conforme disminuye la velocidad de barrido, es posible observar la exoterma a altas temperaturas dentro del intervalo accesible calorimétricamente y por otro lado como la velocidad de barrido no afectaría a la posición del máximo de la transición, como ocurre en nuestras condiciones experimentales.

A raíz de las simulaciones anteriormente descritas, se realizaron experimentos en aquellas condiciones donde se obtuviera la menor temperatura de transición y a la velocidad de barrido más baja posible. En la Figura 5.1.1-10 se recoge un experimento de β -Lg B a pH 1.5 y velocidad de barrido 0.25 K/min. Es evidente en este experimento, la aparición de una exoterma a altas temperaturas, que sin embargo, no puede ser obtenida en su totalidad. Dicha traza calorimétrica no es ajustable por el modelo anteriormente expuesto, lo que nos lleva a concluir que el proceso que ocurre a altas temperaturas, posiblemente sea mucho más complejo y conlleve procesos de agregación o alteraciones intramoleculares como ya proponían otros autores en la bibliografía (Harwalkar et al., 1980a; Lapanje y Poklar, 1989) y como se comprobó mediante electroforesis, la presencia de péptidos conforme se aumentaba la temperatura (Figura 5.1.1-8)

No obstante, y dado que no conseguimos observar la exoterma en su totalidad, nos planteamos realizar experimentos a pH alcalino, en donde según la bibliografía, la proteína es menos estable (Casal et al., 1988), y de esta manera poder bajar la temperatura del máximo de la transición y también desplazar a su vez la exoterma a bajas temperaturas.

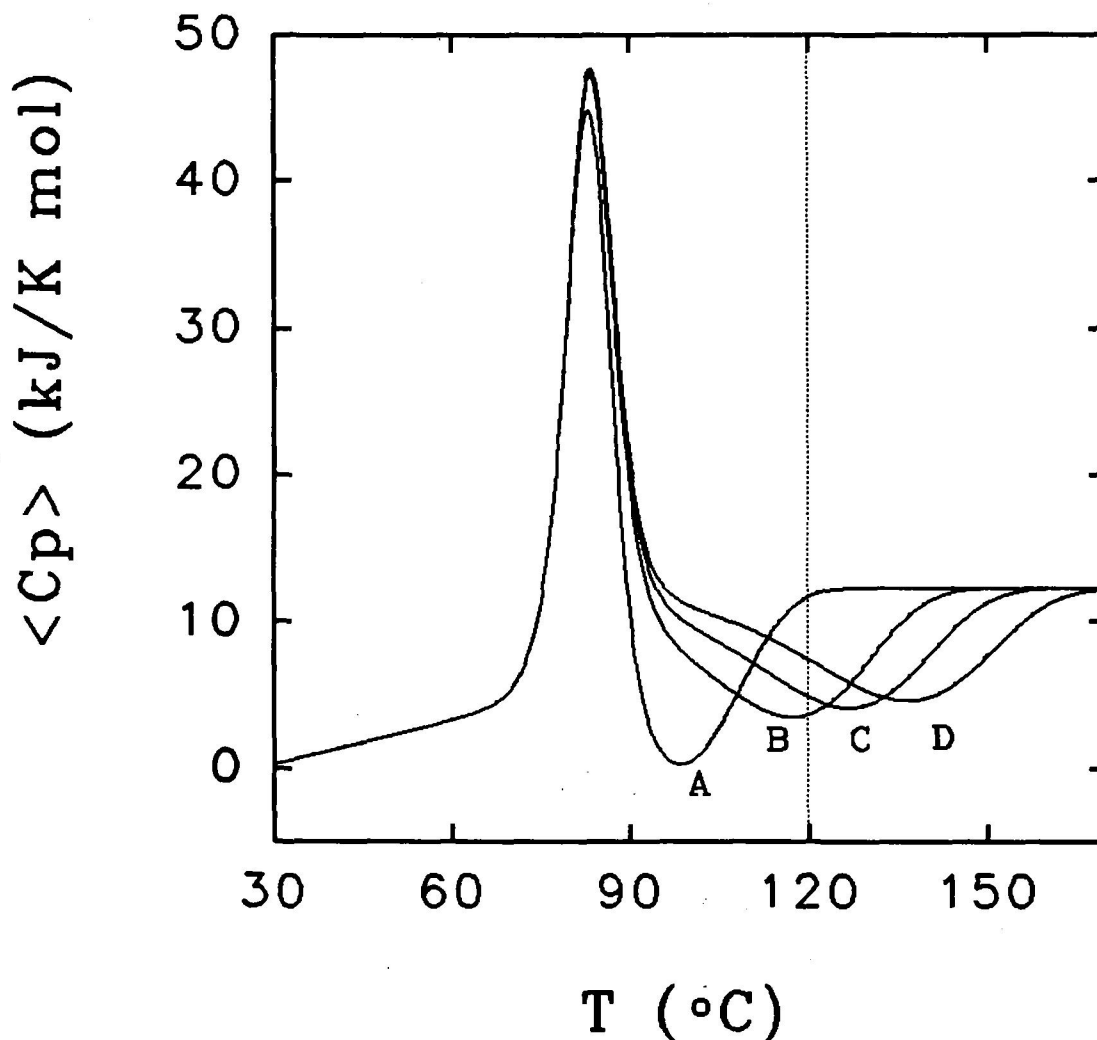


Figura 5.1.1-9: Perfiles de capacidad calorífica para β -Lg a pH 2.25, simuladas suponiendo el modelo $N \rightleftharpoons U \longrightarrow F$ con los parámetros siguientes: entalpía de desplegamiento (ΔH_U) = 405 kJ/K mol, T_m = 83 °C, C_p^N = 0.1 kJ/K² mol ($T=300K$), C_p^D = 12 kJ/K mol - 0.5 kJ/ K² mol ($T=350K$), energía de activación (E) = 90 kJ/mol, constante de velocidad (k) a 445 K = 1 y entalpía de la etapa irreversible (ΔH_p) = -300 kJ/mol. Velocidades de barrido; A, 0.1 K/min; B, 0.5 K/min; C, 1 K/min y D, 2 K/min. La línea de puntos corresponde a la máxima temperatura alcanzada experimentalmente.

β -Lactoglobulina B



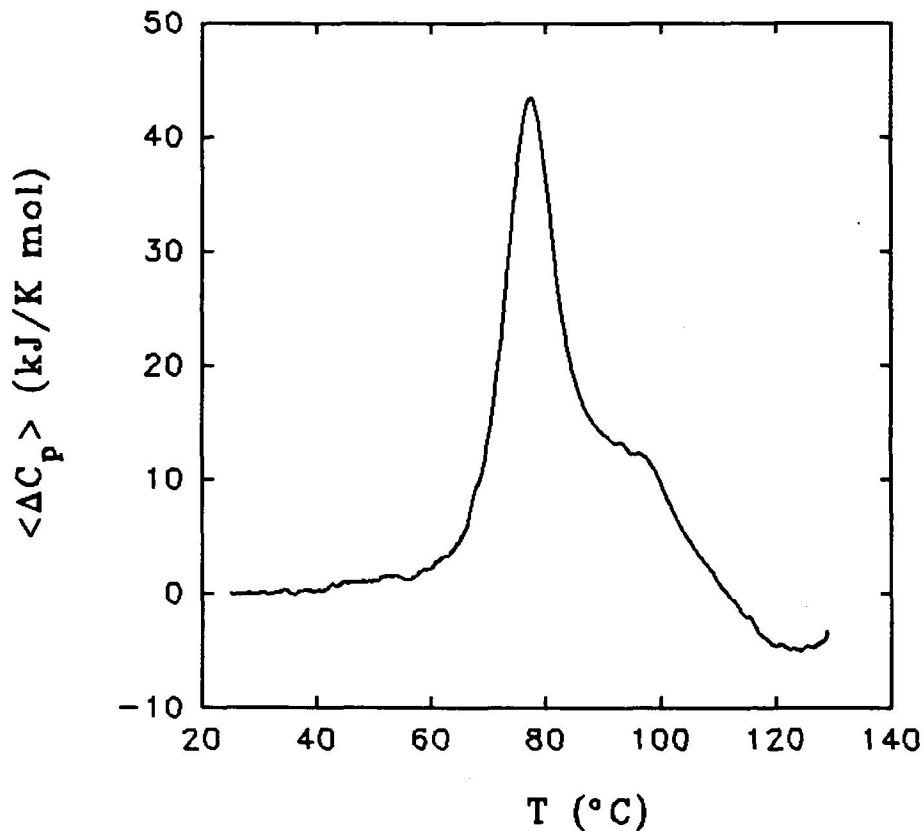


Figura 5.1.1-10: Capacidad calorífica de β -Lg B en fosfato 20 mM, pH 1.5 y velocidad de barrido 0.25 K/min.

En la Figura 5.1.1-11 A, se muestra un experimento de β -Lg B a diferentes velocidades de barrido y en la misma Figura la gráfica B a diferentes concentraciones de proteínas. El proceso que ocurre a altas temperaturas, a raíz de los resultados, está afectado tanto por la velocidad de barrido como por la concentración de muestra. El proceso irreversible, no es monomolecular y por lo tanto abordar su análisis es sumamente complicado.

β -Lactoglobulina B

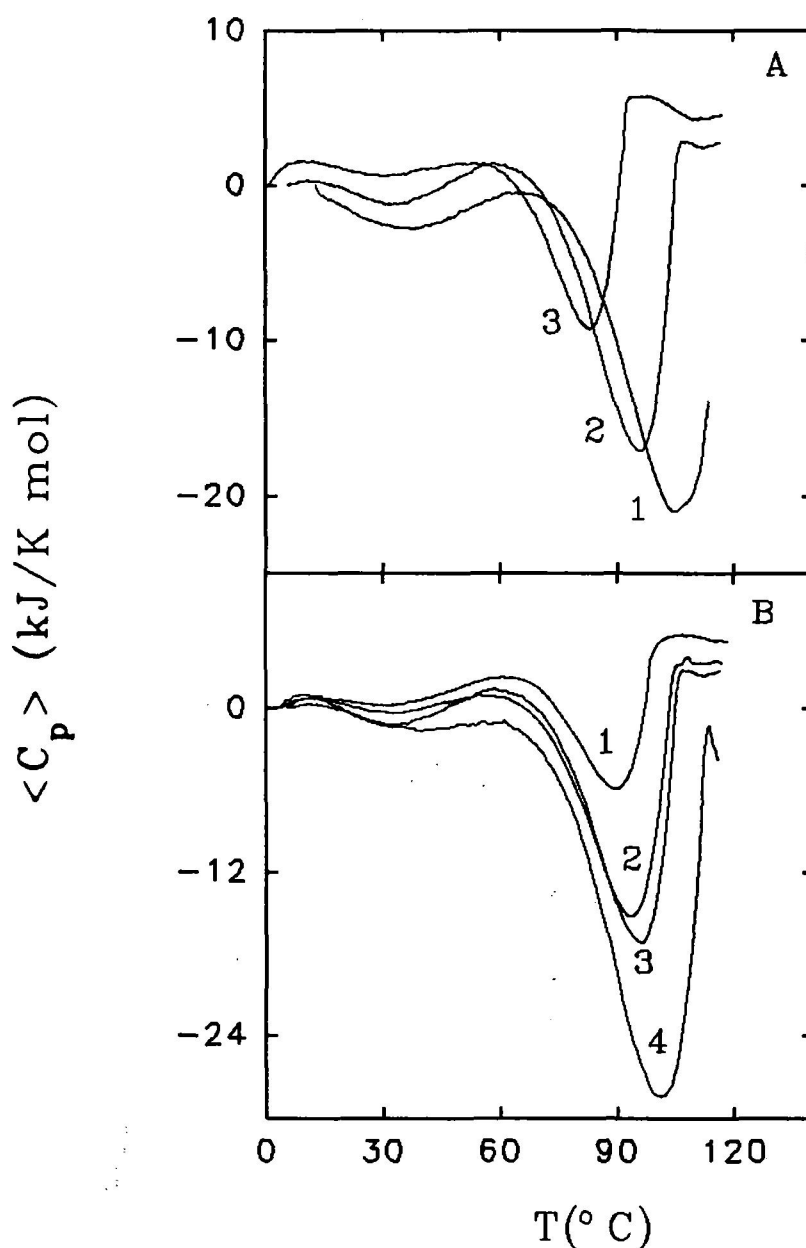


Figura 5.1.1-12: Gráfica A: capacidad calorífica de β -Lg B en tampón CAPS 20 mM, pH 11.0 y a diferentes velocidades; (1) 2.0 K/min, (2) 1.0 K/min y (3) 0.5 K/min. Gráfica B: capacidad calorífica de la proteína en tampón CAPS 20mM, pH 11.0 a diferentes concentraciones de muestra; (1) 8.75 mg/ml, (2) 5.13 mg/ml, (3) 4.58 mg/ml, (4) 2.79 mg/ml.

β -Lactoglobulina B

Resumiendo lo anteriormente expuesto, el desplegamiento de la proteína β -Lg B a pH ácido y baja fuerza iónica, está constituido por una etapa reversible a temperaturas inferiores a los 90°C seguida por una etapa irreversible compleja a temperaturas superiores en donde se pueden apreciar procesos de hidrólisis ácida, como se ha puesto de manifiesto por electroforesis y experimentos de ultracentrifugación analítica, así como posibles agregaciones de la proteína. El proceso irreversible afecta la transición calorimétrica disminuyendo la entalpía, siendo esta muy baja para proteínas del peso molecular de β -Lg y su compacidad. Asimismo, la distorsión causada impide la buena determinación del ΔC_p de desplegamiento.

En experimentos de FTIR, realizados por el Dr. Antonio Cardenete en nuestro Departamento con la proteína β -Lg B, se observa la disminución de estructura secundaria con la temperatura y posterior aumento de estructura β conforme ésta sigue aumentando, indicando la presencia de un estado parcialmente plegado a altas temperaturas. Si tenemos en cuenta la estructura de la proteína, presenta un puente disulfuro en su interior entre los aminoácidos 119 y 66 que parece mantener un corazón muy compacto constituido por láminas β . Este corazón compacto podría ser el responsable de que la proteína no se desplegara completamente dando lugar a las señales observadas tanto por FTIR.

5.1.2. Desplegamiento térmico de β -Lactoglobulina B en presencia de cloruro de guanidina.

La proteína β -Lg presenta un marcado carácter hidrofóbico como anteriormente se indicó, es por lo tanto una buena candidata para observar experimentalmente la denominada desnaturalización "por frío" en presencia de un agente desnaturalizante. En nuestro caso se ha utilizado el cloruro de guanidina (GuHCl) que presenta la ventaja frente la urea de una mayor estabilidad térmica dado el elevado valor de T_m para β -Lg.

Los experimentos en presencia de diferentes concentraciones de GuHCl se realizaron todos a pH 3.0 en tampón fosfato 20 mM y a velocidad de barrido de 0.5 K/min. Dado que los procesos a bajas temperaturas son lógicamente más lentos, es necesario trabajar a menor

velocidad de barrido para que el sistema se encuentre en todo momento en equilibrio. Las concentraciones de GuHCl utilizadas fueron siempre mayores a 1.5 M, debido a que por debajo de esta concentración se observó agregación de la proteína a altas temperaturas.

En la Figura 5.1.2-1 se recogen las curvas calorimétricas correspondientes a diferentes concentraciones de GuHCl. Como se observa en la Figura, sólo a concentraciones superiores a 2.5 M en el agente desnaturizante, se observa la aparición de una segunda endoterma a bajas temperaturas correspondiente a la llamada desnaturización "por frío". Este término ampliamente utilizado en la Bibliografía, es en esta caso erróneo dado que, tal como se realiza el experimento de DSC, se trata realmente de un proceso de renaturalización, ya que a bajas temperaturas la proteína se encuentra desnaturizada y al ir aumentando la temperatura la proteína se renaturaliza. Sería al enfriar la muestra suficientemente cuando se observaría la exoterma correspondiente a la desnaturización "por frío".

Los parámetros termodinámicos obtenidos del análisis de estas curvas se muestran en la siguiente Tabla:

C' (M)	C (mg/ml)	T _m (°C)	T _f (°C)	ΔH (kJ/mol)
1.60	5.19	77.3	—	295
2.50	4.05	67.7	—	248
3.00	7.90	62.0	13.0	193
3.25	8.40	55.5	18.9	146
3.50	4.95	53.0	20.5	134

C' es la concentración molar de cloruro de guanidina y T_f la temperatura de desnaturización "por frío", cuyo valor de entalpía no se ha podido determinar con precisión.

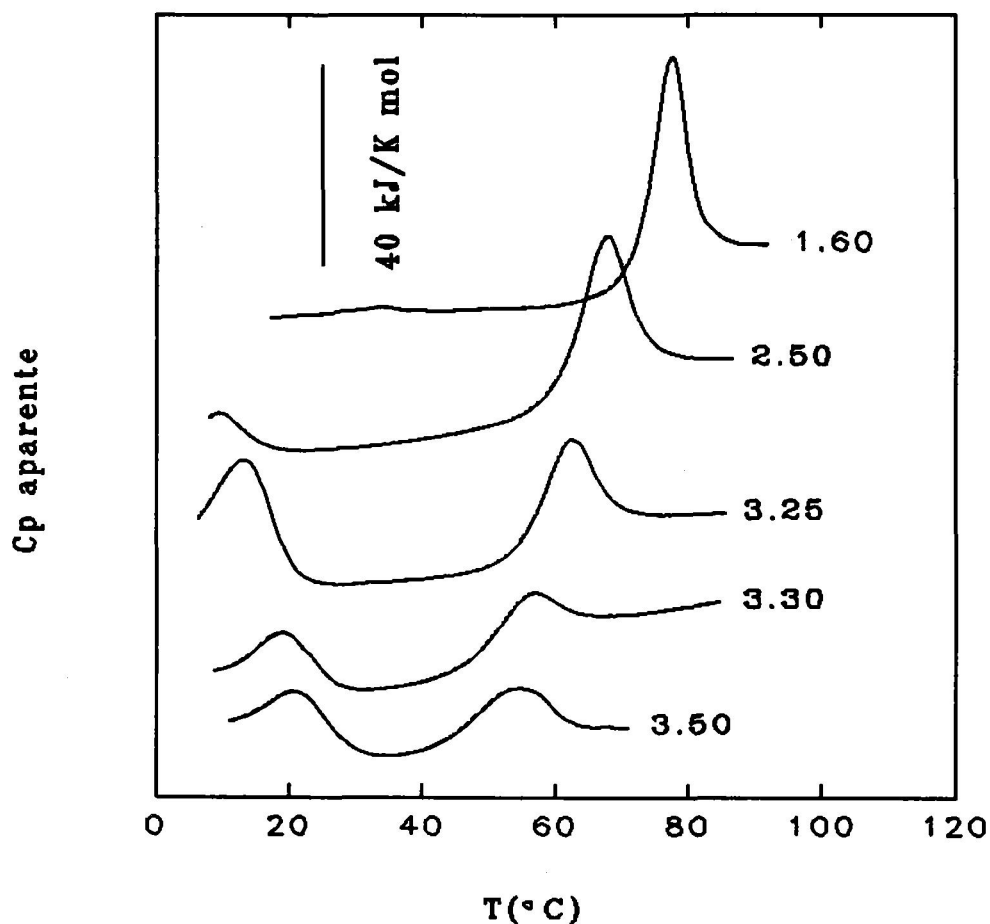


Figura 5.1.2-1: Registros experimentales de DSC para β -Lg B en fosfato 20 mM, pH 3.0 y diferentes concentraciones (M) de GuHCl. La posición de cada registro en la gráfica se ha desplazado verticalmente a efectos de claridad en la presentación.

Tanto en la tabla anterior como en la Figura 5.1.2-1, se observa como al aumentar la concentración de cloruro de guanidina, como es lógico, tanto la T_m como la ΔH disminuyen a la vez que T_f se desplaza a temperaturas mayores. Las transiciones con concentraciones superiores a 3 M en GuHCl, muestran una segunda endoterma a bajas temperaturas la cual debe corresponder al plegamiento de la proteína desnaturizada a bajas temperaturas como anteriormente dijimos. El proceso de plegamiento-desplegamiento a baja

β -Lactoglobulina B

y alta temperatura es totalmente reversible.

Nuestros datos experimentales para la endoterma de alta temperatura no se ajustan al modelo de equilibrio de dos estados, obteniéndose unos valores de $r=0.5$ aproximadamente, lo cual indica la posibilidad de cooperatividad intermolecular. Este valor de r es algo inesperado en principio, dado que la presencia de cloruro de guanidina tiende a disociar los posibles agregados de proteína que se puedan encontrar presentes. Es interesante destacar que Pace y Tanford (1968) indican que a bajas concentraciones de este agente desnaturizante la transición tampoco es de dos estados. En nuestro caso, parece que la presencia de GuHCl favorece algún tipo de asociación molecular. De hecho, hemos encontrado turbidez en las muestras calentadas para concentraciones de aproximadamente 1 M en GuHCl. Por otra parte, el ΔC_p medio obtenido de las trazas des de 8 ± 2 kJ/K mol, un valor que coincide dentro del error experimental con el obtenido de la pendiente de la representación de ΔH vs. T_m (Figura 5.1.2-2), que es de 6.9 ± 0.2 kJ/K mol. Estos valores coinciden a su vez con el encontrado por Pace y Tanfor (1986), 8.8 kJ/K mol. Estos autores apuntaron de manera implícita la posibilidad de desnaturalización "por frío" al proponer no sólo un cambio de signo del ΔH sino del propio ΔC_p con la temperatura. El valor de ΔC_p es análogo al que realmente existiría para β -Lg en ausencia de cloruro de guanidina, lo que está de acuerdo con lo expuesto por Privalov y colaboradores (Privalov et al., 1986; Privalov, 1990). Hay que insistir aquí, que evidencia experimental de desnaturalización "por frío" se ha obtenido sólo recientemente y para muy pocas proteínas (Privalov, 1990; Privalov et al., 1986; Griko et al., 1988; Chen y Shelman, 1989; Franks y Hatley, 1992).

Griko y Privalov (1992) han realizado un estudio de la desnaturalización de la variante genética A a pH 2.0 en presencia de diferentes concentraciones de urea. Estos autores encuentran que la desnaturalización "por frío" no se ajusta al modelo de dos estados y sí lo hace la desnaturalización a altas temperaturas, siendo por otro lado el ΔC_p para la primera superior que para la segunda. Esto significaría que, de acuerdo con los resultados de estos autores, se obtienen estados desnaturalizados diferentes a baja y alta temperatura, estando aparentemente el estado a altas temperaturas parcialmente plegado.

β -Lactoglobulina B

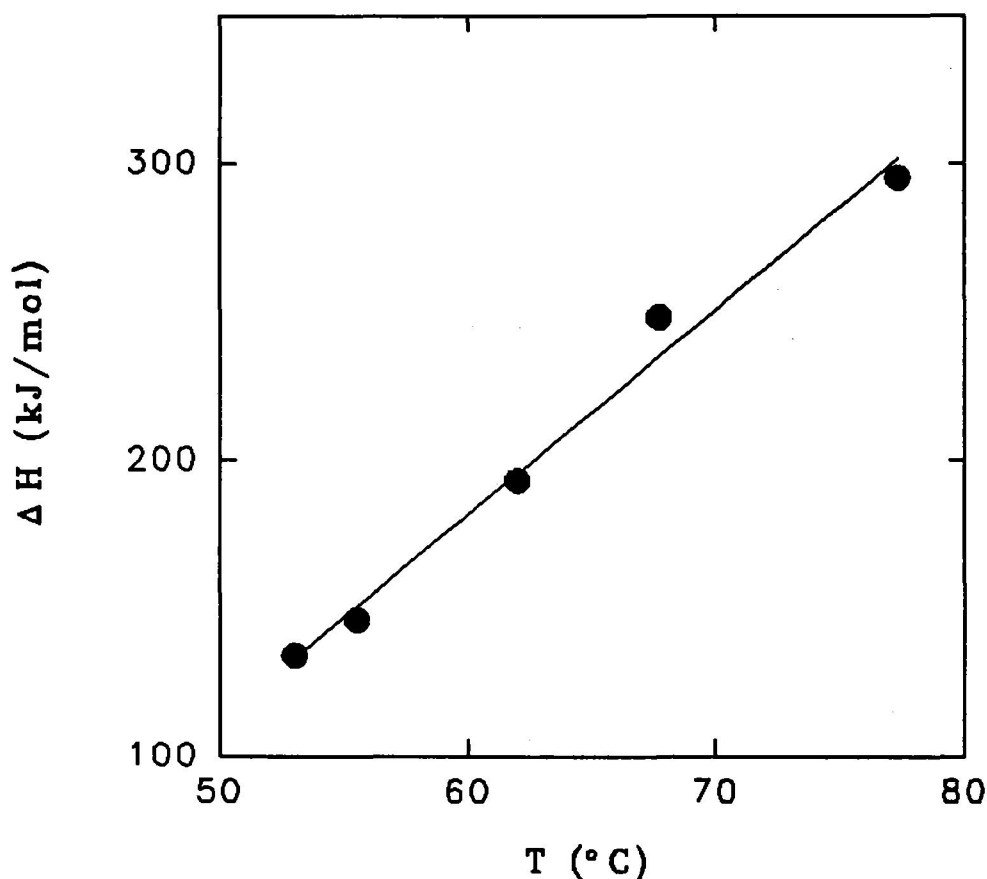


Figura 5.1.2-2: Entalpía de desnaturalización de β -Lg B en fosfato 20 mM, pH 3.0, en función de la temperatura. Los círculos representan los datos experimentales para diferentes concentraciones de GuHCl. La línea corresponde a la regresión lineal de ΔH vs. T , con una pendiente de 6.9 ± 0.2 kJ/K mol.

Aparte de los estudios de DSC, otras técnicas estructurales como CD ó RMN han sido también utilizados para confirma la desnaturalización de proteínas a bajas temperaturas en condiciones apropiadas (Privalov et al., 1986; Griko et al., 1988; Chen y Shellman, 1989). En esta memoria se han llevado a cabo experimentos de CD con β -Lg B a pH 3.0 con 3.5 M de GuHCl, en la región de temperatura donde la proteína parece estar en estado plegado,

β -Lactoglobulina B

así como desplegado tanto a bajas como a altas temperaturas, y también experimentos en ausencia de agente desnaturizante.

En la Figura 5.1.2-3 gráfica A se recoge el espectro de CD en la región del ultravioleta cercano para β -Lg B a pH 3.0 en tampón fosfato 20 mM, tanto en presencia (GuHCl 3.5 M) como en ausencia de GuHCl a una temperatura de 33 °C. En la gráfica B se muestra el espectro en la región ultravioleta lejano. En la región del ultravioleta cercano se observan principalmente los cambios en estructura terciaria, mientras que en la región del ultravioleta lejano los cambios en estructura secundaria de la macromolécula. La presencia del agente desnaturizante tiene un efecto mínimo sobre la estructura terciaria y secundaria de la proteína como se observa en la Figura.

En la Figura 5.1.2-4 se recogen respectivamente en las gráficas A y B, los espectros de CD en la región del ultravioleta cercano y lejano para la proteína a pH 3.0 en fosfato 20 mM y en presencia de 3.5 M de GuHCl a diferentes temperaturas. Como se observa en ambas gráficas el aumento o descenso de la temperatura conduce a cambios conformacionales en la proteína que son detectados por esta técnica. A la temperatura de -5 °C la proteína se encuentra prácticamente desplegada; sin embargo, a 88 °C queda estructura secundaria residual, mientras que la terciaria en ambos casos parece haber desaparecido completamente.

De esta forma los espectros de CD no sólo han confirmado la desnaturización "por frío" detectada por DSC, sino que también, muestran que los estados de desnaturización alcanzados a bajas y altas temperaturas tienen diferentes espectros de CD en el ultravioleta lejano, y por lo tanto distintas estructuras secundarias, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Griko y Privalov (1992). El hecho de que los dos procesos de conduzcan a diferentes estados desplegados de la proteína difiere de los encontrado en los pocos casos estudiados hasta ahora para otras proteínas.

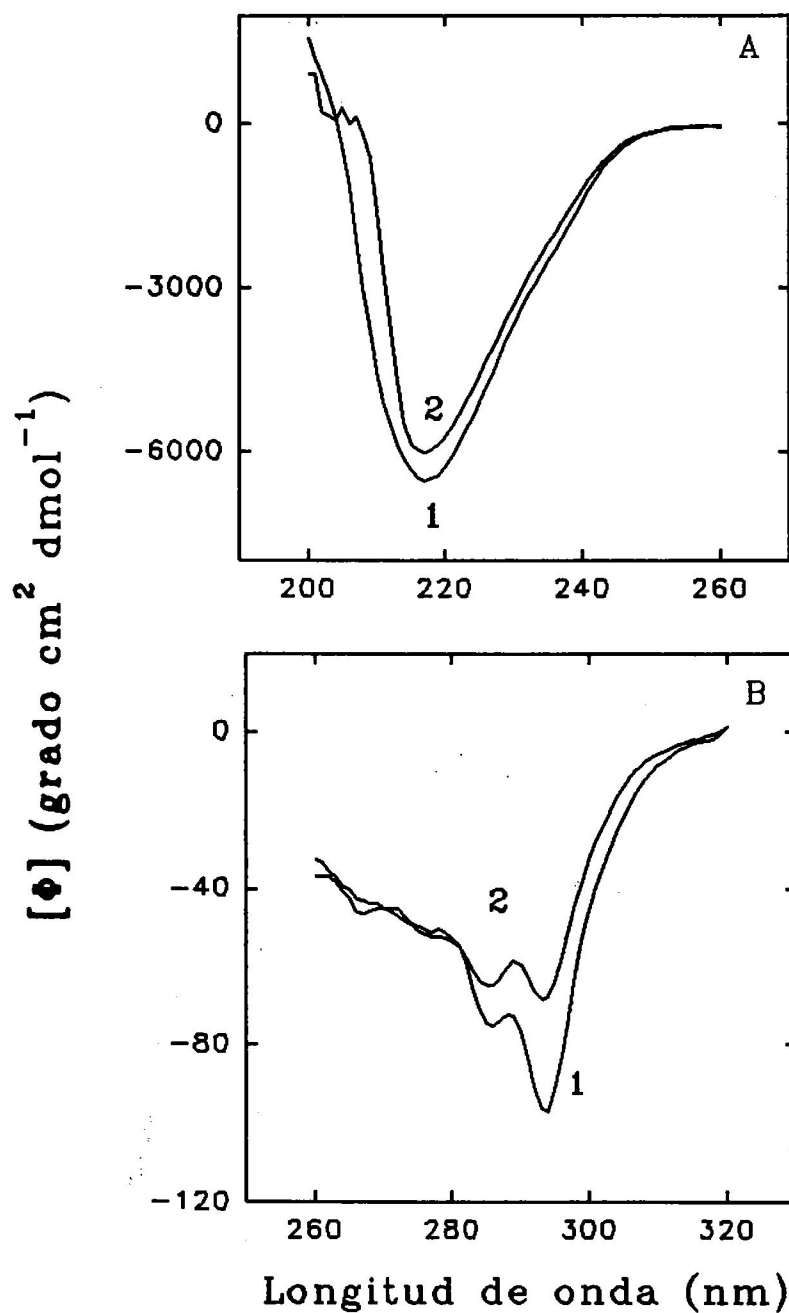


Figura 5.1.2-3: Gráfica A: espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano para β -Lg B a 33 °C en fosfato 20 mM, pH 3.0. Gráfica B: espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano para la misma proteína. (1) en ausencia de GuHCl, (2) en presencia de GuHCl 3.5 M.

β -Lactoglobulina B

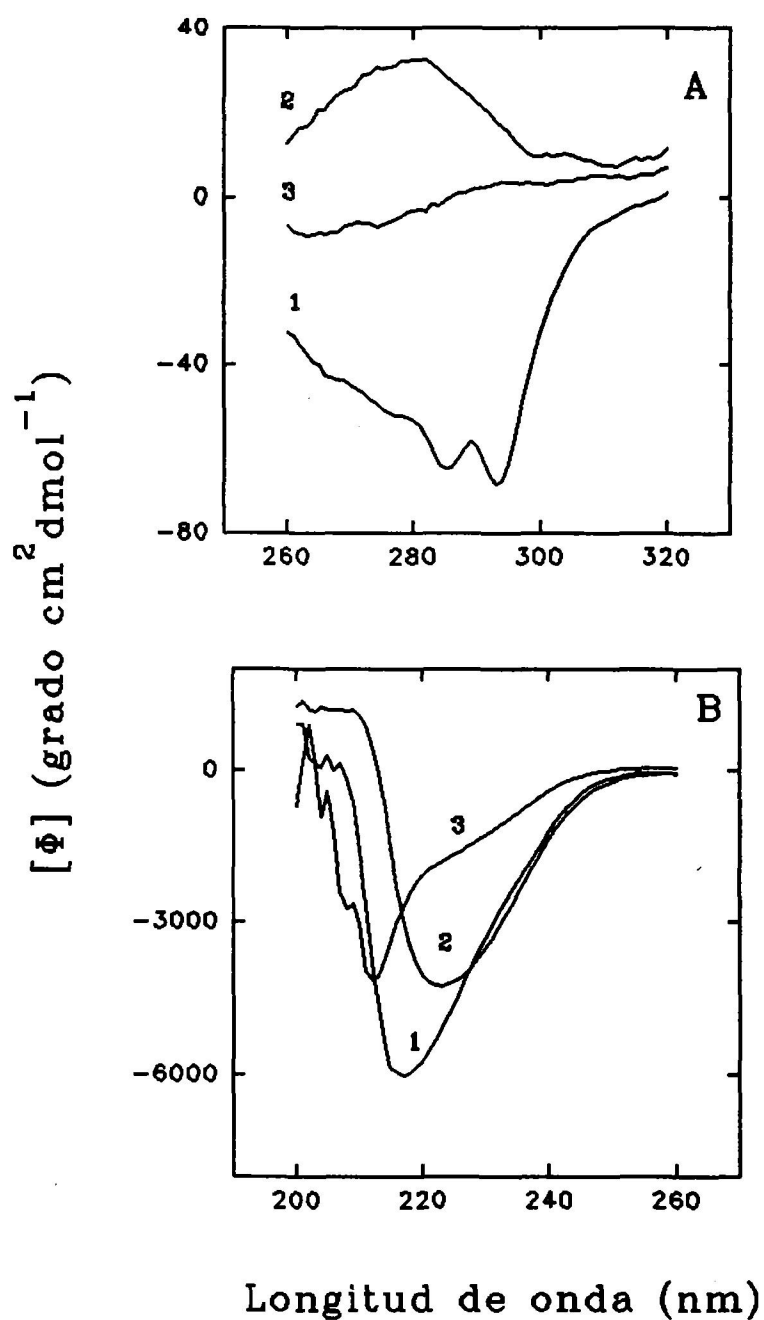


Figura 5.1.2-4 Gráfica A: espectro de CD en el ultravioleta cercano de β -Lg B en fosfato 20 mM, pH 3.0 y 3.5 M de GuHCl a diferentes temperaturas. Gráfica B: espectro de Cd en el ultravioleta lejano para la misma muestra a diferentes temperaturas. (1) 33 °C, (2) 88 °C y (3) -5 °C.

β -Lactoglobulina B

5.2 DESPLEGAMIENTO TERMICO DEL FRAGMENTO DE TERMOLISINA 205-213 A pH ACIDO.

El estudio con compuestos modelos es una forma lógica de racionalizar aspectos estructurales, mecánicos y energéticos del plegamiento de proteínas. Estos péptidos modelos son de particular interés cuando corresponden a regiones aisladas de proteínas capaces de plegarse en solución. Proteínas por encima de cierto tamaño (cerca de 100 aminoácidos) están compuestas de dominios plegados. El estudio termodinámico de estas unidades cooperativas puede ser de gran utilidad para caracterizar la energética de estados primarios del plegamiento de proteínas y la posible asociación de estas unidades en solución cuando son aisladas del resto de la proteína.

En esta memoria hemos realizado un estudio del desplegamiento térmico del fragmento carboxi-terminal de termolisina 205-316 (TLN 205-316) en el intervalo de pH 2.5 a 5.0 mediante calorimetría diferencial de barrido. Todos los experimentos se realizaron a fuerza iónica constante de 0.13 M mediante la adición de las concentraciones apropiadas de NaCl para compensar los efectos de ionización de los tampones empleados. En el intervalo de pH 2.5 a 3.0 se utilizó tampón glicina 20 mM, a pH 3.5 formiato sódico 20 mM y para pH 4.0 y 5.0 acetato sódico 20 mM. El desplegamiento térmico bajo estas condiciones es reversible como podemos observar en la Figura 5.2-1 donde se muestran barridos originales de DSC del fragmento a pH 3.5. La insensibilidad de los valores de T_m que se ha encontrado a la variación de la velocidad de barrido (2.9, 1.0 y 0.5 K/min), confirman que la transición transcurre en equilibrio. Por tanto, se puede concluir que el fragmento TLN 205-316 muestra un desplegamiento térmico reversible, como también se ha descrito en la bibliografía para TLN 206-316 (Vita y Fontana, 1982).

En la Figura 5.2-2 se representa la capacidad calorífica molar parcial del fragmento calculada según Privalov y Potekhin (1986), tomando como volumen específico parcial 0.73 ml/g, obtenido de la secuencia de aminoácidos, para diferentes valores de pH (Makhatadze et al., 1990). Una vez abstraída la línea base instrumental y corregidos los termogramas para

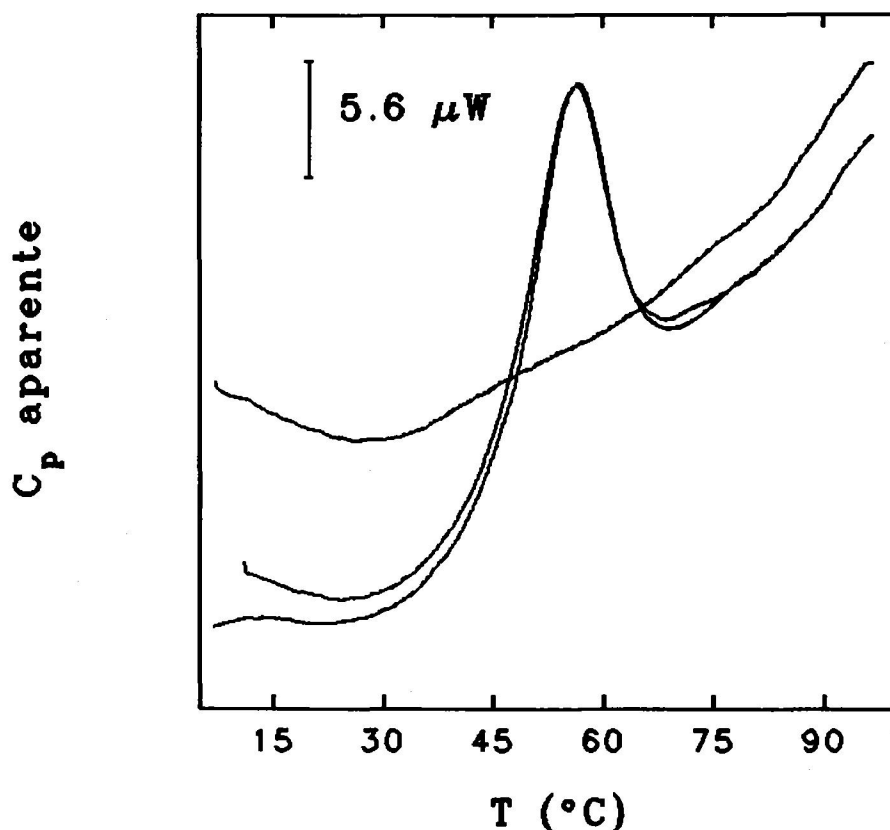


Figura 5.2-1: Registros experimentales de DSC del fragmento de TLN 205-316 en formiato sódico 20 mM, pH 3.5 y concentración de muestra 1.7 mg/ml. En trazo continuo se muestra la línea base instrumental y el primer barrido con la muestra. En trazo discontinuo se muestra el segundo barridos con la muestra. Todos los registros se han obtenido a una velocidad de 2.0 K/min.

el tiempo de respuesta del calorímetro (López-Mayorga y Freire, 1987). Existe una pequeña dispersión experimental (± 2 kJ/K mol) en la posición absoluta de las curvas, que se ha corregido superponiendo las trazas a la capacidad calorífica del estado desplegado calculado a partir de la secuencia de aminoácidos del fragmento (Makhatadze y Privalov, 1990). Se puede apreciar en la Figura 5.2-2, como existe una fuerte desestabilización del fragmento al bajar el pH.

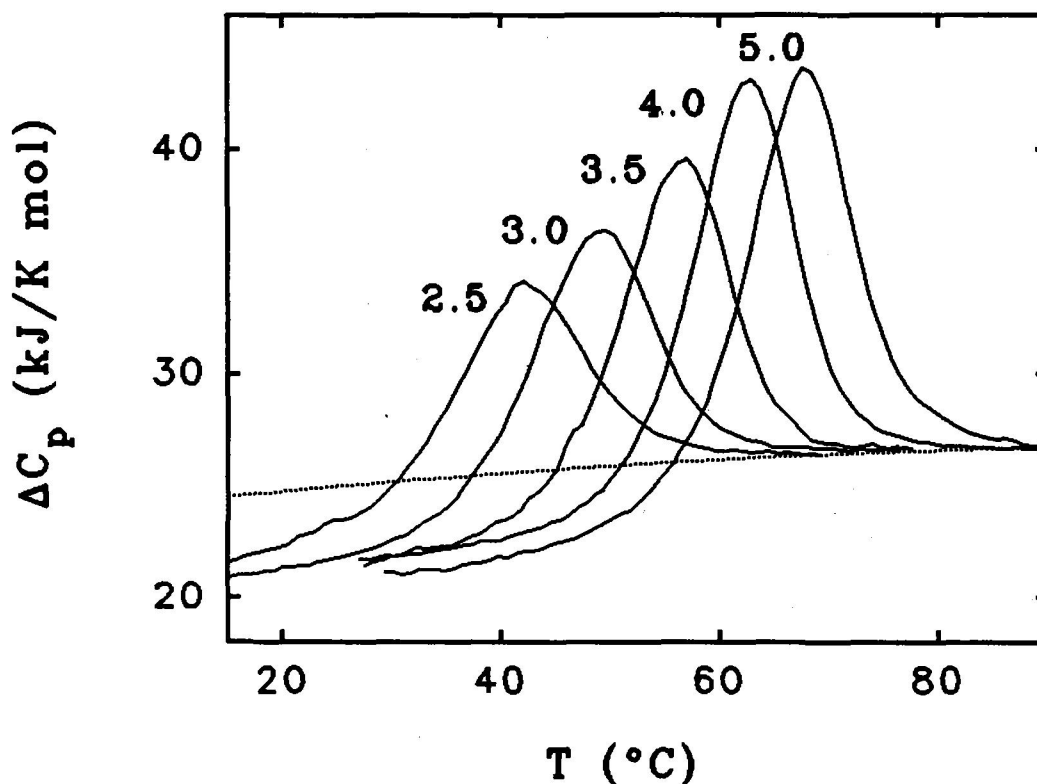


Figura 5.2-2: Capacidad calorífica molar parcial del fragmento TLN 205-316 a velocidad de barrido de 1 K/min a diferentes valores de pH indicados en la Figura. En trazo punteado se muestra la capacidad calorífica del estado desplegado calculado como se indica en el texto.

Del análisis de las transiciones calorimétricas se obtuvieron por un lado la entalpía calorimétrica, ΔH^{cal} , del área bajo el pico de DSC usando una línea base sigmoideal (Takahashi y Sturtevant, 1981) y por otro lado la entalpía de van't Hoff, ΔH^{vH} calculada a partir de la ecuación $\Delta H^{vH} = 4RT_m^2 C_p^m / \Delta H$. En todos los casos $\Delta H^{vH} > \Delta H^{cal}$, indicando que la transición no corresponde a un proceso monomérico de dos estados, y que existen interacciones intermoleculares en el monómero plegado. Esta conclusión también está de acuerdo con la asimetría observada en la forma de las transiciones observada en la Figura 5.2-2. El valor medio para $r = \Delta H^{cal} / \Delta H^{vH}$ es de 0.81 ± 0.3 para todos los experimentos. Este valor es mayor que el 0.73 correspondiente al caso de un dímero que despliega en monómero

como es el caso del fragmento de termolisina 255-316 (Conejero-Lara et al., 1994).

Existe un efecto de concentración de muestra sobre las transiciones como se puede observar en la Figura 5.2-3 y en la Tabla 5.2-I, en donde se observa el efecto de la concentración sobre los valores de T_m de las transiciones calorimétricas.

Conforme aumenta la concentración de muestra, aumenta la T_m de la transición. Este resultado sugiere la existencia de un equilibrio de disociación del fragmento simultáneo o acoplado al equilibrio de desplegamiento. Un proceso de disociación del dímero y posterior plegamiento $N_2 \rightleftharpoons 2U$ como ocurre en el caso del fragmento 255-316 (Conejero et al., 1994) daría lugar a un efecto de la concentración de muestra mayor que el observado en la Figura 5.2-3.

Por tanto, el modelo más simple de análisis, sería el caso de un dímero que se disocia para dar monómero y que posteriormente despliega, representado en el esquema siguiente:



Sin embargo los datos existentes en la bibliografía para el fragmento TLN 206-316, indican que éste a 20 °C se encuentra como una especie monomérica (Vita et al., 1989). Aún cuando se trata de un fragmento con un resto adicional y que los experimentos realizados por estos autores están realizados principalmente a pH neutro y a diferente fuerza iónica, no creemos que justifique el diferente comportamiento entre ambos. Por ello, aunque los datos obtenidos por DSC indican la presencia de equilibrio monómero-dímero, para aclarar la existencia de esta asociación, llevamos a cabo experimentos de sedimentación en equilibrio, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid) bajo la dirección del Dr. Germán Rivas, con una ultracentrífuga XL-A.

Los experimentos de sedimentación en el equilibrio se realizaron a pH 2.5, 4.0 y 5.0, a tres concentraciones (0.1, 0.5 y 1 mg/ml) para cada uno de los valores de pH que fueron equilibrados a varias velocidades del rotor (20, 25 y 35 krpm) y a una temperatura de 10 °C.

TABLA 5.2-I

Efecto de la concentración de muestra sobre Tm para el fragmento de TLN 205-316 a diferentes valores de pH.

pH	C (mg/ml)	Tm (°C)
2.5	1.07	40.85
	3.14	42.35
3.0	0.85	45.75
	1.61	47.75
	2.02	48.95
	3.30	49.35
3.5	3.63	49.45
	0.63	54.85
	1.70	56.55
4.0	1.92	56.85
	1.48	61.25
5.0	3.97	62.85
	0.95	67.35
	2.13	67.85
	2.79	67.95

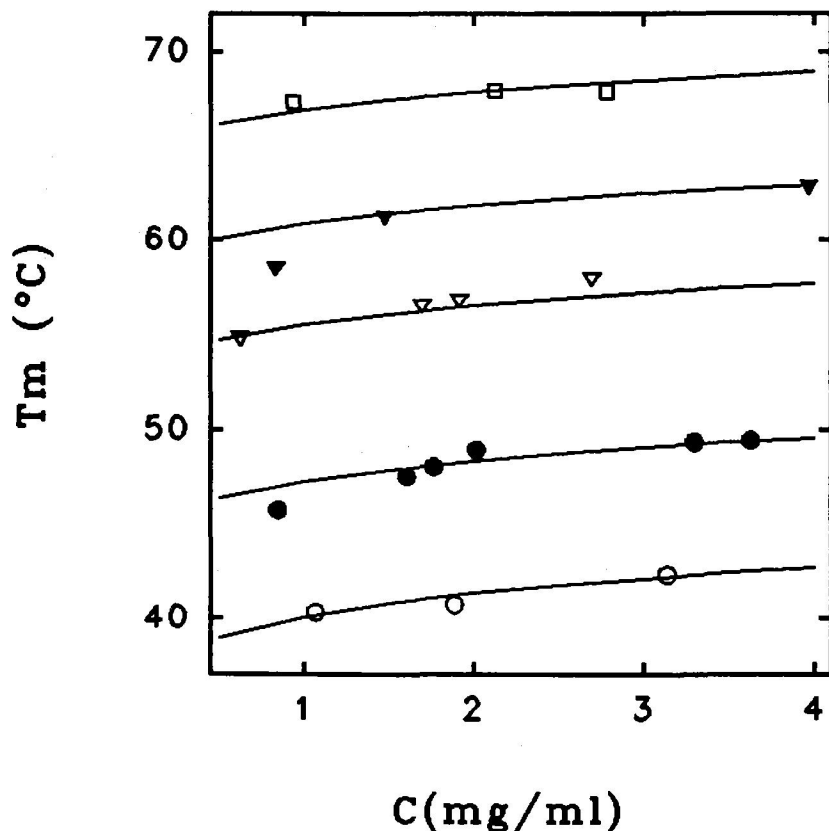


Figura 5.2-3: Dependencia con la concentración de los valores de T_m para el desplegamiento térmico del fragmento TLN 205-316 a cinco valores de pH: 5.0 (□); 4.0 (▼); 3.5 (▽); 3.0 (●); 2.5 (○). En trazo continuo se muestra la dependencia del valor de T_m a cada pH de acuerdo con el análisis multidimensional de los resultados de DSC.

Después de alcanzado el equilibrio de sedimentación, se realizaron barridos radiales a dos longitudes de onda 280 y 300 nm. La masa molecular relativa, M_r , se obtuvo analizando los datos experimentales con los programas XLAEQ y EQASSOC suministrados por la casa Beckman (Minton, 1994). El volumen molar parcial del fragmento se obtuvo como se ha descrito anteriormente, corregido por el efecto de temperatura (Durchschag, 1986). Los datos experimentales a cada uno de los valores de pH se ajustaron globalmente a un modelo de equilibrio monómero-dímero según la ecuación 3.5.3-2, usando la versión ORIGIN (Hedges et al., 1994) del algoritmo NONLIN (Johnson et al., 1981) suministrado por Beckman. En la Tabla 5.2-II se recogen las constantes de asociación obtenidas a 10 °C para los

diferentes valores de pH.

TABLA 5.2-II

Dependencia con el pH de la constante de equilibrio de dimerización del fragmento TLN 205-316.

pH	K_2^A (OD ⁻¹) ^b	r.m.s. (OD) ^c	K_2^M (M ⁻¹)
2.0	5.3 (5.0 → 5.8)	0.0095	6.2 10 ⁵
4.0	3.5 (3.3 → 3.7)	0.0180	4.1 10 ⁵
5.0	3.1 (2.9 → 3.3)	0.0131	3.5 10 ⁵

b) corregida a 1 cm de paso de luz. Los valores en paréntesis corresponden a un intervalo de confianza del 95 %.

c) Desviación cuadrática media del ajuste en unidades de absorbancia.

K_2^A es la constante de asociación en unidades de absorbancia y K_2^M la constante de asociación en molar obtenida de la primera según la ecuación:

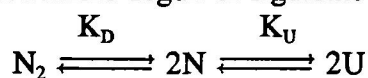
$$K_2^M = K_2^A \frac{\epsilon l}{2}$$

donde ϵ es el coeficiente de extinción molar del fragmento y l el paso de luz de la célula de la centrífuga (Lewis, 1991).

De los experimentos de equilibrio de sedimentación a pH 2.5, 4.0 y 5.0, se obtuvieron una masa molecular relativa para el fragmento TLN 205-316 a 0.1 mg/ml de 19000-19800 Da, mucho mayor que la correspondiente a un monómero simple, 11978 Da y cercana a el fragmento en forma dimérica 22000-24400 Da obtenida a la mayor concentración empleada (1 mg/ml). Este comportamiento, donde M_r incrementa concomitantemente con la concentración de muestra, es característico de un sistema con asociación consigo misma de la proteína (McRorie y Voelker, 1993). El análisis global de todos los datos experimentales a cada pH, como hemos indicado anteriormente, corresponde

a un modelo de equilibrio monómero-dímero. El fragmento TLN 205-316 asocia con una afinidad moderada en el rango $10^5 M^{-1}$ y el proceso tiene poca dependencia con el pH, lo cual podría significar que los grupos ionizables no están implicados en la asociación. De las constantes mostradas en la tabla 5.2-II se observa como al aumentar el pH la constante disminuye, lo que implica que a pH 5.0 tendríamos menor población de especie dimérica lo que concuerda con los datos de DSC, así en la tabla 5.2-I se observa como el efecto de concentración es menor a este pH.

En este punto, parece claro por tanto, la existencia de un equilibrio monómero-dímero y posterior desplegamiento del monómero según el siguiente esquema:



donde K_D es la constante de disociación del dímero y K_U la constante de desplegamiento del monómero.

Las fracciones molares, X , de las especies presentes y las constantes de equilibrio, para una concentración total del fragmento dada, C_t expresada por mol de monómero pueden ser escritas como:

$$X_{N_2} = \frac{2 [N_2]}{C_t} ; X_N = \frac{[N]}{C_t} ; X_U = \frac{[U]}{C_t} \quad (5.2-1)$$

$$K_D = \frac{[N]^2}{[N_2]} = \frac{2 X_N^2 C_t}{X_{N_2}} ; K_U = \frac{X_U}{X_N} \quad (5.2-2)$$

Por transformación simple de estas ecuaciones obtendríamos:

$$X_N = \frac{-K_D(1+K_U) + [K_D^2(1+K_U^2) + 8C_t K_D]^{1/2}}{4C_t} \quad (5.2-3)$$

$$X_U = K_U X_N$$

Tomando como referencia el estado dimérico, N_2 , la capacidad calorífica de exceso $\langle \Delta C_p \rangle$, es una función con dos términos como vimos en el apartado 4.1:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \langle \Delta C_p^{int} \rangle + \langle \Delta C_p^{ex} \rangle$$

donde $\langle \Delta C_p^{int} \rangle$ es la capacidad calorífica intrínseca y $\langle \Delta C_p^{ex} \rangle$ la capacidad calorífica de exceso total, ambas vienen dadas por las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \langle \Delta C_p^{int} \rangle &= \frac{X_N \Delta C_{p,D}}{2} + (\Delta C_{p,U} + \Delta C_{p,D}/2) X_U \\ \langle \Delta C_p^{ex} \rangle &= \frac{\Delta H_D}{2} \left(\frac{dX_N}{dT} \right) + (\Delta H_U + \Delta H_D/2) \left[K_U \left(\frac{dX_N}{dT} \right) + X_N \left(\frac{dK_U}{dT} \right) \right] \end{aligned} \quad (5.2-4)$$

ΔH_D y $\Delta C_{p,D} = 2(C_p(N) - C_p(N_2))$ son la entalpía y el cambio en capacidad calorífica de disociación y ΔH_U y $\Delta C_{p,U} = C_p(N) - C_p(U)$ corresponde a los valores del desplegamiento, $C_p(N)$, $C_p(N_2)$ y $C_p(U)$ son las capacidades caloríficas molares de los estados monómero, dímero y desplegado respectivamente expresados por mol de monómero. Para obtener la ecuación 5.2-4 es necesario la derivada de la ecuación 5.2-3 respecto a la temperatura, la cual incluye a su vez las derivadas dK_U/dT y dK_D/dT que varían con la temperatura según la ecuación de Kirchof:

$$\frac{dK_U}{dT} = K_U \frac{\Delta H_U}{RT^2}; \quad \frac{dK_D}{dT} = 2 K_D \frac{\Delta H_D}{RT^2} \quad (5.2-5)$$

Las funciones ΔH , ΔS tanto para el proceso de disociación como de desplegamiento varían con la temperatura según las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \langle \Delta H(T) \rangle &= \Delta H(T_0) + \int_{T_0}^T \Delta C_p(T) dT \\ \langle \Delta S(T) \rangle &= \Delta S(T_0) + \int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p(T)}{T} dT \end{aligned} \quad (5.2-6)$$

donde T_0 es una temperatura de referencia.

Finalmente la variación de la energía libre y las constantes de equilibrio para cada proceso vendrían dadas por:

$$\begin{aligned} \langle \Delta G_D(T) \rangle &= \Delta H_D(T) - T \Delta S_D(T) \\ \langle \Delta G_U(T) \rangle &= \Delta H_U(T) - T \Delta S_U(T) \end{aligned} \quad (5.2-7)$$

$$\begin{aligned} K_D(T) &= \exp(-2 \langle \Delta G_D(T) \rangle / RT) \\ K_U(T) &= \exp(- \langle \Delta G_U(T) \rangle / RT) \end{aligned} \quad (5.2-8)$$

Mediante estas ecuaciones ha sido posible realizar un análisis global de las curvas de capacidad calorífica molar parcial del fragmento TLN 205-316 a los diferentes valores de pH, para lo cual se han hecho las siguientes aproximaciones con el objeto de reducir el número de parámetros a ajustar:

1.- La función $C_p(U)$ varía con la temperatura según una ecuación cuadrática sobre los datos de capacidad calorífica calculado con los datos para la transferencia de compuestos modelos a disolución acuosas, suponiendo que en el estado desplegado todos los grupos de la cadena polipeptídica están expuestos al disolvente, publicados para varias temperaturas (Makhatadze y Privalov, 1990) :

$$C_p(U) = -8.9649 + 0.1851 T - 0.000239 T^2$$

2.- Las funciones $C_p(N_2)$ y $C_p(N)$ varían con la temperatura de forma lineal :

$$C_p(N_2) = C_p(N_2)(T_0) + a(T-T_0)$$

$$C_p(N) = C_p(N)(T_0) + b(T-T_0)$$

donde T_0 es una temperatura de referencia, ambas funciones están expresadas por mol de monómero. Además, se han hecho coincidir por simplicidad con la función $C_p(U)$ a 140 °C, temperatura a la que los incrementos de capacidad calorífica de desplegamiento se hacen cero (Privalov y Gill, 1988).

3.- Las funciones anteriores, no dependen del pH, por lo que serán comunes a todas las curvas de DSC analizadas.

4.- $\Delta H_D(T)$ y $\Delta H_U(T)$ no dependen del pH debido a la presencia del tampón que cancela los efectos del calor de protonación de los grupos ionizables del polipéptido (Privalov y Khechinashvili, 1974). Por tanto, los parámetros de entalpías optimizados son comunes a todas las curvas utilizadas en el ajuste global.

5.- Para cada valor de pH, habrá valores de ΔS_D y ΔS_U que se ajustarán independientemente y que tienen en cuenta el efecto del pH en la estabilidad de cada estado.

Con estas suposiciones, los parámetros a optimizar en el ajuste global son:

- $C_p(N_2)$, $C_p(N)$, ΔH_D y ΔH_U comunes a todas las curvas
- ΔS_D y ΔS_U para cada una de las curvas utilizadas en el ajuste.

Como temperatura de referencia se ha utilizado 50 °C por ser una temperatura central en el desplegamiento. Por tanto, todos los parámetros obtenidos del ajuste son valores a $T_0=50$ °C. Para cada curva hay una variable experimental que es la concentración total de proteína C_t , perfectamente conocida.

Obviamente cuantas más curvas se utilicen, más información existe para llegar a unos parámetros correctos. Además, con el fin de restringir el número de parámetros a ajustar, se han utilizado los valores de las constantes de equilibrio de dimerización (K_D) a 10°C obtenidas de los experimentos de sedimentación en el equilibrio. De esta manera se pueden fijar los valores de ΔS_D .

Para realizar el ajuste multidimensional de las transiciones calorimétricas a los diferentes valores de pH, se ha desarrollado por el Dr. Francisco Conejero-Lara, software

específico para realizar el mismo, basado en el algoritmo de minimización SIMPLEX.

El ajuste multidimensional de las curvas de DSC para cinco valores de pH diferentes a una concentración de proteína dada, se puede ver en la Figura 5.2-4, donde se incluyen también las funciones lineales de $C_p(N)$ y $C_p(N_2)$ obtenidas de dichos ajustes, junto con la función $C_p(U)$. Los parámetros del ajuste se muestran en la Tabla 5.2-III.

TABLA 5.2-III

Parámetros termodinámicos obtenidos del ajuste multidimensional de las curvas de capacidad calorífica molar parcial del fragmento TLN 205-316 a diferentes valores de pH, para el modelo de equilibrio desarrollado en el texto. Los parámetros mostrados corresponden a una temperatura de referencia de 50°C. Entre paréntesis se muestran los intervalos de error obtenidos para los parámetros, expresados todos por mol de monómero.

ΔH_D (kJ/mol)	ΔH_U (kJ/mol)	$C_p(N)$ (kJ/K mol)	$C_p(N_2)$ (kJ/K mol)
3.8 (-2.4→8.6)	186 (183→189)	21.75 (21.62→21.87)	22.88 (22.81→22.95)
pH	ΔS_U (kJ/K mol)		
5.0	0.548 (0.539→0.560)		
4.0	0.561 (0.552←→0.573)		
3.5	0.572 (0.563←→0.584)		
3.0	0.588 (0.579←→0.600)		
2.5	0.601 (0.591←→0.612)		

Los errores de los parámetros ajustados que se muestran en la Tabla 5.2-III se han realizado mediante un análisis de varianza del ajuste de acuerdo con Bevington (1969), con el fin de obtener una estimación de los mismos.

Las curvas predichas por el modelo reproducen muy bien los resultados experimentales como se puede observar en la Figura 5.2-4, así como el efecto de la concentración sobre la T_m como podemos observar en la Figura 5.2-3. A pesar de la ligera dispersión de las curvas (± 2 kJ/K mol) a temperaturas donde no han comenzado las transiciones, los valores de $C_p(N_2)$ y $C_p(N)$ a 50 °C tienen poco error. Esto es debido a que estos parámetros también vienen determinados por la información que existe en las curvas sobre la variación de ΔH_D y ΔH_U con la temperatura. A pesar de esto, los parámetros con mayor error son ΔH_D y $C_p(N)$, que caracterizan el estado N, debido a que este estado está menos poblado en todo el intervalo de temperatura, por lo que, las curvas contienen menos información sobre él.

El cambio en capacidad calorífica de desplegamiento tanto del monómero plegado, $C_p(U) - C_p(N)$, como del dímero plegado $C_p(U) - C_p(N_2)$, es positivo como es de esperar de la exposición de los grupos hidrofóbicos enterrados al desplegarse la proteína (Ver Figura 5.2-3, Tabla 5.2-III), aunque con valores específicos más bajos que para proteínas globulares compactas (Privalov, 1979). Esto sugiere que ambas conformaciones tienen un corazón hidrofóbico menos compacto y/o extenso en relación con el tamaño de cada especie. Si comparamos estos valores de capacidad calorífica de este fragmento con los del fragmento TLN 255-316 que es un dímero a pH 7.5 (Conejero et al., 1994), podemos observar en primer lugar, que los cambios en capacidad calorífica molar es similar para ambos dímeros a pesar de su diferencia en tamaño (Figura 5.2-5). En segundo lugar, si se le suma a la función capacidad calorífica del fragmento TLN 255-316 los valores de C_p de la cadena 205-254 que los diferencia, asumiendo que esta cadena se encuentra desplegada y usando los valores de C_p antes mencionados calculados según Makhatazde y Privalov (1990), se obtiene una traza de capacidad calorífica que coincide muy bien con la traza experimental del fragmento TLN 205-316, tanto antes (estado plegado) como después (estado desplegado) de la transición térmica (Figura 5.2-5 traza discontinua). Dado que el fragmento TLN 205-316 está mayoritariamente en forma dimérica antes de la transición, este resultado es consistente con un estado desordenado para la cadena polipeptídica 205-254 en el fragmento. Estudios recientes de RMN tanto del fragmento TLN 255-316 dimérico y del dímero del fragmento

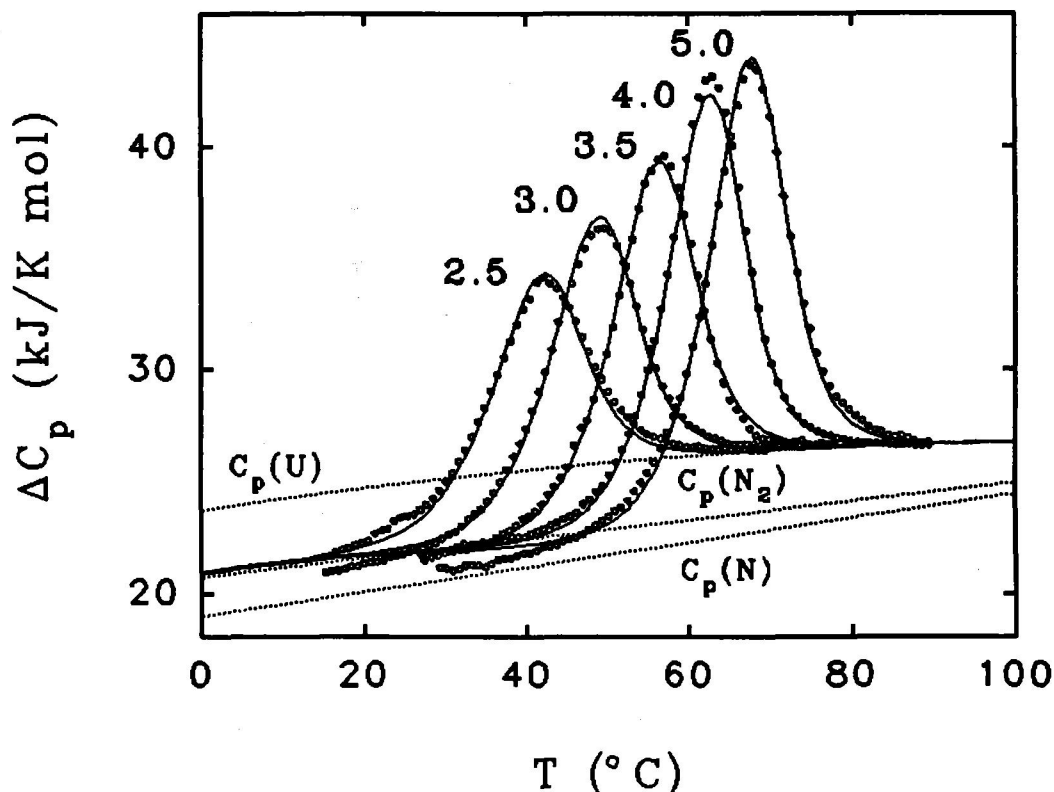


Figura 5.2-4: Capacidad calorífica molar parcial del fragmento TLN 205-316 a los cinco valores de pH indicados en los termogramas: con círculos se representan los datos experimentales de DSC, con líneas continuas lo mejores ajuste a los mismos y con trazo discontinuo las capacidades caloríficas de cada uno de los estados presentes.

TLN 205-316 en solución, confirman la similitud conformacional entre ambos (Rico et al., 1994; comunicación personal del Dr. Conejero-Lara y Dra. Jiménez).

El resultado más sorprendente en nuestro análisis, es el valor positivo encontrado para el $\Delta C_{p,D}$. Normalmente el ΔC_p de unión en la interacción de proteínas-ligandos es negativo (Sturtevant, 1977; Wiesinger y Hinz, 1987; Ross, 1987). Este valor negativo es mayor cuando la unión va emparejada a un plegamiento parcial o total que cuando se refiere a asociaciones a cuerpos rígidos (Spolar y Record, 1994). Por tanto, la única explicación razonable para nuestro valor de $\Delta C_{p,D}$ es que la asociación se encuentre emparejada a un desplegamiento parcial, dado que la superficie no-polar enterrada parece ser el término

dominante en los valores de ΔC_p de asociación frente al cambio en el área de la superficie polar (Spolar y Record, 1994). De hecho, el fragmento TLN 255-316 formado por 3 hélices α es un dímero en solución (Conejero et al., 1994; Vita et al., 1989), donde la interfase de las dos subunidades, de marcado carácter hidrofóbico, coinciden topológicamente con la que existe entre el fragmento y el resto de la proteína en la enzima intacta (Rico et al., 1994). Estudios preliminares a pH 4.0 y 5.0 muestran que el dímero del fragmento TLN 205-316 está también estabilizado por la misma interacción favorable de las 3 hélices, dejando la primera hélice 233-246 y la parte amino-terminal de la cadena próxima a una conformación random (Comunicación personal de los doctores Conejero y Jiménez). El péptido 233-246 aislado ha sido estudiado por CD y RMN y tiene una propensidad del 13-17 % de formación de hélice (Jiménez et al., 1993). El hecho que la superficie hidrofóbica de cerca de 50 residuos esté completamente expuesta en el dímero plegado, sería responsable del anteriormente mencionado bajo ΔC_p específico de desplegamiento.

De acuerdo con esta conformación propuesta para el dímero, el valor negativo de $\Delta C_{p,D}$ sugiere que el proceso de disociación a pH ácido no conlleva únicamente una exposición adicional de la superficie hidrofóbica encerrada entre los dos monómeros, sino que debe existir algún tipo de cambio conformacional simultáneo a la disociación, de forma que el balance de superficie hidrofóbica expuesta al medio por causa de la disociación sea negativo. Una posible explicación que explicaría el valor negativo del $\Delta C_{p,D}$, sería que el monómero formara una estructura similar a la que tiene en la proteína intacta (Matthews et al., 1974), por plegamiento de la cuarta hélice, lo que encerraría no sólo la superficie hidrofóbica de las tres hélices involucradas en la dimerización, sino también los grupos hidrofóbicos expuestos en el dímero en la hélice 233-246.

En un intento por demostrar lo propuesto anteriormente, se realizaron experimentos de CD a diferentes valores de pH a 20 °C. En la Figura 5.2-6 gráfica A y B, se representa el espectro ultravioleta cercano y lejano para el fragmento TLN 205-316. Como se puede observar en las gráficas no se observa grandes diferencias entre los espectros a los diferentes valores de pH. A pH 5.0 el contenido en fragmento en estado monomérico es mayor que a

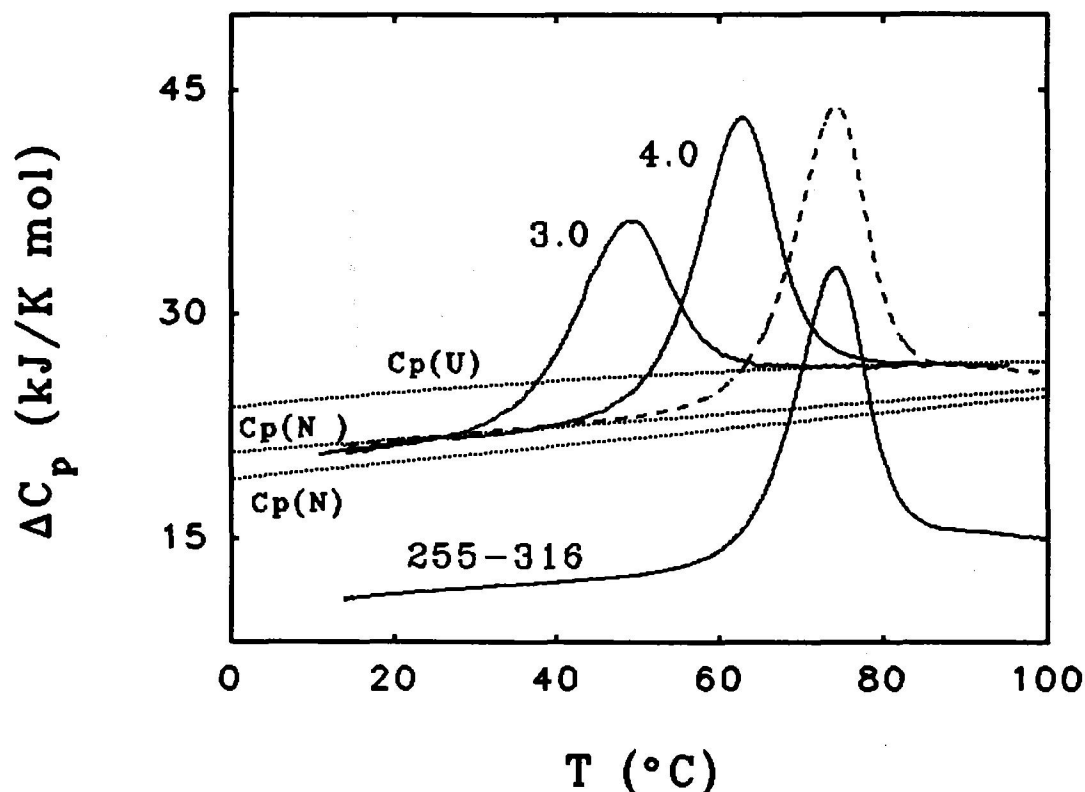


Figura 5.2-5: En trazo continuo en la zona inferior de la figura se representa la capacidad calorífica molar parcial del fragmento TLN 255-316 a pH 7.5 (tomado de Conejero et al., 1994), en trazos discontinuo se muestra la suma de esta curva con la C_p de la cadena desplegada 205-254 (ver texto). Se incluyen dos curvas experimentales del fragmento TLN 205-316 en trazo continuo, a pH 3.0 y 4.0.

pH 2.5, sin embargo, no se aprecia apenas diferencia en la región del ultravioleta lejano que nos indicara un mayor contenido en hélice α , como sería de esperar en el caso de formación de la cuarta hélice. No obstante, sería necesario realizar un estudio más exhaustivo mediante esta técnica realizando experimentos a diferentes concentraciones de muestra a un pH dado y a menores temperaturas donde se encuentra favorecido el estado monomérico.

La dependencia de la entalpía y energías de Gibbs con la temperatura de los diferentes estados del fragmento se representan en la Figura 5.2-7, calculados del conjunto de parámetros de la Tabla 5.2-III. El valor de ΔH de desplegamiento tanto del monómero, ΔH

TLN 205-316

(N→D), como del dímero, $\Delta H(N_2 \rightarrow D)$, tienen una dependencia positiva con la temperatura como era de esperar de acuerdo con los valores positivos del ΔC_p de desplegamiento (Figura 5.2-7 A). No obstante, ΔH_D decrece con la temperatura, desde valores positivos a bajas temperaturas a valores negativos pequeños por encima de 50 °C, debido a el signo negativo obtenido para $\Delta C_{p,D}$. La entalpía de desplegamiento del monómero tiende a 400 kJ/mol (3.57 kJ/mol de resto de aminoácido) a 140 °C, mientras que el dímero tiende a 350 kJ/mol (3.12 kJ/mol de resto de aminoácido), ambos valores son claramente inferiores a los descritos para proteínas globulares compactas, 6.25 kJ/(mol de resto de aminoácido) (Privalov y Gill, 1988). Esto difiere con lo que ocurre para el fragmento TLN 255-316, cuyo valor de ΔH extrapolado es de 5.80 KJ/(mol de residuo), mucho mayor que los anteriores (Conejero et al., 1994). Este resultado es de nuevo compatible con una estructura parcialmente desplegada o desordenada para el fragmento TLN 205-316. Aunque son valores aproximados dada la larga extrapolación, podemos hacer una correlación de la entalpía de desplegamiento para la longitud de la cadena plegada en el dímero, suponiendo que es la misma que en dímero del fragmento 255-316 (55%). El valor de ΔH_U a 140 °C que se obtiene es 6.9 kJ/(mol de residuo) que correspondería a una estructura plegada altamente compacta. Para el monómero no se conoce la cantidad de cadena con estructura plegada, pero se puede hacer una estimación aproximada del 57%, dividiendo el valor de ΔH_U a 140 °C por el valor encontrado para las proteínas globulares compactas. Este porcentaje no abarcaría la formación de una cuarta hélice altamente compacta contra las otras 3 hélices formando un corazón hidrofóbico bien definido, pero si apoya la idea de una estructuración adicional del resto de la cadena cuando ocurre la disociación.

En la Figura 5.2-7 B se muestra la variación de ΔG entre los diferentes estados implicados. El ΔG de desplegamiento para el monómero y el dímero alcanzan su máximo para valores de temperatura cercano a los 0 °C. El dímero mayor ΔG que el monómero a todas las temperaturas, con un mínimo diferente cerca de 45 °C donde la constantes de

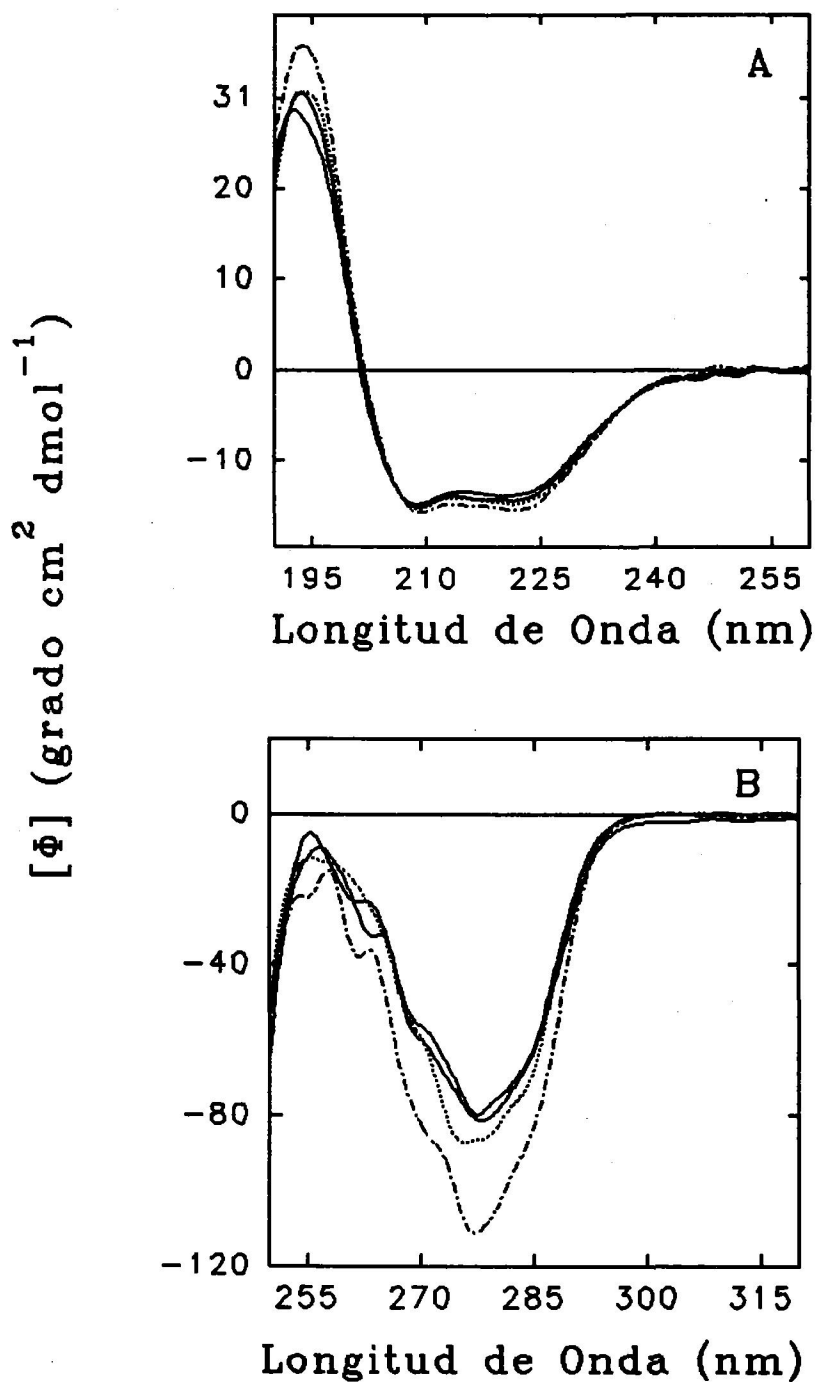


Figura 5.2-6: Espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (A) y en el ultravioleta cercano para el fragmento de TLN 205-316 a diferentes valores de pH: 2.5 (—); 3.0 (- -); 4.0(⋯); 5.0 (-⋯-).

TLN 205-316

disociación es mayor. La estabilidad del monómero es muy baja, especialmente a pH bajos, lo cual podría permitir al monómero desnaturalizar "por frío" a temperaturas cercanas a 0 °C. Dado que estas transiciones serían bastante anchas dada su baja entalpía, podrían ser detectadas, al menos parcialmente, por DSC en el caso de altas concentraciones de monómero. Es evidente que este no es el caso dado el efecto estabilizador de la asociación del fragmento. La dependencia con el pH de los valores de Δ de disociación es muy baja y puede ser ajustada a una línea recta de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial pH}\right)_T = 2.303 R T \nu$$

donde ν es el número de protones tomados en la disociación (Hinz et al., 1971). De la pendiente de esa representación se obtiene un valor de $\nu = -0.1$, lo cual sugiere que el proceso tiene poco carácter electrostático.

En conclusión, el fragmento TLN 205-316 sufre un proceso de desplegamiento térmico cooperativo como el fragmento TLN 255-316. La diferencia entre ambos fragmentos viene de que este último parece comportarse sólo como dímero en solución con una estructura globular compacta, mientras que el fragmento TLN 205-316 tiene un equilibrio monómero-dímero, con una conformación algo menos compacta. No obstante, ambos fragmentos son claramente estabilizados por su asociación en dímeros en solución. El hecho que la disociación del fragmento 205-316 da lugar a una conformación más ordenada con menos superficie no-polar expuesta al solvente contrasta con lo observado generalmente para las interacciones entre proteínas-ligandos, proteína-proteína y proteína-ADN (Spolar y Record, 1994). Es necesario, por tanto, llevar a cabo estudios estructurales adicionales para intentar racionalizar este cambio conformacional particular que parece estar conectado con el equilibrio de disociación.

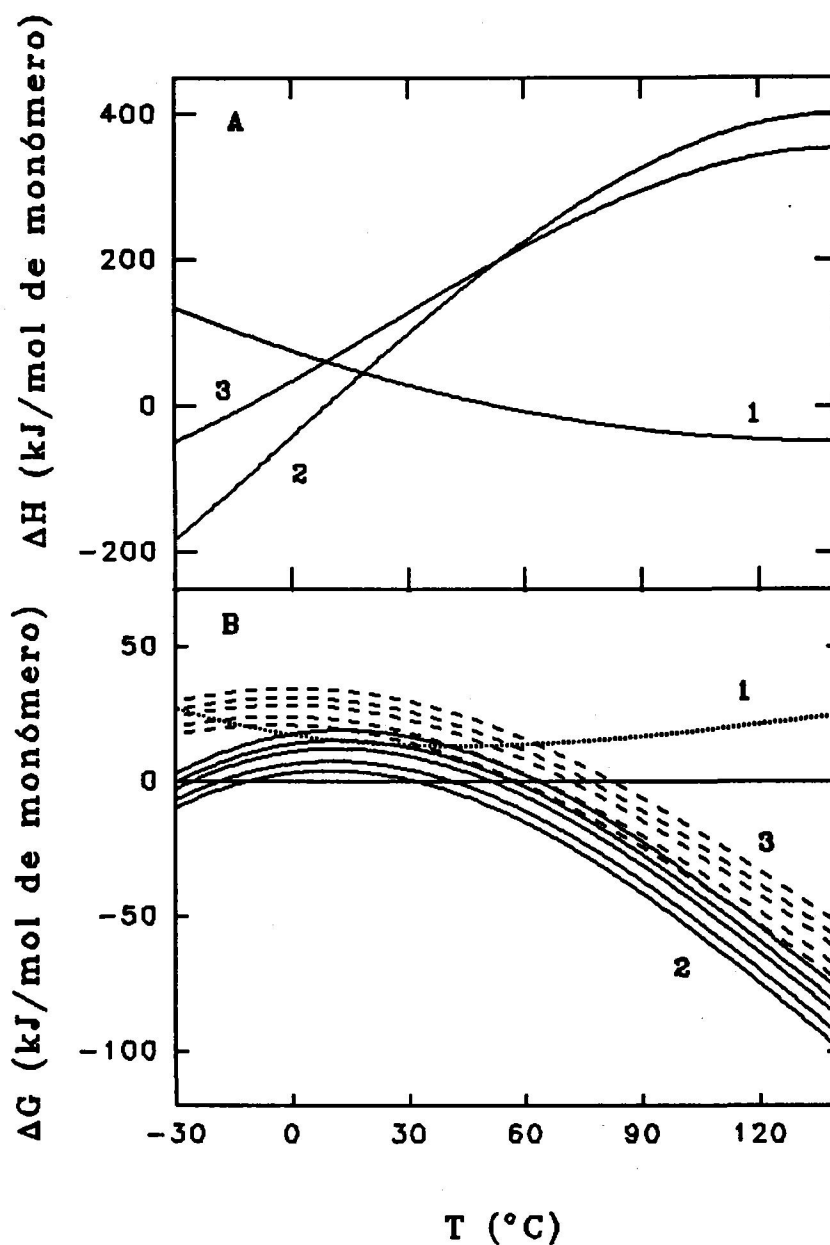


Figura 5.2-7: Dependencia con la temperatura de la entalpía (A) energía de Gibbs (B) de la disociación del dímero (1), desplegamiento del monómero (2) y desplegamiento del dímero (3) para el fragmento TLN 205-316. Las cinco curvas de ΔG del proceso de disociación aparecen prácticamente superpuestas.

5.3 DESPLEGAMIENTO TERMICO DE LOS DOMINIOS SH3 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LIGANDOS.

Las señales de transducción que regulan el crecimiento y diferenciación celular están caracterizadas por una cascada de reconocimientos específicos proteínas-proteínas muy importantes para su función. Las proteínas que intervienen en los diferentes caminos de las señales de transducción contienen una serie de dominios modulares pequeños que son responsables de la mediación específica en la interacción de estas proteínas entre sí. Ejemplo de éstos son los dominios SH2 y SH3.

Como indicamos anteriormente (apartado 2.3), aunque la estructura de varios dominios SH3 son conocidas perfectamente, poco es conocido de sus propiedades químico-físicas. En este apartado vamos a llevar a cabo el estudio del desplegamiento por temperatura mediante calorimetría diferencial de barrido de dos dominios SH3, Fyn-SH3 y Abl-SH3, y compararemos los resultados obtenidos de los mismos con el dominio de espectrina (Spc-SH3) previamente estudiado en nuestro Departamento por el Dr. Jose Cristobal Martínez Herrerías (J.C Martínez-Herrerías, 1995). Por otro lado y dado el papel fisiológico de los dominios SH3 como mediadores de la interacción entre proteínas, es interesante la caracterización termodinámica de la interacción de estos dominios con regiones determinadas de sus proteínas dianas, las cuales contienen secuencias ricas en prolinas. En este sentido realizaremos un estudio de la interacción del dominio Fyn-SH3 con dos péptidos sintéticos denominados 3BP1 (APTMPPPLPP) y el 3BP1-M4Y (APTYPPPLPP).

5.3.1 Desplegamiento térmico del los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 en función del pH.

El estudio mediante DSC del despliegamiento térmico del dominio Fyn-SH3 se realizó a pH 2.0 y pH 10.0 en glicina 10 mM y pH 7.0 en fosfato sódico 10 mM. Para el caso del domino Abl-SH3, los valores de pH estudiados fueron pH 2.0, 2.5, 3.0 y 10.0 en glicina 10 mM y pH 7.0 en fosfato sódico 10 mM. Bajo estas condiciones experimentales el despliegamiento térmico de ambos dominios es reversible como se observa en la Figura 5.3.1-1 para el caso del dominio Fyn-SH3 a pH 7.0, reversibilidad que disminuye conforme aumenta el pH, de tal manera, que mientras a pH ácido es cercano al 100% a pH 10.0 baja a un 75%. Se realizaron experimentos a dos velocidades de barrido (2 y 1 K/min) sin que se apreciara efecto de la misma sobre la T_m de las transiciones.

En la Tabla 5.3.1-I se recogen los parámetros termodinámicos de las transiciones de ambos dominios a los diferentes valores de pH, y en la Figura 5.3.1-2 las capacidades calorífica molares parciales de los mismos. Al variar el pH desde 2.0 a pH 10.0 el efecto sobre la estabilidad teniendo en cuenta la T_m es mínimo para el Fyn-SH3 y de unos 8 °C para el caso de Abl-SH3. El dominio Fyn-SH3 es más estable que Abl-SH3.

Este pequeño efecto sobre la T_m contrasta claramente con Spc-SH3 cuya T_m varía de pH 2.0 a pH 4.0 en unos 30 °C (a pH 2.0 es 34°C y a pH 4.0 de 60°C) (Viguera et al., 1994a) y es semejante al dominios SH3 de Sem-5 (73°C a pH 3.7 y 79.1°C a pH 4.9) (Lim et al., 1994). En todos los casos se aprecia la gran termoestabilidad de estos dominios. De todos ellos, el más termoestable es el domino SH3 de Sem-5 seguido por Fyn-SH3, Abl-SH3 y finalmente Spc-SH3.

Dominios SH3

TABLA 5.3.1-I

Parámetros termodinámicos del desplegamiento térmico de los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 a diferentes valores de pH.

Dominio	pH	C (mg/ml)	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kJ/mol)	ΔC_p (kJ/Kmol)
Fyn-SH3	2.0	3.40	69.9	212	3.3
	7.0	3.40	71.5	215	3.6
	10.0	3.10	64.5	193	2.4
Abl-SH3	2.0	2.67	59.0	173	2.5
		4.78	59.6	170	3.4
	2.5	1.63	61.0	174	2.6
		3.75	61.0	177	2.8
	3.0	3.10	63.5	174	2.0
		3.32	63.3	172	3.0
	7.0	1.22	67.15	162	3.0
		3.36	68.00	185	3.0
	10.0	2.0	64.3	120	---

Esta insensibilidad de la termoestabilidad de los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 con el pH contrasta no solamente con el comportamiento de Spc-SH3, sino también, con las propiedades de la gran mayoría de las proteínas globulares pequeñas (Privalov, 1979). Este hecho, no puede ser explicado por un contenido en grupos cargados anómalo; en los tres dominios la proporción de grupos ionizables con respecto a las demás cadenas laterales, es semejante al de otras proteínas globulares. En los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 los grupos cargados debes de estar distribuidos en la superficie de la molécula de tal forma, que el pK de los aminoácidos como Asp, Glu así como los residuos de Lys, no dependen de la conformación del dominio. Lo mismo es cierto

Dominios SH3

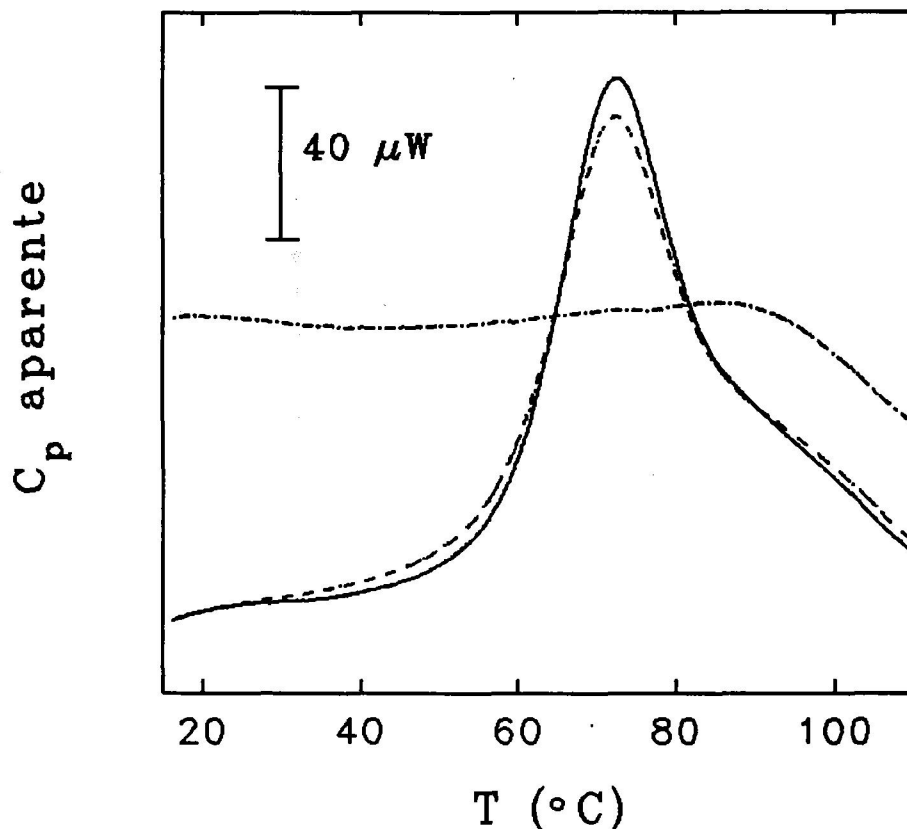


Figura 5.3.1-1: Barridos originales de DSC del dominio Fyn-SH3 en fosfato 10 mM a pH 7.0, concentración de muestra de 3.1 mg/ml y una velocidad de barrido de 2 K/min. En trazo continuo se muestra el primer barrido de la muestra, en trazo discontinuo el segundo barrido de la muestras sin sacar del calorímetro y en trazo discontinuo con puntos, la línea base instrumental.

para algunas Tyr que juegan un papel importante en el reconocimiento de secuencias ricas en prolina de los dominios SH3. La independencia de los valores de pK de la conformación de la proteína, puede ser explicada teniendo en cuenta que: los grupos ionizables mencionados anteriormente se encuentran completamente expuestos al solvente tanto en el estado nativo como en el desplegado; no forman parte de puentes salinos estables y no existe grupos con densidad de carga en la superficie de la proteína. El análisis de la distribución de los grupos cargados en Fyn-SH3 y Abl-SH3

Dominios SH3

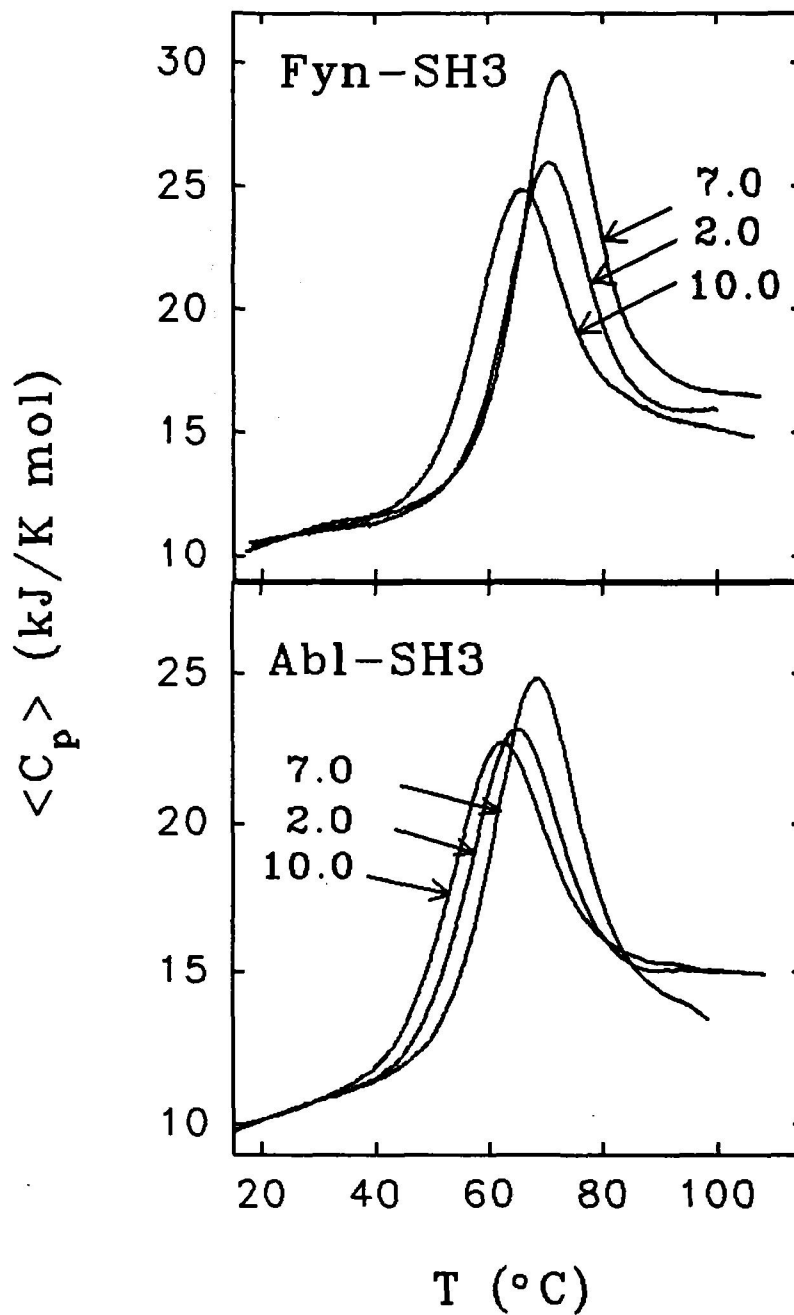


Figura 5.3.1-2: Capacidad calorífica molar parcial de los dominos Fyn-SH3 y Abl-SH3 a los diferentes valores de pH indicados en la gráficas. Todos los experimentos se llevaron a cabo a velocidad de barrido de 2 K/min.

Dominios SH3

muestra que se cumplen las condiciones anteriores, sin embargo, el dominio Spc-SH3 presenta unos grupos cargados en su superficie formado por los residuos Glu-16 y Glu-21 interaccionando con los aminoácidos Arg-20 y Lys-17 (la numeración de los residuos se ha tomado de Viguera et al., 1994a). Los grupos ácidos de esta agrupación, podrían tener valores de pK menores y, por tanto, ser responsables de la fuerte dependencia de la termoestabilidad de Spc-SH3 en la región de pH ácido.

Las transiciones calorimétricas han sido analizadas suponiendo un modelo de equilibrio de dos estados ya que no existen evidencias para suponer un modelo de desplegamiento más complejo teniendo en cuenta que no existe efecto de la velocidad de barrido ni de la concentración como se puede observar en la Tabla 5.3.1-I. En la Figura 5.3.1-3 se recogen los ajustes al modelo anterior suponiendo una variación lineal con la temperatura de la capacidad calorífica tanto para el estado nativo a todos los valores de pH, como para el estado desplegado donde el término cuadrático calculado a partir de la secuencia de aminoácidos (Makatazde y Privalov, 1990) es prácticamente despreciable. Para el caso del dominio Fyn-SH3 y Abl-SH3 la capacidad calorífica específica del estado nativo a 293K es de $(1.51 \pm 0.15) \text{ J K}^{-1} \text{ g}^{-1}$ y $(1.45 \pm 0.16) \text{ J K}^{-1} \text{ g}^{-1}$ respectivamente y su dependencia con la temperatura es de $(7.43 \pm 1.8) 10^{-3} \text{ J K}^{-2} \text{ g}^{-1}$ y $(8.8 \pm 1.9) \text{ J K}^{-2} \text{ g}^{-1}$ datos obtenidos del ajuste de la parte inicial de las transiciones. Estos valores son iguales dentro del error experimental a los encontrados para Spc-SH3 de $(1.47 \pm 0.13) \text{ J K}^{-1} \text{ g}^{-1}$ para la capacidad calorífica específica a 293 K y su variación con la temperatura es de $(6.7 \pm 1.7) \text{ J K}^{-2} \text{ g}^{-1}$ y concuerda muy bien con los datos existentes en la bibliografía para proteínas globulares (Privalov y Khechinasvili, 1974).

Del ajuste de las transiciones se obtiene asimismo un valor de ΔC_p a la T_m igual a $(3.35 \pm 0.3) \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ mientras que su incremento es de $(-0.06 \pm 0.01) \text{ kJ K}^{-2} \text{ mol}^{-1}$. Este valor negativo compensa el incremento de $C_p(N)$ de tal manera que la

Dominios SH3

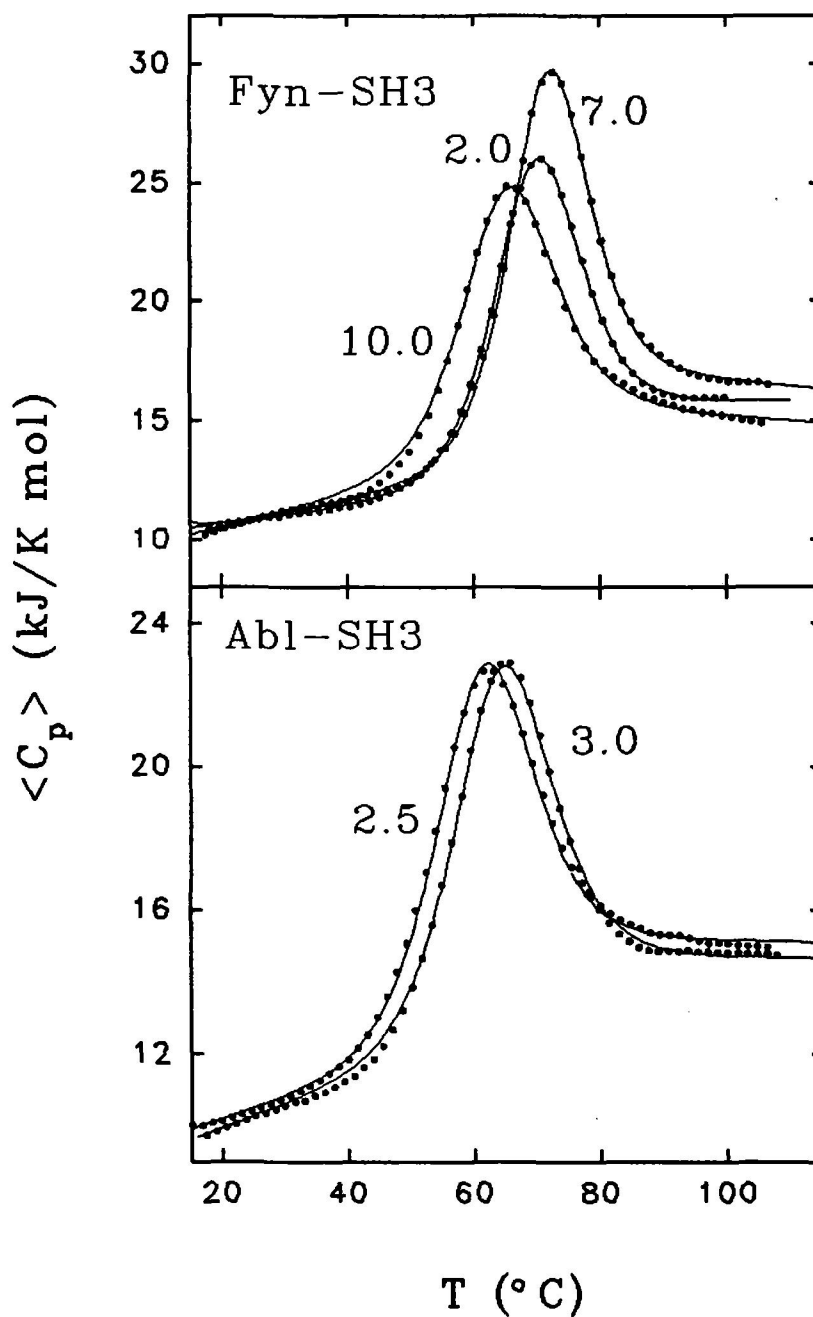


Figura 5.3.1-3: Capacidad calorífica molar parcial de los dominios SH3: con puntos se muestran los datos experimentales y con línea continua el mejor ajuste al modelo de equilibrio de dos estados.

Dominios SH3

$C_p(U)$ a temperatura por encima de 75°C es prácticamente 0 e incluso con pendiente ligeramente negativa. El valor del ΔC_p es muy cercano a la pendiente de la regresión lineal de la gráfica de ΔH vs. T_m para el caso de Spc-SH3 (Vigera et al., 1994a), además los calores de desplegamiento para el dominio Fyn-SH3 coinciden dentro del error experimental en esta línea como se observa en la Figura 5.3.1-4. Los datos de Abl-SH3 tienen prácticamente la misma pendiente pero ligeramente por debajo unos 15 kJ/K mol . Este desplazamiento es desde un punto de vista estadístico apreciable, aunque su valor absoluto es aproximadamente igual al error de la determinación de la entalpía de desplegamiento.

Se puede observar de los parámetros termodinámicos de la Tabla 5.3.1-I que a pesar del pequeño tamaño de los dominios y la ausencia de puentes disulfuros, son extraordinariamente termoestables. No obstante, en términos de estabilidad a temperatura ambiente determinado por su valor de ΔG , en tampón fosfato 10mM pH 7.0, de 15.3 kJ/mol para Fyn-SH3 y de 13.3 kJ/K mol para Abl-SH3, es similar al encontrado para otros dominios como Spc-SH3 cuyo ΔG es de 13.3 kJ/mol (Viguera et al., 1994) o de 17.1 kJ/mol para el dominios SH3 de Sem-5 (Lim et al., 1994), valores que comparado con proteínas globulares de mayor tamaño indican que no son mucho más estables. Estos valores, son similares al de otros dominios globulares pequeños como el dominio de unión Ig-G (Alexander et al., 1992). Este comportamiento de elevada termoestabilidad (valores elevados de T_m), pero estabilidad en términos de ΔG pequeño, es típico de dominios pequeños, dado que dichos dominios tienden a tener valores pequeños de ΔC_p y ΔS de desplegamiento, lo cual lleva a perfiles de ΔG vs. T planos y anchos. Por tanto incluso cuando un dominio tiene una elevada T_m , su estabilidad a temperatura ambiente no es superior a la de proteínas mayores. El valor de ΔC_p esta directamente asociado con el grado de estabilización hidrofóbica de una proteína. Alexander et al. (1992), sin embargo, puntualiza que para pequeños dominios, un bajo ΔC_p , no significa que las fuerzas

Dominios SH3

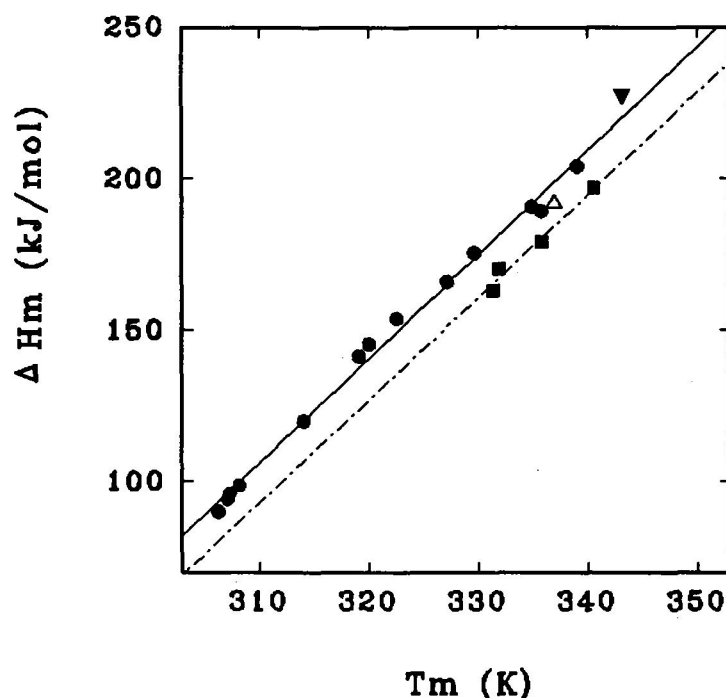


Figura 5.3.1-4: Dependencia de la entalpía de desplegamiento, $\Delta H(T_m)$, con la temperatura de desplegamiento (T_m), para los tres dominios SH3 estudiados hasta ahora en este Departamento. (●) datos sobre espectrina tomados de Viguera et al. (1994) en el intervalo de pH 2.0 a 4.0 en línea continua se muestra la regresión lineal a los datos; (■) datos obtenidos para Abl-SH3 a pH 7.0, 3.5, 2.5 y 2.0; (▼) datos correspondientes a la media de los valores obtenidos para Fyn-SH3 a pH 7.0 y 2.0; (Δ) valor de Fyn-SH3 a pH 10.5.

hidrofóbicas juegan un papel insignificantes, dado que por residuo tienen valores parecidos a la de proteínas mayores. Todos los dominos SH3 conocidos, tienen un corazón hidrofóbico compacto con un volumen substancial, y que los residuos enterrados en este corazón probablemente tienen una contribución importante a la estabilidad.

Resumiendo, el desplegamiento térmico de ambos dominos SH3 en función del pH es un proceso reversible y se ajusta bastante bien a un modelo de equilibrio de

Dominios SH3

dos estados. Es de suponer que al igual que para el dominio Spc-SH3 no existan intermediario de plegamiento (Viguera et al., 1994). Los dominios SH3 presentan una gran termoestabilidad y una estabilidad a temperatura ambiente en términos de ΔG , semejante al de otras proteínas globulares mayores, siendo el dominio Fyn-SH3 más estable que Abl-SH3. La coincidencia de los parámetros termodinámicos de estos dominios con estructuras primarias diferentes es algo bastante curioso y debe de estar relacionado con mecanismos precisos de ajustes termodinámicos de la estructura de los mismos, al menos respecto al mantenimiento de su estabilidad. Al mismo tiempo, algunas diferencias estructurales, como la distribución de grupos cargados en la superficie de la proteínas puede reflejarse en efectos termodinámicos secundarios como es la dependencia de la estabilidad de la proteína con el pH. Estos efectos aunque no son muy importantes para el mantenimiento de la estructura estable del dominio, podrían ser importantes para favorecer interacciones óptimas del dominio con su proteínas hospedadora o diana.

5.3.2. Interacción de los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 con los péptidos 3BP1 y 3BP1-M4Y.

Los dominios SH3 interaccionan con secuencias ricas en prolinas como se puso de manifiesto en los experimentos llevados a cabo por Cicchetti et al. (1992). El hecho de que estos dominios puedan jugar un papel importante como mediadores de la interacción proteína-proteína, esenciales para las funciones celulares y localización subcelular, ha llevado a muchos investigadores a estudiar la interacción de estos dominios con péptidos sintéticos ricos en prolinas, como modelos para la comprensión de la interacción de los dominios SH3 con su proteínas dianas.

En esta memoria realizaremos un estudio de la interacción de los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 con dos péptidos sintéticos suministrados por el centro de síntesis del

Dominios SH3

EMBL (Heidelberg, Alemania), mediante DSC. Ambos péptidos son ricos en prolina y la única diferencia entre los mismos es la sustitución de una metionina en la posición cuarta en el péptido 3BP1 (APTMPPPLPP) por una tirosina en el 3BP1-M4Y (APTYPPPLPP).

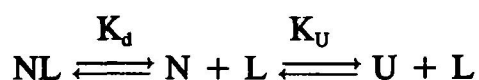
Los experimentos de calorimetría se han realizado a pH 7.0 en tampón fosfato 10 mM donde la estabilidad de ambos dominios es máxima y para el que existen datos en la bibliografía de constantes de asociación (Viguera et al., 1994b). Al igual que el dominio sin ligando, en presencia de diferentes concentraciones del mismo el proceso es reversible prácticamente en un 100% y por tanto el proceso transcurre en el equilibrio.

Como mencionamos en el apartado 4.3, las medidas mediante calorimetría diferencial de barrido de los procesos de unión son indirectas, ya que las constantes de unión se calculan a partir del efecto de la concentración de ligando sobre la temperatura máxima de la transición, lo que implica el uso de modelos para el proceso de desplegamiento de la proteína. En el caso del dominio Abl-SH3, el estudio de su unión a los dos péptidos sintéticos no ha sido posible debido a que no se observó desplazamiento de la T_m en presencia de concentraciones diferentes de los mismos, por lo cual nuestro estudio se centrará solamente en la interacción del dominio Fyn-SH3 con ambos péptidos.

Como se indicó anteriormente hemos realizado los experimentos a pH 7.0 y diferentes concentraciones de ligando. El análisis de las transiciones calorimétricas se llevó a cabo, suponiendo un único sitio de unión del ligando al dominio y que el péptido no sufre ningún proceso de desplegamiento. Además, la conformación del dominio no se modifica por su interacción con los péptidos. Por lo tanto, el modelo más sencillo para el análisis de las transiciones calorimétricas viene dado por el

Dominios SH3

siguiente esquema:



Donde NL representa el complejo macromolécula ligando, N y L la macromolécula en estado nativo y el ligando libre respectivamente y U la macromolécula es estado desplegado. K_d y K_U son las constantes de equilibrio para el proceso de disociación y desplegamiento respectivamente. El desarrollo matemático del mismo se describe en el apartado 4.3.

En la Figura 5.3.2-1 se recogen las capacidades caloríficas del dominio Fyn-SH3 a diferentes concentraciones del péptido 3BP1 (Gráfica A) y del péptido 3BP1-M4Y (Gráfica B), junto con los ajustes globales al modelo anterior. En dichos ajustes se han fijado los datos correspondientes al desplegamiento de la proteína en ausencia de ligandos, de esta manera se puede disminuir el número de parámetros a ajustar. Los parámetros que se han ajustado para cada curva han sido, por tanto, la entalpía, capacidad calorífica y constante de disociación, así como los que controlan la variación del ΔC_p con la temperatura. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 5.2.2-I para ambos péptidos.

Se ha realizado un ajuste multidimensional de las capacidades caloríficas de exceso de las transiciones después de substrair la línea base química según Takahashi y Sturtevant (1981), para ambos péptidos, mediante un programa desarrollado para tal fin en nuestro Departamento. En la Figura 5.3.2-2 se recogen tantos los datos experimentales como los ajustes a los mismos. Los datos obtenidos del ajuste

TABLA 5.3.2-I

Parámetros obtenidos del ajuste de las transiciones calorimétricas de la interacción del dominio Fyn-SH3 con los péptidos 3BP1 y 3BP1-M4Y en fosfato sódico 10 mM, pH 7.0, según el esquema propuesto.

Péptido	Lt*10 ³ (M)	Pt*10 ⁴ (M)	ΔH_d^* (kJ/mol)	K_d^* 10 ^{6*} (M)	$\Delta C_{p,d}^*$ (kJ/K mol)
	0.42	3.40	13	18	1.6
3BP1	0.95	3.10	20	38	0.9
	2.00	3.80	16	44	1.1
	3.97	4.43	10	13	0.8
Media			15±4	28±14	1.1±0.3
	0.60	3.45	22	100	1.1
3BP1- M4Y	1.10	2.80	21	110	0.6
	1.80	3.40	19	103	0.8
	3.97	4.43	11	132	0.7
Media			18±5	111±15	0.8±0.2

* Valores determinados a 298K

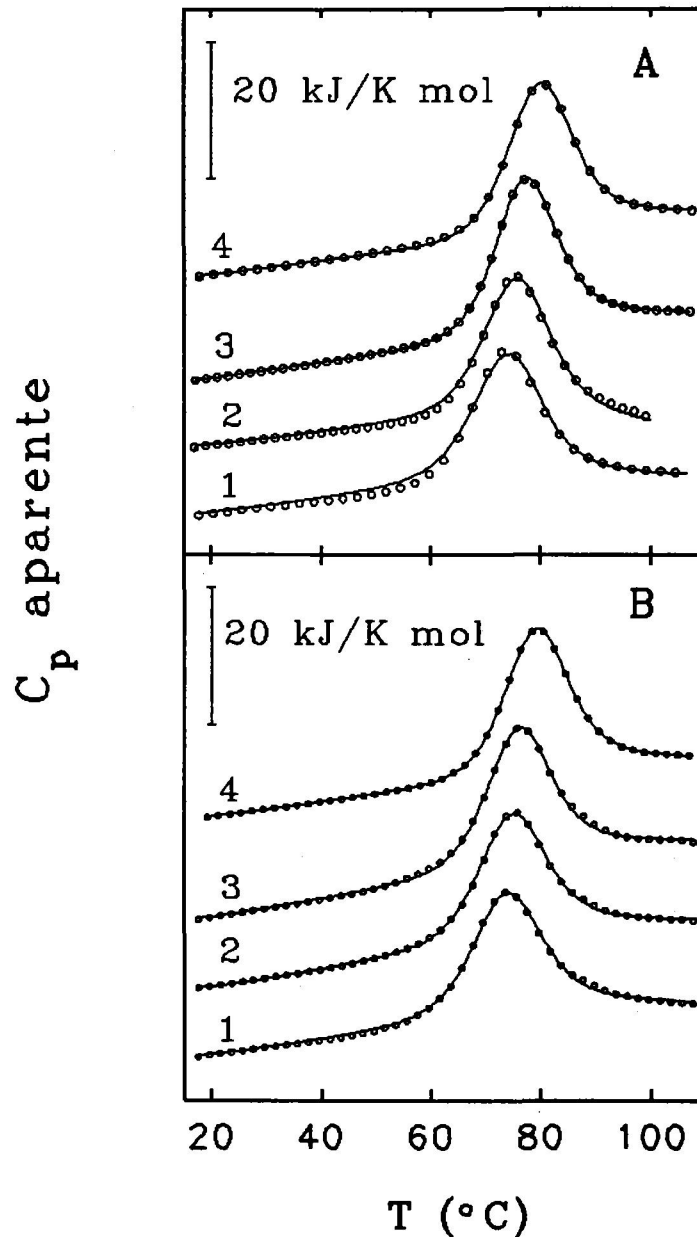


Figura 5.3.2-1: Capacidades caloríficas molares de la interacción del dominio Fyn-SH3 con ambos péptidos a pH 7.0 en tampón fosfato sódico 10 mM y una velocidad de barridos de 2 K/min. Gráfica A: Péptido 3BP1 (1) 0.4 mM; (2) 0.9 mM (3) 2 mM y (4) 4 mM. Gráfica B: Péptido 3BP1-M4Y (1) 0.6 mM; (2) 1.1 mM; (3) 1.8 mM y (4) 4 mM. En puntos se muestran los datos experimentales y en línea continua el mejor ajuste.

Dominios SH3

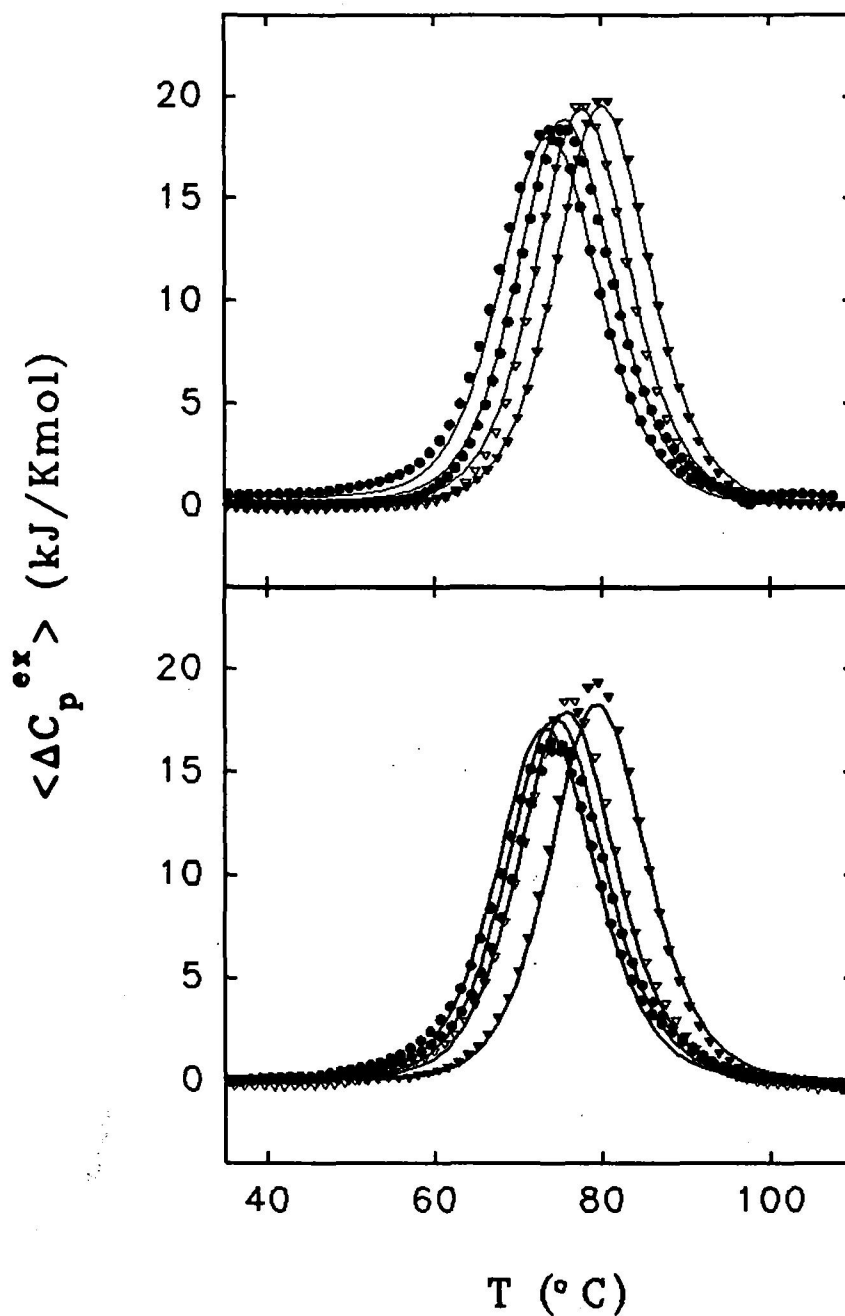


Figura 5.3.2-2: Capacidades caloríficas de exceso de la interacción del dominio Fyn-SH3 con ambos péptidos en las mismas condiciones que en la Figura 5.3.2-1. Gráfica A: péptido 3BP1 (○) 0.4 mM; (●) 0.9 mM; (▽) 2 mM; (▼) 4 mM. Gráfica B: péptido 3BP1-M4Y (○) 0.6 mM; (●) 1.1 mM; (▽) 1.8 mM y (▼) 4 mM.

multidimensional fueron los siguientes:

Péptido	$K_d(\mu M)$	$\Delta H_d(T_m)$ (kJ/Kmol)
3BP1	24	38
3BP1-M4Y	185	28

Hemos de destacar el hecho de que las desviaciones que existen entre las transiciones experimentales y los ajustes influyen principalmente en la altura y anchura del pico, mientras que la posición en temperatura se ajusta bastantes bien, lo cual se traduce en un gran error en la determinación de la entalpía de disociación y menos error en su determinación que K_d . Comparando los datos obtenidos del ajuste multidimensional con los del ajuste global de las transiciones, podemos observar como efectivamente son en los datos de entalpía donde existen más diferencias.

Los datos de K_d pueden ser determinados con una precisión razonable a partir del efecto de la concentración de ligando sobre la T_m (parámetro que en DSC puede ser determinado con bastante exactitud), por lo que los valores obtenidos del ajuste global de las curvas y del ajuste multidimensional concuerdan muy bien. El problema de la determinación de ΔH_d y $\Delta C_{p,d}$ mediante DSC en nuestro caso es bastante importante, por que ambas magnitudes son del orden del error que se comete en la determinación de las mismas mediante esta técnica. Así, en el cálculo de las entalpías de desplegamiento en ausencia y en presencia de ligando, el error es de 15 kJ/mol, que se debe de tomar como el límite más bajo de error de en la determinación de la entalpía de unión, además de tener en cuenta que ΔH_d es la diferencia entre dos grandes magnitudes como son las entalpías en presencia y ausencia de ligando. En el caso de $\Delta C_{p,d}$ el problema es el mismo, su magnitud es del mismo orden que el error

que se comete en la determinación del ΔC_p mediante DSC. Una forma de obviar este problema es la determinación de éste parámetro a partir de la pendiente de la representación de ΔH_T (entalpía total de desplegamiento en presencia de ligando) vs. T_{m_L} (Temperatura de desplegamiento en presencia del ligando), sin embargo, y como se puede observar en la Figura 5.3.2-2 no existe un gran desplazamiento en T_{m_L} a diferentes concentraciones de ligando, llegándose a un punto de saturación en ligando donde no existe efecto sobre la misma. Por tanto, no es posible de terminar el valor de $\Delta C_{p,d}$ de esta manera en nuestras condiciones experimentales, ya que conllevaría también mucho error.

Existe otra forma de calcular los parámetros de unión a partir de las trazas calorimétricas mediante el formulismo desarrollado por Martínez et al.(1994).

El esquema de partida es el mismo propuesto anteriormente para el análisis de las transiciones calorimétricas:



Las constantes se definen de la misma forma que vimos en el apartado 4.3. La concentración de macromolécula total y de ligando, vendrán dada por la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} P_T &= [NL] + [N] + [U] \\ L_T &= [NL] + [L] \end{aligned} \quad (5.2.2-1)$$

sí $L_T \gg P_T$, entonces $[L] \approx L_T = \text{constante}$, K_d puede ser reemplazada por una constante molar efectiva, $K_e = K_d/L_T = [N]/[NL]$. La función de partición, Q_L , para el esquema anterior tomando como estado de referencia la proteína nativa unida al ligando, vendrá dada por,

$$Q_L = 1 + K_e + K_e K_U = 1 + K_e (1 + K_U) = 1 + K_e Q \quad (5.2.2-2)$$

Por tanto,

$$K_e = (Q_L - 1) / Q \quad (5.2.2-3)$$

donde Q es la función de partición de la proteína sin ligando en las mismas condiciones de solvente. Tanto Q_L como Q , son fácilmente calculadas de los datos de DSC según la siguiente ecuación (Freire y Biltonen, 1978):

$$\left(\frac{\partial \ln Q_L}{\partial T} \right)_L = \frac{\langle \Delta H_L \rangle}{RT^2} \quad (5.2.2-4)$$

$$\frac{\partial Q}{\partial T} = \frac{\langle \Delta H_U \rangle}{RT^2}$$

donde ΔH_L es el calor total de desplegamiento en presencia de ligando.

Para obtener la función de partición es necesario realizar una doble integración de la función capacidad calorífica una vez sustraída la capacidad calorífica del estado inicial. Esta operación puede dar lugar a algunas complicación por la extrapolación de la capacidad calorífica del estado inicial a todo el rango de temperatura. Su extrapolación y sustracción puede dar lugar a errores amplificados durante la evaluación de Q por el procedimiento de la doble integración. Por lo tanto, el factor $Q_L - 1$ es calculado con buena aproximación en el punto medio del desplegamiento de la proteína. Los valores de K_d calculados de esta forma, por lo tanto, son bien conocidos sólo para valores de $T > T_{mL}$.

El valor medio de las constantes de disociación para la interacción del dominio

Dominios SH3

Fyn-SH3 con ambos péptidos, calculadas según este método, se recogen en la Tabla siguiente:

Péptido	$K_d \cdot 10^4 (M)^*$	$\Delta H_d (kJ/K \text{ mol})^*$
3BP1	3.62	92
3BP1-M4Y	7.40	55

* Los valores de K_d y ΔH_d están referidos a la T_m .

Como discutimos anteriormente, mientras que los valores de K_d concuerdan con los determinados anteriormente, sin embargo los valores de ΔH_d se desvían mucho más.

El comportamiento del dominio Fyn-SH3 en su unión a ambos péptidos es muy similar, sin embargo a la vista de los resultados de las constantes de disociación, el péptido 3BP1 parece tener mayor afinidad ($K_d = 28 \mu M$) que el péptido 3BP1-M4Y ($K_d = 111 \mu M$). Este comportamiento podría ser debido a que la sustitución de Met por Tyr impida la formación del puente de hidrógeno existente entre la Pro-5 del péptido y el Trp-41 de Fyn-SH3 (Figura 2.3.4-2), por alteración del giro que el péptido presenta en su interacción con el bolsillo formado por las cadenas laterales de los residuos del dominio: Trp-41 y Tyr-54. Interacción, que por otro lado, constituye uno de los tres puntos principales de anclaje del péptido al dominio (Musacchio et al., 1994b).

El valor de la constante de disociación obtenida para el péptido 3BP1, $28 \mu M$, es del mismo orden que el encontrado por Viguera et al. (1994b), $34 \mu M$, aunque el péptido estudiado por ellos tiene un resto de Arg más, en uno de sus extremos. También esta constante, es parecida a la encontrada por Lim et al. (1994) para la

unión del dominio SH3 de Sem-5 con dos ligandos ricos en prolinas (43 y 28 μM), y la interacción del dominio SH3 de la proteína fosfatidilinositol3-Kinasa (PI3K) con varios péptidos (Yu et al., 1994). En todos los casos estudiados hasta el momento, la afinidad de los dominios SH3 es muy baja comparada con otras interacciones biológicas proteínas-péptidos bien conocidas, como es el caso de interacción anticuerpos-péptidos etc. La razón de esta baja afinidad no está muy clara. Para Viguera et al. (1994b) podría ser debida a que la interacción de estos dominios SH3 con sus secuencias dianas ricas en prolinas, tenga lugar en una zona de la célula donde la concentración de las mismas sea muy elevada, aunque también apuntan el hecho de que el péptido libre no represente exactamente la región de unión a la proteína diana y que otros residuos de la proteína o incluso otros componentes celulares puedan estar implicados en el complejo. Lin et al. (1994), proponen que esta baja afinidad es necesaria dado el papel de molécula señal, de tal manera que el complejo que se forma al interaccionar el dominio con su proteína diana, no tenga una vida media muy elevada lo que daría lugar a una obstrucción del camino de las señales de transducción.

Resumiendo pues, la interacción del dominio Fyn-SH3 con los péptidos 3BP1 y 3BP1-M4Y es similar a la interacción de otros dominios SH3 con otros péptidos ricos en prolinas. La caracterización termodinámica de la interacción mediante DSC, debe de ser completada no obstante, con estudios de calorimetría de titulación o diálisis en equilibrio, para determinar con mayor exactitud ΔH_d y $\Delta C_{p,d}$. Sin embargo hay que tener en cuenta que dada la baja afinidad de la unión, los requerimientos de muestra necesario para llevar a cabo estas técnicas son muy elevadas, por lo que es necesario estudiar el coste de trabajo y económico que conlleva la realización de los mismos.

Dominios SH3

6. RESUMEN

6. RESUMEN

En la presente Memoria hemos realizado el estudio mediante calorimetría diferencial de barrido de una proteína y tres dominios submoleculares aislados, todos ellos de bajo peso molecular que despliegan reversiblemente con un comportamiento, sin embargo, claramente diferenciado.

El desplegamiento térmico de la proteína β -Lactoglobulina B, se ha estudiado en la región de pH ácido (Apartado 5.1). El proceso de desplegamiento a todos los valores de pH estudiado (pH 1.5 a 3.0) y a baja fuerza iónica es reversible. La proteína presenta una gran termoestabilidad aumentando ésta con el pH, de tal manera que a pH 3.0 la temperatura de desplegamiento es de 90 °C. Desde un punto de vista termodinámico el comportamiento de β -Lg B a bajas temperaturas es semejante al de otras proteínas globulares descritas en la bibliografía, con un valor de capacidad calorífica específica parcial a 20 °C de 1.5 J/K g y una variación de ésta con la temperatura de $6.7 \cdot 10^{-3}$ J/K² g (1.3 J/K g y $7.5 \cdot 10^{-3}$ J/K² g respectivamente para el caso de Mioglobina; Privalov y Khechinasvili, 1974). A todos los valores de pH estudiado en esta Memoria la proteína es monomérica, como se puso de manifiesto en experimentos de equilibrio de sedimentación.

Aún cuando el análisis de las transiciones de DSC se puede realizar suponiendo un modelo de equilibrio de dos estados, los valores de entalpía y ΔC_p de desplegamiento encontrados son anómalos. Los valores de ΔH son anormalmente bajos teniendo en cuenta el tamaño de la proteína y el que ésta sea muy compacta. Así, para β -Lg B tenemos un valor de entalpía de 2.5 kJ/(mol de residuo) a 90 °C, mientras que para Mioglobina (17.9 kDa) a la misma temperatura este valor es de 4.2 kJ/(mol de residuo). Al mismo tiempo los valores de ΔC_p son muy elevados lo que no puede ser justificado incluso teniendo en cuenta el gran carácter hidrofóbico de esta proteína. Es, por tanto, el desplegamiento térmico de esta proteína a pH ácido algo más complejo que el modelo simple de equilibrio de dos estados como hasta ahora se venía considerando en la bibliografía por todos los autores que han llevado a cabo su estudio (Ananthanarayana et al., 1977; Harwalkar, 1980a y 1980b; Lapanje y Polkar, 1989; Griko et al., 1992). De hecho, el valor tan bajo de entalpía, nos llevó a

plantearnos la existencia de una etapa irreversible a altas temperaturas que pudiera hacer disminuir la misma. Así, el desplegamiento de la proteína es reversible si se calienta a temperaturas inferiores a 110°C siendo irreversible al subir la temperatura. Por otro lado, experimentos realizados a diferentes velocidades de barrido, comprobaron la existencia de un efecto de la misma sobre la pendiente de salida de las transiciones, sin que el máximo del pico de DSC se viera afectado. Simulaciones según el modelo de Lumry y Eyring indicaron que, en aquellas condiciones de menor estabilidad (pH 1.5) y a una velocidad suficientemente baja (0.25 K/min), sería posible observar experimentalmente la exoterma del proceso que tenía lugar a altas temperaturas. Experimentos realizados en este sentido nos llevaron a detectar efectivamente dicha exoterma, aunque no en su totalidad. En un intento por desestabilizar la proteína, es decir, disminuir su temperatura de desnaturalización, se realizaron experimentos a pH 11.0, pudiéndose detectar la exoterma en su totalidad y cómo ésta dependía a su vez de la concentración de muestra, lo cual indica que el proceso exotérmico no es monomolecular. Además, y como se puso de manifiesto por experimentos de electroforesis SDS-PAGE, al aumentar la temperatura la proteína sufría ruptura de enlaces peptídicos, dando lugar a la aparición de péptidos de diferentes tamaños. Estos hechos, junto con otros posibles procesos concomitantes de diferente naturaleza (desamidación, alteración en la formación de puentes disulfuros, etc.) y el efecto citado de la concentración, originan que la etapa sea irreversible y no monomolecular, y que su cinética no sea de primer orden como se propone en el modelo simple de Lumry y Eyring. Por tanto, sería necesario el análisis de las transiciones calorimétricas con un modelo mucho más complejo que incluyera etapas de equilibrio e irreversibles.

Como indicamos anteriormente, la β -Lg B presenta un marcado carácter hidrofóbico, lo que nos llevó a realizar experimentos en presencia de un agente desnaturalizante, como es el cloruro de guanidina, para intentar detectar la denominada desnaturalización "por frío". La presencia de diferentes concentraciones de agente desnaturalizante da lugar a una disminución tanto de la entalpía como de la temperatura de desplegamiento y efectivamente a la aparición de una segunda endoterma a bajas temperaturas correspondiente a la desnaturalización "por frío". Esta segunda endoterma sólo es visible a concentraciones de GuHCl superiores a 3M. Tanto el desplegamiento a altas temperaturas como el replegamiento

de la proteína desnaturalizada a bajas temperaturas, no siguen el modelo de dos estados obteniendo un valor de $r=0.5$, indicando la posibilidad de cooperatividad intermolecular. De hecho, por debajo de una concentración de GuHCl 1.5M la proteína agrega. Este comportamiento en presencia de GuHCl es extraño, si tenemos en cuenta que este agente incrementa la solubilidad tanto de compuestos polares como apolares (Nozaki y Tanford, 1963), por tanto, la proteína tanto en estado nativo como desplegado debería ser más soluble en GuHCl, si nos basamos en las propiedades de solvatación de los aminoácidos aislados. La presencia de la desnaturalización "por frío" detectada por DSC, fue confirmada mediante experimentos de CD, que además indicaron que se alcanzan diferentes estados desplegados a alta y a baja temperatura. El hecho de que los dos procesos conduzcan a diferentes estados desplegados de la proteína, difiere de lo encontrado en los pocos casos estudiados hasta ahora para otras proteínas. Hay que destacar, que se han obtenido evidencias experimentales de la desnaturalización "por frío" sólo recientemente y para muy pocas proteínas.

* * *

El estudio del fragmento TLN 205-316 mediante calorimetría diferencial de barrido se ha realizado a pH ácido (Apartado 5.2). El desplegamiento es reversible, observándose un efecto de concentración sobre las transiciones calorimétricas (aumento de T_m conforme aumenta la concentración de muestra) y una cierta asimetría de las mismas. Aún cuando los datos existentes en la bibliografía para el fragmento TLN 206-316 indican que se encuentra en estado monomérico, nuestras datos calorimétricos apuntan la existencia de un equilibrio de asociación-disociación, confirmado posteriormente por experimentos de ultracentrifugación analítica, con los cuales se determinaron las constantes de equilibrio de asociación a los diferentes valores de pH y utilizadas posteriormente para el análisis de las transiciones calorimétricas. Los datos calorimétricos para el desplegamiento térmico del fragmento TLN 205-316, siguen el siguiente esquema:



El resultado más sorprendente del análisis termodinámico del fragmento es el valor negativo encontrado para el $\Delta C_{p,D}$, ya que normalmente el ΔC_p de unión en la interacción de proteínas-proteínas o proteínas-ligandos es negativo. La única explicación razonable para nuestro valor de $\Delta C_{p,D}$, es que la asociación se encuentre emparejada a un desplegamiento

parcial, dado que la superficie no-polar enterrada en la unión parece ser el término dominante en los valores de ΔC_p de asociación frente al posible cambio en el área de la superficie polar. De hecho, experimentos preliminares de RMN, indican que el fragmento TLN 205-316 al igual que el fragmento TLN 255-316, el cual es un dímero en solución (cada subunidad formada por 3 hélices α), está también estabilizado por la misma interacción favorable de las 3 hélices dejando la primera hélice y la parte amino-terminal de la cadena, próxima a una conformación al azar. De acuerdo con esta conformación propuesta para el dímero, el valor negativo de $\Delta C_{p,D}$ sugiere que el proceso de disociación a pH ácido, no conlleva únicamente una exposición adicional de la superficie hidrofóbica encerrada entre los dos monómeros, sino la existencia de algún tipo de cambio conformacional simultáneo a la disociación, ocasionando así que el balance de superficie hidrofóbica expuesta al medio por causa de la disociación sea negativo.

En este mismo sentido apuntan los valores de entalpía encontrados para el monómero y el dímero plegados, siendo éstos mucho más bajos que los correspondientes a proteínas globulares, lo que indica de nuevo la posible presencia de una estructura parcialmente plegada o desordenada para el fragmento TLN 205-316. No obstante, son necesarios experimentos adicionales por técnicas estructurales para determinar la existencia de este cambio de conformación en el proceso de disociación y poder, de esta forma, justificar un valor de $\Delta C_{p,D}$ tan sorprendente determinado del análisis de las transiciones calorimétricas de DSC.

* * *

El estudio de DSC del desplegamiento térmico de los dominios SH3, tanto en ausencia como en presencia de ligando, sigue el modelo de equilibrio de dos estados, siendo el estado nativo y el desplegado los únicos estados poblados significativamente. Tanto el dominio Fyn-SH3 como Abl-SH3 en ausencia de ligandos, tienen una gran termoestabilidad, sin que ésta se vea afectada por cambios en el pH. Esta insensibilidad al pH contrasta con el dominio SH3 de espectrina. Este comportamiento diferente puede ser justificado teniendo en cuenta que, tanto en Fyn-SH3 como en Abl-SH3, los grupos cargados se encuentran distribuidos en

la superficie de la molécula expuestos al solvente, no solo en el estado desplegado sino también en el estado nativo, y sin formar puentes salinos estables, de tal forma que los valores de pK de estos grupos cargados no dependen de la conformación de la proteína. En términos de estabilidad a temperatura ambiente determinada por el valor de ΔG , estos dominios no presentan mayor estabilidad que otras proteínas de mayor tamaño. Este comportamiento de gran termoestabilidad y estabilidad normal a temperatura ambiente, típico de dominios pequeños.

Los parámetros termodinámicos obtenidos mediante DSC del desplegamiento de los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 son semejantes a los de otros dominios SH3 estudiados hasta el momento, lo cual no deja de ser sorprendente dada la baja homología en secuencia que presentan entre sí. Este hecho puede estar relacionado con mecanismos precisos de ajustes termodinámicos de la estructura de los dominios, al menos respecto al mantenimiento de su estabilidad. Al mismo tiempo, algunas diferencias estructurales, como la distribución de grupos cargados en la superficie de las proteínas, pueden reflejarse en efectos termodinámicos secundarios como es la dependencia de la estabilidad de la proteína con el pH.

El desplegamiento del dominio Fyn-SH3 y Abl-SH3, en presencia de los péptidos 3BP1 y 3BP1-M4Y, es reversible y también sigue el modelo de equilibrio de dos estados. Mediante DSC ha sido posible determinar las constantes de asociación de dichos péptidos, mediante el efecto de las diferentes concentraciones de los mismos sobre la T_m de las transiciones calorimétricas. Sólo se ha podido realizar para el caso del dominio Fyn-SH3 debido a que en el caso del dominio Abl-SH3 no se ha encontrado prácticamente efecto sobre el máximo de las transiciones calorimétricas, imposibilitando su estudio mediante DSC. La interacción del péptido 3BP1 con el dominio Fyn-SH3 ($K_d=28 \mu M$), es más fuerte que la del péptido 3BP1-M4Y ($K_d=110 \mu M$), posiblemente debido a que la sustitución de la metionina en posición cuarta en el péptido 3BP1 por tirosina en el 3BP1-M4Y origina una alteración en la conformación del péptido en su interacción con el dominio, impidiendo de esta manera la formación de un puente de hidrógeno existente entre la Pro en posición 5 del péptido con el triptófano-41 del dominio, con la consiguiente desestabilización de la

interacción. Las constantes de disociación obtenidas, son del mismo orden que las encontradas por otros autores utilizando técnicas no calorimétricas en la interacción de los dominios SH3 con péptidos ricos en prolinas. La causa de la afinidad que presentan estos dominios con estos péptidos no está aún muy clara, siendo varias las razones propuestas por diferentes autores.

Aún cuando las constantes de disociación han podido ser determinadas adecuadamente, los valores de entalpía y de ΔC_p de disociación no han podido ser determinados de la misma forma, debido principalmente a que su magnitud era del mismo orden que el error cometido en las medidas de los valores de entalpías y cambios en capacidad calorífica que se comete en el análisis de las transiciones calorimétricas. Es necesario realizar experimentos adicionales mediante otras técnicas, como podría ser el caso de la calorimetría isotérmica de titulación, para determinar con menor error estos valores y caracterizar completamente la energética de la interacción de estos péptidos con el dominio Fyn-SH3.

* * *

Como se ha puesto de manifiesto a lo largo de esta Memoria, proteínas con bajo peso molecular presentan un diferente comportamiento en su desplegamiento térmico, aunque para todas ellas el desplegamiento es reversible, en mayor o menor extensión. Mientras que en los dominios SH3 existen solamente dos estados significativamente poblados, nativo (N) y desplegado (U) en el caso de β -Lactoglobulina B, a parte de dos estados en equilibrio químico, existe una etapa irreversible a altas temperaturas dando lugar a un estado final (F), y en el caso del fragmento TLN 205-316 tenemos tres estados significativamente poblados constituidos por un estado dimérico (N_2), monomérico (N) y desplegado (U). Por lo tanto, aún cuando muchas proteínas de bajo peso molecular sigan en su desplegamiento el modelo de equilibrio de dos estados, los resultados de esta Memoria indican que no sólo el tamaño determina este comportamiento, sino que otros aspectos tales como la composición y la secuencia de aminoácidos, y consiguientes niveles de estructura secundaria y conformación resultante juegan un papel muy importante en el mismo. No debe olvidarse, por último que

en nuestros sistemas se incluyen una típica proteína globular, un fragmento de proteína que tiende a asociarse en su estado plegado, y dos dominios submoleculares de alta homología. Precisamente estos últimos son los que presentan la desnaturalización térmica que sigue más ajustadamente el modelo monomolecular de equilibrio de dos estados.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

A partir del análisis, interpretación y discusión de los resultados obtenidos en esta Memoria, se proponen las siguientes conclusiones.

1. La desnaturalización térmica de la proteína β -Lactoglobulina B en el intervalo de pH 1.5 a 3.0 y baja fuerza iónica es reversible y su análisis puede realizarse según el modelo de dos estados. Sin embargo, un estudio más detallado de los valores anómalos de baja entalpía, elevado ΔC_p , de desplegamiento, la irreversibilidad del proceso al calentar la muestra por encima de 110 °C y la detección mediante electroforesis SDS-PAGE de ruptura de la cadena polipeptídica a altas temperaturas, nos lleva a concluir que el desplegamiento de esta proteína se ve afectada por un proceso exotérmico a altas temperaturas no monomolecular y, por tanto, no analizable por el modelo sencillo de Lumry y Eyring.

2. Estudios calorimétricos de la β -Lactoglobulina B a pH 3.0, en presencia de cantidades crecientes de cloruro de guanidina, muestran la aparición de una endoterma a bajas temperaturas correspondiente a la renaturalización de la proteína previamente desnaturalizada a temperaturas inferiores. La detección de la denominada desnaturalización por frío es un hecho reciente y solo comprobado experimentalmente hasta la fecha para un número muy reducido de proteínas.

3. Estudios paralelos por dicroísmo circular en las regiones del ultravioleta cercano y lejano han confirmado la desnaturalización de la β -Lactoglobulina B a pH 3.0 en 3.5 M de cloruro de guanidina, tanto a baja como a alta temperatura, y la existencia del estado plegado de las proteína a temperaturas intermedias. Los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano parecen indicar, a su vez, una mayor ordenación en estructura secundaria para la proteína desnaturalizada a alta temperatura que para la desnaturalizada "por frío".

4. El desplegamiento térmico del fragmento de termolisina 205-316 en el intervalo de pH ácido 2.5-5.0 es reversible y de equilibrio. El efecto de la concentración de muestra

sobre las transiciones de calorimetría diferencial de barrido y la asimetría presentada por las mismas, se ajustan cuantitativamente al modelo $N_2 \rightleftharpoons 2N \rightleftharpoons 2U$, propuesto para el análisis de dichas trazas de DSC. La existencia de un equilibrio monómero-dímero para la conformación plegada en disolución se ha confirmado mediante experimentos de ultracentrifugación analítica.

5. El desplegamiento térmico de los dominios Fyn-SH3 y Abl-SH3 tanto a pH ácido, como neutro y alcalino, sigue el modelo de equilibrio de dos estados, con unos parámetros termodinámicos similares a los de otros dominios SH3 estudiados y de otras proteínas globulares.

6. El dominio Fyn-SH3 en presencia de los ligandos 3BP1 y 3BP1-M4Y se despliega térmicamente también según un modelo de equilibrio de dos estados. Las constantes de disociación obtenidas por DSC, indican una disminución de la afinidad al reemplazar el resto de metionina del péptido 3BP1 por tirosina (péptidos 3BP1-M4Y).

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

- Adams, E.T. y Lewis, M.S. (1968) *Biochemistry* 7, 1044.
- Alexander, P., Fahnestock, S., Lee, T., Orban, J. y Bryan, P. (1992) *Biochemistry* 31, 3597-3603.
- Azuaga, A.I., Galisteo, M.L., Mayorga, O.L., Cortijo, M. y Mateo, P.L. (1992) *FEBS Lett.* 309, 258.
- Ananthanarayanan, V.S., Ahmad, F. y Bigelow, C.C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 492, 194.
- Armstrong, J.McD. y McKenzie, H.A. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 147,60.
- Aschaffenburg, R. y Drewry, J. (1955) *Nature* 176, 218.
- Aschaffenburg, R. y Drewry, J. (1957) *Biochem. J.* 65, 273.
- Bach, D. y Chapman, D. (1980) "Biological Microcalorimetry" (Beezer, A. E., Ed.), pag. 265, Academic Press, London.
- Bar Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A. y Mandigan, V. (1993) *Cell* 74,83-91.
- Bell, K. (1962) *Nature* 195, 705.
- Bell, K. y McKenzie, H.A. (1964) *Nature* 204, 1275.
- Bell, K. y McKenzie, H.A. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 147, 123.
- Bell, K., McKenzie, H.A., Shaw, D.C. (1981) *Mol. Cel. Biochem.* 35, 103.
- Bevington, P.R. (1969) in *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, McGraw-Hill, New York.
- Booker, G.W., Gout, I., Downing, A.D., Driscoll, P.C., Boyd, J., Waterfield, M.D. y Campbell, I.D. (1993) *Cell* 73, 813-822.
- Brandts, J.F. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 4291.
- Brochert, T.V., Mathieu, M., Zeelen, J.Ph., Courtneidge, S.A. y Wierenga, R.K. (1994) *FEBS Lett.* 341, 79-85.
- Brown, E.M., Carrol, R.J., Pfeffer, P.E. y Sampugna, J. (1983) *Lipids* 18, 111.
- Casal, H.L., Köhler, U. y Mantsch, H.H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 957, 11.
- Chen, B. y Schellman, J. A. (1989) *Biochemistry* 28, 685.
- Christensen, J.J., Izatt, R.M. y Hansen, L.D. (1965) *Rev. Sci. Instrum.* 36, 779
- Christensen, R. y Pain, R.H. (1991) *Eur. Biophys. J.* 19, 221.

- Cichetti, O., Mayer, B.J., Thiel, G. y Baltimore, D. (1992) *Science* 257, 803-806.
- Colman, P.M., Jansonius, J.N. y Matthews, B.W. (1972) *J. Mol. Biol.* 70, 701.
- Conejero, F. (1993) *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- Conejero, F., De Filippis, V., Fontana, A. y Mateo, P.L. (1994) *FEBS Lett.* 344, 154-156.
- Conejero, F., Mateo, P.L., Avelés, F.X. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1991b) *Biochemistry* 30, 2067.
- Conejero, F., Sánchez-Ruiz, J.M., Mateo, P.L., Burgos, F.J., Vendrell, J. y Avelés, F.X. (1991a) *Eur. J. Biochem.* 200, 663.
- Conejero-Lara, F., De Filippis, V., Fontana, A. y Mateo, P.L. (1994) *FEBS Lett.* 344, 154-156.
- Dalzoppo, D., Vita, C. y Fontana, A. (1985) *J. Mol. Biol.* 182, 331-340.
- De Wit, J.N. y Swinkels, G.A.M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 624, 40.
- Dill, K.A. (1990) *Biochemistry* 29, 7133.
- Dupont, M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 94, 573.
- Durchschlag, H. (1986) in *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology* (Hinz, H.J. ed.) pp. 45-128, Spriger-Verlag, Berlin.
- Franks, F. y Hatley, R.H.M. (1992) *Advances in Low-Temperature Biology 1*, 141.
- Freire, E. y Biltonen, R.L. (1978) *Biopolimers* 17, 463.
- Freire, E. (1989) *Comments Mol. Cell. Biophys.* 6, 123-140.
- Freire, E., Mayorga, O.L. y Straume, M. (1990) *Anal. Chem.* 62, 950A.
- Frushour, B.G. y Koenig, J.L. (1975) *Biopolymers* 14, 649.
- Fujita, S.C., Go, N. y Imahori, K. (1979) *Biochemistry* 18, 24-28.
- Galisteo, M.L., Mateo, P.L. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1991) *Biochemistry* 30, 2061.
- Galisteo, M.L. (1990) *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- García-Fuentes, L. (1994) *Tesis Doctoral*. Universidad de Almería.
- Gilbert, G.A. (1960) *Nature* 186, 882.
- Gilbert, L.M. y Gilbert, G.A. (1961) *Nature* 192, 1181.
- Gordon, W.G., Basch, J.J. y Kalan, E.B. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2908.
- Gouch, P. y Jennes, R. (1962) *J. Dairy Sci.* 45, 1033.
- Green, D.W. y Aschaffenburg, R. (1959) *J. Mol. Biol.* 1, 54.

Green, D.W., Aschaffenburg, R., Camerman, A., Copplola, J.C., Dunnill, P., Simmons, R.M., Komorowsky, E., Sawyer, L., Turner, E.M.C. y Woods, K.F. (1979) *J. Mol. Biol.* 131, 375.

Griko, Y.V., Privalov, P.L., Sturtevant, J.M. y Venyaminov, S.Y. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3343.

Griko, Y.V. y Privalov, P.L. (1992) *Biochemistry* 31, 8810.

Groves, M.L., Hipp, N.J. y McMeekin, T.L. (1951) *J. Am. Chem. Soc.* 73, 2790.

Harwalkar, V.R. (1980a) *J. Dairy Sci.* 63, 1043.

Harwalkar, V.R. (1980b) *J. Dairy Sci.* 63, 1052.

Hedges, J., Sarrafzadeh, S., Lear, J.D. y McRorie, D.K. (1984) in *Modern Analytical ultracentrifugation* (Schuster, T.M. y Laue, T.M., eds.) pp. 227-244, Birkhäuser, Boston.

Herskovits, T.T., Townend, R. y Timasheff, S.N. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 4445.

Hinz, H.J., Shiao, D.D.F. y Sturtevant, J.M.: (1971) *Biochemistry* 10, 1347-1352.

Hirai, J. y Varmus, H.E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8592-8596.

Hirs, C.H.W. y Timasheff, S.N. (1985) *Methods Enzymol.*, 117.

Jackson, P. y Baltimore, D. (1990) *EMBO J.* 8, 449-456.

Janin, J., Miller, S. y Chothia, C. (1988) *J. Mol. Biol.* 204, 155-164.

Johnson, M.L., Correia, J.J., Yphantis, K.A. y Halvorson, H.R. (1981) *Biophys. J.* 36, 575-588.

Jordan, J., Grime, J.K., Wangh, D.H., Miller, C.D., Culles, H.M. y Lohr, D. (1976) *Anal. Chem.* 48, 234.

Kella, D. y Kinsella, E. (1988) *Biochem. J.* 255, 113.

Khan, S.M., Birnbaum, E.R. y Darnall, D.W. (1978) *Biochemistry* 17, 4669-4674.

Khan, S.M., Darnall, D.W. y Birnbaum, E.R. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 624, 1-12.

Kientz, M.L. y Bigelow, C.C. (1966) *Biochemistry* 5, 3494.

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.

Kumosinski, T.F. y Timasheff, S.N. (1966) *J. Am. Chem. Soc.* 88, 23.

- Kuwajima, K. (1989) en "*Proteins: Structure, Function and Genetics*" 6, 87.
- Lapanje, S. y Poklar, N. (1989) *Biophys. Chem.* 34, 155.
- Lechuga, A. (1986) *Tesina de Licenciatura*. Universidad de Granada.
- Lento, V.P., Wasenius, V.M., Salven, P. y Saraste, M. (1988) *Nature* 334, 388.
- Lewis, M.S. (1991) *Biochemistry* 30, 11716-11718.
- Liberatori, J., Morisio-Guidetti, L., Napolitano, L. y Conti, A. (1979) *Bool. Soc. It. Biol. Sper.* 55, 1369.
- Lim, W.A., Fox, R.O. y Richards, F.M. (1994) *Protein Science* 3, 1261-1266.
- Lim, W.A. y Richards, F.M. (1994) *Structural Biology* 1, 221-225.
- Liu, X. Marengere, L.E.M., Koch, C.A. y Pawson, T. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 5225-5232.
- López-Lacomba, J.L. (1987) *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- López-Lacomba, J.L., Guzman, M., Cortijo, M. y Mateo, P.L. (1989) *Biopolymers* 28, 2143.
- López-Mayorga, O. (1983) *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- López-Mayorga, O. y Freire, E. (1987) *Biophys. Chem.* 87, 87-96.
- Lumry, R., Biltonen, R. y Brandts, J.F. (1966) *Biopolymers* 4, 917.
- Lumry, R. y Eyring, H. (1954) *J. Phys. Chem.* 58, 110.
- Makhatadze, G.I., Medvedkin, V.N. y Privalov, P.L. (1990) *Biopolymers* 30, 1001-1010.
- Makhatadze, G.I. y Privalov, P.L. (1990) *J. Mol. Biol.* 213, 375-384.
- Mabrey, S. y Sturtevant, J.M. (1978) *Methods Membr. Biol.* 9, 237.
- Maddox, J. (1992) *Nature* 355, 201.
- March, K.L., Maskalick, D.C., England, R.D., Friend, S.H. y Gurd, F.R.N. (1982) *Biochemistry* 21, 5241-5251.
- Martínez-Herrerías, J.C. (1995) *Teisis doctoral*. Universidad de Granada.
- Mateo, P.L. y Privalov, P.L. (1981) *FEBS Lett.* 123, 189.
- Mateo, P.L. (1984) "*Thermochemistry and its Applications to Chemical and Biochemical Systems*" (Ribeiro de Silva, M. A. V., Ed.), pag. 541. Reidel, Holland.
- Matthews, B.W., Jansonius, J.N., Colman, P.M., Schoenborn, B.P. y Dupourque, D. (1972) *Nature (Lond.)* 238, 37-41.

- Matthews, B.W., Weaver, L.H. y Kester, W.R. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 8030-8044.
- Mayer, B.J., Hamaguchi, M. y Hanafusa, H. (1988) *Nature* 332, 272-275.
- McKenzie, H.A (1967) *Adv. Protein Chem.* 22, 57.
- McKenzie, H.A. y Ralston, G.B. (1972) *Biochemistry* 11, 4539.
- McRoire, D.K. y Voelker, P.J. (1993) *Self-Associating Systems in the Analytical Ultracentrifuge*, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California.
- Mills, O.E. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 434, 324.
- Minton, A. P. (1994) in *Modern Analytical Ultracentrifugation* (Schuster, T.M. y Laue, T.M., eds.) pp. 81-93 Birkhäuser, Boston.
- Montminy, M. (1993) *Science* 261, 1694-1695.
- Murphy, K.P., Vinod, B., Xie, D. y Freire, E. (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 293.
- Musacchio, A., Noble, M.E.M., Pautit, R., Wierenga, R. y Saraste, M. (1992) *Nature* 359, 851.
- Musacchio, A., Wilmanns, M. y Saraste, M. (1994a) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 61, 283-297.
- Musacchio, A., Saraste, M. y Wilmanns, M. (1994b) *Structural Biology* 1, 546-551.
- Noble, M.E.M., Musacchio, A., Saraste, M., courtneidge, S. y Wierenga, R.K. (1993) *EMBO J.* 12, 2617-2624.
- Nozaki, Y., Bunville, L.G. y Tanford, C. (1959) *J. Am. Chem. Soc.* 81, 5523.
- Nozaki, Y. (1972) *Methods Enzymol.* 26, 43.
- Ogston, A.G. y Tilley, J.M.A. (1955) *Biochem. J.* 59, 644.
- Overduin, M., Rios, C.S., Mayer, S.J., Baltimore, D. y Cowburn, D. (1992) *Cell* 70, 697-704.
- Pace, N. C. y Tanford, C. (1968) *Biochemistry* 7, 198.
- Palmer, A.H. (1934) *J. Biol. Chem.* 104, 359.
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcome, M.E. y Kraulis, P.J. (1986) *Nature* 324, 383.
- Park, K.H. y Lund, D.B. (1984) *J. Dairy Sci.* 67, 1699.
- Pervaiz, S. y Brew, K. (1985) *Science* 228, 335.
- Pfeil, W. y Privalov, P.L. (1976) *Biophys. Chem.* 4, 23.

- Piez, A.K., Earl, W.D., Folk, J.E. y Gladner, J.A. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2912.
- Polis, D., Schumukler, H.W., Custer, J.H. y McMeekin, T.L. (1950) *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 4965.
- Privalov, P.L. y Kechinashvili, N.N. (1974) *J. Mol. Biol.* 86, 665.
- Privalov, P.L. y Filimonov, V.V. (1978) *J. Mol. Biol.* 122, 447.
- Privalov, P.L. (1979) *Adv. Prot. Chem.* 33, 167.
- Privalov, P.L. (1980) *Pure & Appl. Chem.* 52, 479.
- Privalov, P.L., Mateo, P.L., Khechinashvili, N.N., Stepanov, V. y Revina, L. (1981) *J. MOL. Biol.* 152, 445.
- Privalov, P.L., Griko, Y.V., Venyaminov, S.Y. y Kutysenko, V.P. (1986) *J. Mol. Biol.* 190, 487.
- Privalov, P.L. y Gill, S.J. (1988) *Adv. Prot. Chem.* 39, 191-234.
- 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.
- Privalov, P. L., Pititsyn, O.B. y Birshtein, T.M. (1969) *Biopolymers.* 8, 559-571.
- Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov, S.Yu., Griko, Yu.V., Makhatadze, G.I. y Khechinashvili, N.N. (1989) *J. Mol. Biol.* 205, 737.
- Privalov, P.L. (1990) *Biochem. Mol. Biol.* 25, 281.
- Privalov, P.L. y Makhatadze, G.I. (1990) *J. Mol. Biol.* 213, 385-391.
- Privalov, P.L. y Makhatadze, G.I. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 715-723.
- Ramsay, G. y Freire, E. (1990) *Biochemistry* 29, 8677.
- Randzio, S.L. y Suurkuusk, J. (1980) "Biological Microcalorimetry" (Beezer, A. E., Ed.) pag. 311. Academic Press. London.
- Relkin, P., Eynard, L. y Launay, B. (1992) *Thermochim. Acta* 204, 111.
- Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P. y Baltimore, D. (1993) *Science* 259, 1157-1161.
- Rico, M., Jimenez, M.A., González, C., De Phillipis, V. y Fontana A. (1994) *Biochemistry* 33, 14834-14847.
- Ross, P.D. (1987) in *Thermodynamic Data for Biochemistsry and Biotechnology* (Hinz, H.J., ed.) pp. 227-233, Springer-Verlag, Berlin
- Rüegg, M., Metzger, V. y Susi, H. (1975) *Biopolymers* 14, 1465.

- Rüegg, M., Moor, U. y Blanc B. (1977) *J. Dairy Research* 44, 509.
- Sánchez-Ruiz, J.M. y Mateo, P.L. (1987) *Cell Biol. Rev.* 11, 15.
- Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M. y Mateo, P.L. (1988) *Biochemistry* 27, 1648-1652.
- Sánchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.* 61, 921.
- Savitzky, A. y Golay, M.J.E. (1964) *Anal. Chem.* 36, 1627.
- Sawyer, W.H. (1968) *J. Dairy Sci.* 51, 323.
- Sawyer, W.H., Norton, R.S., Nichol, L.W. y McKenzie, G.H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 243, 19.
- Schwarz, F.P. (1990) *Thermochim. Acta* 159, 305.
- Seidel-Dugan, C., Meyer, B.E., Thomas, S.M. y Brugge, J.S. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 1835-1845.
- Spolar, R.S. y Record Jr., M.T. (1994) *Science* 263, 777-784.
- Stahl, M.L., Ferez, C.R., Kelleher, K.L.O., Kriz, R.W. y Knopf, J.L. (1988) *Nature* 332, 269-272.
- Sturtevant, J.M. (1974) *Ann. Rev. Biophys. Bioengin.* 3, 32.
- Sturtevant, J.M. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2236-2240.
- Takahashi, K. y Sturtevant, J.M. (1981) *Biochemistry* 20, 6185.
- Tanford, C. y Nozaki, Y. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 2874.
- Timasheff S.N. y Townend, R. (1961a) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 464.
- Timasheff, S.N. y Townend, R. (1961b) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 470.
- Timasheff, S.N. y Townend, R. (1962) *J. Dairy Sci.* 45, 259.
- Timasheff, S.N., Townend, R. y Mescanti L. (1965) *J. Biol. Chem* 241, 1863.
- Titani, K., Hermodson, M.A., Ericson, L.H., Walsh, K.A. y Neurath, H. (1972) *Nature New Biology* 238, 41.
- Townend, R. y Timasheff, S.N. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3613.
- Townend, R. y Timasheff, S.N. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* 82, 3168.
- Townend, R. Lucille, W. y Timasheff, S.N. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* 82, 3175.
- Viguera, A.R., Martínez, J.C., V.V. Filimonov, P.L. Mateo y L. Serrano (1994a) *Biochemistry* 33, 2142-2150.
- Viguera, A.R., Arrondo, J.L., Musacchio, A., Saraste, M. y Serrano, L. (1994b)

Biochemistry 33, 10925-10933.

Viser, J., Deonier, R.C., Adams, E.T. y Williams, J.W. (1972) *Biochemistry* 11, 2634.

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., Seeman, J.R. y Chaiken, I.M. (1979) *Biochemistry* 18, 3023-3031.

Vita, C. Fontana, A. y Jaenicke, R. (1989) *Eur. J. Biochem.* 183, 513-518.

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.

Waskman, G., Kominos, D., Robertson, S.C., Palin, N., Baltimore, D., Birge, R.B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B.J., Overduin, M., Resh, M.D., Rios, C.B. Silverman, L. y Kuriyan, J. (1992) *Nature* 358, 646-653.

Wausbluth, M.D. y Grieger, R.A. (1974) *Biochemistry* 13, 1285.

Wierenga, R.K., Noble, M.E.M. y Davenport, R.C. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 1115-1126.

Wiessinger, H. y Hinz, H.J. (1987) in *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology* (Hinz, H.J., ed.) pp. 211-225, Springer-Verlag, Berlin.

Yoo, S.H. y Lewis, M.S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 11236-11241.

Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. y Schreiber, A.W. (1994) *Cell* 76, 933-945.

Yu, H., Rosen, M.K., Shin, T.B., Seidel-Dugan, C., Brugge, J.S. y Schreiber, S.L. (1992) *Science* 258, 1665-1668.

Zale, S.E. y Klibanov, A.M. (1986) *Biochemistry* 25, 5432-5444.