

PROV. T/20-205

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Química Física

**Puesta a Punto de un Nuevo Calorímetro de Titulación GILL.
Caracterización Termodinámica de la Interacción
Barnasa - 3'GMP.**

Mohamed El Harrous

TESIS DOCTORAL

Granada (España), 1994



Biblioteca Universitaria de Granada



01533902

Prov. T/20-205

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA

↑
15
117

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ...8-4-94...
ENTRADA NUM. ...516...

*Puesta a Punto de un Nuevo Calorímetro
de Titulación GILL.
Caracterización Termodinámica de la Interacción
Barnasa - 3'GMP.*

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	69681823
Nº Copia	2123448

Mohamed El Harrous

Tesis Doctoral, 1994.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA

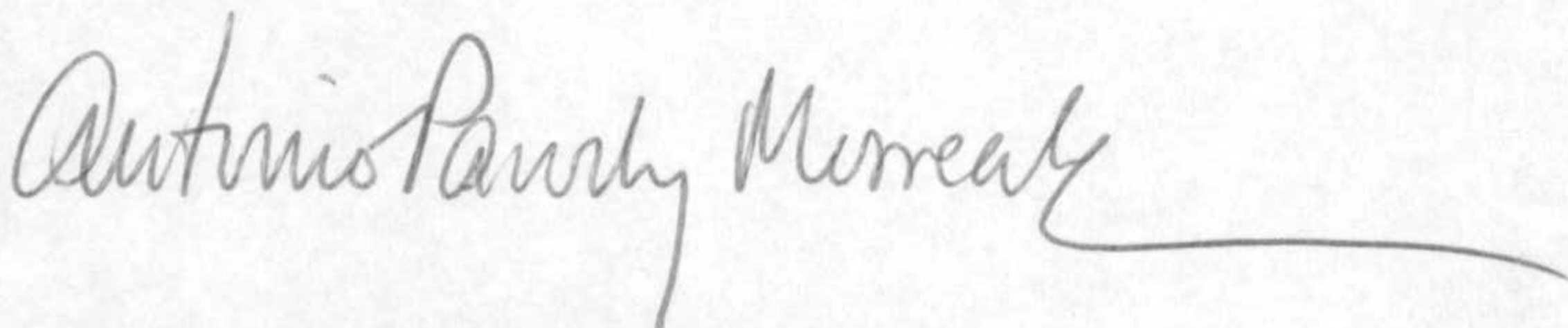
Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.



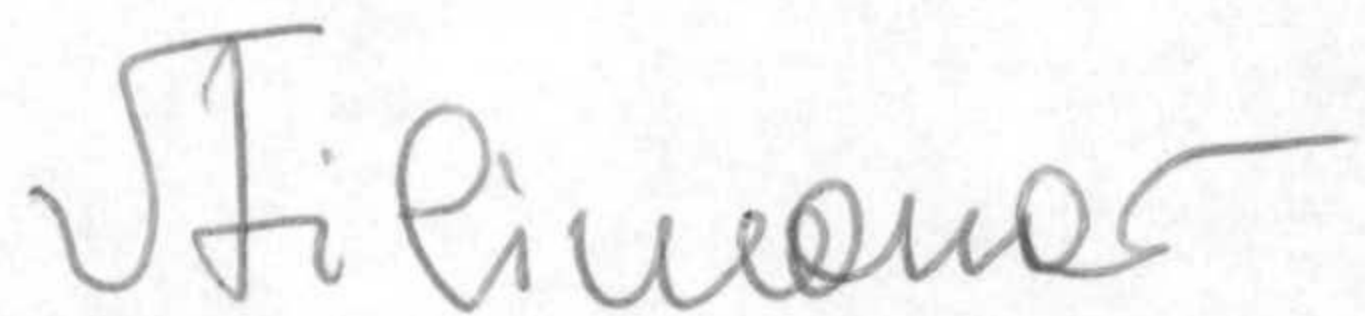
Fdo. Mohamed El Harrous
Licenciado en Ciencias Físicas en la Universidad Sidi Mohammed Ben Abdellah,
Facultad de Ciencias de Tetuan (Reino de Marruecos).

Visado en Granada a 28 de Marzo 1994.

Los Directores de la Tesis:



Fdo. Antonio Parody Morreale
Profesor Titular del Dpto. de
Química-Física de la Facultad
de Ciencias de la Universidad
de Granada.



Fdo. Vladimir Filimonov
Profesor de Investigación en
el Instituto de Proteínas de
la Academia Rusa de Ciencias,
Pushchino, Moscow (Rusia).

A mis padres

Agradecimientos: Ante todo, quiero agradecer a mi mismo por el esfuerzo que he tenido que desarrollar para familiarizarme con la investigación en general, y especialmente la biofísica que se está llevando a cabo en este departamento, que ha sido una cosa nueva para mí, y también por el esfuerzo que he tenido que realizar para vencer a la nostalgia que uno siente cuando está fuera de su tierra. Pero esto no hubiera sido posible sin la ayuda, tanto social como laboral, de la gente del departamento (los notables y los mariachis) que considero como mi familia adoptiva y con los cuales he pasado unos buenos cinco años. Quiero expresar mis agradecimientos en especial a los directores de la tesis, Antonio y Valodia, que sin ellos, por supuesto, no hubiera sido posible la realización de este trabajo. Agradezco también la estimable asistencia técnica (ships, tornillos del calorímetro, cables, etc.) de Obdulio Lopez, y a Pedro Luis Mateo la posibilidad de trabajar con la barnasa. Quiero agradecer también al Ministerio de la Educación Nacional de Marruecos y al Ministerio de Asuntos Exteriores de España por las becas que me ofrecieron.

Finalmente, y no al último, agradezco a mis padres por su ayuda y la oportunidad que me dieron para salir al extranjero a realizar este trabajo.

INDICE GENERAL.

Indice de Figuras.
Indice de Tablas.

<i>Capítulo 1: Introducción</i>	1
1.1 CALORIMETRIA Y BIOQUIMICA	1
1.1.1 Ideas Preliminares.	1
1.1.2 Conceptos de Calorimetría.	5
1.1.3 Calorimetría de Reacción.	8
-Clasificación.	8
-Formulación básica de la medida del efecto térmico en un calorímetro de reacción.	8
-Resultados experimentales.	12
-Calorímetros de titulación. Desarrollo instrumental.	15
-Información estructural y resultados termodinámicos.	16
-Otras consideraciones.	18
1.2 TERMODINAMICA DE LA INTERACCION MACROMOLECULA-LIGANDO.	18
1.2.1 Descripción Fenomenológica.	19
1.2.2 Energía de Gibbs de Unión de un Ligando a una Macromolécula.	23
1.2.3 Formulación de un Experimento de Valoración Calorimétrica.	25
-Entalpía de unión.	25
-Análisis de datos calorimétricos.	26
1.3 RESUMEN DE ESTA TESIS.	29
<i>Capítulo 2: Descripción del Calorímetro. Respuesta Básica y Sensibilidad.</i>	31
2.1 VISION GLOBAL DEL SISTEMA.	31
2.2 CALORIMETRO.	34
2.2.1 Bloque.	34
2.2.2 Sistema de Inyección y Agitación.	37
2.3 CONTROL DE LA TEMPERATURA DEL BAÑO.	40



2.4 SISTEMA DE DETECCION DE LA SEÑAL DEL CALORIMETRO Y LINEA BASE	42
2.5 SENSIBILIDAD.	45
<i>Capítulo 3: Caracterización Operacional del Calorímetro.</i>	47
3.1 METODO DE MEDIDA.	47
3.1.1 Determinación de Parámetros Térmicos.	48
3.1.2 Método de Medida.	50
3.1.3 Descripción del Programa de Control.	54
3.2 PROCESO BASICO DE MEZCLA Y VOLUMEN EFECTIVO.	56
3.2.1 Proceso Básico de Mezcla.	56
3.2.2 Cálculo del Volumen Efectivo del Bulbo de Reacción.	58
3.3 FUNCIONAMIENTO DEL CALORIMETRO.	60
3.3.1 Calores de Agitación, Inyección de Agua en Agua y Ruido de Línea Base.	60
3.3.2 Dilución de la Sacarosa en Agua.	60
3.3.3 Realización de un Experimento de Valoración Calorimétrica de una Proteína con un Ligando.	63
-Procedimiento experimental.	63
-Análisis.	70
-Ejemplo.	73
<i>Capítulo 4: Caracterización Termodinámica Completa de Interacciones Bioquímicas Simples.</i>	77
4.1 MATERIALES Y METODOS.	77
4.1.1 Purificación de β -Tripsina.	77
4.1.2 Inhibidor de Tripsina.	80
4.1.3 Ribonucleasa A e Inhibidores (3'CMP y 2'CMP).	80
4.1.4 Medida de la Concentración de los Sitios Activos de la Tripsina.	80
4.1.5 Actividad Enzimática de la Tripsina.	82
4.1.6 Medida Potenciométrica de Constantes de Equilibrio.	84
4.1.7 Calorimetría.	87
4.2 RESULTADOS Y DISCUSION.	91
4.2.1 Simulación de Valoraciones Calorimétricas.	91
-Ventana kc.	91
-Precisión de los análisis.	95
4.2.2 Comprobación Experimental.	101
-Reacción de β -tripsina con su inhibidor.	103
-Reacción de ribonucleasa A con 3'CMP.	106
-Reacción de ribonucleasa A con 2'CMP.	110
4.3 CONCLUSION.	115

Capítulo 5: Interacción Barnasa-3'GMP.	117
5.1 INTRODUCCION.	117
5.2 MATERIALES Y METODOS.	128
5.2.1 Materiales.	128
-Proteínas.	128
-Ligandos.	128
-Tampones.	129
5.2.2 Potenciometría.	129
-Valoración de 3'GMP.	132
-Valoración de la barnasa.	132
-Valoración del complejo barnasa-3'GMP.	133
5.2.3 Calorimetría.	134
-Valoración de la barnasa con 3'GMP.	135
-Valoración de la barnasa con guanosina.	135
-Valoración de la barnasa con fosfato.	136
-Valoración de 3'GMP con HCl.	136
-Valoración de la barnasa con HCl.	138
5.3 TEORIA.	138
5.3.1 Análisis de Datos Calorimétricos.	138
-Tratamiento de las valoraciones calorimétricas de la barnasa con los ligandos 3'GMP, guanosina y fosfato.	138
-Análisis de $\Delta G^{\circ}(T)$ y $\Delta H^{\circ}(T)$	139
-Análisis de $\Delta G^{\circ}(pH)$ y $\Delta H^{\circ}(pH)$	140
5.3.2 Análisis de los Datos Potenciométricos.	145
-Valoraciones potenciométricas de 3'GMP y la barnasa.	145
-Análisis del intercambio protónico ΔN en la formación del complejo.	146
5.4 RESULTADOS Y DISCUSION.	148
5.4.1 Valoraciones Potenciométricas y Calorimétricas de 3'GMP, Barnasa y Complejo Barnasa-3'GMP	148
-Valoración potenciométrica de 3'GMP.	148
-Valoración potenciométrica de la barnasa.	151
-Valoración potenciométrica del complejo barnasa-3'GMP.	158
-Determinación del intercambio protónico $\Delta N(pH)$	161
-Valoración calorimétrica de 3'GMP con HCl.	170
-Valoración calorimétrica de la barnasa con HCl.	170
5.4.2 Interacción Calorimétrica de 3'GMP con la Barnasa a diferentes Temperaturas y a pH 4.5.	178
5.4.3 Interacción Calorimétrica de 3'GMP con Mutantes de la Barnasa a diferentes Temperaturas y pH 4.5.	189
5.4.4 Interacción Calorimétrica de 3'GMP con la Barnasa a 25°C y a diferentes pH.	197
-Análisis de la variación de ΔG_{obs}° con el pH.	201
-Análisis de la variación de ΔH_{obs}° con el pH.	204
-Análisis global de ΔG_{obs}° , ΔH_{obs}° y ΔN	208

-Conclusión.	211
5.4.5 Interacción Calorimétrica de la Guanosina y el Fosfato con la Barnasa.	217
-Interacción barnasa-guanosina.	218
-Interacción barnasa-fosfato.	222
-Comparación de la interacción de 3'GMP-barnasa con la del fosfato-barnasa y guanosina-barnasa.	225
5.5 RESUMEN Y CONCLUSIONES.	228
BIBLIOGRAFIA.	237
APENDICES:	
-Apéndice 1: Compensador.	247
-Apéndice 2: Programa MEDCAL.	251
-Apéndice 3: Programa SIMCAL.	261
-Apéndice 4: Programa ANALCAL.	273

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1-1	2
Figura 1-2	4
Figura 1-3	6
Figura 1-4	9
Figura 1-4'	10
Figura 1-5	13
Figura 1-6	20
Figura 2-1	32
Figura 2-2	35
Figura 2-3	39
Figura 2-4	41
Figura 2-5	44
Figura 3-1	49
Figura 3-2	51
Figura 3-3	55
Figura 3-4	57
Figura 3-5	59
Figura 3-6	62
Figura 3-7	74
Figura 4-1	79
Figura 4-2	81
Figura 4-3	83
Figura 4-4	85
Figura 4-5	88
Figura 4-6	92
Figura 4-7	94
Figura 4-8	97
Figura 4-9	104
Figura 4-10	107
Figura 4-11	109
Figura 4-12	111
Figura 4-13	114
Figura 5-1.	119
Figura 5-2.	124
Figura 5-3.	125
Figura 5-4.	141
Figura 5-5.	150
Figura 5-6.	153
Figura 5-7.	155
Figura 5-8.	160
Figura 5-9.	163
Figura 5-10.	168
Figura 5-11.	172
Figura 5-12.	175
Figura 5-13	179
Figura 5-14	182

Figura 5-15	190
Figura 5-16	192
Figura 5-17	193
Figura 5-18	202
Figura 5-19	207
Figura 5-20	209
Figura 5-21	214
Figura 5-22	219

INDICE DE TABLAS.

Tabla 3-1	61
Tabla 4-1	99
Tabla 4-2	100
Tabla 4-3	101
Tabla 4-4	103
Tabla 4-5	108
Tabla 4-6	110
Tabla 4-7	113
Tabla 4-8	113
Tabla 5-1.	149
Tabla 5-2.	152
Tabla 5-3.	157
Tabla 5-4.	159
Tabla 5-5.	162
Tabla 5-6.	167
Tabla 5-7.	171
Tabla 5-8.	173
Tabla 5-9.	176
Tabla 5-10	180
Tabla 5-11	181
Tabla 5-12	185
Tabla 5-13	191
Tabla 5-14	198
Tabla 5-15	203
Tabla 5-16	206
Tabla 5-17	205
Tabla 5-18	208
Tabla 5-19	210
Tabla 5-20	211
Tabla 5-21	212
Tabla 5-22	213
Tabla 5-23	218
Tabla 5-24	221
Tabla 5-25	221
Tabla 5-26	223
Tabla 5-27	224
Tabla 5-28	225
Tabla 5-29	226

1 Introducción

1.1 CALORIMETRIA Y BIOQUIMICA.

1.1.1 Ideas Preliminares.

Una de las características importantes de las macromoléculas biológicas es que presentan interacciones con otras biomoléculas de una gran especificidad. Estas interacciones tienen un papel primordial en el desarrollo de la función de las macromoléculas biológicas, como son el transporte, la catálisis enzimática, la acción de las hormonas, la regulación de la actividad genética, etc. Para intentar explicar la relación entre estructura de una parte, y función y especificidad de otra se requiere tanto un conocimiento estructural como termodinámico y cinético de la interacción. La información estructural la suministran las técnicas de difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear, fundamentalmente. Entre las numerosas técnicas que se pueden utilizar en la caracterización termodinámica tenemos las calorimétricas.

Por calorimetría nos referimos al conjunto de técnicas muy amplio cuyo objeto es la determinación de la absorción (proceso endotérmico) o liberación (proceso exotérmico) de calor que siempre acompaña a cualquier proceso físico o químico. Numerosos tipos de calorímetros se han desarrollado desde la construcción en 1780 del primero por parte de Lavoisier y Laplace (Figura 1-1), y la aplicación de los mismos ha sido muy amplia; desde el estudio de procesos con moléculas puras de bajo peso molecular hasta el estudio de sistemas vivos como células en suspensión, microorganismos, animales, insectos, etc. En el campo concreto de la Bioquímica se pueden encontrar descripciones amplias de la aplicación de la calorimetría en trabajos de Sturtevant (1972), Langerman y Biltonen (1979), Biltonen y Langerman (1979), Hinz (1983) y Wadso (1985).

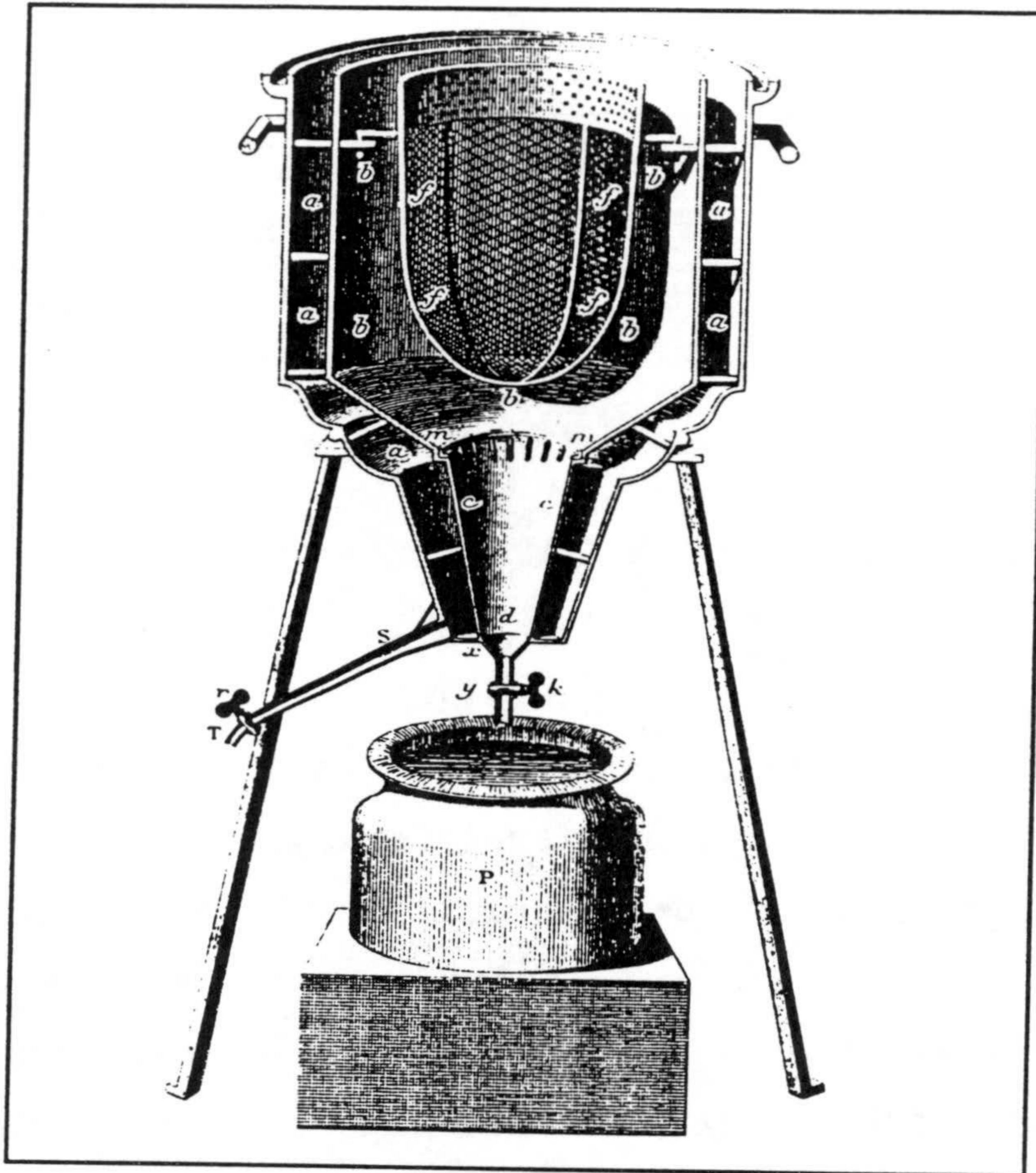


Figura 1-1: El calorímetro de hielo de Lavoisier y Laplace (figura tomada del libro de W.J. Moore "Chimie physique", Dunod, Paris 1965). Uno de los primeros experimentos realizados con este calorímetro tuvo un carácter claramente biológico: el estudio del metabolismo basal de un ratón.

En dicho campo Bioquímico, los efectos térmicos que se miden mediante técnicas calorimétricas suelen ser, generalmente, los asociados a la ruptura de enlaces, inter o intramoleculares, de carácter no covalente (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, de van der Waals, etc.), caracterizados por su baja magnitud. Por otra parte ha existido siempre el problema de conseguir los compuestos de interés (usualmente las macromoléculas) en cantidades grandes y con suficiente pureza, por razones bien de tipo preparativo o económico. Estas dificultades (bajo calor por gramo y poca cantidad de sustancia) limitaron el uso de la calorimetría convencional en Bioquímica hasta que en los años sesenta diversos investigadores comenzaron a desarrollar calorímetros especialmente diseñados para el estudio de procesos de interés bioquímico, es decir capaces de medir

calores del orden del microjulio y que gastaban muy poco material, del orden del micromol (Privalov et al., 1965; Monk y Wadso, 1968; Sturtevant y Lyons, 1969; Privalov, 1980a; Spokane y Gill, 1981; McKinnon et al., 1984; Mayorga et al., 1988; Wiseman et al., 1989; Freire et al., 1990). Desde entonces y tras la comercialización de algunos calorímetros por las firmas: Tronac, LKB, Beckman, DASM, MicroCal, la calorimetría ha sido una técnica accesible a los laboratorios de Bioquímica.

Actualmente, la aplicación de las técnicas calorimétricas en Bioquímica se realiza fundamentalmente en dos grandes áreas de trabajo. Por una parte, tenemos el estudio termodinámico de los cambios conformacionales en macromoléculas biológicas; por otra, el estudio termodinámico de las interacciones entre biomoléculas. La técnica utilizada fundamentalmente en el primer área de trabajo es la calorimetría diferencial de barrido que mide la capacidad calorífica del sistema a diferentes temperaturas (ver por ejemplo Privalov, 1980b). Para la segunda área de trabajo tenemos la calorimetría isoterma de reacción, mediante la que se miden los cambios de entalpía en la interacción de interés a temperatura constante. Estas ideas se recogen en la Figura 1-2. Las líneas de puntos de dicha figura nos indican que las técnicas indicadas no son exclusivas del conjunto correspondiente de problemas. Así, por ejemplo, la calorimetría diferencial de barrido se ha revelado como la única técnica capaz de medir constantes de unión muy altas, del orden de 10^{40} M^{-1} para interacciones proteína-proteína o proteína-ligando (Brandts et al., 1990). En los últimos años se están desarrollando los calorímetros multifrecuenciales, instrumentos diseñados para medir la amplitud de las fluctuaciones entálpicas asociadas con las transiciones conformacionales, por lo que se aplicaría a la primera de las áreas de trabajo anteriormente mencionadas. Mediante estos calorímetros se podrá no sólo determinar los parámetros termodinámicos de una transición, sino sus tiempos de relajación (Mayorga et al., 1988).

Es interesante indicar aquí, que en lo que concierne a las interacciones biomoleculares, la calorimetría es la técnica que permite una determinación directa del cambio de entalpía de un determinado proceso. Hasta que no se pudieron aplicar técnicas calorimétricas en este campo, la determinación del cambio de entalpía en una reacción bioquímica se realizaba de forma indirecta a partir de la pendiente de una representación de van't Hoff, tras la medida de la constante de equilibrio de la reacción a diferentes temperaturas. Esta metodología suele consumir mucho tiempo. Además la entalpía determinada por el método de van't Hoff, ΔH^{vH} , es válida solamente cuando el modelo con

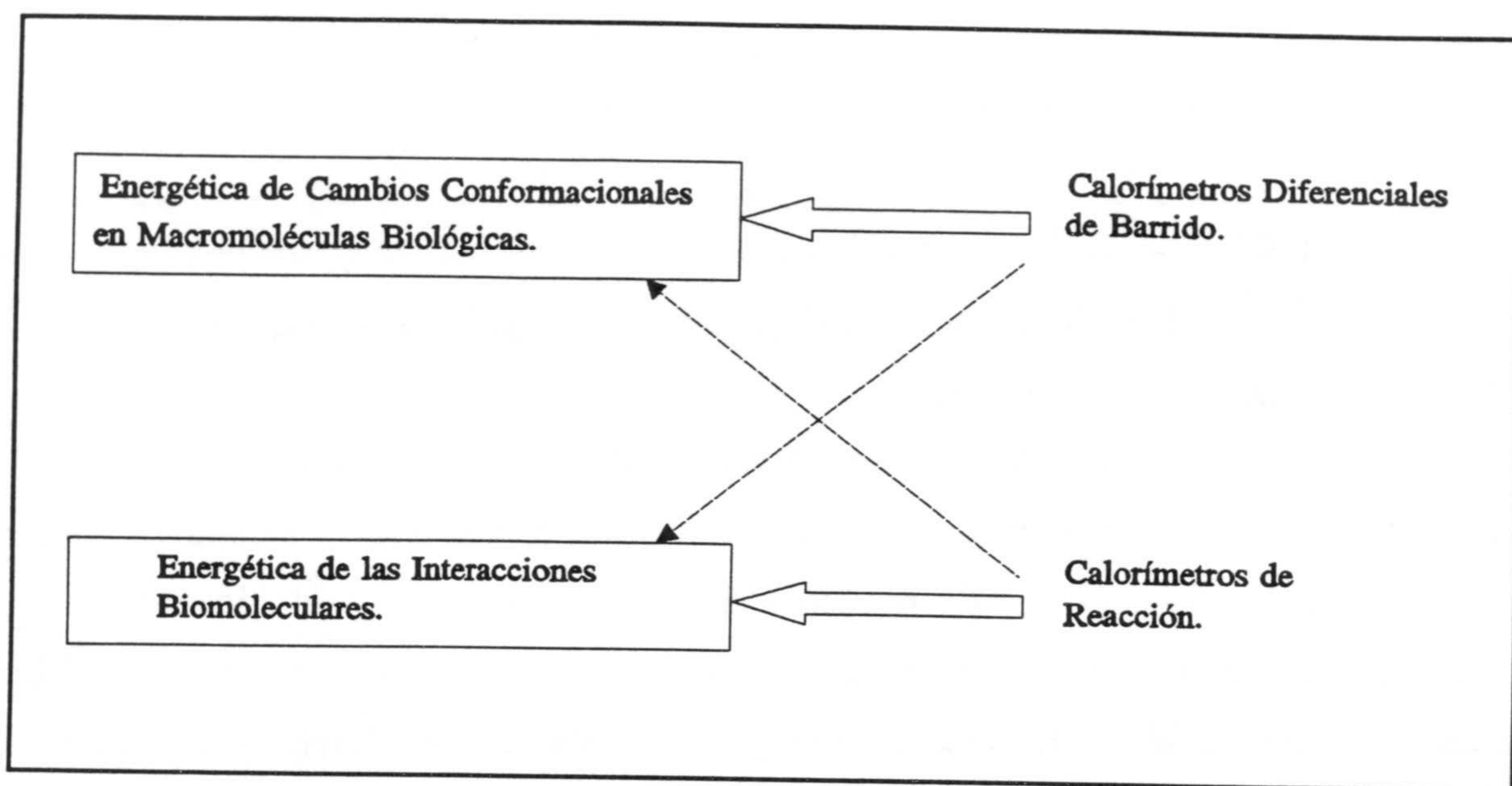


Figura 1-2: Problemas más usuales y técnicas calorimétricas más utilizadas en Bioquímica. Los calorímetros usados en Bioquímica operan a presión constante, por lo que el calor medido es la variación de la entalpía para el proceso en estudio. Además, la calorimetría se suele realizar siempre con disoluciones acuosas por lo que las técnicas se engloban a veces bajo la denominación de Calorimetría en Disolución (Solution Calorimetry).

el que han sido analizados los datos es válido también, y por lo que, a veces ΔH^{vH} es diferente de la entalpía calorimétrica ΔH^{cal} (ver por ejemplo Hofmann et al., 1979). Por otra parte, la determinación directa del cambio de entalpía a diferentes temperaturas permitió evaluar la variación de la capacidad calorífica ΔC_p^o de la interacción ($\Delta C_p^o = d\Delta H^o/dT$), parámetro que puede ser interpretado en términos estructurales. Las representaciones de van't Hoff carecen de precisión suficiente para la determinación de dicha variación de la capacidad calorífica.

En esta Tesis se va a describir la puesta a punto de un calorímetro de reacción, destinado por lo tanto al estudio de interacciones biomoleculares, y su aplicación a un problema bioquímico concreto por lo que en esta Introducción nos centraremos en algunos aspectos de dicho tipo de calorimetría (Sección 1.1.3). Previamente, en la Sección 1.1.2 veremos un criterio general de clasificación de calorímetros, las ecuaciones básicas para la medida del calor en un calorímetro de conducción a través de termopila y algunas consideraciones sobre la utilización de metodologías de compensación eléctrica en la realización de las medidas calorimétricas.

1.1.2 Conceptos de Calorimetría.

Físicamente cualquier calorímetro se puede considerar dividido en dos partes: el espacio en donde ocurre el proceso de interés (que podemos llamar célula de reacción) y el resto del sistema (alrededores). Uno de los criterios posibles para hacer una clasificación general de los calorímetros consiste en considerar la evolución de un efecto térmico en la célula de reacción. Desde este punto de vista se pueden considerar dos tipos de calorímetros. En el caso extremo de que cuando se produce un efecto térmico en la célula de reacción no se produce ningún intercambio de calor con los alrededores tenemos un calorímetro adiabático. En este caso, el calor del proceso, q , se invierte en cambiar la temperatura de la célula de reacción y se puede calcular simplemente multiplicando la capacidad calorífica, C , de la célula de reacción por el incremento en la temperatura ΔT de la misma: $q=C\Delta T$. El otro tipo de calorímetros es aquel en el que cuando se produce un efecto térmico en la célula de reacción se produce una transferencia cuantitativa de calor con los alrededores: cuando se produce un efecto exotérmico se da un flujo de calor desde la célula de reacción hacia los alrededores; al revés cuando el efecto es endotérmico. A este tipo de calorímetros se les conoce como calorímetros de conducción. Véase Figura 1-3.

Dado que el calorímetro que se va a describir en esta Tesis es de conducción vamos a prestar a continuación una atención más detallada a la formulación básica para la medida de los efectos térmicos en dicho tipo de calorímetros.

En un calorímetro de conducción los alrededores del sistema se denominan sumidero de calor. Idealmente el sumidero de calor tiene una capacidad calorífica infinita por lo que las temperaturas de la célula de reacción al comenzar el proceso y una vez finalizado el mismo son iguales. En general, el calor se mide a partir de una magnitud que es proporcional al flujo de calor entre la célula de reacción y el sumidero.

En la práctica, para que un calorímetro de conducción funcione correctamente se debe cumplir la ley de Newton del enfriamiento (McGlashan, 1979):

$$\frac{dq}{dt} = -K'(T_c - T_o) \quad (1.1)$$

que establece que el flujo de calor entre la célula de reacción y el sumidero es directamente proporcional a la diferencia de temperatura entre ambos. En la anterior ecuación q representa el calor, t el tiempo, T_c la temperatura de la célula y T_o la temperatura del sumidero. K' es

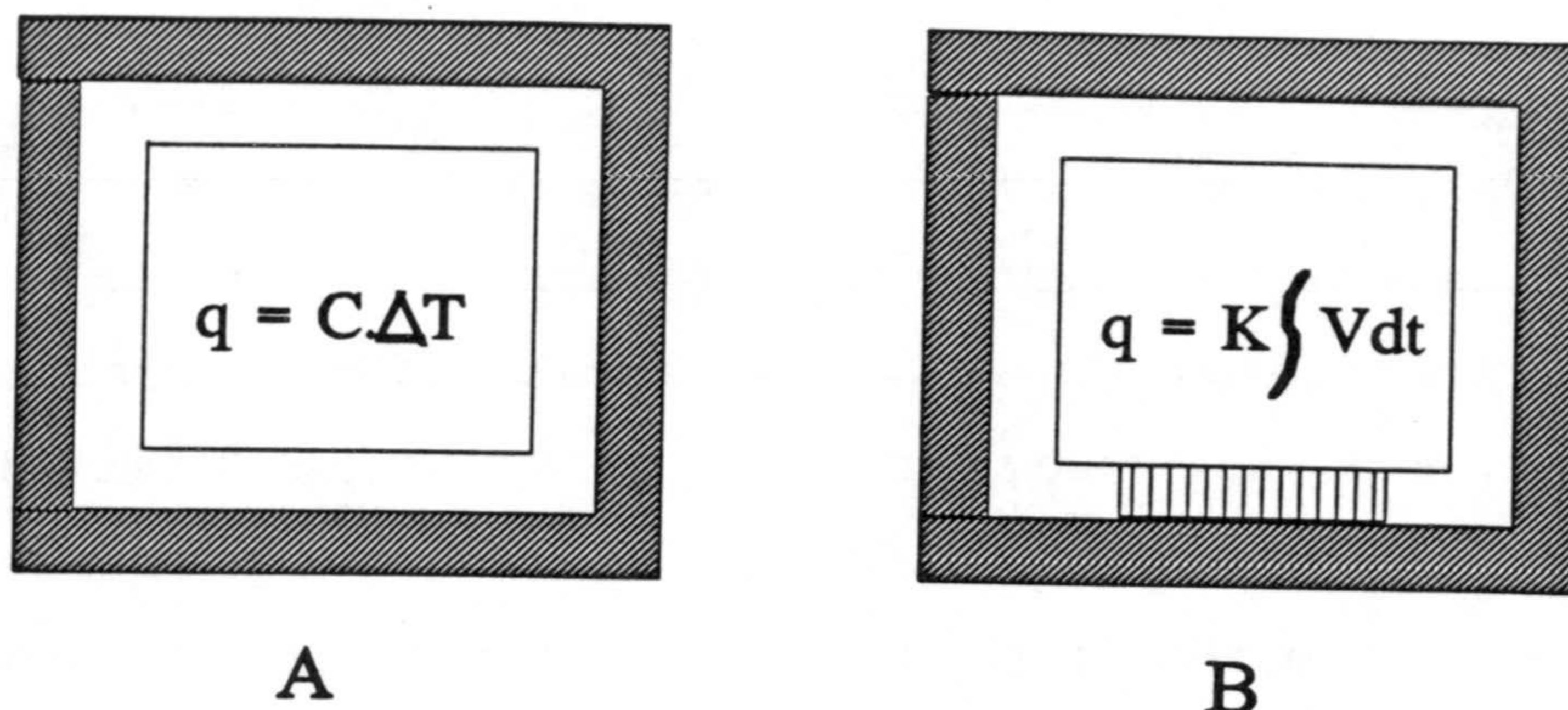


Figura 1-3: Esquemas básicos para un calorímetro adiabático (A) y un calorímetro de conducción a través de termopila (B). En ambos casos el rectángulo central es la célula de reacción y las franjas rectangulares oscuras representan los alrededores. En el caso de los calorímetros adiabáticos estos alrededores lo forma la habitualmente denominada coraza adiabática, que idealmente en un experimento se procura que se mantenga siempre a la misma temperatura que la célula de reacción. En el caso de los calorímetros de conducción los alrededores se denominan sumidero de calor y a lo largo de un experimento se procura que su temperatura se mantenga constante.

una constante de proporcionalidad que podemos considerar como una conductividad térmica. En el caso particular de nuestro calorímetro, la conducción de calor entre la célula de reacción y el sumidero ocurre a través de un termopila, tratándose por lo tanto de un calorímetro de conducción a través de termopila. Cuando la diferencia de temperatura entre las dos caras de una termopila es suficientemente pequeña, el voltaje que produce es directamente proporcional a la citada diferencia de temperatura (efecto Seebeck). Por lo tanto, para una diferencia de temperatura $T_c - T_o$ el voltaje de la termopila vendrá dado por

$$V = \epsilon(T_c - T_o) \quad (1.2)$$

donde ϵ es la constante de proporcionalidad. Sustituyendo en la Ecuación (1.1), ésta nos queda como:

$$\frac{dq}{dt} = -KV \quad (1.3)$$

en donde la constante de proporcionalidad K también puede considerarse como una conductividad térmica. Integrando la anterior ecuación, nos queda:

$$q = -K \int V dt \quad (1.4)$$

Por lo tanto, en los calorímetros de conducción a través de termopila se evalúa el efecto térmico mediante medidas del voltaje de la misma. En el caso que la ecuación básica que consideremos para la medida sea la (1.3) estamos realizando una medida de la potencia del proceso; cuando utilizamos la (1.4) medimos el calor producido en el mismo: este es el caso con nuestro instrumento. Tian (1923) y Calvet después en 1948 con una modificación del calorímetro de Tian, fueron los primeros que usaron esta metodología de conducción a través de termopilas (Calvet y Prat, 1963).

A efectos de la realización práctica de las medidas de calor, tanto los calorímetros adiabáticos como de conducción generalmente aplican metodologías de compensación eléctrica. Estos métodos suelen acortar los tiempos de medida y mejoran la precisión de las mismas y consisten en que, a medida que se va produciendo el efecto térmico en la célula de reacción, se va suministrando corriente eléctrica a elementos Peltier de calentamiento-enfriamiento o a una resistencia eléctrica calefactora para mantener la diferencia de temperatura entre la célula de reacción y los alrededores constante. Estas metodologías de compensación eléctrica fueron aplicadas por primera vez por Buzzell y Sturtevant (1951) utilizando un computador electromecánico. Desde entonces y dado el gran avance de la electrónica y de los computadores son utilizadas en todos los calorímetros modernos. La puesta en práctica de la metodología varía de un instrumento a otro. A modo de ejemplo podemos analizar el procedimiento seguido en los calorímetros de reacción de Spokane y Gill (1981) y en el Omega (Wiseman et al., 1989), que son calorímetros que trabajan en modo adiabático con dos células; una de referencia y otra de reacción. El sistema de compensación se activa inicialmente aplicando una potencia eléctrica constante y de forma continua a la célula de referencia. En ausencia de reacción, la potencia de compensación aplicada a la célula de reacción es la misma que se está aplicando a la de referencia, mientras que en presencia de reacción, la potencia de compensación variaría decreciendo o aumentando según que la reacción sea exotérmica o endotérmica respectivamente. El calor de reacción se calcula simplemente a partir de las diferencias de potencia aplicadas a ambas células.

1.1.3 Calorimetría de Reacción.

Clasificación:

Según el modo de mezclar las disoluciones de reactivos existen tres tipos de calorímetros de reacción: los de batch, los de flujo y los de inyección, bien continua o discontinua (véase Figura 1-4). En los calorímetros de batch, los reactivos se encuentran en compartimientos separados dentro de la célula de reacción y la mezcla de ambos se realiza girando la célula. La existencia de una fase gaseosa en la célula puede dar problemas a la hora de la mezcla de disolventes volátiles, así como el mojado de las paredes de la célula después de la mezcla que puede generalmente estar acompañado por un efecto calorífico que supera a veces el del proceso en estudio. En los calorímetros de flujo los reactivos llegan a la célula de reacción a través de un tubo en forma de Y, impulsados por bombas peristálticas. Estos calorímetros no son convenientes para procesos químicos lentos, cuando el tiempo de reacción excede el tiempo de residencia de los reactivos en la célula del calorímetro. En los calorímetros de inyección discontinua la mezcla se realiza mediante inyecciones separadas de volúmenes pequeños de uno de las disoluciones de reactivo en la célula de reacción conteniendo al otro. Siguiendo la tendencia actual, a partir de ahora llamaremos a los calorímetros de reacción de inyección discontinua calorímetros de titulación ("Isothermal Titration Calorimeters", ITC).

Formulación básica de la medida del efecto térmico en un calorímetro de reacción:

En cualquier calorímetro de reacción el calor total, q_t' , medido tras la mezcla de dos disoluciones A y B para dar una disolución C es la suma de tres términos: el calor de reacción en estudio, q , los calores de dilución de los componentes de las disoluciones, q_d , y calores debidos a otros efectos diferentes de los dos anteriores, q' .

$$q_t' = q + \sum q_d + q' \quad (1.5)$$

En la ecuación anterior, el sumatorio es sobre todos los componentes de las disoluciones A y B. En un calorímetro de titulación isotermo, como el que se va a describir en esta Tesis, al calor q' contribuyen dos términos; el calor de agitación de la muestra, q_a , y el calor de inyección de disolvente en disolvente, q_{iny} . Tanto q_a como q_{iny} son constantes a lo largo del proceso de valoración y se determinan en experimentos independientes y normalmente suelen ser pequeños en comparación con el calor de reacción q . El calor corregido q_t , tras restar

Calorímetro	Uso	Gasto de material
"batch"	↓	relativamente alto
flujo	↓	relativamente alto
inyección: continua		?
discontinua	↑	relativamente bajo

Figura 1-4: Clasificación de los calorímetros de reacción en disolución según el modo de mezcla de los reactivos. Las flechas indican el uso relativo de los mismos en la actualidad. No se da información sobre los calorímetros de inyección continua en tanto que los mismos han sido muy escasamente utilizados.

a q'_t los términos constantes q_a y q_{iny} , queda entonces como la suma del calor de reacción y de dilución solamente, que son los calores que pueden no ser constantes a lo largo de la valoración.

$$q_t = q + \sum q_d \quad (1.6)$$

Vamos a ver a continuación como se formulan los dos términos del segundo miembro de la ecuación anterior. Cuando se trabaja a presión constante (como es el caso del calorímetro que se va a describir en esta Tesis y en general de todos los calorímetros de reacción utilizados en Bioquímica), el calor medido en un calorímetro es una medida de la variación de la función termodinámica de estado entalpía por lo que el proceso puede formularse mediante un ciclo con un estado de referencia común como el que se indica en la Figura 1-4'.

De acuerdo con este esquema, el calor medido en el calorímetro vendrá dado por la expresión:

$$q \text{ (ó } q_d) = q_{R \rightarrow F} - q_{R \rightarrow I} \quad (1.7)$$

en donde $q_{R \rightarrow F}$ y $q_{R \rightarrow I}$ son los efectos térmicos producidos en el paso a los estados final e

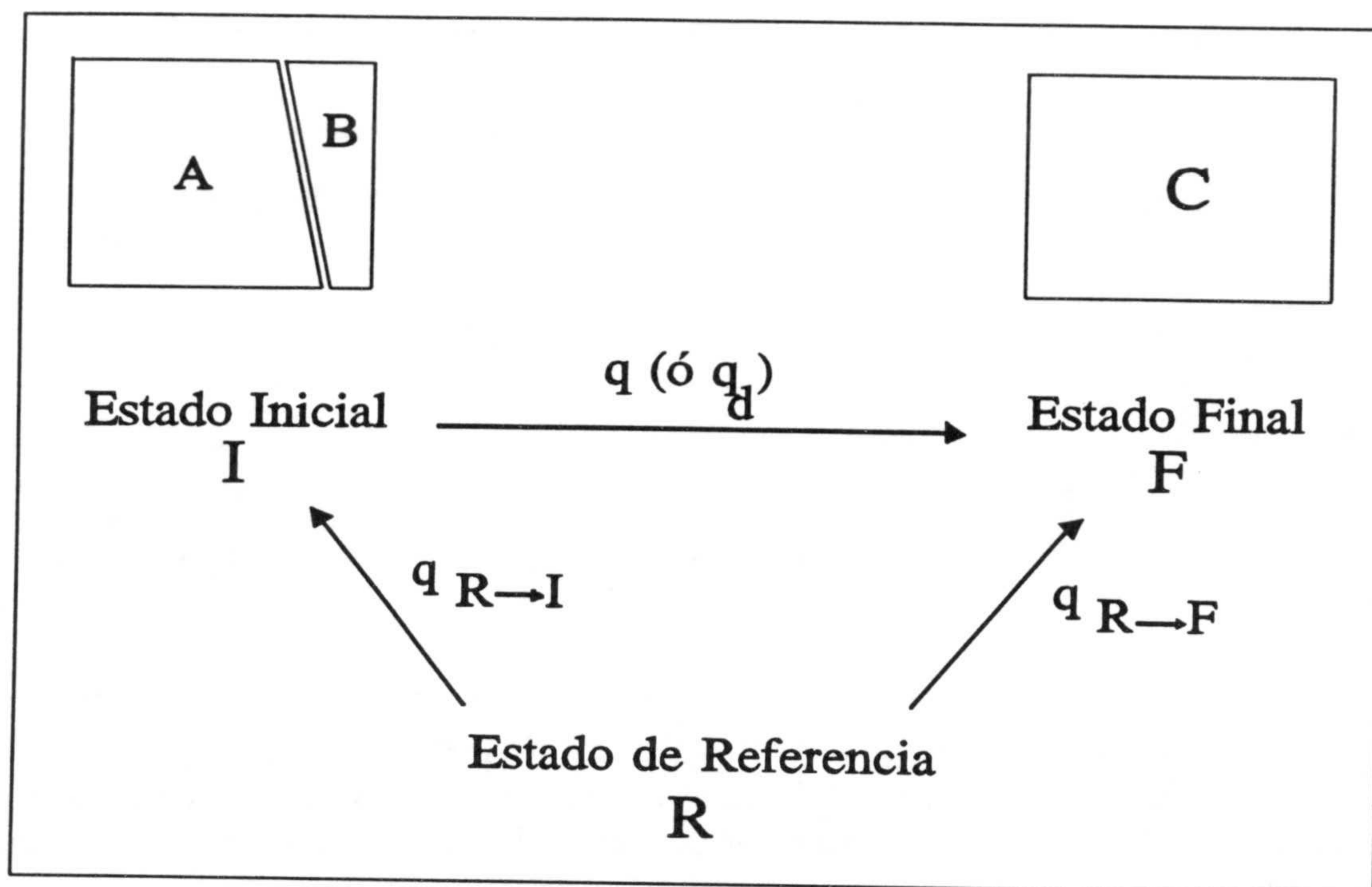


Figura 1-4: Esquema básico para la formulación de un efecto térmico en el proceso de mezcla de un calorímetro de reacción. El estado inicial en esta figura corresponde al estado previo a la mezcla de dos disoluciones de reactivos A y B. La situación inicial se generaliza fácilmente para considerar en la misma la mezcla de más de dos disoluciones.

inicial respectivamente, desde el estado de referencia común. En un experimento en un calorímetro de reacción, el estado inicial es el previo a la mezcla de las dos disoluciones (este hecho se representa partiendo el rectángulo que en la figura representa el estado inicial). Por lo tanto el término $q_{R \rightarrow I}$ en la anterior ecuación vendrá dado por la suma de dos términos:

$$q_{R \rightarrow I} = q_{R \rightarrow I}^A + q_{R \rightarrow I}^B \quad (1.8)$$

Por lo tanto la Ecuación (1.7) queda:

$$q \text{ (ó } q_d) = q_{R \rightarrow F}^C - (q_{R \rightarrow I}^A + q_{R \rightarrow I}^B) \quad (1.9)$$

Desde un punto de vista práctico, los efectos térmicos que aparecen en el segundo miembro es siempre conveniente referirlos a la unidad de cantidad de sustancia del componente o uno de los componentes del proceso (dilución, reacción, ...) en estudio.

Si estamos estudiando la dilución de un componente X del sistema, los estados inicial y final quedan definidos por la concentración de X y lo más conveniente es utilizar como estado de referencia el estado de dilución infinita. Por lo tanto, el calor de dilución medido en el calorímetro vendrá dado por:

$$q_d = n_X^C \cdot \phi L_2(x^C) - [n_X^A \cdot \phi L_2(x^A) + n_X^B \cdot \phi L_2(x^B)] \quad (1.10)$$

en donde n_X representa al número de moles del componente X y ϕL_2 la entalpía molar aparente relativa del mismo que corresponde al calor del proceso de llevar un mol de X de una determinada concentración x hasta dilución infinita.

Si estamos estudiando una reacción (M+X), podemos utilizar como estado de referencia un reactivo, por ejemplo M, en ausencia del otro y el efecto térmico asociado a la reacción vendrá dado por:

$$q = n_M^C \xi_M^C \Delta H_M^C - (n_X^A \xi_M^A \Delta H_M^A + n_X^B \xi_M^B \Delta H_M^B) \quad (1.11)$$

en donde n_M es el número total de moles del reactivo de referencia, ξ_M el grado de avance de la reacción definido en función de dicho reactivo e ΔH_M es la entalpía de reacción por mol del mismo y es una constante. En el caso particular de las interacciones macromolécula-ligando (M es una macromolécula y X un ligando) es particularmente útil utilizar una formulación alternativa basada en el concepto de entalpía de unión, ΔH_u . En este caso se suele tomar como estado de referencia la macromolécula en ausencia de ligando y la entalpía de unión, ΔH_u , a diferencia de la entalpía de reacción, ΔH_M , es una variable a lo largo del proceso y se define como el cambio de entalpía por mol de macromolécula en el paso de la macromolécula desde una situación en ausencia de ligando hasta un determinado grado de saturación con el ligando definido por la concentración libre x de este último. ΔH_u es por lo tanto una función de dicha concentración x: $\Delta H_u = \Delta H_u(x)$. El calor medido en el calorímetro puede formularse entonces como:

$$q = n_M^C \Delta H_u^C(x^C) - [n_M^A \Delta H_u^A(x^A) + n_M^B \Delta H_u^B(x^B)] \quad (1.12)$$

El concepto de entalpía de unión es particularmente útil en el estudio calorimétrico de una interacción macromolécula-ligando porque se relaciona de forma muy simple con el polinomio de unión del proceso (concepto que introduciremos más adelante), lo que facilita la formulación para la medida del calor cuando la interacción es compleja.

En la formulación completa para la medida de un calor en un calorímetro de reacción cuando se dan simultáneamente una reacción química y uno o varios procesos de dilución habrá que considerar para la primera la Ecuación (1.12) y para él o los segundos la (1.10). Si en experimentos independientes en los que no se da la presencia simultánea de las sustancias reaccionantes se comprueba que los calores de dilución que se tengan que considerar son despreciables, el efecto térmico se formulará sólo en función de la entalpía de reacción, Ecuación (1.12). En el caso particular de que los calores de dilución no sean despreciables es necesario conocer los ϕL_2 , bien a partir de la información bibliográfica o bien a partir del ajuste del mismo experimento de dilución a la Ecuación (1.10).

Resultados experimentales:

Desde un punto de vista metodológico, la investigación calorimétrica de las reacciones bioquímicas mediante calorimetría de reacción se basa generalmente en la realización de experimentos a temperatura constante de valoración calorimétrica de uno de los reactivos (por ejemplo una proteína) por el otro (por ejemplo un ligando). En este tipo de experimentos se miden los efectos térmicos asociados a la mezcla de ambos reactivos en diferentes proporciones relativas, hasta llegar, si es posible, a la situación en la que se produce la saturación entre ambos. La máxima información de un experimento de valoración calorimétrica se obtiene cuando el valor de la constante de asociación para el proceso en estudio es tal que para las diferentes proporciones relativas entre los reactivos se produce una situación de asociación parcial entre los mismos, es decir que nunca la concentración en la disolución de cualquiera de los reactivos sea indeterminable por lo pequeña. Se trata obviamente de una situación en la que la afinidad entre los reactivos es relativamente baja. En tal caso, el experimento de valoración calorimétrica debe permitir no sólo obtener el cambio de entalpía del proceso, ΔH° , sino que si éste es desde un punto de vista molecular lo suficientemente simple, se puede obtener la caracterización termodinámica completa del mismo. Por ejemplo, para una proteína que tenga un sólo sitio de interacción con un ligando, de una valoración calorimétrica de las anteriores características se puede obtener además de la variación de entalpía, la constante de equilibrio, k , y de la misma la variación de la energía de Gibbs, ΔG° ($\Delta G^\circ = -RT \ln k$), y consiguientemente, el cambio de entropía, ΔS° ($\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ)/T$). La otra situación que se puede considerar ocurre cuando la afinidad entre los reactivos es relativamente alta, es decir, que los valores de las constantes de

asociación son tales que a cualquier proporción relativa entre los reactivos aquel que se encuentra en menor concentración reacciona completamente con el otro, produciéndose al asociación total entre los mismos y quedando su concentración libre en disolución indeterminable. En este caso, de la valoración calorimétrica sólo es posible obtener la variación de entalpía de la reacción y la estequiometría de la misma. Con la instrumentación calorimétrica actual, el límite entre ambas situaciones se encuentra para valores de la constante de equilibrio comprendidos entre 10^7 y 10^8 M^{-1} . En la Figura 1-5 se ilustra de una forma esquemática la información termodinámica básica que se puede obtener a partir de experimentos calorimétricos.

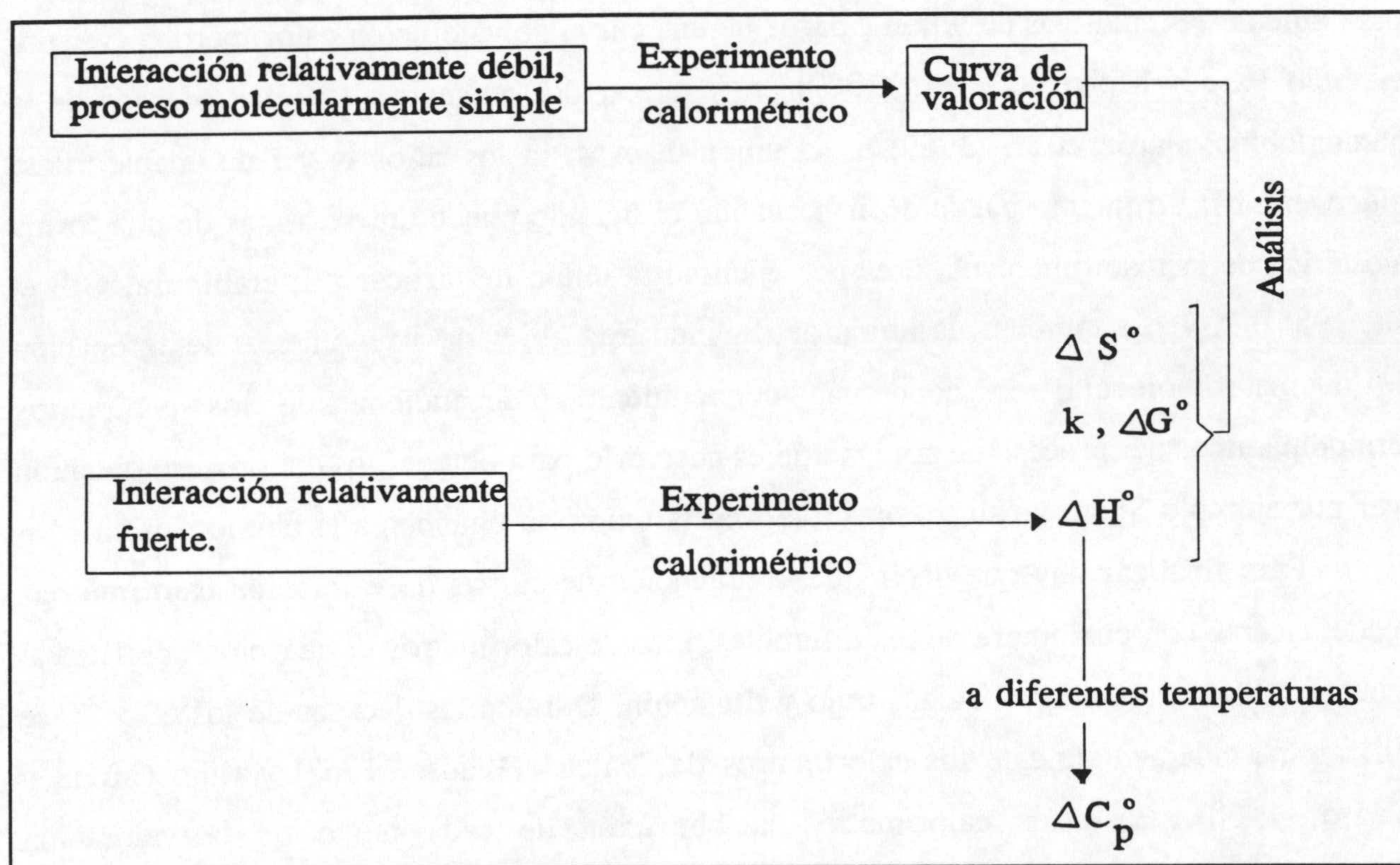


Figura 1-5: Parámetros termodinámicos obtenidos de los experimentos de calorimetría de reacción. En el caso de interacciones relativamente débiles es en principio posible la caracterización termodinámica completa de la interacción en estudio. Para interacciones relativamente fuertes sólo es posible la determinación del cambio de entalpía y la estequiometría del proceso. En ambos casos, de la realización de los experimentos a varias temperaturas se puede determinar el cambio de la capacidad calorífica en el proceso.

Es importante insistir que para que el análisis de una curva de valoración

calorimétrica permita la determinación, además de la entalpía, de la constante de equilibrio, es necesario que el proceso en estudio sea simple desde un punto de vista molecular. De hecho, hasta hoy, para valoraciones calorimétricas de una macromolécula con un ligando los análisis han podido ser realizados con éxito para el caso más simple de n sitios de unión para el ligando independientes e idénticos, es decir que el ligando puede unirse a cualquiera de estos sitios con la misma afinidad intrínseca k y con la misma entalpía ΔH° (véase por ejemplo Bjurulf et al., 1970; Bolen et al., 1971; Bjurulf y Wadso, 1972; Gill et al., 1990; Freire et al., 1990; Wiseman et al., 1989). No obstante, el análisis se complica cuando los n sitios muestran alguna cooperatividad entre ellos, y en este caso el conocimiento de las constantes de unión para cada sitio, por otras técnicas no calorimétricas, es imprescindible para obtener las entalpías de unión a partir de una curva de valoración calorimétrica (ver por ejemplo Parody-Morreale et al. (1987) en la unión del oxígeno a los cuatro sitios de la hemoglobina; Barón et al. (1989) en la unión de AMP a los sitios N y I de la fosforilasa glucogeno b). Lo mismo puede decirse cuando el ligando puede unirse a más de una forma alostérica de la macromolécula (ver por ejemplo la unión del azúcar a L-arabinosa, Gill et al., 1985). A veces también, la unión del ligando está asociada a fenómenos de agregación de la macromolécula, en donde un conocimiento independiente de los parámetros termodinámicos del proceso de agregación es necesario para obtener los del proceso de unión (ver por ejemplo Shiao y Sturtevant (1969) en la unión de ligandos a la chimotripsina).

Para finalizar hay que decir que la obtención de curvas de valoración calorimétrica puede hacerse con cualquiera de los diferentes tipos de calorímetros de reacción descritos al principio de esta sección: "batch", flujo y titulación. Durante las décadas de los 60 y 70 se utilizaron fundamentalmente los calorímetros de "batch" (Wadso, 1968) y flujo (Monk y Wadso, 1968). En estos calorímetros la obtención de cada punto de la valoración calorimétrica necesitaba de un experimento independiente. Para la obtención de una curva de valoración completa de, por ejemplo, una proteína con un ligando, se podía tardar hasta varios días, con un gasto mínimo de varios milimoles de proteína. Durante la década de los 80, los calorímetros de "batch" y flujo comenzaron a caer de desuso como consecuencia del desarrollo de los calorímetros de titulación. En estos calorímetros la curva de valoración se obtiene en un sólo experimento y con prácticamente la misma cantidad de material necesaria para obtener un sólo punto de la curva de valoración en los otros tipos de calorímetros.

Calorímetros de titulación. Desarrollo instrumental:

Los primeros calorímetros de titulación aparecieron a principios de los años setenta (Christensen et al., 1973; Pennington, 1976). El volumen de la célula de reacción era de 1 a 2 ml, pero no tenían la suficiente sensibilidad para trabajar a bajas concentraciones de macromolécula. El salto cualitativo se produce a principios de la década de los 80 cuando Spokane y Gill (1981) construyeron el primer instrumento que entraba en el orden de magnitud de los 100 nanomoles de cantidad mínima de sustancia necesaria para obtener toda la curva de valoración. Posteriormente, se desarrollaron nuevos instrumentos tanto en el mismo laboratorio de S.J. Gill (McKinnon et al., 1984) como en los laboratorios de J.F. Brandts (Wiseman et al., 1989) y E. Freire (Freire et al., 1990). Desde el punto de vista de sus posibilidades, son instrumentos de características aproximadamente similares en cuanto a la cantidad mínima de muestra necesaria; del orden de las decenas de nanomoles. Estrictamente, es por lo tanto posible, referirse a estos instrumentos como nanocalorímetros.

El primero de los calorímetros que se desarrolló en el laboratorio de S.J. Gill (Spokane y Gill, 1981), aunque permitió la investigación calorimétrica de la interacción de represor de la lactosa con isopropil-1-thio- β -galactopiranosido (IPTG) (Donner et al., 1982), se trataba de un instrumento que presentaba grandes dificultades en la realización de medidas. Estas dificultades se derivaban tanto del control adiabático de las fluctuaciones de temperatura de su única célula como del ruido mecánico derivado del rozamiento de la aguja de inyección del reactivo valorante. Ello hizo que se pusiese a punto un nuevo calorímetro (McKinnon et al., 1984) basado en el principio de construcción de células gemelas y en el que la aguja de inyección y agitación se centraba en el calorímetro sin que se produjese ningún rozamiento con las paredes en las proximidades del bulbo de reacción. Este instrumento resultó ser muy reproducible y de gran sencillez en su manejo. Con el mismo se ha realizado diferentes estudios, tanto de interacciones de macromoléculas biológicas con moléculas más pequeñas (véase por ejemplo Parody-Morreale et al., 1987) como de determinación de calores de dilución de moléculas orgánicas pequeñas (véase por ejemplo Murphy y Gill, 1989). Podemos decir de este calorímetro que sería el primer modelo de la segunda generación de calorímetros de titulación isoterma desarrollados en el laboratorio de S.J. Gill. En esta Tesis se va a describir la puesta a punto del segundo de los modelos de dicha generación.

El único de los calorímetros de titulación descritos en la pasada década que ha sido comercializado hasta hoy es el Omega (Microcal Inc. Northhampton, MA) desarrollado en

el laboratorio de J.F. Brandts (Wiseman et al., 1989) y su uso ha revitalizado la presencia de la técnica en la bibliografía (Sehl y Castellino, 1990; Epand et al., 1990; Schwarz et al., 1991; Morin y Freire, 1991; Varadarajan et al., 1992; Khalifah et al., 1993; Connelly et al., 1993; Jin et al., 1993; Thomas y Seelig, 1993; Huber et al., 1993; Ito et al., 1993; Mandal et al., 1994).

Información estructural y resultados termodinámicos:

En algunos casos, es posible interpretar y discutir los parámetros termodinámicos a nivel molecular, usando información termodinámica obtenida a partir de compuestos modelo junto con la información estructural obtenida en particular por RMN y difracción de rayos X (Eftink y Biltonen, 1980; Ross y Subramanian, 1981), aunque todavía estamos lejos de poder evaluar la contribución energética de los diferentes procesos de la unión a nivel cuantitativo. No obstante, se puede obtener información importante acerca de la unión del análisis de los efectos entálpicos y entrópicos de la unión que están íntimamente relacionados con la naturaleza de las interacciones entre las moléculas reaccionantes. Por ejemplo, a partir de estudios sobre compuestos modelo, se sabe que las interacciones electrostáticas son dominadas por efectos más bien entrópicos que entálpicos. Lo mismo puede decirse de las interacciones hidrofóbicas a temperatura ambiente (Kauzmann, 1959). Al contrario de estos dos tipos de interacciones, las interacciones mediante puentes de hidrógeno y las de van der Waals son dominadas más bien por efectos entálpicos (Kauzmann, 1959; Ross y Subramanian, 1981).

Muchas veces, la información obtenida a partir de los parámetros termodinámicos puede ser más fructífera si las medidas experimentales se realizan en diferentes condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura, etc. Quizás la reacción mejor caracterizada en función del pH es la unión de 3'CMP a la ribonucleasa A (Flogel y Biltonen, 1975a, 1975b) que se estudió mediante un calorímetro de flujo. En dicho estudio se concluyó que la unión está asociada a la ionización de tres histidinas en la proteína, y que, a partir del signo de ΔS° , a pH básico la unión está dominada por interacciones de tipo electrostático entre el fosfato del ligando cargado negativamente y los residuos de las histidinas cargados positivamente, y que a pH ácido la reacción está dominada por interacciones de van der Waals entre la citosina y la proteína. Una interacción proteína-proteína caracterizada a diferentes pH, es la inhibición de la β -tripsina por STI (Barnhill y Trowbridge, 1975; Yung y Trowbridge, 1980)

en donde se ha encontrado un proceso cooperativo a pH ácido entre tres y cuatro grupos ionizables.

Muchas reacciones implican la participación de varios grupos ionizables tanto en una proteína como en un ligando, que liberan o absorben protones después de la unión. Este efecto puede cuantificarse si uno mide ΔH° de la reacción, en un pH determinado, en diferentes tampones caracterizados por diferentes calores de ionización (Dobry y Sturtevant, 1952; Hinz et al., 1971). La cuantificación de este efecto pone en manifiesto la importancia de las interacciones electrostáticas entre grupos específicos de la proteína y el ligando.

La magnitud de las interacciones electrostáticas en una reacción depende, entre otras, de la constante dieléctrica del medio. Esta última es función de la polaridad del medio y consiguientemente, la caracterización termodinámica de la reacción en medios a diferentes fuerzas iónicas puede poner en evidencia la importancia de este tipo de interacciones en la unión. Bolen et al. (1971) han encontrado una importante influencia de la concentración de sales por debajo de 1 M en la unión de 3'CMP a la ribonucleasa A, que desaparece a altas concentraciones. Ello ha permitido concluir que no hay competitividad entre los aniones de las sales y el inhibidor en la unión a los centros cargados positivamente de la proteína (el sitio es específico para el fosfato), y que esta influencia es debida probablemente a cambios en los pK de las histidinas con la fuerza iónica que tienen un papel primordial en las interacciones electrostáticas.

Trabajando a diferentes temperaturas se puede evaluar el incremento en la capacidad calorífica a presión constante de una reacción ΔC_p° . Este parámetro es importante en la evaluación del efecto hidrofóbico en la unión (Kauzmann, 1959; Tanford, 1973), reflejado en la cantidad de agua desplazada del sitio de unión por el ligando. También es importante en la predicción de posibles cambios conformacionales inducidos por la interacción. Sturtevant (1977) ha desarrollado un método empírico para la estimación cuantitativa de este efecto, así como en la evaluación de los modos vibracionales destruidos en el proceso de unión. Como ejemplo de la aplicación de este método, se ha encontrado que la unión de un molécula de AMP a los sitios I de la fosforilasa b conduce a la liberación de aproximadamente 15 moléculas de agua y a una pérdida de aproximadamente 50 modos vibracionales internos (Barón et al., 1989). Muchos valores de ΔC_p° para interacciones macromolécula-ligando han sido tabulados (ver por ejemplo Hinz, 1983; Wiesinger y Hinz, 1986; Sturtevant, 1977; Biltonen y Langerman, 1979). Recientemente, este parámetro está

teniendo interés en estudios teóricos computacionales; se puede evaluar teóricamente a partir de la evaluación de las superficies polares y apolares de la proteína y del ligando accesibles al agua, antes y después de la unión. Pero, si a veces en los procesos que envuelven cambios conformacionales se ha encontrado una buena correlación entre los valores medidos y los predichos de ΔC_p° (Spolar et al., 1992; Murphy y Freire, 1992), en muchos casos de interacción proteína-ligando no se ha encontrado ninguna correlación (Varadarajan et al., 1992) o una correlación muy pobre (Jin et al., 1993). En cualquier caso, cualquier tratamiento teórico de las interacciones proteína-ligando tiene que ser coherente con la energética experimental de la reacción.

Otras consideraciones:

La calorimetría de reacción en Bioquímica se ha aplicado fundamentalmente a la caracterización termodinámica de las interacciones macromolécula-ligando. A menor escala, la técnica ha sido utilizada en otros tipos de problemas. Así, por ejemplo, podemos considerar su uso en la caracterización cinética de reacciones catalizadas por enzimas (ver por ejemplo Johnson y Biltonen (1975) en la determinación de la constante de Michaelis y la velocidad máxima para la ribonucleasa y la chimotripsina, Morin y Freire (1991) en la oxidación del citocromo c), o en la caracterización termodinámica de los procesos que envuelven cambios conformacionales inducidos por agentes químicos (ver por ejemplo Forrest y Sturtevant (1960) en la desnaturalización de la Ferrihemoglobina en disolución ácida, Atha y Ackers (1971) en el la desnaturalización ácida de la lisozima a diferentes concentraciones de guanidina). En el campo analítico, aunque la calorimetría llega a tener algunas ventajas sobre otras técnicas como las espectroscópicas, que necesitan objetos ópticamente claros, su uso en ella ha sido hasta hoy muy limitado.

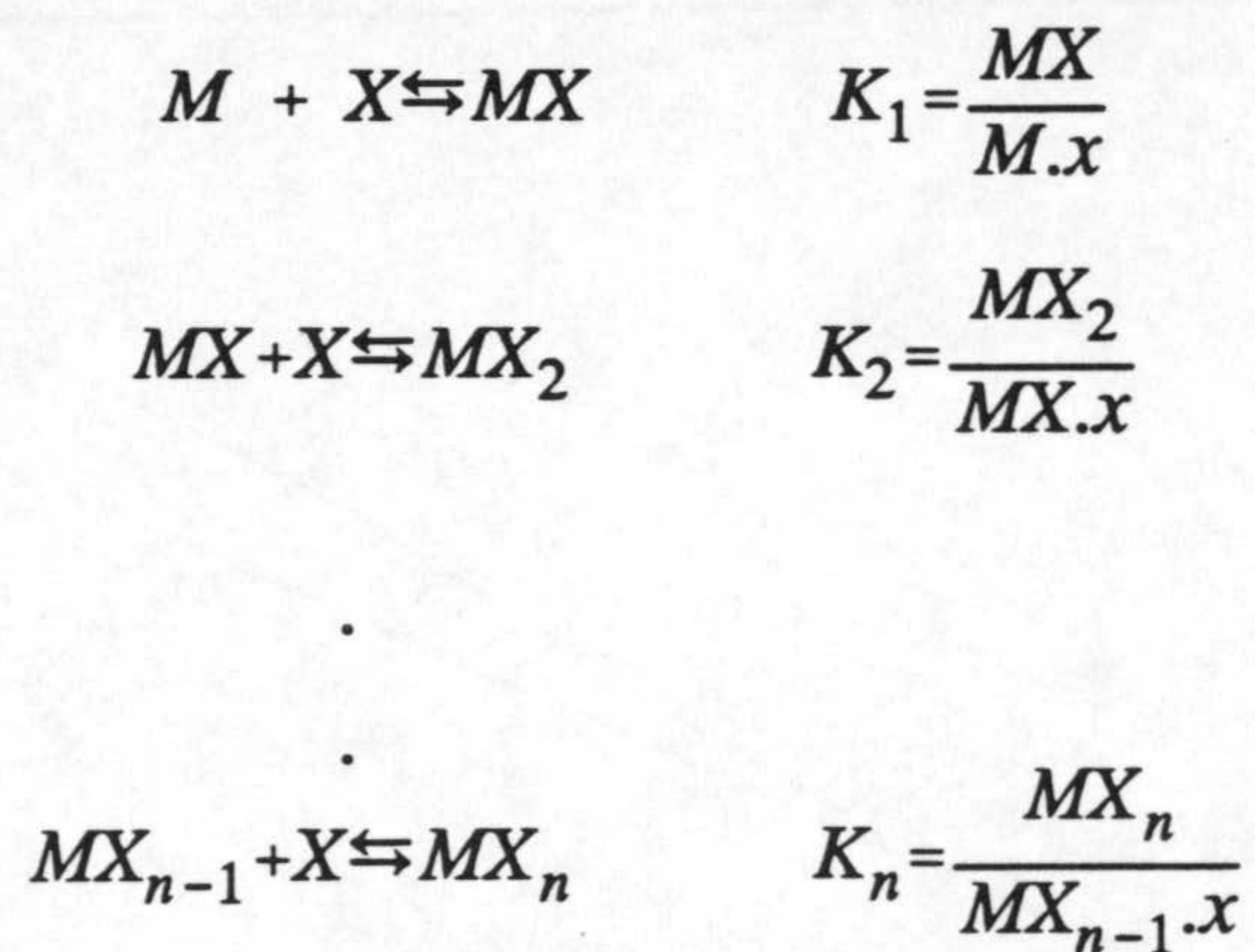
1.2 TERMODINAMICA DE LA INTERACCION MACROMOLECULA-LIGANDO.

Dado que el calorímetro que se va a describir es un calorímetro de titulación que se pretende aplicar en principio al estudio de interacciones entre macromoléculas biológicas, fundamentalmente proteínas, y ligandos de bajo peso molecular, presentamos en esta sección una breve descripción de la termodinámica de este tipo de interacciones.

1.2.1 Descripción Fenomenológica.

Experimentalmente, en una interacción específica entre una macromolécula y un ligando, en la que la macromolécula puede tener uno o más sitios de unión para el ligando, se busca obtener una curva de unión, que representa el promedio del número de moléculas de ligando unidos por macromolécula, \bar{X} , a una determinada concentración de ligando libre, x (Wyman y Gill, 1990). \bar{X} se denomina parámetro de unión. La curva de unión contiene la mayor información sobre la interacción: las constantes de equilibrio de unión de cada sitio, el número de sitios de unión, n , la existencia o no de cooperatividad, etc. Una curva de unión típica que puede obtenerse se ilustra en la Figura 1-6A (línea en trazo continuo) para una macromolécula con dos sitios de unión independientes e idénticos. Se observa que la misma alcanza el valor constante n a alta concentración de ligando, que es una característica de una unión específica.

En una interacción específica, la unión del ligando está gobernada por la ley de acción de masas, es decir que existe una constante de equilibrio K_j para cada sitio. Las reacciones sucesivas que describen esta unión en función de las constantes de equilibrio son:



Aquí MX_j son las concentraciones de la macromolécula con j ligandos unidos y x la del ligando libre. Aunque estrictamente las constantes de equilibrio deben ser expresadas en función de las actividades de los reactivos, a partir de ahora consideramos que las mismas pueden ser sustituidas por las concentraciones. La interacción de la macromolécula con el ligando puede formularse también mediante reacciones totales con constantes macroscópicas β_j , correspondientes a la unión de j moléculas de ligando a la macromolécula que se encuentra en el estado de cero ligandos unidos, M .

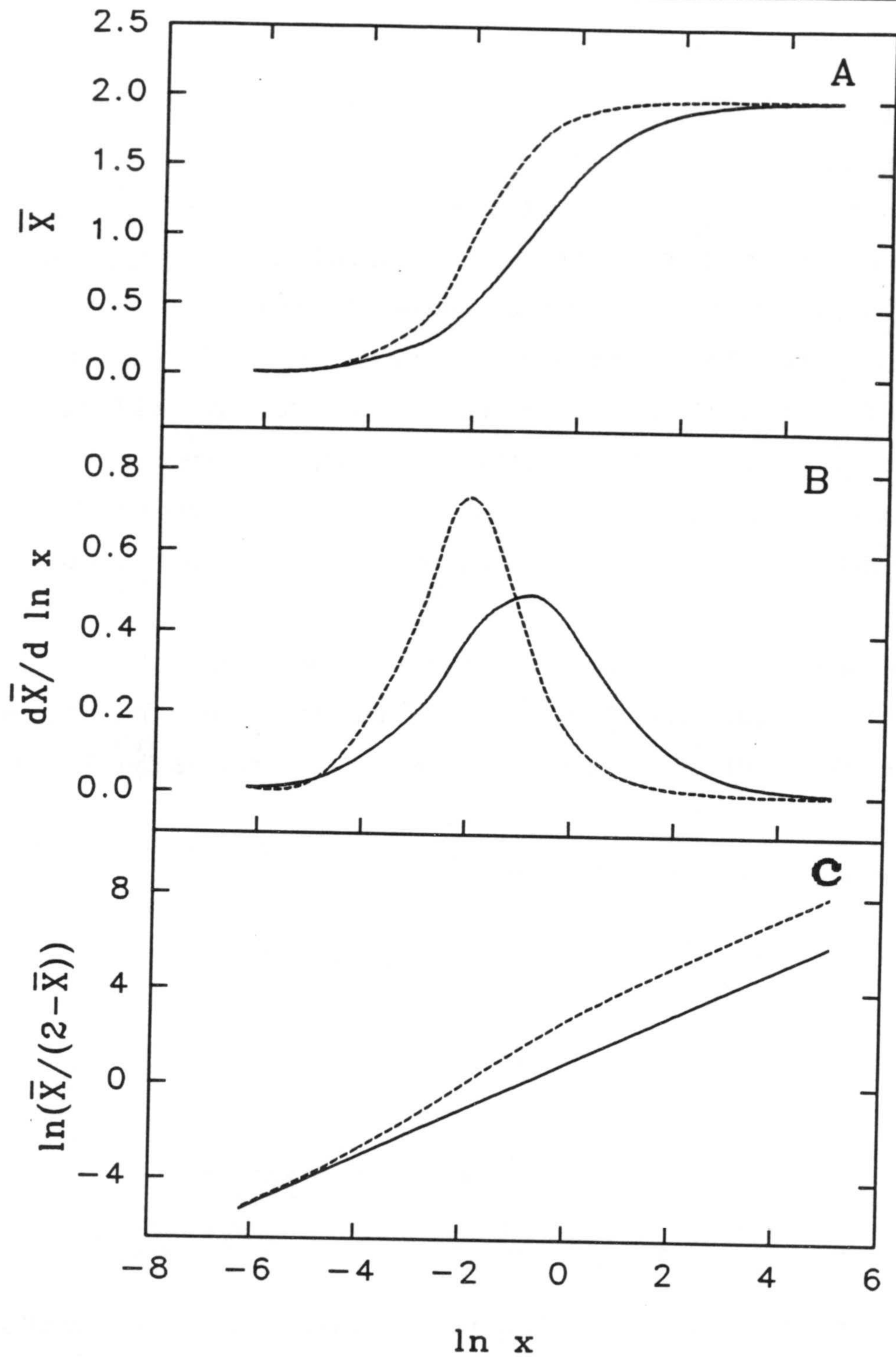
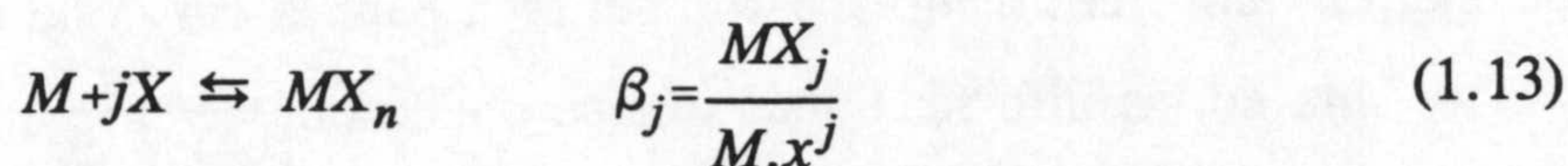


Figura 1-6: A. Curva de unión para dos sitios de unión independientes e idénticos con constantes de equilibrio $K_1 = 5 \text{ M}^{-1}$ y $K_2 = 1.25 \text{ M}^{-1}$ (línea en trazo continuo) y para dos sitios con cooperatividad positiva con constantes $K_1 = 5 \text{ M}^{-1}$ y $K_2 = 10 \text{ M}^{-1}$ (línea en trazo discontinuo). En la parte B están representadas las pendientes de las curvas de la parte A. C. Representación de Hill para los dos casos. Para más detalle, ver texto.



Tanto las β_j como las K_j se llaman también constantes de Adair y se relacionan entre sí por:

$$\beta_j = K_1 K_2 \dots K_j, \quad \text{con } \beta_0 = K_0 = 1 \quad (1.14)$$

El número de ligandos unidos por macromolécula \bar{X} está dado por la suma de todas las especies macromoleculares MX_j con los pesos apropiados:

$$\bar{X} = \frac{MX + 2.MX_2 + \dots + n.MX_n}{M + MX + MX_2 + \dots + MX_n} \quad (1.15)$$

que en función de las constantes macroscópicas β_j y la concentración del ligando libre x queda:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{j=0}^n j\beta_j x^j}{\sum_{j=0}^n \beta_j x^j} \quad (1.16)$$

Esta es la ecuación de Adair representando al parámetro de unión en función de las propiedades del sistema. El denominador de la misma es el polinomio de unión, P , cuya noción ha sido introducida por Wyman (1965):

$$P = 1 + \beta_1 x + \dots + \beta_n x^n \quad (1.17)$$

Este parámetro tiene una conexión directa con los parámetros termodinámicos de la reacción en estudio como la cantidad de ligando unido y la variación de la entalpía. Conocido el polinomio de unión, los valores medios de las diferentes propiedades del sistema se obtienen operando sobre el mismo mediante derivadas apropiadas. Así por ejemplo se puede comprobar que el parámetro de unión es la derivada de logaritmo de P con respecto al logaritmo de x :

$$\bar{X} = \frac{d \ln P}{d \ln x} \quad (1.18)$$

A partir de esta ecuación se ve también que, en el caso de que P es desconocido, se puede

obtener el valor del mismo a partir del area bajo la curva de unión.

Una de las informaciones que se puede obtener a partir de la curva de unión es la existencia o no de la cooperatividad en el caso de que la macromolécula posee más de un sitio de unión. La cooperatividad está definida como la interacción entre los sitios que hace que la unión de la primera molécula de ligando afecta a la afinidad de unión para la siguiente molécula. Esta cooperatividad puede ser positiva o negativa según que esta influencia favorece o desfavorece a la unión de esa siguiente molécula. En la misma Figura 1-6A se puede ver una curva de unión para una macromolécula con dos sitios positivamente cooperativos (línea en trazo discontinuo). Notar que en este caso, la macromolécula se satura en menos concentración de ligando en comparación con el caso de dos sitios independientes e idénticos. Una de las características de una curva de unión con cooperatividad positiva es el valor de la pendiente de la misma a la mitad de saturación que es siempre mayor que el valor $n/4$. Este último es característico de sitios independientes e idénticos. Los valores de las pendientes de las dos curvas de unión de la Figura 1-6A se muestran en la parte B de la misma. Este tipo de curvas se llama curva de capacidad de unión de la macromolécula (Di Cera et al., 1988) en analogía con la capacidad calorífica en las transiciones conformacionales de las macromoléculas. Como se puede ver la curva de capacidad de unión muestra un pico alto y agudo cuando hay cooperatividad positiva en comparación con el caso de sitios independientes e idénticos en donde el pico es más ancho y bajo. Quizás la curva que mejor describe la cooperatividad es la representación de Hill, que muestra la variación de la relación sitios ocupados/sitios no ocupados con la actividad del ligando.

$$\ln \frac{\theta}{1-\theta} \left[\text{vs. } \ln \frac{X}{n-X} \right] \text{ vs. } \ln x \quad (1.19)$$

en donde $\theta = \bar{X}/n$ es la fracción de los sitios ocupados. En la Figura 1-6C se da la representación de Hill para los dos casos: con y sin cooperatividad. Notar que en el caso de que no hay cooperatividad la misma es una línea recta de pendiente 1, sin embargo cuando hay cooperatividad positiva la representación de Hill es una sigmoide que tiende hacia el más infinito con una asíntota de pendiente 1 y de ordenada en el origen igual a $\ln(K_1/n)$, y tiende hacia el menos infinito de la misma manera pero con una ordenada en el origen de valor $\ln(nK_n)$. El parámetro que bien representa al grado de cooperatividad es el coeficiente

de Hill n_H (Wyman, 1964) que es la pendiente de la gráfica de Hill en el punto de la mitad de saturación, es decir donde $\bar{X} = n/2$. Este parámetro vale 1 cuando los sitios son independientes e idénticos y está comprendido entre 1 y n en caso de que haya cooperatividad positiva.

1.2.2 Energía de Gibbs de Unión de un Ligando a una Macromolécula.

El parámetro termodinámico que nos da el mayor o menor grado de afinidad en la interacción entre la macromolécula y el ligando es la energía de Gibbs. Definimos la energía de Gibbs de unión, ΔG_u , como la variación de energía de Gibbs por mol de macromolécula en el paso desde la macromolécula en ausencia de ligando hasta la macromolécula en un determinado grado de saturación definido por la concentración de ligando libre x . Vamos a ver la relación que existe entre ΔG_u , el polinomio de unión, siguiendo el tratamiento original de Schellman (1975).

ΔG_u es la diferencia entre la energía de Gibbs antes (G_1) y después (G_2) de la reacción de la macromolécula con el ligando:

$$\Delta G_u = G_2 - G_1 \quad (1.20)$$

y cada uno de estos dos términos es simplemente igual a la suma de los potenciales químicos de las diferentes especies moleculares presentes en el sistema. Los potenciales químicos μ_j , de las especies macromoleculares con j ligandos unidos, y del ligando μ_x están relacionados con sus concentraciones por:

$$\mu_j = \mu_j^0 + RT \ln MX_j, \quad j = 0, \dots, n.$$

$$\mu_x = \mu_x^0 + RT \ln x \quad (1.21)$$

La concentración total c de la macromolécula es la suma de todas las especies macromoleculares:

$$c = M + MX + \dots + MX_n = M \cdot P \quad (1.22)$$

en donde P es el polinomio de unión definido por la Ecuación (1.17). Si, por simplicidad, consideramos que el sistema contiene un mol de macromolécula, la energía de Gibbs antes de la reacción vendrá dada por:

$$G_1 = \mu_0^o + RTLnc + n_{X,u}(\mu_x^o + RTLn x) + G_{ex} \quad (1.23)$$

en donde $n_{X,u}$ es el número de moles de ligando que se unirán al equilibrio y G_{ex} es la energía de Gibbs de exceso, que incluye ligando, disolvente, etc. Después de la interacción, la energía de Gibbs estará dada por:

$$G_2 = \sum_{j=0}^n \alpha_j \mu_j + G_{ex} \quad (1.24)$$

en donde α_j es la fracción de la macromolécula con j ligandos unidos. A partir de las Ecuaciones (1.20), (1.23), (1.24), y teniendo en cuenta que:

$$n_{X,u} = \sum_{j=0}^n j\alpha_j, \text{ y } \alpha_0 = 1 - \sum_{j=1}^n \alpha_j \quad (1.25)$$

se obtiene:

$$\Delta G_u = \sum_{j=0}^n \alpha_j \mu_j - \left[\mu_0^o + RTLnc + \sum_{j=1}^n j\alpha_j (\mu_x^o + RTLn x) \right]$$

$$\Delta G_u = RTLn \frac{M}{c} + \sum_{j=1}^n \alpha_j \left[\mu_j^o - \mu_0^o - j\mu_x^o + RTLn \frac{MX_j}{M \cdot x^j} \right] \quad (1.26)$$

El segundo termino del miembro de la derecha de la ecuación anterior se hace cero ya que $(\mu_j^o - \mu_0^o - j\mu_x^o)$ es la energía de Gibbs estándar de la formación de MX_j a partir de M y ligando libre y es por lo tanto igual a $-RT \ln \frac{MX_j}{M \cdot x^j}$. Entonces la Ecuación (1.26), teniendo en cuenta de (1.22), queda como:

$$\Delta G_u = -RTLn P \quad (1.27)$$

Esta es la expresión que relaciona la energía de Gibbs de unión con las constantes de equilibrio y la concentración de ligando libre, o sea con el polinomio de unión P . La energía de Gibbs de unión es una variable que depende del grado de saturación de la macromolécula que a su vez queda definido mediante la concentración de ligando libre.

1.2.3 Formulación de un Experimento de Valoración Calorimétrica.

Entalpía de unión:

Para el análisis de un experimento calorimétrico de valoración de una macromolécula con un ligando definimos la entalpía molar de unión, ΔH_u , que análogamente a la energía de Gibbs de unión, es la variación de entalpía por mol de macromolécula asociada al proceso de llevar la macromolécula desde una situación en ausencia de ligando hasta un determinado grado de saturación definido mediante la concentración de ligando libre x . La relación entre ΔH_u y el polinomio de unión se obtiene fácilmente a partir de la expresión para ΔG_u aplicando la ecuación de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta H_u = \Delta G_u - T \left[\frac{\partial \Delta G_u}{\partial T} \right]_{p,x} \quad (1.28)$$

que derivando ΔG_u , dada por la Ecuación (1.27), con respecto a la temperatura y sustituyendo en la ecuación anterior se obtiene la siguiente expresión de la entalpía molar de unión:

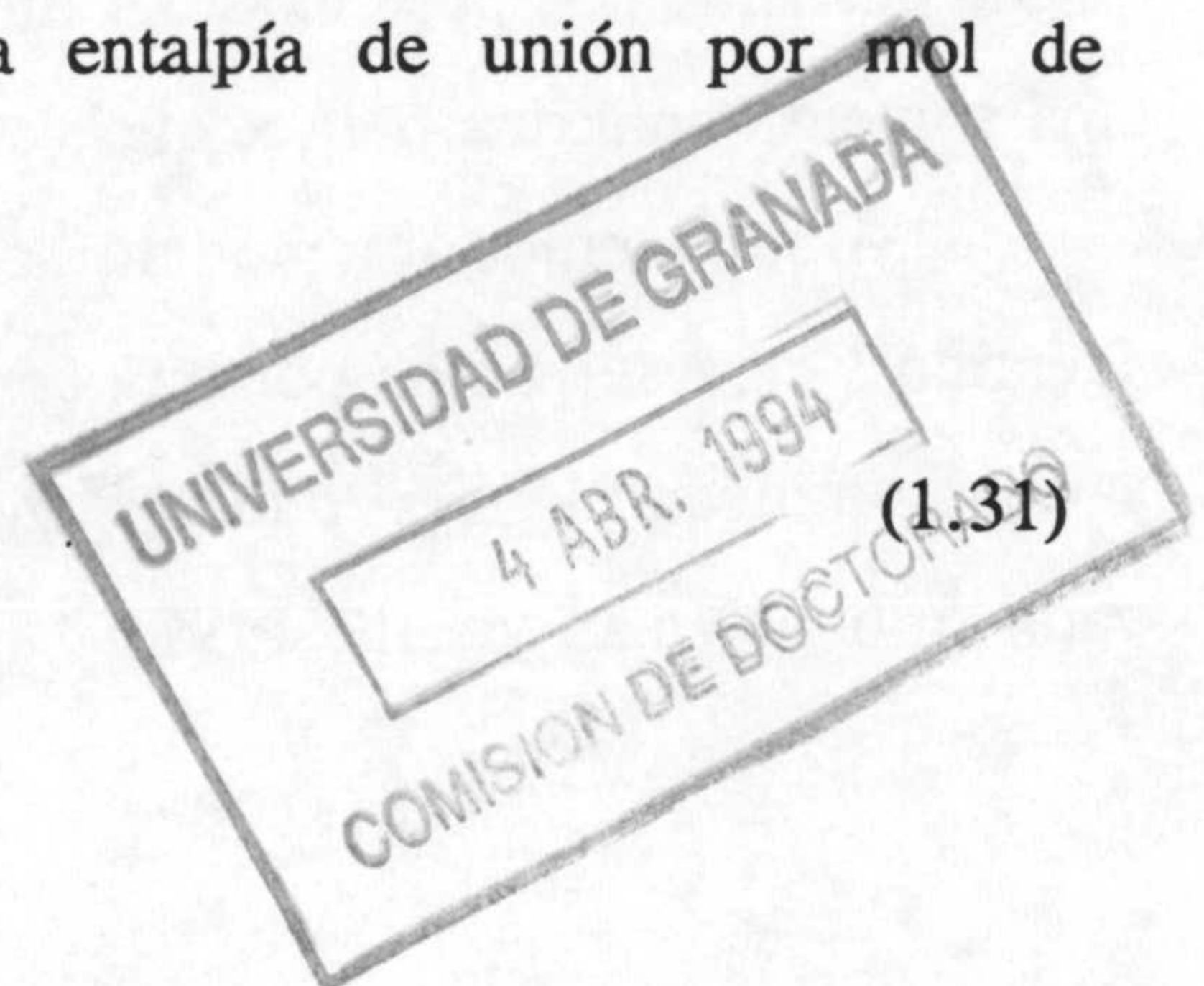
$$\Delta H_u = -R \left[\frac{\partial \ln P}{\partial (1/T)} \right]_{p,x} \quad (1.29)$$

Una expresión similar se ha deducido por Wyman y Gill (1990). Si reemplazamos en la ecuación anterior P por su expresión (1.17) y teniendo en cuenta de la relación de van't Hoff

$$\left[\frac{\partial \ln \beta_j}{\partial (1/T)} \right]_{p,x} = \frac{-\Delta H_j}{R} \quad (1.30)$$

en donde ΔH_j es la variación en la entalpía de la reacción de j moléculas de ligando con la macromolécula inicialmente en el estado de cero ligandos unidos a la que corresponde la constante β_j , obtenemos la expresión general de la entalpía de unión por mol de macromolécula:

$$\Delta H_u = \frac{\sum_{j=1}^n \Delta H_j \beta_j x^j}{\sum_{j=0}^n \beta_j x^j} \quad (1.31)$$



Análisis de datos calorimétricos:

En el Sección 1.1.3 se ha visto que en un calorímetro de reacción el calor debido a la mezcla de dos disoluciones A y B está dado por la diferencia en la entalpía del sistema después y antes de la reacción, que considerando como estado de referencia la macromolécula en ausencia de ligando y recordando es la Ecuación (1.12):

$$q = n_M^C \cdot \Delta H_u^C - (n_M^A \cdot \Delta H_u^A + n_M^B \cdot \Delta H_u^B) \quad (1.32)$$

siendo n_M el número de moles de macromolécula. Tras sustituir las ΔH_u dadas por (1.31) en (1.32) nos queda una expresión en la que aparecen las concentraciones de ligando libre. Dado que en un experimento se conocen las concentraciones totales de macromolécula, M_t , y ligando, X_t , la concentración de ligando libre se puede expresar en función de las mismas y de las constantes β_j para el proceso, ya que:

$$x = X_t - \bar{X} \cdot M_t \quad (1.33)$$

Sustituyendo el parámetro de unión \bar{X} por su Ecuación (1.16) se obtiene:

$$x = X_t - \frac{\sum_{j=0}^n j\beta_j x^j}{\sum_{j=0}^n \beta_j x^j} \cdot M_t \quad (1.34)$$

que si desarrollamos se obtiene un polinomio en x de grado $n+1$:

$$-X_t + \sum_{j=1}^n (jM_t\beta_j - X_t\beta_j + \beta_{j-1})x^j + \beta_n x^{n+1} = 0 \quad (1.35)$$

La única raíz x de esta ecuación, comprendida entre 0 y la concentración total del ligando, puede determinarse por cualquier método numérico iterativo. Hay casos en los cuales existe una solución analítica para x que vamos a ver a continuación.

Si suponemos un modelo sencillo de un sólo sitio o de n sitios independientes e idénticos, caracterizados por una constante intrínseca k de unión, el polinomio de unión de la macromolécula $\sum \beta_j x^j$ puede factorizarse en el producto de los n polinomios propios de cada sitio (Wyman y Gill, 1990):

$$P = (1+kx)^n \quad (1.36)$$

y en este caso el parámetro de unión definido por la Ecuación (1.18) es:

$$X = \frac{nkx}{1+kx} \quad (1.37)$$

que reemplazando en la Ecuación (1.33) la transforma en una ecuación de segundo grado cuya solución es:

$$x = \frac{-(nkM_t - kX_t + 1) + \sqrt{(nkM_t - kX_t + 1)^2 + 4kX_t}}{2k} \quad (1.38)$$

Uno de los modelos simples también de interacción macromolécula ligando es de dos sitios de unión. En este caso el polinomio de unión es $P = 1 + \beta_1 x + \beta_2 x^2$ y la Ecuación (1.35) en x será una ecuación de tercer grado cuya solución analítica es:

$$x = 2\sqrt{-a} \cos \left[\frac{\arccos\left(\frac{-b}{\sqrt{-a^3}}\right)}{3} \right] - \frac{A}{3\beta_2} \quad (1.39)$$

con

$$a = \frac{B}{3\beta_2} - \left[\frac{A}{3\beta_2} \right]^2, \quad b = \left[\frac{A}{3\beta_2} \right]^3 - \frac{AB}{6\beta_2^2} - \frac{X_t}{2\beta_2}$$

$$A = \beta_1 + \beta_2(2M_t - X_t), \quad B = 1 + \beta_1(M_t - X_t)$$

En un calorímetro de titulación, se miden normalmente los calores de una reacción a diferentes proporciones relativas de los reactivos obteniéndose una curva de valoración, y el objetivo es la determinación, a partir de la misma si es posible, de los parámetros termodinámicos de la reacción: ΔH_j y β_j . En principio esto puede llevarse a cabo para interacciones relativamente débiles ajustando los datos a la expresión de q , Ecuación (1.32), en donde la concentración de ligando libre entra en el ajuste a través de la Ecuación (1.35).

El ajuste puede realizarse por un método no lineal, con un procedimiento iterativo que consiste en encontrar los parámetros que hacen que la diferencia entre los datos experimentales y los calculados sea mínima. Sin embargo, a veces, existen limitaciones en la aplicación de esta metodología debido al gran número de parámetros desconocidos y por consiguiente diferentes conjuntos de parámetros pueden ajustar bien los datos experimentales, y solamente es en algunas situaciones limitadas que se puede obtener simultáneamente valores precisos de las constantes de equilibrio y las entalpías de reacción a partir del ajuste.

En la situación más simple (n sitios independientes e idénticos), los parámetros del sistema se reducen a una sola constante de equilibrio k y una sola entalpía de reacción ΔH , que son las mismas para los n sitios. Si la unión no es muy fuerte, a partir de un ajuste no lineal de la curva de valoración se puede obtener los valores de estos últimos e incluso el número de sitios n si éste es desconocido. Este es el modelo más popular usado en el análisis de los experimentos calorimétricos.

La situación intermedia es la de dos sitios que no son idénticos. En este caso, hemos comprobado mediante simulaciones que se podrían obtener los cuatro parámetros ΔH_1 , ΔH_2 , β_1 y β_2 a partir de un ajuste no lineal, pero con menos precisión que si se tratará de dos sitios independientes e idénticos. No obstante, todavía no conocemos ningún caso en que los cuatro parámetros hayan podido ser determinados a partir del ajuste de una valoración calorimétrica.

La situación se complica definitivamente cuando el número de sitios es mayor que dos. En este caso es actualmente imposible obtener todas las constantes de equilibrio β_j y las entalpías de reacción ΔH_j a partir de un ajuste de los datos. Es necesario, por tanto, conocer de antemano las β_j , y a partir del ajuste se determinan sólo las ΔH_j . Estas últimas se pueden obtener a partir de un ajuste no lineal o bien más fácilmente mediante un ajuste lineal. El ajuste lineal consiste en resolver un sistema de ecuaciones lineales normales, con las únicas incógnitas de las entalpías. Las ecuaciones de este sistema se obtienen minimizando la suma de los residuos al cuadrado SRC. Por residuo se entiende la diferencia entre el dato experimental q_{exp} y el dato calculado q_{cal} utilizando un determinado conjunto de parámetros β_j y ΔH_j . La condición necesaria que tiene que cumplirse para que SRC este mínima es que su derivada parcial con respecto al parámetro desconocido ΔH_j sea nula:

$$\left[\frac{\partial SRC}{\partial \Delta H_j} \right]_{\Delta H_m} = \left[\frac{\partial \sum_{i=1}^{N_d} (q_{i,exp} - q_{i,cal})^2}{\partial \Delta H_j} \right]_{\Delta H_m} = 0 \quad \text{con } m \neq j \quad (1.40)$$

en donde N_d es el número de datos experimentales. La condición anterior tiene que cumplirse para todas las ΔH_j ($j=1\dots n$) de manera que el sistema a resolver tendrá n ecuaciones.

Finalmente hay que decir que en el caso de interacciones relativamente fuertes siempre es posible determinar a partir de una valoración calorimétrica el número de sitios n y ΔH_n .

1.3 RESUMEN DE ESTA TESIS.

El objetivo de esta Tesis ha sido en primer lugar la puesta a punto de un segundo modelo de la segunda generación de calorímetros de titulación desarrollados en el laboratorio del Profesor S.J. Gill, de la Universidad de Colorado (USA). El calorímetro fue diseñado por dicho Profesor y el Dr. Antonio Parody Morreale en aquella Universidad, en donde también se ensambló el sumidero de calor. A partir de ahí, el montaje total del bloque calorimétrico y la torre soporte de los sistemas de inyección y agitación, su conexión a periféricos, desarrollo de software de control del experimento y puesta a punto completa se ha realizado en la Universidad de Granada.

Posteriormente se evaluó el calorímetro como instrumento capaz de realizar, en un sólo experimento, la caracterización termodinámica completa de interacciones biomoleculares, es decir, de medir no sólo la variación de entalpía sino también la constante de equilibrio, con la determinación consiguiente de las variaciones de energía de Gibbs y entropía. Para ello se ha desarrollado el software de simulación de las curvas de valoración calorimétricas y de análisis de las mismas para la obtención de dichos parámetros.

Por último, se ha aplicado el calorímetro al estudio de una reacción bioquímica de interés, la de la barnasa con su inhibidor 3'GMP. La barnasa es una ribonucleasa, de un sólo dominio globular y de bajo peso molecular, específica para las guaninas en la hidrólisis de los ácidos ribonucleicos. Es objeto de una investigación intensiva que se está llevando a cabo

en varios laboratorios del mundo así como también en este Departamento. Se conoce sobre la misma muchos detalles de varios tipos de estudios (estructurales, cinéticos, termodinámicos,...), sin embargo, falta en la bibliografía una descripción termodinámica completa de una interacción importante en la función biológica de esa proteína, que es la unión de 3'GMP. Nosotros en esta Tesis completamos la información estructural que se conoce con información termodinámica, que esperamos sea útil para entender el mecanismo de acción de esa proteína.

2 Descripción del Calorímetro. Respuesta Básica y Sensibilidad.

En este capítulo se va a hacer una descripción general del calorímetro. Como se ha dicho anteriormente, este calorímetro es similar al construido por McKinnon et al. (1984), y se ha diseñado para medir efectos térmicos en los procesos de interacción entre moléculas biológicas ya que el volumen del bulbo de reacción es sólo 200 μl y su sensibilidad es de 1 μcal . Se trata de un calorímetro de conducción a través de termopilas construido mediante el principio de células gemelas, y para la medida del calor se aplica una metodología de compensación eléctrica. El calorímetro trabaja a temperatura constante (isotérmico) controlada por un baño de agua. La mezcla de los reactivos se realiza mediante sucesivas inyecciones con una jeringa de volúmenes pequeños de un reactivo en la célula que contiene al otro reactivo, por lo que se trata también de un calorímetro de titulación. Tanto la realización de las inyecciones como la medida del calor se controla mediante un ordenador.

2.1 VISION GLOBAL DEL SISTEMA.

En la Figura 2-1 se muestra un esquema general del sistema calorimétrico. El calorímetro propiamente dicho viene designado por (a). El mismo consta esencialmente de dos partes, el bloque calorimétrico y la torre soporte de los sistemas de inyección y agitación, que se describirán en detalle posteriormente. El bloque calorimétrico se encuentra sumergido en un baño termostático (b), mientras que la torre soporte se encuentra por encima del nivel del agua del mismo. El baño termostático, así como el sistema para el control de su temperatura, también se describirán en detalle más adelante.

Al tratarse de un calorímetro de conducción, la medida de los efectos térmicos

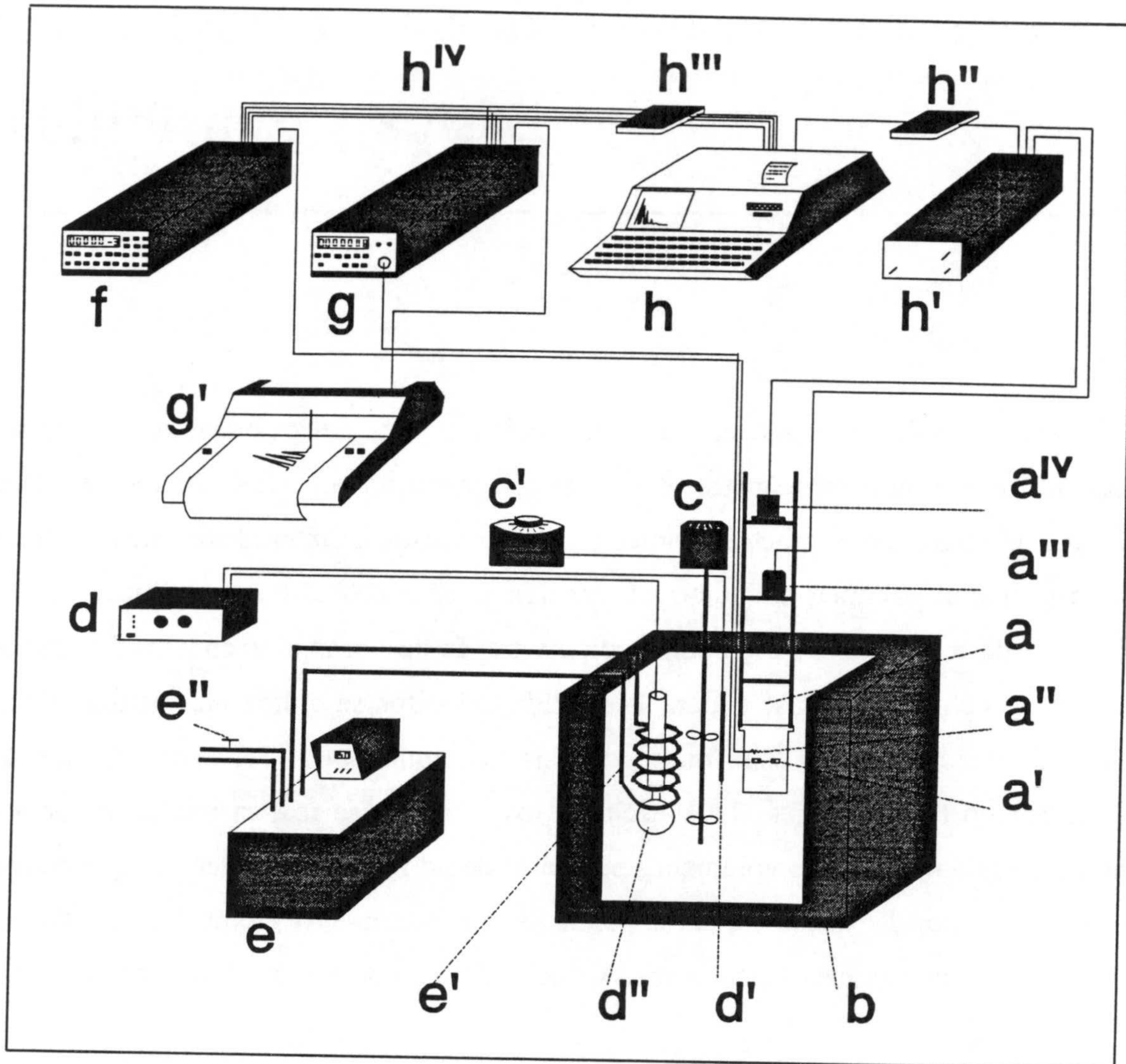


Figura 2-1: Visión global del sistema. a) Calorímetro; b-e) Baño termostático y elementos de control de la temperatura del mismo; f) Fuente de alimentación; g) Nanovoltímetro; g') Registro gráfico; h) Computador e interfaces. Para la descripción detallada, ver texto.

producidos se realiza a partir de la variación con el tiempo del voltaje de las dos termopilas (a') en contacto con las células de reacción y referencia y el sumidero de calor. Para la realización de esta medida se utiliza un nanovoltímetro Keithley 181 (g) con capacidad para amplificar la señal y enviarla a través de su salida analógica a un registrador gráfico (g'). Por otra parte, para el calibrado del calorímetro y la medida de los efectos térmicos con el método de compensación eléctrica (ver Capítulo 3 para los detalles sobre este método), se utiliza una resistencia calefactora en la célula de reacción (a'') a través de la cual es posible comunicar a la misma una cantidad conocida de calor. La intensidad de corriente a través de dicha resistencia se controla desde una fuente de alimentación Keithley 224 (f).

Los elementos anteriormente reseñados son los básicos para que sea posible el funcionamiento del sistema calorimétrico. En tal caso se trataría de un sistema "pasivo" en el que por una parte, habría que proceder manualmente a activar la agitación de la mezcla reaccionante y la inyección de reactivo valorante, y por otra, en la medida de un efecto térmico se invertiría un tiempo de unas 7-8 veces la constante de tiempo del calorímetro. Sin embargo, todo el sistema se encuentra controlado mediante un computador Hewlett-Packard HP 85 (h) con una extensión de memoria HP-82903A de 16K, y otra memoria IO/ROM (P/N 00085-15003) para la comunicación con los periféricos. Este computador permite en primer lugar, controlar el motor de agitación (a''') de la mezcla de reacción y el de inyección (a^{IV}) de reactivo valorante. Este control se realiza a través de un interfaz de propósito general (h'') HP-GPIO 82940A y con su correspondiente etapa de potencia (h'). En segundo lugar, el computador se comunica a través de una línea IEEE-488-1978 (h^{IV}) y su correspondiente interfaz HP-IB 82937A (h'''), tanto al nanovoltímetro como a la fuente de alimentación (la fuente de alimentación tiene instalado un interfaz IEEE-488 modelo Keithley 2243). Esto permite la adquisición directa de datos del nanovoltímetro y modificar la intensidad de la corriente desde la fuente de alimentación a la resistencia calefactora en la célula de reacción, permitiendo así utilizar un método de compensación eléctrica (McKinnon et al. 1984) que reduce el tiempo de ejecución de las medidas a 1-2 veces la constante de tiempo del calorímetro. El computador por lo tanto convierte el sistema de "pasivo" a "activo" y hace posible la automatización completa del experimento.

2.2 CALORIMETRO.

Pasamos a continuación a describir el calorímetro propiamente dicho. Este consta de dos partes; el bloque calorimétrico, en donde se aloja el sumidero de calor con las células de reacción y referencia, y la torre soporte de los sistemas de inyección y agitación.

2.2.1 Bloque.

En la Figura 2-2 puede verse un corte longitudinal del bloque calorimétrico. En primer lugar hay que decir que el mismo tiene simetría cilíndrica, y que el corte se ha hecho con el plano que contiene tanto a su eje como a los ejes de las células de reacción y referencia. El bloque calorimétrico consta fundamentalmente de una coraza externa (i) construida en acero inoxidable, en el interior de la cual se aloja el sumidero de calor (j) construido en aluminio. El aluminio, por una parte, al tener una alta capacidad calorífica (0.206 cal/K.g, que dado el peso del bloque sería aproximadamente 400 cal/K), permite que la temperatura del sumidero no se ve afectada por pequeñas fluctuaciones en la temperatura del baño de agua o por la conducción del calor de reacción desde la célula. Por otra parte es un buen conductor de calor (conductividad térmica = 0.48 cal/K.cm.s) lo cual evita acumulación de calor en la célula y hace que la conducción del mismo hacia el sumidero sea más rápida. La coraza externa es como una caja cilíndrica con una rebaba en el borde superior. El sumidero de calor se encuentra suspendido de la superficie inferior de la tapa de la caja por seis tornillos, que no se muestran en la figura. El único contacto entre la coraza y el sumidero se produce a través de estos seis tornillos y de cuatro separadores de acero inoxidable (k), de los cuales se muestran en la figura sólo dos; los otros dos se encuentran en el plano perpendicular al del corte y en posiciones equivalentes. Todo el bloque se encuentra sumergido en el interior de un baño termostático de agua, y para amortiguar en alguna medida en el primero las fluctuaciones de temperatura del segundo la coraza externa se rodea por un material aislante constituido por una lamina de 1 cm de grosor de poliuretano expandido.

El sumidero de calor consta de tres partes (j', j'' y j'''). La parte superior (j') está atravesada por cuatro orificios. En dos de ellos, de sección variable (tres diámetros diferentes) se alojan las células de reacción y referencia (l). Estos dos orificios se muestran en la figura, uno de ellos con la célula de reacción colocada en su sitio, y el otro, en donde

se alojaría la célula de referencia, para mayor claridad se muestra vacío. Los otros dos orificios que no se muestran en la figura se encuentran situados a la misma distancia del eje central del bloque que los anteriores y en el plano que conteniendo a dicho eje es perpendicular al de la figura. Estos orificios son de sección única y el diámetro es el mismo que el diámetro menor de los tres que hay que considerar en los dos primeros. A través de estos orificios pasan dos tubos de acero inoxidable que se prolongan, por debajo, hasta la mitad de la segunda porción (j'') del sumidero, y por arriba, atraviesan la coraza y sobrepasan el nivel del agua del baño termostático. A través de uno de estos tubos pasan los cables que unen el nanovoltímetro con las termopilas (a'), conectadas entre sí en oposición, y a través del otro los cables que conectan la resistencia calefactora (a'') con la fuente de alimentación. Estos cables se embeben en el tubo de acero inoxidable con una aleación a base de bismuto de bajo punto de fusión (Small Parts, J-LMA-117). Los cables llegan desde los tubos hasta tanto las termopilas como la resistencia calefactora a través de surcos en la superficie inferior de la parte (j'') del sumidero y pequeños orificios a su través, que no se muestran en la figura.

Hemos llamado células de reacción y referencia (l) a unas estructuras relativamente complejas alojadas en la porción (j') del sumidero. El esquema de estas estructuras también se muestra, ampliado en la Figura 2-2. La reacción en estudio tiene lugar en un bulbo (l') de vidrio, de un volumen aproximado de $200 \mu\text{l}$, soplado al final de un tubo de muestra en espectroscopía de resonancia magnética nuclear de 4 mm de diámetro externo (l''). Por lo tanto hablaremos de bulbo de reacción al referirnos sólo al espacio físico donde ésta ocurre. La longitud total desde la parte inferior del bulbo hasta el borde superior del tubo es de aproximadamente 7 cm. Los 5 cm superiores del tubo se alojan en otro tubo de acero inoxidable (l''') que es el que hace contacto con la porción (j') del sumidero de calor y atraviesa la tapa de la coraza externa hacia el exterior. La fijación del tubo del vidrio con el acero inoxidable se realiza con una fina capa de cera. El bulbo se encuentra embebido, mediante la aleación de bismuto anteriormente reseñada, en una cápsula de cobre (m), de simetría cilíndrica, cuyo corte longitudinal se aprecia en la figura. En un pequeño surco (m') de la parte inferior de la cápsula de cobre se enrolla la resistencia calefactora a'' , construida por un cable de manganina (aleación de 84% de Cu, 12% de Mn y 4% de Ni) de 15 cm de longitud y 99 ohmios de resistencia (la variación del valor de la resistencia del cable de manganina con la temperatura es de sólo 0.02% cuando la temperatura varía 1°C). La

superficie inferior de la cápsula de cobre está en contacto térmico con la superficie superior de la termopila (Melcor FCO-6-66-05L) (a'); la superficie inferior de la termopila, a su vez, está en contacto térmico con la porción (j'') del sumidero de calor. La cápsula está fijada al sumidero por dos tornillos de nylon, que no se muestran en la figura, y el contacto térmico entre la termopila y la cápsula de un lado y el sumidero del otro lado se hace a través de una película de grasa térmica para eliminar focos de resistencia térmica del aire. Por lo tanto, y debido a la alta conductividad térmica de la termopila y del cobre de la cápsula, se puede considerar que todo el flujo de calor entre el bulbo de reacción y el sumidero ocurre a través de estos dos elementos.

El montaje del bloque calorimétrico es muy sencillo. En primer lugar, se colocan las dos células así como los tubos con el cableado del sistema en los orificios correspondientes de la porción (j') del sumidero. A continuación, con las termopilas colocadas adecuadamente sobre su superficie superior, se atornilla la parte (j'') a la (j'). Tras realizar las conexiones eléctricas necesarias, se atornilla todo a la superficie inferior de la tapa de la coraza y a continuación se completa el sumidero atornillando la porción (j'''), cuyo único objeto es aumentar la capacidad calorífica del mismo. Una vez completada esta operación la coraza externa (i) puede cerrarse. Hay que decir que en los contactos entre todas las superficies del sumidero se coloca grasa térmica. Para lograr una mayor claridad en el esquema no se muestran en el mismo los orificios y las posiciones relativas de los mismos para el atornillamiento de las diferentes partes. Tampoco se muestran las juntas tóricas en la rebaba de la coraza externa y en los separadores entre coraza y sumidero necesarias para mantener la estanqueidad en el interior del bloque calorimétrico.

Por último, en la superficie de la coraza externa, y concéntrica con la célula de reacción en la posición por la que la célula de reacción sobresale, se coloca una pieza de bronce (n) de simetría cilíndrica. El objeto de la misma es centrar el extremo de la jeringa desde la que se inyecta el agente valorante.

2.2.2 Sistema de Inyección y Agitación.

Una curva de valoración calorimétrica se obtiene mediante sucesivas inyecciones de volúmenes pequeños de uno de los reactivos, que se coloca en una jeringa, en la célula de reacción que contiene al otro reactivo. Para la mezcla de los dos reactivos, se agita el contenido de la célula mediante la misma aguja de inyección.

El esquema de la torre soporte para los sistemas de inyección y agitación se muestra en la Figura 2-3. La misma está constituida por cinco columnas (de las que en la figura aparecen sólo dos) atornilladas a la rebaba superior y la tapa del bloque en las posiciones relativas de cinco de los seis vértices de un hexágono regular, y tres niveles diferentes formados por láminas circulares de aluminio de 0.6 cm de espesor. En el nivel superior se fija un motor a pasos (Superior Electric, SLO-SYN) (a^{IV}) con el que se realiza la inyección del agente valorante. En el nivel intermedio se fijan un tornillo micrométrico (o) y el motor de agitación (a'''). En el nivel inferior se atornilla una lámina rectangular de aluminio (p) que contiene dos cojinetes: en uno de ellos se aloja el eje del motor de agitación que contiene una rueda dentada que engraza con la rueda dentada de la jeringa (q), que se coloca en el otro.

Tanto el motor a pasos como el motor de agitación se controlan desde el computador. El motor a pasos mueve el tornillo micrométrico (o) que a su vez empuja el émbolo de la jeringa (q). El motor de agitación hace girar a la rueda dentada que a su vez hace girar a la jeringa. La agitación en el bulbo de reacción se produce porque el extremo del tubo de vidrio a través del cual se realiza la inyección de agente valorante se encuentra ligeramente doblado.

Para una descripción más detallada de la jeringa se debe consultar de nuevo la Figura 2-2. La jeringa consta esencialmente de dos partes. Un tubo de bronce central (q'') que aloja a su vez el tubo de vidrio (q''') proveniente de una jeringa comercial (Unimetrics) de 250 μ l y una parte superior (q^{IV}), también de bronce que contiene la rueda dentada y que es la parte de la jeringa que se aloja en el cojinete. El extremo inferior del tubo central termina en una pieza de acero inoxidable (q^V) en la que se centra mediante dos pequeñas piezas de teflón un tubo de vidrio (q^{VI}) de 1.33 mm de diámetro externo y un volumen interno de aproximadamente 25 μ l. A través de este tubo de vidrio, ligeramente doblado por su extremo, se realiza la inyección. Tanto el tornillo micrométrico como la jeringa y su correspondiente tubo de inyección deben estar bien centrados y alineados con la célula de reacción. Este alineamiento centralización es un factor crítico en la minimización del calor de agitación y del mantenimiento de la estabilidad de la línea base durante el desarrollo de un experimento.

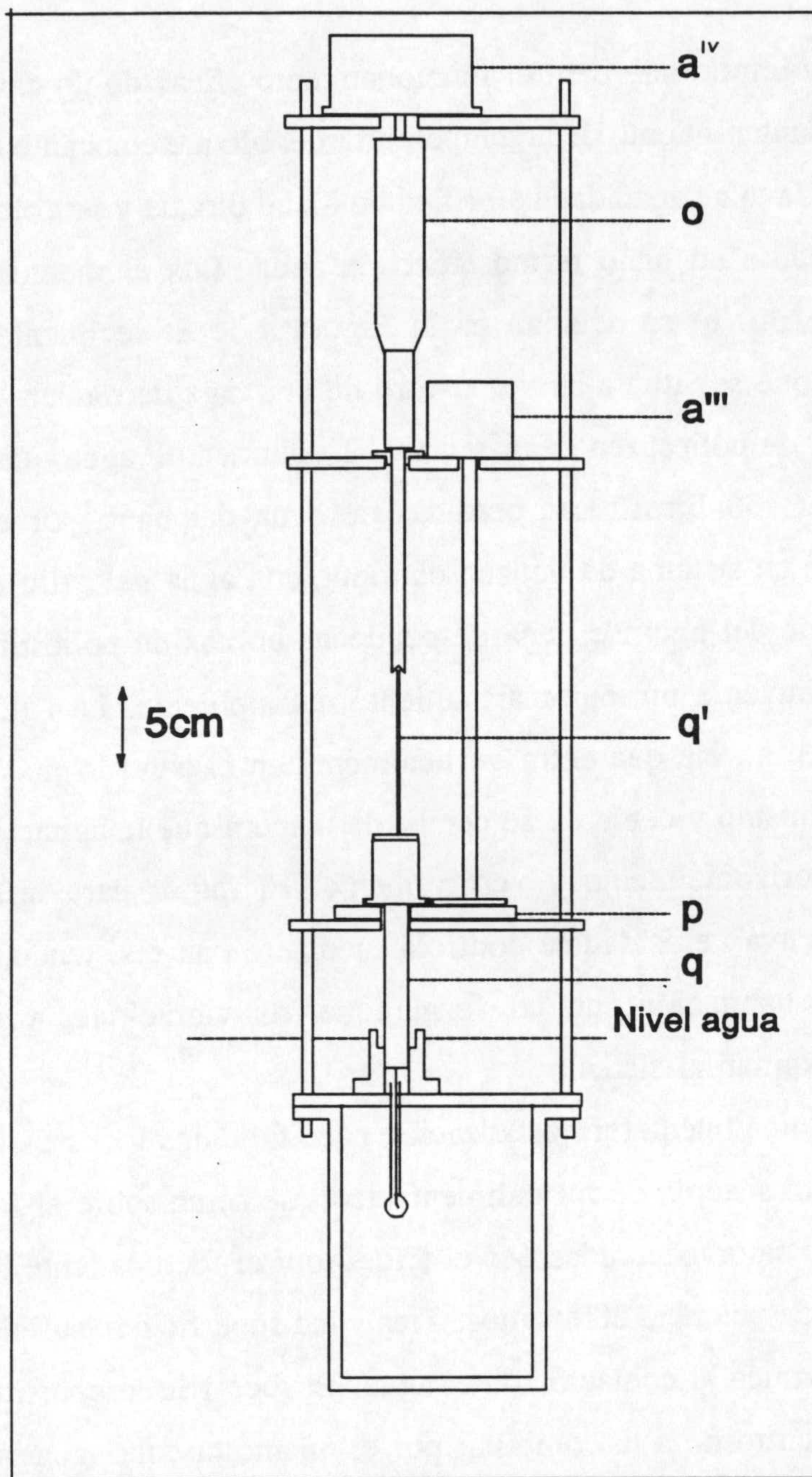


Figura 2-3: Esquema de la torre soporte para los sistemas de inyección de agente valorante y agitación en el bulbo de reacción. **a^{III}**) Motor de agitación; **a^{IV}**) Motor a paso de inyección; **o**) Micrómetro; **q**) Soporte de la jeringa. **q'**) Embolo de la jeringa. Para la descripción detallada, ver texto.

2.3 CONTROL DE LA TEMPERATURA DEL BAÑO.

Un factor muy importante para el funcionamiento eficaz de un calorímetro isotermo es la precisión en el mantenimiento de la temperatura del bloque constante. Esto se logra aquí de una parte gracias a la alta capacidad calorífica de dicho bloque y por otra parte a su buena termostatación mediante un baño termostático de agua. Los elementos de control de la temperatura de este baño (b) se detallan en la Figura 2-1. El recipiente del baño es una nevera de "camping" que se sitúa a su vez dentro de una caja de madera y queda separada de la misma por 3 cm de poliestireno expandido. El volumen de agua que contiene el baño es de aproximadamente 30 litros. Las pérdidas de agua del baño por evaporación están compensadas mediante un sistema de llenado continuo con agua del grifo (no se muestra en la figura). La superficie del agua se llena de pequeñas bolitas de poliestireno que flotando sobre la misma contribuyen a un mejor aislamiento del ambiente. La agitación se produce mediante dos hélices en un eje que entra verticalmente en el baño lo más cerca posible de la pared posterior del mismo y cerca de su centro de manera que la agitación tenga lugar en las dos direcciones; horizontalmente y verticalmente. El motor para la agitación (c) (de potencia 230 vatios), cuya velocidad se controla mediante una resistencia variable (c'), se fija a la pared de la habitación, de tal forma que las vibraciones producidas por su movimiento no se transmitan al sistema.

En general para una buena termostatación hace falta dos focos de temperatura; uno caliente y otro frío; y un sistema de retroalimentación que actúa sobre el foco caliente para corregir las pérdidas de calor generadas por el frío. Aquí el foco caliente lo constituye una bombilla eléctrica (d'') de potencia 200 vatios. Tiene una superficie lo suficiente grande para reducir la resistencia térmica al contacto con el agua. El foco frío lo constituye un serpentín de cobre (e') colocado en torno a la bombilla; por el mismo circula agua pretermostatizada desde otro baño (e), a una temperatura en torno a 1 grado por debajo de la que se desea para el baño principal. Como foco frío del segundo baño se utiliza agua corriente del grifo (e''). El sistema de retroalimentación consta de un controlador Tronac PTC-41 (d) que, mediante el termistor (d), va midiendo la temperatura del baño principal y mandando, en periodos de 1 s, pulsos eléctricos a través de la bombilla, de potencias proporcionales a las pérdidas de calor generadas por el foco frío.

En la traza C de la Figura 2-4 se puede observar el registro gráfico de las

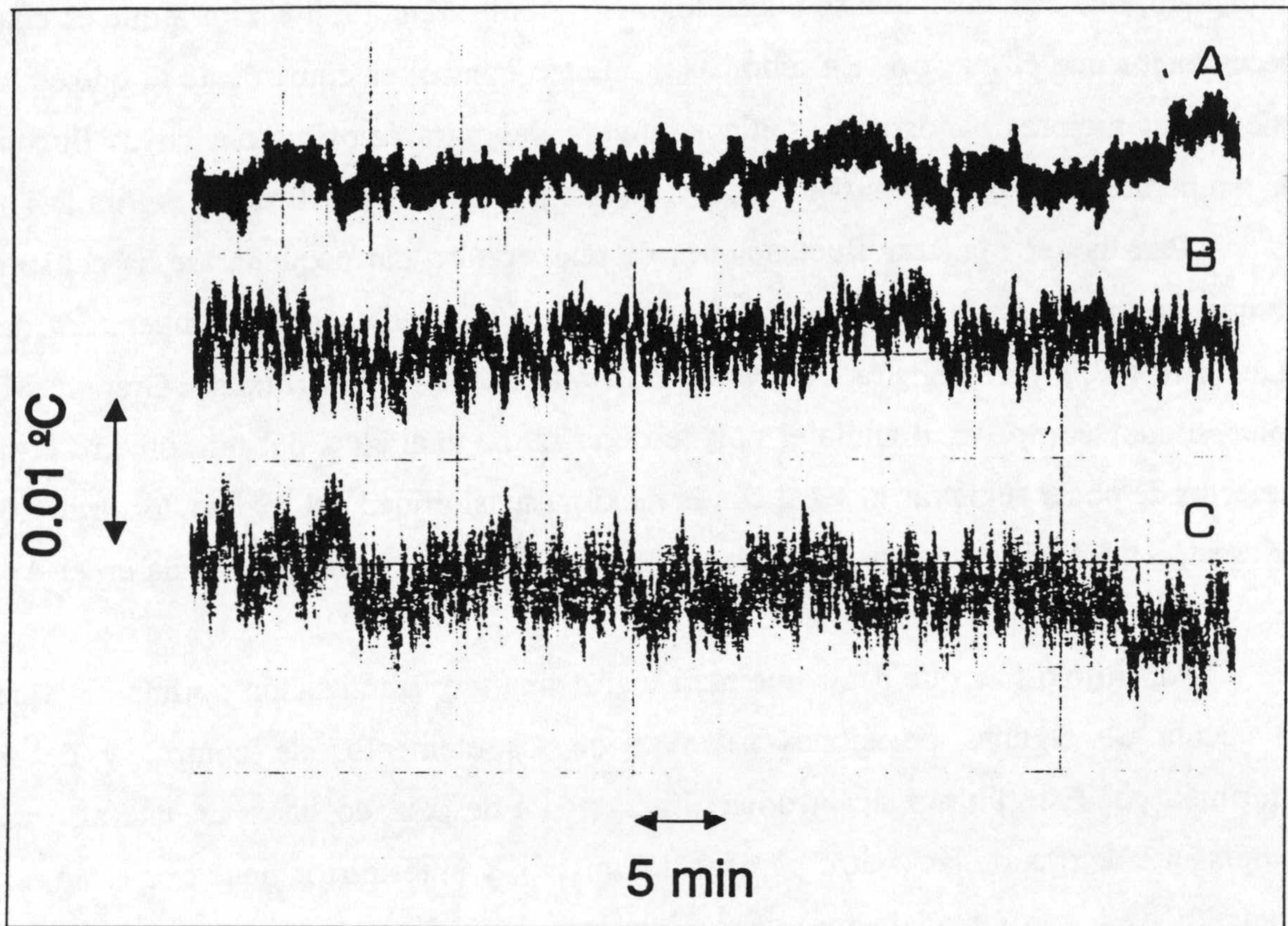


Figura 2-4: Registro de la temperatura del baño del calorímetro a 25°C (traza C). La traza B son las fluctuaciones de la temperatura del baño de un calorímetro LKB Bioactivity Monitor a 25°C . La traza A es la señal analógica de salida del termómetro utilizado en la medida cuando se cortocircuitaba su entrada. En todas las trazas se interpuso entre el termómetro y el registrador gráfico el compensador a una amplificación de 100 y un filtro de 0.47 s (para el compensador, ver Apéndice 1).

fluctuaciones de la temperatura del baño. Se ve como las mismas están en el orden de $\pm 1-2$ m°C. Este control está por debajo de las especificaciones dadas para el controlador por el fabricante, que establece que se puede lograr un control en la temperatura que es unas cinco veces mejor que el nuestro. En todo caso, nuestro control es equivalente al que se logra en uno de los mejores baños termostáticos comerciales para calorimetría, cuyas fluctuaciones de temperatura también hemos medido y mostramos en la traza B de la Figura 2-4.

Para poder registrar fluctuaciones de temperatura tan pequeñas se ha construido un compensador que se conecta entre el termómetro de medida de la temperatura del baño (Lauda R 42/2) y el registrador gráfico utilizado (LLOYD instruments Graphic 450). El compensador compensa o anula el voltaje de la salida analógica del termómetro (1mV/°C) a efectos de poder registrar la señal con la máxima sensibilidad del registrador gráfico (fondo de escala 1mV). El esquema del circuito electrónico del compensador se da en el Apéndice 1.

Por último hay que decir que para lograr una termostatización óptima hay que tener en cuenta de algunas posiciones relativas de los elementos de control y del bloque calorimétrico. Este último se introduce ligeramente desplazado hacia un lateral, quedando equidistante de tres de las cuatro paredes del mismo, y el termistor tiene que estar cerca del bloque (a 1 cm aproximadamente) para minimizar el gradiente de temperatura entre los dos, pero nunca debe tocarlo. La bombilla tiene que estar ligeramente por debajo del serpentín del foco frío.

2.4 SISTEMA DE DETECCIÓN DE LA SEÑAL DEL CALORIMETRO Y LINEA BASE.

Cuando hay evolución de calor en la célula de reacción, se genera una diferencia de temperatura ΔT con respecto a la del sumidero, y aparece por consiguiente un flujo de calor entre éste y la célula. Este flujo de calor, que permanece hasta que se establezca el equilibrio térmico entre las dos partes, se hace a través de la termopila de la célula de reacción que genera un pequeño voltaje proporcional a ΔT (efecto Seebeck). La célula de referencia está también en contacto térmico con el sumidero a través de otra termopila idéntica a la de la célula de reacción. Las dos termopilas están conectadas entre sí en oposición, de manera que, si suponemos que la temperatura del sumidero es uniforme en cada punto del mismo, el

voltaje diferencial global que se mide es una medida indirecta de la diferencia de temperatura entre las dos células. Este voltaje se recoge por un nonovoltímetro digital (Keithley 181).

Este último tiene un "damping" que combinado con el filtro permite optimizar la respuesta del instrumento, cinco rangos de medida para voltajes desde 10 nV hasta 1000 V, una salida analógica de -2 V hasta +2 V con amplificación, y un conector para el Bus IEEE-488 de comunicación con el ordenador. El nanovoltímetro está conectado a la salida diferencial de las dos termopilas vía un conector especial (Keithley 1506) de bajo efecto térmico, que permite minimizar los errores en la señal causadas por fuerzas electromotrices térmicas. También, con el mismo fin, las soldaduras entre el cable de entrada al nanovoltímetro y el cable de la salida de las termopilas se encuentran termostalizadas dentro del baño del calorímetro en un tubo de vidrio.

La señal a la salida analógica del nanovoltímetro se amplifica un millón de veces previamente a su recogida en el registro gráfico. En la Figura 2-5, las trazas B, C y D corresponden a tres líneas base del instrumento a tres temperaturas diferentes (15, 25 y 35°C). El valor de la escala del voltaje de la figura corresponde al voltaje medido sin amplificación por el nanovoltímetro. En una línea base se registra el voltaje frente al tiempo cuando no está ocurriendo ningún efecto calorífico en las dos células. Se puede observar en la figura como el ruido de las líneas base (≈ 10 nV pico a pico) es prácticamente el mismo que se especifica para el nanovoltímetro utilizado. Por otra parte estas líneas base se han registrado con diferencias de temperatura entre la habitación y el baño hasta 5°C, sin que ello parezca afectar a las mismas. Se ha seguido también la evolución de la línea base durante más tiempo de el de la Figura 2-5 sin que aparezca una importante deriva en la línea base; en el peor de los casos la estabilidad de la línea base es mejor de 5 nV/hora.

La traza F de la Figura 2-5 es la señal del calorímetro cuando se agita a 170 rpm el bulbo de reacción durante 45 s cada 12 min. Este tiempo de 45 s es el tiempo habitual de agitación en un experimento, en el que la inyección de agente valorante y la agitación se comienzan simultáneamente, durando la primera, si es de 10 μ l, unos 20 s. Se puede observar como del ruido de la traza no se pueden discernir los periodos de agitación. En el siguiente capítulo, volveremos sobre los calores de agitación.

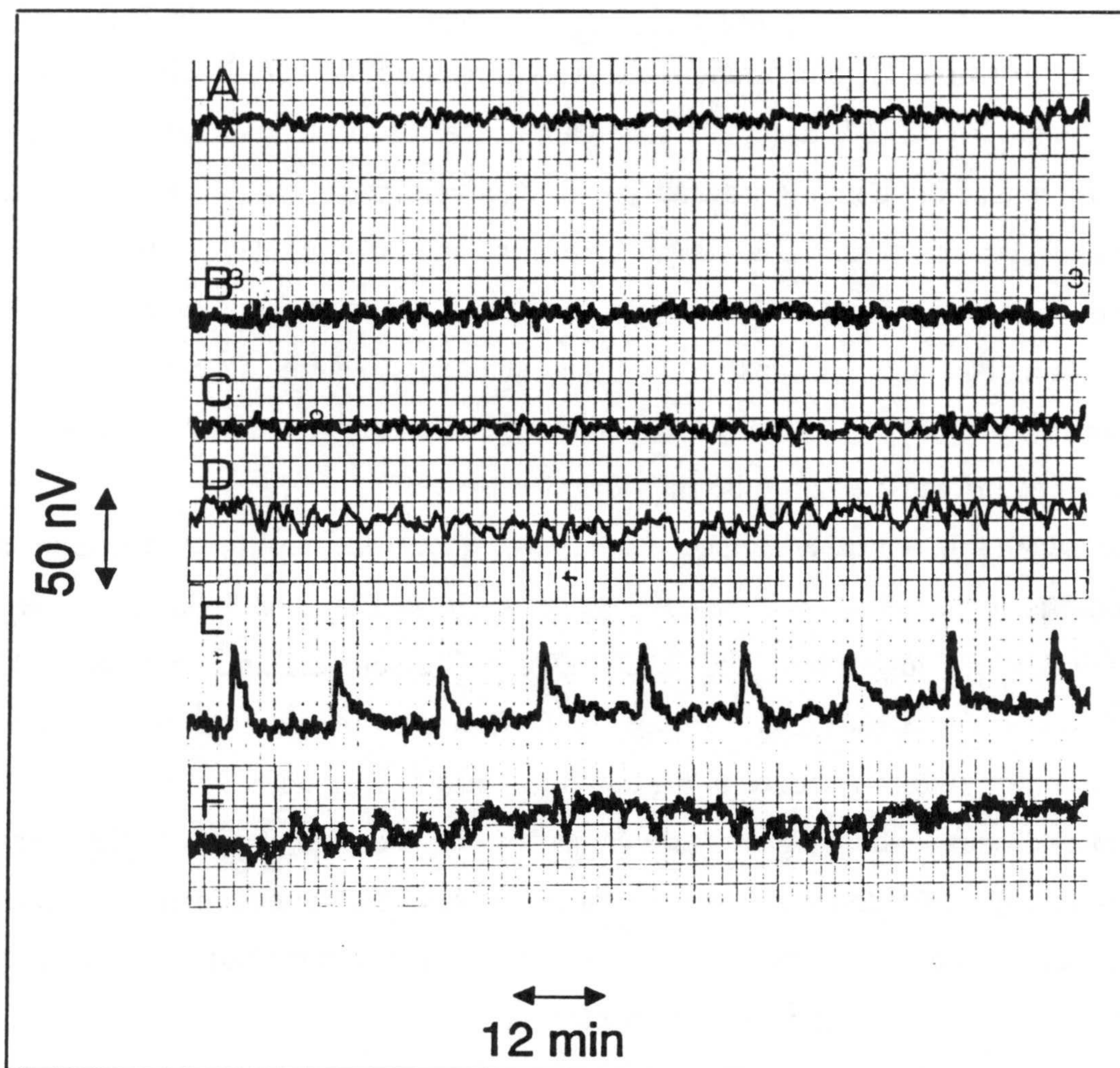


Figura 2-5: Registros de la señal del calorímetro. Las trazas B, C y D son líneas base del calorímetro a 15°C, 25°C y 35°C siendo las temperaturas de la habitación 17°C, 22°C y 30°C respectivamente. La traza E es la señal del calorímetro cuando cada 12 min se hacen pasar 100 μ A por la resistencia calefactora durante 10 s, es decir, cuando se suministran 2.5 μ cal a la célula de reacción. La traza F es la señal del calorímetro cuando se procede a agitar el agua del bulbo de reacción a 170 rpm durante 45 s cada 12 min. La traza A es la señal del nanovoltímetro utilizado cuando se cortocircuitaba su entrada por un conector especial (Keithley 1488) de bajo efecto térmico. Todas las trazas han sido tomadas con el filtro, "damping" y resolución del nanovoltímetro en posición activada.

2.5 SENSIBILIDAD.

La sensibilidad del calorímetro se relaciona con su capacidad de detectar con nitidez efectos térmicos por encima del ruido de su línea base. En la traza E de la Figura 2-5 se recogen las señales del calorímetro cuando a través de la resistencia calefactora de la célula de reacción se comunican a la misma calores de $2.5 \mu\text{cal}$ durante 10 s. Estos efectos térmicos son claramente discernibles del ruido de línea base. Si pensamos que picos con la mitad del area estarían en el límite de discernibilidad, podemos decir que nuestro calorímetro posee una sensibilidad de $1-2 \mu\text{cal}$. Dado que el volumen del bulbo de reacción es de unos $200 \mu\text{l}$, la sensibilidad específica (sensibilidad por unidad de volumen) del instrumento es del orden de $5 \mu\text{cal/ml}$. En una revisión de la bibliografía sobre calorímetros de valoración sólo hemos encontrado dos, los desarrollados por Brandts (Wiseman et al., 1989) y Freire et al.(1990), con una sensibilidad específica mejor que la del nuestro, debido al mayor volumen de sus células de reacción.

Por último, para cerrar este capítulo, merece la pena hacer una consideración sobre la construcción del calorímetro siguiendo el principio de células gemelas. De acuerdo con este principio, tanto la célula de reacción como de referencia se construyen de forma que sean prácticamente iguales. Los picos de la traza E de la Figura 2-5 corresponden a calores de $2.5 \mu\text{cal}$ suministrados a la célula de reacción y su altura es de unos 40-50 nV. Si suponemos que este calor se invierte en calentar los aproximadamente $200 \mu\text{l}$ de agua del bulbo de reacción, el mismo originaría un aumento de la temperatura del bulbo del orden de unos $10 \mu^\circ\text{C}$. Si hacemos la nueva aproximación de que los 40-50 nV de altura del pico corresponden a esos $10 \mu^\circ\text{C}$, podemos llegar a la conclusión de que el ruido de la línea base corresponde a fluctuaciones de la diferencia de temperatura entre ambas células del orden del microgrado. Es decir que se ha logrado una mejora de unas mil veces en el rango de las fluctuaciones de la temperatura del baño. Obviamente no toda esta mejora se debe a la construcción según el principio de células gemelas. Hay que pensar en primer lugar que el aislante que rodea la coraza amortigua en la misma las fluctuaciones de la temperatura del baño. Después, que la alta capacidad calorífica del sumidero de calor y el escaso contacto térmico entre éste y la coraza conduce a una nueva amortiguación de las fluctuaciones en el sumidero. Son estas fluctuaciones las que, al ser detectadas de forma equivalente por ambas

termopilas y estando éstas conectadas en oposición, quedan anuladas, debido precisamente a la identidad de las células de reacción y referencia.

3 Caracterización Operacional del Calorímetro.

En este capítulo vamos a describir el funcionamiento del calorímetro. Se hará una caracterización estática y dinámica de su respuesta a partir de la cual se determinaran los parámetros térmicos: la conductividad térmica y la capacidad calorífica del sistema. Se describirá una metodología de compensación eléctrica para la medida del calor que acorta sensiblemente el tiempo de medida. Se describirá también el proceso básico de mezcla de los reactivos en el calorímetro así como la determinación del volumen efectivo del bulbo de reacción. Dentro de lo que llamamos el funcionamiento del calorímetro, se evaluarán los calores de agitación y de inyección de disolvente en disolvente y se comprobará su funcionamiento mediante dilución de la sacarosa en agua. Por último, se describirá con el máximo detalle posible la realización de un experimento de valoración de una macromolécula con un ligando que ilustraremos con un ejemplo concreto.

3.1 METODO DE MEDIDA.

Nuestro calorímetro es un calorímetro isotérmo de conducción a través de termopila. En el mismo el calor fluye entre el bulbo de reacción y el sumidero de calor atravesando una termopila generandose un voltaje V . En el Capítulo 1 se ha descrito las ecuaciones básicas de conducción del calor en estos calorímetros:

$$\frac{dq}{dt} = -KV \quad (3.1)$$

y

$$q = -K \int_{t_1}^{t_2} V dt \quad (3.2)$$

que relacionan respectivamente la potencia calorífica (3.1) y el calor transmitido en un intervalo de tiempo t_2-t_1 (3.2) con la señal del calorímetro, el voltaje V , y la conductividad térmica K .

Para medir un efecto térmico hacemos uso de la Ecuación (3.2) y para ello es necesario conocer cuanto vale la conductividad térmica K del calorímetro. Además, el tiempo de integración t_2-t_1 se relaciona con la constante de tiempo del instrumento, que es el cociente entre la capacidad calorífica C del mismo y la conductividad térmica. A continuación vamos a determinar estos parámetros térmicos.

3.1.1 Determinación de Parámetros Térmicos.

En la parte A de la Figura 3-1 se observa la respuesta del calorímetro cuando a través de la resistencia calefactora (cuyo valor es de 99 ohmios) del bulbo de reacción se aplica una determinada intensidad de corriente durante un tiempo suficientemente largo. Se observa como el voltaje de la termopila alcanza un estado estacionario que corresponde a la situación en la que el flujo de calor a su través, desde el bulbo al sumidero, iguala a la potencia suministrada al bulbo mediante la resistencia calefactora. En este momento, el primer miembro de la Ecuación (3.1) viene dado precisamente por esta potencia por lo que el cociente entre la misma y el voltaje de la termopila constituye la conductividad térmica K a través de la termopila para nuestro sistema. Este mismo experimento se repitió para diferentes potencias desde 0.25 hasta 1600 μW y los resultados se recogen en la parte B de la Figura 3-1. En la misma se ha representado los logaritmos de los valores de potencia y voltaje debido a que se han abarcado varios ordenes de magnitud para la potencia aplicada y, consiguientemente, los voltajes medidos. En todos los casos el cociente entre ambas magnitudes fue el mismo y el valor determinado para K en esta serie de experimentos a 25°C fue $2.80 \pm 0.04 \text{ J s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ (0.04 es 1 error estándar). Este resultado confirma el cumplimiento de la ley de Newton del enfriamiento para nuestro calorímetro, al menos en el rango de potencias estudiado. Hay que tener en cuenta que este instrumento está pensado para la medida de calores correspondientes a potencias muy por debajo del límite superior utilizado

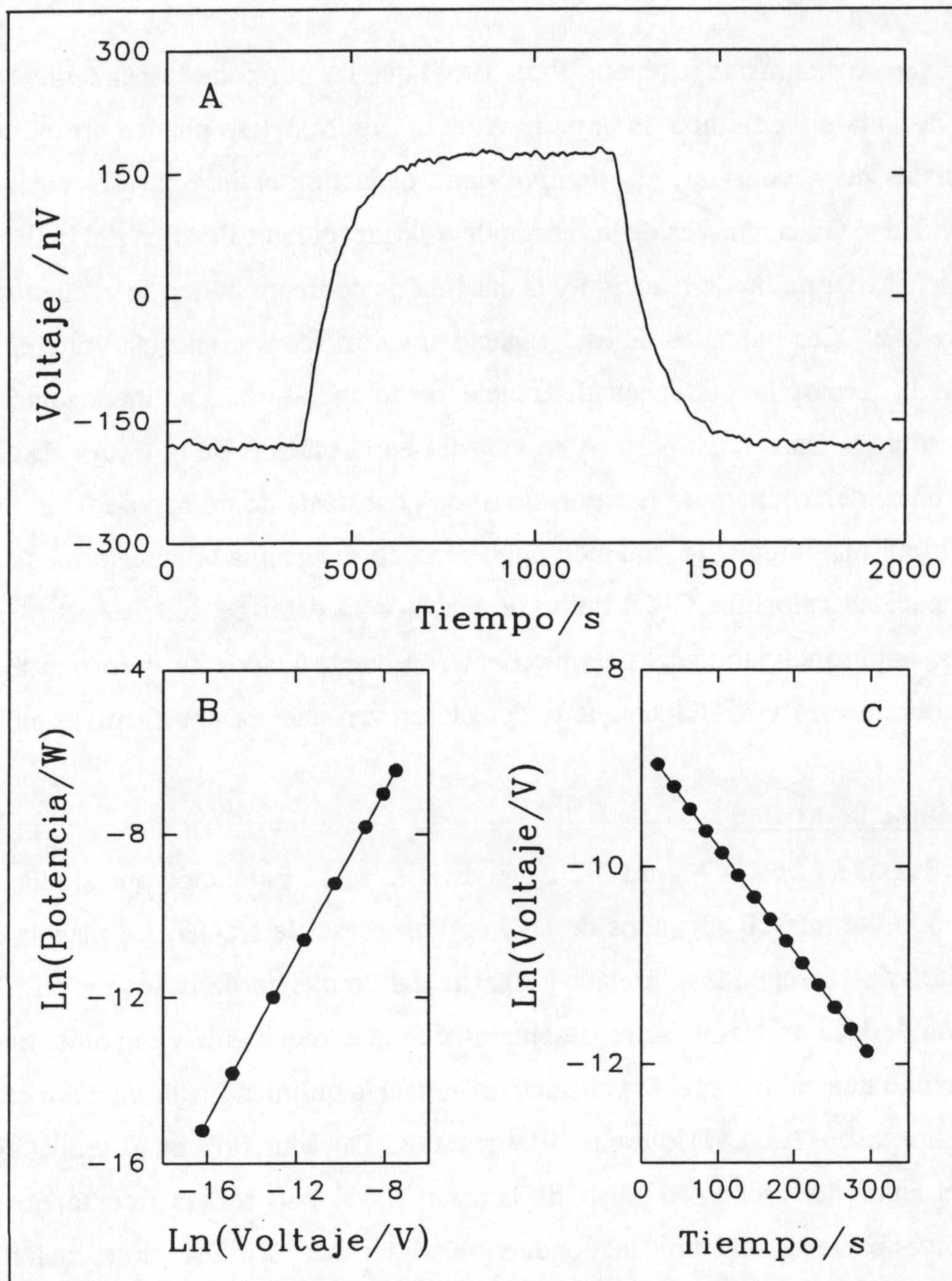


Figura 3-1: A. Respuesta del calorímetro a la aplicación de una potencia eléctrica de $1 \mu\text{W}$ a través de la resistencia calefactora (99 ohmios) del bulbo de reacción. La potencia se aplicó durante un tiempo lo suficientemente largo como para que alcanzase un valor estacionario para el voltaje. B. Resultados obtenidos para los voltajes de los estados estacionarios tras la aplicación de potencias entre 0.25 y $1600 \mu\text{W}$ a la resistencia calefactora del bulbo de reacción. C. Análisis de la porción descendente de la traza en A. Todos los experimentos descritos en la figura fueron realizados a 25°C .

en este experimento.

Se puede demostrar (Calvet y Prat, 1963) que las porciones ascendente y descendente de la curva voltaje vs. tiempo de la parte A de la Figura 3-1 se pueden aproximar mediante exponenciales cuya constante de tiempo viene dada por el inverso del cociente entre la conductividad térmica a través de la termopila y la capacidad calorífica del bulbo de reacción (estrictamente, del bulbo de reacción y la cápsula de cobre en la que se encuentra embebido, ver Figura 2-2). Las unidades de esta capacidad calorífica son energía/voltaje, en donde el voltaje de la termopila mide una diferencia de temperatura. La linearización del tramo descendente de la traza de la parte A se muestra en la parte C de la figura. De la pendiente de la misma se determina para el calorímetro una constante de tiempo de 94 s. Del producto de esta última magnitud y la conductividad térmica determinada anteriormente obtenemos para la capacidad calorífica C del bulbo de reacción el valor de 263 J V^{-1} .

Los anteriores parámetros térmicos fueron determinados de la misma forma a otras temperaturas entre 15 y 35°C , sin que se detectasen variaciones significativas en los mismos.

3.1.2 Método de Medida.

En la parte A de la Figura 3-2 se muestra la señal producida por el calorímetro tras una inyección durante 10 segundos de HCl en un exceso de NaOH. La mezcla de reacción se agitó durante 45 segundos, contados a partir del comienzo de la inyección. En la figura la inyección de HCl en NaOH se representa mediante el rectángulo de puntos, que simboliza la misma como una comunicación constante de potencia química (la altura del rectángulo, que sería en este caso $12.1 \mu\text{W}$) durante 10 segundos. De acuerdo con la Ecuación (3.2), la medida del calor del proceso a partir de la señal V vs. t se realiza integrando la misma y multiplicando el resultado por la conductividad térmica K . Esta integración la realiza numéricamente el programa que controla el experimento. Se observa en la gráfica que la diferencia de tiempo $t_2 - t_1$ para la integración es al menos de 10 minutos, teniendo en cuenta que es necesario poseer tramos de línea base antes y después de la señal como para poder extrapolar los mismos y obtener la línea base en la integración numérica. En general, en cualquier calorímetro de conducción a través de termopila, se conviene en que el tiempo de realización de una medida debe ser unas 7-8 veces la constante de tiempo del sistema, lo que en nuestro caso equivale a unos 12 minutos. En una valoración completa, en la que se

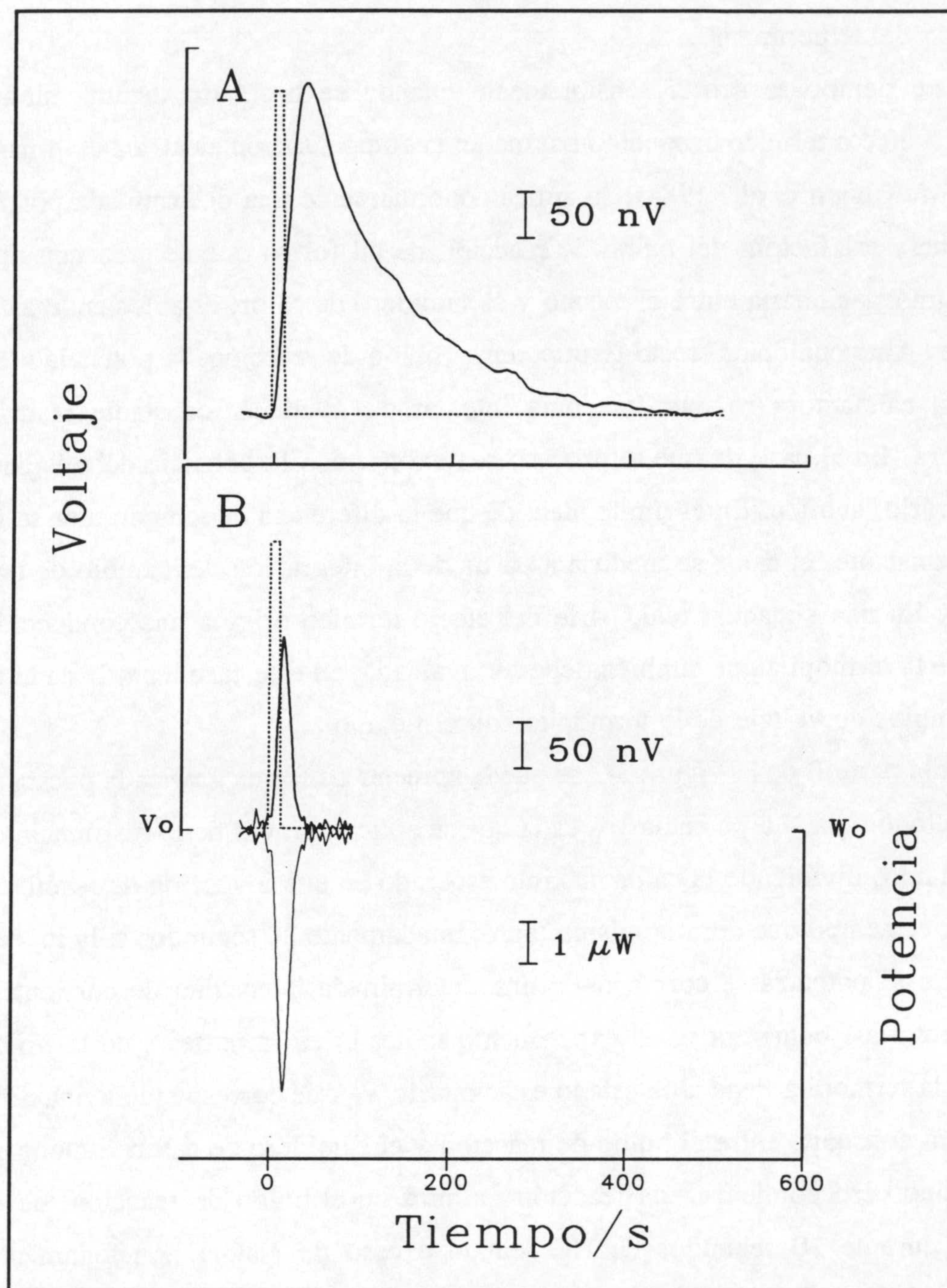


Figura 3-2: A. Respuesta del calorímetro a la aplicación de una potencia química (inyección de HCl en NaOH) en el bulbo de reacción de $12.1 \mu\text{W}$ durante 10 s. B. Respuesta del calorímetro a la aplicación de una potencia química de $13.2 \mu\text{W}$ durante 10 s y compensación eléctrica de la misma. El voltaje de las termopilas se mide de tal forma que a efectos exotérmicos en el bulbo de reacción le corresponden una variación en el voltaje hacia valores más positivos y vice versa. Los dos experimentos descritos en la figura fueron realizados a 25°C .

realizasen al menos 10 inyecciones de agente valorante se invertirían como 2-3 horas en la realización del experimento.

Este tiempo se acorta sensiblemente cuando se hace uso de una metodología de medida del efecto térmico producido basada en la compensación eléctrica del mismo. En este método (McKinnon et al., 1984), se aplica continuamente una determinada potencia, W_0 , a la resistencia calefactora del bulbo de reacción de tal forma que se crea una diferencia de temperatura estacionaria entre el mismo y el sumidero de calor, estableciendo así una nueva línea base. Ante cualquier efecto térmico en el bulbo de reacción, la potencia a través de la resistencia calefactora se modifica para intentar de mantener constante la diferencia de temperatura. En el caso de que el proceso sea exotérmico la potencia debe bajarse, y en el caso contrario, subirse. En el límite ideal de que la diferencia de temperatura se mantuviese siempre constante, el calor se mediría a partir de la integración del cambio de potencia con el tiempo. En una situación real, parte del efecto térmico origina una conducción de calor a través de la termopila que también debe ser evaluada, en este caso a partir de la integración de los cambios de voltaje de la termopila con el tiempo.

En la parte B de la Figura 3-2 se puede apreciar de forma gráfica la puesta en práctica de esta metodología. La potencia W_0 es la que se aplica a través de la resistencia calefactora y la calculamos dividiendo el calor máximo esperado en una inyección de reactivo valorante (q_{\max}) por el tiempo que dura la misma (aproximadamente 20 segundos si la inyección es de 10 μ l). A esta potencia le corresponde una determinada intensidad de corriente I_0 . De la misma forma que ocurriera en el experimento indicado en la parte A de la Figura 3-1, el voltaje de la termopila llega a un estado estacionario V_0 que corresponde a una diferencia de temperatura constante entre el bulbo de reacción y el sumidero de calor. Supongamos ahora que a tiempo cero comienza una reacción química en el bulbo de reacción, de nuevo una inyección durante 10 segundos de HCl en un exceso de NaOH. Análogamente a como hiciéramos en la parte A, esta reacción se simboliza en la parte B de la Figura 3-2 con un rectángulo punteado que representa la comunicación de una potencia química constante a la célula de reacción durante 10 segundos, con agitación de 45 segundos. En este caso, la potencia química fue de 13.2 μ W, valor muy próximo al utilizado en el experimento descrito en la parte A, por lo que si en el experimento descrito en la parte B no se aplicase la compensación eléctrica cabría esperar entonces que la traza V vs. t fuese muy similar a la

de la parte A. Sin embargo, en este caso el calor se mide aplicando la compensación eléctrica de la forma que se explica a continuación.

A partir del tiempo cero, el voltaje de la termopila se mide cada segundo, obteniéndose valores V para el mismo. Dependiendo de este valor de V , durante el segundo siguiente se modifica la intensidad a través de la resistencia calefactora de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$I = I_0 - (V - V_0)G \quad (3.3)$$

que nos indica que la corriente a través de la resistencia calefactora, I o la correspondiente potencia W , se modifica en una cantidad proporcional a lo que se separe de la línea base el voltaje medido, siendo G el factor de proporcionalidad. Este factor de proporcionalidad varía para cada valoración, dependiendo del calor máximo, q_{\max} , que se espere para una inyección, de acuerdo con la fórmula:

$$G = -150 (1 + \text{Log } q_{\max}), \quad q_{\max} \text{ en Julios} \quad (3.4)$$

El resultado de la aplicación de este modo de compensación eléctrica se aprecia en la parte B de la Figura 3-2. El calor se calcula ahora evaluando dos integrales; la de la señal $V - V_0$ vs. t que corresponde al calor no compensado y la de la señal $W - W_0$ vs. t que corresponde al calor compensado, y sumando ambos resultados.

$$q = -K \int (V - V_0) dt + \int (W - W_0) dt \quad (3.5)$$

El efecto más importante de la aplicación de esta metodología de compensación está en el acortamiento del tiempo de medida. Habiéndose aplicado prácticamente la misma potencia química durante el mismo tiempo en los experimentos de las partes A y B de la figura, se observa cómo en el caso B el tiempo necesario para medir el calor es casi diez veces menor. Ello permite acortar sensiblemente el tiempo invertido en una valoración calorimétrica completa. En la rutina habitual de operación del calorímetro se dedican 90 s a la realización de una medida y pasan 3 minutos desde el comienzo de una inyección de agente valorante en el bulbo de reacción hasta el comienzo de la siguiente. Por lo tanto, en una valoración con diez inyecciones se tarda unos 30 minutos.

El calor medido a partir de la traza V vs. t en el experimento de la parte B es 2.5

μcal , aproximadamente un 8% del calor total producido por la reacción química en estudio. En general, este método deja sin compensar entre el 5 y el 10% del efecto térmico total, sea cual sea la magnitud de éste.

Para terminar hay que decir que la metodología de compensación eléctrica se ha puesto a punto de una forma totalmente empírica. Tanto la determinación de la potencia inicial, W_0 , a partir del calor máximo esperado en una inyección, como la modificación de la intensidad de corriente a través de la resistencia calefactora de acuerdo con la Ecuación (3.3), o la evaluación del factor G de la Ecuación (3.3) mediante la fórmula (3.4), son los elementos del método de compensación a los que se ha llegado en un proceso de tanteo. No hemos encontrado alternativas que nos permitieran compensar eléctricamente más del 95% del efecto térmico sin que el sistema no realizase oscilaciones amortiguadas. Hay que decir que existen varias metodologías para la implementación del método de compensación. Hemos comprobado que sin en lugar de compensar mediante la Ecuación (3.3) utilizamos la siguiente ecuación: $RI^2 - RI_0^2 = G(V-V_0)$ para la compensación, es decir que la potencia de compensación es proporcional a la variación del voltaje, se puede demostrar, a partir de la formulación del balance calorífico total, que la señal vuelve a la línea base exponencialmente con una constante de tiempo igual a $C/(K+G)$. En este caso el calor compensado sería igual al área bajo la curva del voltaje multiplicada por el factor G . Si $G = 50$ por ejemplo, la constante de tiempo del calorímetro se reduce de 94 s, cuando se mide sin compensación, a 5 s al aplicar la metodología de compensación, y el calor compensado representaría el 94.7% del calor total.

3.1.3 Descripción del Programa de Control.

Todo el proceso de compensación eléctrica que acabamos de describir, así como la integración de las señales para obtener la magnitud del calor producido se realiza automáticamente mediante un computador Hewlett-Packard HP85 que controla el experimento.

Los aspectos esenciales del programa se muestran en el diagrama de flujo de la Figura 3-3. En primer lugar se introducen en el programa, entre otros, los valores para cuatro parámetros básicos del experimento, que son el volumen v de agente valorante, el calor máximo esperado q_{max} en una inyección, el tiempo t_M durante el cual se va a proceder a la

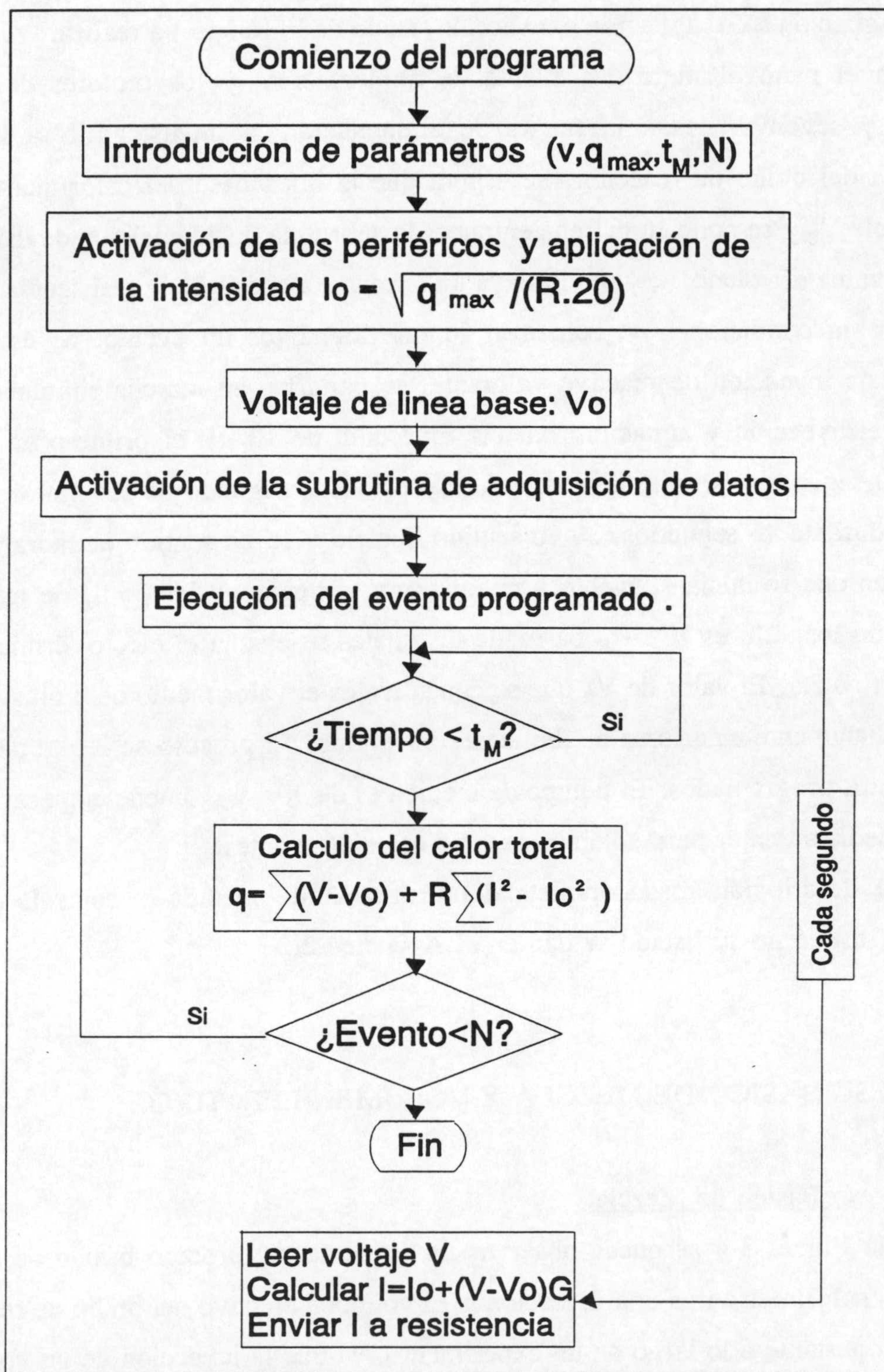


Figura 3-3: Aspectos esenciales del diagrama de flujo del programa de control del calorímetro.

medida del calor (que habitualmente, como ya se ha dicho, es de 90 s) y el número N de eventos (agitación sólo, agitación e inyección, ruido de línea base) a realizar. A continuación se activan el nanovoltímetro, la fuente de alimentación, y los motores de inyección y agitación y se envía desde la fuente de alimentación la intensidad I_0 a la resistencia calefactora del bulbo de reacción. Se espera que la línea base del calorímetro alcance un valor estable V_0 y se pone en marcha entonces la subrutina de adquisición de datos, que cada segundo evalúa el voltaje V, y modifica la intensidad I a través de la resistencia calefactora. Se está ya en condiciones de comenzar lo que llamamos un evento. Si éste fuera, por ejemplo, una inyección de reactivo valorante, se pondrían en marcha simultáneamente los motores de inyección y agitación: en una inyección de $10 \mu\text{l}$, el primero de los motores invierte 20 segundos; para este tiempo de inyección, al segundo de los motores se le hace funcionar durante 45 segundos, 30 en sentido horario y 15 en sentido antihorario. Desde el momento en que se inicia el evento y mientras no se llegue al tiempo t_M de medida se van almacenando los valores V e I a partir de los cuales se evalúa el efecto térmico cuando el tiempo t_M finaliza. El valor de V_0 que se considera es el valor medio del voltaje durante los 30 s inmediatamente anteriores al comienzo del evento. El proceso se repite para cada uno de los eventos programados. El tiempo de medida es de 90 s y se puede empezar el siguiente evento inmediatamente, pero solemos esperar otros 90 s antes.

Una descripción más completa del programa de medida y control, denominado MEDCAL, así como su listado se dan en el Apéndice 2.

3.2 PROCESO BASICO DE MEZCLA Y VOLUMEN EFECTIVO.

3.2.1 Proceso Básico de Mezcla.

En la Figura 3-4 se puede observar un esquema del proceso básico de mezcla que ocurre en el calorímetro tras una inyección i. El volumen efectivo del bulbo de reacción, V_e , permanece constante a lo largo de un experimento, ya que la inyección de un volumen v en el mismo implica la salida de un volumen equivalente. La suposición básica que se hace en el planteamiento de cualquier cálculo es que el volumen que sale del bulbo de reacción no participa en el proceso que se esté estudiando. Por ejemplo, si se estudia la reacción de una

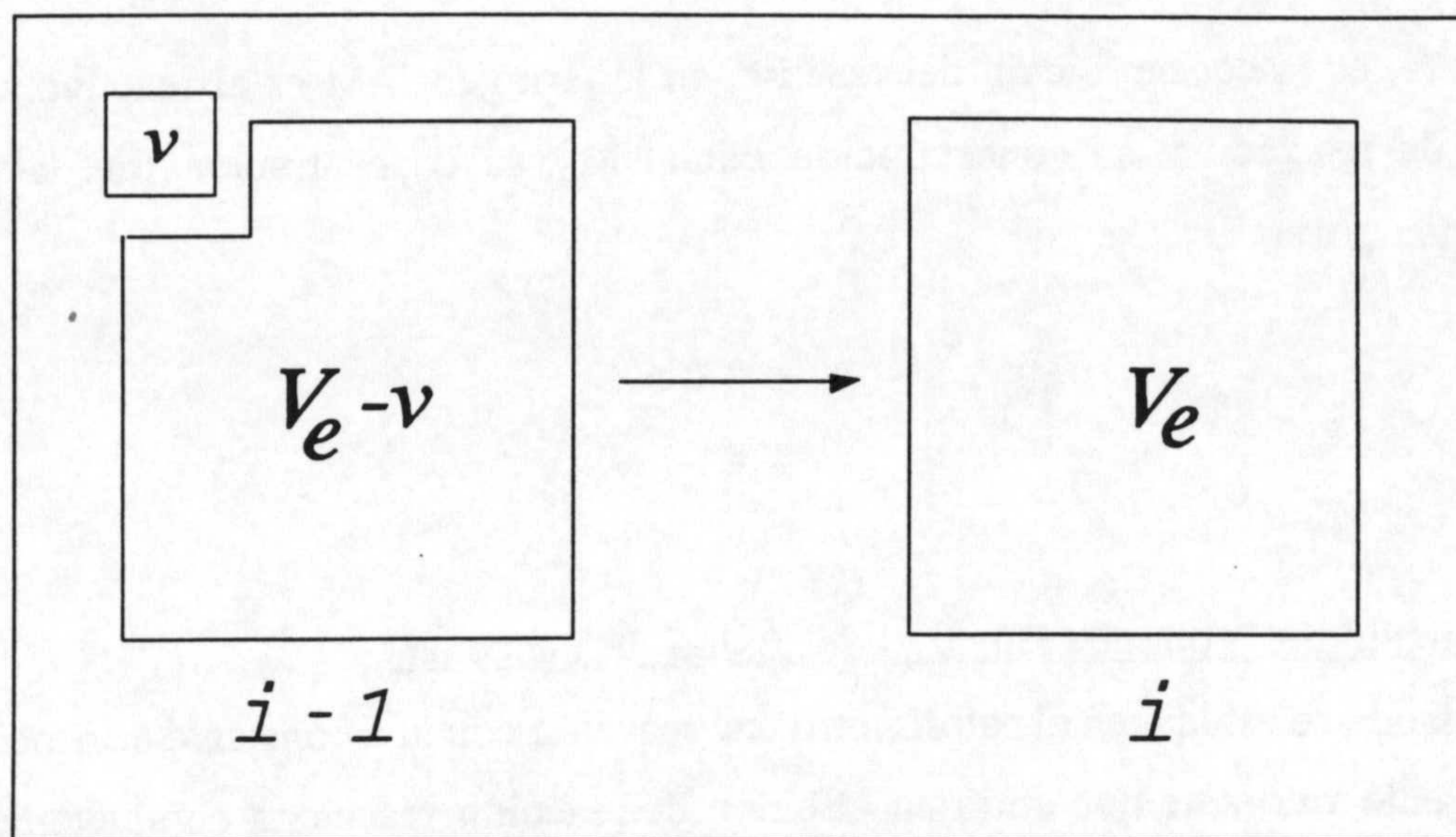


Figura 3-4: Proceso básico de mezcla tras la inyección i , V_e es el volumen efectivo del bulbo de reacción y v es el volumen inyectado desde la jeringa.

macromolécula con un ligando, en la inyección de un volumen v de disolución de ligando, la macromolécula que sale en el volumen v de la disolución ya existente en el bulbo lo hace sin reaccionar con el ligando que se inyecta. La validez de esta suposición se verifica por la concordancia con los resultados experimentales de las predicciones que se hacen, haciendo uso de la misma, para procesos conocidos (por ejemplo, el que veremos posteriormente de dilución de sacarosa en agua). Los volúmenes de inyección en cualquiera de los experimentos realizados no han superado nunca los $10 \mu\text{l}$, a una velocidad de flujo de $0.5 \mu\text{l/s}$.

A efectos de calcular las concentraciones de reactivos en el bulbo de reacción a lo largo de una valoración es útil definir el factor de dilución, D :

$$D = 1 - \frac{v}{V_e} \quad (3.6)$$

en donde v es el volumen que se inyecta en el calorímetro y V_e el volumen efectivo del bulbo de reacción. Si llamamos X al reactivo que se inyecta desde la jeringa su concentración en el bulbo de reacción tras la inyección i en una valoración vendrá dada por:

$$X_i = X_J(1-D^i) \quad (3.7)$$

en donde X_J es la concentración del reactivo en la jeringa. Si M es el reactivo a valorar en el bulbo de reacción y su concentración inicial M_0 , la concentración tras la inyección i vendrá dada por:

$$M_i = M_0 D^i \quad (3.8)$$

3.2.2 Cálculo del Volumen Efectivo del Bulbo de Reacción.

Cuando se estudia en el calorímetro una reacción con una constante de asociación alta, todo el agente valorante que entra en el bulbo de reacción reacciona completamente con el reactivo a valorar hasta que éste se consume completamente, es decir, hasta que se llega al punto de equivalencia. Una curva de valoración calorimétrica en este caso, en que se representase el calor medido para cada inyección, constará por tanto de un tramo horizontal seguido de una brusca caída a cero. Se puede demostrar que el cociente entre el calor medido en la inyección en que se alcanza el punto de equivalencia, q_k , y el calor medido en la inyección anterior, q_{k-1} , se relaciona con las concentraciones iniciales de reactivos y el factor de dilución mediante la ecuación:

$$\frac{q_k}{q_{k-1}} = \frac{(M_0 + X_J)D^{k-1} - X_J}{X_J\left(\frac{1}{D} - 1\right)} \quad (3.9)$$

Esta ecuación permite el cálculo del volumen efectivo de reacción si se conocen con precisión el primer miembro, el volumen v de inyección y la concentración del reactivo valorante en la jeringa y la concentración inicial del reactivo a valorar en el bulbo de reacción.

En la Figura 3-5 puede verse el resultado de un experimento de valoración de HCl con NaOH. De acuerdo con lo anterior, de este experimento se ha determinado un volumen efectivo del bulbo de reacción, V_e , de 203 μl . Del análisis de la propagación de errores en el experimento el error absoluto para este valor está en torno a los 4 μl .

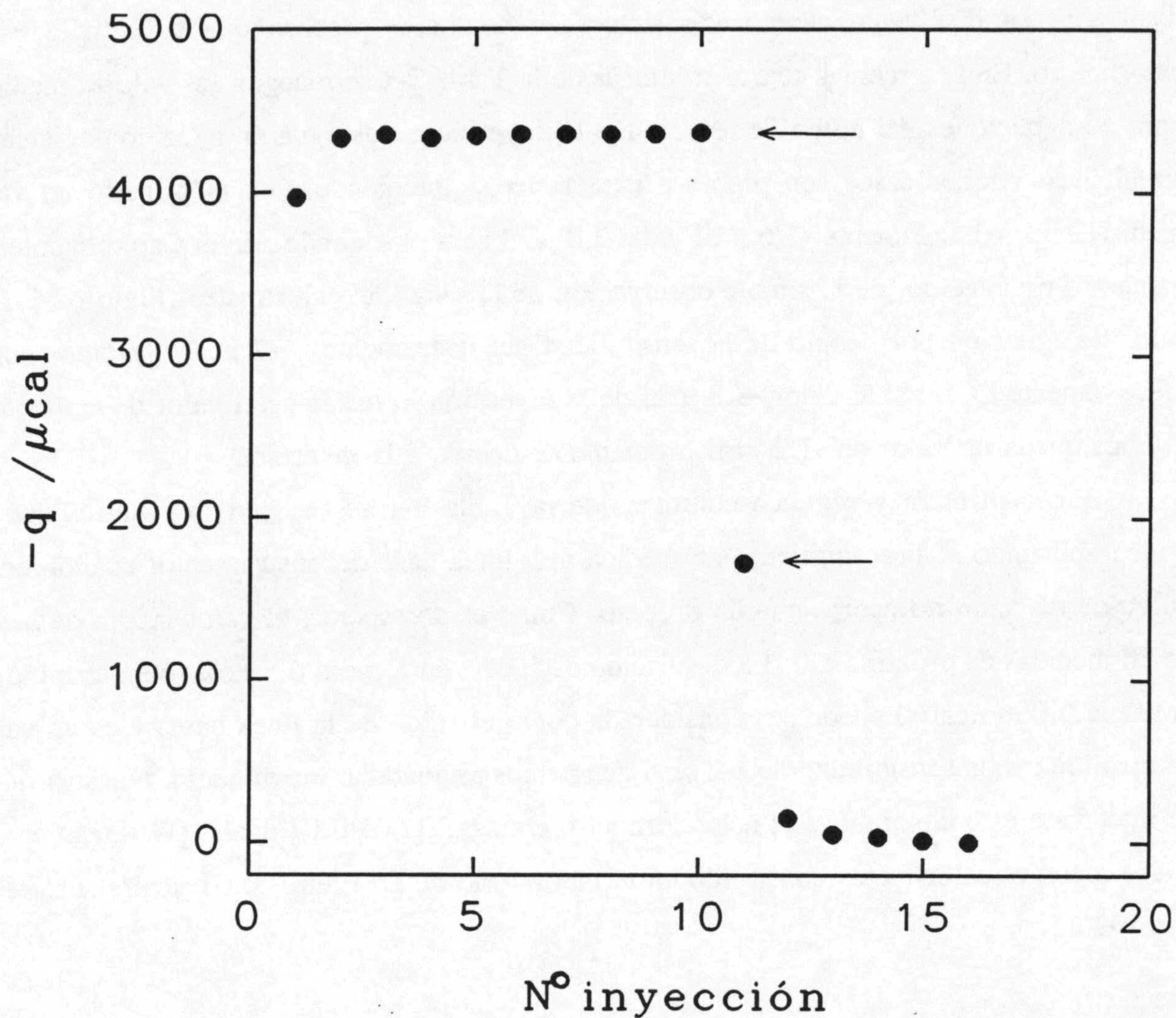


Figura 3-5: Valoración calorimétrica de HCl 0.0216 M con NaOH 0.0312 M a 15°C. El volumen de las inyecciones de NaOH fue de 10 μl y los calores representados están corregidos por el calor de dilución de NaOH. Para el cálculo del volumen efectivo del bulbo de reacción, según el texto, se utilizó el cociente entre los calores indicados con la flecha.

3.3 FUNCIONAMIENTO DEL CALORIMETRO.

3.3.1 Calores de Agitación, Inyección de Agua en Agua y Ruido de Línea Base.

Los calores producidos en la agitación del bulbo de reacción y la inyección de disolvente en disolvente acompañan siempre a cualquier proceso que se estudie en el calorímetro. En la tercera y cuarta columnas de la Tabla 3-1 se recogen los valores medidos para 10 agitaciones del bulbo de reacción y 10 inyecciones de agua en agua con agitación simultánea. Ambos casos son procesos exotérmicos, obteniéndose en el primero un valor medio de aproximadamente $-1.6 \mu\text{cal}$ y de $-2.8 \mu\text{cal}$ para el segundo. En el Capítulo anterior habíamos establecido, de la simple observación de la señal del calorímetro (Figura 2-5), un calor de agitación por debajo de la sensibilidad del instrumento, $1-2 \mu\text{cal}$, y vemos como efectivamente lo es. Si al valor $-2.8 \mu\text{cal}$ de la inyección le restamos el valor de agitación -1.6 nos queda un valor de $-1.2 \mu\text{cal}$ propiamente debido a la inyección.

En la primera y segunda columnas de la Tabla 3-1 se recogen los valores que se miden aplicando el procedimiento de medida a la línea base del instrumento, cuando en el bulbo de reacción no ocurre ningún proceso. Como es de esperar, el valor medio de series de 10 medidas es próximo a 0. La desviación estándar, en torno a $0.5 \mu\text{cal}$ (o en término de potencia $0.006 \mu\text{cal/s}$) puede ser considerada como el ruido de la línea base, y es un valor compatible con la sensibilidad de $1-2 \mu\text{cal}$ que hemos asignado al instrumento. Nuestro ruido de línea base es comparable a el del calorímetro Omega, $0.005-0.01 \mu\text{cal/s}$ (Wiseman et al., 1989) o con el calorímetro construido en el laboratorio de E. Freire, $0.01 \mu\text{cal/s}$ (Freire et al., 1990).

3.3.2 Dilución de la Sacarosa en Agua.

El estudio de la reacción de dilución de la sacarosa es uno de los modos convencionales de comprobación del funcionamiento de un calorímetro para la medida de calores en el orden de los μcal . En la Figura 3-6 se recogen los resultados de 3 experimentos de este tipo. En primer lugar se aprecia la reproducibilidad del instrumento. Además, se puede hacer la comparación de los calores medidos con los calculados a partir de la entalpía molar aparente relativa, ϕL_2 , para la sacarosa a 20°C de Gucker et al. (1940):

Tabla 3-1

Calores (μcal) de agitación y mezcla disolvente-disolvente.

	Línea base		Agitación ^b	Inyección ^a + Agitación ^b
	0.5	0.0	-2.4	-1.2
	1.1	1.3	-2	-3.2
	-0.5	-0.5	-0.9	-2.4
	0.1	-0.3	-0.4	-3.6
	0.6	-0.1	-1.9	-3.6
	-0.4	0.8	-1.5	-2.2
	1.1	-0.2	-2.4	-2.8
	-0.3	-0.1	-1.2	-2.2
	-1.5	0.4	-1.4	-3.1
	0.8	0.2	-2.1	-3.5
media	0.1	0.1	-1.6	-2.8
error estándar	0.8	0.5	0.7	0.8

Los calores que se reseñan en la primera columna fueron medidos sin aplicar la metodología de compensación eléctrica, durante un tiempo de 10 min. El resto de los calores se midieron durante 90 s, aplicando la metodología de compensación eléctrica, con una intensidad I_0 a través de la resistencia calefactora de 0.4595 mA. El signo negativo corresponde a un efecto exotérmico. Todas las medidas se realizaron a 25°C.

^a Inyección de 10 μl de agua en agua durante 20 s. ^b Agitación del bulbo de reacción durante 30 s en sentido horario y 15 s en sentido antihorario.

$$\phi L_2 = 128.9m - 6.917m^2, \text{ cal/mol} \quad (3.10)$$

donde m es la molalidad. Teniendo en cuenta que la expresión de Gucker se calcula de resultados con una dispersión en torno al 3%, la concordancia de nuestros valores con los suyos es excelente.

El cálculo de los valores esperados para los calores en las sucesivas inyecciones a partir de la entalpía molar aparente relativa se ha realizado de acuerdo con la Ecuación (1.10) formulada en el Capítulo de Introducción, y al tener en cuenta del proceso básico de mezcla de la Figura 3-4 aquella expresión de q_d queda como:

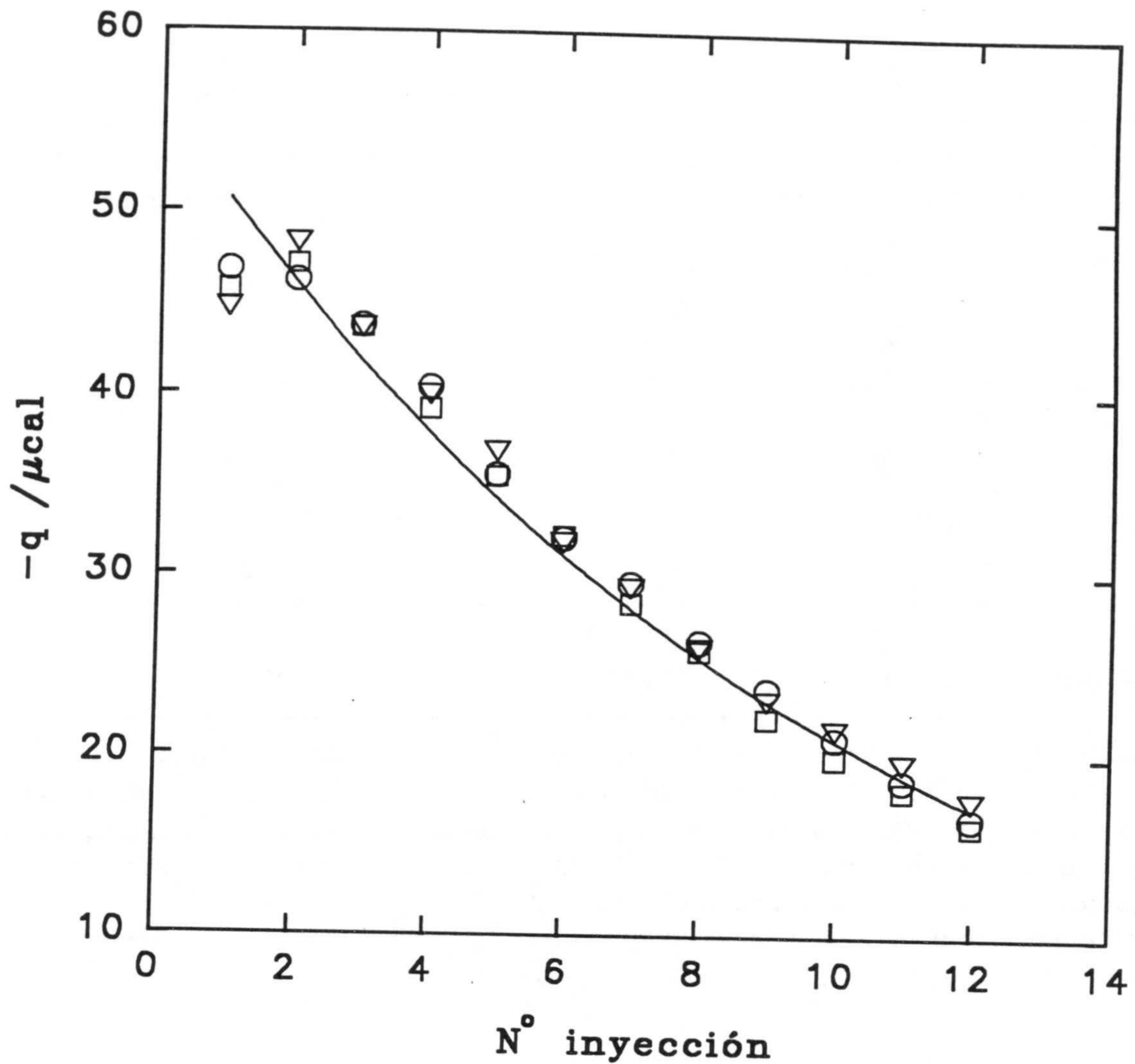


Figura 3-6: Dilución de sacarosa en agua a 20°C. Se recogen los calores medidos en tres experimentos en los que se realizaron sucesivas inyecciones de 10 μl de sacarosa 0.20 M en agua inicialmente pura. Las líneas unen puntos calculados para cada inyección a partir de datos de la bibliografía de Gucker et al. (1940).

$$q_i = \phi L_2(m_i)X_iV_e - [\phi L_2(m_{i-1})X_{i-1}(V_e - v) + \phi L_2(m_j)X_jv] \quad (3.11)$$

donde ϕL_2 es la entalpía del proceso de dilución infinita de la disolución de sacarosa desde la concentración que se especifique. X_i son las concentraciones molares de sacarosa en el bulbo de reacción, calculadas para cada inyección i a partir de la Ecuación (3.7) y X_j la de la sacarosa en la jeringa; a partir de ellas se obtienen las correspondientes molalidades para el cálculo de las ϕL_2 . Para esta conversión (molaridad-molalidad) se ha utilizado datos de la bibliografía (Handbook of Chemistry and Physics).

Por último, hay que hacer un comentario sobre los valores para la primera inyección por debajo de lo esperado, que se pueden observar en los experimentos de las Figuras 3-5 y 3-6. Ello se debe a la difusión de reactivo valorante del extremo del tubo de inyección durante el tiempo que dura el equilibrado del calorímetro, antes de comenzar la valoración. Comoquiera que durante la valoración sólo se tarda 3 minutos entre inyección e inyección, la difusión puede considerarse despreciable y el resto de los puntos de la valoración no se verán afectados por la misma. En los análisis de los experimentos no se tienen en cuenta los valores para la primera inyección.

3.3.3 Realización de un Experimento de Valoración Calorimétrica de una Proteína con un Ligando.

En esta sección se va a describir en detalle la realización de un experimento de valoración calorimétrica. Hay dos aspectos fundamentales a considerar: el primero es el procedimiento experimental para la obtención de los calores de reacción, y el segundo es el análisis de estos calores para la obtención de los parámetros termodinámicos de la reacción. Comoquiera que nuestro calorímetro está diseñado para procesos bioquímicos, se ilustrará su funcionamiento y el análisis de los datos con un ejemplo de una valoración de una proteína, la ribonucleasa A, con un ligando pequeño, 2' citidin monofosfato, 2'CMP.

Procedimiento experimental:

En esta parte vamos a ver las diferentes etapas por las cuales pasa cualquier experimento calorimétrico desde la selección de la temperatura del experimento, pasando por la preparación de los reactivos hasta la medida de los calores.

Selección de la temperatura. Los elementos de control de la temperatura del baño del calorímetro se muestran en la Figura 2-1 del Capítulo 2. Para subir la temperatura se actúa sobre el potenciómetro de control grueso del Tronac PTC-41 de manera que la bombilla quede encendida continuamente, lo que corresponde a la máxima potencia calefactora. Cuando la temperatura del baño alcanza el valor deseado se actúa primero sobre el control grueso y después sobre el fino, con pequeños reajustes hasta que la bombilla empieza a apagarse y encenderse, controlando ya la temperatura. Después se ajusta la temperatura del foco frío (el baño auxiliar), que antes estaba por debajo de la temperatura que se va a seleccionar, hasta que las pérdidas de calor generadas por el mismo dentro del baño del calorímetro estén oscilando aproximadamente entre el 20 y 50%. Al final, la temperatura del foco frío queda aproximadamente 1 grado por debajo de la del baño. Para bajar la temperatura del baño se siguen los mismos pasos sólo que ésta vez se actúa sobre los potenciómetros del PTC-41 para que se quede apagada la bombilla, y se enfría el baño bajando la temperatura del foco frío. La equilibración térmica del calorímetro puede tardar 24 horas. Debido a la aleación utilizada en la dos células del calorímetro, es importante saber que la temperatura máxima a la que se puede poner el calorímetro es aproximadamente 40°C.

Las diferencias de temperatura entre el calorímetro y la habitación donde se encuentra no son importantes mientras no se produzcan cambios bruscos en la segunda, que pueden afectar a la estabilidad del controlador PTC-41 como también a los aparatos digitales originando deriva en la línea base. Por esta razón hay que evitar dichas variaciones bruscas durante la marcha de un experimento de valoración calorimétrica. Entre la causas que pueden dar lugar a este tipo de variaciones el poner en marcha un ventilador o un calefactor en la habitación y también dejar la puerta de la habitación abierta después de que haya estado cerrada para tiempo largo o vice versa.

Preparación de los reactivos. Un punto importante en la preparación de los reactivos es la pureza de los mismos, que se puede comprobar por electroforésis, cromatografía, etc. El control del pH ha de realizarse teniendo una sustancia tamponante en el disolvente ya que si no es difícil mantener el mismo pH para los dos reactivos, antes o durante la valoración. Los dos reactivos, en nuestro caso la macromolécula y el ligando, tienen que prepararse en el mismo disolvente procurando que estén a la misma fuerza iónica y al mismo pH. Esto puede

llevarse a cabo dializando los dos reactivos frente al disolvente del experimento. Si el ligando es una pequeña molécula no se puede dializar, y hay que tener en cuenta que el pH del tampón del experimento en el que se disuelve puede variar sobre todo si el ligando tiene grupos ionizables con pK lejos del pH del tampón o si la fuerza iónica del tampón es muy baja, por lo cual siempre hay que comprobar el pH de la disolución del ligando y se ajusta si hace falta al mismo de la macromolécula. Se pueden aceptar diferencias de hasta 0.03 unidades de pH. Es conveniente usar tampones cuyo calor de ionización sea lo más bajo posible sobre todo si la reacción se acompaña por una absorción o liberación de protones, que se intercambian normalmente con el tampón si su capacidad tamponante es mayor que la de los reactivos mismos. Así los calores medidos serán íntegramente debidos a la interacción del ligando con la macromolécula, y al evitar las correcciones por el calor de ionización del tampón, serán más precisos. Hay que decir que es conveniente desgasificar los tampones, aunque no es crítico, para evitar la formación de burbujas de aire dentro de la célula del calorímetro que pueden afectar al ruido de la línea base. Todos los disolventes con que hemos trabajado han sido acuosos, pero no sabemos si los disolventes orgánicos pueden originar algún tipo de problemas.

Las concentraciones de la macromolécula y el ligando deben determinarse con precisión y sobre todo la del ligando (el reactivo que se coloca en la jeringa). En general, para una interacción macromolécula-ligando con n sitios independientes e idénticos los errores en la concentración de la macromolécula afectarán en el análisis fundamentalmente al valor del número de sitios n , mientras que los valores de la variación de entalpía de la reacción y de la constante de equilibrio dependen mucho de la precisión en la determinación de la concentración del ligando (ver siguiente capítulo). Para uniones moderadas o fuertes, la concentración del ligando tiene que ser aproximadamente entre 2.5 y 3 veces mayor que la de la macromolécula, para inyecciones de $10 \mu\text{l}$. Para uniones débiles esta relación puede ser más grande. Una concentración de sitios de la macromolécula usual es del orden de 0.2 mM que da calores del orden de $50 \mu\text{cal}$ para las primeras inyecciones en una reacción con una entalpía de -10 kcal/mol . En cualquier caso se puede utilizar el programa SIMCAL (Apendice 3) para simular los calores de la valoración que se va a realizar si se tiene una idea sobre los parámetros termodinámicos de la interacción. Las concentraciones a utilizar tienen que ser tales que los primeros calores medidos estén por encima de las $20 \mu\text{cal}$ para

obtener así más precisión en los datos. Si se está interesado en la determinación de la constante de equilibrio de la reacción, el producto de ésta con la concentración de los sitios de la macromolécula (reactivo colocado en la célula) tiene que estar comprendido entre 1 y 1000 (ver siguiente capítulo).

Con respecto a la preparación de las muestras, hay que decir que a veces si la densidad de la disolución del ligando es menor que la de la macromolécula, pueden haber fenómenos de convección de reactivos del tubo de la célula de reacción hacia el bulbo de la misma que no se tienen en cuenta en el proceso básico de mezcla de los reactivos y consiguientemente en el análisis de los datos. Este fenómeno puede ser más grave si se realiza las medidas sin compensación cuando el tiempo que transcurre entre inyección e inyección es más grande. La existencia de la convección puede notarse en los últimos calores de la valoración que tienden a ser cada vez más grandes en lugar de pequeños. Para evitar el problema se puede poner macromolécula con el ligando en exceso en la jeringa, o bien preparar el ligando más concentrado; por ejemplo 5 veces más concentrado que la macromolécula en lugar de 2.5 veces e inyectar 5 μl en lugar de 10 μl . Otra solución es de colocar la macromolécula en la jeringa y el ligando en la célula, pero respetando siempre la relación entre las concentraciones. Otro problema que puede ocurrir es la fuerte dependencia de los parámetros termodinámicos de la reacción con la concentración de la macromolécula que puede explicarse por una agregación de la misma. En este caso una determinación rigurosa de estos parámetros tiene que hacerse colocando la macromolécula en la jeringa también, con el ligando en exceso, a la misma concentración que la de la macromolécula en la célula de manera que su concentración no va a variar durante la valoración y los parámetros determinados serían válidos para una concentración específica, conocida, de la macromolécula.

Llenado de la célula del calorímetro. La célula puede llenarse completamente, con un volumen de 0.7 ml, o parcialmente con 0.5 ml. Cualquier reactivo que rebose a la hora de llenar la célula tiene que quitarse. Es importante llenar la célula desde el fondo y sin burbujas de aire. Aunque el bulbo de reacción, que es el espacio físico donde la misma ocurre, tiene un volumen de unos 200 μl se necesitan como mínimo 0.5 ml de disolución en la célula de reacción porque con ello se logra que la disolución de ligando en el tubo de inyección desde la jeringa se equilibre térmicamente con la disolución de macromolécula en el tubo de vidrio

de la célula de reacción por encima del bulbo de reacción. Además, se evita un excesivo ruido de la línea base como consecuencia de la exposición al aire de dicho tubo. Si el volumen es menor que 0.5 ml, se corre el riesgo de medir calores de inyección de disolvente en disolvente altos y no reproducibles. Siempre se puede reducir este riesgo inyectando menos volumen (menos de 10 μ l por ejemplo), pero en cualquier caso, hay que hacer previamente un blanco con disolvente en disolvente en donde los calores no deben pasar normalmente los 3 μ cal. Si se dispone justo del volumen necesario de la macromolécula se puede efectuar el llenado con una pipeta Gilson con una prolongación de un tubo de teflón en la punta.

Después de llenar la célula, hace falta esperar un cierto tiempo para la equilibración térmica del sistema. Este tiempo depende por supuesto de la diferencia entre la temperatura de la disolución que se introduce en la célula de reacción y la temperatura de trabajo del calorímetro. Procurando que ambas temperaturas sean similares (termostalizando la disolución en el baño mismo del calorímetro por ejemplo) el tiempo de equilibrado está entre los 30 y 45 minutos. Sin embargo si no se termostatiza antes la disolución este tiempo puede ser de hasta 4 horas. Esta pre-termostatización evita también la formación de burbujas de aire en la célula.

Colocación de la jeringa. Tanto el tubo de vidrio de la jeringa como la aguja tienen que estar limpias y secas antes de su utilización. Para llenar el tubo de vidrio se puede utilizar, cuidadosamente, una pipeta Pasteur. Hay que procurar que no se queden burbujas de aire dentro y que no rebose (la superficie del mismo tiene que quedarse seca). Se coloca el tubo de vidrio en el tubo soporte de la jeringa y se fija con el tapón. Se llena la aguja con el ligando empujando suavemente el émbolo y se deja salir una gota más o menos. Es importante dejar después la jeringa en posición vertical, durante un momento, para comprobar que no se está escapando el ligando por el boquete de la aguja. En caso contrario hay que sacar el tubo de vidrio del tubo soporte, secar las superficies de contacto entre ambos y volver a colocarlo. Durante este proceso hay que procurar que el émbolo se quede bien vertical, centrado con la jeringa, ya que sino, durante la agitación o la inyección, el baile del émbolo puede dar lugar a calores no deseables e incluso puede aparecer una deriva de línea base durante el desarrollo del experimento. La colocación de la jeringa en el calorímetro y la introducción de la aguja dentro de la célula de reacción tiene que hacerse

con suavidad y en posición vertical procurando que no roze demasiado la aguja con las paredes internas de la célula. Hay comprobar después que la jeringa gire con facilidad, y en caso contrario se saca y se puede poner un poco de grasa de silicona en los dos contactos entre el mismo y el calorímetro. Después de la colocación de la jeringa en el calorímetro 20 min son suficientes para la equilibración térmica.

Control automático del experimento. Una vez colocada la jeringa, y sin esperar para la equilibración térmica, se enciende el ordenador HP-85 con la cinta que contiene el programa de control y medida MEDCAL puesta en su sitio. El programa se carga de esta manera automáticamente. Se introducen los parámetros necesarios: medir con compensación o sin compensación, el número de eventos (inyecciones, agitaciones y ruido de línea base) a realizar, el volumen a inyectar por cada inyección, el máximo calor esperado para una inyección, el tiempo de medida por evento y el tiempo de agitación). Para más detalle sobre el programa se puede consultar el Apéndice 2. Una vez establecida la intensidad base I_0 (en caso de que las medidas se van a efectuar con compensación), 15 min son suficientes para la creación de la nueva línea base. La evolución del voltaje tiene que seguirse en el registrador gráfico para comprobar la estabilidad de la misma. Hay que procurar mandar esta intensidad base lo más pronto posible después de la colocación de la jeringa para no tener que esperar separadamente a las dos equilibraciones térmicas; la de la colocación de la jeringa y la debida al establecimiento de la intensidad base. Si se espera mucho tiempo se corre el peligro de medir los calores de más de una de las primeras inyecciones incorrectamente a causa de la difusión entre los dos reactivos.

Una vez estabilizada la línea base (normalmente 20 min después de colocar la jeringa), se inicia el experimento y el sistema realiza entonces primero las sucesivas inyecciones programadas del ligando en la macromolécula. Como ya se ha dicho anteriormente, se suele realizar una inyección cada 3 minutos. El tiempo invertido en una inyección de $10 \mu\text{l}$ es de 20 segundos. Simultáneamente al comienzo de la inyección se inicia la agitación de la mezcla reaccionante en el bulbo de reacción, mediante el giro a 170 rpm de la punta ligeramente doblada del tubo de vidrio a través del cual se realiza la inyección desde la jeringa. A medida que se van realizando los diferentes eventos programados se van imprimiendo los calores correspondientes a cada uno. Cuando acabe la valoración, el sistema realiza las agitaciones, y finalmente las evaluaciones del ruido de línea base si éstas han sido

programadas puesto que no son necesarias, terminando así el experimento. Un experimento estándar de 15 inyecciones y 5 agitaciones dura aproximadamente 1 hora.

Cuando acabe el experimento, se saca la jeringa y se lavan bien con agua desionizada tanto la célula de reacción como el tubo de vidrio de la jeringa y la aguja. Es importante lavar la aguja inmediatamente para evitar que se obture con las sales del tampón. Si se va a hacer otro experimento el mismo día, es preferible lavar la célula de reacción con agua termostatzada en el baño para una equilibración térmica rápida del calorímetro. Por último hay que decir que la célula de reacción se deja llena con agua desionizada y tapada. La célula de referencia está normalmente siempre llena con agua desionizada que se mantiene de un experimento a otro.

Correcciones. Los calores totales medidos en la valoración de la macromolécula con el ligando necesitan algunas correcciones para obtener los que son debidos exclusivamente a la interacción entre las dos moléculas, que son los calores de reacción. En primer lugar hay que restar a todos los calores medidos el calor medio de agitación, que se mide al final de las inyecciones del mismo experimento, y cuyo valor absoluto no suele pasar las 2 μcal . En segundo lugar hay que restar también el calor medio propio de inyección de tampón en tampón, que no suele ser grande y equivalente al de inyección de agua en agua, que no suele pasar tampoco las 2 μcal . Este calor tiene que determinarse por supuesto en otro experimento, preferentemente antes del experimento con la macromolécula y el ligando ya que así se comprueba el buen funcionamiento del calorímetro y además se ahorra tiempo, puesto que no es necesario lavar la célula después del experimento de tampón en tampón y consiguientemente se esperará menos tiempo para la equilibración del calorímetro. En este experimento también hay que medir el calor de agitación y restarlo del calor total para obtener el calor propio de inyección de tampón en tampón.

En tercer lugar hay que restar el calor de dilución del ligando que se determina también en un experimento independiente, inyectando ligando en tampón. Aquí hay dos situaciones posibles. Si los calores son pequeños, no pasan las 2 μcal , o indistinguibles del calor de inyección de tampón en tampón, se resta a todos los calores el mismo valor promedio. En este caso se puede prescindir del experimento de inyección de tampón en tampón y la corrección global de los calores de reacción consiste en restar solamente el calor de agitación y de dilución del ligando. Sin embargo si el calor de dilución del ligando es

significativo frente al calor de reacción, la corrección del mismo no es constante para cada inyección y se tiene que analizar los calores de dilución del ligando para determinar la dependencia de la entalpía molar relativa aparente del ligando (ϕL_2) con la concentración. Este análisis se hace con el programa ANALCAL (Apéndice 4). Obviamente para obtener la expresión de ϕL_2 hay que sustraer previamente de los calores de dilución los de agitación y de inyección de tampón en tampón, cuyos valores se pedirán por el programa a la hora del análisis. Una vez determinada la expresión de ϕL_2 , la corrección de los calores totales de la valoración mediante sustracción de los calores de dilución se hará con el mismo programa ANALCAL, durante el procedimiento del ajuste de los datos para obtener los parámetros termodinámicos de la reacción. Como ejemplo de la aplicación de este tipo de corrección, se puede ver la interacción de la β -tripsina con el inhibidor STI (siguiente Capítulo).

En relación a los calores de dilución de la proteína (reactivo colocado en la célula) no hemos detectado hasta el momento que sean significativos debido a la pequeña dilución de la misma.

Análisis:

Desde un punto de vista general, el análisis de los datos calorimétricos para la obtención de los parámetros termodinámicos de una reacción se ha descrito en la Introducción y aquí vamos a ver, en el caso particular de nuestro calorímetro, la aplicación de este análisis formulando la expresión del calor q_i medido a cada inyección. De acuerdo con el proceso básico de mezcla de los reactivos en nuestro calorímetro, en un experimento de valoración calorimétrica se van midiendo los calores producidos en las sucesivas adiciones de un volumen v de disolución de ligando X desde la jeringa a un volumen $V_e - v$ de disolución de macromolécula M en el bulbo de reacción, teniendo en cuenta que cada volumen v añadido desplaza un volumen equivalente de la disolución del bulbo de reacción, de manera que el volumen de reacción V_e queda constante durante la valoración. El calor medido a cada inyección i está dado por la diferencia en la entalpía del sistema entre el estado final y los estados iniciales de los dos reactivos (ver Introducción). Esta entalpía está definida con respecto a un estado de referencia que consideramos, por simplicidad, el de la macromolécula sin ligando unido.

En la realización de un experimento de valoración, podemos considerar dos tipos de

situaciones: a) La célula contiene inicialmente sólo la macromolécula a una concentración M_0 , y la jeringa, además de ligando de concentración X_J contiene macromolécula a una concentración M_J ; b) Cuando la jeringa contiene sólo ligando. El caso a es conveniente bien cuando la reacción está asociada a fenómenos de agregación-disociación de la macromolécula, no inducidos por la unión del ligando, y uno le interesa mantener la concentración de la macromolécula en la célula constante poniendo macromolécula también en la jeringa a una concentración igual que la inicial en la célula ($M_J = M_0$) o bien para aumentar la densidad del reactivo de la jeringa con respecto al de la célula con el fin de evitar posibles convecciones de los reactivos del tubo de la célula de reacción hacia el bulbo de la misma.

En el primer caso a, el calor de reacción q_i en una inyección i vendrá dado por la Ecuación (1.12):

$$q_i = n_M^C \Delta H_u^C - (n_M^A \Delta H_u^A + n_M^B \Delta H_u^B) \quad (3.12)$$

En una inyección i , teniendo en cuenta del proceso básico de mezcla ($A \equiv V_e - v$; $B \equiv v$; $C \equiv V_e$), la expresión anterior se transforma en:

$$q_i = \Delta H_{u,i} M_{t,i} V_e - (\Delta H_{u,i-1} M_{t,i-1} (V_e - v) + \Delta H_{u,J} M_{t,J} v) \quad (3.13)$$

en donde $M_{t,i}$ es la concentración total de macromolécula en el bulbo de reacción a la inyección i , ΔH_u es la entalpía de unión por mol de macromolécula y $\Delta H_{u,J}$ es el valor de la misma en la disolución de la jeringa que es constante y no varía a lo largo de la valoración. Este término se hace cero en el caso b cuando la jeringa no contiene macromolécula, y la expresión anterior de q_i se reduce a:

$$q_i = \Delta H_{u,i} M_{t,i} V_e - \Delta H_{u,i-1} M_{t,i-1} (V_e - v) \quad (3.14)$$

En el caso general de n sitios, la entalpía molar de unión en función del polinomio de unión P se ha definido en la Ecuación (1.31) de la Introducción:

$$\Delta H_{u,i} = -R \left[\frac{\partial \ln P_i}{\partial 1/T} \right]_{x,p} \quad (3.15)$$

Cuando los n sitios de la macromolécula son independientes e idénticos con constantes de afinidad k , como es el caso de los sistemas estudiados en esta Tesis, el polinomio de

unión se puede expresar como:

$$P_i = (1+kx_i)^n \quad (3.16)$$

en donde x_i es la concentración de ligando libre en el bulbo de reacción tras la inyección i . Sustituyendo la ecuación anterior en (3.15) nos queda:

$$\Delta H_{u,i} = n\Delta H \frac{kx_i}{1+kx_i} \quad (3.17)$$

donde ΔH es la variación de entalpía en la reacción por mol de ligando unido. Sustituyendo (3.17) en (3.13) nos queda:

$$q_i = \frac{n\Delta H k x_i}{1+kx_i} M_{t,i} V_e - \left[\frac{n\Delta H k x_{i-1}}{1+kx_{i-1}} M_{t,i-1} (V_e - v) + \frac{n\Delta H k x_J}{1+kx_J} M_{t,J} v \right] \quad (3.18)$$

x_J es la concentración de ligando libre en la jeringa. Tanto x_J como x_i pueden determinarse a partir de las concentraciones totales de macromolécula M_t y ligando X_t a partir del balance de masas:

$$x = X_t - X_u = X_t - \bar{X} \cdot M_t \quad (3.19)$$

donde X_u es la concentración de ligando unido y \bar{X} el parámetro de unión. En el caso de n sitios independientes e idénticos, \bar{X} se da por la Ecuación (1.39):

$$\bar{X} = \frac{nkx}{1+kx} \quad (3.20)$$

y por lo tanto si sustituimos esta ecuación en (3.19), nos queda una ecuación de segundo grado en x cuya solución analítica es:

$$x = \frac{-(nkM_t - kX_t + 1) + \sqrt{(nkM_t - kX_t + 1)^2 + 4kX_t}}{2k} \quad (3.21)$$

Las concentraciones totales de la macromolécula y el ligando en el bulbo de reacción tras una inyección i están descritas por el proceso básico de mezcla:

$$M_{t,i} = M_0 D^i + M_J(1-D^i) \quad \text{y} \quad X_{t,i} = X_J(1-D^i) \quad (3.22)$$

Por lo tanto, los datos experimentales de una valoración, q_i , se ajustan usando la Ecuación (3.18) en conjunción con las Ecuaciones (3.21) y (3.22). Los parámetros ajustables son la constante de equilibrio k , la variación de entalpía de reacción ΔH y el número de sitios n , siendo el resto de parámetros conocidos a priori. La manera más conveniente de llevar a cabo el ajuste es utilizar un método de regresión no lineal por mínimos cuadrados. Para ello se ha computado un programa, denominado ANALCAL, que utiliza el algoritmo Simplex (Nedler y Mead, 1965) como método de regresión no lineal. La descripción del programa y su listado se dan en el Apéndice 4. También para la simulación de los calores, se ha computado otro programa, denominado SIMCAL, que se da en el Apéndice 3.

Ejemplo:

En la Figura 3-7 se da un experimento de valoración de la ribonucleasa A con 2'CMP en tampón AcK 0.2 M, KCl 0.2 M, pH 5.5 y a temperatura 28°C. En la célula se colocó 0.5 ml de ribonucleasa A, que se dializó previamente frente al tampón del experimento. La concentración de la misma era 0.175 mM. En la jeringa se colocó el ligando 2'CMP preparado en el mismo tampón a una concentración de 0.975 mM. La concentración de 2'CMP se midió tres veces y el valor considerado es la media. La ribonucleasa se valoró con 18 inyecciones de 2'CMP de 5 μ l cada una, utilizando el programa de control y medida MEDCAL. Los parámetros introducidos, en el orden con que vienen en el programa, fueron

- Medir con compensación (S/): S
- Número de inyecciones.....: 18
- Número de agitaciones.....: 6
- Número de líneas base.....: 0
- Volumen/inyección (μ l).....: 5
- Max. Calor esperado (μ cal)..: 100
- Tiempo de medida (s).....: 80
- Tiempos de agitación
30,15 s en los dos sentidos.: 30,15

La señal del calorímetro, tal como se registró en el registrador gráfico, durante las 18 inyecciones se muestra en la parte A de la Figura 3-7. El calor determinado solamente a partir del área de los picos corresponde al calor no compensado, como se explicó

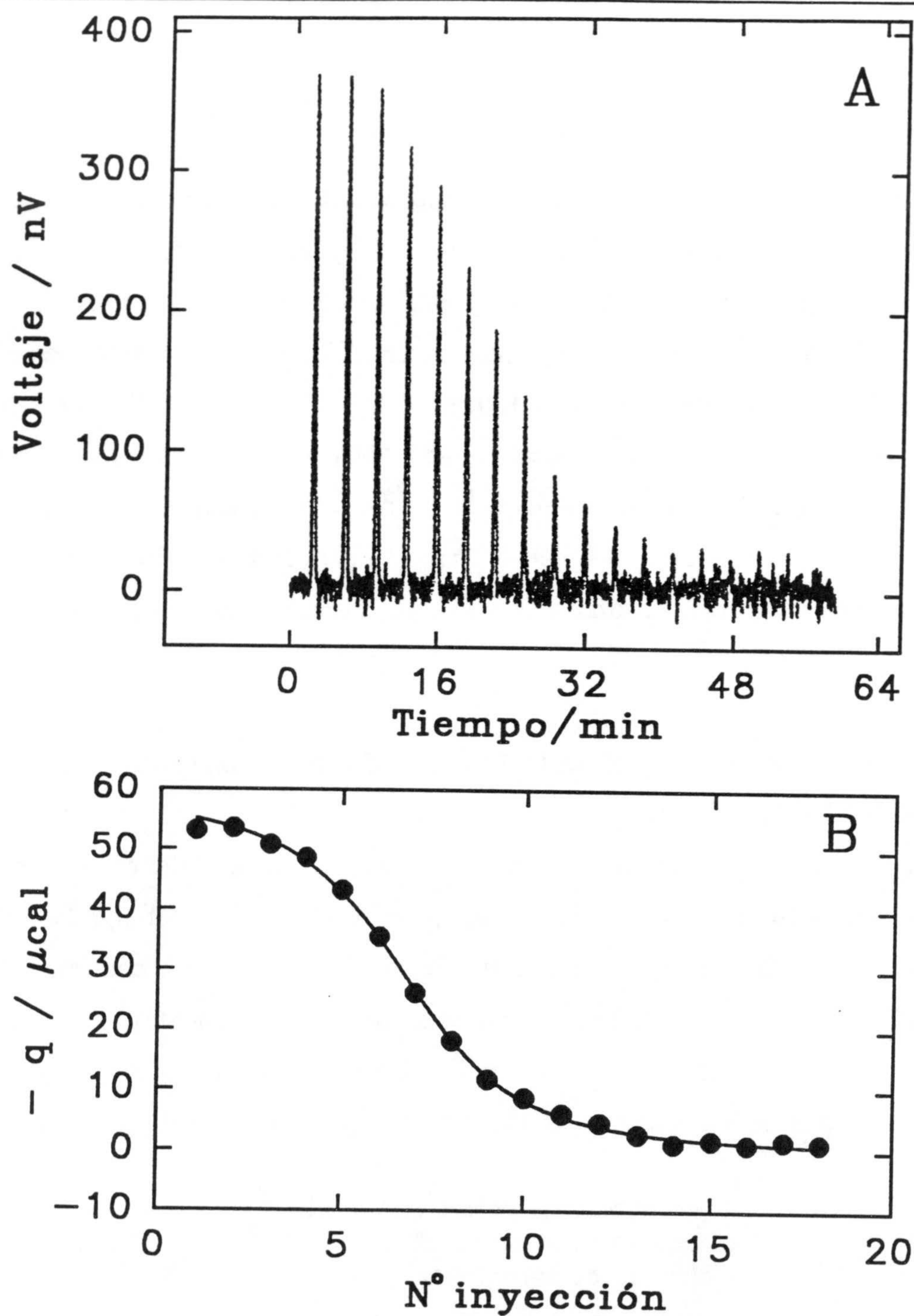


Figura 3-7: A. Registro de la señal del calorímetro en una valoración de ribonucleasa A con 2'CMP. El área bajo los picos corresponde al calor no compensado eléctricamente; al primer pico le corresponden $-4.5 \mu\text{cal}$. B. Calores totales medidos en el experimento de la parte A después de corregir por el calor de agitación y de dilución de 2'CMP ($-1.2 \mu\text{cal}$) y el mejor ajuste de los mismos al modelo de n sitios independiente e idénticos (línea). No se ha tenido en cuenta el primer punto en el ajuste. Ver texto para más detalle.

anteriormente, y es del orden del 8 % del calor total. El calor total es la suma de este calor y el compensado eléctricamente.

Previamente a la realización de la valoración de la proteína con el ligando, se midieron los calores de inyección de tampón en tampón (8 inyecciones de 5 μl y 6 agitaciones) con valores medios de $-1.1 \mu\text{cal}$ para las inyecciones y $0.5 \mu\text{cal}$ para las agitaciones, lo cual da un calor neto de inyección de tampón en tampón de $-1.6 \mu\text{cal}$. Después de la realización de este experimento, y sin rellenar de nuevo la célula, se hizo otro experimento (8 inyecciones y 6 agitaciones) en el que se inyectó 5 μl de la disolución de 2'CMP en tampón. El calor neto de dilución del ligando obtenido fue $-0.9 \mu\text{cal}$. Como se puede comprobar, este calor es próximo al de inyección de tampón en tampón y además muy pequeño, y consecuentemente podemos corregir todos los calores medidos en la valoración de proteína con el ligando por un valor constante de $-0.9 + 0.2 = -0.7 \mu\text{cal}$. $0.2 \mu\text{cal}$ es el valor medio para la agitación medido en el experimento al final del mismo. Los calores de reacción corregidos de esta manera se muestran en la parte B de la Figura 3-7 (puntos) con su correspondiente ajuste (línea). El ajuste se ha llevado a cabo con el programa ANALCAL y como título de ejemplo mostramos los parámetros tal como se introdujeron en el programa para empezar el ajuste.

Estimación inicial de parámetros.	[] Ajustable, [1] Fijo	
ΔH (kcal/mol)	-10	0
k (M^{-1})	100000	0
N. de sitios	1	0
Parámetro X		
ζ	0	
Calor de corrección	-0.7	
Tolerancia en SRC	0	
Intervalo de análisis [1,18]	2,18	

Los parámetros del mejor ajuste obtenidos han sido: $\Delta H = -12.2 \pm 0.2 \text{ kcal/mol}$, $k = 93000 \pm 6000 M^{-1}$ y $n = 1.01 \pm 0.01$, con una desviación estándar del ajuste de $0.5 \mu\text{cal}$. La estimación de los errores se hace con el método de Bevington (1969) que está incorporado

en el programa (ver Apéndice 4).

4 Caracterización Termodinámica Completa de Interacciones Bioquímicas Simples.

Además de su obvia aplicación a la determinación de entalpías globales de reacción en interacciones relativamente fuertes, o la de las diferentes contribuciones entálpicas en procesos en que haya que considerar varias constantes de equilibrio conocidas, pretendemos que nuestro calorímetro sea una herramienta útil en la caracterización termodinámica completa de reacciones bioquímicas simples. Es decir, poder, a partir del análisis de un único experimento de valoración calorimétrica, determinar además de la entalpía del proceso de interés, los cambios de energía de Gibbs y entropía. Ello equivale a considerar que el calorímetro de titulación es un instrumento que no sólo permite medir entalpías, sino también constantes de equilibrio.

Generalmente, con la excepción quizás de las técnicas potenciométricas, las técnicas encaminadas a determinar constantes de equilibrio tienen limitada su rango de aplicabilidad a unos pocos ordenes de magnitud de las mismas. En este capítulo vamos a evaluar dicho rango para nuestro calorímetro mediante simulaciones de valoraciones calorimétricas con el mismo. La validez de los resultados obtenidos en las simulaciones se ha comprobado estudiando reacciones concretas en tres niveles de afinidad: próxima al más alto posible (reacción de la β -tripsina con su inhibidor de soja (STI) a pH 4.5), intermedio (reacción de ribonucleasa A con 2'CMP) y próximo al más bajo posible (reacción de ribonucleasa A con 3'CMP).

4.1 MATERIALES Y METODOS.

4.1.1 Purificación de β -Tripsina.

La tripsina pertenece a la familia de las proteasas con una serina en el sitio activo.

Tiene una gran actividad hidrolizante frente a proteínas o pequeños sustratos. La tripsina comercial generalmente no es homogénea y se encuentra por lo menos en cinco especies moleculares diferentes lo que aparentemente es debido a autólisis. Estas formas pueden ser activas, parcialmente activas ó inertes. Schroeder y Shaw (1968) han llegado a separar las dos formas más activas de la tripsina, α -tripsina y β -tripsina, por cromatografía líquida en columna convencional. La diferencia entre las dos formas es que la α -tripsina tiene el enlace Lys131-Ser132 hidrolizado, sin embargo la forma β conserva todos los enlaces internos intactos (Walsh y Wilcox, 1971). Nosotros hemos utilizado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) siguiendo en líneas generales el mismo procedimiento de Schroeder y Shaw.

La tripsina de bovino se adquirió a Boehringer. La β -tripsina se purificó a partir de esta preparación comercial en un equipo de HPLC (Pharmacia/LKB) equipado de dos bombas modelo 2248 con un flujo máximo de 10 ml/min por cada bomba, un mezclador de alta presión y un detector UV/visible VWM 2141. Todo el equipo está controlado por un ordenador Tandon AT, utilizando un software Nelson. Todos los tampones utilizados han sido preparados con agua desionizada y filtrada en un aparato Milli-Q. Los tampones han sido también desgasificados en trompas de vacío para eliminar las burbujas de aire que pueden afectar a la señal del detector UV/visible.

Se usó una columna de intercambio catiónico Synchronapak S300 (100×4.6 mm D.I) equilibrada en Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.1 y a temperatura ambiente. El calcio ha sido incluido en el tampón porque retarda la autólisis y estabiliza la tripsina. En una preparación se aplican sobre la columna, a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min, 0.5 ml de disolución de tripsina de una concentración de 5 mg/ml en el tampón anterior. Se puede recoger el eluato en aproximadamente 15 min y en este tiempo se detectan en el mismo tres picos mayoritarios de tripsina (Figura 4-1): el primero de ellos sin actividad enzimática probablemente formado por los fragmentos de la autodigestión de la tripsina, el segundo correspondiente a la α -tripsina y el tercero a la β -tripsina. Hay también otro pico, pero más pequeño, que aparece antes de el de la α -tripsina que corresponde a γ -tripsina. La β -tripsina puede eluirse también de la columna inmediatamente después de la forma α con tampón Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 0.4 M, pH 7.1 (Figura 4-1B). El objetivo del aumento de la fuerza iónica en este tampón es el de concentrar la enzima que nos interesa en el eluato. Es

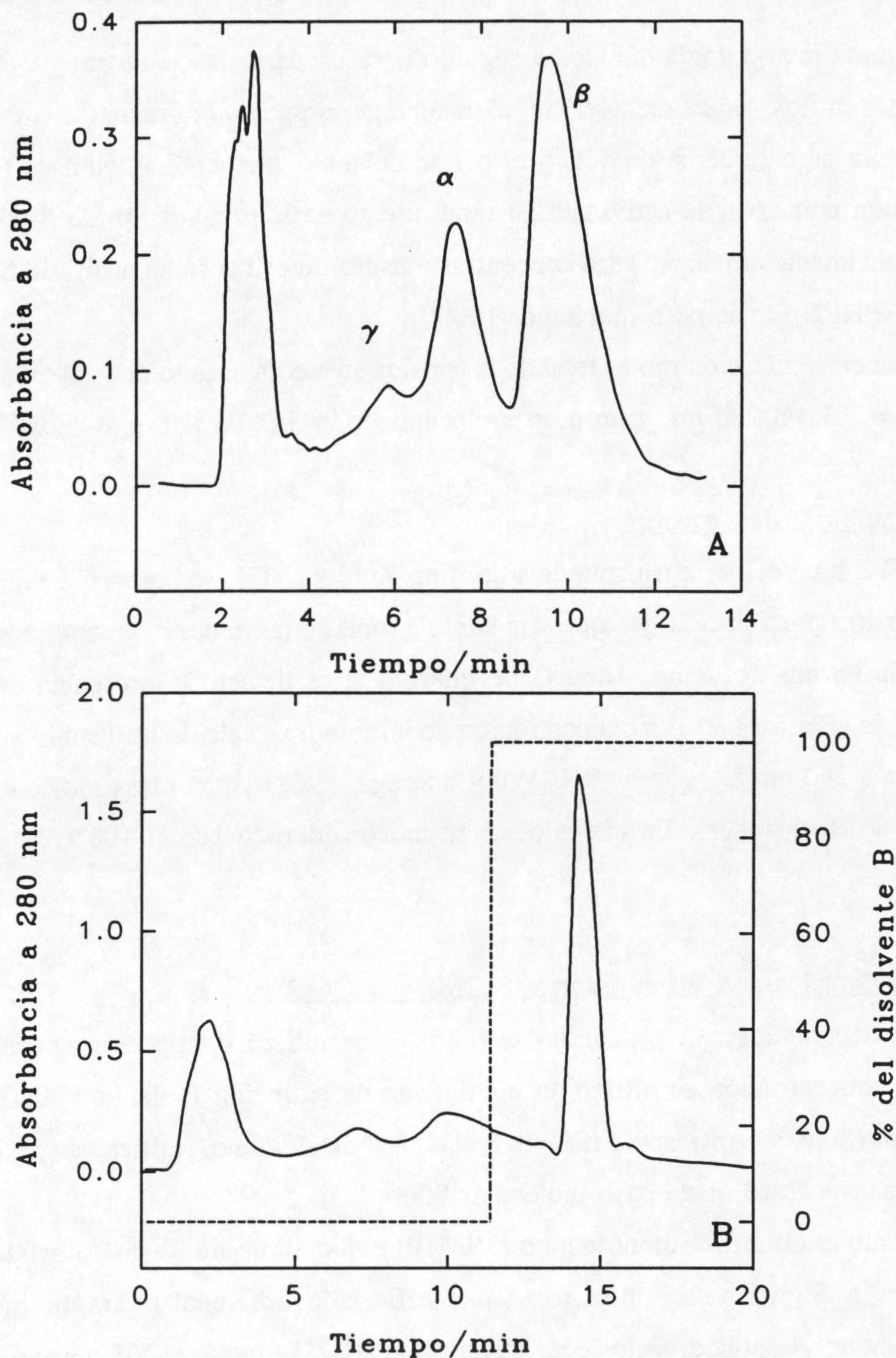


Figura 4-1: Cromatogramas de la tripsina en columna Synchronapak S300 equilibrada en el disolvente A: Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, pH 7.1. Parte A: cromatograma obtenido tras la aplicación de 0.1 ml de tripsina 5 mg/ml, preparada en el mismo tampón de equilibración. La elución se realizó a un flujo de 0.5 ml/min con el mismo tampón. Parte B: cromatograma obtenido tras la aplicación de 0.5 ml de tripsina 5mg/ml, preparada en el mismo tampón de equilibración. La elución se realizó a un flujo constante, 0.5 ml/min, con un gradiente del disolvente B (Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, NaCl 0.2 M, pH 7.1) que se muestra en línea de trazo discontinuo.

esta segunda metodología que se ha seguido para preparar las muestras de β -tripsina utilizadas en los experimentos. Inmediatamente después de recogida de la misma, su temperatura se baja cerca de 4°C y el pH se lleva a 3 mediante adición de formiato sódico 1.5 M para conservar la actividad. El rendimiento en la preparación de β -tripsina era aproximadamente del 30%. Para concentrar más las muestras se ha utilizado filtros Millipore (ULTRAFREE-FP de paso molecular 10000).

La concentración molar total de la tripsina se medía usando una absorbancia específica $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 15.4$ a 280 nm y un peso molecular de 24 kD (Walsh y Wilcox, 1971)

4.1.2 Inhibidor de Tripsina.

El inhibidor de la tripsina de soja, tipo Kunitz (STI), se compró a Sigma y se utilizó sin posterior purificación ya que mediante cromatografía de intercambio iónico de alta resolución en una columna Mono Q de Pharmacia se detectó la presencia de un sólo pico mayoritario (Figura 4-2). La concentración de inhibidor se calculó utilizando una absorbancia específica a 280 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 9.1$ (Wu y Sheraga, 1962) y una masa molecular de 20.1 kD (Manual de Boehringer). En los cálculos se ha considerado que el 100% del inhibidor está activo.

4.1.3 Ribonucleasa A e Inhibidores (3'CMP y 2'CMP).

La ribonucleasa A se compró a Sigma y se utilizó sin posterior purificación. Para medir su concentración se utilizó un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 9800 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 277.5 nm (Sela y Anfinsen, 1957). Todas las disoluciones utilizadas se dializaron en membranas Spectra/Por de paso molecular 8000.

Tanto el citidin 2'-monofosfato (2'CMP) como el citidin 3'-monofosfato (3'CMP) se compraron a Sigma y se utilizaron sin purificación adicional. Para la medida de sus concentraciones se utilizaron los coeficientes de extinción molar a 265 nm y pH 7 $\epsilon = 7400 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Wiseman et al., 1989) y $\epsilon = 7600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Beaven et al., 1955) respectivamente.

4.1.4 Medida de la Concentración de los Sitios Activos de la Tripsina.

Debido a la autodigestión de la tripsina, la concentración de los sitios activos de la

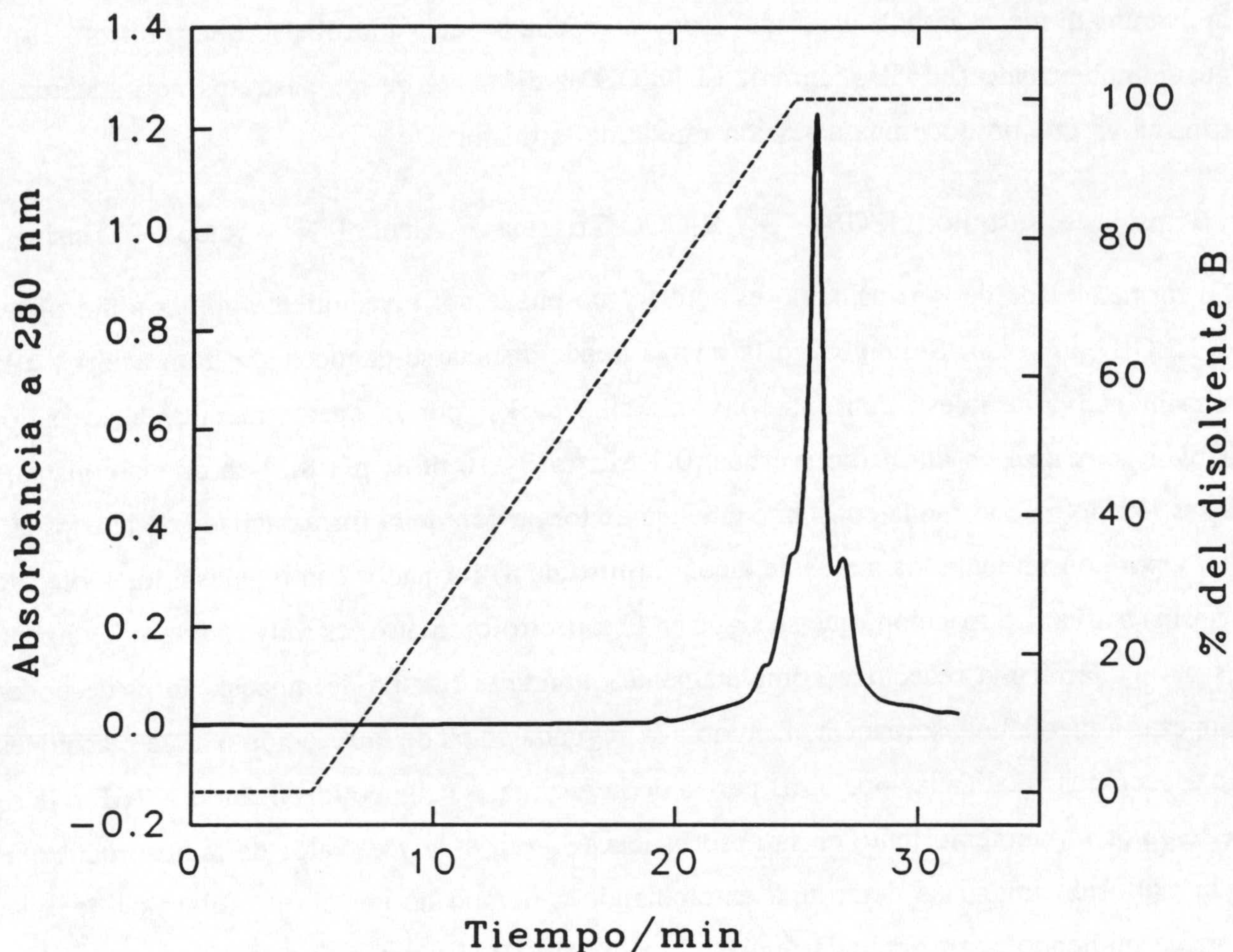
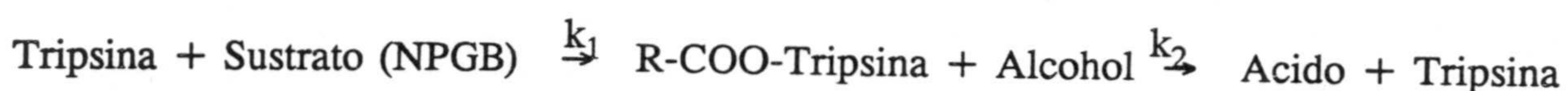


Figura 4-2: Cromatograma de STI en una columna de intercambio iónico (Mono Q de Pharmacia) equilibrada en NaH_2PO_4 12.5 mM pH 6.6 (disolvente A) y a temperatura ambiente. El volumen aplicado es 0.4 ml de STI de concentración 5 mg/ml preparado en el mismo tampón de equilibración. La elución se realizó con la mezcla del disolvente B (NaH_2PO_4 12.5 mM, NaCl 0.4 M, pH 6.6) y A, a un flujo de 0.5 ml/min y a la proporción del disolvente B durante la elución se muestra en línea de trazo discontinuo en la figura.

misma suele ser diferente de la concentración monomolecular total. Para determinar esta concentración activa hemos seguido el método de Chase y Shaw (1967) que consiste en medir la cantidad de alcohol liberado como producto del hidrólisis de p-nitrofenil-p'-guanidinobenzoato (NPGB, Sigma). El NPGB es diferente de los sustratos normales de la tripsina ya que produce una acilación rápida de la misma.



La forma acilada de la tripsina no es activa y no puede por consiguiente volver a hidrolizar el NPGB en exceso. Sin embargo la misma puede disociarse dando lugar a un ácido y a la tripsina activa de nuevo con una constante cinética k_2 , por lo que la medida de los sitios activos se realiza en un medio (veronal 0.1 M, CaCl_2 10 mM, pH 8.3) en que la constante k_2 es mucho menor que la constante cinética de formación de la forma acilada de la tripsina, k_1 , y por consiguiente los moles de alcohol (nitrofenol) formados son iguales a los moles de tripsina activa. La reacción, que se sigue en el espectrofotómetro, es muy rápida si la enzima es pura y la misma reacciona completamente durante el tiempo de mezcla, antes de poder empezar a medir la absorbancia. Debido a la segunda etapa de la reacción o a las reacciones no específicas catalizadas por otras partes de la enzima, se sigue hidrolizando NPGB que se refleja por un aumento lento en la absorbancia (Figura 4-3) y el valor de la absorbancia π a la explosión inicial se determina extrapolando a tiempo de mezcla t_m . El valor de π se corrige midiendo la absorbancia inicial al añadir NPGB al tampón que no contiene tripsina. La concentración de sitios activos, $[T]_{ac}$, se calcula a partir de π por la relación: $[T]_{ac} = \pi \times 6.025 \cdot 10^{-5}$ M, con π medido a 410 nm y en una cubeta de 1 cm de paso de luz. La concentración activa de la tripsina comercial medida por este método era aproximadamente un 60% de la total y la de la forma β un 95% aproximadamente.

4.1.5 Actividad Enzimática de la Tripsina.

La actividad catalítica de la tripsina se midió siguiendo la hidrólisis del sustrato "p-toluensulfonyl-L-arginine methyl ester" (TAME) por el método espectrofotométrico de Walsh y Wilcox (1971). Tres mililitros de sustrato 1.04 mM, preparados en Tris 40 mM, CaCl_2 10 mM y pH 8.1, se colocan en un cubeta termostaticada a 30°C y se les añade 0.1 ml de tripsina conteniendo aproximadamente 0.45 μg de proteína. La aparición del producto se

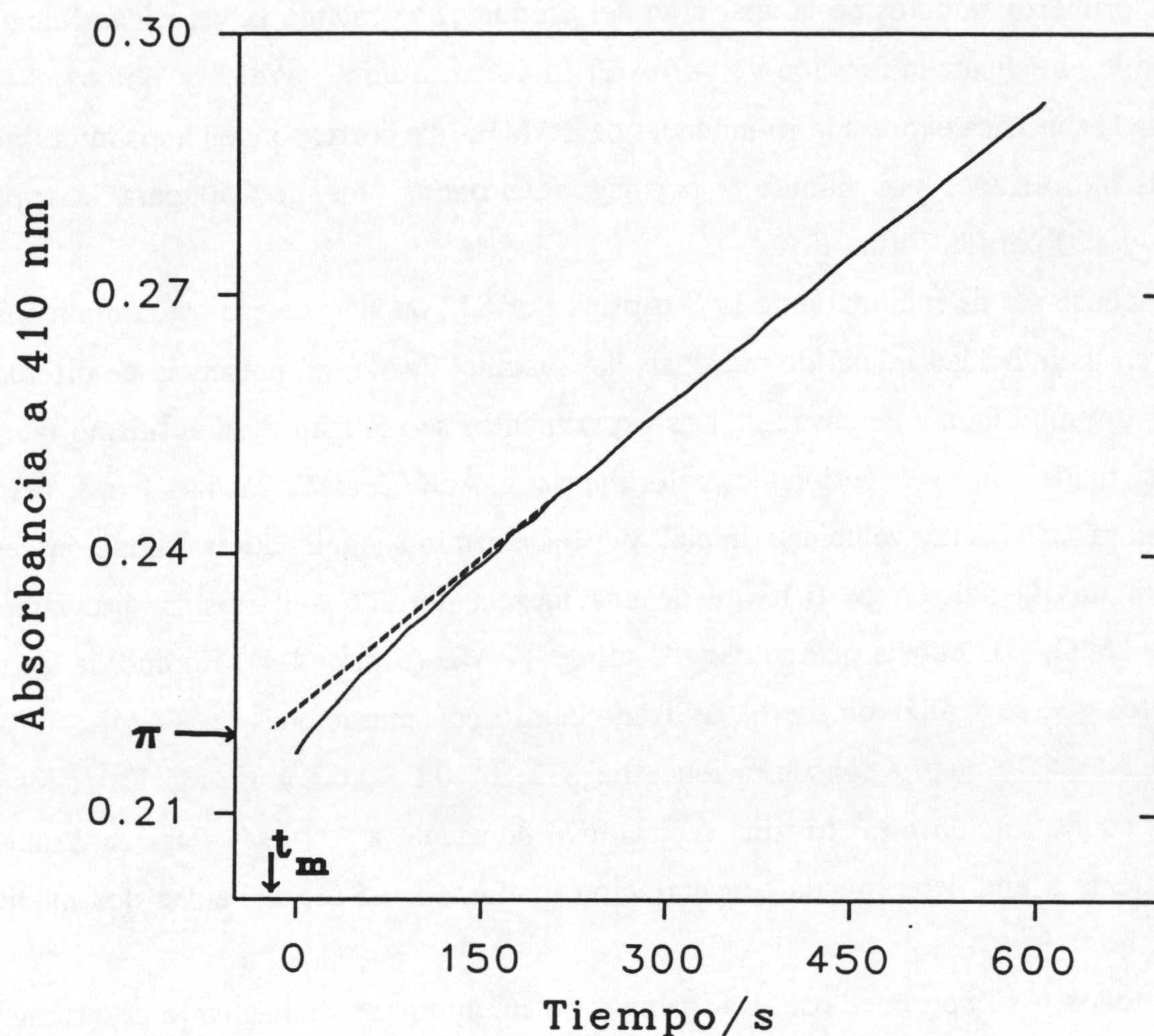


Figura 4-3: Cambio en la absorbancia de una disolución de tripsina comercial 0.019 mM, en el tampón veronal 0.1 M, CaCl_2 10 mM y pH 8.3, tras la adición de 10 μl de NPGB de concentración 0.01 M, preparado en dimetil formamida. El tiempo cero corresponde al tiempo de comienzo de la medida de la absorbancia y π es la absorbancia a t_m , correspondiente al tiempo de adición de NPGB, determinada a partir de la extrapolación de la zona lineal (línea en trazo discontinuo). A partir del valor de π se calculó que solamente el 62% de la tripsina comercial era activa.

sigue después midiendo la absorbancia (en un espectrofotómetro Beckman DU-70) a 247 nm durante unos cinco minutos. A partir de la pendiente inicial de la misma, determinada en los dos o tres primeros minutos de la aparición del producto, se calcula la velocidad inicial de la reacción v_0 , mediante la relación $v_0 = (dA/dt)/0.409 \text{ mM min}^{-1}$ (Walsh y Wilcox, 1971). La actividad específica expresada en unidades de TAME, que corresponden a los micromoles de TAME hidrolizados por minuto y por mg de proteína, fue de 250 para la tripsina comercial y 420 para la forma β .

La constante de inhibición de la β -tripsina por STI ha sido determinada midiendo la variación en la velocidad inicial de hidrólisis del sustrato TAME en presencia de diferentes cantidades del inhibidor y de sustrato. Los experimentos se realizaron en el mismo tampón en el que se realizaron los experimentos calorimétricos; AcK 25 mM, CaCl_2 10 mM, pH 4.5 y temperatura 25°C. La velocidad inicial v_0 se determinó siguiendo la variación de la absorbancia tras la adición de 0.15 ml de una mezcla de STI y β -tripsina, previamente incubada a 25°C, a la cubeta que contiene 3 ml de TAME (Figura 4-4). En uno de los tres experimentos que se realizaron, se ha utilizado cuatro concentraciones de TAME; 1, 0.2, 0.125 y 0.1 mM, y cuatro concentraciones de STI; 0, 0.5, 0.67 y 1 μM . En todos los ensayos la concentración de β -tripsina se mantuvo constante a 3.5 μM . Para cada punto, correspondiente a una determinada concentración de TAME y STI, se hacían dos medidas como mínimo.

En todos los experimentos, la tripsina y su inhibidor se dializaban antes frente al disolvente apropiado en membranas Medicell de paso molecular aproximadamente 12 kD y cualquier material insoluble, en su caso, se eliminaba filtrando en Millipores (MILLEX-HV) de tamaño de poro 0.2 μm o centrifugando a 10000 g.

4.1.6 Medida Potenciométrica de Constantes de Equilibrio.

La constante de equilibrio de la inhibición de la ribonucleasa A por 2'CMP a pH 6.5 y fuerza iónica 200 mM de KNO_3 se determinó por calorimetría y por potencimetría con el fin de comparar los valores obtenidos por las dos técnicas. Las medidas potenciométricas se realizaron de acuerdo con el método de pH-Stat (Lebowitz y Laskowski, 1962). Se basan en la medida del número de protones absorbidos o liberados al mezclar diferentes cantidades de ligando con la proteína, debido al desplazamiento en los pK de algunos grupos ionizables.

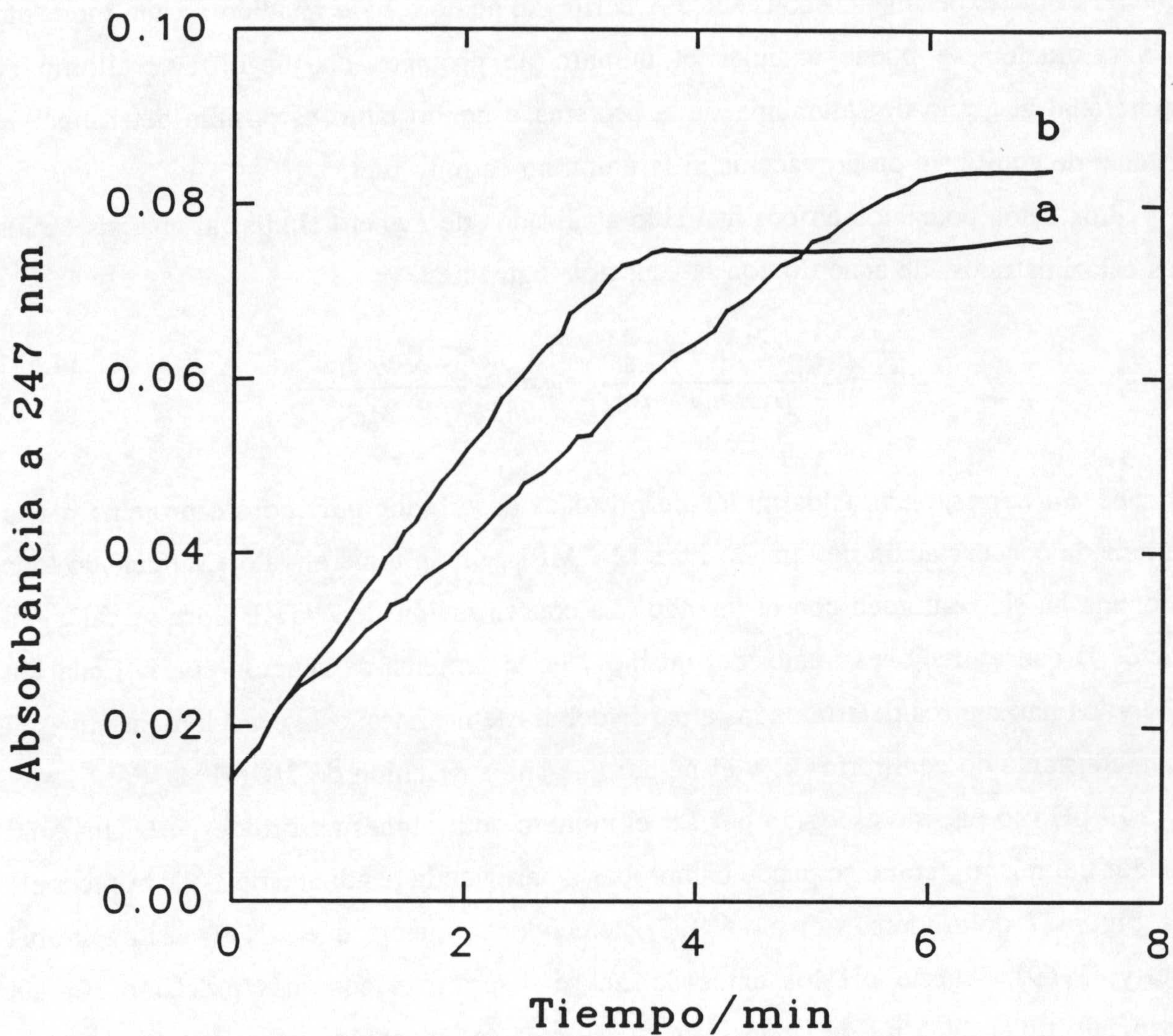


Figura 4-4: Cambio en la absorbancia debido a la aparición de los productos del hidrólisis de TAME con β -tripsina en ausencia (a) y en presencia (b) del inhibidor a la concentración de $1 \mu\text{M}$. En ambos casos, la concentración de TAME inicial es 0.125 mM y la concentración de la enzima es $3.5 \mu\text{M}$.

Los protones absorbidos o liberados se compensan por adición de un ácido o base para mantener el pH experimental constante. A partir del ácido o base añadido a cada momento de la valoración se puede calcular el número de protones en juego. Este último es proporcional al grado de saturación de la proteína y por lo tanto es posible determinar la constante de equilibrio de la reacción si la unión no es muy fuerte.

Los datos potenciométricos han sido analizados de manera similar al análisis de los datos calorimétricos, de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\Delta n = \Delta N \frac{[2'CMP]_{unido}}{[ribonucleasa]} = \Delta N \frac{nk[2'CMP]_{libre}}{1+k[2'CMP]_{libre}} \quad (4.1)$$

en donde Δn corresponde a los moles de protones absorbidos por mol de proteína a una determinada concentración de ligando libre $[2'CMP]_{libre}$. Δn toma el valor ΔN cuando toda la proteína ha sido saturada con el ligando. La concentración de 2'CMP libre se calcula a partir de las concentraciones totales del mismo y de la proteína de acuerdo con la Ecuación (3.21) y los parámetros determinados a partir del ajuste no lineal a la ecuación anterior son ΔN , la constante de equilibrio, k , y el número de sitios de unión de 2'CMP, n .

El pH 6.5 ha sido escogido por ser el número de protones absorbidos, ΔN , máximo alrededor del mismo, como se puede comprobar a partir de la pendiente de $\ln k$ frente a pH en la Figura 7 de Anderson et al. (1968), teniendo en cuenta que $\Delta N = -\partial \log k / \partial \text{pH}$ (Alberty, 1969). A este pH los datos de Δn se determinan con más precisión. En un experimento típico, 1.5 ml de ribonucleasa 0.29 mM se colocaron en una célula de vidrio termostatizada a $25 \pm 0.05^\circ\text{C}$ mediante un baño termostático (M3 Lauda) y se valoraron añadiendo volúmenes de 25 μl de 2'CMP 3.1 mM, tomados con una jeringa Hamilton. La absorción de protones produce un pequeño aumento en el pH de la disolución que ha sido compensado por adición de volúmenes (entre 15 y 1 μl) de HNO_3 5 mM.

El pH-metro usado Crison 501, permite apreciar en el visualizador digital hasta 0.01 unidades de pH. El electrodo utilizado era del tipo combinado Ingold U402-M6-S7/100 y la calibración del pH-metro se realizaba con dos tampones estándar Crison de pH 4.00 y 7.02. Con el fin de aumentar la sensibilidad del pH-metro, se ha seguido la variación del pH en un registro gráfico que recoge la señal analógica del pH-metro a través de un aparato, construido en este laboratorio, permitiendo compensar la salida del pH-metro a cero y por

consiguiente se ha llegado a apreciar variaciones de pH de hasta 0.005 unidades. Este aparato está descrito en el Apéndice 1 y es el mismo utilizado en el registro de la temperatura del baño del calorímetro (ver Capítulo 2). En la Figura 4-5 puede verse la señal del pH-metro registrada durante una valoración de la ribonucleasa A con 2'CMP.

Por último hay que decir que, antes del experimento, la ribonucleasa se dializaba exhaustivamente frente al disolvente de la reacción y se burbujeaba después nitrógeno saturado con agua a través de la misma durante unos 30 min para eliminar el dióxido de carbono. La disolución de 2'CMP ha sido tratada igualmente con nitrógeno. Las valoraciones se realizaban siempre en atmósfera de nitrógeno.

4.1.7 Calorimetría.

La metodología para la realización de los experimentos calorimétricos se ha descrito en los capítulos anteriores, fundamentalmente en la última sección del Capítulo 3, y las resumimos de nuevo a continuación.

En una valoración calorimétrica típica se llena la célula de reacción con un volumen de aproximadamente 0.5 ml del reactivo a valorar y se va midiendo el calor producido en las sucesivas inyecciones (generalmente de 5 ó 10 μ l) desde la jeringa de reactivo valorante. En todos los experimentos, los calores asociados con cada inyección se midieron durante 80 s, aplicando la metodología de compensación eléctrica (ver Capítulo 3), y el tiempo que transcurre entre una inyección y otra era de 3 min. Para la reacción de β -tripsina con su inhibidor y en algunas condiciones de pH no se alcanza el equilibrio químico de la reacción rápidamente, pero en nuestras condiciones de trabajo, el tiempo de 80 s fue suficiente para medir todo el efecto térmico asociado con la reacción. En la Figura 4 de Laskowski y Finkenstadt (1972) se muestra, en sus experimentos potenciométricos, que la liberación de protones asociada con la reacción de β -tripsina con STI a 20°C se produce en menos de 30 s. La mezcla reaccionante se agitaba durante 30 s en el sentido del reloj y otros 15 min en el otro sentido. El programa de control de los experimentos calorimétricos está descrito en el Apéndice 2. En la Figura 3-7 puede verse por ejemplo el registro de la señal calorimétrica de un experimento de valoración de ribonucleasa con 2'CMP. Se trata de la variación del voltaje de las termopilas del instrumento tras sucesivas inyecciones. Del área bajo los picos se mide sólo una fracción entre el 5 y el 10% del calor total producido en la inyección. El

resto del efecto térmico se evalúa de la variación durante el tiempo de medida de la potencia comunicada a la resistencia calefactora del bulbo de reacción en relación a una potencia inicial de referencia (ver Capítulo 3 para más detalle). El valor de la potencia de referencia establecido en todos los experimentos correspondía a un calor máximo esperado de 100 μcal por inyección.

Para obtener los parámetros termodinámicos de cada reacción, se ha analizado los calores medidos de acuerdo con el modelo de n sitios independientes e idénticos. Las ecuaciones del modelo están descritas en la última sección del Capítulo 3. Los parámetros obtenidos a partir del ajuste son la constante de equilibrio de asociación k , la entalpía de reacción ΔH° por mol de ligando unido y el número de sitios de unión n . El método no lineal del ajuste utilizado está basado en el algoritmo Simplex (Nedler y Mead 1965) y los errores en los parámetros se estimaron utilizando el método de Bevington (1969). Todas estas nociones están incorporadas en el programa de análisis ANALCAL descrito en el Apéndice 4.

La Ecuación (3.18) del Capítulo 3 a la que analizamos los datos corresponde al caso ideal en el que el calor medido es debido exclusivamente a la unión del ligando. Sin embargo, en cualquier experimento calorimétrico, este calor de unión está normalmente asociado a efectos térmicos adicionales debidos a la agitación de la mezcla reaccionante, a la inyección de disolvente en disolvente, a la dilución del reactivo que inicialmente se coloca en el bulbo de reacción y la dilución del reactivo que se inyecta desde la jeringa. La determinación de cada uno de estos efectos necesita de un experimento independiente. Los dos primeros suelen estar en el orden de $\pm 1-2 \mu\text{cal}$. La dilución tras cada inyección del reactivo que se coloca inicialmente en el bulbo de reacción es muy pequeña (cuando se opera colocando dicho reactivo también en la jeringa a la misma concentración, es nula) por lo que la contribución de su calor de dilución al efecto térmico medido suele ser despreciable. La corrección más importante es la del calor de dilución del reactivo que se inyecta desde la jeringa, que en determinados casos puede llegar a ser significativa. Esto es así sobre todo cuando los calores medidos en la valoración son pequeños, como ocurre en la reacción entre tripsina e inhibidor (ver Figura 4-10).

Para tener en cuenta la corrección en el análisis de datos hemos de calcular la contribución de esta dilución, $q_{d,i}$, que se sumaría a la Ecuación (3.18) igual que todos los

otros tipos de calores de corrección mencionados anteriormente. Para ello, en primer lugar, los datos del experimento independiente de dilución del ligando $q_{d,i}^o$ (puntos triangulares de la Figura 4-10 por ejemplo) se ajustan a una ecuación similar a la vista en el caso de dilución de la sacarosa en el Capítulo 3:

$$q_{d,i}^o = \phi L_2(X_{t,i})X_{t,i}V_e - [\phi L_2(X_{t,i-1})X_{t,i-1}(V_e - v) + \phi L_2(X_J)X_Jv] \quad (4.2)$$

donde $X_{t,i}$ son las concentraciones de ligando conocidas tras cada inyección i , y ϕL_2 , la entalpía molar aparente relativa. En las situaciones analizadas en esta memoria se ha encontrado que ϕL_2 es una función de la concentración del tipo:

$$\phi L_2(X) = \zeta\sqrt{X} \quad o \quad bien \quad \phi L_2(X) = \zeta X. \quad (4.3)$$

donde ζ es una constante. En el caso de la dilución de β -tripsina se ha encontrado que los datos se ajustan bien cuando ϕL_2 varia linealmente con la raíz cuadrada de X (Figura 4-10) y en el caso de 2'CMP y 3'CMP linealmente con X . Entonces el experimento de dilución independiente se analiza para determinar el parámetro ajustable ζ , que se puede realizar con el mismo programa de análisis ANALCAL (Apéndice 4). Una vez determinado ζ , los calores $q_{d,i}$ de dilución de ligando en un experimento de valoración de la macromolécula, vendrán dados por:

$$q_{d,i} = \phi L_2(x_i)x_iV_e - [\phi L_2(x_{i-1})x_{i-1}(V_e - v) + \phi L_2(x_J)x_Jv] \quad (4.4)$$

en donde ahora x_i son las concentraciones de ligando libre en el bulbo de reacción y x_J de ligando libre en la jeringa, en principio desconocidas, y se evalúan en el proceso de ajuste.

En los experimentos descritos en este trabajo la corrección de los calores de dilución ha sido significativa sólo en el caso de la valoración del inhibidor con la β -tripsina. Para las valoraciones de ribonucleasa A con 2'CMP y 3'CMP los calores de dilución de los nucleótidos no afectan a los resultados.

4.2 RESULTADOS Y DISCUSION.

4.2.1 Simulación de Valoraciones Calorimétricas.

A efecto de evaluar el rango de constantes de equilibrio de un proceso bioquímico simple determinables a partir del análisis de una valoración calorimétrica, se han realizado simulaciones teóricas de experimentos de este tipo. A partir de dichas simulaciones también hemos determinado de forma aproximada la precisión de los parámetros determinados en el análisis.

Ventana kc:

Para que de una valoración de cualquier tipo sea posible obtener información sobre la constante de equilibrio, es necesario que a lo largo de la misma se produzca un proceso de asociación parcial moderada entre los reactivos. Si la afinidad es muy fuerte, la asociación es total y entonces la concentración de uno de los reactivos libre en disolución, necesaria para el análisis que permita la determinación de k , es indeterminable. Por otra parte, si la asociación es parcial pero muy débil, se corre el peligro de que no se pueda medir la señal física asociada a la misma, en el caso del calorímetro, el efecto térmico.

Sea por ejemplo la interacción de una macromolécula de un sitio con un ligando, mezclándose ambos en cantidades equimoleculares a una concentración c . Si llamamos a α al grado de asociación, la constante de unión del ligando es:

$$k = \frac{\alpha}{c(1-\alpha)^2} \quad (4.5)$$

en donde podemos observar que el grado de asociación no depende exclusivamente de k sino del producto adimensional kc . Para un valor $kc = 1000$, el grado de asociación α vale 0.97; para un valor $kc = 0.1$, α vale 0.08. Obviamente, si uno de los reactivos está en exceso, el grado de asociación, definido en relación a la concentración del reactivo limitante, crece.

En la Figura 4-6 puede verse el resultado de diferentes simulaciones de la valoración calorimétrica de una macromolécula con un ligando para diferentes valores del producto kc . Estas simulaciones se han realizado considerando que la macromolécula se colocaba a una concentración M_0 en el bulbo de reacción y se valoraba inyectando desde la jeringa sólo ligando a una concentración $X_j = 2.5 M_0$. Esta suele ser la relación de concentraciones entre

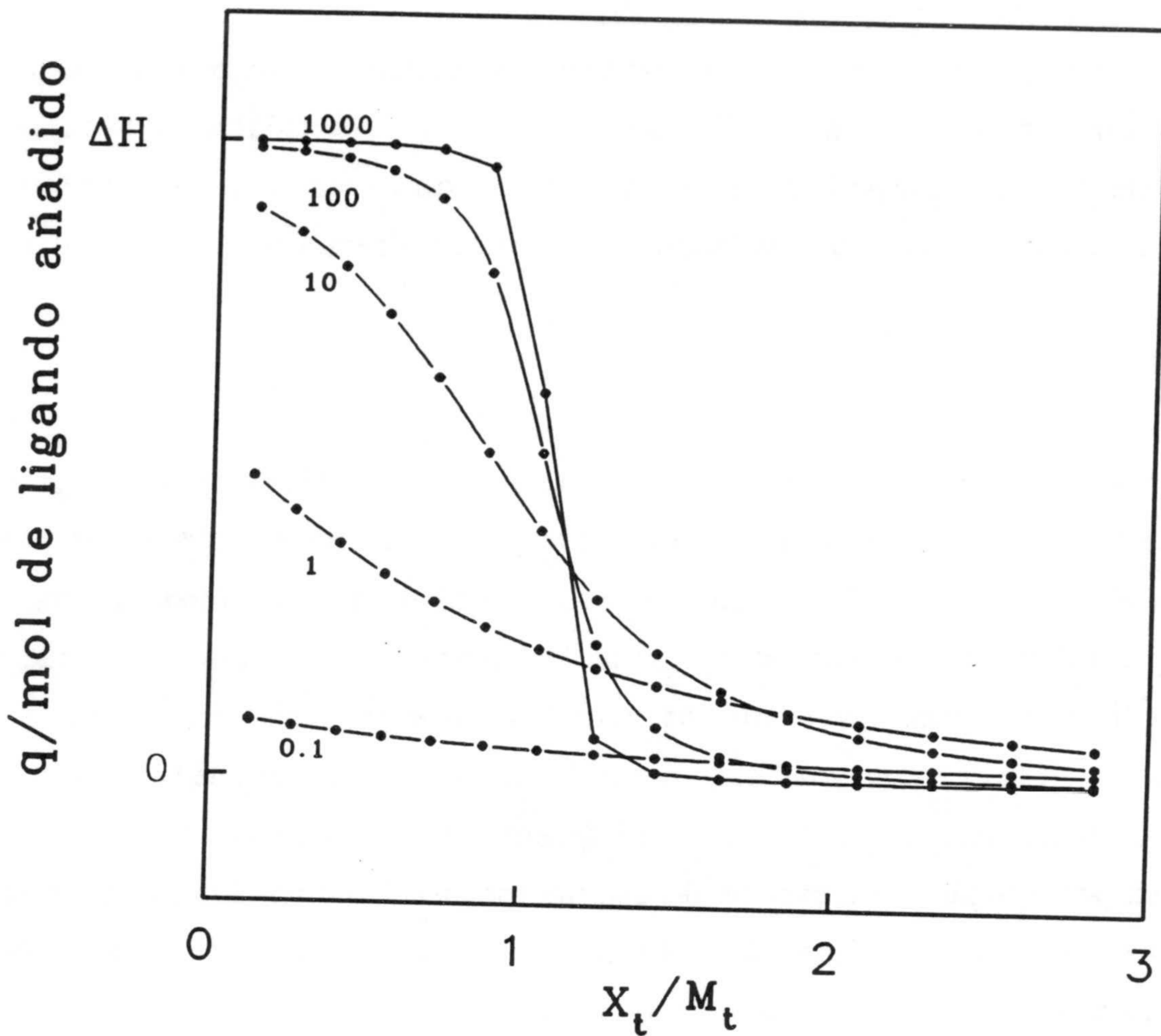


Figura 4-6: Simulación de valoraciones calorimétricas para valores de k_c (constante de equilibrio por concentración de macromolécula inicial) comprendidos entre 0.1 y 1000. Las líneas unen los puntos definidos para cada inyección de la siguiente forma: en la ordenada se da el calor calculado en cada inyección dividido por los moles de ligando añadido en la inyección; en la abscisa, la relación entre las concentraciones totales de ligando y macromolécula en el bulbo de reacción tras una determinada inyección. El plateau de la curva para una afinidad alta $k_c=1000$ corta la ordenada en un punto muy próximo a la variación de entalpía por mol de ligando unido para la reacción. En el caso de una macromolécula con n sitios independientes e idénticos las curvas son similares teniendo en cuenta que c en el parámetro k_c debe ser la concentración de sitios y en la abscisa se debe representar la relación entre las concentraciones totales de ligando y de sitios.

macromolécula y ligando usada en nuestros experimentos de valoración. Para inyecciones de $10 \mu\text{l}$ de ligando, y dado el volumen efectivo de reacción ($203 \mu\text{l}$), con dicha relación el momento en que las concentraciones totales de ligando y macromolécula en el bulbo de reacción se igualan ocurre tras la sexta inyección. Por otra parte, tras la primera inyección, la relación de concentraciones entre macromolécula y ligando es casi 8 veces. El factor k_c en las simulaciones se ha tomado como una medida aproximada del grado de asociación y consideramos que la concentración c en el mismo es la concentración inicial de macromolécula M_0 .

Si se observan las simulaciones se ve como para valores de k_c superiores a 1000, que implican un grado de asociación próximo a uno, la curva se aproxima a la hipotética curva rectangular para una afinidad infinita. Por encima de esta situación no es posible un análisis de los datos que permita la determinación de la constante de equilibrio al ser la concentración de ligando libre en el medio indeterminable por lo pequeña. Para poder determinar k en un experimento, hemos de trabajar por debajo del valor $k_c=1000$; en estos casos la forma de la curva simulada es sensible al parámetro k_c . Considerando $k_c \approx 1000$ como límite superior de las condiciones experimentales para determinar una constante de equilibrio resulta obvio que cuanto más alto sea el valor de ésta hay que trabajar a concentraciones más bajas de macromolécula. Sin embargo dichas concentraciones no pueden bajar de forma que los calores producidos se aproximen al límite de detección del instrumento, por lo que esto impone un límite superior a la constante de equilibrio en principio determinable mediante un experimento de valoración calorimétrica. En la Figura 4-7 podemos ver tres simulaciones de los resultados que se obtendrían en experimentos a $k_c=1000$, tres constantes de equilibrio diferentes y con una variación de entalpía constante -10 kcal/mol . Se observa que para una constante $k=5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, la concentración de macromolécula en el experimento es tan baja que los valores para los calores determinados tras cada inyección son muy pequeños. Estos calores, en torno a las $5 \mu\text{cal}$, son muy próximos a la sensibilidad del instrumento ($1 \mu\text{cal}$), y se ven por lo tanto afectados por un error considerable, por lo que la curva de valoración no nos da ninguna información, o en el mejor de los casos una estimación del número de sitios de unión n .

Siempre es posible hacer que los calores medidos sean mayores aumentando la concentración del ligando en la jeringa, pero ello es a costa de disminuir el número de puntos

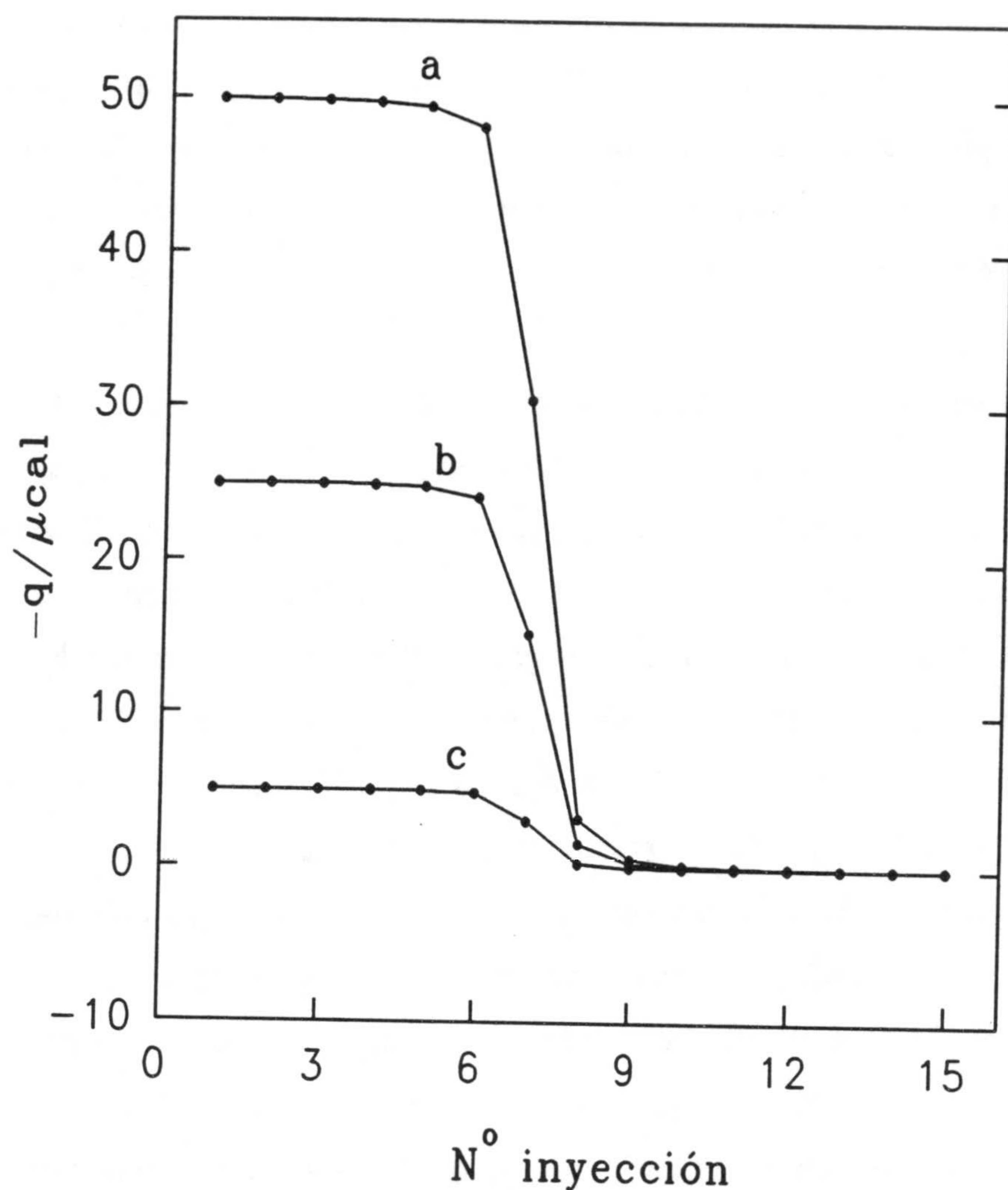


Figura 4-7: Simulaciones de experimentos de valoración calorimétrica de una macromolécula con 1 sitio para $k_c = 1000$ y tres constantes de equilibrio diferentes: a) $k = 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, b) $k = 10^7 \text{ M}^{-1}$ y c) $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. La concentración del ligando en la jeringa es 2.5 veces la inicial de la macromolécula en el bulbo de reacción y la entalpía de la reacción es -10 kcal/mol.

en la valoración, lo que también dificulta el análisis. Para una constante de equilibrio $k=10^7 M^{-1}$, se obtienen calores en las primeras inyecciones en el experimento en torno a las 20 μcal ; hemos considerado los valores entre 10 - 20 μcal por inyección en las primeras inyecciones como los mínimos para proceder al análisis de una valoración. Por lo tanto el valor máximo de la constante de equilibrio determinable mediante nuestro calorímetro es en torno a $10^7 M^{-1}$.

En la Figura 4-6 se puede observar también que para valores de k_c muy bajos, por ejemplo $k_c = 0.1$, los calores de las valoraciones calorimétricas son muy bajos, debido a que una muy pequeña fracción del ligando añadido a cada inyección se une a la macromolécula, y la forma de la misma se aproxima a una recta horizontal. En este caso no se puede obtener ninguna información relevante salvo que la unión es muy débil. Hemos considerado que el valor mínimo de k_c para el cual podemos analizar las valoraciones calorimétricas es en torno a 1. Resulta obvio que cuando la constante de equilibrio es muy baja se tiene que aumentar la concentración de la macromolécula para que el parámetro k_c esté comprendido entre 1 y 1000. Sin embargo, con proteínas, uno se encuentra con la dificultad de preparar concentraciones altas a causa de la solubilidad por lo que hay un límite para la constante de equilibrio mínima que uno puede medir. Si suponemos que la concentración máxima de una macromolécula es del orden de 20 mg/ml y que su peso molecular es de 10 kD, lo que daría una concentración de 2 mM, podríamos medir entonces constantes de equilibrio tan bajas como $500 M^{-1}$. Sin embargo, sobre todo si el ligando es otra macromolécula es posible que no se puede preparar una disolución del mismo tan concentrada para que la relación $X_J \approx 2.5 M_0$ se cumpla y consiguientemente los calores pueden ser muy pequeños lo que hará imposible el análisis de la valoración y no se puede medir constantes de equilibrio muy bajas.

Precisión de los análisis:

Dentro del rango admisible de constantes de equilibrio determinables en el experimento de valoración calorimétrica, para un valor concreto de la misma, uno puede moverse dentro de la ventana k_c variando la concentración de macromolécula. La magnitud de los calores medidos en la valoración depende de dicha concentración de macromolécula. Por otra parte, dado que dichos calores vendrán afectados siempre por el mismo error absoluto la concentración de macromolécula en el experimento afectaría al error relativo de

los mismos y consiguientemente a la precisión final de los parámetros obtenidos del análisis de la valoración.

A efecto de estimar el efecto del error relativo en los calores medidos en la precisión final de los parámetros determinados en el análisis, se procedió a analizar simulaciones en las que los calores se verán afectados de un error aleatorio ϵ . Estas simulaciones se realizaron para una interacción macromolécula-ligando 1:1 con un cambio de entalpía de reacción $\Delta H^\circ = -10$ kcal/mol. Este valor es aproximadamente la media de más de 80 interacción entre macromoléculas y ligandos pequeños recogidas por Wiesinger y Hinz (1986). Las simulaciones se realizaron en primer lugar para un valor del parámetro $k_c = 1000$ y tres concentraciones de macromolécula diferentes: 0.2, 0.1 y 0.05 mM. Para cada una de las concentraciones se realizaron 4 simulaciones, siendo en cada una de ellas los calores por inyección $q_{i,\text{exp}}$ que mediríamos en un experimento real el resultado de sumar a los calores calculados $q_{i,\text{cal}}$ un error aleatorio ϵ_i :

$$q_{i,\text{exp}} = q_{i,\text{cal}} + \epsilon_i \quad (4.6)$$

El error ϵ_i se determinó a partir de una curva normal de distribución de error:

$$f(\epsilon) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma} e^{-\frac{\epsilon^2}{2\sigma^2}} \quad (4.7)$$

en donde se utilizó para el error estándar σ el valor $0.6 \mu\text{cal}$, al ser éste el valor determinado en ajustes de experimentos reales realizados en esta memoria. Para ello se generó de forma aleatoria (mediante la función RANDOMIZE del computador HP85) un número entre 0 y 1, siendo este número el área bajo la curva (4.7) entre $-\infty$ y el valor ϵ buscado. En la Figura 4-8, parte D, se muestran los 48 errores ϵ determinados para las 4 valoraciones calorimétricas (12 inyecciones por valoración) simuladas a cada una de las 3 concentraciones. Las simulaciones se muestran en las partes A, B y C de la misma figura.

El ajuste de las cuatro simulaciones para cada concentración de macromolécula ha dado los resultados que se exponen en la Tabla 4-1. A partir de la tabla podemos comprobar que el error relativo en la determinación de k en una valoración calorimétrica de parámetro $k_c = 1000$ es del 6% si la concentración es de 0.2 mM (o desde un punto de vista más práctico si los calores de las primeras inyecciones son del orden de los $50 \mu\text{cal}$), 10% si la

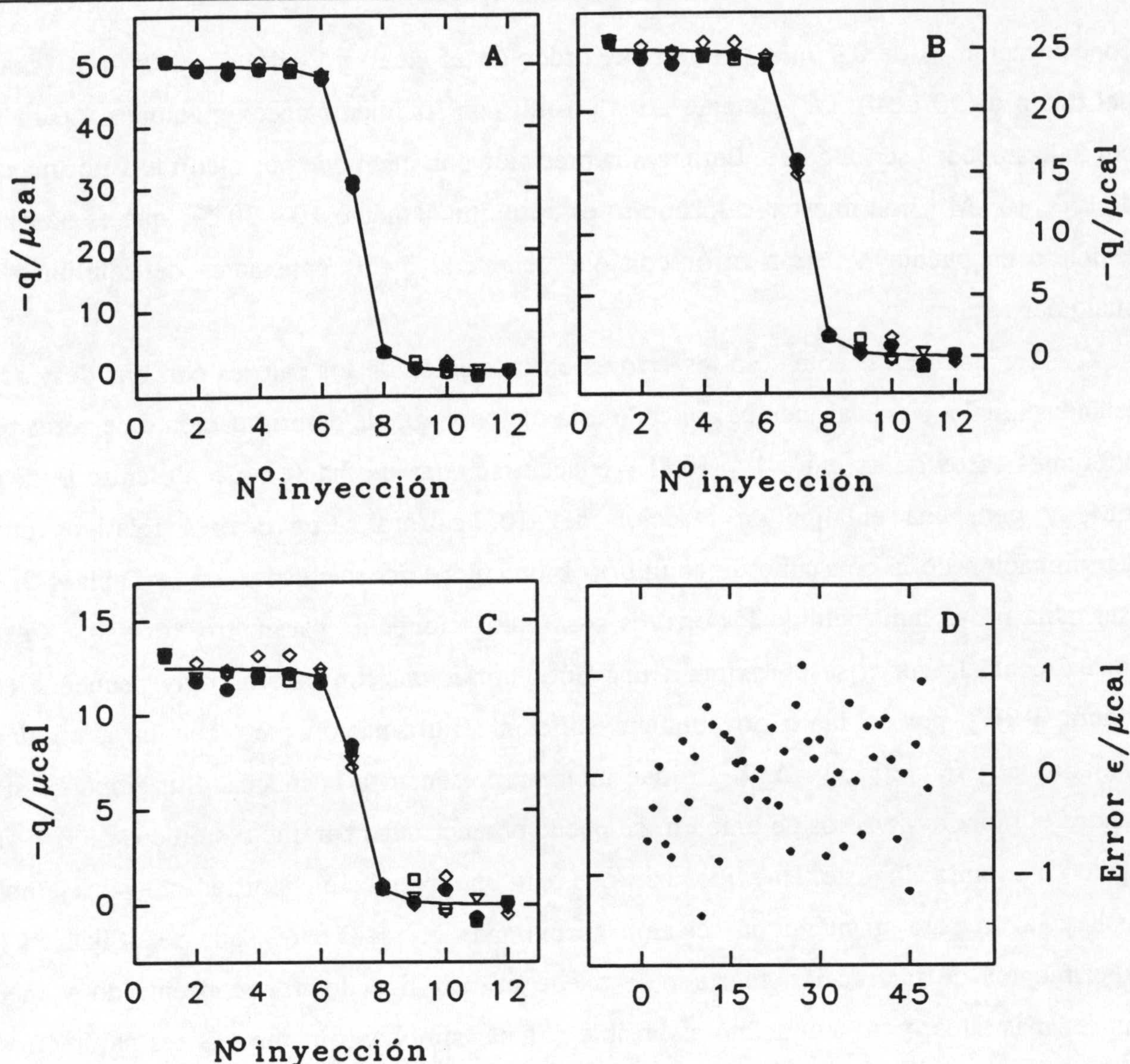


Figura 4-8: en cada parte A,B y C, la línea une puntos simulados para una valoración calorimétrica de una macromolécula con 1 sitio para $k_c=1000$ y tres concentraciones diferentes; 0.2 mM, 0.1 mM y 0.05 mM respectivamente. La concentración del ligando en la jeringa es 2.5 veces más concentrado que la macromolécula y la entalpía de la reacción es -10 kcal/mol. Los puntos en forma de círculos, rombos, cuadrados y triángulos corresponden a los calores simulados de la curva en trazo continuo cuando se les asigna un error aleatorio ϵ que sigue una distribución normal de parámetros: $\mu = 0$ y $\sigma = 0.6 \mu\text{cal}$ (ver texto para más explicación). Los valores de los errores absolutos en cada parte A, B y C son los mismos, y se representan en la parte D en donde se ve que el 68 % de los mismos están comprendidos entre 0.6 y $-0.6 \mu\text{cal}$. Los parámetros del ajuste n , k y ΔH de las cuatro simulaciones con errores se dan en la Tabla 4-1, a partir de los cuales se ha estimado errores en el valor de la constante de equilibrio k del 6% (A), 10% (B) y 20% (C), con un margen de confianza del 68%.

concentración es de 0.1 mM (calores del orden de 25 μcal) y 20% para 0.05 mM (calores del orden de 10 μcal). Obviamente estos errores son solamente aproximaciones y para más confianza pueden ser el doble. Entonces la precisión con que podemos medir el valor máximo de k de 10^7 M^{-1} con nuestro calorímetro es aproximadamente 10 - 20 %, que es aceptable teniendo en cuenta del gran error con que se puede medir constantes de equilibrio por cualquier técnica.

Teniendo en cuenta sólo los errores en la medida de los calores con una desviación estándar igual a 0.6 μcal , hemos aplicado esta metodología de determinación de errores para diferentes casos de k_c entre 1 y 1000 y concentraciones de macromolécula entre 0.05 y 1 mM, y para una entalpía de reacción de -10 kcal/mol. Los errores relativos en la determinación de la constante de equilibrio k obtenidos así se ilustran en la Tabla 4-2. En esta tabla no se han incluido los errores para valoraciones de parámetro $k_c = 0.1$ ya que normalmente la curva se aproxima a una línea horizontal con calores muy pequeños (ver Figura 4-6) y por lo tanto no contiene suficiente información para que haya un único conjunto de parámetros k , ΔH° y n que mejor representan a la misma. Sin embargo si se conoce el número de sitios de unión n , se puede obtener unos parámetros únicos de k y ΔH° fijando n durante el ajuste. Hay que decir que para una interacción débil, $k_c < 1$ por ejemplo, no hay razón para mantener la relación aproximada $X_J = 2.5 M_0$ que se utiliza en los experimentos de interacción fuerte y se puede utilizar ligando más concentrado y medir calores más altos, pero aún así no es posible obtener simultáneamente los tres parámetros a partir de los ajustes.

Hasta ahora se ha visto solamente el efecto de los errores en los calores medidos q sobre los parámetros termodinámicos obtenidos en el análisis. Si ahora consideramos que los calores se miden con alta precisión ($\epsilon=0$), podemos ver de forma aproximada la influencia de los errores de las concentraciones de los dos reactivos sobre dichos parámetros. Para ello se ha simulado una valoración de parámetro $k_c = 20$ ($M_0 = 0.2 \text{ mM}$, $X_J = 0.5 \text{ mM}$, $k = 10^5 \text{ M}^{-1}$, $\Delta H^\circ = -10 \text{ kcal/mol}$ y $n = 1$) y después se ha analizado la misma fijando en el proceso de ajuste las concentraciones de la macromolécula y el ligando en valores hasta un 2% diferentes del utilizado en la simulación. No se ha utilizado una distribución aleatoria de dicho error sino que se han tratado sólo casos extremos. Los parámetros de estos ajustes se exponen en la Tabla 4-3.

Tabla 4-1

Parámetros termodinámicos del ajuste de las valoraciones calorimétricas de la Figura 4-8, simuladas con errores.

c/mM	k /10 ⁷ M ⁻¹	ΔH° /kcal mol ⁻¹	n	DS
0.2	0.454	-10.11	1.00	0.55
	0.519	-10.00	1.00	0.37
	0.507	-09.93	1.00	0.52
	0.486	-09.96	1.00	0.54
valor medio	0.49±0.03	-10.00±0.08	1.00	
0.1	0.833	-10.21	1.00	0.55
	1.08	-10.00	1.00	0.37
	1.04	-09.86	1.01	0.52
	0.952	-09.91	1.01	0.54
valor medio	0.98±0.11	-10.00±0.16	1.00	
0.05	1.44	-10.42	0.99	0.55
	2.34	-10.00	1.00	0.37
	2.27	-09.73	1.02	0.52
	1.87	-09.83	1.02	0.54
valor medio	1.98±0.4	-10.00±0.3	1.01±0.02	

DS: desviación estándar del ajuste.

Los errores corresponden a 1 desviación estándar del valor medio, lo que significa que el intervalo de confianza es del 68%. Si se multiplican por un factor de dos, la confianza será del 95%.

A partir de la Tabla 4-3 se puede comprobar que un error del 2% en la concentración de la macromolécula se traduce por un error del 2% en solamente el número de sitios y no tiene efecto sobre k y ΔH° . Sin embargo un error en la concentración de ligando afecta a los tres parámetros simultáneamente con el mismo error. Por consiguiente la precisión en k y ΔH° depende mucho de la precisión en la determinación de la concentración de ligando y no

Tabla 4-2

Estimación de los errores relativos en k para diferentes valores de k_c y c . Los valores corresponden a una desviación estándar en la media de valores de k obtenidos en el ajuste de cuatro simulaciones, y por consiguiente el intervalo de confianza es del 68%.

c/mM	k _c			
	1	10	100	1000
0.05	X	20	10	20
0.1	50	10	6	10
0.2	25	5	3	6
0.5	10	2	1	5
1	6	1	1	2

X significa que los calores medidos serán por debajo de 10 μcal .

de la macromolécula.

En cualquier caso podemos concluir que si a uno le interesa medir solamente ΔH° y n , puede trabajar en condiciones de unión fuerte $k_c > 1000$ en donde estos dos parámetros se determinan con más precisión. En este caso, si no es posible utilizar macromolécula muy concentrada para aumentar la fuerza de unión, se puede poner el ligando en la célula en lugar de la macromolécula ya que generalmente el ligando es una pequeña molécula que se puede preparar en concentraciones relativamente altas, lo cual permitirá además ahorrar macromolécula. En caso contrario tiene que trabajar en condiciones óptimas de k_c entre 1 y 1000 en donde k puede determinarse aunque a costa de pérdida en la precisión en la medida de ΔH° y n en comparación con la unión fuerte. Si la constante de equilibrio es muy baja y no es posible trabajar en esta ventana de k_c , se tiene que conocer el número de sitios de unión que se fija en el ajuste y obviamente la precisión en k y ΔH° será reducida. En general, durante el ajuste de cualquier valoración calorimétrica es más conveniente dejar el n como parámetro ajustable aunque se conozca la estequiometría de la reacción, ya que el valor del mismo refleja bien los errores que se cometen en la medida de las concentraciones.

Tabla 4-3

Parámetros obtenidos en el ajuste de una valoración simulada con los parámetros $M_0 = 0.2$ mM, $X_J = 0.5$ mM, $k = 10^5$ M⁻¹, $\Delta H^\circ = -10$ kcal/mol y $n = 1$, considerando diferentes valores para las concentraciones de los reactivos.

M_0 /mM	X_J /mM	n	$k/10^5$ M ⁻¹	ΔH° /kcal/mol ⁻¹
0.200	0.50	1.00	1.00	-10.00
0.200	0.51	1.02	0.98	-09.80
0.200	0.49	0.98	1.02	-10.20
0.204	0.50	0.98	1.00	-10.00
0.196	0.50	1.02	1.00	-10.00
0.204	0.51	1.00	0.98	-09.80
0.196	0.49	1.00	1.02	-10.20
0.204	0.49	0.96	1.02	-10.20
0.196	0.51	1.04	0.98	-09.80

4.2.2 Comprobación Experimental.

En esta sección comprobaremos experimentalmente los resultados obtenidos en las simulaciones realizadas en la sección anterior, fundamentalmente en lo que concierne al rango de valores de kc (1-1000) que permiten la determinación de constantes de equilibrio a partir del análisis de una valoración calorimétrica.

Para comprobar la capacidad de nuestro calorímetro en la determinación de constantes de equilibrio cerca del límite teórico superior hemos escogido la reacción β -tripsina-STI. La constante de equilibrio para esta asociación fue determinada potenciométricamente por Laskowski y Finkenstadt (1972) en función del pH, y la variación en la entalpía de la misma fue determinada por Barnhill y Trowbridge (1975), y Yung y Trowbridge (1980) en función del pH también. La constante de equilibrio adquiere un valor de aproximadamente 10^{10} M⁻¹ en torno a pH 6.5. Por debajo de pH 4.6, el valor de la constante se hace menor a 10^7 M⁻¹. A pH más ácidos la tripsina tiene una actividad más baja que a pH alcalinos, lo cual estabiliza la tripsina contra su autólisis a pH ácido. Dadas estas consideraciones hemos decidido trabajar con este sistema a pH 4.5. Se ha evitado también trabajar por debajo de pH

4.25 en donde la reacción de la tripsina con su inhibidor transcurre en dos etapas: la primera es la formación del complejo, etapa rápida, que se sigue con la isomerización lenta de uno de los reactivos (Laskowski y Finkenstadt, 1972) y por lo tanto los parámetros termodinámicos determinados a pH 4.5 no contienen contribuciones del fenómeno de isomerización. Dada de un lado la no homogeneidad de las preparaciones comerciales de STI que difiere de una casa a otra (Bieth y Frechin, 1974) y de otro lado la gran dependencia de la constante de equilibrio con el pH, hemos decidido determinar en este trabajo de forma independiente la constante de equilibrio que vamos a utilizar como referencia para los experimentos calorimétricos. Esta determinación la hemos realizado a partir de medidas de actividad enzimática. Hay que decir que este sistema ha resultado un poco complicado debido al grado de pureza de las muestras y al autólisis de la tripsina, y a también a la dificultad de preparar muestras suficientemente concentradas.

A efecto de estudiar el comportamiento del calorímetro para valores bajos de k_c hemos escogido la reacción de la ribonucleasa A con 3'CMP, de la que se poseen datos de la variación de entalpía y la constante de equilibrio medidos por Bolen et al. (1971) por calorimetría de flujo a diferentes fuerzas iónicas y pH 5.5. La constante de equilibrio adquiere un valor de aproximadamente 40000 M^{-1} a fuerza iónica 50 mM y 6000 M^{-1} a 500 mM. Por lo cual hemos decidido trabajar con este sistema a 500 mM de fuerza iónica. Los experimentos se han realizado para un valor de k_c de 3.

Para valores óptimos de k_c (10-100) en la determinación de la constante de equilibrio, hemos trabajado con la reacción de la ribonucleasa A con 2'CMP a pH 5.5 de la que se poseen bastantes datos de la entalpía y k determinados en el calorímetro de valoración de Brandts (Wiseman et al., 1989). Además, dado que este calorímetro es el único comercializado hasta la fecha de hoy (con el nombre Omega) hemos considerado conveniente comparar los parámetros termodinámicos que mediríamos con nuestro calorímetro con los medidos en el Omega. Hemos trabajado también con el mismo sistema en las condiciones de Anderson et al. (1968) que determinaron la constante de equilibrio de la reacción por espectroscopía diferencial. Nosotros, además de los experimentos calorimétricos hemos llevado a cabo también experimentos potenciométricos con el mismo sistema con el objeto de diversificar los métodos de medida de constantes de equilibrio y que la comparación sea más objetiva. Hay que decir que los datos de la ribonucleasa A se utilizan con frecuencia en

la evaluación de calorímetros dedicados en general al estudio de las biomoléculas.

Reacción de β -tripsina con su inhibidor:

A efectos de contar con una medida de la constante de equilibrio entre la tripsina y el inhibidor que sirviera de referencia para los experimentos calorimétricos se hizo una determinación independiente de la misma basada en medidas de actividad enzimática. Para ello, se evaluó la velocidad inicial v_0 de la reacción catalizada por la tripsina tal como se describió en Materiales y Métodos a diferentes concentraciones iniciales de TAME en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor. Los valores de v_0 obtenidos en un experimento a partir de la variación inicial de la absorbancia con el tiempo, de la cual se puede ver un ejemplo en la Figura 4-4, se muestran en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4

Velocidades iniciales del hidrólisis de TAME por β -tripsina de concentración 3.5×10^{-6} M en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor STI: 0 M (a), 0.5×10^{-6} M (b), 0.67×10^{-6} M (c) y 10^{-6} M (d). Las condiciones experimentales son las mismas que se dan en el pie de la Figura 4-9.

$10^{-3}/[\text{TAME}]$ (M^{-1})	^a $10^{-2}/v_0$	^b $10^{-2}/v_0$	^c $10^{-2}/v_0$	^d $10^{-2}/v_0$
	(min M^{-1})			
1	201	243	260	301
5	213	260	284	328
8	214	267	292	338
10	222	266	292	344

En la parte superior de la Figura 4-9 se da una gráfica de Lineweaver-Burk (representación del inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentración de sustrato). Cada una de las líneas corresponde a una misma concentración de inhibidor en el experimento. Las cuatro líneas no coinciden en un punto del eje de la ordenada ni son paralelas, lo cual indica que la inhibición es no-competitiva (Engel, 1977; Gutfreund, 1975). En este caso el sustrato y el inhibidor pueden unirse simultáneamente a la enzima y la inhibición de la hidrólisis del sustrato está descrita por el esquema:

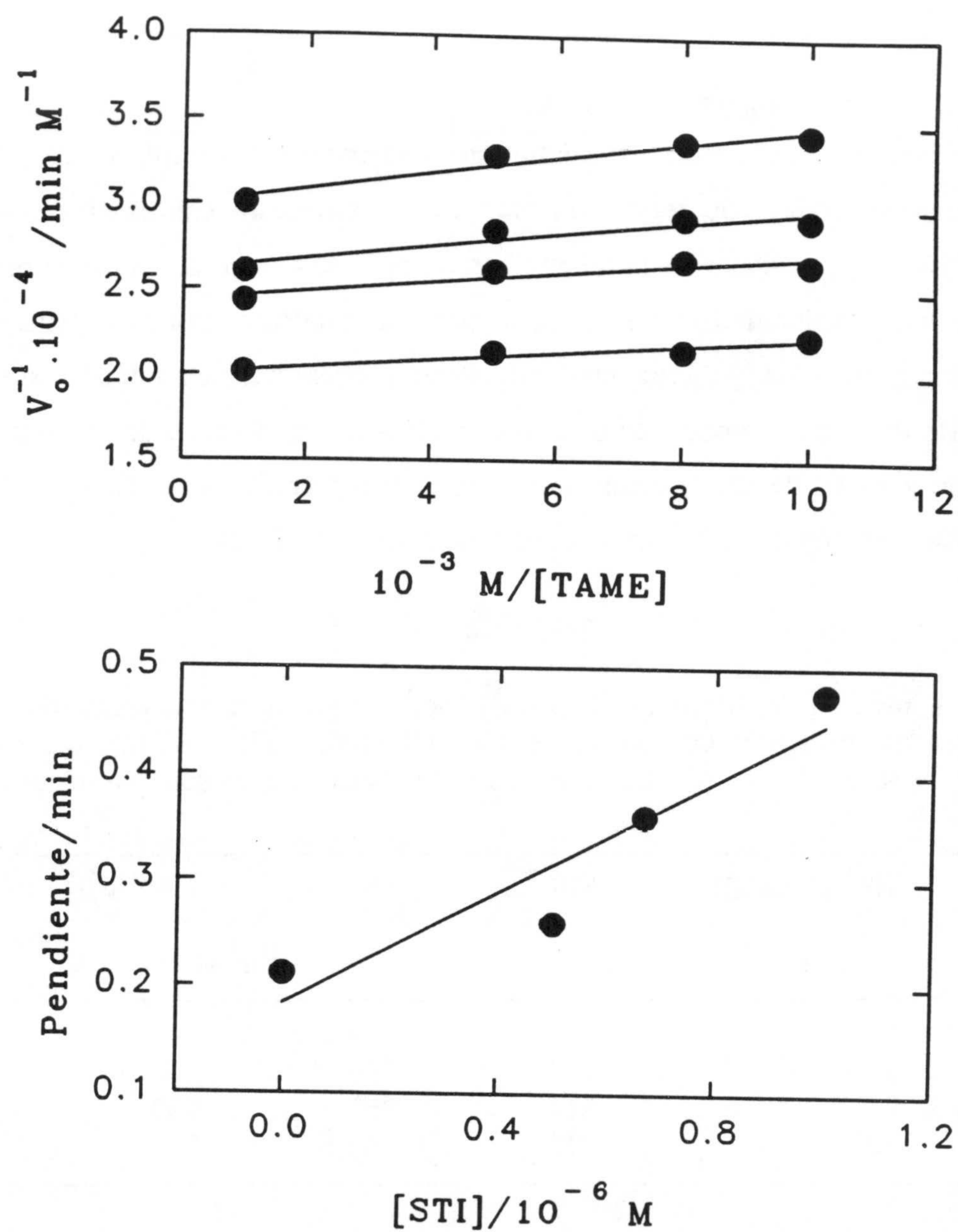
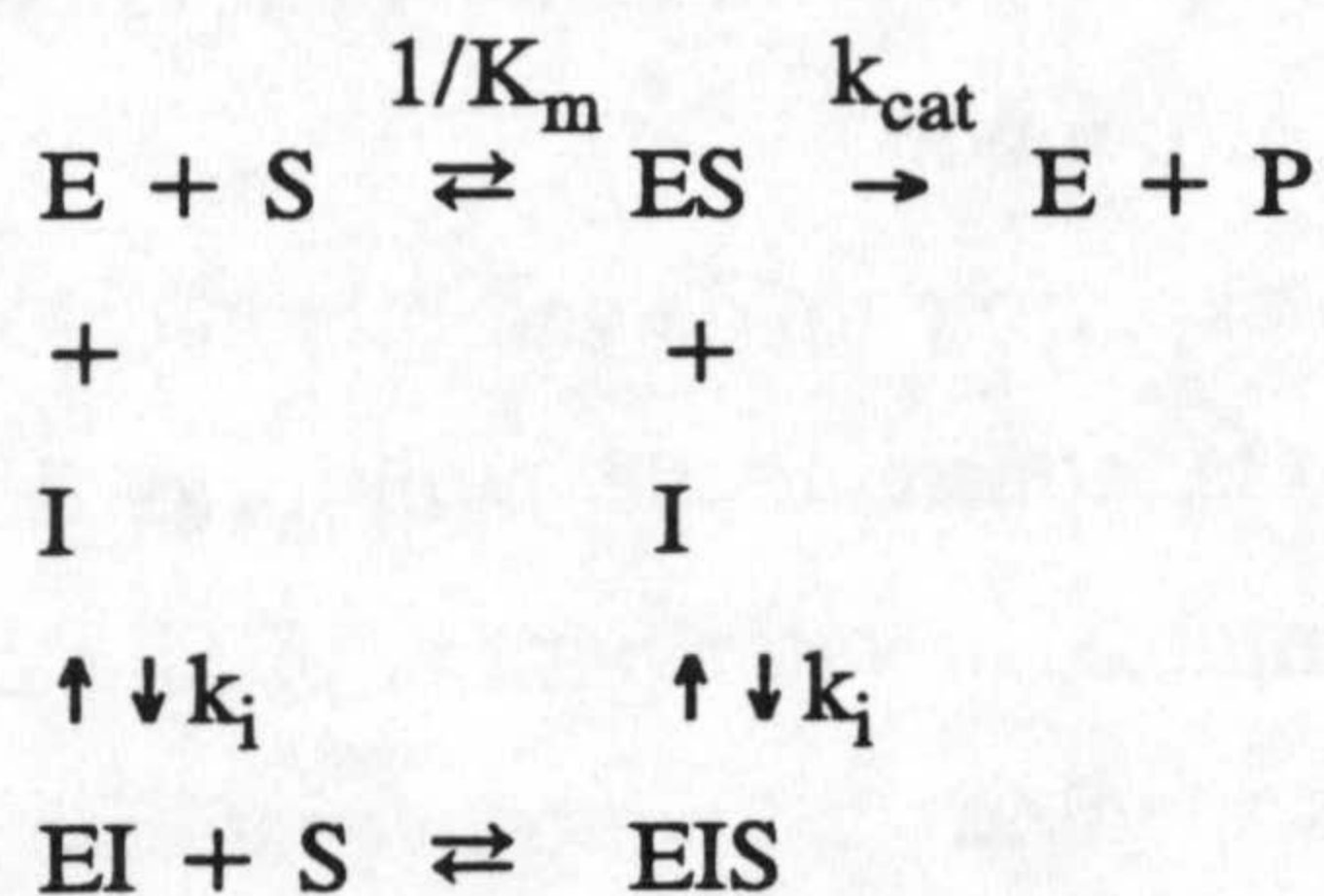


Figura 4-9: Gráfica superior: Representación del inverso de la velocidad inicial del hidrólisis de TAME frente al inverso de su concentración inicial para experimentos realizados en ausencia (línea inferior) y presencia de inhibidor a $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$, $0.67 \times 10^{-6} \text{ M}$ y 10^{-6} M . La concentración de la tripsina era constante en todos los experimentos: $3.5 \times 10^{-6} \text{ M}$. Los experimentos se realizaron en AcK 25 mM, CaCl_2 10 mM, pH 4.5 y temperatura 25°C . Gráfica inferior: Representación de las pendientes de las líneas de la gráfica superior frente a las concentraciones de inhibidor para cada una de ellas. Del cociente entre la pendiente y la ordenada en el origen se obtuvo un valor para la constante de equilibrio de inhibición k_i de β -tripsina de $(1.4 \pm 0.7) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.



Modelo para una inhibición no competitiva.

en donde E, S, I y P representan a la enzima, sustrato, inhibidor y producto respectivamente. k_{cat} es la constante catalítica de la reacción, K_m es la constante de Michaelis y k_i es la constante de equilibrio de inhibición. Se ha supuesto que esta última es la misma para la inhibición de la enzima libre como el complejo enzima-sustrato. Aplicando la teoría del estado estacionario a las tres especies de la enzima E, ES y ESI, se obtiene la siguiente ecuación que relaciona la velocidad inicial v_o del hidrólisis del sustrato en función de la concentración del sustrato y del inhibidor (Gutfreund, 1975):

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1+k_i[I]}{k_{cat}[E_o]} + \frac{K_m(1+k_i[I])}{k_{cat}[E_o]} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (4.8)$$

De la representación de las pendientes de las líneas de la Figura 4-9 frente a las concentraciones de inhibidor correspondientes a cada una de ellas, que se muestra en la parte inferior de la misma figura, se determina la constante de equilibrio de inhibición k_i . Los resultados de tres determinaciones independientes se muestran en la última columna de la Tabla 4-5. El valor medio de k_i está en torno a $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

En los experimentos calorimétricos realizados con tripsina y su inhibidor, se ha colocado el inhibidor a una concentración de aproximadamente 0.07 mM en el bulbo de reacción a 25°C y se ha valorado con inyecciones de 10 μl de β -tripsina de concentración aproximadamente 0.15 mM, en el tampón AcK 25 mM, CaCl_2 10 mM, pH 4.5. Se colocó la disolución de inhibidor en el bulbo de reacción porque en las condiciones del medio en que se ha realizado el experimento el límite de la solubilidad del inhibidor es precisamente la concentración utilizada. Dado que el ligando debe estar al menos 2.5 veces más concentrado, si éste fuese el inhibidor, la concentración de tripsina en el bulbo sería tal que los calores

medidos en el experimento serían muy bajos. Previamente al experimento tanto la β -tripsina como el inhibidor se dializaron frente al tampón.

En la Figura 4-10 se muestra un experimento de valoración calorimétrica del inhibidor con la β -tripsina. Con el valor para la constante de equilibrio determinado antes y la concentración del inhibidor utilizada implica un valor para el producto kc en el experimento en torno a 100. Los primeros calores medidos estuvieron en torno a las 20 μcal . Al no poderse elevar la concentración de inhibidor no se pudieron obtener calores más altos. En la misma figura se puede ver un experimento de dilución de β -tripsina en donde los calores medidos han sido analizados de acuerdo con la Ecuaciones (4.2) para obtener la expresión siguiente de la entalpía molar relativa aparente: $\phi L_2 = (-207 \pm 12) \times [\text{tripsina}]^{1/2} \text{ kcal/mol}$.

Los calores medidos en la reacción de las dos proteínas han sido corregidos primero por los calores constantes correspondientes a los de agitación y de inyección de tampón en tampón (del orden de -1 μcal) y después se ajustaron al modelo de n sitios independientes e idénticos, teniendo en cuenta de la dilución de la tripsina como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados de los ajustes de cuatro experimentos independientes se muestran en la Tabla 4-5. El valor medio para la constante de equilibrio es $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, que coincide con el de la constante de equilibrio determinada mediante medidas cinéticas. Hay que notar que a pesar de los calores pequeños medidos en las primeras inyecciones y de la dificultad de controlar la concentración activa del reactivo de la jeringa (tripsina), los errores del 40% en k y 7% en ΔH° obtenidos son aún aceptables.

Reacción de ribonucleasa A con 3'CMP:

Los experimentos calorimétricos con la ribonucleasa y 3'CMP se realizaron en las condiciones de Bolen et al. (1971): AcNa 0.5 M, pH 5.5 y a una concentración de ribonucleasa 0.35 mM. En la jeringa se ha colocado 3'CMP 0.95 mM aproximadamente y ribonucleasa a la concentración 0.35 mM. El objetivo de colocar ribonucleasa en la jeringa también es para mantener su concentración constante en el bulbo de reacción a lo largo de la valoración.

En la Figura 4-11 se recogen los calores medidos en una de las tres valoraciones realizadas de la ribonucleasa A con 3'CMP. Anteriormente al análisis de los datos, los calores se corrigieron por el calor de agitación y por el calor de inyección de tampón en

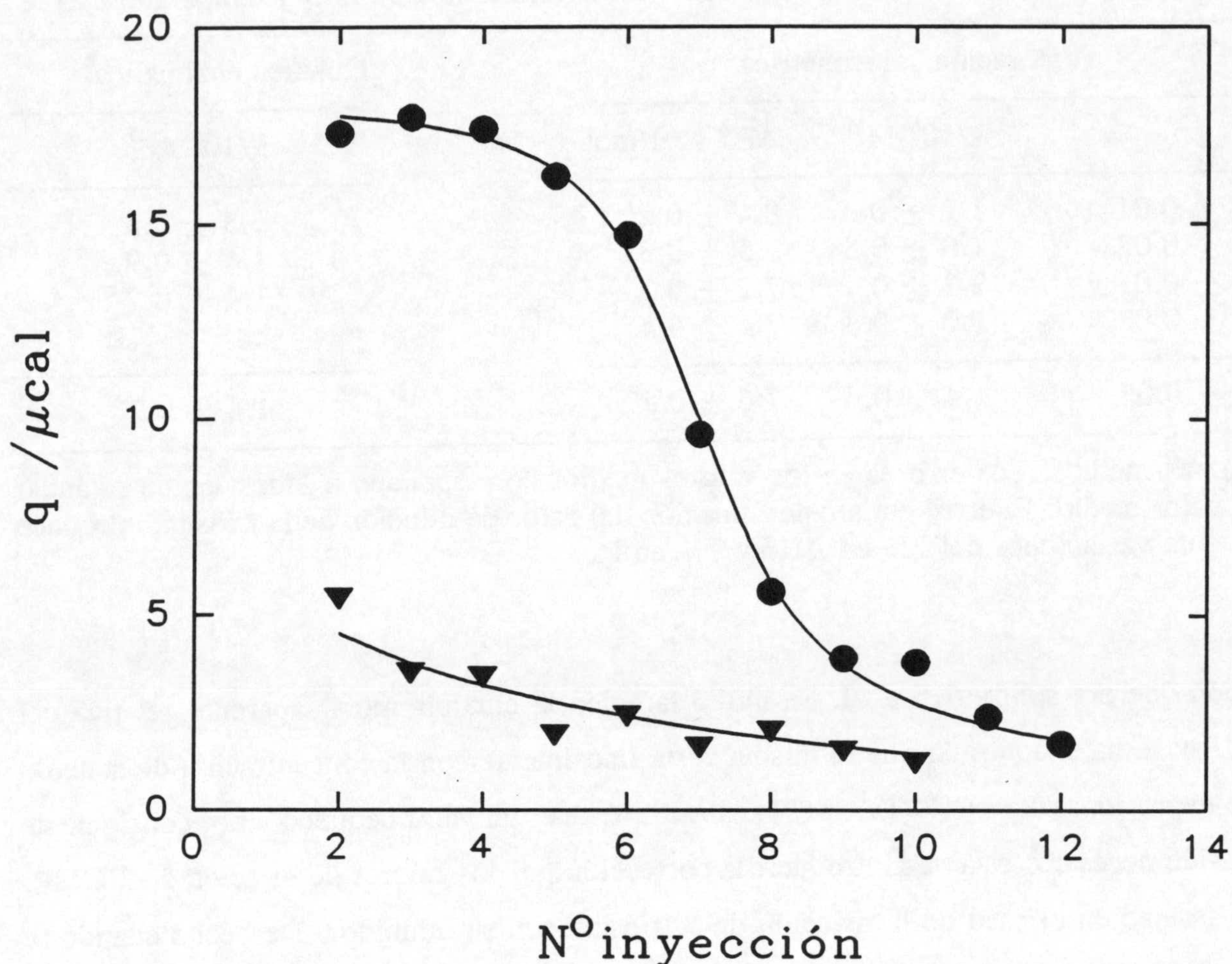


Figura 4-10: Valoración calorimétrica de inhibidor (STI) con β -tripsina a 25°C. Círculos: Calores producidos en la inyección sucesiva de 10 μ l de β -tripsina 0.16 mM (en tampón AcK 25 mM, CaCl_2 10 mM, pH 4.5) en inhibidor 0.066 mM en el mismo tampón. La línea continua es el mejor ajuste al modelo de n sitios independientes e idénticos, y los parámetros determinados en el mismo son los de la primera fila de la Tabla 4-5. La desviación estándar del ajuste es 0.5 μ cal. Triángulos: Calores producidos en la inyección sucesiva de tampón con β -tripsina 0.23 mM en tampón. La línea continua es el mejor ajuste a la Ecuación (4.2) para determinar la entalpía relativa molar aparente para la tripsina $\phi L_2 = -207 [\text{tripsina}]^{1/2}$ kcal/mol.

Tabla 4-5

Parámetros termodinámicos de la interacción de β -tripsina con el inhibidor STI medidos por calorimetría y por cinética enzimática, a pH 4.5, fuerza iónica 55 mM y temperatura 25°C.

Valoración calorimétrica			Cinética enzimática
n	k/10 ⁶ M ⁻¹	ΔH° kcal/mol	k/10 ⁶ M ⁻¹
0.93 ± 0.01	1.2 ± 0.3	8.4 ± 0.2	1.3 ± 0.3
1.04 ± 0.02	1.0 ± 0.3	7.5 ± 0.3	1.6 ± 0.9
0.96 ± 0.01	2.3 ± 0.7	7.2 ± 0.2	1.4 ± 0.7
1.01 ± 0.02	1.0 ± 0.3	7.4 ± 0.4	
0.99 ± 0.05*	1.4 ± 0.6*	7.6 ± 0.5*	1.4 ± 0.2*

* Valores medios. Los errores en los valores medios corresponden a 1 desviación estándar en el valor medio. El error en la determinación del calor de dilución de la tripsina introduce solamente variaciones del 2% en ΔH° y 7% en k.

tampón que era sobre $-1.5 \mu\text{cal}$. Se midió también la entalpía molar aparente relativa del 3'CMP y se ha encontrado que la misma varía linealmente con la concentración de acuerdo con la expresión: $\phi L_2 = -4 \times [3'\text{CMP}] \text{ kcal/mol}$. Este es un valor pequeño y por consiguiente no ha sido necesario esta vez introducir la corrección por los calores de dilución de 3'CMP, como se hizo en el caso de la reacción de β -tripsina con su inhibidor. De hecho cuando se diluye 3'CMP a la concentración utilizada en el experimento en tampón, el calor medido es indistinguible del calor de inyección de tampón en tampón. En la Tabla 4-6 se muestran los parámetros termodinámicos obtenidos a partir del ajuste de los tres experimentos. Se comprueba como nuestros datos experimentales coinciden dentro del error experimental con los de Bolen et al. (1971) que también se muestran en la misma tabla a efectos de comparación. A pesar de que el valor del parámetro kc en los experimentos fue 3, que es muy próximo al valor 1 que hemos establecido como límite inferior de la ventana kc experimental, los errores en los parámetros termodinámicos obtenidos del 22% en k y del 11% en ΔH° son aceptables.

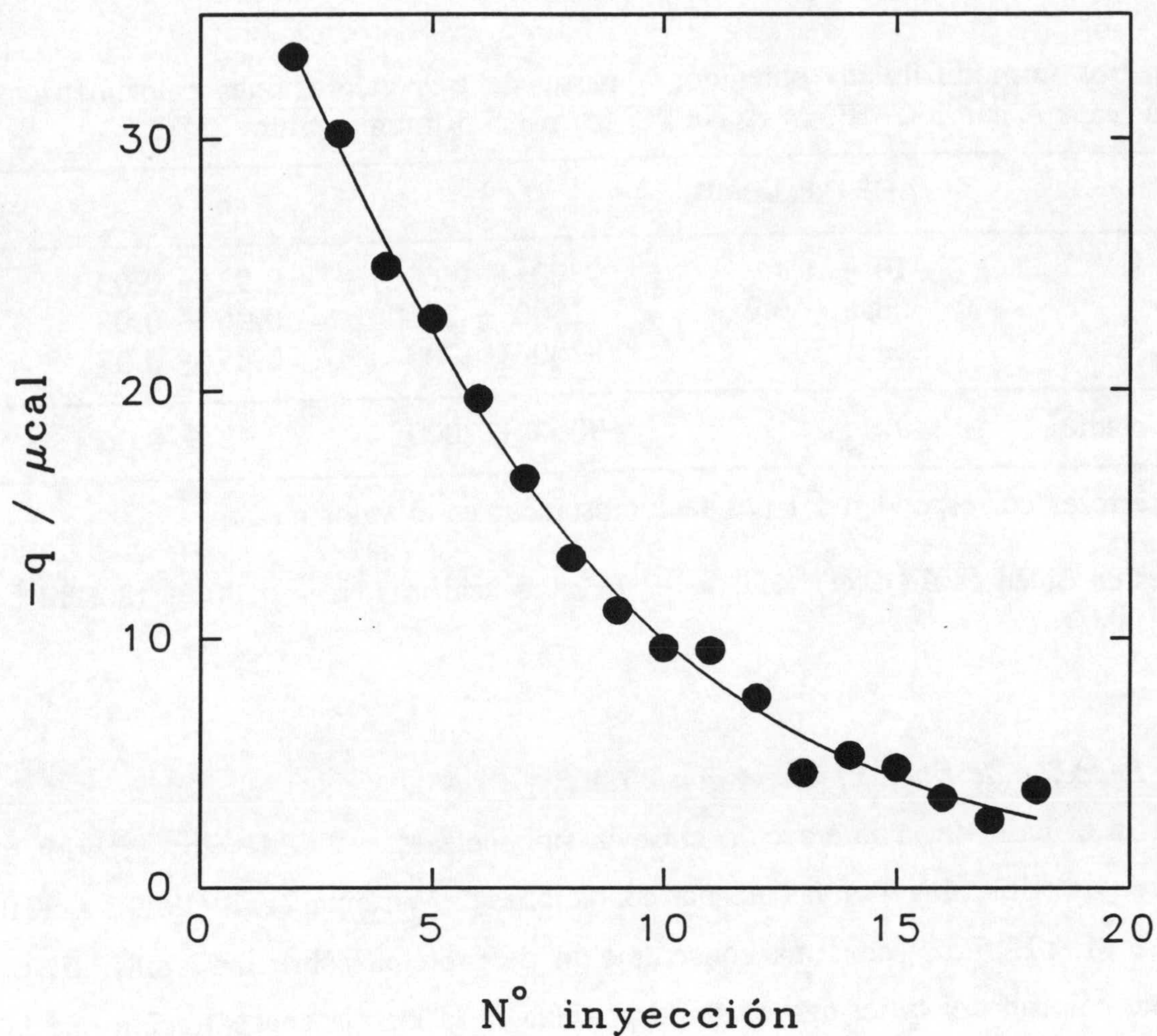


Figura 4-11: Valoración calorimétrica de ribonucleasa A 0.35 mM en tampón AcNa 0.5 M, pH 5.5 con 3'CMP 0.95 mM, ribonucleasa A 0.35 mM en el mismo tampón. La línea representa el mejor ajuste al modelo de n sitios independientes e idénticos, con los parámetros $\Delta H^\circ = -10 \pm 1.4$ kcal/mol, $k = 7300 \pm 1600$ M⁻¹ y $n = 0.92 \pm 0.03$. La desviación estándar del ajuste es 0.7 μcal.

Tabla 4-6

Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de tres valoraciones calorimétricas de la ribonucleasa A con 3'CMP, en AcNa 0.5 M, pH 5.5 y temperatura 25°C.

	ΔH° (kcal/mol)	k (M ⁻¹)	n
	-10 ± 1.4	7300 ± 1600	0.92 ± 0.03
	-08.1 ± 0.7	11500 ± 2400	0.96 ± 0.02
	-09,2 ± 1	8200 ± 1700	0.85 ± 0.02
Valor medio*	-9 ± 1	9000 ± 2000	0.91 ± 0.06

* Los errores corresponden a 1 desviación estándar en el valor medio.

Valores de Bolen et al.(1971): $\Delta H^\circ = -9.7 \pm 0.5$ kcal/mol, $k = 6100 \pm 1800$ M⁻¹ y $n = 0.99 \pm 0.05$.

Reacción de ribonucleasa A con 2'CMP:

En el caso de la interacción entre la ribonucleasa y 2'CMP, los experimentos se realizaron en primer lugar en las mismas condiciones de Wiseman et al. (1989): AcK 0.2 M, KCl 0.2 M, pH 5.5 y con una concentración de proteína sobre 0.17 mM. El reactivo valorante colocado en la jeringa contenía proteína, a la misma concentración que la de la célula, y ligando en exceso; aproximadamente 2.5 veces más concentrado que la proteína. Se ha colocado proteína en la jeringa para evitar su dilución en el bulbo de reacción ya que según Wiseman et al. (1989) se ha observado una dependencia de la constante de equilibrio con la concentración de la proteína que se ha explicado en su día por la agregación de la proteína, aunque después (Brandts y Lin, 1990) la han atribuido más bien a la dimerización de 2'CMP que tiene un efecto sobre la constante de equilibrio cuando la concentración del mismo es mayor de 1 mM aproximadamente. En las mismas condiciones se hizo un experimento adicional sin proteína en la jeringa. Otros experimentos calorimétricos se realizaron con ribonucleasa A y 2'CMP en las condiciones de Anderson et al. (1968): Tris 50 mM, AcNa 50 mM, KNO₃ 0.1 M, pH 6.5, que corresponde a fuerza iónica 200 mM.

En la Figura 4-12A, se muestra una valoración calorimétrica de la ribonucleasa A con 2'CMP en las condiciones de Wiseman. Los calores se corrigieron por el calor de agitación

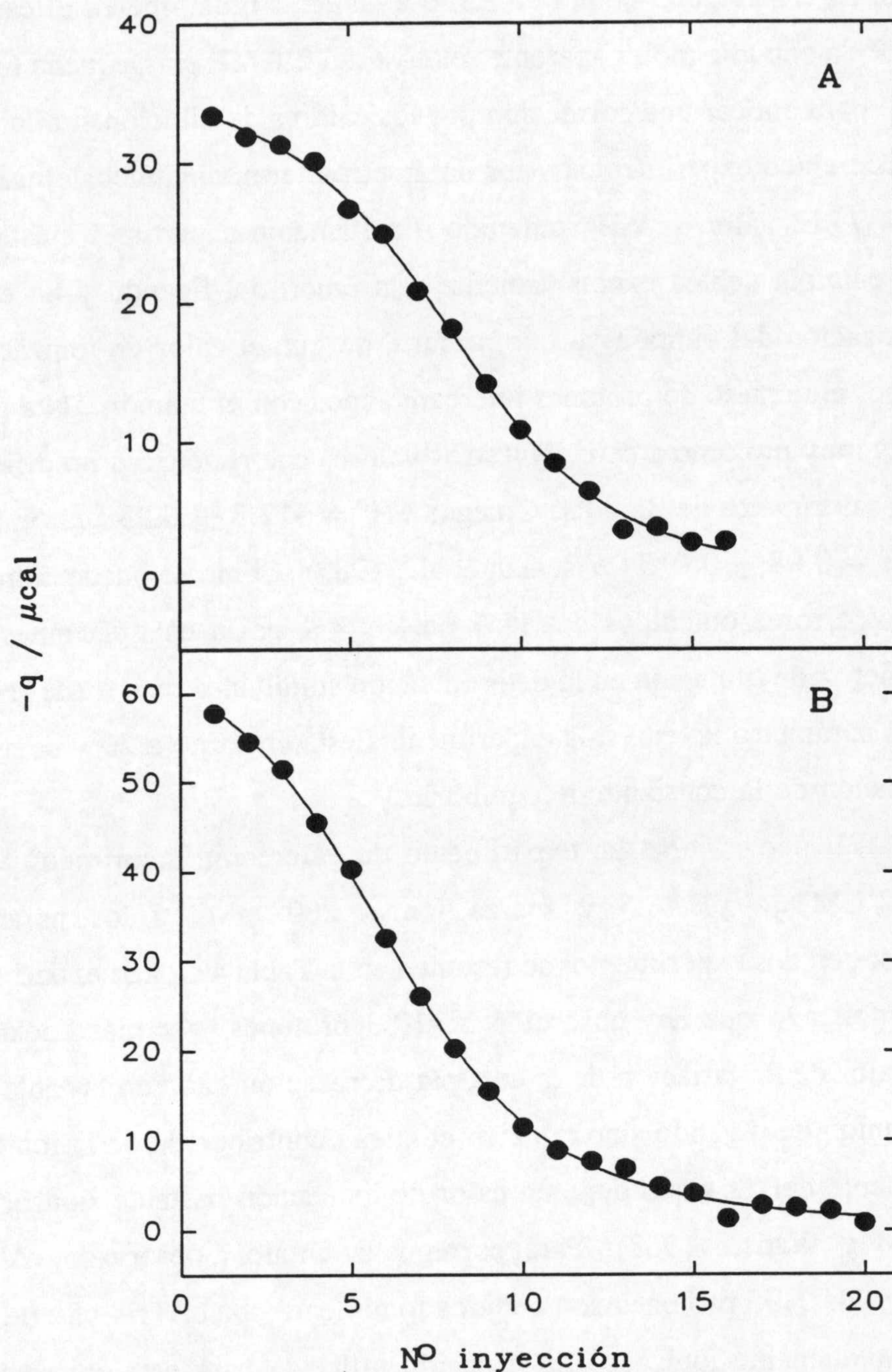


Figura 4-12: A. Valoración de ribonucleasa A 0.17 mM a 28°C, en tampón AcK 0.2 M, KCl 0.2 M y pH 5.5, con inyecciones de 10 μl de 2'CMP 0.45 mM y ribonucleasa A 0.17 mM en el mismo tampón. La línea continua corresponde al ajuste de los datos experimentales con los parámetros que se recogen en la segunda fila de la Tabla 4-7. La desviación estándar del ajuste es 0.5 μcal . B. Valoración de ribonucleasa A 0.22 mM a 25°C, en tampón AcNa 0.05 M, Tris 0.05 M, KNO₃ 0.1 M y pH 6.5, con inyecciones de 5 μl de 2'CMP 1.2 mM en el mismo tampón. Los parámetros del ajuste (línea continua) se dan en la primera fila de la Tabla 4-8. La desviación estándar del ajuste es 0.6 μcal .

y de inyección de tampón en tampón que era en torno a $-1 \mu\text{cal}$. Igual que en el caso de la interacción con 3'CMP, la entalpía molar aparente relativa del 2'CMP era pequeña ($\phi L_2 = -7 \times [2'CMP] \text{ kcal/mol}$) para aplicar una corrección por los calores de dilución similar a la de la tripsina. Se realizaron cinco experimentos y los parámetros termodinámicos obtenidos se recogen en la Tabla 4-7. El valor de ΔH° obtenido directamente a partir el ajuste puede considerarse como la entalpía debida exclusivamente a la unión del ligando y no contiene contribución de la ionización del tampón ya que, a parte de que el calor de ionización del acetato es muy pequeño, el número de protones intercambiados con el tampón ΔN a pH 5.5, medido por pH-Stat, es muy próximo a cero. Nuestros valores calorimétricos no difieren de los determinados en el calorímetro de Brandts, Omega: $\Delta H^\circ = -12.3 \pm 0.25 \text{ kcal/mol}$, $k = 98000 \pm 2200 \text{ M}^{-1}$ y $n = 0.98 \pm 0.015$ (Wiseman et al., 1989). Como se puede comprobar en la tabla anterior, los errores obtenidos del 15% en k y 4% en la entalpía muestran la capacidad de la calorimetría de titulación en la determinación simultánea de k e ΔH° con una precisión aceptable. El parámetro kc en estos experimentos está en torno a 20 y es un buen valor para la determinación de la constante de equilibrio.

En la Figura 4-12B puede verse un experimento de valoración calorimétrica de la ribonucleasa A con 2'CMP a pH 6.5 y fuerza iónica 200 mM, y los parámetros termodinámicos obtenidos en dos experimentos se resumen en la Tabla 4-8. Los experimentos potenciométricos han mostrado que hay absorción de 1.03 protones (ver más adelante) y consiguientemente el valor de la variación de la entalpía de reacción dado en la tabla no es debido solamente a la unión del ligando sino también contiene contribución de la ionización del tampón, y precisamente del Tris que tiene un calor de ionización bastante significativo, 11.3 kcal/mol (Ojelund y Wadso, 1968). Para corregir la entalpía observada, $\Delta H^\circ_{\text{obs}}$, podemos considerar que los 1.06 protones son cedidos totalmente por el Tris ya que a pH 6.5 el acetato está completamente ionizado. La ecuación utilizada para esta corrección es (Hinz et al., 1971):

$$\Delta H^\circ_{\text{obs}} = \Delta H^\circ + \Delta N \Delta H^\circ_{\text{ion}} \quad (4.9)$$

que da un valor neto de -23.3 kcal/mol para la variación en la entalpía de unión del ligando ΔH° . El valor de kc en estos experimentos está en torno a 7 y los errores en k y ΔH° son del 12% y 4% respectivamente.

Tabla 4-7

Parámetros termodinámicos de la interacción de la ribonucleasa A con 2'CMP en AcK 0.2 M, KCl 0.2 M pH 5.5 y temperatura 28°C.

	n	k/10 ³ M ⁻¹	ΔH° kcal/mol
	1.00 ± 0.01	129 ± 17	-12.0 ± 0.3
	1.00 ± 0.01	105 ± 10	-12.6 ± 0.3
	0.99 ± 0.01	136 ± 18	-11.2 ± 0.3
	0.98 ± 0.01	127 ± 15	-11.8 ± 0.3
	1.01 ± 0.01*	093 ± 6	-12.2 ± 0.2
Valor medio**	1.00 ± 0.01	118 ± 18	-12 ± 0.5

* Valores obtenidos en la valoración de la ribonucleasa A con 2'CMP solamente.

** El error corresponde a 1 desviación estándar en el valor medio.

Tabla 4-8

Parámetros termodinámicos de la interacción de ribonucleasa A con 2'CMP en Tris 50 mM, AcNa 50 mM, KNO₃ 0.1 M, pH 6.5 y temperatura 25°C

	n	k/10 ³ M ⁻¹	ΔH° kcal/mol
	0.97 ± 0.01	30 ± 3	-11.4 ± 0.3
	0.88 ± 0.02	36 ± 7	-12 ± 1
Valor medio*	0.92 ± 0.06	33 ± 4	-11.7 ± 0.4

El valor de ΔH° no es debido solamente a la unión del ligando (ver texto).

* El error corresponde a 1 desviación estándar del valor medio.

La absorción de los protones al formarse el complejo ribonucleasa-2'CMP a pH 6.5 ha sido observada a diferentes concentraciones de 2'CMP como se muestra en la Figura 4-13. Los parámetros obtenidos en el ajuste de los datos de dos experimentos a la Ecuación (4.1) se dan en la Tabla 4-9, y muestran que hay absorción de 1.06 protones cuando una molécula de 2'CMP se une a la ribonucleasa A, lo cual indica que ha habido un aumento promedio en los pK de algunos grupos, probablemente de las histidinas de la ribonucleasa que toman una

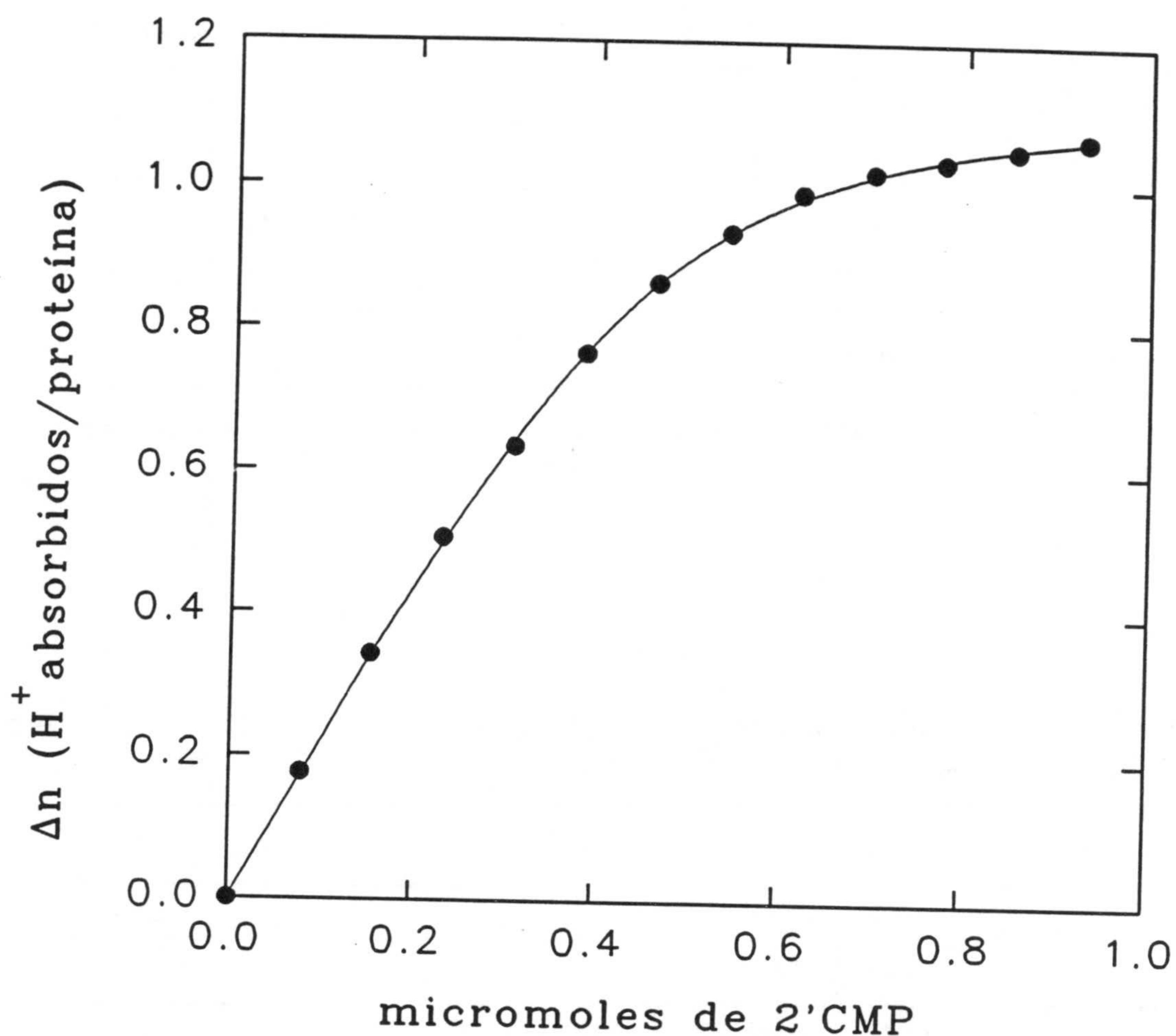


Figura 4-13: Titulación pH-Stat de la formación del complejo ribonucleasa A - 2'CMP a pH 6.5, temperatura 25°C y fuerza iónica 200 mM de KNO₃. La línea continua representa el mejor ajuste a la Ecuación (4.1) con los parámetros que se dan en la segunda fila de la Tabla 4-9. El ajuste de ha hecho con la opción "Curve Fit" del programa SigmaPlot (Jandel Co. California, USA).

carga positiva para facilitar las interacciones electrostáticas con el fosfato del ligando cargado negativamente (Flogel et al., 1975c). La constante de equilibrio k de unión obtenida a partir de los resultados potenciométricos es de $50000 \pm 4000 \text{ M}^{-1}$, que coincide con el valor de 49800 M^{-1} medido por espectroscopía diferencial (Anderson et al., 1968) y difiere solamente por 34% del valor calorimétrico que se da en la Tabla 4-8.

Tabla 4-9

Resultados potenciométricos obtenidos a partir de la valoración de ribonucleasa A con 2'CMP en KNO_3 0.2 M, pH 6.5 y temperatura 25°C . ΔN es el número de protones absorbidos por molécula de complejo formada.

	n	$k/10^3 \text{ M}^{-1}$	ΔN
	0.95 ± 0.01	53 ± 3	1.07 ± 0.01
	1.15 ± 0.01	46 ± 4	1.00 ± 0.02
Valor medio*	1.05 ± 0.14	50 ± 5	1.04 ± 0.05

* El error corresponde a 1 desviación estándar.

4.3 CONCLUSION.

En este Capítulo hemos evaluado la capacidad del calorímetro en la determinación de parámetros termodinámicos, especialmente la constante de equilibrio, para algunas interacciones moderadas entre proteínas y proteínas y moléculas pequeñas. En esta evaluación se ha utilizado como criterio de referencia el valor del parámetro adimensional kc , donde k es la constante de equilibrio del proceso de interés y c la concentración inicial de la macromolécula en el experimento. A partir de una única valoración calorimétrica se puede determinar la constante de equilibrio además de la entalpía para valores de kc comprendidos entre 1 y 1000. Por lo tanto con el instrumento se pueden determinar en un mismo y sólo experimento la variación de entalpía y la constante de equilibrio para una reacción. Los errores en la determinación de la constante de equilibrio son aceptables y no superiores a los obtenidos utilizando otras técnicas. La cantidad de material bioquímico necesaria es de sólo

0.1 μ moles de tanto la macromolécula como el ligando. El valor máximo de k que se puede medir es en torno a 10^7 M^{-1} . Dependiendo de las características particulares del problema en estudio el valor mínimo de k determinable está en torno a 10^2 M^{-1} . El único calorímetro de valoración que ha sido caracterizado en su capacidad para la determinación de constantes de equilibrio es el Omega de Wiseman et al. (1989) que puede determinar k hasta 10^8 M^{-1} . Esto es debido a la menor sensibilidad por unidad de volumen de dicho instrumento.

En todo caso es importante tener en cuenta que la determinación de k a partir de un experimento calorimétrico está restringida a situaciones sencillas, es decir cuando se trata de una interacción con un ligando de una macromolécula bien con un sólo sitio o con varios sitios independientes e idénticos. Hemos realizado simulaciones de experimentos en los que hemos comprobado que es posible la determinación de las dos constantes de equilibrio de unión del ligando a una macromolécula que posee dos sitios diferentes, así como cuando hay dos ligandos que compiten por el mismo sitio en la macromolécula, en el que el valor máximo de k determinable en nuestro calorímetro puede ser más grande que 10^7 M^{-1} . Pero no hemos realizado hasta hoy una comprobación experimental de los dos casos, por lo que no mostramos dichas simulaciones.

5 Interacción Barnasa-3'GMP

5.1 INTRODUCCION.

La caracterización químico-física de las proteínas se apoya fundamentalmente en los estudios realizados con aquellas de bajo peso molecular. Ello se debe a la facilidad del análisis y de la interpretación de los resultados de los estudios biofísicos tanto estructurales (cristalografía de rayos X, RMN) como cinéticos y termodinámicos, así como a la facilidad en realizar cálculos teóricos computacionales sobre las estructuras y las interacciones en general. Entre estas proteínas pequeñas, se han destacado las nucleasas en general, y más precisamente las ribonucleasas extracelulares con especificidad para la guanosina, como la ribonucleasa T1, la binasa, la barnasa, etc.. Esto es debido a que estas últimas tienen una gran homología en su estructura tridimensional (todas contienen un motivo estructural que consiste en una estructura α -hélice en el extremo N-terminal empaquetada contra una lamina β antiparalela en el extremo C-terminal) y además todas comparten tres residuos esenciales (His, Glu y Arg) en el sitio activo (Hill et al., 1983; Hartley, 1980). Constituyen unos sistemas convenientes para la realización de mutaciones específicas con el fin de ver la contribución y la importancia del residuo sustituido en la estabilidad de la estructura de la proteína o la función biológica de la misma. Hay que decir que la atribución de un observable experimental al residuo mutado es solamente correcta cuando esta mutación no provoca cambios en la estructura espacial de la proteína; la invarianza de la estructura tridimensional de las nucleasas anteriormente citadas a cambios puntuales en la secuencia les hace un grupo muy conveniente para dichos estudios de mutagenesis.

En esta Tesis, y dentro en general de un area de investigación que se lleva a cabo en nuestro Departamento, hemos estudiado una de esas nucleasas específicas para la guanosina, la barnasa, fundamentalmente por dos razones. En primer lugar es una proteína pequeña que contiene un sólo dominio globular, no tiene puentes disulfuros ni metales unidos, y además

hay una amplia información sobre la misma en la bibliografía. En segundo lugar se ha podido conseguir algunos mutantes de la misma de residuos específicos importantes para su estabilidad y su función.

La barnasa es una endoribonucleasa bacteriana, está presente en el *Bacillus amyloliquefaciens*, y fue purificada por primera vez por Nishimura et al. (1958). El gen de la barnasa ha sido clonado y expresado en *Escherichia coli* por Hartley (1988) por técnicas de ADN recombinante lo cual ha permitido desde entonces producir barnasa en suficiente cantidad y producir mutantes específicos de la misma (Mossakowska et al., 1989). En cuanto a su estructura, la barnasa está compuesta de una sola cadena polipeptídica de 110 amino residuos ($M = 12382$ g/mol) y no presenta puentes disulfuros, ni unión de metales (Hartley y Barker, 1972). Su estructura cristalina se ha resuelto con 2 Å de resolución (Mauguen et al., 1982), y en disolución, por RMN bi-dimensional (Bycroft et al., 1990 y 1991). Se ha encontrado la presencia de cinco estructuras β doblemente antiparalelas y dos α -hélices (Figura 5-1). Las cinco estructuras β contienen a los residuos 50-55, 70-75, 85-91, 94-101, 106-108 y las dos α -hélices a los residuos 6-18 y 26-34. La comparación de las estructuras cristalina y en disolución ha mostrado que tanto la estructura secundaria como el plegamiento total de la proteína son similares en ambos casos. La comparación de las estructuras cristalinas de varias ribonucleasas, con especificidad para las guaninas, y de sus complejos con inhibidores ha mostrado que hay una conservación de un motivo de unión para la guanina (Sevcik et al., 1990) que, en la barnasa, está formado por el "loop" que contiene a los residuos 56 a 63 entre la primera y la segunda cadena de la lámina β . La estabilidad de este "loop" se debe principalmente a los enlaces hidrógenos que forma la Asn58 con la Lis62 y la Leu63, que se conservan en todas estas nucleasas microbiales, lo que explica la especificidad de las mismas por la guanina (Baudet y Janin, 1991).

En varios laboratorios del mundo (Hartley, 1975; Pace et al., 1992; Yoshida et al., 1992; Martinez et al., 1994) y sobre todo en el centro MRC (Cambridge U.K) de "Protein function and design", la barnasa se considera como un modelo básico en los estudios sobre la estabilidad y el plegamiento de proteínas, de gran importancia por su aplicación en biotecnología. En el laboratorio MRC se han producido varios mutantes de la barnasa (Mossakowska et al., 1989; Serrano y Fersht, 1989) lo que ha permitido obtener información valiosa sobre su estabilidad (Kellis et al., 1988; Sali et al., 1988 y 1991; Loewenthal et al.,

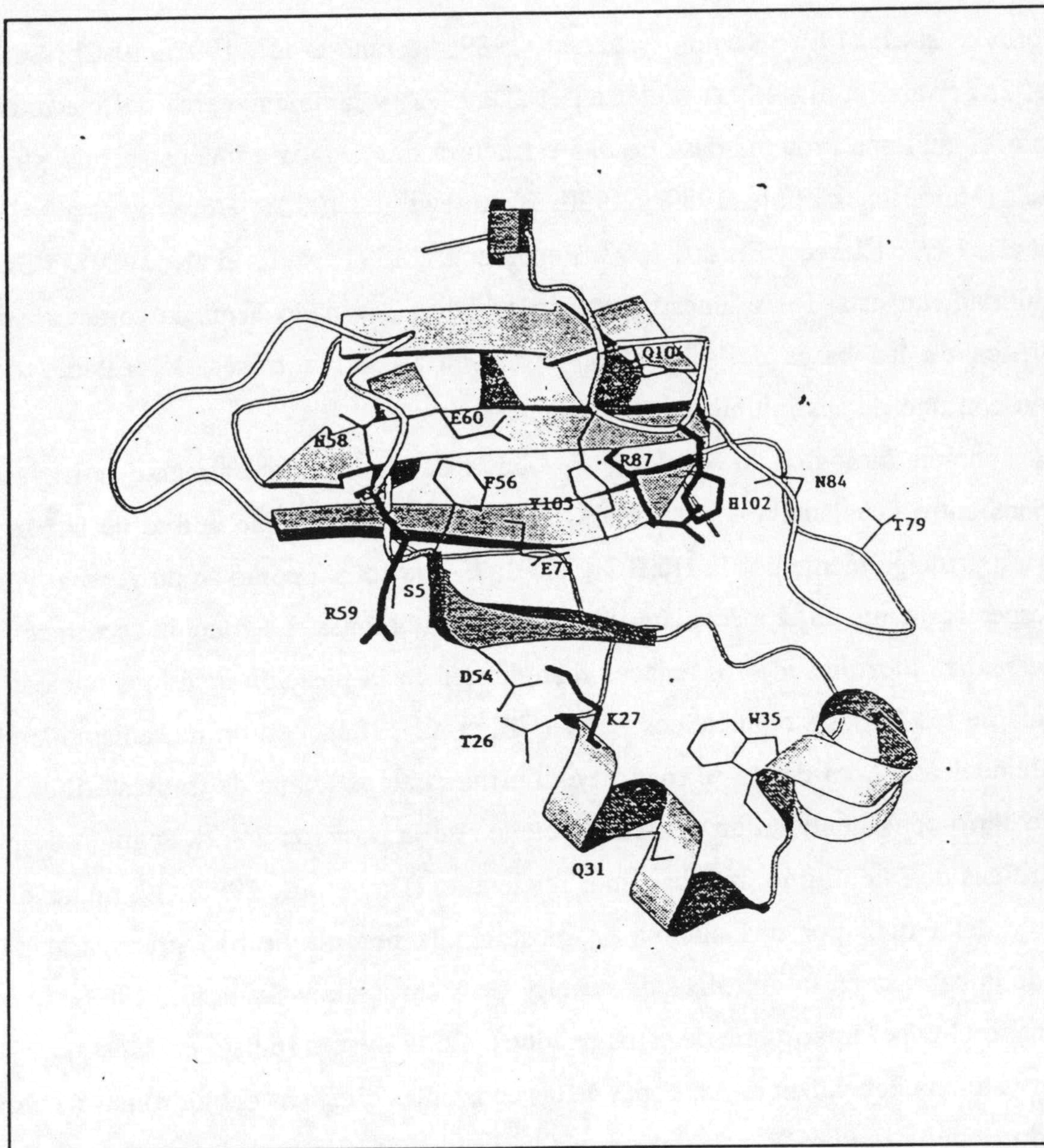


Figura 5-1: Representación esquemática del esqueleto de la barnasa. La barnasa consiste en dos α -hélices en el extremo N-terminal (residuos 6-18 y 26-34) con la primera α -hélice empaquetada contra una lámina β formada por cinco cadenas antiparalelas (residuos 50-55, 70-75, 85-91, 94-101 y 106-108). El sitio activo formado principalmente por la His102, el Glu73, la Lis27 y la Arg87 se encuentra en un hueco no profundo a la superficie de la proteína (esquema tomado de Shreiber y Fersht (1993)).

1992; Horovitz et al., 1992; Serrano y Fersht, 1989; Serrano et al., 1992a, 1992b; Sancho et al., 1992; Serrano et al., 1991; Meiering et al., 1992) y también acerca del mecanismo general por el cual una proteína pasa de una estructura desplegada a una estructura plegada y ordenada (Matouschek et al., 1989 y 1990; Bycroft et al., 1990b; Horovitz et al., 1991; Sancho et al., 1991; Clarke y Fersht, 1993; Fersht et al., 1991; Kellis et al., 1989). Más que a la estabilidad, en esta Tesis, nuestro trabajo se ha encaminado hacia la caracterización químico-física de las bases de su función biológica y ésto a través del estudio de la interacción con uno de sus inhibidores.

La función biológica de cualquier proteína se realiza naturalmente a través de interacciones entre la misma y los sustratos, inhibidores, etc. El sitio activo de la barnasa está formado principalmente por la His102 y el Glu73 que actúan como ácido general y base general respectivamente en el mecanismo catalítico de la barnasa. La función catalítica de la barnasa se realiza hidrolizando los enlaces fosfodiéster en la posición 3' de los nucleótidos con guanina de los ácidos ribonucleicos ARN (Hill et al. 1983), con un mecanismo similar al de la ribonucleasa A en donde se forma en la primera etapa (etapa de transesterificación) un intermediario consistente en un nucleótido cíclico en la posición 2'-3', seguido después por la hidrólisis de este último para dar un 3' nucleótido (Day et al., 1992). La mutación de la His102 y del Glu73 por una alanina ha mostrado la pérdida de una gran parte de la actividad de la barnasa en la hidrólisis de ARN y GpA (Mossakowska et al., 1989), lo cual ha confirmado el papel importante de estos residuos. En el mismo trabajo de Mossakowska, se ha observado una dependencia con el pH de las constantes cinéticas del hidrólisis de varios dinucleótidos, con la implicación de dos grupos ionizables de pK alrededor de 4.4 y 5.7 que pueden representar a los dos residuos del sitio activo Glu73 y His102. El papel catalítico de la His102 se ha confirmado también por el hecho de que el cianuro de oro, al reaccionar con el grupo imidazol, elimina la actividad de la barnasa, restaurándose completamente esta actividad al eliminar el cianuro por diálisis (Mauguen et al., 1982). Otros residuos importantes en la acción catalítica de la barnasa son la Lis27 y la Arg87 que se piensa que se unen al 3'-fosfato estabilizando así el estado de transición durante la hidrólisis de los sustratos (Mossakowska et al., 1989; Meiering et al., 1991). En la proteína, el resto de la Lis27 apunta hacia el sitio activo y forma varios contactos de van der Waals; la His102 forma también varios contactos de van der Waals con los residuos 84-86 y 101, y el Glu73

forma interacciones electrostáticas muy fuertes con la Arg87, así como interacciona con la Arg83 y la Lis27. En la Figura 5-1 se puede ver la colocación relativa de estos residuos en la estructura del sitio activo de la proteína. Dentro de la caracterización de la importancia de los residuos del sitio activo en la estabilidad de la barnasa, se ha mostrado, a partir de la comparación de los parámetros obtenidos con la proteína y los mutantes, que los residuos básicos, cargados positivamente por ejemplo, destabilizan a la barnasa y al mismo tiempo son necesarios para la catálisis y para la unión de las cargas negativas de los sustratos. Por ejemplo la Lis 27 destabiliza a la barnasa por 0.36 kcal/mol y la His102 por 0.55 kcal/mol al sustituirlas por una alanina (Meiering et al., 1992). Al contrario, los que están cargados negativamente estabilizan a la barnasa; por ejemplo el Glu73 estabiliza esta última por 2.3 kcal/mol, y la mutación del mismo por una alanina disminuye drásticamente la actividad. La mutación de los residuos que forman enlaces de tipo hidrógeno en el "loop" de la guanina, como la Asn58 y la Ser57, conducen a una estructura un poco más estable y tiene un efecto moderado sobre la actividad (Meiering et al., 1992).

En el contexto de la caracterización de la especificidad de la barnasa, están descritos en la bibliografía varios estudios tanto con la proteína como con mutantes. La preferencia de la barnasa por guanina ha sido demostrada a partir del análisis de los productos de la hidrólisis de varios oligonucleótidos (Rushizky et al., 1963). Mossakowska et al. (1989) han mostrado también que en la hidrólisis de dinucleótidos de estructura GpN hay una preferencia creciente en el orden A, G, C, U para N, con una actividad máxima alrededor de pH 5. Para moléculas largas de ARN, el pH óptimo para la actividad de la barnasa está alrededor de 8.5.

La barnasa ha sido ampliamente estudiada como modelo en el análisis de los efectos que contribuyen a la estabilidad de las proteínas y los mecanismos de plegamiento de las mismas y también se han realizado estudios cinéticos de los residuos importantes del sitio activo; sin embargo se realizaron mucho menos estudios de unión de ligandos. Meiering et al. (1991) han caracterizado la unión del fosfato a la barnasa y a algunos mutantes del sitio activo (His102-Ala, Lis27-Ala y Arg87-Ala) determinando la energía de Gibbs de interacción por técnicas de RMN, desnaturalización en urea y por inhibición de la transesterificación de GpC. En este estudio se ha encontrado que una sola molécula de fosfato se une a la barnasa con una constante de equilibrio de asociación de aproximadamente 700 M^{-1} a pH 4.5, y que el sitio de unión es específico para el fosfato. Hay que decir que la barnasa puede tener

varios sitios no específicos, diferentes del sitio catalítico, de baja afinidad a los cuales puede unirse el fosfato a altas concentraciones de éste (Day et al., 1992). En el caso de los tres mutantes estudiados, se ha encontrado una disminución en la afinidad de unión, lo que ha indicado que el fosfato se une al sitio catalítico de la barnasa. Esta disminución en la afinidad se interpretó como el resultado de la eliminación de los grupos cargados positivamente que interaccionan electrostáticamente con el fosfato. En el mismo estudio y a partir de los datos de RMN no se ha observado cambios estructurales importantes en la barnasa cuando se une al fosfato. La comparación de ΔG de unión a la barnasa y a los mutantes ha permitido evaluar cuantitativamente la contribución energética de la His102 y la Lis27 en la estabilización del complejo, que ha resultado ser aproximadamente 2 kcal/mol, prácticamente el mismo valor, para cada uno de los dos residuos.

Uno de los ligandos de la barnasa fisiológicamente importantes es el barstar, su inhibidor natural; se trata de una proteína intracelular del *B. amyloliquefaciens* (Hartley, 1988). Su interacción con la barnasa y con algunos mutantes ha sido caracterizada por Schreiber y Fersht (1993) en el intervalo de pH 4.5 - 8 y a diferentes fuerzas iónicas. En este estudio y a partir de las constantes cinéticas de la formación del complejo, se encontró una constante de asociación muy fuerte, del orden de 10^{14} M^{-1} a pH 8 que decrece al disminuir el pH de acuerdo con la ionización de un grupo en la barnasa de $\text{pK } 6.4 \pm 0.3$, que se desplaza a 6.8 ± 0.1 en el complejo. Esta dependencia con el pH ha sido atribuida a la ionización de la His102. Se encontró también que el complejo es 3.1 kcal/mol menos estable en 500 mM de sales que en agua, lo cual ha indicado que las interacciones electrostáticas son probablemente importantes en su formación. El estudio con mutantes mostró que el barstar se une al sitio activo de la barnasa, principalmente a la His102, la Lis27 y la Arg87; y a la Arg59 que se encuentra en el "loop" de reconocimiento de los sustratos. Hartley (1993) también identificó mediante mutantes tanto los residuos de la barnasa como los del barstar implicados en la formación del complejo, y los diferentes contactos moleculares en la estructura cristalina del complejo se han caracterizado últimamente por Guillet et al. (1993). El mismo sistema está siendo estudiado también en nuestro Departamento en donde se está haciendo una caracterización termodinámica directa de la estabilidad del complejo por calorimetría diferencial de barrido y por calorimetría de titulación utilizando el calorímetro descrito en la primera parte de esta Tesis (Martinez et al., 1994).

Dada la especificidad de la barnasa por la guanosina en la hidrólisis de ARN y dado que 3'GMP en su interacción con la barnasa actúa como un inhibidor de la acción catalítica de ésta, se ha puesto en manifiesto la importancia de aclarar y conocer bien esta interacción. Aunque recientemente la estructura cristalina y en disolución del complejo barnasa-3'GMP ha sido resuelta, todavía se carece en la bibliografía una información termodinámica completa de la interacción. Con la excepción de los estudios cinético-termodinámicos de Sancho et al. (1991) en el desplegamiento con urea de la barnasa en presencia de 3'GMP en donde se determinó ΔG de interacción del ligando con la forma plegada y con la del estado de transición a pH 6.3, y los estudios de la estabilidad térmica de la misma en presencia de 3'GMP que se han llevado a cabo en este departamento con calorimetría diferencial de barrido (Martinez et al., 1994) en donde se han determinado los parámetros termodinámicos de la interacción a pH 4.5 y a temperaturas por encima de la de transición (53°C), no se ha hecho hasta hoy ninguna caracterización termodinámica directa y completa de esta interacción. En esta parte de la Tesis, se describe un estudio termodinámico de la interacción de 3'GMP con la barnasa, utilizando el calorímetro que se describió anteriormente, para la determinación de las variaciones en la entalpía ΔH° , la energía de Gibbs ΔG° , la entropía ΔS° y la capacidad calorífica ΔC_p° de unión, en diferentes condiciones de pH y temperatura.

Para poder discutir los datos termodinámicos según la naturaleza de las fuerzas moleculares que estabilizan el complejo se necesita un conocimiento estructural de la interacción. La estructura de la barnasa se ha mostrado en la Figura 5-1 y en la Figura 5-2 se puede ver la de 3'GMP. La estructura del complejo barnasa-3'GMP hasta hace poco tiempo no se había resuelto y en los estudios realizados con 3'GMP (Sancho et al., 1991) y con d(GpC) (Baudet y Janin, 1991) se recurría a la estructura cristalina del complejo barnasa-3'GMP (Pavlovsky et al., 1988; Sevcik et al., 1990), sabiendo que la barnasa y la binasa muestran un 80% de similaridad en su secuencia primaria (Hill et al., 1983). En el complejo barnasa-3'GMP, se mostró que los residuos equivalentes a la Lis27 y la His102 forman interacciones electrostáticas con el grupo fosfato del ligando, mientras que el residuo del Glu60 forma dos enlaces hidrógenos con el grupo amino del anillo de la guanina. La estructura cristalina (Guillet et al., 1993) y en disolución (Meiering et al., 1993) del complejo barnasa-3'GMP se ha resuelto recientemente y en la Figura 5-3 se muestran los diferentes contactos en el sitio activo entre las dos moléculas, observados en la estructura

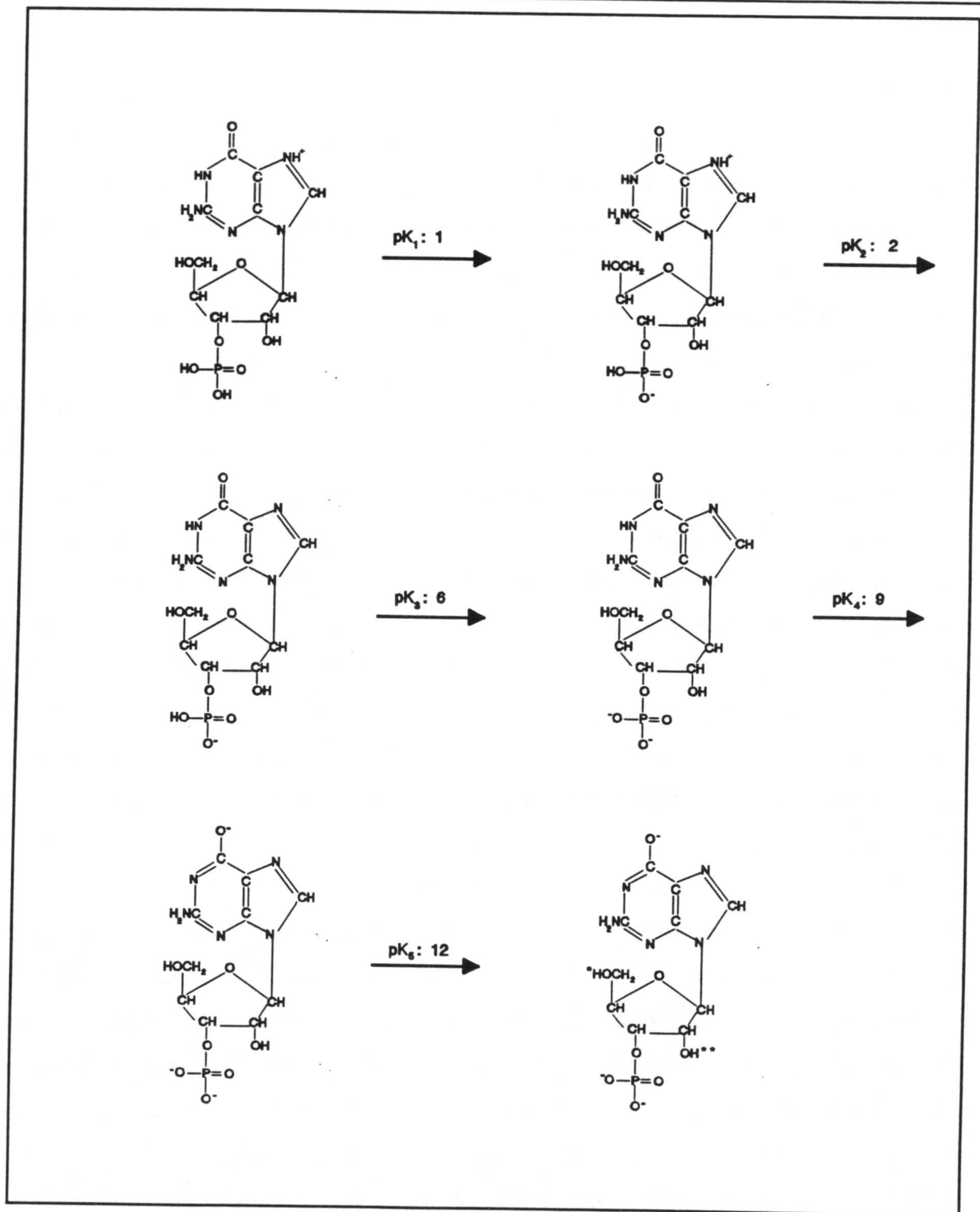


Figura 5-2: Estructura de 3'guanosina monofosfato (3'GMP). Los valores de los pK son solamente aproximados, y la asignación de los mismos está basada en los de la guanosina (Christensen et al., 1970) y en comparación con los de 5'adenosina monofosfato (5'AMP) (Blackburn y Gait, 1990). No sabemos a qué protón (*,**) se asigna el pK₅.

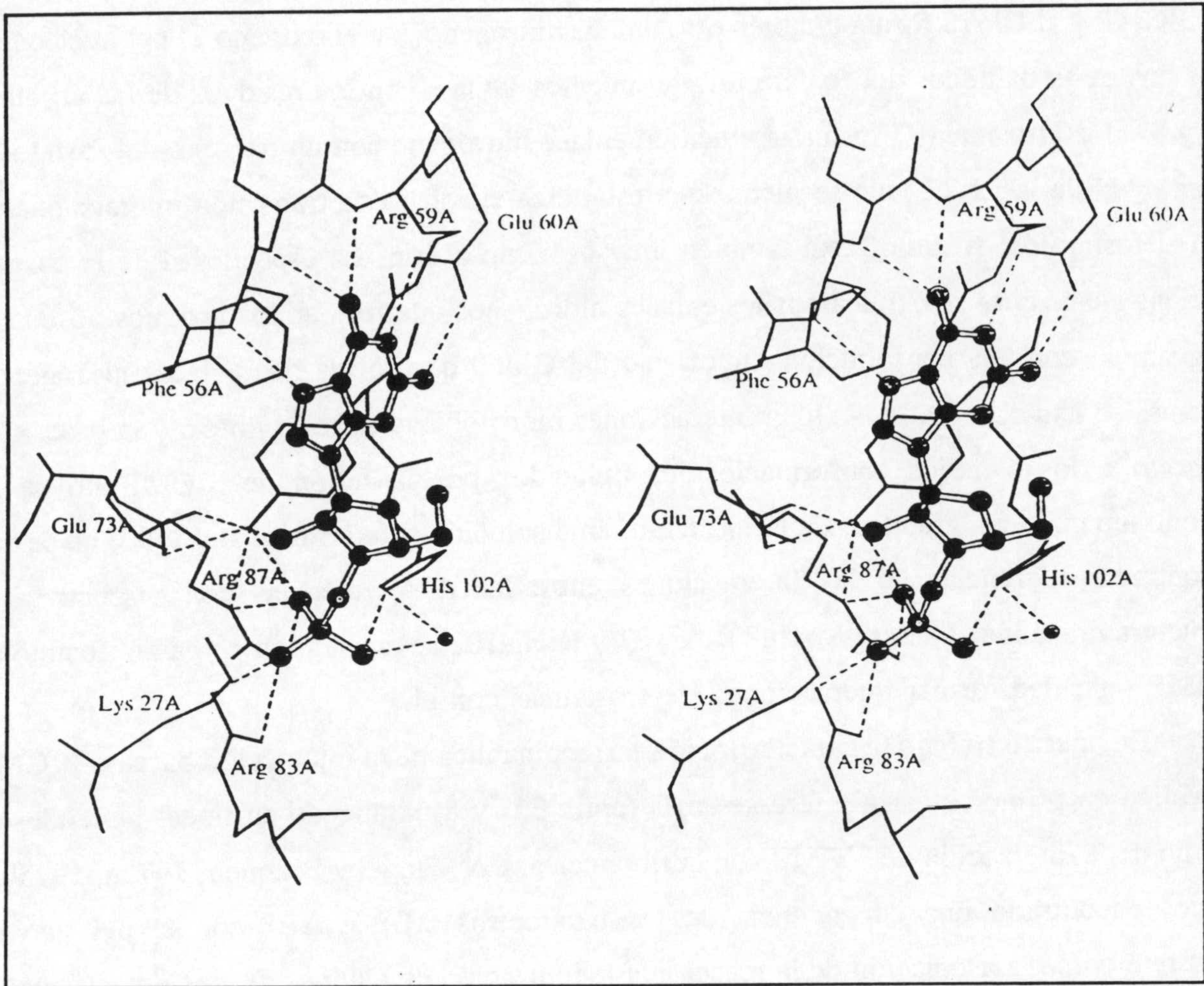


Figura 5-3: Esquema mostrando los contactos entre 3'GMP y la barnasa en el sitio activo. La molécula de 3'GMP se muestra en bolitas y las líneas en trazo discontinuo representan a los puentes de hidrógeno. En la figura se ve también una molécula de agua (en bolita pequeña) formando dos puentes de hidrógeno con la His102 y un oxígeno del grupo fosfato (esquema tomado de Guillet et al., 1993).

cristalina. Se puede ver que la His102 forma un enlace hidrógeno con un oxígeno del fosfato de 3'GMP y el Glu73 forma también otro enlace hidrógeno con el oxígeno 2' del nucleósido. Los dos otros oxígenos del fosfato forman puentes salinos con los residuos de las argininas 83 y 87. La Tirosina 103 forma también un enlace hidrógeno con un oxígeno del fosfato. El átomo ζ -N de la Lis27, que se piensa que estabiliza el estado de transición interaccionando con el fosfato del sustrato, está también muy próximo a éste. La especificidad de la barnasa para las guanosinas se explica por los enlaces hidrógenos que forman los residuos 56-60 con la guanina, con una contribución importante del Glu60 que forma dos enlaces hidrógenos. Además se han observado también interacciones hidrofóbicas entre la Phe56 y la base. Con respecto a los cambios conformacionales inducidos por la unión de 3'GMP no se ha encontrado que sean grandes. En la estructura en disolución (Meiering et al., 1993) no se han encontrado diferencias en las interacciones entre las dos moléculas con respecto a la estructura cristalina. La Lis27, Arg83, Arg87 y la His102 se encuentran cerca del fosfato de 3'GMP y pueden formar interacciones electrostáticas con él.

En nuestro trabajo la caracterización termodinámica de la interacción barnasa-3'GMP se realizó en primer lugar a diferentes pHs (entre 3.5 y 8) siguiendo en líneas generales el estudio de la interacción de 3'CMP con la ribonucleasa A (Flogel y Biltonen, 1975a, 1975b). Hemos encontrado una dependencia de los parámetros ΔG° y ΔH° con el pH que se interpretó como la asociación de la reacción a la ionización de algunos grupos específicos en la proteína y el ligando. El análisis de los datos de acuerdo con un modelo termodinámico nos ha permitido evaluar los parámetros termodinámicos independientes del pH (parámetros intrínsecos como han sido definidos por Eftink y Biltonen (1980)) así como la evaluación de la magnitud de las interacciones electrostáticas, principalmente entre la His102 y el fosfato del ligando. Con el objeto de poder aplicar el modelo al análisis de los datos, se han llevado a cabo valoraciones tanto potenciométricas como calorimétricas del ligando y la proteína, que nos han permitido obtener los pK y los calores de ionización de los grupos interesantes en el intervalo de pH estudiado. La obtención de estos últimos parámetros nos ha permitido por consiguiente evaluar la contribución de los protones a los parámetros termodinámicos de la interacción. En segundo lugar, tanto la interacción de 3'GMP con la barnasa como con algunos de sus mutantes específicos (His102-Ala, Lis27-Ala, Arg87-Ala) ha sido estudiada a diferentes temperaturas con objeto de determinar el parámetro ΔC_p° que proporciona

información acerca de la importancia de los varios tipos de fuerzas moleculares que estabilizan al complejo, así como sobre la contribución energética en términos cuantitativos de cada uno de los tres residuos cambiados. También, con el fin de evaluar la importancia de las dos partes del 3'GMP en la unión, se ha estudiado la interacción de la guanosina, la parte específica, y del fosfato, la parte selectiva, con la barnasa a dos pH. Los parámetros termodinámicos de estas dos reacciones han sido comparados con los de la unión del ligando completo.

5.2 MATERIALES Y METODOS.

5.2.1 Materiales.

Proteínas:

Tanto la barnasa como los mutantes de la misma nos han sido suministrados por el laboratorio del Dr. A. Fersht (Universidad de Cambridge U.K) en forma liofilizada sin sales. Los mono-mutantes utilizados son aquellos en los cuales se ha sustituido la lisina 27 por una alanina (Lis27-Ala), la histidina 102 por una alanina (His102-Ala) y la arginina 87 por una alanina (Arg87-Ala). Para su conservación se guardaban en un congelador a -20°C. La preparación de las muestras de la proteína para los experimentos calorímetros se ha hecho disolviendo la proteína liofilizada en el tampón del experimento y dializando después con membranas (Spectrapore) de masa molecular de corte 3500 frente a aproximadamente 1 litro del mismo tampón durante una noche y en una cámara fría a 4°C. En caso de que haya algunas impurezas en suspensión, se centrifuga durante unos 10 min a ≈ 10000 g. La concentración de la barnasa se determinaba midiendo la absorbancia a 280 nm y a pH 7, diluyendo una alícuota de 50-60 μ l en 1 ml de una disolución de Hepes (ácido N-2 Hidroxiethylpiperacina, N'-etanosulfónico) 50 mM, pH 7. Se consideró una absorbancia específica $E_{1\text{cm}}^{0.1\%} = 2.21$ a 280 nm (Loewenthal et al., 1991) y un peso molecular de 12382 g/mol.

Ligandos:

El 3'GMP se compró a Sigma en forma de sal mono sódica. La preparación de las muestras del ligando se hicieron simplemente disolviendo la cantidad apropiada en el tampón del experimento. El pH del ligando se comprobaba después por si acaso variaba. La concentración del ligando se medía espectrofotométricamente a 252 nm, después de las diluciones apropiadas con una disolución de Hepes 50 mM pH 7, utilizando un coeficiente de extinción molar de $13400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a pH 7 ("Handbook of Biochemistry"). En general se hacía como mínimo dos medidas de la concentración del ligando para tomar un valor medio. La relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm era de 0.67-0.68, que no se diferenciaba de 0.68; valor dado en el "Handbook of Biochemistry".

La guanosina era de Sigma, y la concentración de la misma se determinó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción molar de $13600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 253 nm y pH 6 (Handbook of Biochemistry). La relación entre la absorbancia a 260 nm y 250 nm era de 1.15-1.16 que no es diferente del valor 1.15 que se da en el "Handbook of Biochemistry". En las condiciones experimentales, la guanosina no era totalmente soluble, y hemos tenido que calentarla sobre 80°C para disolverla.

Para el fosfato, se ha utilizado la forma monopotásica KH_2PO_4 de Merck y su concentración se determinó solamente por pesada.

Tampones:

Los tampones utilizados han sido los que tienen calores de protonación los más bajos posibles, y disponibles. Se ha evitado utilizar el fosfato debido a su interacción con la barnasa (Meiering et al., 1992), y también, se ha evitado utilizar tampones no monovalentes debido a la complicación en la corrección de las entalpías de reacción por el efecto térmico de la protonación de los tampones. El formiato de sodio fue usado a pH 3.5, el acetato de potasio a pHs comprendidos entre 4.0 y 5.7, el Mes (ácido 2-N-Morfolino etanosulfónico) a pHs 6 y 6.5, y el Hepes entre pH 7 y 8. El pH de los tampones se ajustaba con HCl o con KOH, con un pH-metro Crison 501 que permite apreciar hasta 0.01 unidades de pH. El pH-metro se calibraba con dos tampones estándar de pH 4.00 y 7.02 de la marca Crison. En todos los experimentos, la concentración de los tampones fue 50 mM y la fuerza iónica se mantuvo a 50 mM por adición de cantidades apropiadas de KCl. Todos los tampones fueron Merck o Sigma. El agua utilizada fue Milli-Q (Millipore) y desgasificada con una trompa de vacío.

5.2.2 Potenciometría.

La reacción de 3'GMP con la barnasa está acompañada, como veremos más adelante, con un intercambio de protones, ΔN , con el tampón. Para evaluar este fenómeno, hemos utilizado técnicas potenciométricas: pH-stat a algunos pH específicos y titulación diferencial en el intervalo de pH 3.5 - 8. Hay varios métodos para la determinación de ΔN y las razones para la utilización de la técnica pH-sat combinada con la titulación diferencial se expone en

la Sección 5.3 de Resultados y Discusión.

La técnica de pH-stat consiste en mezclar volúmenes de proteína y ligando preparados en un mismo medio sin tampón y previamente ajustados al mismo pH y, debido al intercambio protónico, se produce una variación en el pH al unirse el ligando a la proteína. El pH después se restablece a su valor inicial añadiendo un ácido o una base según haya absorción o liberación de protones. El ΔN se calcula en este caso simplemente a partir de los moles de ácido o base añadidos y referidos por mol de complejo formado (Laskowski y Finkenstadt, 1972). Este método es quizás el más directo y preciso, pero su inconveniente reside en la dificultad de conseguir que los dos reactivos estén perfectamente al mismo pH antes de mezclarlos y después de reajustar el pH a su valor inicial. En general, el cambio en el pH después de la mezcla es muy pequeño debido, entre otros fenómenos, al efecto tamponante de los reactivos mismos, y consiguientemente el error en el volumen de ácido o base añadido para ajustar el pH puede ser grande. Este error no puede minimizarse con la utilización de muestras más concentradas ya que el efecto tamponante de los reactivos será también más importante y por consiguiente el pH no variará mucho. Otro inconveniente es la gran cantidad relativa de muestras necesarias para determinar ΔN a cada uno de los pH experimentales.

El otro método de titulación diferencial ("Difference Titration"), consiste en hacer tres valoraciones protónicas, en un intervalo de pH, de la proteína, del ligando, y del complejo proteína-ligando, y a partir de la diferencia en la carga protónica media \bar{Z} (Tanford, 1962) de las tres especies se puede calcular ΔN (Lebowitz y Laskowski, 1962).

$$\Delta N = \bar{Z}_C - (\bar{Z}_P + \bar{Z}_L) \quad (5.1)$$

Este modo del cálculo de ΔN a partir de las cargas requiere el conocimiento del punto isoiónico de la proteína, así como los grupos ionizables del ligando para poder determinar sus cargas protónicas a cada pH. Además, \bar{Z} no es fácil de determinar en el caso de que los iones que mantienen la fuerza iónica del medio pueden unirse a la proteína, que es el caso de la barnasa en donde se sabe que los Cl^- interaccionan con la misma (Meiering et al., 1991). Otro modo para determinar ΔN con este método es a partir de la diferencia entre los protones unidos \bar{H}^+ a las tres especies; ligando, proteína y complejo, sin necesidad de conocer el punto isoiónico. La determinación de \bar{H}^+ puede hacerse en principio empezando

la valoración desde un pH extremo; por ejemplo a pH muy básico en donde $\bar{H}^+ = 0$; no obstante se pueden presentar muchas dificultades experimentales al trabajar en condiciones extremas de pH. La magnitud que sí podemos calcular fácilmente a partir de las valoraciones potenciométricas es la diferencia en el número los protones unidos o liberados por el reactivo X, ΔN_X , cuando el pH pasa de un valor inicial pH_0 a otro valor: $\Delta N_X = \bar{H}^+_X(pH) - \bar{H}^+_X(pH_0)$. Por lo tanto, la magnitud $\Delta N'$ que obtenemos a partir de la diferencia entre ΔN_X de las tres especies es el valor relativo de ΔN con respecto al de pH_0 . En este caso, no es posible calcular el valor absoluto de ΔN sin el conocimiento de un valor del mismo, ΔN_r , en un pH de referencia pH_r .

$$\Delta N'(pH) = \Delta N_C - (\Delta N_P + \Delta N_L) \quad (5.2)$$

y

$$\Delta N(pH) = \Delta N'(pH) + \Delta N_r - \Delta N'(pH_r) \quad (5.3)$$

Con el fin de ahorrar material, hemos combinado este método con el método de pH-stat para determinar el intercambio protónico ΔN en la unión de 3'GMP a la barnasa. El método de pH-stat se ha utilizado a cuatro pHs para tener más puntos de referencia; ΔN_r .

Todas las valoraciones potenciométricas se llevaron a cabo en una célula de vidrio termostatizable a 25°C. El pH-metro usado fue de la marca Crison, modelo 501, que permite apreciar 0.01 unidades de pH. Se usó un microelectrodo combinado (Ingold U402-M3-S7). El pH-metro se calibraba con dos tampones estándar Crison de pH 4.00 y 7.02, y la lectura del pH se tomaba después de parar la agitación del contenido de la célula, que se hacía con un agitador magnético. El ácido clorhídrico y la sosa utilizadas fueron de la máxima pureza (Merck). La concentración exacta de la sosa se determinaba mediante contraste con el biftalato potásico (Merck) desecado, utilizando la fenolftaleína como indicador, y la concentración exacta del clorhídrico se determinaba a su vez mediante valoración con la sosa ya contrastada. Se hacía tres contrastes para tomar un valor medio de las concentraciones. Las adiciones de HCl y NaOH en cada etapa de la valoración potenciométrica han sido efectuadas manualmente con jeringas Hamilton de 5 μ l y 10 μ l, que tienen precisiones de 0.05 y 0.1 μ l respectivamente. En todos los experimentos potenciométricos, el disolvente usado fue KCl 50 mM preparado con agua desionizada y desgasificada, y antes de empezar

las valoraciones, se burbujeaba nitrógeno saturado con agua a través de las disoluciones de los reactivos durante ≈ 30 min, y se operaba siempre en atmósfera de nitrógeno.

Valoración de 3'GMP:

1.48 ml de 3'GMP de concentración 2.41 mM en KCl 50 mM se valoraron con HCl 0.102 M desde pH 9.49 hasta 2.52. El incremento en los protones unidos a 3'GMP, $\Delta N_{GMP,u}$, se ha calculado a partir de los moles totales de HCl añadidos, considerando que una fracción de los mismos se queda libre en el medio y otra reacciona con OH^- para formar el agua.

$$\Delta N_{GMP,u} = \frac{v_{HCl}[HCl] - (V10^{-pH} - V_o10^{-pH_o}) - (V_o10^{pH_o-14} - V10^{pH-14})}{n_{GMP}} \quad (5.4)$$

en donde V_o es el volumen inicial de la disolución a pH inicial pH_o , V el volumen total de la disolución después de la adición de v_{HCl} , y n_{GMP} son los moles totales de 3'GMP presentes en la disolución, que se mantienen constantes.

Valoración de la barnasa:

La barnasa se dializó frente a KCl 50 mM con un cambio en el disolvente de diálisis (1 litro/8 horas + 1.5 litros/noche). El pH de la disolución después de diálisis se quedaba sobre 5.5. 1.32 ml de barnasa de concentración 0.272 mM se pusieron en la célula a 25°C y se valoraron con NaOH 0.102 M desde pH 3.55 hasta 8.65, y después en sentido contrario con HCl 0.102 M desde pH 8.65 hasta pH 3.58. La valoración se hizo en los dos sentidos de pH para comprobar su reversibilidad. $\Delta N_{Ba,u}$ (cambio en los moles de protones unidos por mol de barnasa) se calcularon a partir de los datos de la valoración con HCl de acuerdo con una ecuación similar a (5.4), y los datos de $\Delta N_{Ba,d}$ (cambio en los moles de protones disociados por mol de barnasa) durante la valoración con NaOH se calcularon de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\Delta N_{Ba,d} = \frac{v_{NaOH}[NaOH] - (V10^{-pH} - V_o10^{-pH_o}) + (V_o10^{pH_o-14} - V10^{pH-14})}{n_{Ba}} \quad (5.5)$$

en donde n_{Ba} son los moles de proteína presentes en la célula y que se mantienen constantes.

Valoración del complejo barnasa-3'GMP:

Como se dijo anteriormente, para poder calcular el valor absoluto de ΔN a partir de las curvas de valoración de las tres especies (Ecuaciones (5.2) y (5.3)), tenemos que conocer un valor de referencia absoluto ΔN_r en algún pH_r . Por lo cual, y antes de empezar la valoración del complejo, se aprovechó las muestras anteriores con las que se realizaron las valoraciones de la barnasa y 3'GMP para determinar ΔN_r . Se han medido varios ΔN_r a diferentes pH_r para tener más precisión.

0.2 ml de 3'GMP de concentración 2.41 mM y a pH 3.59 se añadieron a 1.22 ml de barnasa de concentración 0.270 mM y al mismo pH que el de 3'GMP. Para poder ajustar el pH de los dos reactivos al mismo valor, se ha registrado el pH en un registrador gráfico que ha sido conectado a la salida analógica del pH-metro a través de un compensador (descrito en el Apéndice 1), lo cual nos permitió registrar en una escala de más sensibilidad apreciando así variaciones en el pH de hasta 0.001-0.002 unidades. Después de la mezcla de los reactivos, el pH de la disolución bajó hasta 3.51 y después se restableció a su valor inicial añadiendo 7 μ l de NaOH 0.0204 M. La bajada del pH indica que ha habido una liberación de protones en la unión de 3'GMP a la barnasa a pH 3.59.

La misma disolución del complejo utilizada para determinar el punto de referencia se utilizó después para determinar la curva de valoración del complejo. La valoración potenciométrica del complejo se llevó a cabo desde pH 8.54 hasta 3.49 con HCl. Las concentraciones iniciales de la barnasa y 3'GMP fueron sido 0.225 mM y 0.651 mM respectivamente. El $\Delta N_{C,u}$ (incremento en los protones unidos al complejo) se calculó suponiendo que los protones que se añaden a la disolución en forma de ácido clorhídrico, $v_{HCl}[HCl]$, se reparten entre los que se unen al complejo, $n_C \Delta N_{C,u}$ (sin discriminación entre el ligando y la proteína, n_C se refiere a los moles de complejo); los que se unen a la proteína libre, $\Delta H^+_{Ba,libre}$ (en nuestras condiciones, no se saturó toda la proteína con el ligando); los que se unen al ligando libre, $\Delta H^+_{GMP,libre}$; los que se unen a OH^- para formar el agua, ΔH_2O ; y finalmente los que se quedan libres en el medio, ΔH^+ , de manera que $\Delta N_{C,u}$ vendrá dado por:

$$\Delta N_{C,u} = \frac{v_{HCl}[HCl] - \Delta H_{Ba,libre}^+ - \Delta H_{GMP,libre}^+ - \Delta H_{H_2O} - \Delta H^+}{n_C} \quad (5.6)$$

En esta ecuación, el cambio en los protones unidos a la proteína libre, $\Delta H_{Ba,libre}^+$, y al ligando libre; $\Delta H_{GMP,libre}^+$, se calcularon a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas de los mismos hechas anteriormente.

$$\Delta H_{Ba,libre}^+ = V[Ba]_{libre} \Delta N_{Ba,u}, \quad y \quad \Delta H_{GMP,libre}^+ = V[GMP]_{libre} \Delta N_{GMP,u} \quad (5.7)$$

con las concentraciones de los reactivos libres calculadas utilizando las constantes de equilibrio de unión de 3'GMP medidas a partir de las valoraciones calorimétricas. ΔH_{H_2O} y ΔH^+ se calculan simplemente a partir del cambio en el pH de la disolución por las expresiones:

$$\Delta H_{H_2O} = V_o 10^{pH_o - 14} - V 10^{pH - 14}, \quad y \quad \Delta H^+ = V 10^{-pH} - V_o 10^{-pH_o} \quad (5.8)$$

Para corregir $\Delta N'$ y obtener valores absolutos de ΔN , se ha determinado por el método de pH-stat tres valores de más de ΔN_r a pH_r 5.40, 6.50, y 8.48, por lo que los valores de $\Delta N'$ han sido corregidos sumandoles el promedio de las diferencias entre los cuatro valores de ΔN_r y sus correspondientes valores de $\Delta N'$:

$$\Delta N(pH) = \Delta N'(pH) + \frac{\sum_{i=1}^4 \Delta N_r(pH_{r,i}) - \Delta N'(pH_{r,i})}{4} \quad (5.9)$$

5.2.3 Calorimetría.

Todas las valoraciones calorimétricas han sido llevadas a cabo en el calorímetro descrito anteriormente. El calor desarrollado en la célula a cada inyección ha sido medido con compensación eléctrica durante 80 s, y el tiempo que transcurría entre inyección e inyección fue de aproximadamente 3 min. La homogenización en el bulbo de reacción se ha

llevado a cabo mediante agitación durante 45 s.

Valoración de la barnasa con 3'GMP:

Los experimentos calorimétricos entre la barnasa y 3'GMP se realizaron en primer lugar a pH 4.5 en acetato de potasio 50 mM y a diferentes temperaturas entre 15 y 30°C, y en segundo lugar a 25°C y a diferentes pH entre 3.5 y 8. Los tampones utilizados en estos últimos experimentos se han descrito anteriormente. La reacción de 3'GMP con los mutantes de barnasa se estudió a pH 4.5 y a diferentes temperaturas entre 15 y 35°C.

Los calores de reacción se obtuvieron mediante titulación de la barnasa de concentración del orden de 0.2 mM con una mezcla de 3'GMP y barnasa. La concentración de la barnasa en la disolución valorante era la misma que la de la célula antes de empezar el experimento, y el ligando era aproximadamente 2.5 veces más concentrado que la proteína. El volumen operativo de la barnasa era 0.5 ml, y el volumen del reactivo valorante añadido en cada inyección era habitualmente 10 μ l. Al final de cada valoración calorimétrica se medía el calor de la agitación, que en general fue pequeño (entre -1 y -2 μ cal). Para corregir de los calores observados el calor de dilución de ligando, se hizo un experimento de dilución de 3'GMP en las mismas condiciones de pH, temperatura y concentración que las del experimento con la proteína. En general el calor de dilución de 3'GMP, a las concentraciones utilizadas, era muy pequeño (entre -1 y -2 μ cal), indistinguible del calor de inyección de tampón en tampón.

También se ha midió el calor de dilución de 3'GMP a concentraciones más altas de las utilizadas en los experimentos con proteína, y se encontró calores endotérmicos con una entalpía molar relativa aparente que varía linealmente con la concentración: $\phi L_2 = -16.5 \times [3'GMP]$ kcal/mol. Este valor es la media de tres experimentos realizados a pH 5.5 y a distintas concentraciones del ligando en la jeringa; 8, 10 y 12 mM. En las tres concentraciones, no se ha encontrado diferencia apreciable en la entalpía de dilución, lo cual puede interpretarse como la no existencia de fenómenos de agregación significativos del ligando.

Valoración de la barnasa con guanosina:

La reacción de la guanosina con la barnasa se ha estudiado a dos pH 4.5 y 3.5, a

fuerza iónica 50 mM de acetato de potasio y de formiato de sodio respectivamente, y a temperatura 25°C. En el primer experimento que se hizo a pH 4.5, la barnasa de concentración 0.2 mM se puso en la célula del calorímetro y fue valorada con la guanosina. Los calores medidos fueron muy pequeños, del orden de magnitud de la sensibilidad del calorímetro y no diferentes del calor de dilución de la guanosina, por lo que no ha sido posible obtener ninguna información termodinámica. Con el fin de aumentar la fuerza de unión, representada en el factor k_c (ver Capítulo 4), había que aumentar la concentración del reactivo de la célula. Por lo que, en otro experimento, la guanosina de concentración 2.78 mM se puso en la célula y fue valorada con inyecciones de 10 μ l de la barnasa de concentración 0.603 mM.

Valoración de la barnasa con fosfato:

La reacción del fosfato con la barnasa se estudió también a dos pH 4.5 y 5.7, a fuerza iónica 50 mM de acetato de potasio a los dos pH y a temperatura 25°C. Igual que la guanosina, la constante de unión del fosfato es muy baja, por lo que también se puso el fosfato en la célula y la barnasa en la jeringa con el fin de aumentar la fuerza de unión.

La determinación de los calores de protonación de los grupos ionizables de 3'GMP y la barnasa, que nos interesan para el análisis de las variaciones en las entalpías de la interacción de la barnasa con 3'GMP a los diferentes pH, se realizaron a partir de valoraciones calorimétricas de 3'GMP y la barnasa con HCl.

Valoración de 3'GMP con HCl:

Una disolución de 3'GMP de concentración 3.2 mM preparada en KCl 50 mM se valoró calorimétricamente a 25°C con inyecciones de 8 μ l de HCl 0.0104 M, desde un pH inicial de 9.21 hasta un pH final de 2.38.

Como no es posible medir directamente el pH en el bulbo de reacción del calorímetro después de cada inyección i , la medida de éste ha sido determinada aparte, fuera del calorímetro, en una célula termostaticada a la misma temperatura, con las mismas disoluciones del ligando y del clorhídrico utilizadas en la valoración calorimétrica. En la valoración potenciométrica, un volumen inicial de 2.5 ml de 3'GMP a pH 9.21 se valoró con

inyecciones de 98.5 μ l de HCl y los pH obtenidos a cada etapa i han sido asignados a los pH de la disolución de 3'GMP en el bulbo de reacción durante la valoración calorimétrica. El valor exacto del volumen del clorhídrico (98.5 μ l) añadido en la valoración potenciométrica se calculó teniendo en cuenta de la variación de las concentraciones de los reactivos en el bulbo de reacción del calorímetro (ver Capítulo 3), de manera que las mismas sean iguales en ambas valoraciones:

$$[3'GMP]_i = [3'GMP]_o \left[1 - \frac{v_c}{V_c} \right]^i = [3'GMP]_o \left[1 - \frac{v_p}{V_p} \right]^i$$

y

(5.10)

$$[HCl]_i = [HCl] \left[1 - \left[1 - \frac{v_c}{V_c} \right]^i \right] = [HCl] \left[1 - \left[1 - \frac{v_p}{V_p} \right]^i \right]$$

siendo v_c y v_p volúmenes de clorhídrico de concentración $[HCl]$ añadidos en cada etapa i a los volúmenes iniciales V_c (volumen efectivo del bulbo de reacción del calorímetro, 203 μ l) y V_p (2.5 ml) de 3'GMP en las valoraciones calorimétrica y potenciométrica respectivamente. En la valoración potenciométrica antes de añadir un volumen v_p de clorhídrico se quitaba de la célula el mismo volumen de 3'GMP para que se cumplan las diluciones de los dos reactivos reflejadas en las ecuaciones anteriores. Para su posterior análisis, los calores han sido corregidos por el calor de inyección de KCl en KCl, por el calor de agitación, así como por el calor de formación del agua $q_{H_2O,i}$. Este último termino ha sido calculado a partir de los cambios en el pH de la célula de acuerdo con la siguiente expresión:

$$q_{H_2O,i} = \Delta H_{H_2O} \left((V_c - v_c) 10^{pH_{i-1} - 14} - V_c 10^{pH_i - 14} \right) \quad (5.11)$$

ΔH_{H_2O} es el calor molar de formación del agua que se ha considerado igual a -13.5 kcal/mol. Hay que decir que $q_{H_2O,i}$ es significativo sólo para las tres primeras inyecciones ($i = 1, 2, 3$).

Valoración de la barnasa con HCl:

El procedimiento experimental que se ha seguido para la determinación de los calores de protonación de la barnasa fue el mismo que el de 3'GMP. Se hicieron dos valoraciones, una calorimétrica en donde la barnasa de concentración 0.257 mM en KCl 50 mM se valoró con inyecciones de 5 μ l de HCl 5.2 mM desde pH 7.9 a 3.54, y otra potenciométrica en donde un volumen inicial de 1.35 ml de la misma disolución de la barnasa (concentración 0.257 mM) se valoró con inyecciones de 33.2 μ l de HCl 5.2 mM con el fin de determinar los pH correspondientes a cada etapa i de la valoración calorimétrica. Para mantener la fuerza iónica del disolvente constante durante las valoraciones, el clorhídrico utilizado ha sido preparado también con KCl 50 mM.

El cambio en el contenido entálpico $\Delta H_{p,Ba}^{\circ}$ de la barnasa, entre cualquier pH_l correspondiente a la inyección número l y un pH de referencia pH_m correspondiente a la inyección número m , puede calcularse a partir de los calores q_i medidos en el calorímetro a cada etapa i de la valoración por la expresión:

$$(\Delta H_{p,Ba}^{\circ})_l = \sum_{i=m+1}^l \frac{q_i}{V_c[Ba]_i} \quad (5.12)$$

q_i son los calores corregidos por el calor de agitación, de inyección de KCl en KCl y de formación del agua.

5.3 TEORIA.

5.3.1 Análisis de Datos Calorimétricos.*Tratamiento de las valoraciones calorimétricas de la barnasa con los ligandos 3'GMP, guanosina y fosfato:*

La obtención de los parámetros termodinámicos de la interacción de los ligandos 3'GMP, guanosina y fosfato con la barnasa se realizó mediante el ajuste de los calores medidos q_i en cada inyección i , después de su corrección por el calor de agitación y dilución del ligando, por mínimos cuadrados no lineales usando el programa ANALCAL (Apéndice

4). El modelo al cual se ajustaban los calores era el de n sitios independientes e idénticos, para el que la entalpía de unión por mol de macromolécula $\Delta H_{u,i}$ se relaciona con el número de sitios n , la constante de equilibrio de la reacción k , la variación en la entalpía de la reacción ΔH° y la concentración de ligando libre en el bulbo de reacción del calorímetro x por la ecuación (ver Capítulo 3, Sección 3.3.3):

$$\Delta H_{u,i} = \frac{n\Delta H^\circ kx_i}{1+kx_i} \quad (5.13)$$

La concentración de ligando libre se calcula a partir de las concentraciones totales de la macromolécula M_t y el ligando X_t por la ecuación:

$$x = \frac{\sqrt{(1-kX_t+nkM_t)^2 + 4kX_t} + kX_t - nkM_t - 1}{2k} \quad (5.14)$$

y q_i está dado por:

$$q_i = \Delta H_{u,i}M_{t,i}V_e - (\Delta H_{u,i-1}M_{t,i-1}(V_e-v) + \Delta H_{u,J}M_{t,J}v) \quad (5.15)$$

en donde V_e es el volumen efectivo del bulbo de reacción del calorímetro y v es el volumen del reactivo valorante añadido en cada inyección. $\Delta H_{u,J}$ se refiere a la entalpía por mol de macromolécula en la jeringa. Hay que decir que en los experimentos de guanosina y fosfato, en donde se colocó éstos en la célula del calorímetro y la barnasa en la jeringa, la macromolécula sería el reactivo de la célula y el ligando el reactivo de la jeringa.

Análisis de $\Delta G^\circ(T)$, $\Delta H^\circ(T)$:

Los valores de la variación en la entalpía de reacción ΔH° a cada temperatura se analizaron mediante regresión lineal para estimar el incremento en la capacidad calorífica de la reacción ΔC_p° .

$$\Delta C_p^\circ = \frac{d\Delta H^\circ}{dT} \quad (5.16)$$

Después de la determinación de ΔC_p° el ajuste final de la dependencia de la energía de Gibbs ΔG° con la temperatura se realizó de acuerdo con las ecuaciones:

$$\Delta H^{\circ} = \Delta H_0^{\circ} + \Delta C_p^{\circ}(T-T_0) \quad (5.17)$$

$$\Delta S^{\circ} = \Delta S_0^{\circ} + \Delta C_p^{\circ} \ln(T/T_0) \quad (5.18)$$

$$\Delta G^{\circ} = -RTL \ln k = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} \quad (5.19)$$

Los parámetros ajustables son ΔH_0° y ΔS_0° , la entalpía y la entropía a una determinada temperatura T_0 , por ejemplo 25°C.

Análisis de $\Delta G^{\circ}(pH)$ y $\Delta H^{\circ}(pH)$:

En los parámetros termodinámicos de la unión de los ligandos a la barnasa se ha encontrado una dependencia con el pH (ver Resultados y Discusión), por lo que, de ahora en adelante, la variación en la entalpía de la reacción ΔH° y la constante de equilibrio k de la Ecuación (5.13) serán consideradas como parámetros observados que designaremos por $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$ y K_{obs} . Esta dependencia con el pH puede interpretarse como la asociación de la reacción a la combinación de varios factores (Timasheff, 1966), y principalmente a la ionización de algunos grupos específicos en la proteína y/o en el ligando (Flogel y Biltonen, 1975; Eftinck y Biltonen, 1980), que se refleja, como veremos más adelante, en un intercambio de protones entre los reactivos y el disolvente. Esta liberación o absorción de los protones por estos grupos es la consecuencia de un cambio en sus pK en el complejo con respecto a sus valores en la forma libre. Este cambio es debido a la modificación del contorno molecular de los grupos afectados por la interacción, que es la consecuencia, por ejemplo, de la transferencia de dichos grupos de un medio acuoso en donde estaban formando enlaces hidrógenos con el agua a otro sin agua en el sitio de unión, en donde se forman nuevas fuerzas de interacción. A continuación vamos a desarrollar las ecuaciones de un modelo para la dependencia de los parámetros termodinámicos con el pH, de acuerdo con Eftink y Biltonen (1980).

Suponemos la interacción de una macromolécula M con un ligando X. M y X tienen cada uno un sólo grupo ionizable interviniendo en la interacción. Cada grupo en la macromolécula libre y en el ligando libre está caracterizado por una constante de ionización k_i y una entalpía de protonación ΔH_p° . Estos parámetros pueden tomar valores diferentes k'_i

y ΔH_p° cuando se forma el complejo. En la Figura 5-4 se da el esquema del ciclo termodinámico del modelo, en donde se ve que hay cuatro tipos de complejos que pueden formarse; según los estados de ionización de la macromolécula y el ligando. Estos cuatro complejos están caracterizados por las constantes de formación $k(MX)$, $k(MHX)$, $k(MXH)$ y $k(MHXH)$.

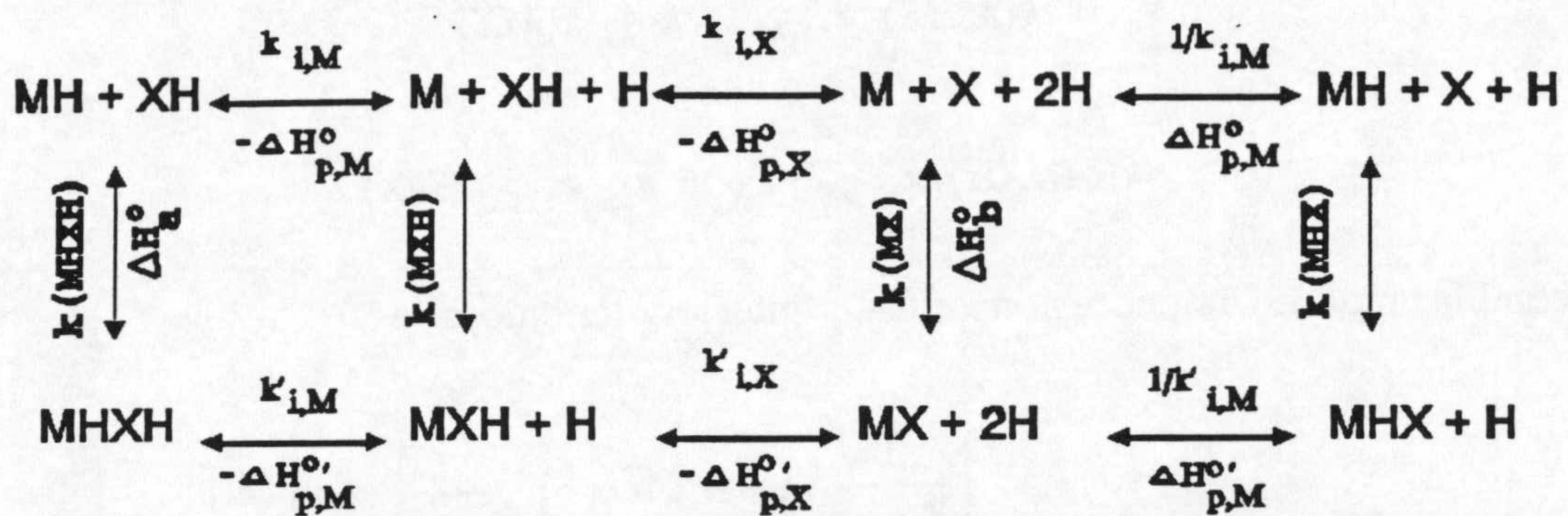


Figura 5-4: Esquema termodinámico de la unión de un ligando con un grupo ionizable a una macromolécula con otro grupo ionizable (Eftink y Biltonen, 1980).

La proporción relativa de cada uno de estos complejos dependerá de los pK' y del pH , y la constante de equilibrio de formación del complejo total a un pH determinado viene dada por:

$$k_{obs} = \frac{[MX] + [MXH] + [MHX] + [MHXH]}{([X] + [XH]) ([M] + [MH])} \quad (5.20)$$

que se puede escribir en función de la concentración libre de los protones $[H]$ y las constantes de equilibrio:

$$k_{obs} = \frac{k(MX) + \frac{k(MXH)}{k_{i,X}}[H] + \frac{k(MHX)}{k_{i,M}}[H] + \frac{k(MHXH)}{k_{i,M}k_{i,X}}[H]^2}{\left(1 + \frac{1}{k_{i,X}}[H]\right)\left(1 + \frac{1}{k_{i,M}}[H]\right)} \quad (5.21)$$

Tenemos también las siguiente igualdades:

$$k(MXH) k'_{i,X} = k_{i,X} k(MX) \quad (5.22)$$

$$k(MHX) k'_{i,M} = k_{i,M} k(MX) \quad (5.23)$$

$$k(MHXH) k'_{i,M}k'_{i,X} = k_{i,M}k_{i,X} k(MX) \quad (5.24)$$

que reemplazando en la expresión de k_{obs} anterior, tenemos:

$$k_{obs} = k(MX) \frac{1 + \left[\frac{1}{k'_{i,M}} + \frac{1}{k'_{i,X}} \right] [H] + \left[\frac{1}{k'_{i,M}k'_{i,X}} \right] [H]^2}{\left[1 + \frac{1}{k_{i,X}} [H] \right] \left[1 + \frac{1}{k_{i,M}} [H] \right]} \quad (5.25)$$

y teniendo en cuenta de que $[H] = 10^{-pH}$, $k_i = 10^{-pK}$ y $\Delta G_{obs}^o = -RTLn k_{obs}$, podemos escribir el cambio en la energía de Gibbs observada con el pH de acuerdo con la expresión:

$$\Delta G_{obs}^o = \Delta G_b^o - RTLn \frac{\left(1 + 10^{pK'_X - pH}\right) \left(1 + 10^{pK'_M - pH}\right)}{\left(1 + 10^{pK_X - pH}\right) \left(1 + 10^{pK_M - pH}\right)} \quad (5.26)$$

en donde, $\Delta G_b^o = -RTLn k(MX)$ corresponde a la unión del ligando a la macromolécula, ámbos en la forma no protonada, es decir a pH básico. Utilizando la Ecuación (5.24) podemos obtener la expresión de la energía de Gibbs de la reacción a pH ácido, $\Delta G_a^o = -RTLn k(MHXH)$, en donde ambos reactivos están en la forma protonada:

$$\Delta G_a^o = \Delta G_b^o - RTLn \frac{10^{-(pK_M + pK_X)}}{10^{-(pK'_M + pK'_X)}} \quad (5.27)$$

La variación de ΔH_{obs}° con el pH puede interpretarse también como la contribución de un término independiente del pH, correspondiente a la unión intrínseca, de un término dependiente del pH que refleja los cambios en los estados de ionización de los grupos afectados por la interacción, y de otro término adicional esta vez, a diferencia de ΔG_{obs}° , que corresponde al calor liberado o absorbido por el tampón del medio al intercambiar protones, ΔN , con el sistema reaccionante. Cuando la concentración del tampón es mucho mayor que la de los reactivos, prácticamente todos los protones liberados o absorbidos en la formación del complejo se intercambian con el tampón, aunque siempre hay una pequeña fracción de los mismos que lo hace con los reactivos mismos ya que presentan también una capacidad tamponante (Janssen y Nelen, 1979). En nuestro caso, la concentración del tampón fue mucho mayor que la de los ligandos y la barnasa, y por lo tanto podemos escribir:

$$\Delta H_{obs}^{\circ} = \Delta H^{\circ} - \Delta N \Delta H_{p, Ta}^{\circ} \quad (5.28)$$

En esta ecuación, $\Delta H_{p, Ta}^{\circ}$ representa el calor molar de protonación del tampón, y ΔH° es la entalpía de la reacción corregida solamente por la protonación del tampón. En la ecuación anterior consideramos que el valor de ΔN es positivo cuando los protones los absorbe el complejo. La derivación de la ecuación de la dependencia de ΔH° con el pH puede obtenerse considerando el modelo descrito anteriormente (Figura 5-4). ΔH° está relacionada con ΔG_{obs}° por la relación de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta H^{\circ} = \Delta G_{obs}^{\circ} - T \left[\frac{\partial \Delta G_{obs}^{\circ}}{\partial T} \right]_P \quad (5.29)$$

Derivando ΔG_{obs}° , Ecuación (5.26), con respecto a la temperatura, y teniendo en cuenta de la relación de van't Hoff que relaciona el calor molar de protonación $\Delta H_{p,j}^{\circ}$ de un grupo j con la dependencia de su pK_j con la temperatura:

$$\frac{dpK_j}{dT} = \frac{\Delta H_{p,j}^{\circ}}{2.3RT^2} \quad (5.30)$$

y de la siguiente igualdad también:

$$\frac{d\ln(1+10^{pK_j-pH})}{dT} = \frac{\Delta H_{pj}^o}{RT^2} \left[\frac{10^{pK_j-pH}}{1+10^{pK_j-pH}} \right] \quad (5.31)$$

obtenemos la ecuación que relaciona ΔH^o con los calores de protonación de los diferentes grupos en los reactivos libres ΔH_{pj}^o , y en el complejo $\Delta H_{pj}^{\circ'}$:

$$\Delta H^o = \Delta H_b^o + \sum_j \frac{10^{pK'_j-pH}}{1+10^{pK'_j-pH}} \Delta H_{pj}^{\circ'} - \sum_j \frac{10^{pK_j-pH}}{1+10^{pK_j-pH}} \Delta H_{pj}^o \quad (5.32)$$

en donde ΔH_b^o es independiente del pH y corresponde al calor molar de unión del ligando a la macromolécula cuando ambos están en la forma no protonada. ΔH_a^o , correspondiente a la unión cuando los dos reactivos están en la forma protonada, está relacionada con ΔH_b^o por la expresión (ver el ciclo termodinámico de la Figura 5-4):

$$\Delta H_a^o = \Delta H_b^o + \sum_j (\Delta H_{pj}^{\circ'} - \Delta H_{pj}^o) \quad (5.33)$$

Finalmente la expresión total de ΔH_{obs}^o en función del pH queda:

$$\Delta H_{obs}^o = \Delta H_b^o + \sum_j \frac{10^{pK'_j-pH}}{1+10^{pK'_j-pH}} \Delta H_{pj}^{\circ'} - \sum_j \frac{10^{pK_j-pH}}{1+10^{pK_j-pH}} \Delta H_{pj}^o - \Delta N \Delta H_{p,Ta}^o \quad (5.34)$$

Análisis de las valoraciones calorimétricas de 3'GMP y la barnasa con HCl:

Los calores medidos en las valoraciones de 3'GMP y la barnasa con HCl, después de su corrección por el calor de agitación y de dilución, pueden interpretarse como el calor neto de la unión de los protones a los grupos ionizables. El análisis de estos calores para la determinación del calor molar de protonación de cada uno de ellos puede tratarse como el del fenómeno general de interacción macromolécula-ligando (ver Capítulo 1) en donde el ligando sería el protón. Los calores medidos a cada inyección i corresponden a la diferencia entre el calor acumulado entre dos inyecciones consecutivas $i-1$ y i .

$$q_i = V_c X_{t,i} \left[(\Delta H_{p,X}^o)_i - (\Delta H_{p,X}^o)_{i-1} \right] \quad (5.35)$$

siendo $(\Delta H_{p,X}^o)_i$ el calor acumulado por mol del reactivo X en la inyección número i y que está referido a un estado de referencia. El estado de referencia puede ser cualquier estado de protonación del reactivo X, por ejemplo el estado al pH inicial de la valoración, pH_0 . Si consideramos $\Delta H_{p,j}^o$ el calor molar de protonación de los n_j grupos idénticos de tipo j que posee el reactivo X, y que a un pH_i dado, hay un incremento de ΔN_j protones unidos a estos grupos por molécula de X con respecto al pH de referencia pH_0 , tendremos:

$$(\Delta H_{p,X}^o)_i = \sum_j \Delta N_j \Delta H_{p,j}^o \quad (5.36)$$

Y sabiendo que se puede relacionar ΔN_j con el pK_j y n_j por la Ecuación (5.40) (ver más adelante), podemos formular la siguiente ecuación de la variación del contenido entálpico del reactivo X durante su valoración con los protones:

$$(\Delta H_{p,X}^o)_i = \sum_j n_j \Delta H_{p,j}^o \left[\frac{10^{pK_j - pH_i}}{1 + 10^{pK_j - pH_i}} - \frac{10^{pK_j - pH_0}}{1 + 10^{pK_j - pH_0}} \right] \quad (5.37)$$

En principio es posible ajustar los datos de $\Delta H_{p,X}^o$, que se pueden calcular a partir de los calores q_i medidos a cada inyección de la valoración calorimétrica mediante la Ecuación (5.12), por mínimos cuadrados no lineales a la ecuación anterior. En el caso de que se conocen los pKs, el ajuste puede convertirse a un ajuste lineal que consiste en resolver el sistema de ecuaciones normales para la determinación de las entalpías de protonación ΔH_p^o (ver Capítulo 1).

5.3.2 Análisis de los Datos Potenciométricos.

Valoraciones potenciométricas de 3'GMP y la barnasa:

Durante la valoración potenciométrica de un reactivo X desde un pH básico a un pH ácido ocurre una unión de protones a los diferentes grupos ionizables del mismo. A un pH determinado, la cantidad de protones unidos a un grupo j depende de la constante de

equilibrio de protonación $k_{p,j}$ (es decir de su pK_j). La derivación de la ecuación teórica de la variación del número de protones unidos al reactivo X con el pH, $\Delta N_{X,u}$, para la obtención de los valores de los pK puede formularse tratando la unión de los protones como el fenómeno general de unión macromolécula-ligando (ver Capítulo 1). Si consideramos que los protones se unen a los grupos de una manera independiente y que el reactivo X posee n_j grupos idénticos de tipo j, el polinomio de unión P_H vendrá dado por:

$$P_H = \prod_j (1 + k_{p,j}[H^+])^{n_j} \quad (5.38)$$

y el parámetro de unión \bar{H}^+ será:

$$\bar{H}^+ = \left[\frac{\partial \ln P_H}{\partial \ln [H^+]} \right]_T = \sum_j \frac{n_j k_{p,j}[H^+]}{1 + k_{p,j}[H^+]} \quad (5.39)$$

Y por lo tanto, $\Delta N_{X,u}$ que representa el cambio en los protones unidos entre un pH inicial, pH_0 , y cada pH de la valoración será:

$$\Delta N_{X,u}(pH) = \bar{H}^+(pH) - \bar{H}^+(pH_0) = \sum_j \frac{n_j 10^{pK_j - pH}}{1 + 10^{pK_j - pH}} - \frac{n_j 10^{pK_j - pH_0}}{1 + 10^{pK_j - pH_0}} \quad (5.40)$$

En este tratamiento, se ha considerado que las actividades y las concentraciones de los protones son iguales. La introducción de los coeficientes de actividad complicaría mucho el análisis, y no pensamos que habrá diferencia apreciable en los valores de los pK.

Análisis del intercambio protónico ΔN en la formación del complejo:

El número de protones absorbidos o liberados durante la interacción del ligando con la proteína puede deducirse a partir de la derivada de la variación de la energía de Gibbs de la reacción con respecto al pH, ya que (Wyman, 1964; Alberty, 1969):

$$\Delta N = \frac{1}{2.3RT} \left[\frac{\partial \Delta G_{obs}^o}{\partial pH} \right]_T \quad (5.41)$$

Entonces llevando a cabo la derivada de la Ecuación (5.26), generalizada para cualquier número de grupos, se obtiene la relación de ΔN con los valores de los pK en las formas

libres, pK_j , y en el complejo, pK'_j :

$$\Delta N = \sum_j \frac{10^{pK'_j - pH}}{1 + 10^{pK'_j - pH}} - \frac{10^{pK_j - pH}}{1 + 10^{pK_j - pH}} \quad (5.42)$$

que representa simplemente la variación en el parámetro de unión de los protones a las dos formas de los reactivos; forma libre y complejada.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSION.

5.4.1 Valoraciones Potenciométricas y Calorimétricas de 3'GMP, Barnasa y Complejo Barnasa-3'GMP.*Valoración potenciométrica de 3'GMP:*

En la Tabla 5-1 se dan los datos de v_{HCl} , volumen total de HCl añadido, y los pH correspondientes en cada momento de la valoración potenciométrica de 3'GMP, así como la variación en los moles de protones unidos por mol de 3'GMP, $\Delta N_{\text{GMP,u}}$, desde el pH inicial $\text{pH}_0 = 9.49$ hasta pH 2.52, en las condiciones experimentales: $T = 25^\circ\text{C}$ y fuerza iónica 50 mM de KCl. Los valores de $\Delta N_{\text{GMP,u}}$ se han calculado de acuerdo con la Ecuación (5.4) y una representación de los mismos se da en la Figura 5-5 Como se puede comprobar en la figura, se han valorado tres grupos con distintos pK, como cabe de esperar (ver Figura 5-2).

Los valores de los pK de estos tres grupos se han obtenido a partir del ajuste no lineal de los datos de $\Delta N_{\text{GMP,u}}$ a la Ecuación (5.40), y se han encontrado valores de 9.54, 2.03, y 5.85 en las condiciones experimentales de fuerza iónica 50 mM de KCl y temperatura 25°C . La calidad del ajuste se muestra también en la misma figura. Los dos primeros pK son de dos grupos de la base de 3'GMP y el tercero es de uno de los dos grupos OH del fosfato (el segundo grupo), ver Figura 5-2. Estos valores no difieren mucho de los datos de la bibliografía; 9.38, 2.3 y 5.92 ("Handbook of Biochemistry"). No sabemos a que fuerza iónica están determinados estos últimos valores, pero lo más probable a fuerza iónica cero. El efecto de la fuerza iónica I sobre los pK puede estimarse a partir de la ecuación de Debye-Huckel:

$$\text{pK}(I) = \text{pK}(I=0) + \frac{0.51(2Z-1)\sqrt{I}}{1+1.6\sqrt{I}} \quad (5.43)$$

en donde Z es la carga de la forma ácida. En el caso del fosfato y el grupo de pK 2.03, en donde $Z = -1$ y 0 respectivamente, la disminución del pK con el aumento la fuerza iónica está de acuerdo con la ecuación de Debye-Huckel, pero, en el caso del otro grupo de pK 9.54 en donde $Z = -2$, la situación no es clara.

Tabla 5-1

Datos potenciométricos obtenidos en la valoración de 3'GMP con HCl, en 50 mM KCl, temperatura 25°C. v_{HCl} representa el volumen total de HCl añadido para llevar el pH de la disolución desde $\text{pH}_0 = 9.49$ a los pH correspondientes de la segunda columna. $\Delta N_{\text{GMP},u}$ representa la variación en los protones unidos por molécula de ligando, calculada según la Ecuación (5.4).

$v_{\text{HCl}}(\mu\text{l})$	pH	$\Delta N_{\text{GMP},u}$
0	9.49	0
05.0	9.24	0.14
09.0	8.99	0.25
13.0	8.61	0.36
15.0	8.26	0.42
17.0	7.62	0.47
19.0	7.08	0.53
21.0	6.78	0.59
23.5	6.51	0.66
25.5	6.35	0.72
27.5	6.22	0.77
31.5	6.00	0.89
36.5	5.74	1.03
41.5	5.46	1.17
46.5	5.08	1.31
50.5	4.50	1.42
52.7	4.03	1.46
53.7	3.86	1.47
55.7	3.62	1.49
58.7	3.39	1.51
63.7	3.16	1.55
68.7	3.01	1.58
73.7	2.89	1.61
78.7	2.79	1.62
83.7	2.72	1.65
93.7	2.59	1.68
100.7	2.52	1.70

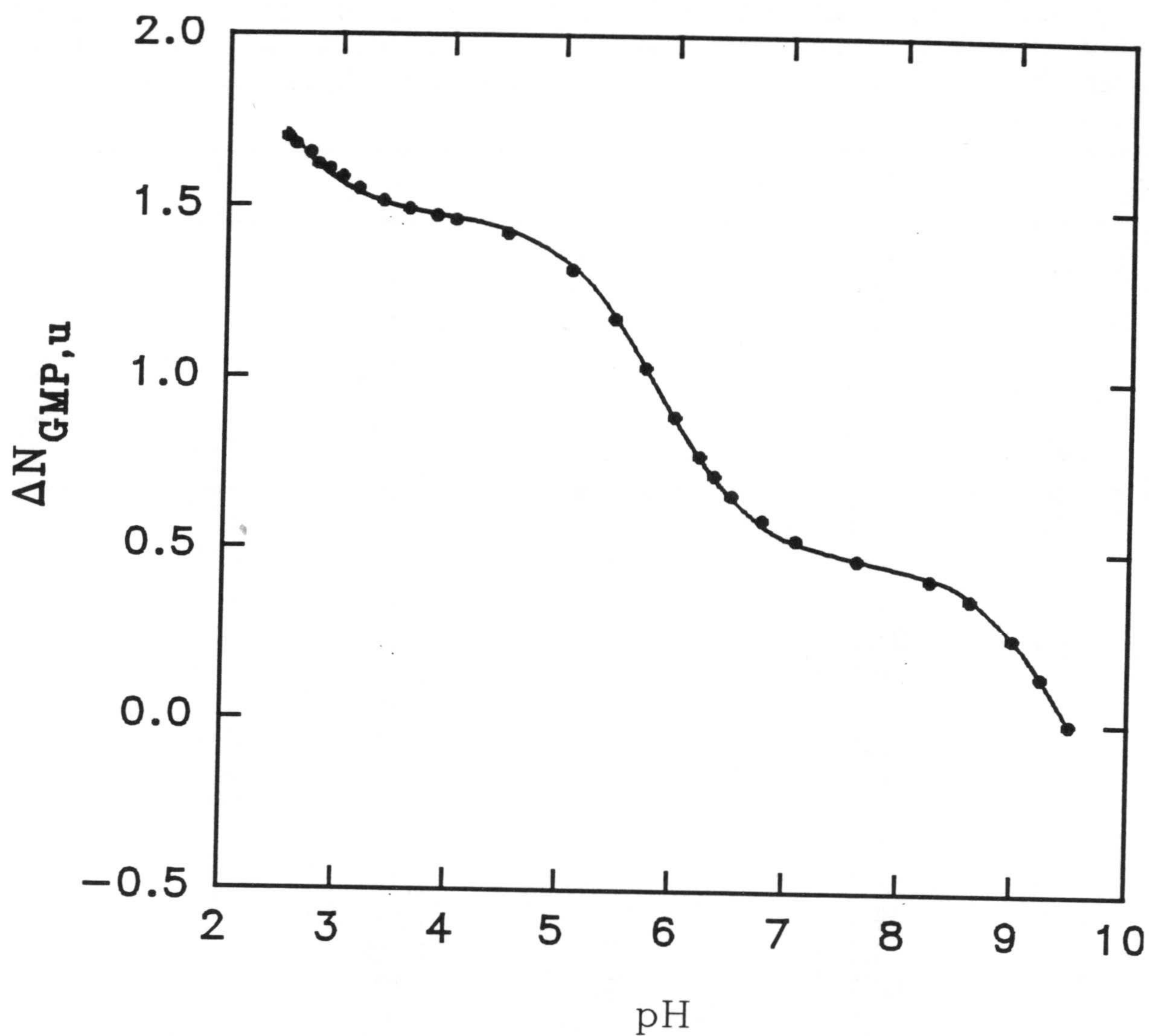


Figura 5-5: Representación de la variación en los moles de protones unidos por mol de 3'GMP frente a pH. La línea continua representa el mejor ajuste a la Ecuación (5.40) con los parámetros 2.04 ± 0.02 , 5.85 ± 0.01 y 9.54 ± 0.01 para los pK de los tres grupos valorados en el rango de pH 2.52 - 9.49. La desviación estándar del ajuste es 0.01 protón.

Valoración potenciométrica de la barnasa:

En la Tabla 5-2 se dan los resultados de la valoración potenciométrica de la barnasa en los dos sentidos de pH. Se puede comprobar que el número de grupos valorados en los dos sentidos es el mismo: 7.7 entre pH 3.55 y 8.65. Según la secuencia en aminoácidos de la barnasa (Hill et al., 1983), hay en total 35 grupos ionizables: 1 grupo α -amino terminal, 1 grupo α -carboxílico terminal, 8 lisinas, 6 argininas, 6 tirosinas, 2 histidinas, 9 ácidos aspárticos, y 3 glutamatos. De acuerdo con los pK aproximados de estos grupos en las proteínas (Tanford, 1962), habría que valorar aproximadamente 13 grupos (10 carboxílicos y 3 amino) entre pH 3.55 y 8.65. Parece por lo tanto que ≈ 5 grupos no se han valorado.

Para comprobar la validez de la metodología experimental que hemos seguido, se ha hecho una valoración potenciométrica de la ribonucleasa A entre pH 9.37 y 3.44 en KCl 50 mM y temperatura 25°C. 11.5 grupos se han valorado en este intervalo de pH y este dato es conforme con los valores de 10.6, 11.5 y 12.9 obtenidos a fuerzas iónicas 10, 30 y 150 mM respectivamente (Tanford y Hauenstein, 1956).

En la Figura 5-6A se han representado las dos curvas de valoración de la barnasa así como la superposición de las mismas en la parte B de la misma figura. Las dos curvas coinciden en el mayor intervalo de pH, lo que muestra la reversibilidad de la valoración. La pequeña diferencia de aproximadamente 0.1 protones observada alrededor de pH 6.5 puede atribuirse a errores experimentales. Hay que decir en cuanto al tiempo que las medidas de pH se tomaban en un intervalo de tiempo regular, aproximadamente 45 s, después de la adición de la sosa o el clorhídrico. El tiempo puede ser un factor importante a tener en cuenta cuando hay cambios conformacionales irreversiblemente inducidos por el pH (Tanford, 1962). No hemos estudiado el efecto de la velocidad de valoración sobre la reversibilidad, ya que generalmente, es en las zonas de pH extremas en donde los cambios conformacionales importantes ocurren y donde tal efecto puede manifestarse.

El análisis de la unión de protones a proteínas no es fácil, debido al gran número de sitios de unión para los protones que presentan características diferentes. Uno de los métodos que se ha utilizado para este tipo de análisis ha sido la aplicación del modelo de Linderstrøm-Lang, que permite una linealización de diferentes partes de la curva protónica y consiguientemente, obtener los diferentes parámetros de cada tipo de los grupos ionizables: los pK intrínsecos, los factores electrostáticos, etc. Este método ha sido discutido y criticado

Tabla 5-2

Datos potenciométricos obtenidos en la valoración de un volumen inicial de 1.32 ml de barnasa 0.272 mM con HCl 0.104 M y NaOH 0.102, en KCl 50 mM y $T = 25^{\circ}\text{C}$. $\Delta N_{\text{Ba,d}}$ y $\Delta N_{\text{Ba,u}}$ representan la variación en los protones disociados y unidos por molécula de barnasa desde $\text{pH}_0 = 3.55$ y 8.65 respectivamente.

$V_{\text{NaOH}}(\mu\text{l})$	pH	$\Delta N_{\text{Ba,d}}$	$V_{\text{HCl}}(\mu\text{l})$	pH	$\Delta N_{\text{Ba,u}}$
0	3.55	0	0	8.65	0
05.0	3.81	0.95	01.5	8.31	0.42
10.0	4.15	2.06	03.0	7.97	0.85
13.0	4.42	2.78	04.5	7.63	1.28
15.0	4.65	3.29	05.5	7.36	1.57
17.0	4.97	3.82	06.5	7.04	1.86
18.5	5.32	4.22	07.5	6.74	2.15
19.5	5.63	4.49	08.5	6.44	2.43
20.5	5.96	4.77	09.5	6.15	2.72
21.5	6.26	5.05	10.5	5.86	3.01
22.5	6.58	5.33	11.5	5.55	3.29
23.5	6.90	5.61	13.0	5.14	3.71
24.5	7.18	5.90	14.5	4.84	4.11
25.5	7.46	6.18	16.0	4.63	4.51
26.5	7.68	6.46	18.0	4.40	5.03
28.0	8.00	6.88	21.0	4.13	5.76
29.5	8.32	7.30	25.0	3.86	6.67
31.0	8.65	7.72	30.0	3.58	7.63

por Tanford (1962), y aplicado a varias proteínas: ribonucleasa A (Tanford y Hauenstein, 1956), lisozima (Tanford y Wagner, 1954), albumina (Tanford et al., 1955). En nuestro caso, no ha sido posible la aplicación de este modelo, ya que el mismo requiere el conocimiento de la carga Z de la proteína así como el factor electrostático w . Este último está basado en consideraciones teóricas que escapan de nuestro conocimiento. Nosotros aquí, hemos analizado la curva protónica de la barnasa mediante ajuste no lineal al modelo descrito en la Sección de Materiales y Métodos: a cada pH $\Delta N_{\text{Ba,u}}$ representa la variación en el número de protones unidos por molécula de barnasa y está relacionada con los diferentes pK_j de los n_j grupos idénticos de tipo j de acuerdo con la expresión:

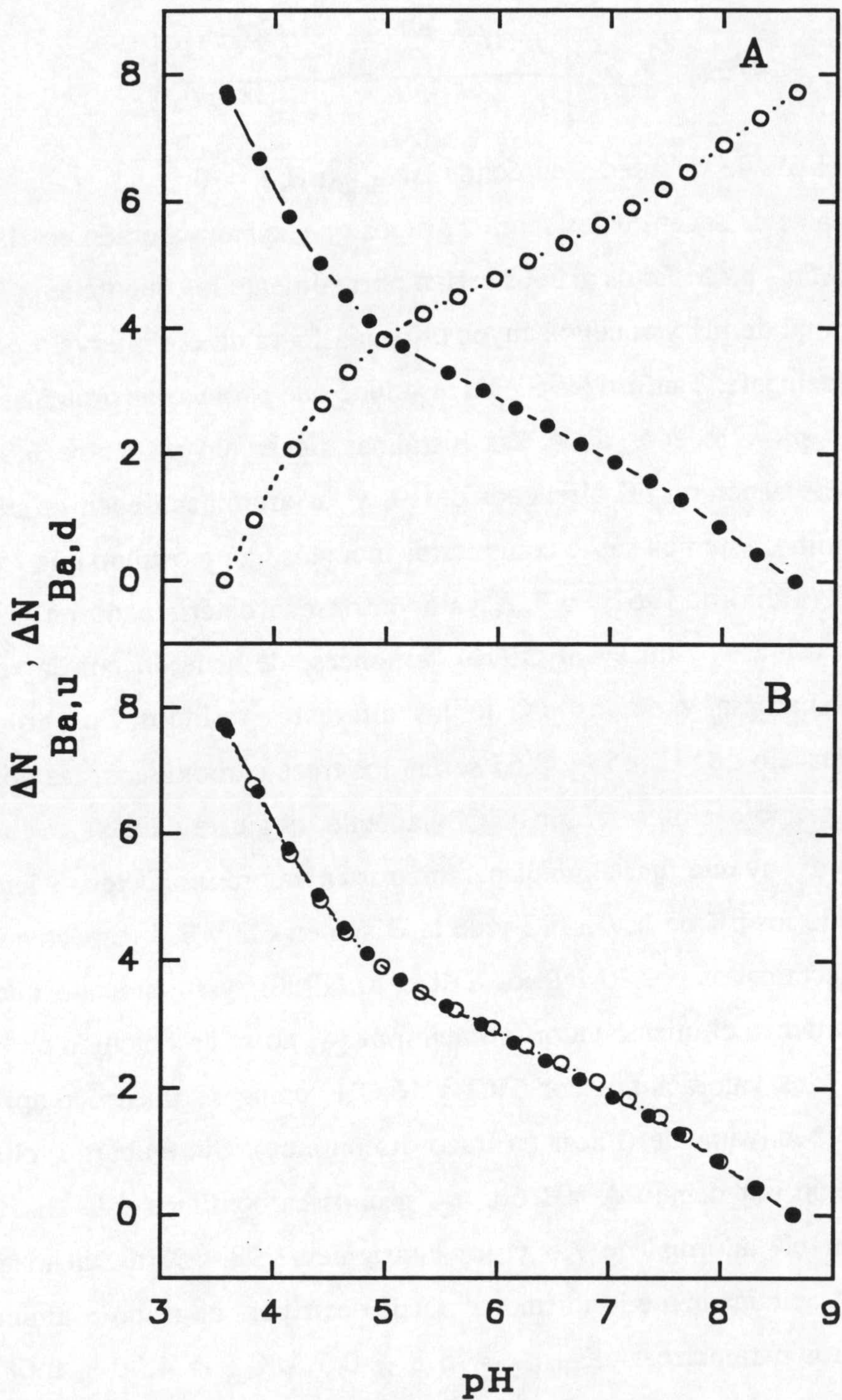


Figura 5-6: A. Representación de la variación en los moles de protones unidos $\Delta N_{Ba,u}$ (curva en trazo continuo —) y disociados $\Delta N_{Ba,d}$ (curva en trazo discontinuo ----) por mol de barnasa. Los datos han sido medidos en KCl 50 mM , T=25°C. B. Las dos curvas en (A) se han hecho coincidir a pH 3.55 para ver la reversibilidad de la valoración. Las curvas son solamente ajustes por esplines.

$$\Delta N_{Ba,u} = \sum_j \left[\frac{n_j 10^{pK_j - pH}}{1 + 10^{pK_j - pH}} - \frac{n_j 10^{pK_j - pH_0}}{1 + 10^{pK_j - pH_0}} \right] \quad (5.44)$$

en donde pH_0 es el pH de referencia en donde $\Delta N_{Ba,u}(pH_0) = 0$.

El problema es de saber cuales son los grupos que se han valorado en el intervalo de pH experimental 3.55 - 8.65. Estos grupos serían normalmente los que tienen pK dentro del intervalo experimental de pH y aquellos cuyos pK están fuera de ese intervalo por menos de 1 unidad aproximadamente. Tanford (1962) ha resumido que para varias proteínas, los grupos carboxílicos tienen pK alrededor de 4, las histidinas tienen un pK entre 6.3 y 7.4, las tirosinas y las lisinas tienen un pK alrededor de 10, y las argininas tienen un pK sobre 12. Para un grupo α -amino, estudios sobre compuestos modelos han mostrado que se valora con un pK entre 7 y 8 (Tanford, 1962), o 7.7, valor intrínseco determinado en tres proteínas globulares a 25°C (Shiao y Sturtevant, 1976). Entonces, de acuerdo con la secuencia en aminoácidos de la barnasa y de los pK de los diferentes residuos, los grupos que se valorarían en el intervalo de pH 3.55 y 8.65 serían los trece carboxílicos, las dos histidinas (His102 y 18) y el grupo α -amino terminal. Obviamente, el ajuste de ΔN_{Ba} a los 16 pK no es posible, por lo cual hay que fijar algunos parámetros en valores conocidos y hacer algunas suposiciones. Fijando los pK de la His102 y de la His18 en 6.3 y 7.8 respectivamente, que son los valores determinados por RMN por Sali et al.(1988), y suponiendo que todos los grupos carboxílicos tienen el mismo valor promedio pK_{Ca} , no se ha obtenido un buen ajuste en los datos de las dos valoraciones con HCl y NaOH, como se puede comprobar en la Figura 5-7A y B respectivamente (líneas en trazo discontinuo). Sin embargo, el análisis de la curva de valoración por debajo de pH 6 a n_{Ca} grupos carboxílicos y la His102 (la otra histidina muestra un pK anormal de 7.8 y por consiguiente 98.4 % de la misma está ya protonada a pH 6, y prácticamente lo mismo se puede decir para el grupo α -amino) ha dado un buen ajuste con los parámetros: $pK_{His102} = 5.8 \pm 0.5$, $pK_{Ca} = 4.00 \pm 0.08$, y $n_{Ca} = 5.7 \pm 0.2$, para la curva de valoración con HCl, y 5.6 ± 0.3 , 3.90 ± 0.05 , 5.9 ± 0.2 para los mismos parámetros en el caso de la valoración con NaOH. Los ajustes de estas partes de las curvas de valoración a pH ácido se ilustran en las figuras internas en la Figura 5-7.

Los parámetros obtenidos en los ajustes son razonables excepto que se encontró que sólo 6 de los 13 grupos carboxílicos son valorables. Si se fija n_{Ca} en 13 en el ajuste, el

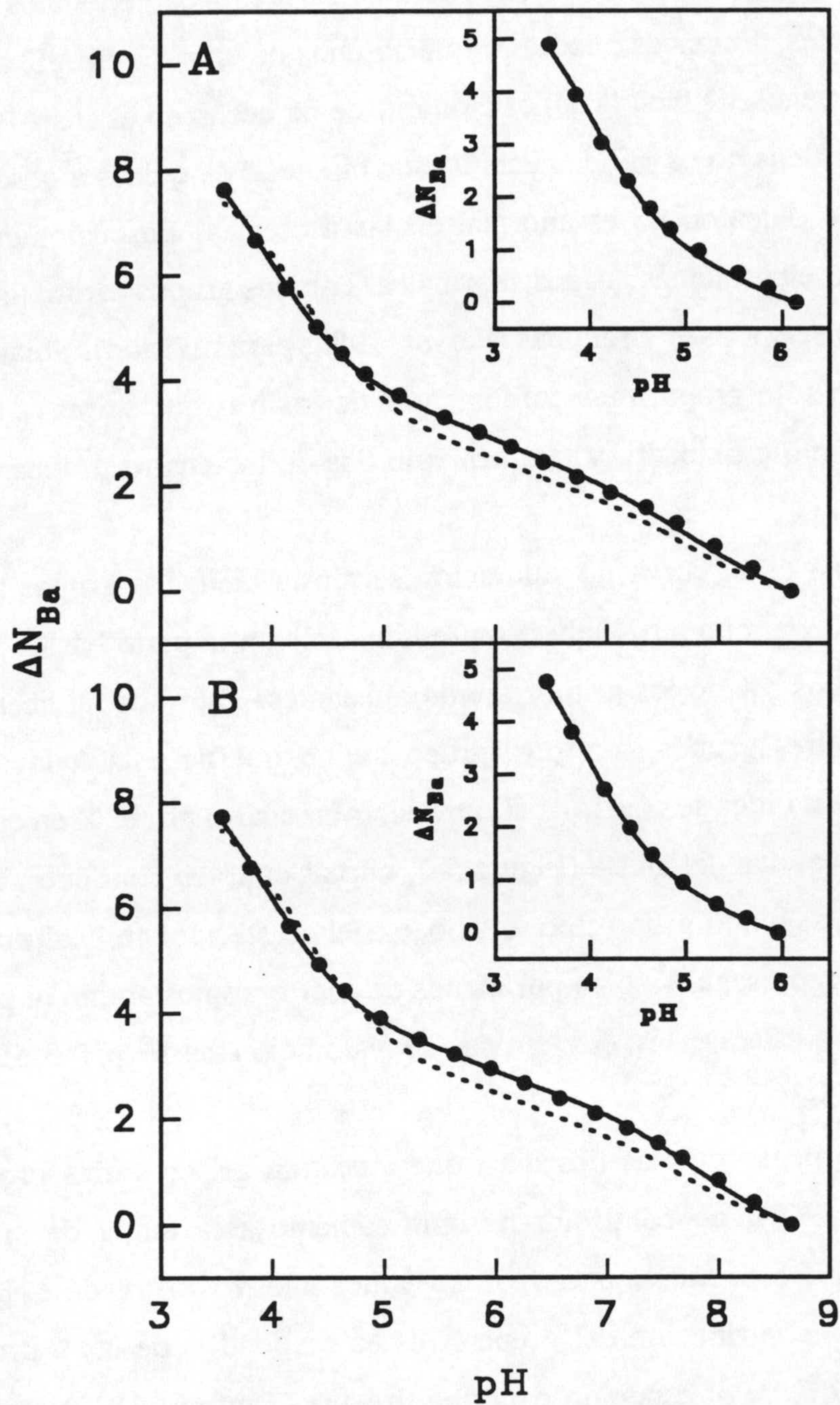


Figura 5-7: A. Ajuste no lineal de la variación frente al pH de ΔN_{Ba} (protones unidos por molécula de barnasa), obtenidos en la valoración con HCl entre pH 3.58 y 8.65, a la Ecuación (5.44) para 6 grupos carboxílicos idénticos, dos histidinas y un grupo amino (línea en trazo discontinuo); y para los mismos grupos y además otro grupo desconocido X (curva en trazo continuo). La desviación estándar del ajuste es de 0.06 protones. En la parte superior de la figura, se representa el ajuste sólo en el intervalo de pH 3.58 y 6.15 a 6 grupos carboxílicos y una histidina. B. Lo mismo que en A, con los datos de ΔN_{Ba} obtenidos en la valoración reversa con NaOH. La desviación estándar del ajuste en trazo continuo es de 0.05 protones. Los parámetros de los ajustes se dan en el texto.

mismo no es bueno. Por lo cual, no todos los grupos carboxílicos conocidos a partir de la estructura son valorables. Entonces puede ser que algunos de ellos tienen pK anormales por debajo de 2.5 por lo menos. O bien la suposición que se ha hecho en el análisis consistiendo en tratarlos como idénticos no es válida. Esta última hipótesis es quizás a descartar, ya que el valor de pK_{Ca} de 4 obtenido no es anormal en las proteínas. En cualquier caso, no es sorprendente encontrar en proteínas grupos anormales. Para los grupos carboxílicos, pK entre 2.5 hasta 5 han sido observados en proteínas (Fersht, 1985, para revisión). Shiao y Sturtevant (1976) encontraron un sólo grupo imidazol ionizable de los tres que se preve a partir de la estructura del citocromo c oxidado, y también sólo dos de los cuatro grupos fenólicos del chimotripsinogeno A.

Si la parte ácida de la curva de valoración se ajusta bien, los grupos aminos de la His102, la His18, y el α -amino terminal no representan bien a la parte básica de la misma, incluso al dejar todos los pK de los grupos amino ajustables. Esto nos ha hecho pensar en que, además de estos tres grupos, hay otro grupo amino que no está todavía totalmente protonado a pH 8.65. Esta idea se confirma al introducir un cuarto grupo X en el análisis que ha mejorado mucho la calidad del ajuste (Figura 5-7, curvas en trazo continuo). Sin embargo la consideración de un segundo grupo tipo X empeora el ajuste, por lo cual nuestros datos a pH básico no pueden representarse bien por menos de cuatro grupos amino ni por más. Los parámetros del mejor ajuste de las dos curvas de valoración entre pH 3.55 y 8.65 se sumarizan en la Tabla 5-3.

Al principio, se pensó que las tirosinas, que muestran pK en varias proteínas entre 9.4 y 10.8 (Tanford, 1962), no contribuirán significamente a la unión de protones a la barnasa por debajo de pH 8.6. Sin embargo, si ajustamos nuestros datos de ΔN_{Ba} hasta pH 8.65, suponiendo que la contribución del grupo X es en realidad la de las 6 tirosinas de la barnasa con un pK de 9.6, valor esperado para una tirosina (Tanford, 1962), obtenemos un buen ajuste, sin variación apreciable en los pK de la His102 y el grupo α -amino de la Tabla 5-3. Por lo tanto, el grupo X podría representar bien a las 6 tirosinas, si las mismas muestran un pK normal de 9.6 y son accesibles a la unión de protones. El grupo X podría representar también sólo a la tirosina 103 que se encuentra en la barnasa formando varios puentes de hidrógeno con el Glu73 y la Arg87 (ver Figura 5-3) estabilizando así su forma ionizada y por consiguiente tiene un pK menor que lo normal.

Tabla 5-3

Valores de los pK de los grupos ionizables de la barnasa valorados en el intervalo de pH 3.55 y 8.65.

Grupo	Carboxil	His102	α -amino	X
*pK	3.96 \pm 0.06	5.8 \pm 0.2	7.1 \pm 0.2	8.4 \pm 0.2
	3.94 \pm 0.05	5.9 \pm 0.2	7.3 \pm 0.1	8.4 \pm 0.2

* Primera fila: parámetros de la valoración con HCl. Segunda fila: parámetros de la valoración con NaOH.

Para n_{Ca} se han encontrado valores de 5.8 \pm 0.2 y 5.9 \pm 0.1, en las dos valoraciones. El valor del pK de la His18 se ha fijado en 7.8, valor determinado por Sali et al. (1988).

Estos parámetros se obtuvieron mediante ajuste no lineal a la Ecuación (5.44), utilizando la opción "Curve Fit" del programa SigmaPlot (Jandel Co. California, USA).

En cuanto a la asignación de estos pK, es evidente que el pK de 5.85 es de la His102, en comparación con el valor de 6.3 medido por RMN a fuerza iónica 20 mM (Sali et al., 1988). El pK de 7.2 se asigna al α -amino, que es conforme con los datos de Tanford (1962) y Shiao y Sturtevant (1976) para otras proteínas.

Con nuestro tratamiento, hemos encontrado que los datos se representan mejor con un pK 5.85 \pm 0.2 para la His102 que con el pK 6.30 \pm 0.05 determinado por RMN (Sali et al., 1988) a fuerza iónica 20 mM, temperatura 25°C. La mejora del ajuste se refleja bien en la desviación estándar del mismo que es aproximadamente un 40 % peor en el segundo caso. Mossakowska et al. (1989) en sus estudios cinéticos con dinucleótidos a diferentes pH encontraron que sus datos se ajustan a dos pK, uno 5.6 a fuerza iónica 100 mM y otro 5.7 a fuerza iónica 20 mM, que ha sido atribuido a la His102. La diferencia en sus valores con el valor determinado por Sali ha sido explicada por falta de separación suficiente entre los dos pK para poder obtener valores precisos de los mismos. Los datos de Shreiber y Fersht (1993) en el estudio de la interacción de la barnasa con el barstar a diferentes pH y a fuerza iónica 100 mM han sido interpretados de acuerdo con la ionización de un grupo de pK 6.4 \pm 0.3, que ha sido también asignado a la His102. En nuestros ajustes, el pK_{His18} ha sido siempre fijado en 7.8, valor determinado a fuerza iónica 20 mM también por Sali; y hemos

encontrado en los mismos que el pK_{His102} no es muy sensible al pK de la His18: hay un aumento de solamente 0.005 ó 0.05 en el pK_{His102} al considerar un pK de 7.7 y 7.6 en lugar de 7.8 para la His18. No ha sido posible ajustar el pK_{His18} debido a la dependencia del mismo con el del grupo α -amino. Por estas razones y por otras que veremos más adelante, hemos concluido que el pK de la histidina 102 en nuestras condiciones de trabajo es diferente de 6.3; un valor posible para el mismo es 5.9 ± 0.2 , un valor conforme con los de Mossakowska y con el de Shreiber, dentro de los intervalos de errores. No pensamos que el valor bajo se deba al aumento de la fuerza iónica ya que, normalmente, el pK intrínseco de un grupo cuya forma ácida está cargada positivamente tiene que aumentar con la fuerza iónica (Tanford, 1962).

Valoración potenciométrica del complejo barnasa-3'GMP:

En la Tabla 5-4 se dan los datos directamente obtenidos (volumen de HCl añadido, pH) en la valoración del complejo barnasa-3'GMP entre pH 3.59 y 8.54. En la misma tabla se dan también los valores de $\Delta N_{C,u}$ (incremento en los protones unidos al complejo) que se han calculado de acuerdo con la Ecuación (5.6) y en la Figura 5-8 se da la gráfica de la curva de valoración del complejo.

Dado que la constante de equilibrio barnasa-3'GMP depende del pH (ver más adelante) el número de moles de complejo n_C en la Ecuación (5.6) no se mantiene constante durante la valoración. En todo el intervalo de pH experimental, el grado de saturación de la proteína variaba entre 0.92 y 0.99. Por lo tanto, hay que tener en cuenta esta variación de Δn_C en el cálculo de $\Delta N_{C,u}$ en la Ecuación (5.6) ya que la misma contribuye a la liberación o absorción de protones. El efecto de Δn_C se manifiesta por un término igual a $\Delta N(pH_0)\Delta n_C/n_C$, siendo pH_0 el pH inicial de la valoración. Sin embargo en nuestro caso, dados los valores pequeños de $\Delta N(pH_0 = 8.54) \approx 0.06$ (valor medido por pH-stat, ver más adelante) y de $\Delta n_C/n_C$, se ha despreciado el efecto protónico de Δn_C en la Ecuación (5.6) del cálculo de $\Delta N_{C,u}$. Con respecto al cálculo de $\Delta N_{C,u}$, hay que decir también que en aquella ecuación, el cambio en los protones unidos a la proteína libre ($\Delta H^+_{\text{Ba,libre}}$) y al ligando libre ($\Delta H^+_{\text{GMP,libre}}$) se calcularon según la Ecuación (5.7) a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas de los mismos hechas anteriormente, y las concentraciones de la proteína libre, del ligando libre y del complejo se calcularon utilizando las constantes

Tabla 5-4

Datos potenciométricos obtenidos en la valoración de un volumen inicial de 1.463 ml de una disolución de 3'GMP 0.651 mM + barnasa 0.225 mM con HCl 0.104 M, en KCl 50 mM y temperatura 25°C.

$V_{\text{HCl}}(\mu\text{l})$	pH	$\Delta N_{\text{C,u}}$
0	8.54	0
02.0	8.18	0.53
04.0	7.84	1.11
06.0	7.48	1.70
07.5	7.20	2.13
09.0	6.92	2.53
10.5	6.65	2.89
12.0	6.39	3.19
14.0	6.08	3.54
16.0	5.77	3.83
17.5	5.52	4.04
19.5	5.17	4.38
21.5	4.85	4.82
23.5	4.57	5.31
26.0	4.29	5.94
29.0	4.02	6.65
32.5	3.77	7.39
35.7	3.59	7.98

de asociación determinadas calorimétricamente (Figura 5-18). Como había una ligera diferencia entre las dos curvas de valoración de la barnasa, $\Delta N_{\text{Ba,u}}$ y $\Delta N_{\text{Ba,d}}$, alrededor de pH 6.5 (ver Figura 5-6) se ha considerado un valor medio de los dos para los valores de $\Delta N_{\text{Ba,u}}$ en la Ecuación (5.7), y dada la no coincidencia de los pH experimentales de la valoración del complejo con los de las valoraciones de la proteína (Tabla 5-2) y del ligando (Tabla 5-1), $\Delta N_{\text{Ba,u}}$ y $\Delta N_{\text{GMP,u}}$ a cada pH de la valoración del complejo se han calculado de acuerdo con la Ecuación (5.44) y con los pK del mejor ajuste.

En la Figura 5-8, también se da el ajuste de los datos de $\Delta N_{\text{C,u}}$ a los grupos ionizables siguientes: n_{Ca} grupos carboxílicos, 2 histidinas, 1 grupo α -amino terminal, el grupo X de la proteína (ver Tabla 5-3) y dos grupos de ligando. Algunos pK de estos grupos

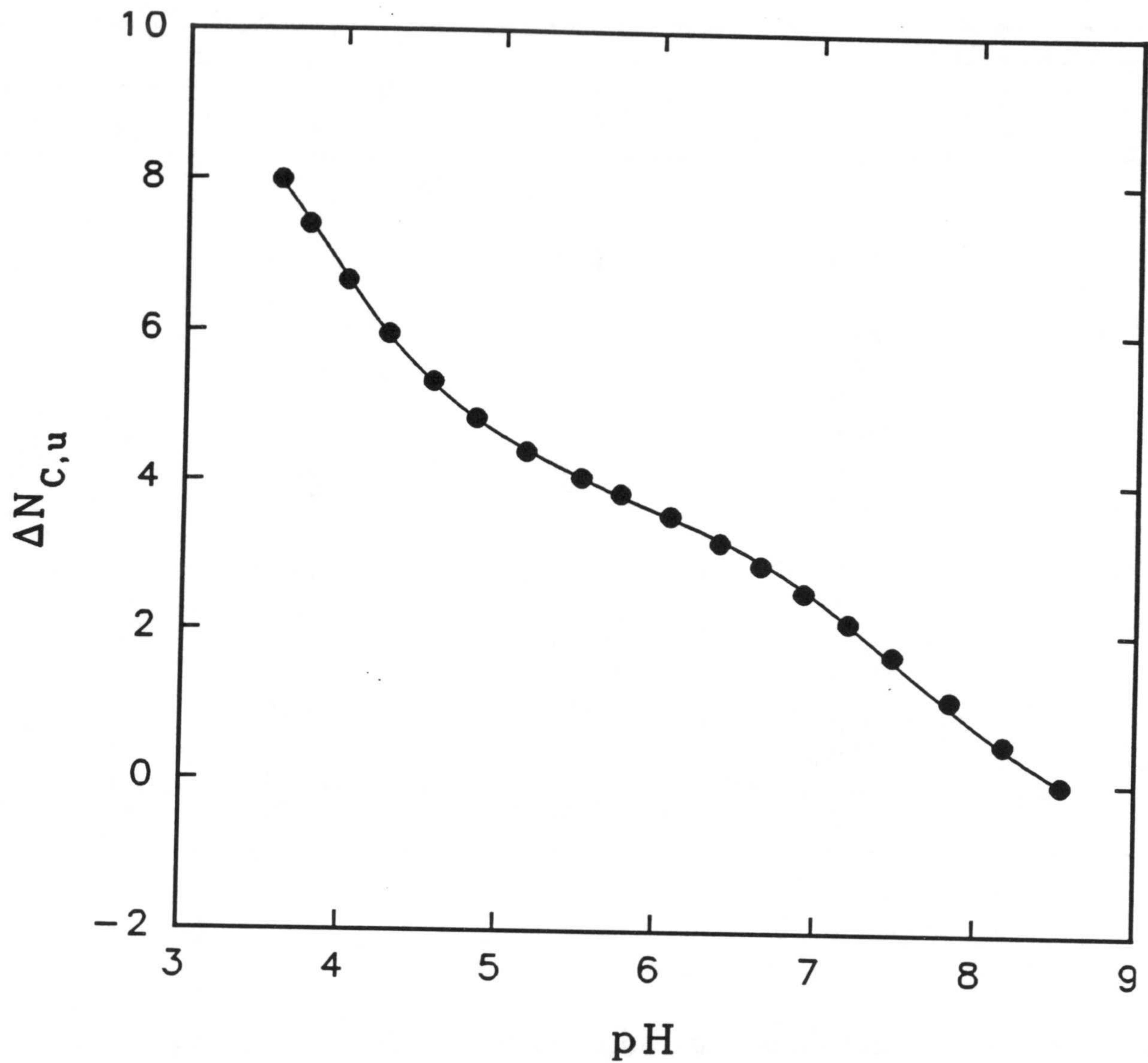


Figura 5-8: Variación en el número de protones unidos por molécula de complejo barnasa-3'GMP. La línea es el mejor ajuste a partir del cual se determinó los valores de 7.1, 3.1 y 5.6 para los pK' de la histidina 102, el glutamato 60 y el fosfato respectivamente. Ver texto para más detalle.

de determinaron antes en las valoraciones potenciométricas de la proteína y el ligando, y aquí se ha ajustado los datos a solamente los grupos que pueden tener valores diferentes de pK en el complejo y en las formas libres de los dos reactivos. Estos grupos son la His102 y el Glu60 en la barnasa y el segundo grupo OH del fosfato de 3'GMP (ver apartado siguiente para explicación). Los pK' de estos grupos y el número de grupos carboxílicos n_{Ca} obtenidos en el mejor ajuste son: $pK'_{His102} = 7.10 \pm 0.05$, $pK'_{Glu60} = 3.1 \pm 0.7$, $pK'_{Pi} = 5.60 \pm 0.04$ y $n_{Ca} = 4.7 \pm 0.4$.

Determinación del intercambio protónico $\Delta N(pH)$:

En la Tabla 5-5 se dan los valores de la variación en el número de protones unidos a la barnasa, a 3'GMP y al complejo barnasa-3'GMP desde pH 8.54 hasta 3.59, así como los valores de $\Delta N'$ correspondientes a la diferencia entre la curva de valoración del complejo y la suma de las curvas de la proteína y del ligando. Esta diferencia se explica por el hecho de que la formación de una molécula de complejo está asociada a la liberación o absorción de ΔN protones. Para corregir $\Delta N'$ y obtener valores absolutos de ΔN , se han determinado cuatro valores de ΔN_r a pH_r 3.59, 5.40, 6.50 y 8.48, como se explicó en la sección de Materiales y Métodos. Estos valores se han medidos por el método de pH-stat y se encontraron valores de -0.44, 0.24, 0.63 y 0.06 a los cuatro pH_r respectivamente. Por lo tanto, los valores de $\Delta N'$ se han corregido sumándoles un valor de 0.13 que es el promedio de las diferencias entre los cuatro valores de ΔN_r y sus correspondientes $\Delta N'$ (Ecuación (5.9)) para obtener los valores absolutos de ΔN . Estos se dan en la Tabla 5-5 y una gráfica de los mismos puede verse en la Figura 5-9.

Como se puede comprobar en dicha figura, a pH por encima de 5, se absorben protones durante la formación del complejo mientras que a pH por debajo de 5 se liberan protones. Esta liberación de protones a pH ácido podría ser debida a la ionización del fosfato del ligando si se supone que sólo la forma dianiónica del fosfato se une a la proteína de la misma manera que la unión de 3'CMP a la ribonucleasa A (Flogel et al., 1975), pero nosotros no tenemos evidencia de que sea éste el mismo caso. Consideramos que la liberación o absorción de protones es la consecuencia principal de los cambios en los pK de algunos grupos ionizables en los reactivos que normalmente son grupos que intervienen en el sitio de interacción entre el ligando y la proteína. Los grupos no pertenecientes al sitio de

Tabla 5-5

Incremento en los protones unidos a 3'GMP ($\Delta N_{\text{GMP,u}}$), barnasa ($\Delta N_{\text{Ba,u}}$) y al complejo ($\Delta N_{\text{C,u}}$) con respecto a pH 8.54. $\Delta N'$, diferencia entre $\Delta N_{\text{C,u}}$ y la suma de $\Delta N_{\text{GMP,u}}$ y $\Delta N_{\text{Ba,u}}$. ΔN , número de protones intercambiados con el medio en la formación de una molécula de complejo barnasa-3'GMP, en KCl 50 mM y temperatura 25°C. Los valores de ΔN se han calculado a partir de los de $\Delta N'$, después de su corrección (ver texto).

pH	$\Delta N_{\text{GMP,u}}$	$\Delta N_{\text{Ba,u}}$	$\Delta N_{\text{C,u}}$	$\Delta N'$	ΔN
8.54	0	0	0	0	0.13
8.18	0.05	0.45	0.53	0.03	0.16
7.84	0.08	0.89	1.11	0.14	0.27
7.48	0.10	1.34	1.70	0.26	0.39
7.20	0.13	1.62	2.13	0.39	0.52
6.92	0.16	1.89	2.53	0.48	0.61
6.65	0.22	2.14	2.89	0.52	0.65
6.39	0.31	2.38	3.19	0.50	0.63
6.08	0.46	2.68	3.54	0.40	0.53
5.77	0.64	2.96	3.83	0.23	0.36
5.52	0.80	3.18	4.04	0.08	0.22
5.17	0.92	3.54	4.38	-0.08	0.05
4.85	1.00	3.96	4.82	-0.15	-0.01
4.57	1.04	4.51	5.31	-0.24	-0.11
4.29	1.07	5.19	5.94	-0.32	-0.19
4.02	1.08	5.99	6.65	-0.43	-0.30
3.77	1.10	6.84	7.39	-0.55	-0.42
3.59	1.11	7.46	7.98	-0.59	-0.46

unión pueden ver también su estado de ionización cambiado si se ven afectados por las interacciones de los grupos en el sitio de unión o por posibles cambios conformacionales.

En el análisis del intercambio protónico, vamos a suponer que la unión de 3'GMP a la barnasa está asociada solamente a la ionización de los residuos del sitio de unión. Esta suposición está apoyada por el hecho de que no hay cambios conformacionales grandes inducidos ni por la unión del fosfato sólo (Meiering et al., 1991), ni por la unión de 3'GMP como se observa por rayos X y por RMN (Guillet et al., 1993; Meiering et al., 1993). También vamos a suponer que no hay cambios conformacionales significativos inducidos por

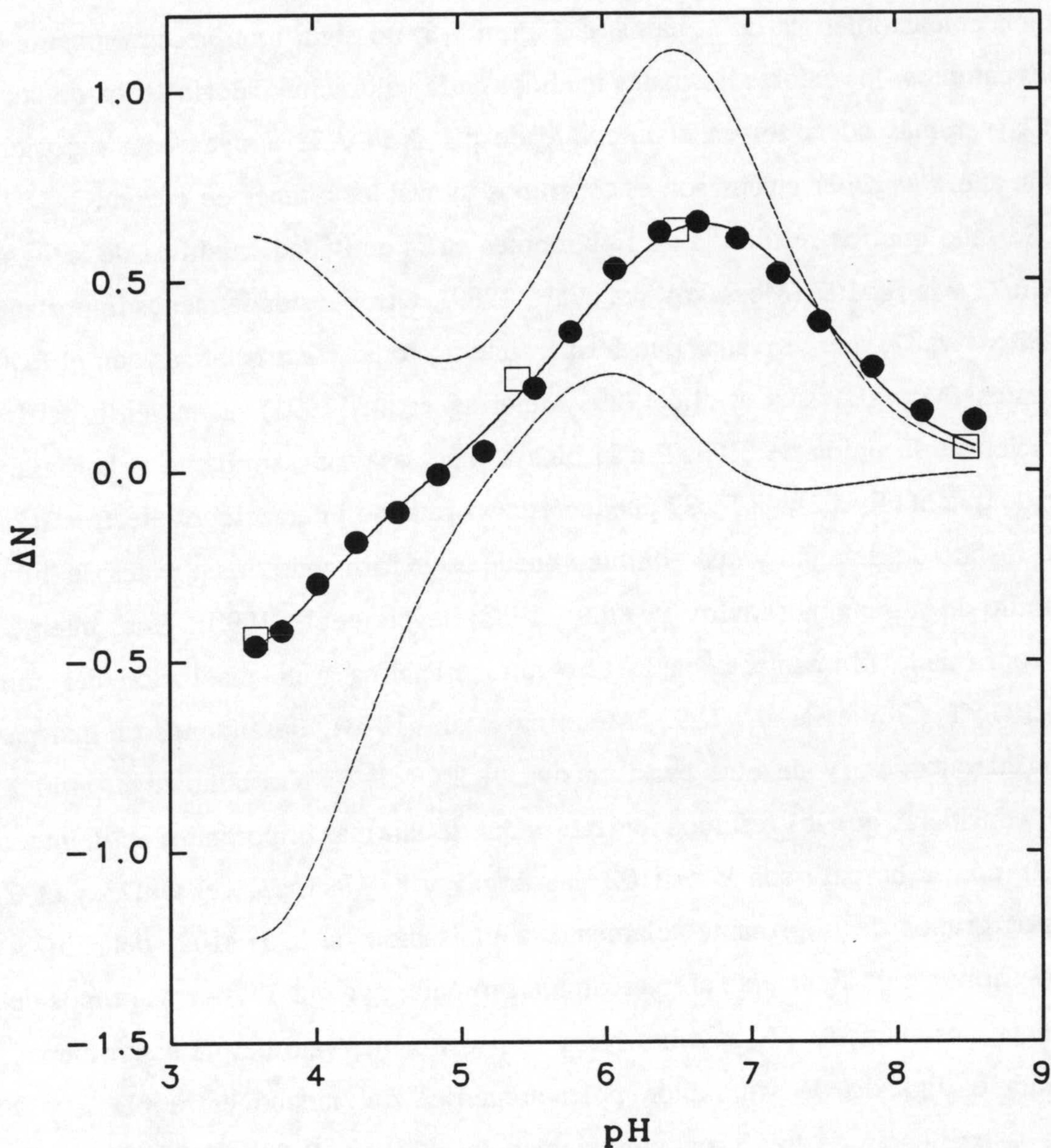


Figura 5-9: Datos de ΔN determinados por el método de titulación diferencial (●). En la misma gráfica se ha incluido también los cuatro puntos de referencia (□) determinados por el método de pH-stat a pH_r 3.59, 5.40, 6.50 y 8.48. La curva en trazo continuo representa datos simulados de ΔN calculados de acuerdo con a la Ecuación (5.45), utilizando valores de los pK' : 7.4, 5.8 y 2.9, y valores de los pK : 5.9, 5.85 y 3.8. La desviación estándar entre los datos experimentales y los simulados es 0.03. Las curvas en trazo discontinuo son los límites de error de ΔN que se calcularían directamente a partir de la derivada de ΔG_{obs}^0 con respecto al pH (ver texto) considerando los parámetros de la Tabla 5-15.

los cambios de pH en nuestro intervalo experimental. Aunque la reversibilidad de la valoración potenciométrica de la barnasa (Figura 5-6) no signifique necesariamente que no hay tales cambios, los calores normales medidos en la valoración calorimétrica de la barnasa con HCl (ver más adelante) en el intervalo de pH 3.54-7.52 apoyan esta suposición. El problema ahora es saber cuales son estos grupos ionizables a tener en cuenta.

Se sabe que los residuos más importantes en la actividad catalítica de la barnasa son el Glu73 y la His102 (Mossakowska et al., 1989). Otros residuos menos importantes son las Arg83 y Arg87, que se piensa que forman interacciones electrostáticas con el fosfato de los sustratos (Mossakowska et al., 1989; Meiering et al., 1991). También a partir de la comparación de la unión de 3'GMP a la barnasa, nucleasa muy similar a la barnasa, se ha encontrado que la His102 y la Lis27 pueden estar formando interacciones electrostáticas con el grupo fosfato del ligando y que el Glu60 puede estar formando dos puentes de hidrógeno con el anillo de la guanina (Pavlovsky et al., 1988; Sevcik et al., 1990). Estas interacciones se han confirmado últimamente en la estructura cristalina y en disolución del complejo barnasa-3'GMP (Guillet et al., 1993; Meiering et al., 1993). Basándonos de una parte en estas consideraciones, y de otra parte en que el 3'GMP se une también al sitio activo, podemos considerar que los residuos ionizables que serían más importantes en la interacción de 3'GMP con la barnasa son la His102, las Arg87 y 83, la Lis27, el Glu73 y el Glu60. Entre estos grupos de la proteína solamente la ionización de la His102, del Glu73 y del Glu60 contribuirá significativamente al intercambio protónico, ya que los demás grupos del sitio activo tienen normalmente pK bastante fuera de nuestro intervalo de pH experimental.

Para el ligando, la valoración potenciométrica del mismo entre pH 2 y 9.5 ha mostrado la existencia de tres grupos ionizables de pK 9.54, 2.03 y 5.85. El pK de 2 se asigna al nitrógeno protonado de la base (ver Figura 5-2), y se puede pensar que si está haciendo algún tipo de interacción electrostática con la barnasa su pK tiene que aumentar y consiguientemente puede contribuir a la absorción de protones. Pero, debido a que no hay información estructural sobre este tipo de interacción de ese grupo no se ha tenido en cuenta en el análisis. Más bien este nitrógeno se encuentra formando un puente de hidrógeno con NH (Ser57) de la cadena principal. Además se sabe que, por ejemplo en la unión de 3'CMP a la ribonucleasa A, la forma protonada y no protonada del nitrógeno de la base se unen de la misma manera (Anderson et al., 1968), lo cual podría indicar que la ionización de este

grupo no es importante en la unión de los nucleótidos a las ribonucleasas en general. El pK de 5.85 de 3'GMP se asigna al segundo grupo OH del fosfato (ver Figura 5-2). El otro grupo OH del fosfato es muy ácido, tiene un pK \approx 0.7 ("Handbook of Biochemistry"), y por consiguiente sólo el grupo pK 5.85 se considerará en la dependencia de ΔN con el pH.

Nuestros datos no tienen suficiente precisión para obtener los parámetros termodinámicos de ionización de los tres grupos de la proteína (His102, Glu73 y Glu60) y el grupo del ligando (el fosfato), tanto en la forma libre como en el complejo. Por lo cual hemos simplificado nuestro modelo al mínimo de parámetros posibles. Es claro a partir de los datos de ΔN (Figura 5-9) que un grupo (o el promedio de varios grupos) ácido está implicado en la unión de 3'GMP. Este grupo puede ser uno de los dos glutamatos 60 y 73 o bien los dos; sin embargo pensamos que el Glu60 es el candidato más favorable para ese grupo ácido, y esto por las razones siguientes. Para el Glu60, los datos estructurales muestran que interacciona directamente con la base de 3'GMP (ver Figura 5-3) y los datos termodinámicos de Sancho et al. (1991) lo confirman. En la proteína libre se encuentra en la superficie de la misma y hace pocos contactos intramoleculares (Sancho et al., 1991) por lo que cabe de esperar que tiene un pK normal, más o menos sobre 4. No obstante el Glu73, que es un residuo importante en la actividad catalítica de la barnasa, se encuentra en la proteína formando varios contactos moleculares, interacciones electrostáticas fuertes con la Arg87 y otras interacciones con la Arg83, la Lis27 y la tirosina 103, que contribuyen a una gran estabilidad del sitio activo, evaluada en 2.3 kcal/mol en la energía de Gibbs (Meiering et al., 1992). Si la mayor parte de estas interacciones son de origen electrostático, podemos estimar que el pK del Glu73 es menor en aproximadamente 2 unidades del valor normal de un grupo carboxílico ($\Delta pK = \Delta G / (2.3RT)$), es decir que sería aproximadamente entre 2 y 2.5, y consiguientemente no pensamos que su interacción con 3'GMP puede producir liberación o absorción de protones en el intervalo de pH experimental (3.5-8). Además los datos de RMN de la estructura del complejo barnasa-3'GMP muestran que los desplazamientos químicos observados en el Glu60 son mayores que los del Glu73 (Meiering et al., 1993), lo cual podría indicar que el contorno molecular del Glu60 está más afectado que el del Glu73 en presencia de 3'GMP. Una manera de evaluar la importancia de cada uno de los dos glutamatos es el estudio de mutantes, no obstante, y desgraciadamente, no los hemos conseguido tener hasta hoy.

Teniendo en cuenta de las anteriores consideraciones, hemos despreciado la contribución posible de la ionización o protonación del Glu73 a los parámetros potenciométricos y termodinámicos observados en la unión de 3'GMP, de manera que nuestro modelo estará restringido a la participación de tres grupos: la His102, el Glu60 y el fosfato.

Para poder hacer la deconvolución del intercambio protónico, se ha analizado los datos de ΔN de acuerdo con el modelo termodinámico descrito en la Sección 5.3, Ecuación (5.42):

$$\Delta N = \sum_{j=1}^3 \left[\frac{10^{pK'_j - pH}}{1 + 10^{pK'_j - pH}} - \frac{10^{pK_j - pH}}{1 + 10^{pK_j - pH}} \right] \quad (5.45)$$

El sumatorio es sobre los tres grupos: His102, Glu60 y el fosfato Pi. En la ecuación anterior se ha considerado que el estado de ionización de un grupo es independiente de los estados de ionización de los demás, que puede justificarse parcialmente por el hecho de que la His102 y el Glu60 se encuentran muy separados en la estructura de la proteína para que pueda haber una interacción entre los dos. Además en la unión del barstar a la barnasa, se encontró que las energías de interacción de la His102 y de la Arg59 con el barstar son aditivas (Hartley, 1993), que muestra la independencia entre los dos residuos, teniendo en cuenta que el Glu60 está muy cerca de la Arg59.

Los parámetros pK' (constantes de ionización en el complejo) obtenidos mediante ajuste no lineal de los datos de ΔN a la ecuación anterior se exponen en la Tabla 5-6, y la calidad del ajuste se ilustra en la Figura 5-9. Los valores de los pK' de los tres grupos no difieren significativamente de los obtenidos en el análisis de la curva de valoración del complejo (ver Figura 5-8)

El valor de 3.81 obtenido para el pK del glutamato es un valor normal para un grupo carboxílico en una proteína (Tanford, 1962), y es conforme con el valor promedio de 3.95 obtenido para los seis grupos carboxílicos valorados hasta pH 3.55 (Tabla 5-3). En el ajuste, se ha considerado un valor de 5.9 para el pK de la His102 en lugar del valor 6.3 determinado por Sali et al. (1988) por las razones que se han expuesto anteriormente (por otra parte, si se deja este parámetro ajustable, se obtiene un valor de 5.74 ± 0.24).

La asignación de los valores de los tres pK' a cada grupo no es discernible a partir

Tabla 5-6

Valores de los pK' de la His102, el Glu60 y el fosfato en el complejo barnasa-3'GMP obtenidos a partir de la deconvolución de los valores del intercambio protónico ΔN .

Grupo	pK	pK'
His102	5.9*	7.36 \pm 0.07
Glu60	3.81 \pm 0.07	2.9 \pm 0.2
Pi	5.85*	5.77 \pm 0.03

* Parámetros fijados en el ajuste en los valores determinados en las valoraciones potenciométricas de la barnasa y 3'GMP.

de la expresión matemática de ΔN , Ecuación (5.45). Sin embargo si la His102 forma interacciones electrostáticas con la carga negativa del fosfato, su forma protonada sería más estable en el complejo y por consiguiente habrá un aumento en su pK. Por lo tanto el pK' de 7.36 se ha asignado a la His102 en el complejo. Para el glutamato, éste podría formar interacciones mediante puentes de hidrógeno con la base de 3'GMP (Guillet et al., 1993) y como la formación de este tipo de enlaces aumenta la acidez del grupo aceptor (Laskowski y Sheraga, 1954), se le ha asignado el valor de pK 2.9 en el complejo. Más adelante presentaremos más indicios sobre la correcta asignación de los pK'. Para el fosfato ha habido una ligera disminución de su pK en el complejo que no puede explicarse solamente por las interacciones electrostáticas de su carga negativa con los grupos cargados positivamente del sitio activo de la barnasa, ya que en este caso se espera una gran disminución en su pK. Es posible que las interacciones electrostáticas del fosfato están de una manera o otra compensadas por las de tipo puentes de hidrógeno (ver Figura 5-3).

Una vez conocidos los valores de los pK y pK' de cada grupo, se puede hacer una deconvolución de ΔN observado en las contribuciones de cada grupo. Esto se ilustra cuantitativamente en la Figura 5-10 en donde se ve que por encima de pH 5, prácticamente todos los protones absorbidos por el complejo se unen a la His102, y por debajo de pH 5 los protones están mayoritariamente liberados por el Glu60.

Finalmente hay que hacer un comentario sobre la metodología que se ha seguido para la determinación del intercambio protónico ΔN . El método más sencillo que teníamos a

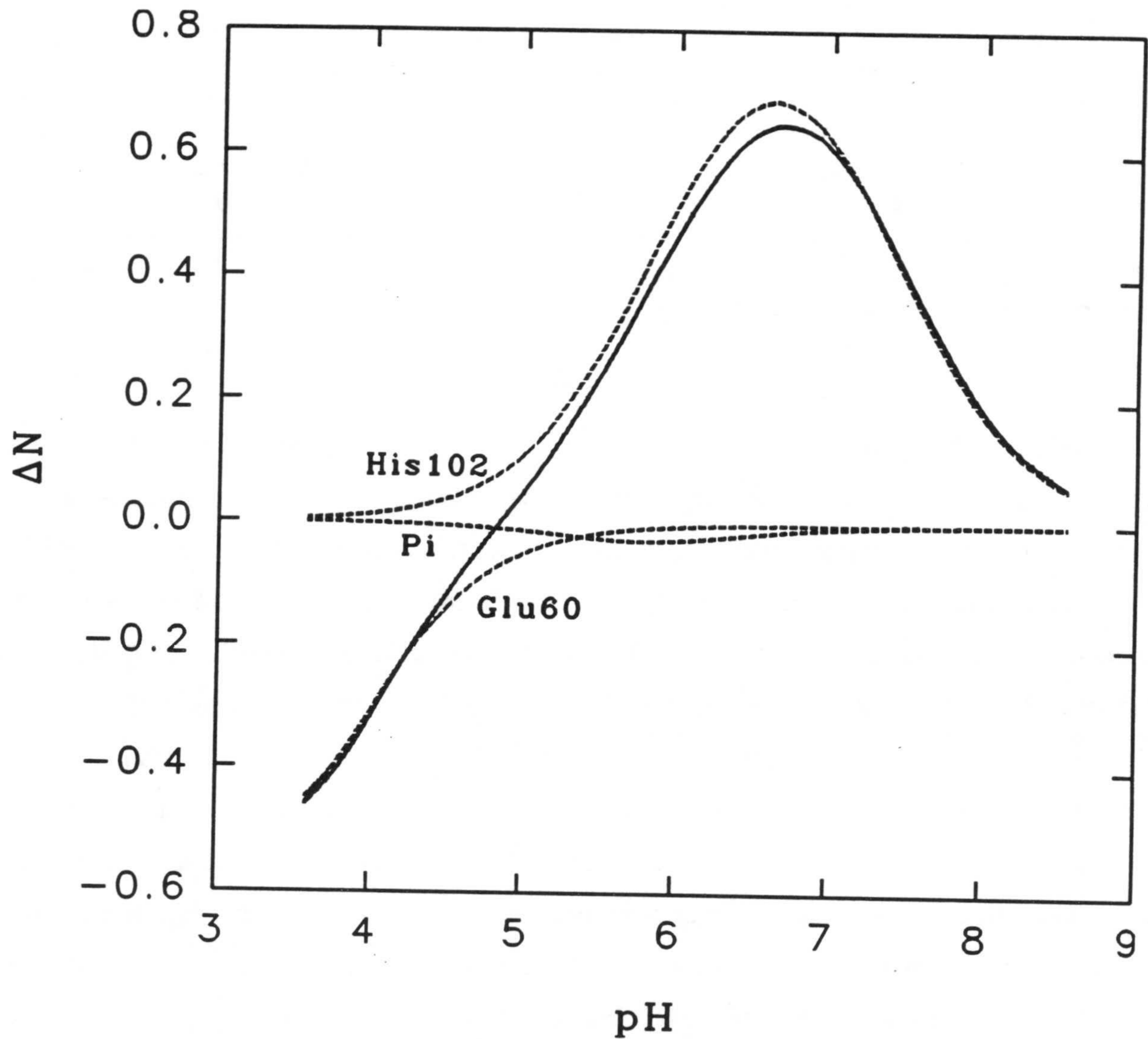


Figura 5-10: Deconvolución de ΔN total (curva en trazo continuo) en las contribuciones (curvas en trazo discontinuo) de cada uno de los tres grupos: la His102, el Glu60 y el fosfato. Las curvas han sido simuladas con los parámetros que se dan en la Tabla 5-6 de acuerdo con la Ecuación (5.45).

nuestra disposición era el de derivar la energía de Gibbs de la unión de 3'GMP a la barnasa, $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$, con respecto al pH, Ecuación (5.41), ya que la dependencia de aquella con el pH había sido determinada calorimétricamente (ver más adelante, Figura 5-18). Sin embargo este método es utilizable con éxito cuanto más grande es el número de datos experimentales de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ y cuando los errores en los parámetros que mejor ajustan a los datos de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ no son grandes. En nuestro caso, la imprecisión en los pK y pK' que mejor han simulado a $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ (ver Tabla 5-15) hace que el error en ΔN determinado por éste método sea bueno. En la Figura 5-9 se ha representado la estimación de los límites o el margen de error de los valores de ΔN que se calcularían directamente a partir de la derivada analítica de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ con respecto al pH considerando los valores de los pK, pK', y sus errores que se dan en la Tabla 5-15. Estos límites se han calculado mediante una propagación de errores, en donde la contribución del error ΔpK de cada parámetro pK al error total en ΔN viene dado por la expresión:

$$\Delta(\Delta N) = \frac{2.3 \cdot 10^{pK-pH}}{(1+10^{pK-pH})^2} \Delta pK \quad (5.46)$$

Como se puede comprobar en la Figura 5-9, los valores de ΔN determinados por el método potenciométrico utilizado (combinación del método de titulación diferencial con el de pH-stat) caen, en el mayor intervalo de pH, dentro de los límites de ΔN calculados directamente a partir de la derivada de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$, y que la determinación de ΔN a partir de la derivada es muy imprecisa cuando los errores en los pK y pK' son significativos, como es nuestro caso. Además, los errores pequeños obtenidos en los parámetros del análisis de ΔN (Tabla 5-6) ponen en manifiesto la buena precisión en los datos de ΔN que se han obtenido, que podemos estimar en un 5 %. Otro método para la determinación de ΔN que podíamos haber utilizado es el método calorimétrico que consiste en medir la variación en la entalpía de la reacción, $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$, a un pH determinado en diferentes tampones que tienen diferentes calores de protonación, $\Delta H_{p, \text{Ta}}^{\circ}$, y a partir de la linealización de $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$ con $\Delta H_{p, \text{Ta}}^{\circ}$, de acuerdo con la Ecuación (5.28), se podía determinar ΔN (Dorby y Sturtevant, 1952; Beres y Sturtevant, 1971; Hinz et al., 1971). No obstante esta técnica tiene el inconveniente de consumir mucho material, así como la dificultad a veces de encontrar diferentes tampones adecuados a un pH dado con una diferencia apreciable en sus calores de protonación.

Valoración calorimétrica de 3'GMP con HCl:

En la Tabla 5-7 se dan los valores de los calores medidos en cada inyección de HCl a una disolución de 3'GMP para llevar su pH desde 9.21 hasta 2.38. Los calores corregidos por los calores de agitación, de inyección de disolvente en disolvente y de formación de agua, tal como se explicó en la sección de Materiales y Métodos, se dan también en la misma tabla. Los calores medidos entre pH 8.86 y 2.63 pueden interpretarse como el calor neto de la unión de los protones a los tres grupos del ligando de pK 9.54, 5.85 y 2.03 (determinados anteriormente). El análisis de estos calores para la determinación del calor molar de protonación ΔH_p° de cada uno de estos grupos se ha llevado a cabo ajustando los datos a la Ecuación (5.35) en conjunción con la Ecuación (5.37) por mínimos cuadrados lineales. El ajuste se ilustra en la Figura 5-11 y los valores de ΔH_p° obtenidos han sido -7.3, 0, y -1.95 kcal/mol para los grupos de respectivos pK 9.54, 5.85 y 2.03. Hay que decir que el análisis se ha restringido solamente al intervalo de pH 2.63-8.86 para no incluir la contribución del calor de unión de los protones al primer grupo OH del fosfato que tiene un pK sobre 1, y para no incluir tampoco el calor medido en la primera inyección que es generalmente incorrecto.

Sólo conocemos en la bibliografía datos de los calores de protonación de la guanosina. Bunville y Schwalbe (1966) han encontrado un valor de -2.22 kcal/mol para la protonación del grupo de pK 2.17 en la guanosina, a fuerza iónica 100 mM y temperatura 25.2°C. Christensen et al. (1970) también encontraron valores de -3.2 y -7.6 kcal/mol para la protonación de los grupos de pK 1.9 y 9.25 a fuerza iónica cero y temperatura 25°C, por lo que nuestros datos obtenidos para el 3'GMP son comparables con los obtenidos por otros autores para la guanosina. El valor cero obtenido para el calor de protonación del segundo grupo OH del fosfato concuerda con el hecho que los fosfatos se ionizan con un pequeño calor (Christensen et al., 1976), y también es el mismo valor medido por Flogel y Biltonen (1975a) en 3'CMP.

Valoración calorimétrica de la barnasa con HCl:

En la Tabla 5-8 se dan los calores, q_{exp} , medidos directamente en la valoración calorimétrica de la barnasa con HCl entre pH 7.90 y 3.54. Estos calores se corrigieron para el calor de agitación, de inyección de disolvente en disolvente y de formación de agua, tal

Tabla 5-7

Calores (μcal) medidos a 25°C en la valoración calorimétrica de 3'GMP 3.2 mM, preparado en KCl 50 mM, con inyecciones de $8 \mu\text{l}$ de HCl 0.0104 M, preparado también en KCl 50 mM. Los calores han sido corregidos ($q_{\text{corregido}}$) por el calor de agitación ($1.4 \mu\text{cal}$), el calor de inyección de KCl en KCl ($-2.3 \mu\text{cal}$), y el calor de formación de agua (Ecuación (5.11)). Se ha omitido el calor de la primera inyección por falta de exactitud.

i	q_{exp}	$q_{\text{corregido}}$	pH
0			9.21
1	-606.4	----	8.86
2	-625.4	-607.9	8.05
3	-178.4	-171.0	6.80
4	-023.4	-022.4	6.36
5	-004.2	-003.3	6.06
6	005.0	005.9	5.77
7	006.5	007.4	5.46
8	008.8	009.7	4.98
9	-014.5	-013.6	3.91
10	-035.8	-034.9	3.33
11	-026.1	-025.2	3.08
12	-026.9	-026.0	2.92
13	-024.1	-023.3	2.80
14	-020.0	-019.1	2.70
15	-018.9	-018.0	2.63
16	-014.5	-013.6	2.56
17	-009.8	-008.9	2.51
18	-007.6	-006.7	2.46
19	-005.2	-004.3	2.42
20	-009.5	-008.6	2.38

como se explicó en la sección de Materiales y Métodos, y el resultado de esta corrección, $q_{\text{corregido}}$, también se da en la misma tabla. Los valores de la variación del contenido entálpico de la barnasa $\Delta H_{p,\text{Ba}}^\circ$ desde pH 7.52 hasta cada pH_i , correspondiente a la inyección i , también se muestran en la misma tabla. Estos se calcularon a partir de $q_{\text{corregido}}$ de acuerdo con la Ecuación (5.12):

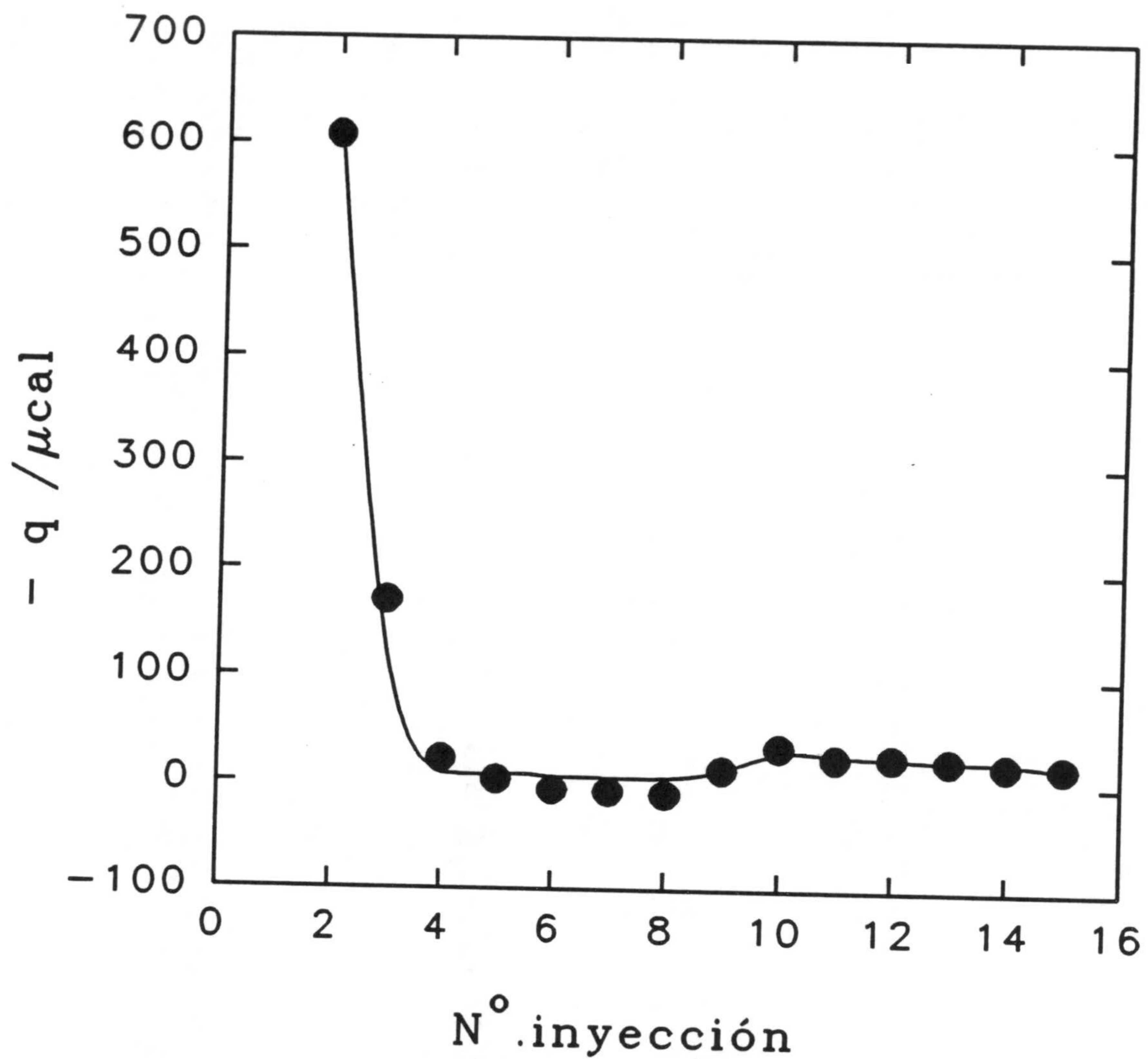


Figura 5-11: Calores medidos en la valoración de 3'GMP con HCl, en KCl 50 mM y temperatura 25°C. La línea continua representa el mejor ajuste a la Ecuación (5.35) en conjunción con la Ecuación (5.37), con los parámetros -7.3, 0 y -2 kcal/mol para las entalpías de protonación de los grupos de pK 9.54, 5.85 y 2.03 respectivamente.

Tabla 5-8

Calores (μcal) medidos en la valoración calorimétrica de la barnasa 0.257 mM con inyecciones de 5 μl de HCl 5.2 mM, en KCl 50 mM y temperatura 25°C. Los calores han sido corregidos ($q_{\text{corregido}}$) por el calor de agitación (3 μcal), el calor de inyección de KCl en KCl (-2.3 μcal), y el calor de formación de agua calculado según la Ecuación (5.11). $\Delta H_{p,\text{Ba}}^{\circ}$ (kcal/mol) representa la entalpía por mol de barnasa referida al estado de referencia de pH 7.52, calculada de acuerdo con la Ecuación (5.47), y $\Delta N_{\text{Ba},u}$ es el incremento en los protones unidos por molécula de barnasa desde el pH de referencia 7.52. Se ha omitido el calor de la primera inyección por falta de exactitud.

i	q_{exp}	$q_{\text{corregido}}$	$\Delta H_{p,\text{Ba}}^{\circ}$	pH	ΔN_{Ba}
0				7.90	
1	-253.3	-----	0	7.52	0
2	-254.4	-255.3	-05.16	7.09	0.41
3	-215.2	-216.5	-09.63	6.66	0.82
4	-179.5	-180.9	-13.46	6.26	1.21
5	-143.5	-145.0	-16.61	5.85	1.60
6	-089.9	-091.4	-18.65	5.35	2.09
7	-047.9	-049.4	-19.78	4.94	2.58
8	-029.3	-030.8	-20.50	4.64	3.10
9	-022.2	-023.7	-21.06	4.42	3.58
10	-017.5	-019.0	-21.53	4.23	4.09
11	-016.1	-017.6	-21.98	4.07	4.46
12	-011.6	-013.1	-22.30	3.94	5.00
13	-009.8	-011.3	-22.61	3.81	5.44
14	-007.7	-009.2	-22.86	3.71	5.71
15	-006.7	-008.2	-23.09	3.63	6.06
16	-005.2	-006.7	-23.28	3.54	6.40

$$(\Delta H_{p,\text{Ba}}^{\circ})_i = \sum_{k=2}^i \frac{q_{\text{corregido},k}}{V_e[\text{Ba}]_k} \quad (5.47)$$

Si suponemos que no hay cambios conformacionales inducidos por la variación del pH, se puede considerar que la variación en la entalpía de la barnasa es debida exclusivamente a la protonación de los grupos ionizables valorados en el intervalo de pH

experimental. El número de los protones unidos a la barnasa, $\Delta N_{Ba,u}$, durante la valoración se muestran en la misma tabla y se calcularon a partir de las valoraciones potenciométricas de la barnasa (Figura 5-7). En la Figura 5-12 se puede observar la variación de $\Delta H_{p,Ba}^{\circ}$ con $\Delta N_{Ba,u}$, en donde se puede apreciar que para los dos primeros protones valorados entre pH 7.5 y 5.4 hay un gran aumento del contenido entálpico de la proteína debido a la protonación de los grupos aminos, mientras que para los cuatro grupos restantes valorados en la parte más ácida de la curva hay una variación muy pequeña de la entalpía, que está de acuerdo con los calores pequeños de protonación de los grupos carboxílicos.

Los valores de $\Delta H_{p,Ba}^{\circ}$ reflejan por lo tanto la contribución calorífica de la protonación de diferentes grupos de tipo j , valorados en el intervalo de pH considerado. Teniendo en cuenta del resultado de las valoraciones potenciométricas de la barnasa hechas anteriormente, podemos considerar que estos grupos son los 6 grupos carboxílicos, las dos histidinas, el grupo α -amino terminal y el grupo X de pK 8.4 (los pK de estos grupos se exponen en la Tabla 5-3). Con el fin de poder evaluar la contribución de cada uno de ellos al calor total, se ha formulado un modelo en el que se ha supuesto de nuevo que los diferentes grupos se comportan de manera independiente (ver sección de Teoría). Si consideramos $\Delta H_{p,j}^{\circ}$ el calor molar de protonación de los n_j grupos idénticos de tipo j de la barnasa, y que a un pH dado, hay un incremento de ΔN_j protones unidos a estos grupos por molécula de barnasa, tendremos:

$$\Delta H_{p,Ba}^{\circ} = \sum_j \Delta N_j \Delta H_{p,j}^{\circ} \quad (5.48)$$

Por lo tanto, $\Delta H_{p,j}^{\circ}$ puede estimarse a partir de la pendiente de $\Delta H_{p,Ba}^{\circ}$ frente a ΔN_{Ba} (Figura 5-12A). A pH por debajo de 4.07 por ejemplo, los grupos que se valoran son solamente los carboxílicos, y con una entalpía de protonación promedia $\Delta H_{p,Ca}^{\circ}$ que puede estimarse a partir de la pendiente de la regresión lineal de los últimos seis puntos, que resulta ser -0.7 kcal/mol. Sin embargo, en los puntos de la parte más básica de la gráfica, hay diferentes tipos de grupos que se valoran con calores muy diferentes, y no es posible trazar una regresión lineal a través de ellos. Por lo cual se ha analizado los datos mediante ajuste no lineal a la Ecuación (5.37):

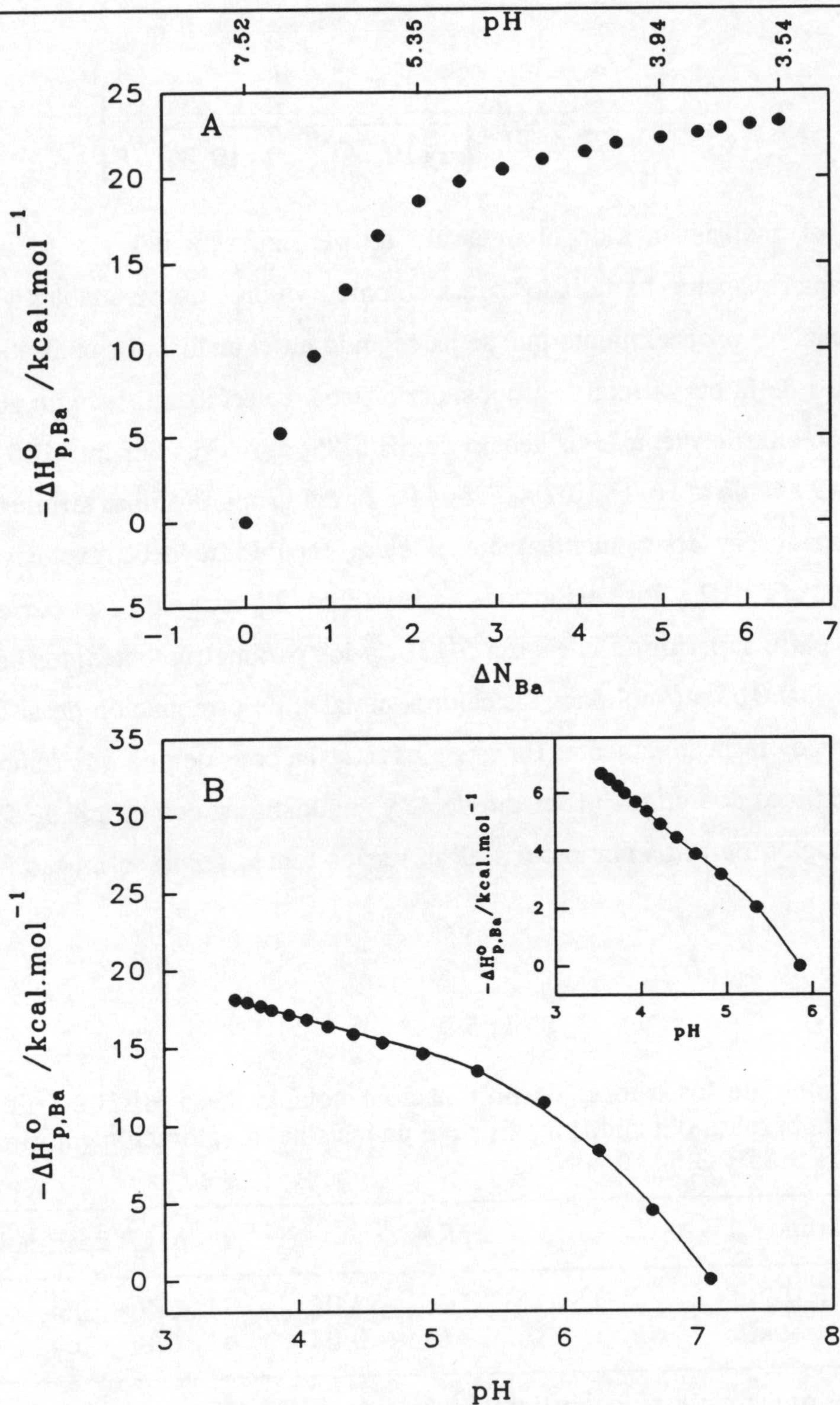


Figura 5-12: A. Cambio en el contenido entálpico $\Delta H_{p,Ba}^0$ de la barnasa con el cambio en el contenido protónico ΔN_{Ba} de la misma, desde pH 7.52. B. Ajuste de $\Delta H_{p,Ba}^0$ entre pH 7.09 y 3.54 a la Ecuación (5.49), con 6 grupos carboxílicos, 2 histidinas y el α -amino terminal (desviación estándar del ajuste es 0.2 kcal/mol). En el interior se representa el ajuste en el intervalo de pH 5.85-3.54, a solamente 6 grupos carboxílicos y una histidina (desviación estándar 0.02 kcal/mol). Los parámetros del ajuste se describen en el texto.

$$\Delta H_{p,Ba}^{\circ} = \sum_j n_j \Delta H_{p,j}^{\circ} \left[\frac{10^{pK_j - pH}}{1 + 10^{pK_j - pH}} - \frac{10^{pK_j - pH_0}}{1 + 10^{pK_j - pH_0}} \right] \quad (5.49)$$

Sin embargo, el análisis en todo el intervalo de pH experimental y a todos los grupos mencionados anteriormente ha fallado; se ha obtenido valores no razonables y con un gran error. Por lo cual, el procedimiento que se ha seguido en el análisis ha consistido en ajustar diferentes partes de la curva total a grupos específicos, seleccionados según sus pK que se han determinado anteriormente. Por debajo de pH 5.85, aproximadamente 100 % del grupo X (pK = 8.4), 99 % de la His18 (pK = 7.8) y 96 % del grupo α -amino terminal (pk = 7.2) están ya protonados, y consiguientemente el calor medido se debe exclusivamente a la protonación de la His102 y los seis grupos carboxílicos. El ajuste de esta parte de la curva se ilustra en la parte superior de la Figura 5-12B, y los parámetros obtenidos han sido: -7.7 ± 0.3 y -0.73 ± 0.01 kcal/mol para los calores molares de protonación de la His102 y los grupos carboxílicos respectivamente. En este ajuste, se ha considerado que se han protonado 6 grupos carboxílicos con un pK promedio de 4, y una histidina con un pK de 5.9. No se ha encontrado variación en estos parámetros al ajustarlos todos, como se muestra en la Tabla 5-9.

Tabla 5-9

Valores de los pk y de los calores de protonación molares de la His102 y de los grupos carboxílicos de la barnasa obtenidos a partir del análisis de la valoración calorimétrica de la barnasa entre pH 5.85 y 3.54.

Grupo	pK	ΔH_p° kcal/mol
His102	5.92 ± 0.06	-7.7 ± 0.4
Carboxilo	3.99 ± 0.03	-0.8 ± 0.4

y el número de grupos carboxílicos valorados ha sido 5.2 ± 2 , a partir del ajuste.

Fijados los anteriores parámetros, se ha intentado ajustar toda la curva (pH 7.52-3.54) para determinar las entalpías de protonación de los demás grupos. Sin embargo, tampoco no ha sido posible determinar valores precisos y razonables de los mismos, y por ésta razón, se ha

reducido el intervalo de pH a 7.09-3.54 (Figura 5-12B) para no englobar el calor de la protonación del grupo X de pK 8.4, y por consiguiente reducir el número de parámetros ajustables a solamente a los calores de protonación de los grupos carboxílicos ($\Delta H_{p, Ca}^{\circ}$), de la His18 ($\Delta H_{p, His18}^{\circ}$) y el grupo α -amino ($\Delta H_{p, \alpha-NH_2}^{\circ}$). El ajuste obtenido se ilustra en la Figura 5-12B, con los parámetros -0.62 ± 0.04 , -7.6 ± 12 , y -15.6 ± 5 kcal/mol para $\Delta H_{p, Ca}^{\circ}$, $\Delta H_{p, His18}^{\circ}$, y $\Delta H_{p, \alpha-NH_2}^{\circ}$ respectivamente. Los demás parámetros se fijaron en los que se dan en las Tablas 5-9 y 5-3. Los grandes errores obtenidos en $\Delta H_{p, His18}^{\circ}$ y $\Delta H_{p, \alpha-NH_2}^{\circ}$ son debidos a la cercanía de sus pK.

En este tratamiento, una vez más se ha encontrado que los datos de la valoración calorimétrica, igual que los de las valoraciones potenciométricas, se representan mejor con un pK 5.9 para la His102 que con el de 6.3; valor determinado por Sali et al. (1988). El valor de -7.7 kcal/mol para el calor molar de protonación de la His102 está de acuerdo con valores de -7 para un grupo imidazol normal (Tanford, 1962), o con valores de -6.5 encontrados en algunas histidinas de la ribonucleasa A (Flogel y Biltonen, 1975a), o -7 de la histidina de la lisozima (Shiao y Sturtevant, 1976). A pesar del error grande en la determinación del calor de protonación de la His18, parece que éste último es más o menos igual que el de la His102, ya que, incluso suponiendo que las dos histidinas tienen el mismo calor de protonación, se obtiene por ajuste un valor medio de -7 ± 0.4 kcal/mol, y sin gran cambio en el valor del grupo α -amino. También, y dentro de los errores, se ha encontrado otra vez que el número de los grupos carboxílicos valorados es solamente 6 de los 13 que se prevén a partir de la secuencia de aminoácidos de la barnasa. Estos grupos se valoran con una entalpía de -0.7 kcal/mol, que concuerda con valores de 0 ± 0.5 kcal/mol encontrados en grupos similares en tres proteínas (Shiao y Sturtevant, 1976). En cuanto a la entalpía de protonación del grupo α -amino, es un valor normal también, y concuerda con valores de -13 hasta -14 kcal/mol que se preve para un grupo α -amino normal (Tanford, 1962).

Finalmente, hay decir que la buena representación de los datos por el modelo y los valores razonables de las entalpías obtenidas indica que los calores medidos serían exclusivamente debidos a la protonación, y no están asociados a otros fenómenos como los cambios conformacionales que pueden tener lugar al cambiar el pH (o por lo menos si están presentes no se acompañan por una entalpía apreciable). Meiering et al. (1992) han encontrado que los iones cloruros Cl^- se unen a la barnasa de manera no específica con una

constante de 20 M^{-1} a pH 4.5 y por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, hay un promedio de aproximadamente 0.5 moléculas de Cl^- unidas por molécula de barnasa. Como estos iones no se unen al sitio activo de la proteína (Meiering et al., 1992), podemos concluir que en el intervalo de pH 7.09 - 3.54, en donde no hay cambio significativo en el estado de ionización de los grupos aminos NH_3^+ (salvo el del grupo α -amino terminal) a los cuales más probablemente se une Cl^- , la unión de este último es más o menos constante, y por consiguiente los calores medidos durante la valoración no contienen contribución calorífica significativa de la unión o disociación de los iones cloruros en caso de que ésta esté acompañada por un efecto térmico.

5.4.2 Interacción Calorimétrica de 3'GMP con la Barnasa a diferentes Temperaturas y a pH 4.5.

En la Figura 5-13 se representa una curva de valoración calorimétrica típica en un experimento de la unión de 3'GMP a la barnasa. Los calores representados han sido corregidos ya para los calores constantes de agitación y de dilución de 3'GMP cuyos valores se dan en el pie de la figura. Hay que decir que se ha medido el calor de dilución de 3'GMP a concentraciones más altas obteniéndose una entalpía relativa aparente $\phi L_2 = -16.5 \times [3'GMP] \text{ kcal/mol}$ (valor medio de tres experimentos a diferentes concentraciones de 3'GMP en la jeringa). En la misma figura, parte B, se da una curva calorimétrica de dilución de 3'GMP.

En la Tabla 5-10 se dan los parámetros termodinámicos obtenidos en la unión de 3'GMP a la barnasa entre 15 y 30°C y a pH 4.5. Los parámetros que se obtienen directamente a partir del ajuste de las curvas de valoración son el número de sitios n , la constante de asociación k_{obs} y la variación de la entalpía de la reacción $\Delta H_{\text{obs}}^\circ$.

Se obtuvo un valor medio de 0.97 para n , indicando que una sola molécula de 3'GMP se une a la barnasa. Esto concuerda con los resultados de Sancho et al. (1991) en la unión de 3'GMP a la barnasa, y con los de Meiering et al. (1991) en la unión del fosfato. El valor de $-7.53 \pm 0.05 \text{ kcal/mol}$ de la energía de Gibbs observado a 25°C también concuerda con el valor de -7.6 ± 0.1 determinado mediante RMN por Elizabeth Meiering en el laboratorio

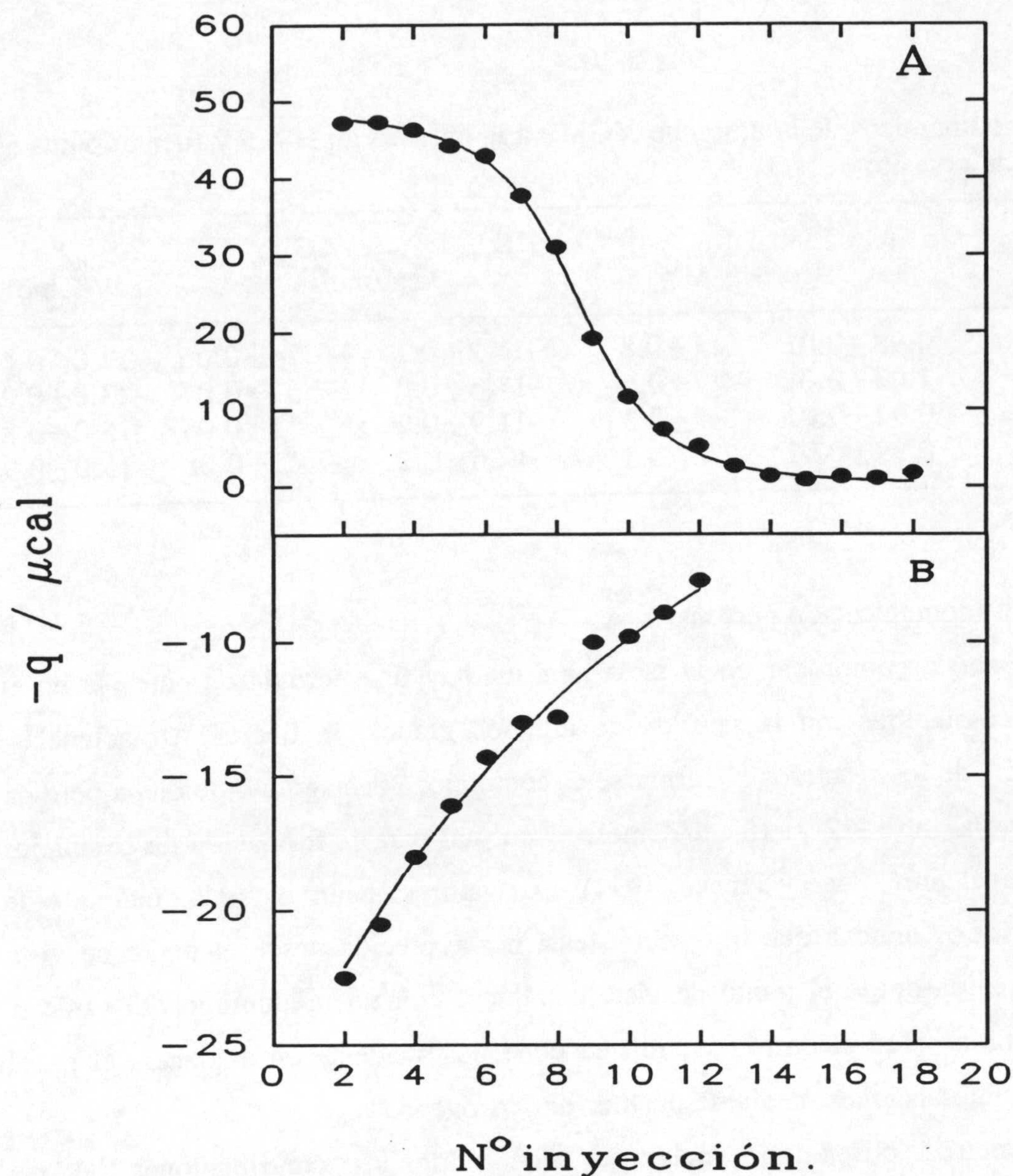


Figura 5-13: A. Calores medidos en la valoración de la barnasa 0.24 mM con una mezcla de barnasa 0.24 mM y 3'GMP 0.634 mM, en AcK 50 mM pH 4.5 y $T=25^{\circ}\text{C}$. El volumen añadido en cada inyección era de $10\ \mu\text{l}$. Los calores están corregidos por el calor de agitación ($-0.8\ \mu\text{cal}$) y el calor de dilución de 3'GMP ($-1.6\ \mu\text{cal}$). La línea continua representa el mejor ajuste de los datos de acuerdo con el modelo de n sitios independientes e idénticos, Ecuación (5.15) y (5.13). Los parámetros del ajuste son $n = 0.92 \pm 0.01$, $k_{\text{obs}} = 340000 \pm 30000\ \text{M}^{-1}$ y $\Delta H_{\text{obs}} = -11.9 \pm 0.2\ \text{kcal/mol}$ (errores estimados con el método de Bevington (1969), ver Apéndice 4). La desviación estándar del ajuste es $0.6\ \mu\text{cal}$. B. Calores medidos a 25°C durante sucesivas inyecciones de $10\ \mu\text{l}$ tampón (AcK 50 mM pH 5.5) conteniendo 3'GMP 12.2 mM en tampón. La línea representa el mejor ajuste a la Ecuación (4.2), obteniéndose una entalpía relativa molar aparente que varía linealmente con [3'GMP]: $\phi L_2 = -17 \times [3'GMP]\ \text{kcal/mol}$. La desviación estándar del ajuste es $0.5\ \mu\text{cal}$.

Tabla 5-10

Parámetros termodinámicos de la unión de 3'GMP a la barnasa a pH 4.5 y fuerza iónica 50 mM de acetato de potasio.

T °C	n	$k_{\text{obs}} \times 10^{-5}$ M ⁻¹	$\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$ kcal/mol	$\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ kcal/mol	$\Delta S_{\text{obs}}^{\circ}$ cal/K.mol
15	0.98±0.01	7.4±0.8	-11.2±0.1	-7.74±0.06	-12.0±0.6
20	1.00±0.01	4.7±0.6	-11.3±0.2	-7.61±0.07	-13.0±0.9
25	0.92±0.01	3.4±0.3	-11.9±0.2	-7.53±0.05	-15.0±0.8
30	0.99±0.01	2.2±0.3	-12.0±0.2	-7.41±0.08	-15.0±0.9

del Dr. A. Fersht (comunicación personal).

Como se puede comprobar en la tabla anterior hay una pérdida de entropía en el sistema que es compatible con la pérdida de algunos grados de libertad (rotacionales, vibracionales, etc.) de los reactivos al formarse el complejo. La magnitud de dicha pérdida observada, que varía entre -12 y -15 cal/K.mol, es normal para la formación de complejos con enlaces no covalentes (Page y Jencks, 1971). Los valores negativos de la entalpía y de la entropía observados indican que la reacción está desfavorecida desde el punto de vista entrópico y favorecida desde el punto de vista entálpico, con un predominio del carácter entálpico de la unión sobre el entrópico, lo que pone posiblemente en evidencia el papel importante de las interacciones mediante puentes de hidrógeno.

Los parámetros observados incluyen, además de las contribuciones de las interacciones específicas, la contribución de la protonación del tampón, de la histidina 102, del glutamato 60 y del fosfato. La contribución del tampón al calor total no es significativa en todo el intervalo de temperatura dados los valores pequeños de tanto del calor molar de protonación del acetato como del número de protones intercambiados ΔN entre el y el complejo. Se ha visto anteriormente que a pH 4.5 y a 25°C hay liberación de un promedio de solamente 0.12 protones por molécula de complejo formada. El ΔN a las otras temperaturas puede estimarse a partir del ΔN a 25°C y pH 4.5 y la derivada de la entalpía de la reacción entre 3'GMP y la barnasa, ΔH° , con respecto al pH usando la siguiente ecuación (Alberty, 1969):

$$\left(\frac{\partial \Delta N}{\partial T} \right)_{pH} = -\frac{1}{2.3RT^2} \left(\frac{\partial \Delta H^{\circ}}{\partial pH} \right)_T \quad (5.50)$$

Los valores de ΔH° a varios pH se han determinado como veremos más adelante (Figura 5-19) y a partir de la derivada de la misma a pH 4.5 se ha obtenido la siguiente estimación de la variación de ΔN con la temperatura a pH 4.5:

$$\Delta N(T) = 0.26 - \frac{112}{T}, \quad a \text{ pH } 4.5 \quad (5.51)$$

Los valores de ΔN calculados entre 15 y 30°C son prácticamente iguales debido a la pequeña derivada de ΔH° a pH 4.5 como se puede comprobar en la Figura 5-19. En todo caso los valores de ΔH_{obs} corregidos por el calor de protonación del tampón, de acuerdo con la Ecuación (5.28), no experimentan variación apreciable y se resumen en la Tabla 5-11.

Tabla 5-11

La variación en la entalpía de la reacción de 3'GMP con barnasa después de su corrección por el calor de ionización del tampón.

T °C	ΔN	* $\Delta H_{p,T}^{\circ}$	$\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$ kcal/mol	ΔH°
15	-0.13	-0.25	-11.2	-11.2
20	-0.12	-0.06	-11.3	-11.3
25	-0.12	0.09	-11.9	-11.9
30	-0.11	0.28	-12.0	-12.0

* Datos de Christensen et al., 1976.

La linealidad de ΔH° con la temperatura (Figura 5-14) nos da un valor de -60 ± 10 cal/K.mol para el incremento en la capacidad calorífica ΔC_p° de la reacción. Este valor es dentro del intervalo -50 hasta -300 cal/K.mol de valores de ΔC_p° recogidos para las asociaciones macromolécula-ligando en general (Biltonen, 1979; Sturtevant, 1977; Wiesinger, 1986). Es también un valor normal para interacciones entre varias proteínas y nucleótidos: -96 ± 50 cal/K.mol para glutamato dehidrogenasa-AMP (Fisher et al., 1980), -74 ± 14

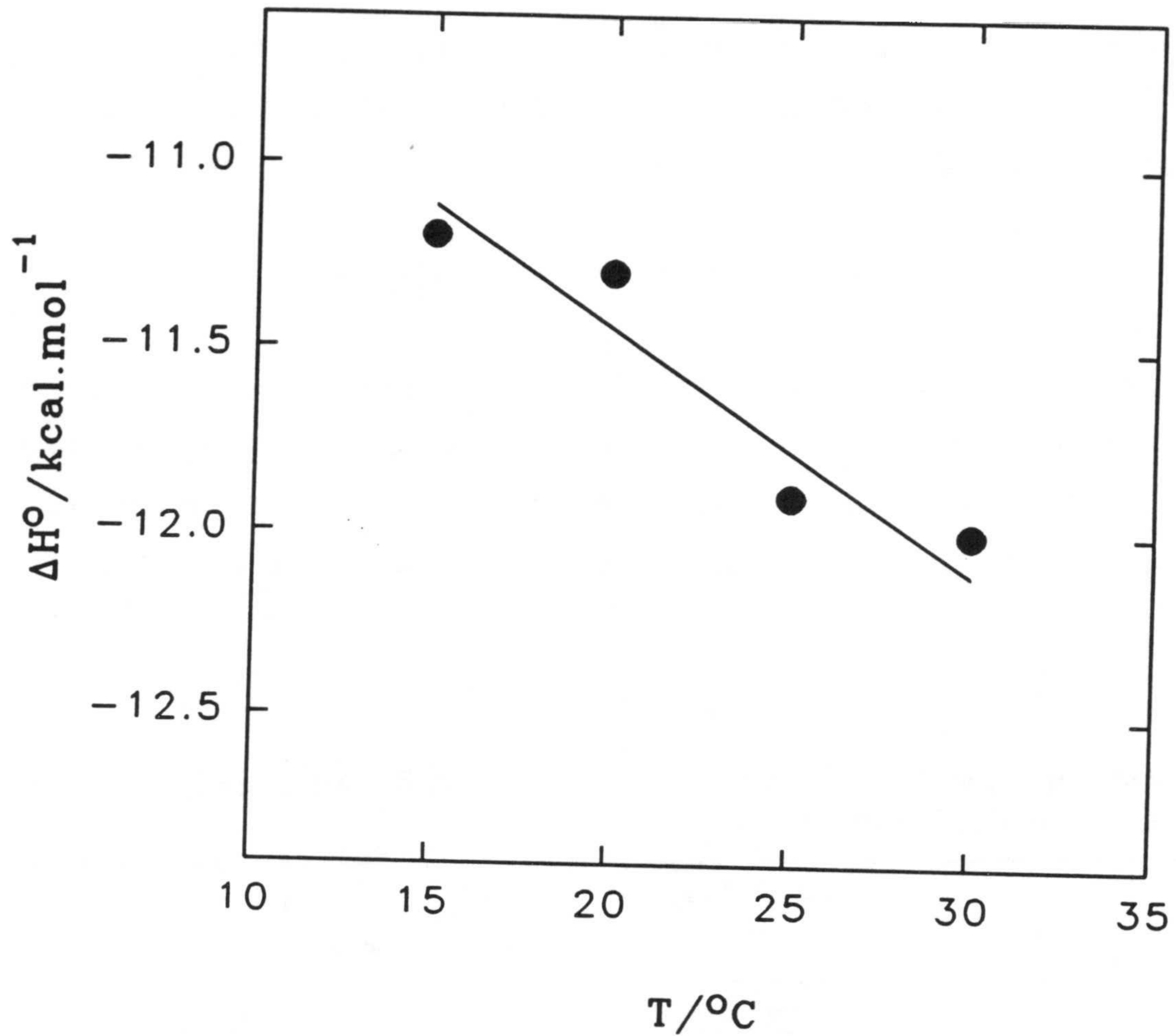


Figura 5-14: Variación del calor molar de unión de 3'GMP a la barnasa con la temperatura, en AcK 50 mM pH 4.5. La recta representa la mejor regresión lineal de los datos, de cuya pendiente se obtuvo un valor de -60 ± 10 cal/K.mol para el incremento en la capacidad calorífica de la reacción ΔC_p° .

cal/K.mol para "pig heart LDH"-ADP (Hinz et al., 1977) y -140 cal/K.mol para ribonucleasa-2'CMP (Wiseman et al., 1989). El valor pequeño obtenido de ΔC_p está de acuerdo con el hecho de que no hay cambios conformacionales grandes inducidos por la unión, constatación que fue puesta en evidencia mediante resolución del complejo barnasa-3'GMP por rayos X (Guillet et al., 1993) y por RMN (Meiering et al., 1993).

Hay que decir que la contribución de la protonación o ionización de los grupos del sitio activo al valor global de ΔC_p° es muy pequeña al tener en cuenta, de un lado, los valores pequeños de la capacidad calorífica de protonación de dichos grupos, $\Delta C_{p,j}^\circ$, que en general en los compuestos modelo varia solamente entre 16 y 41 cal/K.mol (Alberty, 1969), y del otro lado, el número pequeño de protones intercambiados por cada uno de estos grupos con el disolvente a pH 4.5 (Figura 5-10). Por lo que el valor de -60 cal/K.mol puede considerarse como el incremento en la capacidad calorífica intrínseca de unión. Un tratamiento riguroso para la evaluación de la contribución de protonación de los grupos del sitio de unión a ΔC_p° de la reacción requiere un conocimiento de tanto $\Delta C_{p,j}^\circ$ en la forma libre como en el complejo $\Delta C'_{p,j}^\circ$, y también de los pK_j y pK'_j a cada temperatura de los grupos cuyo pK está cerca de pH 4.5, como se puede comprobar al derivar la expresión de ΔH° (Ecuación (5.32)) con respecto a la temperatura.

El origen de la variación de la capacidad calorífica del complejo con respecto a la de la proteína y el ligando reside en los varios efectos que tienen lugar al unirse el ligando a la proteína. Entre estos efectos se destaca el efecto hidrofóbico, las vibraciones intramoleculares, la exposición de cargas electrostáticas al disolvente, variación en el número de puentes de hidrógeno, los cambios conformacionales, etc. (Sturtevant, 1977; Eftink et al., 1980). El efecto hidrofóbico es la consecuencia de la formación de moléculas de agua alrededor de los grupos no polares. Este tipo de estructuración conduce a un aumento en la capacidad calorífica y a una disminución de la entropía de dichos grupos (Kauzmann 1959; Tanford, 1973), por lo que cabe de esperar una disminución en la capacidad calorífica y un aumento en la entropía del sistema al unirse el ligando a la proteína, al acompañarse el proceso de unión en primer lugar por un desplazamiento de moléculas de agua de las superficies de contacto entre la macromolécula y el ligando en el sitio de unión (ver por ejemplo Eftink et al., 1980; Ross y Subramanian, 1981). El signo negativo ΔC_p° que se encuentra normalmente en los procesos de interacción macromolécula-ligando se ha atribuido

en la literatura fundamentalmente a este efecto hidrofóbico.

Según Sturtevant (1977), entre las fuerzas moleculares que intervienen en la estabilización del complejo, sólo el efecto hidrofóbico, los cambios conformacionales y la variación de los modos de vibración contribuyen significativamente al valor observado de ΔC_p^o . Se considera que normalmente no hay un balance neto de los puentes de hidrógeno cuando se une el ligando, al suponer que se reemplazan los puentes de hidrógeno de la macromolécula y el ligando con las moléculas de agua por los nuevos entre los dos reactivos (sin embargo, hay estudios sobre compuestos modelo que han mostrado que, a temperatura ambiente, sólo el 50% de los puentes de hidrógeno están formados entre un soluto y el agua por lo que podría haber un balance neto de formación de puentes de hidrógeno en una interacción macromolécula-ligando (Eftink y Biltonen, 1980)), y también se considera que, en cuanto a las interacciones electrostáticas, los grupos cargados se encuentran normalmente a la superficie de la proteína y por consiguiente no habrá un balance neto en el grado de exposición de estos grupos al disolvente. La evaluación de la contribución del efecto hidrofóbico y vibracional en un proceso macromolecular fue propuesta por él mismo utilizando un método basado en consideraciones empíricas. En el caso de que no hay cambios conformacionales significantes, como en la interacción de la barnasa con 3'GMP, podemos escribir:

$$\Delta C_p^o = \Delta C_p^o(h) + \Delta C_p^o(v) \quad (5.52)$$

$$\Delta S^o = \Delta S^o(h) + \Delta S^o(v) \quad (5.53)$$

Las letras h y v refieren a los efectos de origen hidrofóbico y vibracional. A partir de datos experimentales de la transferencia de sustancias apolares de un medio apolar a un medio acuoso, Sturtevant (1977) estableció la relación siguiente entre la capacidad calorífica y la entropía de origen hidrofóbico:

$$\Delta S^o(h) = (-0.26 \pm 0.05) \Delta C_p^o(h), \quad a \ 25^\circ C \quad (5.54)$$

y que, a partir de estudios por rayos X de proteínas en forma cristalina, hay también una relación entre la capacidad calorífica y la entropía de origen vibracional:

$$\Delta S^{\circ}(v) = (1.047 \pm 0.003) \Delta C_p^{\circ}(v), \text{ entre } 0 \text{ y } 100^{\circ}C \quad (5.55)$$

Se ha supuesto que esta última relación también se mantiene en disolución acuosa teniendo en cuenta que en general las moléculas de agua se encuentran más bien en la superficie de la proteína que en su interior. Combinando estas cuatro últimas ecuaciones, es posible evaluar las contribuciones hidrofóbicas y vibracionales al ΔC_p° y ΔS° totales. El resultado de tal análisis se muestra en la Tabla 5-12.

Tabla 5-12

Evaluación de la contribución de los efectos hidrofóbicos y vibracionales a la variación en la capacidad calorífica de la reacción de 3'GMP con la barnasa, de acuerdo con el método de Sturtevant (1977).

T °C	ΔC_p° cal/K.mol	ΔS° u.e*	$\Delta C_p^{\circ}(h)$ cal/K.mol	$\Delta C_p^{\circ}(v)$	$\Delta S^{\circ}(h)$ u.e*	$\Delta S^{\circ}(v)$
15		-4	-43	-17	13	-17
20		-5	-43	-17	13	-18
25	-60	-7	-43	-17	11	-18
30		-7	-43	-17	11	-18

* Valores de la entropía expresados en fracción molar para no incluir la contribución crítica a la entropía (Kauzmann, 1959). Es igual al valor expresado en el estado estándar de 1 mol/l (Tabla 5-10) más 8 cal/K.mol.

Como se puede comprobar, estos dos efectos son más o menos independientes de la temperatura en el rango 15-30°C. Si suponemos que el calor específico del agua "hidrofóbica" es 30 % mayor que el agua normal, es decir 1.3 cal/K.g a 25 °C, como se encontró en tres proteínas: la lisozima, el chimotripsinógeno y la ovalbumina (Suurkuusk, 1974), el valor de -43 cal/K.mol de $\Delta C_p^{\circ}(h)$ indica que hay pérdida del orden de 2 moléculas de agua cuando se une una molécula de 3'GMP a la barnasa a 25°C. Esta pequeña pérdida de moléculas de agua significa que las interacciones de tipo hidrofóbico no son muy importantes en la unión de 3'GMP a la barnasa, debido probablemente al carácter hidrofóbico pequeño de los ácidos nucleicos en general (Alvarez y Biltonen, 1973). Suponiendo también que el valor máximo del calor específico por modo de vibración es igual a la constante de

gases R (2 cal/K.mol) a 25°C (Sturtevant, 1977), se puede deducir a partir del valor de $\Delta C_p^{\circ}(v)$ que hay una pérdida de aproximadamente como mínimo 9 modos de vibración al unirse el ligando a la proteína. La contribución desfavorable de la entropía observada a la unión de 3'GMP a la barnasa es debida en gran parte a la pérdida de algunos grados de libertad reflejada en la magnitud de $\Delta S^{\circ}(v)$ como es de esperar, que predomina y en sentido contrario a la contribución favorable entrópica del efecto hidrofóbico.

A nuestro conocimiento, este método de Sturtevant se ha comentado pocas veces en la literatura (Baldwin, 1986; Ross y Subramanian, 1981), y su aplicación ha sido escasa en las asociaciones macromolécula-ligando (Baron et al., 1989 en la interacción de la fosforilasa b con nucleotidos; Mateo y Sturtevant, 1977 en la asociación de "flavin adenine dinucleotide" a "d-amino acid oxidase"). La validez de esta deconvolución de ΔC_p° reside en que mayoritariamente contribuyen solamente los dos efectos hidrofóbicos y vibratoriales a la misma, Ecuación (5.52). Esta suposición es quizás más admitible en el caso de que el ligando y la proteína muestran un carácter altamente hidrofóbico y que por consiguiente se puede despreciar la contribución de las demás interacciones como las electrostáticas, los puentes de hidrógeno, etc. En el caso de la asociación de 3'GMP a la barnasa, quizás no es el caso ya que hay formación de muchas interacciones electrostáticas entre el fosfato, la histidina 102, las argininas 87 y 83 y la lisina 27, por lo cual los caracteres parcialmente polares del ligando y de los residuos del sitio activo de la proteína contribuyen por un término positivo al ΔC_p° observado, ya que habrá una disminución en la exposición de las cargas electrostáticas al disolvente que se acompaña en general por un ΔC_p° positivo (Edsall 1935). Si suponemos que la contribución al ΔC_p° de las interacciones mediante puentes de hidrógeno entre el ligando y la proteína están compensadas por las que forman con el agua previamente a la reacción, se puede decir que el valor pequeño de ΔC_p° observado es la suma fundamentalmente de un término positivo debido a las interacciones electrostáticas que está compensado por un término negativo ligeramente mayor en valor absoluto. Este último término es de origen vibracional y hidrofóbico principalmente.

Recientemente Murphy et al. (1992) han sugerido que el parámetro ΔC_p° es proporcional a los cambios en las superficies apolares, ΔA_{ap} , y polares, ΔA_{pol} , accesibles al disolvente asociados con el proceso:

$$\Delta C_p^o = (0.45 \pm 0.02)\Delta A_{ap} - (0.26 \pm 0.03)\Delta A_{pol}, \quad \text{en cal/K.mol} \quad (5.56)$$

en donde los valores 0.45 y -0.26 son las contribuciones elementales por unidad de superficie (en Å²) de las áreas apolares y polares expuestas al agua. Estos valores se han obtenido a partir de los estudios sobre la disolución de péptidos sólidos (Murphy y Gill, 1990) y de los datos termodinámicos y estructurales del desplegamiento de varias proteínas. A partir de la ecuación anterior y considerando que la entalpía del proceso a 100°C varía linealmente con el cambio en la superficie polar (Murphy et al., 1992):

$$\Delta H^o(100^\circ\text{C}) = (35 \pm 1)\Delta A_{pol}, \quad \text{en cal/mol} \quad (5.57)$$

podemos estimar a partir del valor de ΔC_p^o y de la variación de la entalpía del proceso a 100°C los cambios en las superficies polares y apolares accesibles al disolvente. Hemos aplicado estas ideas a la interacción de la barnasa con 3'GMP y se ha encontrado que hay una disminución de $310 \pm 70 \text{ \AA}^2$ en la superficie polar y una disminución de $310 \pm 90 \text{ \AA}^2$ en la superficie apolar accesibles al agua. Para este cálculo se ha considerado un valor de $-11 \pm 2 \text{ kcal/mol}$ para ΔH^o a 100°C y no contiene contribución de la absorción y liberación de protones por los grupos ionizables del ligando y la proteína. Estos resultados muestran que el ΔC_p^o total observado de -60 cal/K.mol es la suma de un valor de negativo -140 cal/K.mol correspondiente al ΔC_p^o apolar, es decir ΔC_p^o hidrofóbico, y un valor positivo de $+80 \text{ cal/K.mol}$ correspondiente al ΔC_p^o polar. Como se puede comprobar este método preve un valor más negativo para $\Delta C_p^o(h)$ que en el método de Sturtevant (Tabla 5-12) debido a la diferencia en la deconvolución del ΔC_p^o total entre los dos métodos; Ecuación (5.56) y (5.52).

A pesar de que en el método de Sturtevant (1977) no se tiene en cuenta el importante efecto en la capacidad calorífica de la contribución de los grupos polares (efecto hidrofílico), la importancia de los mismos se mostró recientemente en los estudios de Murphy y Gill (1991) de disolución de péptidos sólidos en agua. Estas ideas son la base de la metodología de Murphy et al. para el cálculo de las contribuciones polares y apolares al cambio en la capacidad calorífica. Estas ideas se aplicaron en principio en los estudios de la estabilidad de proteínas globulares en donde se encontró una representación satisfactoria del modelo en cuanto a la predicción de los parámetros termodinámicos, sobre todo ΔC_p^o , del

desplegamiento de dichas proteínas (Murphy y Gill, 1991; Murphy et al., 1992; Freire y Xie, 1994). Posteriormente el modelo se aplicó también a algunos procesos de unión macromolécula-ligando (Bains et al., 1992; Murphy et al., 1993) con resultados más o menos satisfactorios en la predicción del valor de ΔC_p° , aunque, en algunos sistemas se han observado desviaciones de 30-50% en la predicción del valor de la variación de la entalpía de reacción. Es posible que la aplicación de un modelo basado en los efectos de desplegamiento de proteínas a los procesos de interacción macromolécula-ligando puede no ser totalmente adecuado. Por ejemplo, la contribución de la exposición de las cargas al disolvente en un proceso de desplegamiento puede ser despreciable en el valor de ΔC_p° frente a la de los grupos apolares y polares, ya que la mayoría de los grupos cargados se encuentran generalmente en la superficie de la proteína. Sin embargo, en una interacción macromolécula-ligando, la contribución de las interacciones electrostáticas a la energética de la reacción puede ser muy importante y consiguientemente el proceso se acompañara por una disminución en la exposición al disolvente de la superficie de los grupos cargados que contribuirá por un término positivo al ΔC_p° total, con una contribución elemental que puede ser diferente de la de la superficie polar en la Ecuación (5.56) (por ejemplo la interacción entre el barstar y la barnasa se acompaña por cambios de 44.5%, 29% y 26.5% de las superficies apolar, polar y superficie cargada respectivamente del área total (Guillet et al., 1993)). Otro efecto como las vibraciones moleculares, que Sturtevant (1977) tuvo en cuenta en su modelo y que en la Ecuación (5.56) está omitido, puede ser importante en la unión.

Parece entonces como si en cada uno de los dos métodos se han omitido algunos efectos que pueden contribuir a la variación en la capacidad calorífica de una interacción macromolécula-ligando: contribución de los grupos polares en el método de Sturtevant y contribución de las vibraciones moleculares en el método de Murphy et al. Quizás los dos métodos han omitido también la contribución de las interacciones electrostáticas que se acompañan por un cambio significativo en la superficie accesible al agua durante la interacción entre dos moléculas. La validez de la aplicación de la Ecuación (5.56) a la barnasa-3'GMP está sujeta a la determinación de los cambios en las superficies apolares y polares por rayos X.

5.4.3 Interacción Calorimétrica de 3'GMP con Mutantes de la barnasa a diferentes Temperaturas y pH 4.5.

Para intentar de evaluar la importancia relativa de algunos residuos del sitio activo de la barnasa en sus interacciones con el 3'GMP, se han hecho algunos experimentos calorimétricos con tres mutantes simples, en los cuales se ha sustituido la histidina 102 por una alanina (His102-Ala), la lisina 27 por una alanina (Lis27-Ala) y la arginina 87 por una alanina (Arg87-Ala). Los experimentos se hicieron a pH 4.5, fuerza iónica 50 mM de acetato potásico y a diferentes temperaturas entre 15 y 35°C. Los calores medidos en el calorímetro se trataron de la misma manera que en los experimentos de 3'GMP con barnasa, excepto que, por falta del conocimiento de la absorbancia específica de los mutantes y consiguientemente de sus concentraciones, los parámetros obtenidos a partir del ajuste eran k , ΔH° y el valor de la concentración de la proteína. En el ajuste se ha considerado que una sola molécula de 3'GMP se une a los tres mutantes ($n=1$). En la Figura 5-15 se muestran curvas de valoraciones calorimétricas típicas para cada uno de los tres mutantes, y los parámetros termodinámicos obtenidos se resumen en la Tabla 5-13. En la misma se ha incluido también los datos de la barnasa a efectos de comparación. La variación en la entalpía de reacción a diferentes temperaturas se ha analizado para obtener los incrementos en la capacidad calorífica de unión de 3'GMP a la His102-Ala y la Lis27-Ala (Figura 5-16), cuyos valores se dan también en la Tabla 5-13, y la variación en la energía de Gibbs de la reacción a diferentes temperaturas se ha analizado de acuerdo con las Ecuaciones (5.17), (5.18) y (5.19) para extrapolar a temperaturas altas (Figura 5-17A) y para determinar también con más precisión la contribución de la His102 y la Lis27 a la energía de estabilización del complejo (Figura 5-17B).

Los parámetros observados para el mutante His102-Ala pueden considerarse que no contienen contribuciones energéticas de la protonación del acetato, debido al pequeño calor molar de protonación de este último así como al valor pequeño de los protones liberados por el Glu60 y el fosfato (ver Figura 5-10) a pH 4.5. Lo mismo puede decirse para los otros dos mutantes en tanto que a pH 4.5 hay absorción de un número muy pequeño de protones por la His102.

Para los tres mutantes, la afinidad en la unión de 3'GMP es menor que la de la

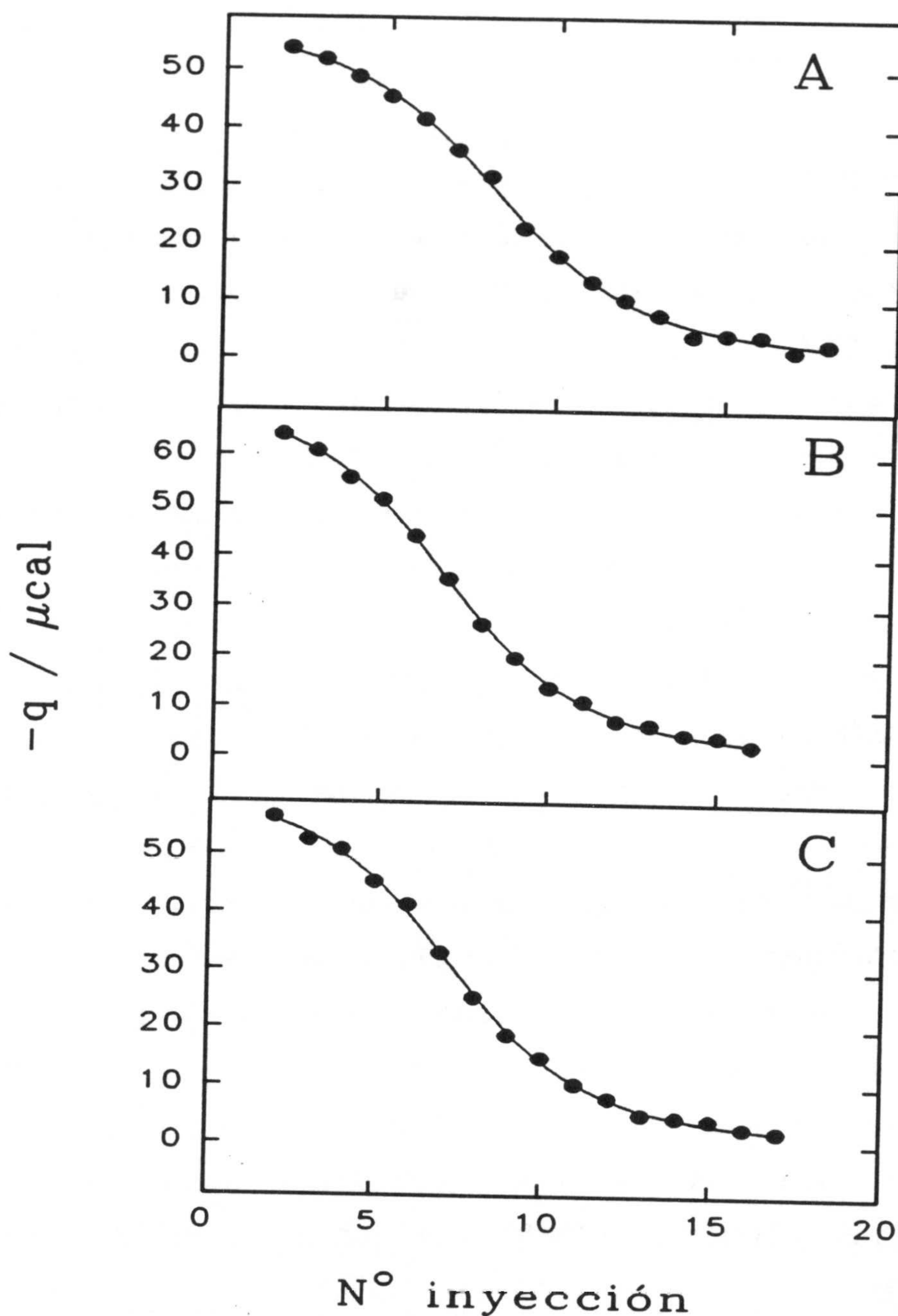


Figura 5-15: A. Calores medidos en sucesivas inyecciones de $5 \mu\text{l}$ de 3'GMP 1.21 mM en la célula conteniendo el mutante His102-Ala, en AcK 50 mM, pH 4.5 y temperatura 15°C . B. Calores medidos en sucesivas inyecciones de $5 \mu\text{l}$ de 3'GMP 1.01 mM en la célula conteniendo el mutante Lis27-Ala, en AcK 50 mM, pH 4.5 y temperatura 35°C . C. Calores medidos en sucesivas inyecciones de $5 \mu\text{l}$ de 3'GMP 1.19 mM en la célula conteniendo el mutante Arg87-Ala, en AcK 50 mM, pH 4.5 y temperatura 25°C . Las líneas son el mejor ajuste de los datos considerando que una molécula de 3'GMP se une a cada una de las tres proteínas. Los parámetros de los ajustes ΔG° y ΔH° se dan en la Tabla 5-13. Las desviaciones estándar de los ajustes son $0.7 \mu\text{cal}$ (A), $0.5 \mu\text{cal}$ (B) y $0.6 \mu\text{cal}$ (C).

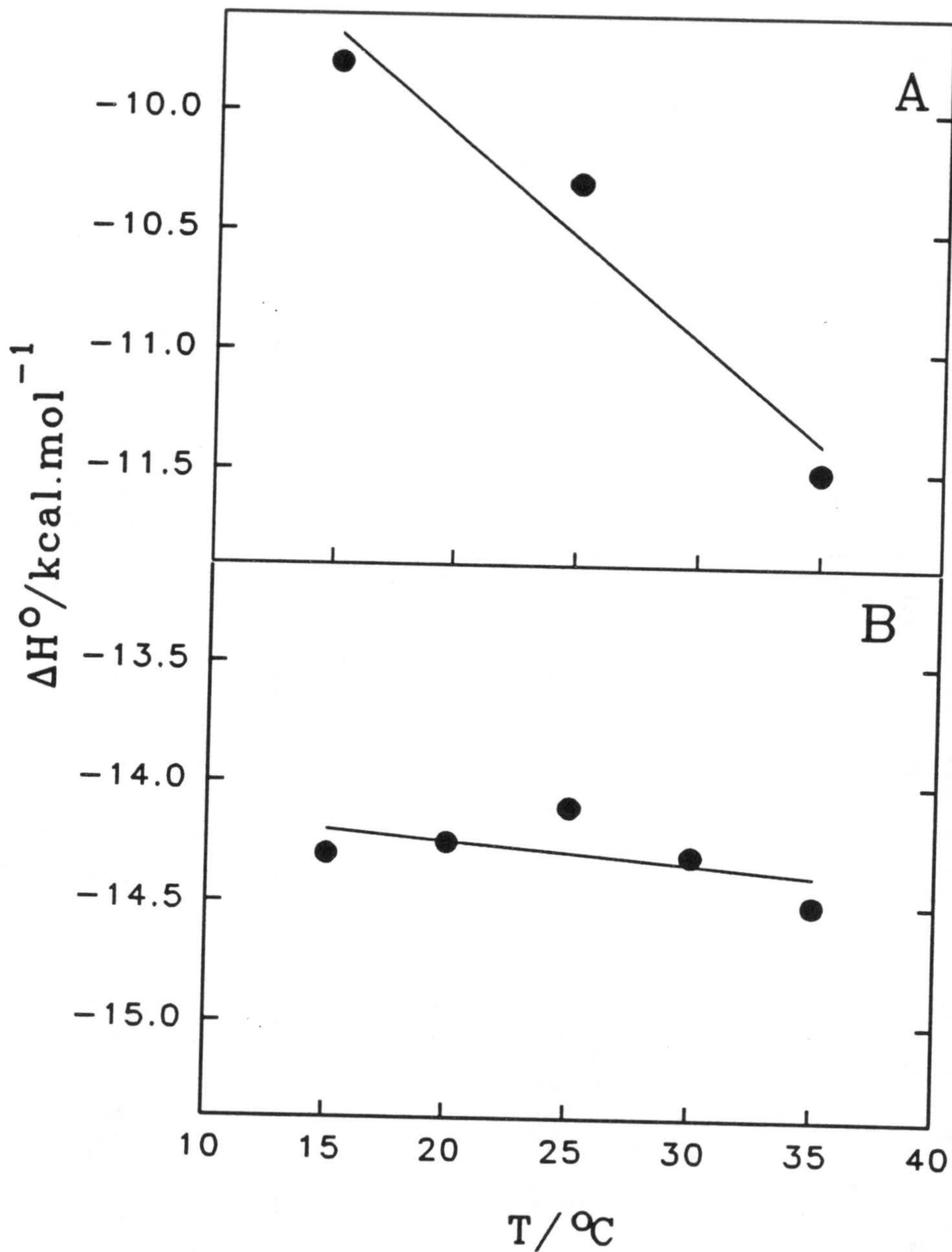


Figura 5-16: Variación con la temperatura del calor molar de unión de 3'GMP a los mutantes de la barnasa, His102-Ala (A) y Lis27-Ala (B), en AcK 50 mM y pH 4.5. Las rectas representan la mejor regresión lineal de los datos de cuyas pendientes se obtuvo los valores de -85 ± 20 cal/K.mol (A) y -9 ± 9 cal/K.mol (B) para los incrementos en la capacidad calorífica de reacción.

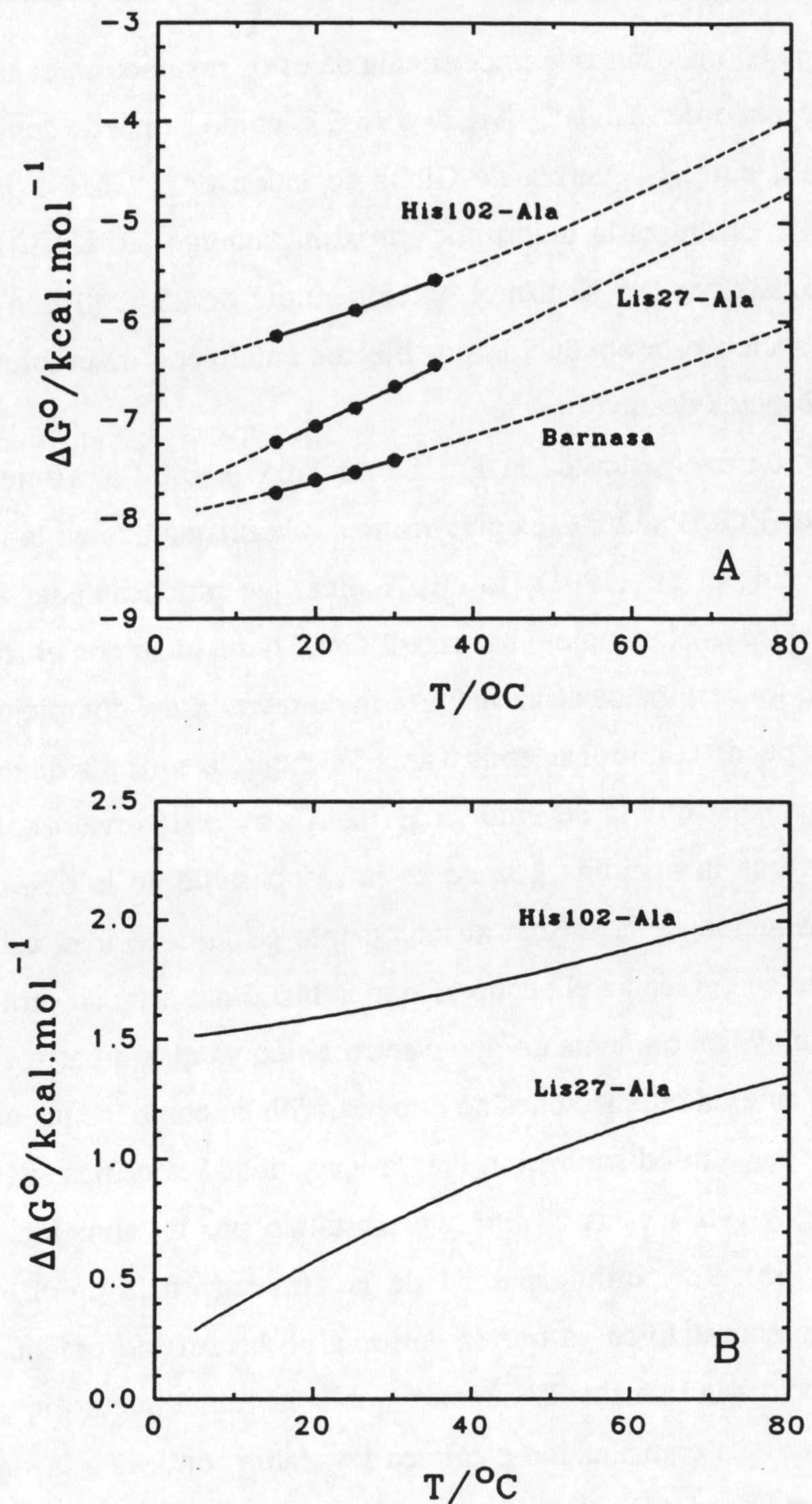


Figura 5-17: A. Variación de la energía de Gibbs de reacción de 3'GMP con la barnasa y sus mutantes His102-Ala y Lis27-Ala, en AcK 50 mM y pH 4.5. Las líneas en trazo continuo son el ajuste de los datos experimentales (puntos) que se dan en la Tabla 5-13 a las Ecuaciones (5.17), (5.18) y (5.19), y las líneas en trazo discontinuo son extrapolaciones de los datos experimentales. En B se representa la diferencia entre la energía de Gibbs de reacción de 3'GMP con la barnasa y con cada mutante.

barnasa, lo que pone en manifiesto la importancia de estos residuos en el sitio de unión. Esta importancia crece en el orden His102, Arg87 y Lis27, como se puede comprobar a partir de la diferencia, $\Delta\Delta G^\circ$, entre la energía de Gibbs de unión de 3'GMP a la barnasa y a los mutantes. La His102 estabiliza la unión por aproximadamente 1.6 Kcal/mol, la Arg87 por 1.2 Kcal/mol y la Lis27 por 0.6 Kcal/mol, a temperatura de 25°C (Tabla 5-13). Con todos los mutantes, la reacción está conducida por efectos entálpicos favorables, a los cuales se oponen efectos entrópicos desfavorables.

La contribución energética de la His102 de 1.65 ± 0.08 Kcal/mol a la energía de Gibbs en la unión de 3'GMP a 25°C es prácticamente la misma que en la unión del fosfato, 1.9 Kcal/mol (Meiering et al., 1991), lo cual indica que prácticamente la totalidad de la interacción de la His102 en el complejo barnasa-3'GMP tiene lugar con el fosfato de 3'GMP, que es conforme con los resultados de cristalografía de rayos X del complejo barnasa-3'GMP (ver Figura 5-3). Se puede comprobar en la Tabla 5-13 que la entropía de unión a la barnasa es prácticamente la misma que la de unión a H102-Ala en el intervalo de temperatura 15-35°C, lo que indica que la histidina 102 no es la responsable de la desfavorable entropía observada. La contribución de la misma al incremento en la capacidad calorífica por $+25 \pm 30$ cal/K.mol pone en evidencia el hecho de que la histidina, estando protonada a pH 4.5, forma interacciones mayoritariamente de tipo electrostático ya que, a partir de estudios sobre compuestos modelo, tanto las interacciones de tipo hidrofóbico como los puentes de hidrógeno están acompañadas por una disminución de la capacidad calorífica (Kauzmann 1959; Kreshbeck y Scheraga, 1965) y las de tipo electrostático por un aumento en la capacidad calorífica (Edsall, 1935). La pérdida parcial de la afinidad en la unión de 3'GMP a la His102-Ala es de origen entálpico ya que la entropía no ha sufrido prácticamente cambios apreciables con respecto a la barnasa. El suponer que la histidina interacciona con el 3'GMP electrostáticamente con una contribución entálpica favorable conlleva a la suposición de que la histidina se encuentra en el complejo en un medio con una constante dieléctrica local baja, es decir que se encuentra en presencia de grupos apolares, ya que según la teoría de Born (Kauzmann, 1959), la interacción entre dos cargas opuestas en agua se acompaña por un pequeño aumento en la entalpía ($\Delta H > 0$). La validez de esta hipótesis depende de la precisión en la contribución de la His102 al ΔC_p° total, que aquí desafortunadamente sobrepasa el valor de la misma. Es posible que, dentro de los errores, esta contribución fuese cero, lo que

sería el resultado de la compensación de dos tipos de interacciones: una electrostática con el fosfato de 3'GMP acompañada con un ΔC_p° positivo y otra mediante el puente de hidrógeno con el fosfato (ver estructura del complejo en la Figura 5-3) acompañada por un ΔC_p° negativo; probablemente fuese este puente hidrógeno el que da el carácter entálpico de la His102 en la unión de 3'GMP.

La Lis27 estabiliza el complejo barnasa-3'GMP por 0.66 ± 0.09 Kcal/mol a 25°C . Este valor es menor en 1.5 Kcal/mol con respecto a la contribución de la Lis27 a la estabilidad del complejo barnasa-fosfato (Meiering et al., 1991). Esto puede indicar que el fosfato libre y el fosfato en la molécula de 3'GMP no se unen de la misma manera a la barnasa. La contribución positiva de la lisina a la entropía total y el pequeño efecto endotérmico de la interacción de la misma con el ligando hace pensar que la lisina puede estar formando mayoritariamente o bien interacciones de tipo hidrofóbico o electrostático. El valor de -9 cal/K.mol del incremento en la capacidad calorífica de unión de 3'GMP a Lis27-Ala indica que la lisina 27 está contribuyendo por un valor negativo de -51 ± 19 cal/K.mol al ΔC_p° total de la unión de 3'GMP a la barnasa. Como, en general, las interacciones electrostáticas se acompañan por cambios positivos en la capacidad calorífica y las de tipo hidrofóbico por cambios negativos, se descarta la hipótesis de que la lisina está formando mayoritariamente interacciones electrostáticas y apoya el carácter hidrofóbico de las interacciones de la misma con el ligando. Esta hipótesis se apoya también por la contribución de aproximadamente $+2$ Kcal/mol de la lisina a la entalpía total a 25°C , que es conforme con valores positivos de $1-2$ Kcal/mol de la entalpía de transferencia de hidrocarburos de un medio acuoso a otro no polar, o con el valor 1 Kcal/mol de la entalpía de transferencia del n-butano en agua al butano líquido sin agua a 25°C (Kauzmann 1959). Este último hidrocarburo es similar a la cadena alifática del residuo de la lisina. También la contribución de la lisina en -51 cal/K.mol al ΔC_p° total está de acuerdo en general con valores de -35 hasta -105 cal/K.mol observados en la capacidad calorífica de transferencia de varios hidrocarburos de un medio acuoso a otro no polar (Sturtevant, 1977), así como la contribución de la Lis27 al ΔS° total por $+9$ u.e está de acuerdo con su relación con ΔC_p° mediante la fórmula (5.54).

Esto no significa que la lisina, cargada positivamente a pH 4.5, no forme interacciones electrostáticas con el fosfato del ligando, cargado negativamente, como se preve

a partir de la estructura en disolución del complejo barnasa-3'GMP (Meiering et al., 1993), pero estas interacciones parecen ser de menor importancia que las hidrofóbicas. Guillet et al. (1993) encontraron que, en la estructura cristalina del complejo barnasa-3'GMP, aunque la Lis27 se encuentra cerca del fosfato su orientación no facilita la formación de puentes de hidrógeno y más bien se encuentra formando puentes de hidrógeno con el Glu73 a través de 2 moléculas de agua. Se puede concluir entonces que el papel de la Lis27 en la actividad de la barnasa (se piensa que estabiliza el estado de transición mediante su interacción con el fosfato (Mossakowska et al., 1989)) no parece ser de una simple interacción electrostática con el fosfato en la unión de 3'GMP, y es posible que no interaccione directamente con el mismo. Hay que decir que este residuo se ha encontrado solamente en la barnasa y la binasa, a diferencia de las otras nucleasas específicas para guaninas.

Obviamente cualquier conclusión obtenida a partir de la comparación de los parámetros termodinámicos de la unión de 3'GMP a la barnasa y a sus mutantes depende de varios factores. En primer lugar tiene que haber una conservación de la estructura conformacional de los mutantes con respecto a la barnasa, en caso contrario no es posible atribuir la variación en la magnitud medida a alguna interacción *específica*. A veces la sustitución de un residuo puede afectar a la conformación de otros residuos directamente, si están interaccionando con el, o indirectamente. Se sabe por ejemplo que la interacción del triptófano 94 con la histidina 18 protonada en la barnasa la estabiliza en 0.8 - 1 Kcal/mol y aumenta el pK de la histidina en 0.6 unidades (Loewenthal et al., 1991). En el caso de los tres mutantes estudiados aquí, el espectro de RMN bi-dimencional de la His102-Ala y de la Lis27-Ala ha mostrado que sus estructuras son esencialmente las mismas que la barnasa en tanto que estos dos residuos se encuentran en la superficie de la proteína y forman pocos contactos intramoleculares, sin embargo en el caso de la Arg87-Ala, los datos de RMN indican que hay cambios estructurales en los residuos 84-86 debido a los varios contactos que forma la Arg87 (Meiering et al., 1991). Para esta razón, hay que considerar con alguna precaución los resultados del experimento con el mutante Arg87-Ala. En segundo lugar, al considerar que los parámetros termodinámicos obtenidos son la suma de los parámetros individuales de cada residuo del sitio de unión significa que estamos suponiendo que no hay cooperatividad entre estos residuos. No tenemos información sobre este fenómeno, y para ello habría que estudiar mutantes dobles. Se sabe que en la unión del inhibidor barstar con

la barnasa, la Arg59 y la His102 interaccionan con el inhibidor de una forma independiente (Hartley, 1993), quizás porque estos dos residuos se encuentran bastante alejados en la estructura de la barnasa para que haya interacción entre los dos (ver Figura 5-1). En tercer lugar, hay que decir que la diferencia entre la variación en la energía de Gibbs de unión de 3'GMP a la barnasa y al mutante es una magnitud aparente, ΔG_{ap} , y puede ser diferente de la energía de interacción real del residuo mutado, ΔG_{int} . Esto dependerá de que si la mutación deja un hueco vacío entre el inhibidor y la proteína no accesible al agua, o al contrario accesible al agua, y es en este último caso cuando ΔG_{int} está muy cerca de ΔG_{ap} (Fersht, 1988).

Por último hay que decir que las comparaciones entre los parámetros de la barnasa y los mutantes serán más informativas si están hechas en base de parámetros termodinámicos intrínsecos ya que, como se ha visto anteriormente y como veremos también en el siguiente apartado, la unión de 3'GMP a la barnasa está fuertemente asociada a la protonación de algunos grupos de la proteína y del ligando que contribuye por ejemplo en aproximadamente -5 Kcal/mol a la variación en la entalpía de reacción observada a pH 4.5 de -11.9 Kcal/mol (ver más adelante la Tabla 5-22). Para los tres mutantes, esta contribución protónica es significativa sólo para la histidina 102 ya que, a pH 4.5 la lisina 27 y la arginina 87 no sufren cambios en sus estados de ionización, pero esto no significa que los parámetros obtenidos para los tres mutantes no contengan contribuciones protónicas del fosfato que puede ser diferente en magnitud en el complejo con la barnasa y con los mutantes.

5.4.4 Interacción Calorimétrica de 3'GMP con la Barnasa a 25°C y a diferentes pH.

En la Tabla 5-14 se dan los parámetros termodinámicos obtenidos a partir de valoraciones calorimétricas de la barnasa con 3'GMP a 25°C, a diferentes pH (3.5 - 8). Los parámetros obtenidos directamente a partir del análisis de las curvas de valoración son n , k_{obs} y ΔH_{obs}° . En todo el intervalo de pH hay una sólo molécula de 3'GMP que se une a la barnasa, y la reacción está conducida por efectos entálpicos opuestos a efectos entrópicos desfavorables.

Tabla 5-14

Parámetros termodinámicos obtenidos en la unión de 3'GMP a la barnasa a diferentes pH, temperatura $T = 25^{\circ}\text{C}$, y fuerza iónica 50 mM. k_{obs} : constante de asociación, n : número de sitios, $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$: variación en la entalpía de reacción, $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$: variación en la energía de Gibbs de reacción, y $\Delta S_{\text{obs}}^{\circ}$: variación en la entropía de reacción.

pH	Disolvente	n	$k_{\text{obs}} \times 10^{-3}$ M^{-1}	$\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$ kcal/mol	$\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$	$\Delta S_{\text{obs}}^{\circ}$ cal/K.mol
3.5	Na Formiato 50 mM	1.05 ± 0.01	200 ± 20	-10.8 ± 0.2	-7.22	-12
4.0	AcK 50 mM	1.07 ± 0.01	280 ± 40	-11.0 ± 0.2	-7.42	-12
4.5	AcK 50 mM	1.00 ± 0.01	340 ± 30	-11.9 ± 0.2	-7.55	-15
5.0	AcK 50 mM	1.10 ± 0.01	310 ± 30	-11.9 ± 0.2	-7.49	-15
5.3	AcK 50 mM	1.04 ± 0.01	420 ± 30	-12.8 ± 0.1	-7.67	-17
5.7	AcK 50 mM	1.07 ± 0.01	290 ± 30	-13.3 ± 0.2	-7.45	-20
6.0	Mes 50 mM + KCl 28 mM	1.06 ± 0.01	123 ± 06	-10.8 ± 0.1	-6.94	-13
6.5	Mes 50 mM + KCl 24 mM	1.03 ± 0.01	093 ± 08	-10.4 ± 0.2	-6.78	-12
7.0	Hepes 50 mM + KCl 38 mM	1.01 ± 0.02	037 ± 05	-08.9 ± 0.4	-6.23	-09
7.5	Hepes 50 mM + KCl 25 mM	0.84 ± 0.02	035 ± 06	-07.8 ± 0.8	-6.20	-05
8.0	Hepes 50 mM + KCl 12 mM	0.93 ± 0.02	028 ± 05	-07.5 ± 0.6	-6.02	-05

Elizabeth Meiering (comunicación personal) ha medido, mediante RMN, valores de 5.2 ± 3.5 , 2.6 ± 0.6 , 2.9 ± 1.2 y $6.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$ para la constante de disociación del complejo barnasa-3'GMP a cuatro diferentes pH; 3.5, 4.5, 6.3 y 8.1, y a las mismas condiciones de temperatura y fuerza iónica que las nuestras. Estas constantes de disociación se convierten a -7.2 ± 0.4 , -7.6 ± 0.1 , -7.6 ± 0.2 , y -7.1 ± 0.2 kcal/mol para la energía de Gibbs de formación del complejo. Los valores a pH 3.5 y 4.5 están de acuerdo con nuestros datos, mientras que los de pH 6.3 y 8.1 están muy lejos, incluso teniendo en cuenta de los errores. En el análisis de las valoraciones calorimétricas se ha considerado que las dos formas ionizadas del fosfato de 3'GMP pueden unirse a la barnasa. Suponiendo que sólo la forma monoaniónica del fosfato se une a la barnasa, de la misma manera que la unión de 2'CMP a la ribonucleasa A (Anderson et al., 1968), podemos analizar los calores medidos en el calorímetro considerando la entalpía por mol de proteína dada por la Ecuación (5.13) en donde esta vez la concentración del ligando libre x será solamente la de la forma monoanionica x^- :

$$x^- = \frac{\sqrt{(1+r-kX_t+nkM_t)^2 + 4k(1+r)X_t} + kX_t - nkM_t - 1 - r}{2k(1+r)} \quad (5.58)$$

en donde r es la relación entre las concentraciones libres en el medio de las dos formas ionizadas del ligando $r = x^2/x^- = 10^{\text{pH}-\text{pK}}$, con $\text{pK} = 5.85$, el del segundo grupo OH del fosfato (valor medido en la valoración potenciométrica de 3'GMP). En este caso, los valores de la energía de Gibbs de la reacción a pH 6 y 6.5 serían -7.5 y -7.8 kcal/mol respectivamente, y el número de sitios n y la entalpía de reacción $\Delta H_{\text{obs}}^\circ$ son las mismas que en el caso de que ambas formas iónicas del fosfato se unen a la barnasa (Tabla 5-14). A pH 3.5 y 4.5, no hay diferencia en los parámetros obtenidos por las dos formas de análisis, ya que a estos dos pH prácticamente todo el ligando se encuentra en su forma monoanionica. A pH 8, x^- es despreciable y el análisis falla. Como se puede comprobar entonces, la discrepancia entre nuestros valores de $\Delta G_{\text{obs}}^\circ$ y los de Elizabeth a pH 6.3 se reduce al suponer que solamente la forma monoanionica del fosfato de 3'GMP se une a la barnasa, pero no tenemos suficientes pruebas para confirmarlo.

Sancho et al. (1991) han medido por espectroscopía diferencial una constante de equilibrio de asociación de 435000 M^{-1} en 50 mM-HMes/NaMes, pH 6.3 y temperatura

25°C, para la unión de 3'GMP a la barnasa. Este valor tampoco concuerda con nuestros datos, es unas cuatro veces más grande. Si la concentración total del Mes es 50 mM, la fuerza iónica del tampón sería sobre los 25 mM, que es menor que la nuestra (50 mM). La disminución de la fuerza iónica puede explicar la discrepancia con el resultado de Sancho, ya que las interacciones electrostáticas, que son importantes en la unión de 3'GMP a la barnasa, son normalmente más fuertes a bajas concentraciones de sales.

Analizando los parámetros termodinámicos obtenidos (Tabla 5-14), se ve claramente que hay una dependencia de los mismos con el pH. Generalmente, los parámetros observados en la unión de un ligando a la macromolécula son el resultado de la contribución de varios procesos moleculares. En primer lugar están los cambios en la solvatación de los grupos del ligando y la macromolécula que hacen el contacto en el complejo, y después la interacción entre dichos grupos mediante puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, etc. (ver por ejemplo Eftink y Biltonen, 1980; Ross y Subramanian, 1981). Todos estos efectos se engloban bajo la denominación de unión intrínseca (Eftink y Biltonen, 1980). En segundo lugar están las demás reacciones secundarias como la liberación o absorción de protones por el ligando, la macromolécula y el disolvente, los cambios conformacionales inducidos o requeridos por la unión, cambios en los estados de agregación de la macromolécula y el ligando, etc. En nuestro caso, la unión de 3'GMP a la barnasa transcurre sin cambios conformacionales significantes (Meiering et al., 1993) y sin agregación de la barnasa (Martínez et al., 1994). En relación al 3'GMP, los experimentos de dilución de 3'GMP indican que hasta una concentración de 12 mM no hay agregaciones, y mucho menos a las concentraciones utilizadas: ≈ 0.5 mM. Por lo tanto los parámetros termodinámicos observados no contienen contribuciones ni de los cambios conformacionales ni de la agregación de los dos reactivos. Sin embargo la reacción está asociada a un intercambio de protones ΔN entre los reactivos y el tampón del medio, que es la causa fundamental de la dependencia de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ y $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$ con el pH. Por lo tanto la corrección de estos parámetros por la contribución de los protones nos daría valores que podemos asociar exclusivamente a la unión intrínseca. En el Apartado 5.4.1, se ha visto que fundamentalmente hay dos grupos ionizables del sitio activo de la barnasa, la His102 y el Glu60, y un grupo del ligando, el fosfato, que contribuyen al intercambio protónico en el intervalo de pH 3.5-8. A continuación vamos a analizar los datos de la Tabla 5-14 considerando que la reacción está

asociada a la ionización/protonación de estos tres grupos.

Análisis de la variación de ΔG_{obs}° con el pH:

En la sección de 5.3 de Teoría se han desarrollado las ecuaciones básicas del modelo de la dependencia de los parámetros termodinámicos con el pH para dos grupos ionizables, y que se puede generalizar a cualquier número de grupos. En el caso de la unión de 3'GMP a la barnasa, la expresión que describe la variación de ΔG_{obs}° con el pH sería:

$$\Delta G_{obs}^{\circ} = \Delta G_b^{\circ} - RT \sum_{j=1}^3 \text{Ln}(1 + 10^{pK'_j - pH}) + RT \sum_{j=1}^3 \text{Ln}(1 + 10^{pK_j - pH}) \quad (5.59)$$

en donde los subíndices j se refieren a los tres grupos mencionados anteriormente y cuyos pK en la forma libre pueden desplazarse a otros valores en el complejo. ΔG_b° corresponde a la energía de Gibbs de la reacción después de la corrección de ΔG_{obs}° por la unión o liberación de protones por los reactivos. ΔG_b° es independiente del pH y constituye un parámetro intrínseco correspondiente a la energía de Gibbs de la unión del 3'GMP a la barnasa cuando tanto el fosfato como la His102 y el Glu60 no están protonados, es decir a pH básico.

En la Figura 5-18 se da la gráfica de ΔG_{obs}° vs. pH. En principio, es posible ajustar los datos por mínimos cuadrados no lineales a los siete parámetros de la ecuación anterior, siempre que no haya coincidencia entre un pK y un pK' y que los valores de los mismos no sean muy cercanos. Sin embargo, el ajuste de nuestros datos a los siete parámetros falla, porque diferentes conjuntos de valores de los parámetros pueden representar bien a los datos, por lo que hay que fijar el máximo número posible de parámetros en valores conocidos. Para ello, en un primer ajuste, se fijó solamente el pK del fosfato en 5.85 (valor determinado anteriormente en la valoración potenciométrica de 3'GMP) y los demás parámetros de la Ecuación (5.59) se obtuvieron a partir de un ajuste no lineal. De nuevo varios conjuntos de valores de los parámetros representan bien a los datos, con el pK de la His102 variando entre $5.6 - 6 \pm 1.8$, como se ve, con un gran margen de error. En el segundo ajuste se fijó tanto el pK del fosfato como el de la His102 en 5.85 y 5.9 respectivamente. Este último es el valor obtenido a partir de la valoración potenciométrica de la barnasa (Tabla 5-3), y también está muy cerca del valor 5.74 ± 0.24 obtenido en el análisis de la dependencia del intercambio

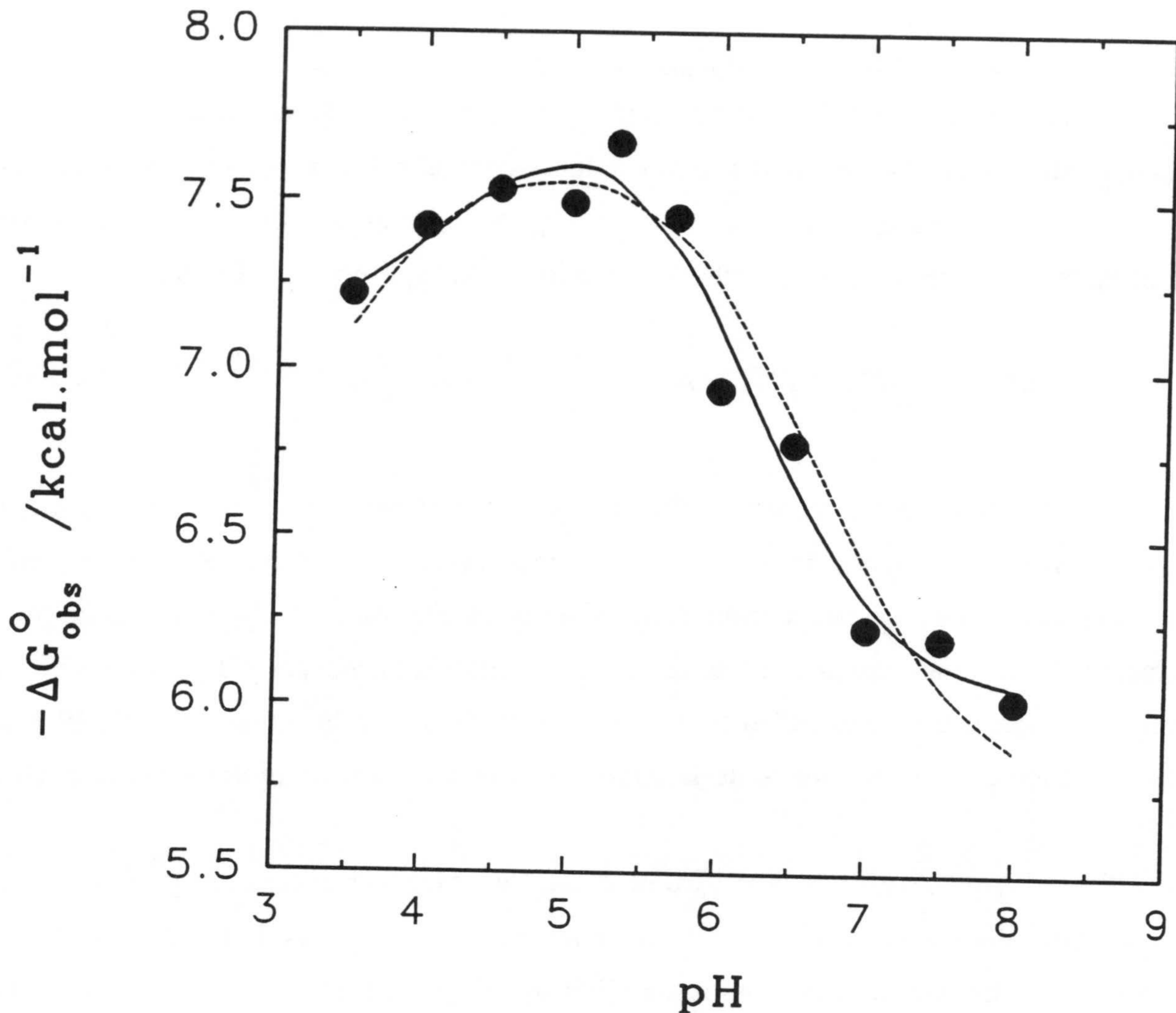


Figura 5-18: Cambio en la energía de Gibbs de reacción de 3'GMP con la barnasa a diferentes pH, temperatura 25°C y fuerza iónica 50 mM. La línea en trazo continuo es el mejor ajuste a la Ecuación (5.59) con los valores 3.9, 6.8 y 6.3 para los pK' del Glu60, His102 y el fosfato del ligando, respectivamente, en el complejo. Los pK de la His102 y del fosfato se han fijado en el ajuste a 5.9 y 5.85 respectivamente y para el pK del Glu60 se ha encontrado un valor de 4.4 en la proteína libre. Para ΔG_b° se ha encontrado un valor de -6 kcal/mol. La desviación estándar del ajuste es 0.1 kcal/mol. La línea en trazo discontinuo es el mejor ajuste a la Ecuación (5.59) fijando los valores de los pK y pK' de los tres grupos en los valores que mejor representan a los datos de ΔN que se dan en la Tabla 5-6. El único parámetro ajustado es ΔG_b° para el cual se encontró el valor -5.75 ± 0.04 kcal/mol. La desviación estándar del ajuste es 0.15 kcal/mol.

protónico ΔN con el pH. En este caso, los parámetros obtenidos en el mejor ajuste (Figura 5-18, línea en trazo continuo) de los datos de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ a la Ecuación (5.59) han sido 4.4 para el pK del Glu60; 3.9, 6.8 y 6.3 para los tres pK'; y -6 kcal/mol para ΔG_b° . Estos parámetros se resumen en la Tabla 5-15.

Tabla 5-15

Parámetros termodinámicos de la ionización de la His102, del Glu60 y del fosfato obtenidos a partir del ajuste de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$. El valor de ΔG_b° obtenido también en el ajuste es -6 ± 0.1 kcal/mol.

Grupo	pK	pK'
His102	5.9*	6.8 ± 0.5
Glu60	4.4 ± 0.6	3.9 ± 0.7
Pi	5.85*	6.3 ± 0.5

* Valores fijados en el ajuste. El ajuste se ha llevado a cabo con la opción "Curve fit" del programa "SigmaPlot", versión 5.0 (Jandel Co. California, USA).

Los valores de los pK del Glu60 y los pK' obtenidos a partir del análisis de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ parecen ser en principio diferentes de los obtenidos en el análisis del intercambio protónico ΔN (Tabla 5-6), pero teniendo en cuenta los márgenes de error, se puede considerar que los dos conjuntos de datos son los mismos. No obstante, los parámetros obtenidos en el análisis de ΔN son más precisos que los obtenidos a partir del análisis de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$, y por consiguiente se ha considerado que los primeros son más representativos de nuestro sistema. En la Figura 5-18 (línea en trazo discontinuo) se ha simulado los valores de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ con los parámetros del mejor ajuste de ΔN (Tabla 5-6) y el único parámetro que se ha quedado ajustable es ΔG_b° que ha resultado ser -5.76 ± 0.04 kcal/mol.

El incremento en la energía de Gibbs ΔG_a° de unión de 3'GMP a la barnasa, con el fosfato, la His102 y el Glu60 protonados, es decir a pH ácido, puede calcularse a partir de la Ecuación (5.27), que generalizada para nuestro caso de tres grupos sería:

$$\Delta G_a^{\circ} = \Delta G_b^{\circ} - 2.3RT \sum_{j=1}^3 (pK'_j - pK_j) \quad (5.60)$$

que da un valor de -6.4 ± 0.04 kcal/mol para ΔG_a° (el error en ΔG_a° se ha estimado a partir del ajuste de ΔG_{obs}° a la Ecuación (5.59) reemplazando ΔG_b° por la Ecuación (5.60)). La diferencia entre ΔG_a° y ΔG_b° muestra que la unión de 3'GMP a la barnasa está más favorecida a pH ácido que a pH básico por 0.6 ± 0.1 kcal/mol. Esto es debido probablemente a que a pH ácido, las interacciones electrostáticas entre el grupo imidazol de la histidina 102 cargado positivamente y el primer grupo OH del fosfato cargado aún negativamente están más favorecidas que las que existen entre el segundo grupo OH del fosfato y las argininas 87, 83 y la lisina 27 a pH básico, a pesar del efecto desfavorable de la protonación del Glu60 sobre ΔG_a° .

Análisis de la variación de ΔH_{obs}° con el pH:

La derivación de la ecuación representando la dependencia de la variación en la entalpía de la reacción ΔH_{obs}° con el pH se ha descrito en la Sección 5.3 de Teoría, Ecuación (5.34), que para los tres grupos sería:

$$\Delta H_{obs}^{\circ} = \Delta H_b^{\circ} + \sum_{j=1}^3 \frac{10^{pK'_j - pH}}{1 + 10^{pK'_j - pH}} \Delta H'_{p,j} - \sum_{j=1}^3 \frac{10^{pK_j - pH}}{1 + 10^{pK_j - pH}} \Delta H_{p,j} - \Delta N \Delta H_{p,Ta}^{\circ} \quad (5.61)$$

en donde ΔH_b° es la variación en la entalpía de reacción cuando el fosfato, la His102 y el Glu60 no están protonados, $\Delta H_{p,j}^{\circ}$ y $\Delta H'_{p,j}^{\circ}$ son los calores molares de protonación de estos grupos en la forma libre y en el complejo y $\Delta H_{p,Ta}^{\circ}$ es el calor molar de protonación del tampón.

Dado el gran número de parámetros de la ecuación anterior, es imposible obtener los valores de los mismos a partir de un ajuste de los datos de ΔH_{obs}° , por lo que es necesario fijar el máximo de parámetros en valores ya conocidos. En las valoraciones calorimétricas de 3'GMP y barnasa con HCl, se han determinado los valores de ΔH_p° de los tres grupos implicados en la unión de 3'GMP, y en las valoraciones potenciométricas de los dos reactivos y del complejo, se determinaron los valores de ΔN , así como los pK y pK', por lo que solamente nos quedan 4 parámetros desconocidos en la Ecuación (5.61): las tres entalpías de

protonación en el complejo, $\Delta H'_p{}^0$, y $\Delta H_b{}^0$. El análisis de $\Delta H_{obs}{}^0$ se ha llevado en dos etapas. En primer lugar se han corregido los valores de $\Delta H_{obs}{}^0$ por el calor de protonación o ionización del tampón, dado por el último término del miembro de derecha de la ecuación anterior, para obtener los valores de ΔH^0 , y en segundo lugar se ha procedido a analizar ΔH^0 para obtener $\Delta H'_p{}^0$, y $\Delta H_b{}^0$.

En la Tabla 5-16 se exponen los valores de ΔH^0 , ya corregidos por el calor de protonación del tampón, y en la Figura 5-19 se puede ver el resultado del ajuste no lineal de los mismos a la ecuación:

$$\Delta H^0 = \Delta H_b^0 + \sum_{j=1}^3 \frac{10^{pK'_j - pH}}{1 + 10^{pK'_j - pH}} \Delta H'_{pj}{}^0 - \sum_{j=1}^3 \frac{10^{pK_j - pH}}{1 + 10^{pK_j - pH}} \Delta H_{pj}{}^0 \quad (5.62)$$

Los parámetros obtenidos a partir del ajuste se resumen en la Tabla 5-17.

Tabla 5-17

Calores molares $\Delta H'_p{}^{***}$ (en kcal/mol) de la protonación de la His102, del Glu60 y del fosfato obtenidos en el ajuste de ΔH . El valor de ΔH_b obtenido también a partir del ajuste es -6.9 ± 0.5 kcal/mol

Grupo	pK*	pK'*	$\Delta H_p{}^{**}$	$\Delta H'_p{}^{***}$
His102	5.9	7.36	-7.7	-7.7 ± 0.8
Glu60	3.8	2.9	-0.7	5.7 ± 3
Pi	5.85	5.77	0	-5.3 ± 0.8

* Valores fijados en el ajuste, que mejor han representado a ΔN (Tabla 5-6).

** Valores determinados en las valoraciones calorimétricas de la barnasa y 3'GMP, y fijados en el ajuste.

$\Delta H_a{}^0$, correspondiente a la variación en la entalpía de reacción cuando los tres grupos están protonados, puede calcularse a partir de $\Delta H_p{}^0$ y $\Delta H'_p{}^0$ según la Ecuación (5.33):

$$\Delta H_a^0 = \Delta H_b^0 + \sum_{j=1}^3 (\Delta H'_{pj}{}^0 - \Delta H_{pj}{}^0) \quad (5.63)$$

Tabla 5-16

Cambio en la entalpía de reacción ΔH° de 3'GMP con la barnasa a temperatura 25°C y fuerza iónica 50 mM, obtenida después de la corrección de $\Delta H_{\text{obs}}^\circ$ por el calor de protonación del tampón: $\Delta N\Delta H_{p, \text{Ta}}^\circ$ de acuerdo con la Ecuación (5.28).

pH	$\Delta H_{\text{obs}}^\circ$ kcal/mol	ΔN	$\Delta H_{p, \text{Ta}}^\circ$ kcal/mol	ΔH°
3.5	-10.8	-0.48	+0.04 ^a	-10.8
4.0	-11.0	-0.32	+0.09 ^b	-11.0
4.5	-11.9	-0.12	+0.09	-11.9
5.0	-11.9	+0.05	+0.09	-11.9
5.3	-12.8	+0.15	+0.09	-12.8
5.7	-13.3	+0.33	+0.09	-13.3
6.0	-10.8	+0.47	-3.72 ^c	-12.5
6.5	-10.4	+0.63	-3.72	-12.7
7.0	-08.9	+0.61	-5.01 ^d	-12.0
7.5	-07.8	+0.40	-5.01	-09.8
8.0	-07.5	+0.19	-5.01	-08.5

Calores molares de protonación de ^a ácido fórmico y ^b acetato (Christensen et al., 1976).

^c: Calor molar de protonación del Mes (Fukada y Takahashi 1987, comunicación personal).

^d: Calor molar de protonación del Hepes (Beres y Sturtevant, 1971).

que resulta ser -5.8 ± 3 kcal/mol (el error se estima a partir del ajuste directo de ΔH_a° en lugar de ΔH_b° en la Ecuación (5.62)).

Finalmente, a partir de los análisis individuales de $\Delta G_{\text{obs}}^\circ$ y $\Delta H_{\text{obs}}^\circ$, podemos resumir los parámetros termodinámicos a pH ácido y básico de la unión de 3'GMP a la barnasa en la Tabla 5-18. En esta tabla, se puede comprobar que, a pH ácido, la reacción está favorecida tanto entálpicamente como entrópicamente y con una gran dominación de la entalpía sobre la entropía, mientras que a pH básico, la reacción se convierte a ser ligeramente desfavorable desde el punto de vista entrópico pero la alta entalpía favorable sigue dominando.

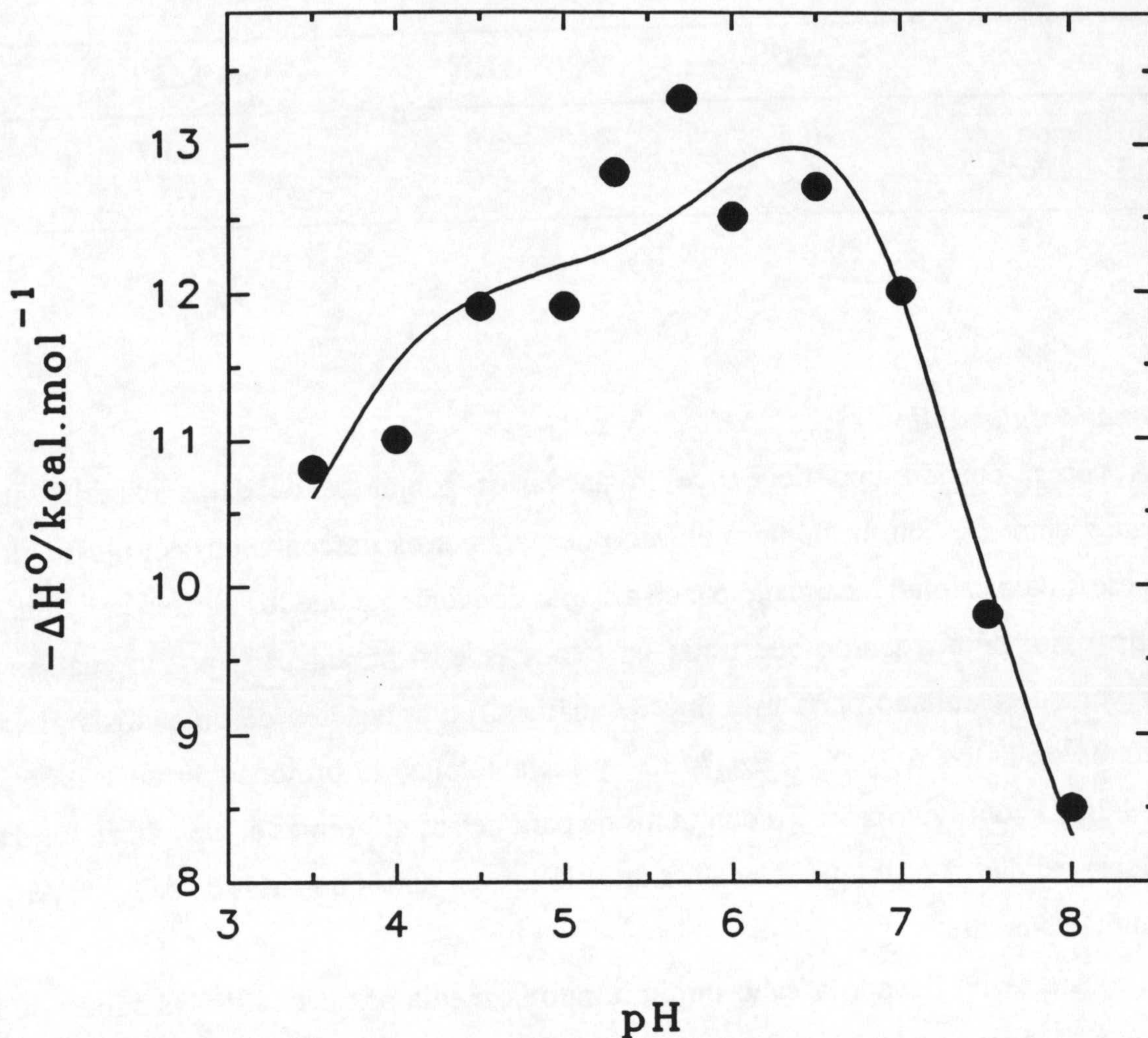


Figura 5-19: Representación de la variación de la entalpía de reacción de 3'GMP con la barnasa a diferentes pH, temperatura 25°C y fuerza iónica 50 mM. La línea es el mejor ajuste a la Ecuación (5.62), con los parámetros -7.7, 5.7, -5.3 y -6.9 kcal/mol para los $\Delta H'_p$ (de la His102, el Glu60 y el fosfato) y ΔH_b respectivamente. Los demás parámetros de la ecuación se han fijado en los valores que se dan en la Tabla 5-6. La desviación estándar del ajuste es 0.4 kcal/mol.

Tabla 5-18

Parámetros termodinámicos intrínsecos de la unión de 3'GMP a la barnasa. Todos los valores en kcal/mol.

	ΔG°	ΔH°	$T\Delta S^\circ$
pH ácido	-6.5	-5.8	+0.7
pH básico	-5.8	-6.9	-1.1

Análisis global de ΔG_{obs}° , ΔH_{obs}° , y ΔN :

A veces, cuando uno tiene que tratar varios conjuntos de datos experimentales relacionados entre sí, con un número elevado de parámetros desconocidos, el ajuste global de todos estos datos simultáneamente puede ser más conveniente que los ajustes individuales. En nuestro caso, hemos tenido que tratar en total hasta 14 parámetros, por lo cual hemos intentado ver que resultado daría este tipo de análisis. La aplicación de un análisis global a los conjuntos de datos ΔG_{obs}° , ΔH_{obs}° , ΔN y las entalpías de protonación de la barnasa, $\Delta H_{p,Ba}^\circ$, falló; se obtuvieron varios conjuntos de parámetros diferentes que explican los datos con la misma calidad. Por lo que se analizaron sólo los conjuntos de datos de ΔG_{obs}° , ΔH_{obs}° y ΔN simultáneamente.

El ajuste se ha llevado a cabo minimizando la media aritmética de las sumas de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los calculados por las Ecuaciones (5.59), (5.61) y (5.45) para ΔG_{obs}° , ΔH_{obs}° y ΔN respectivamente, utilizando un algoritmo basado en el método del simplex (Nedler y Mead, 1965). Como no ha sido posible incluir los datos de las entalpías de protonación de la barnasa en el ajuste global, hemos tenido que fijar las entalpías de protonación de la His102 y del Glu60 en -7.7 y -0.7 kcal/mol, y el pK de la His102 en 5.9, que son los valores que se determinaron en los ajustes individuales (Tabla 5-9). Hay que decir que $\Delta H_{p,His102}^\circ$ depende de su pK_{His} , por lo cual no se puede fijar uno de ellos sin el otro. El ajuste simultáneo de esas tres funciones se muestra en la Figura 5-20 (líneas en trazo continuo) en donde se obtuvieron resultados satisfactorios, excepto para los datos de ΔN . No obstante, el ajuste de ΔN se mejora mucho al darle un peso estadístico 30

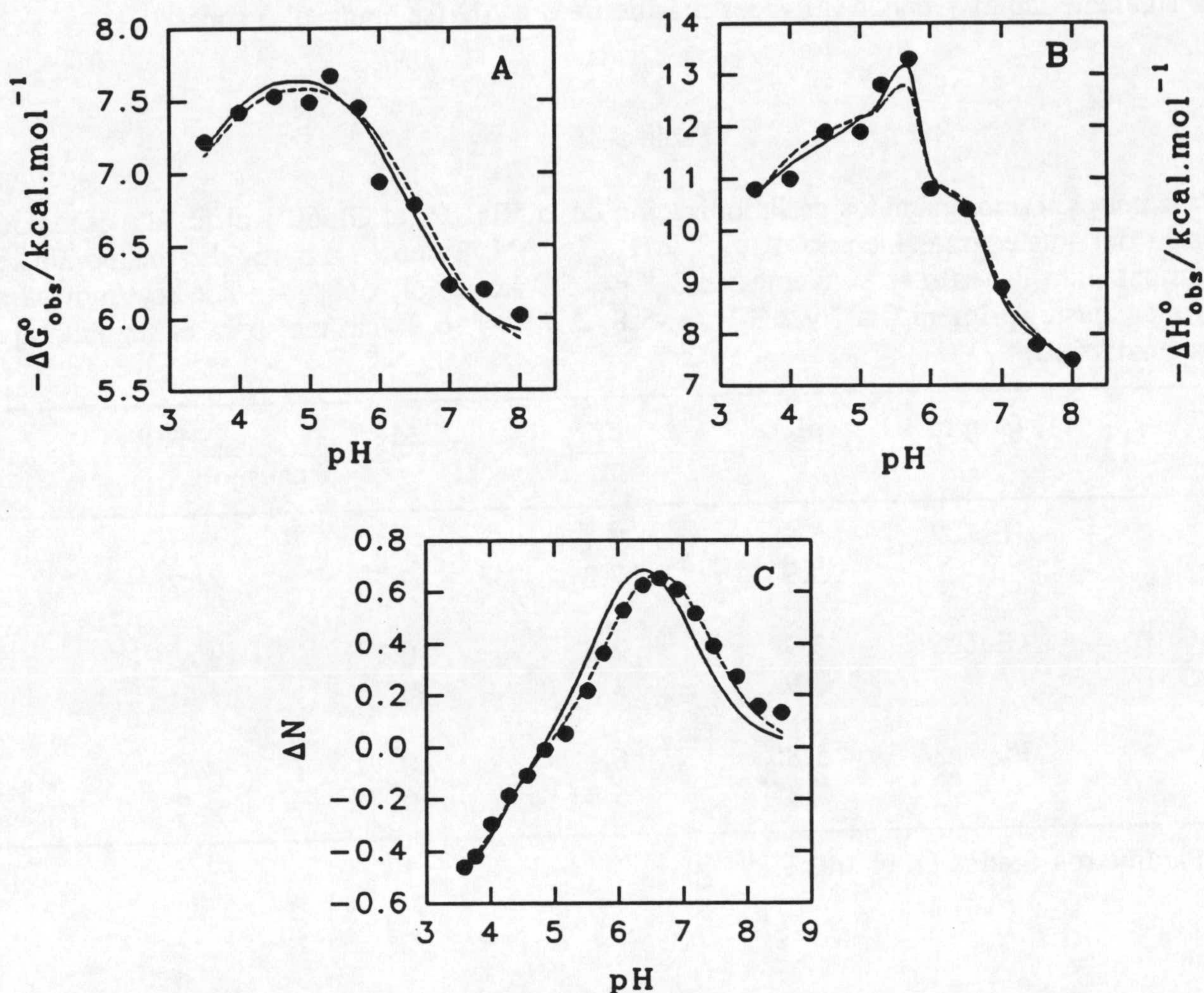


Figura 5-20: Ajuste simultáneo de ΔG_{obs}^0 (A), ΔH_{obs}^0 (B) y ΔN (C). Las líneas en trazo continuo representan el mejor ajuste en el caso de asignar el mismo peso estadístico a la suma de los residuos al cuadrado de cada una de las tres funciones (desviaciones estándar: 0.12 (A), 0.21 (B) y 0.09 (C)), y las líneas en trazo discontinuo corresponden al caso de asignar 30 veces más de peso a ΔN sobre las otras dos funciones (desviaciones estándar: 0.14 (A), 0.3 (B), y 0.03 (C)). El ajuste simultáneo se ha llevado a cabo por minimización de la media aritmética ponderada de las tres sumas de los residuos al cuadrado de cada función. Los parámetros de cada ajuste se exponen en la Tabla 5-19.

veces mayor que a las otras dos funciones (Figura 5-19, líneas en trazo discontinuo) sin que esto afecta sensiblemente a la calidad del ajuste de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ y $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$. Los parámetros del ajuste global obtenidos dando el mismo peso estadístico a las tres funciones (primera fila de la siguiente tabla) y dando 30 veces más de peso a ΔN (segunda fila) son:

Tabla 5-19

Parámetros termodinámicos de la ionización de la His102, el Glu60 y el fosfato obtenidos a partir del ajuste simultáneo de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$, $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$ y ΔN . También a partir del mismo ajuste se han obtenido los valores siguientes: $\Delta G_{\text{b}}^{\circ} = -5.9$ kcal/mol, $\Delta H_{\text{b}}^{\circ} = -7.2$ kcal/mol para el primer ajuste (primera fila), y $\Delta G_{\text{b}}^{\circ} = -5.8$, $\Delta H_{\text{b}}^{\circ} = -6.9$ kcal/mol para el segundo ajuste (segunda fila).

Grupo	pK	pK'	$\Delta H_{\text{p}}^{\circ}$ kcal/mol	$\Delta H'_{\text{p}}^{\circ}$ kcal/mol
His102	5.9*	7.1	-7.7*	-7.7
	5.9*	7.3	-7.7*	-7.7
Glu60	3.9	2.8	-0.7*	+4
	3.9	3	-0.7*	+4
Pi	5.85*	6.1	0*	-4.6
	5.85*	5.84	0*	-5.2

* Parámetros fijados en el ajuste.

Los parámetros termodinámicos de la reacción de 3'GMP con la barnasa a pH ácido, que se calcularían a partir de los a pH básico y los pK, pK', $\Delta H_{\text{p}}^{\circ}$ y $\Delta H'_{\text{p}}^{\circ}$ de la tabla anterior, se resumen junto con los de pH básico en la Tabla 5-20.

Como se puede comprobar, los parámetros tanto de la primera fila como de la segunda fila de la Tabla 5-19 concuerdan con los obtenidos en los ajustes individuales (Tabla 5-17), excepto que, en el caso de dar el mismo peso estadístico a las tres funciones, los pK' de la His102 y del fosfato son 0.3 unidades aproximadamente diferentes de los de la Tabla 5-17. Así mismo de la comparación de las Tablas 5-20 y 5-18 se puede decir para $\Delta G_{\text{a}}^{\circ}$, $\Delta G_{\text{b}}^{\circ}$, $\Delta H_{\text{b}}^{\circ}$ y $T\Delta S^{\circ}$ que son prácticamente iguales, con la excepción de $\Delta H_{\text{a}}^{\circ}$, y consiguientemente

Tabla 5-20

Parámetros termodinámicos intrínsecos de la unión de 3'GMP a la barnasa a pH ácido y básico que se obtieron a partir del ajuste simultáneo de ΔG_{obs} , ΔH_{obs} y ΔN . Todos los valores en kcal/mol.

	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
pH ácido	-6.4	-7.1	-0.7
	-6.5	-7.4	-0.9
pH básico	-5.9	-7.2	-1.3
	-5.8	-6.9	-1.1

$T\Delta S_a^\circ$, que son -1.3 kcal/mol menor, debido al gran error en la determinación de los calores de protonación de los grupos en el complejo, y precisamente del Glu60 (ver Tabla 5-17).

Conclusión:

En cualquier caso, y después de haber analizado los datos tanto mediante ajustes individuales como mediante el ajuste global, podemos concluir que la reacción entre 3'GMP y la barnasa, a temperatura 25°C y fuerza iónica 50 mM, está bien representada con los parámetros termodinámicos en las Tablas 5-21. Podemos concluir que mientras el pK de la His102 aumenta en 1.3 unidades y el pK del Glu60 se ve disminuido por 1 unidad en el complejo, sin embargo, el pK del fosfato apenas se ve afectado por la interacción. La magnitud del cambio en el pK_{His102} no es anormal en comparación con la encontrada en la interacción de tres histidinas de la ribonucleasa A con 3'CMP; que varía entre 0.5 y 2 unidades de pK (Flogel y Biltonen, 1975a,b). El calor de protonación de la His102 en el complejo no experimenta variación con respecto a su valor en la barnasa libre, lo mismo que se ha mostrado en la interacción de dos histidinas de la ribonucleasa A con 3'CMP (Flogel y Biltonen, 1975a,b). Si en el caso de $\Delta H'_{p,\text{Glu60}}^\circ$ no ha sido posible cuantificar su valor con bastante precisión, para $\Delta H_{p,\text{Pi}}^\circ$ se ha determinado una variación de aproximadamente 5 kcal/mol en el complejo. La contribución de la protonación de la His102 y del fosfato de una parte, y de la ionización del Glu60 de otra parte a los valores observados de $\Delta G_{\text{obs}}^\circ$ y $\Delta H_{\text{obs}}^\circ$

Tabla 5-21

Resumen de los parámetros obtenidos a partir de los ajustes individuales y el ajuste global de ΔN , $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ y $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$.

A: Parámetros termodinámicos de la protonación de la His102, del Glu60 y del fosfato. * Error no determinado.

Grupo	pK	pK'	ΔH_p° kcal/mol	$\Delta H'_p{}^{\circ}$ kcal/mol
His102	5.9 ± 0.2	7.2 ± 0.1	-7.7 ± 0.4	-7.7 ± 0.8
Glu60	3.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	-0.7 ± 0.4	5 ± 3
Pi	5.85 ± 0.01	5.9 ± 0.1	0*	-5 ± 1

B: Parámetros termodinámicos intrínsecos de unión de 3'GMP a la barnasa a pH ácido y básico.

ΔG_a° kcal/mol	ΔH_a° kcal/mol	ΔS_a° u.e	ΔG_b° kcal/mol	ΔH_b° kcal/mol	ΔS_b° u.e
-6.3 ± 0.3	-6.4 ± 3	$+8 \pm 11$	-5.9 ± 0.1	-7 ± 0.5	4 ± 2

se ilustra numericamente en la Tabla 5-22 y gráficamente en la Figura 5-21, en donde se puede comprobar la buena correlación entre los valores calculados a cada pH de los parámetros termodinámicos independientes del pH (ΔG_a° , ΔG_b° , ΔH_a° , ΔH_b°), reflejada en las pequeñas desviaciones estándar de los valores medios de los mismos.

La diferencia entre los parámetros termodinámicos a pH ácido y básico representa la diferencia en la unión del ligando cuando los tres grupos están protonados y no protonados. Si suponemos que la mayor interacción de la His102 protonada con el fosfato es de origen electrostático, ésta puede caracterizarse a partir de los cambios del pK y del calor de protonación de la misma en el complejo, como se ilustra en el esquema del modelo termodinámico simple de la Figura 5-4. Las diferencias ($\Delta G_{a,\text{His102}}^{\circ} - \Delta G_{b,\text{His102}}^{\circ}$) en la energía de Gibbs, ($\Delta H_{a,\text{His102}}^{\circ} - \Delta H_{b,\text{His102}}^{\circ}$) en la entalpía de reacción, y ($\Delta S_{a,\text{His102}}^{\circ} -$

Tabla 5-22

Evaluación cuantitativa de las contribuciones energéticas de la ionización del Glu60 (ΔG_{Glu60} , ΔH_{Glu60}) y de la protonación de la His102 (ΔG_{His102} , ΔH_{His102}) y del fosfato (ΔG_{Pi} , ΔH_{Pi}) a la energía de Gibbs total observada y a la entalpía de unión de 3'GMP a la barnasa a 25°C y fuerza iónica 50 mM. $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ (o ΔH°) es la suma de $\Delta G_{\text{b}}^{\circ}$ (o $\Delta H_{\text{b}}^{\circ}$) y de las contribuciones de los tres grupos. Los datos han sido calculados de acuerdo con las Ecuaciones (5.59), (5.62) y los parámetros que se dan en la Tabla 5-21. Los valores medios de los parámetros termodinámicos a pH ácido y básico son: $\Delta G_{\text{a}}^{\circ} = -6.3 \pm 0.1$, $\Delta G_{\text{b}}^{\circ} = -5.9 \pm 0.1$, $\Delta H_{\text{a}}^{\circ} = -6.4 \pm 0.4$ y $\Delta H_{\text{b}}^{\circ} = -7.1 \pm 0.4$ (los errores corresponden a una desviación estándar, todos los datos en kcal/mol).

pH	$\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$	$\Delta G_{\text{a}}^{\circ}$	$\Delta G_{\text{b}}^{\circ}$	ΔG_{His102}	ΔG_{Glu60}	ΔG_{Pi}
3.5	-7.22	-6.47	-5.99	-1.77	0.61	-0.07
4.0	-7.42	-6.36	-5.89	-1.77	0.30	-0.07
4.5	-7.53	-6.31	-5.83	-1.75	0.12	-0.06
5.0	-7.49	-6.24	-5.76	-1.71	0.04	-0.06
5.3	-7.67	-6.47	-5.99	-1.65	0.02	-0.05
5.7	-7.45	-6.39	-5.92	-1.50	0.01	-0.04
6.0	-6.94	-6.07	-5.59	-1.33	0.00	-0.03
6.5	-6.78	-6.32	-5.83	-0.93	0.00	-0.01
7.0	-6.23	-6.19	-5.71	-0.52	0.00	0.00
7.5	-6.20	-6.45	-5.97	-0.23	0.00	0.00
8.0	-6.02	-6.41	-5.94	-0.08	0.00	0.00

pH	ΔH°	$\Delta H_{\text{a}}^{\circ}$	$\Delta H_{\text{b}}^{\circ}$	ΔH_{His102}	ΔH_{Glu60}	ΔH_{Pi}
3.5	-10.8	-6.60	-7.30	-0.03	1.50	-4.98
4.0	-11.0	-5.95	-6.65	-0.09	0.68	-4.94
4.5	-11.9	-6.38	-7.08	-0.28	0.26	-4.81
5.0	-11.9	-6.04	-6.74	-0.81	0.09	-4.44
5.3	-12.8	-6.70	-7.40	-1.45	0.05	-4.00
5.7	-13.3	-6.81	-7.51	-2.74	0.02	-3.07
6.0	-12.5	-5.76	-6.46	-3.83	0.01	-2.21
6.5	-12.7	-6.13	-6.83	-4.87	0.00	-1.00
7.0	-12.0	-6.78	-7.48	-4.15	0.00	-0.37
7.5	-09.8	-6.60	-7.30	-2.38	0.00	-0.12
8.0	-08.5	-6.77	-7.47	-0.99	0.00	-0.04

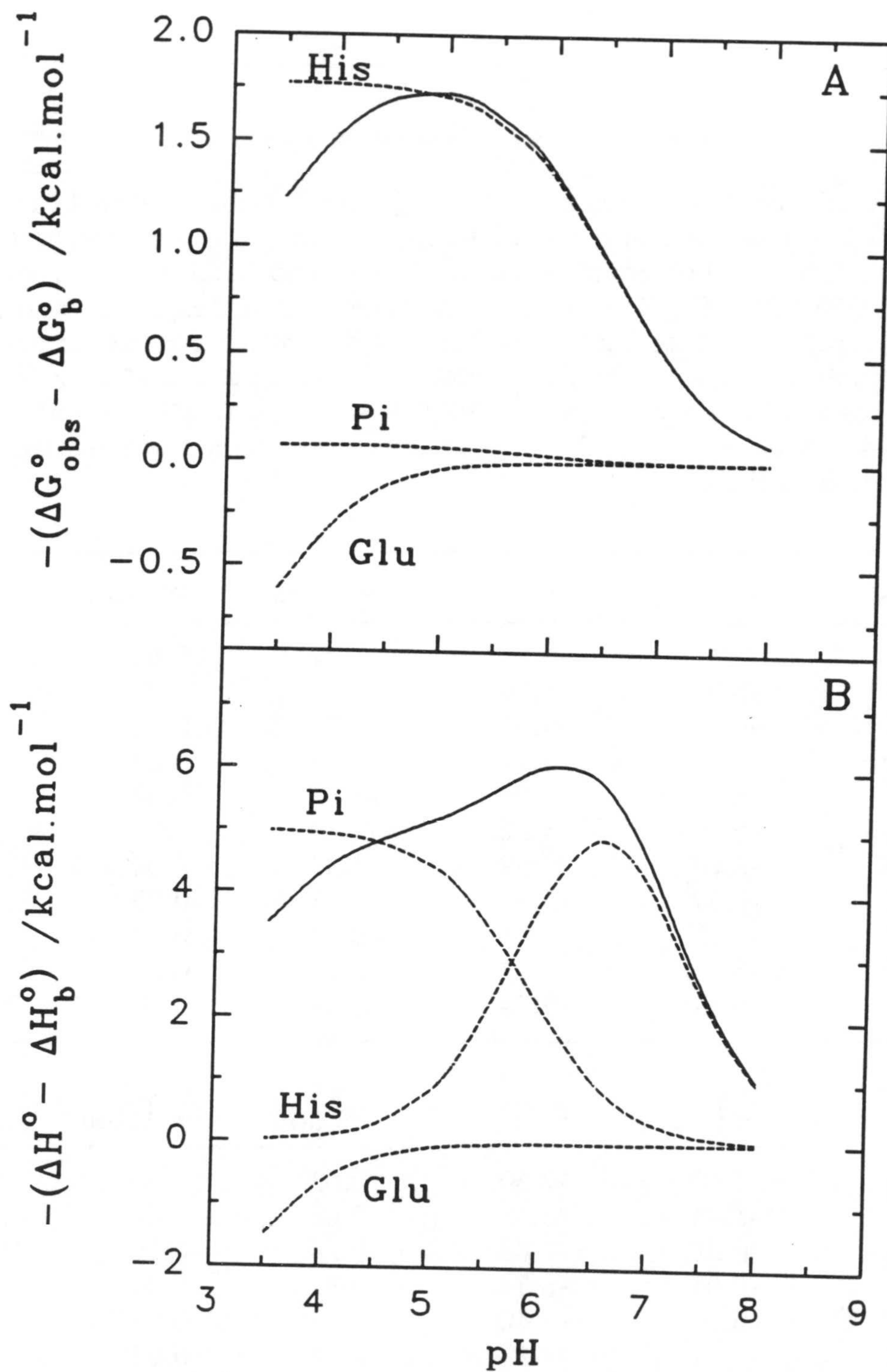


Figura 5-21: Contribución de la protonación/ionización de la His102, del Glu60 de la barnasa, y del fosfato de 3'GMP (líneas en trazo discontinuo) a la energía de Gibbs total observada (A) y a la entalpía total observada (B) en el intervalo de pH 3.5 - 8, a temperatura 25°C y fuerza iónica 50 mM. Datos calculados de acuerdo con las Ecuaciones (5.59) y (5.62), utilizando los parámetros de la Tabla 5-21.

$\Delta S_{b,His102}^{\circ}$) en la entropía de unión de 3'GMP a la barnasa en el caso hipotético de que la His102 esté protonada y no protonada vienen descritas por las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G_{a,His102}^{\circ} - \Delta G_{b,His102}^{\circ} = \Delta(\Delta G)_{His102}^{\circ} = 2.3RT(pK_{His102} - pK'_{His102}) \quad (5.64)$$

$$\Delta H_{a,His102}^{\circ} - \Delta H_{b,His102}^{\circ} = \Delta(\Delta H)_{His102}^{\circ} = \Delta H_{p,His102}^{\circ} - \Delta H'_{p,His102}^{\circ} \quad (5.65)$$

$$\Delta S_{a,His102}^{\circ} - \Delta S_{b,His102}^{\circ} = \Delta(\Delta S)_{His102}^{\circ} = \frac{\Delta(\Delta H)_{His102}^{\circ} - \Delta(\Delta G)_{His102}^{\circ}}{T} \quad (5.66)$$

obteniéndose los valores -1.8 ± 0.4 kcal/mol, 0 ± 1.2 kcal/mol y $+14 \pm 5$ u.e para la energía de Gibbs, la entalpía y la entropía respectivamente. Meiering et al. (1991) han encontrado una diferencia de -1.9 kcal/mol a pH 4.5 en la energía de Gibbs de unión del fosfato a la barnasa y a la barnasa con la His102 cambiada por una alanina, H102-Ala. Nosotros hemos encontrado también en el estudio de los mutantes (Apartado 5.4.3) que, a pH 4.5, la contribución total de la His102 a la energía de Gibbs de la estabilidad del complejo se evalúa en -1.65 ± 0.08 kcal/mol (Tabla 5-13). Entonces, parece que la totalidad de la interacción de la His102 tiene lugar con el fosfato, que la presencia de la guanosina no afecta significativamente a la magnitud de la interacción entre el fosfato y la His102, y que, como a pH 4.5 todas las histidinas están protonadas, casi la totalidad de esta interacción es de tipo electrostático. El valor 0 de $\Delta(\Delta H)_{His102}^{\circ}$ encontrado y el de $\Delta(\Delta S)_{His102}^{\circ}$ estimado en $+14 \pm 5$ u.e son valores razonables y conformes con el hecho de que las interacciones electrostáticas son entrópicamente conducidas (Kauzmann, 1959). El valor de $\Delta(\Delta H)_{His102}^{\circ}$ es consistente también, y dentro de los límites de error, con la diferencia de -1.6 ± 0.5 kcal/mol obtenida entre la entalpía de unión de 3'GMP a la barnasa y a la His102-Ala (Tabla 5-13).

Para el segundo grupo OH del fosfato, no se ha encontrado una variación apreciable en su pK en el complejo. Esto significa que el mismo interacciona con la barnasa con la misma energía; independientemente de su estado de ionización, $\Delta(\Delta G)_{Pi}^{\circ} = -0.1 \pm 0.2$. Esta independencia es quizás debida a la compensación de la interacción que forma la His102 con el primer grupo OH del fosfato a pH ácido por otra interacción de la misma magnitud a pH básico entre el segundo grupo OH del fosfato y los grupos de la proteína que están aún

cargados positivamente como la Lis27 y las argininas 87 y 83. Esto nos llevaría a suponer que el fosfato se encuentra más probablemente mucho más cerca de la His102 que de la Lis27 o de las dos argininas 87 y 83 en el complejo, ya que las interacciones electrostáticas son inversamente proporcionales al cuadrado de la distancia entre los átomos. $\Delta(\Delta H)_{P_i}^\circ$ y $\Delta(\Delta S)_{P_i}^\circ$ se estiman en 5 kcal/mol y 25 u.e respectivamente.

En el caso del glutamato, hay una disminución en su pK de 3.9 a 2.9 en el complejo, lo cual indica que la forma protonada del grupo carboxílico del mismo interacciona menos favorablemente que la forma ionizada, con una diferencia de 1.3 ± 0.3 kcal/mol. La estructura cristalina del complejo barnasa-3'GMP ha mostrado que el anillo de la guanina interacciona con el Glu60 del "loop" de reconocimiento a través de dos puentes de hidrógeno (ver Figura 5-3). Como en el rango de pH estudiado, ninguno de los tres grupos ionizables de la guanosina (Figura 5-2) puede tener una carga positiva para formar una interacción electrostática con el grupo carboxilato del Glu60, el aumento de la energía de interacción del glutamato cuando está ionizado no es debida a la formación de interacciones electrostáticas, si no más bien es debida probablemente a la formación de un nuevo puente de hidrógeno o a la sustitución de uno por otro más energético. La diferencia en la entalpía de unión entre la forma protonada y ionizada del glutamato se estima en -6 ± 3 kcal/mol, y en la entropía en -16 ± 11 u.e, que son valores razonables y conformes con el hecho de que las interacciones mediante puentes de hidrógeno se favorecen más por efectos entálpicos que entrópicos, es decir $\Delta H^\circ < 0$ y $\Delta S^\circ < 0$, (Kreshbeck y Scheraga, 1965; Gill y Noll, 1972).

Como se puede comprobar en la Tabla 5-21, tanto a pH ácido como básico, hay un aumento en la entropía intrínseca de unión de 3'GMP a la barnasa, lo cual muestra que las interacciones de tipo electrostático son importantes en la unión. Los valores positivos de esta entropía son pequeños lo cual significa que las interacciones mediante puentes de hidrógeno que puede formar los residuos del "loop" de reconocimiento con la base (Meiering et al., 1993, ver Figura 5-3) no son de menor importancia, pero predominan las de tipo electrostático. Este predominio es el resultado de la interacción del fosfato cargado negativamente con la His102, la Lis27 y las argininas 87 y 83 cargadas positivamente (Meiering et al., 1991; Mossakowska et al., 1989). Se puede comprobar también, en la misma Tabla 5-21, que la reacción está más favorecida, cuando los tres grupos están protonados que cuando no lo están, solamente por unas 0.4 kcal/mol, que es menor que el

valor 5 kcal/mol encontrado en la unión de 3'CMP a la ribonucleasa A (Flogel y Biltonen, 1975). Esta gran diferencia en el comportamiento de las dos proteínas se debe a que, en la ribonucleasa A, se han considerado tres histidinas que forman interacciones electrostáticas solamente a pH ácido con el fosfato; sin embargo, en el caso de la barnasa, la protonación del Glu60 desfavorece la unión de 3'GMP de un lado, y de otro lado, a pH básico, el fosfato sigue formando interacciones electrostáticas con los grupos cargados positivamente como la Lis27 y las argininas 87 y 83.

5.4.5 Interacción Calorimétrica de la Guanosina y el Fosfato con la Barnasa.

Con el fin de estudiar la importancia relativa de las dos partes del ligando, el fosfato de un lado y la guanosina del otro lado, en la unión de 3'GMP a la barnasa, y también, para comprobar la correcta asignación de los pK' en el complejo del Glu60 y del fosfato en el estudio anterior de la interacción barnasa-3'GMP a diferentes pH (ver Tabla 5-21) (ya que no es posible la asignación de los pK' a partir de las ecuaciones utilizadas en los análisis) se estudiaron las reacciones de la barnasa tanto con el fosfato como con la guanosina. Al principio se pensó extender el estudio de las dos reacciones a un amplio intervalo de pH igual que se hizo con el 3'GMP, pero, debido a que tanto la unión del fosfato como de la de la guanosina son muy débiles, como veremos, nos hemos limitado solamente a dos pH: 4.5, 3.5 para la guanosina, y 4.5, 5.7 para el fosfato. El primer pH de 4.5 se ha elegido porque de un lado la interacción de la barnasa con la base del 3'GMP a través del Glu60 se favorece cuando el glutamato está ionizado, y de otro lado la His102 está protonada y consiguientemente interacciona más fuertemente con el fosfato. Así se estudiarían estas dos reacciones en las condiciones más favorables para la medida de las señales en el calorímetro. Además, y desde el punto de vista comparativo, en la literatura hay solamente datos de la unión del fosfato a pH 4.5. Los segundos pH de cada sistema han sido elegidos de manera que, a partir de la comparación de los parámetros termodinámicos a pH 4.5 y 3.5 para la guanosina y a pH 4.5 y 5.7 para el fosfato, se pueda comprobar la asignación correcta de los pK', teniendo en cuenta siempre del factor limitante de la sensibilidad del calorímetro así como de la disponibilidad de suficientes muestras de la barnasa.

Interacción barnasa-guanosina:

Los calores medidos en la valoración calorimétrica de la guanosina con barnasa a pH 4.5, así como el análisis de los mismos al modelo de n sitios independientes e idénticos, se muestran en la Figura 5-22A. Como se puede comprobar, la reacción es débil y los calores de las primeras inyecciones han sido solamente diez veces más grandes que la sensibilidad del calorímetro, y por consiguiente, no soportaban la libertad de los tres parámetros (n , K_{obs} , y $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$) en el ajuste. En el análisis, se ha supuesto que solamente una molécula de guanosina se une a la barnasa, y los otros dos parámetros que mejor han representado a los datos han sido: $k_{\text{obs}} = 260 \pm 70 \text{ M}^{-1}$ y $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ} = -4.5 \pm 0.8 \text{ kcal/mol}$. El resultado del otro experimento a pH 3.5 se expone, junto con el de pH 4.5, en la Tabla 5-23.

Tabla 5-23

Parámetros termodinámicos de la unión de la guanosina a la barnasa a pH 3.5 y 4.5, temperatura 25°C y fuerza iónica 50 mM. En estos valores no influye la protonación del tampón debido a los pequeños calores molares de protonación del acetato y del formiato. Los valores están en kcal/mol.

pH	$\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$	$\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$	$T\Delta S_{\text{obs}}^{\circ}$
3.5	-3.1 ± 0.2	-5 ± 2	-1.9 ± 2
4.5	-3.3 ± 0.2	-4.5 ± 0.8	-1.2 ± 1

No tenemos evidencia de que n sea igual a 1 y los datos pueden ajustarse igual de bien con n diferente de 1. Si la estequiometría de unión de 3'GMP es 1:1, y la del fosfato es también 1:1 (Meiering et al., 1991), no significa que necesariamente la de la guanosina sea 1:1 también. Day et al. (1992) han mostrado que la barnasa tiene más de un sitio de interacción con las bases y con los fosfatos de los sustratos largos, pero, solamente corta después de una guanina en los dinucleótidos, a la cual reserva un sitio primario. Entonces, si la barnasa tiene más de un sitio para la unión de la guanina, podemos suponer que, a bajas concentraciones de guanina, se satura preferentemente el sitio primario de alta afinidad y la contribución de los otros sitios es insignificante. Hay que decir que el análisis de los datos considerando que n es diferente de 1 sólo afectaría significativamente a K_{obs} y no a $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$.

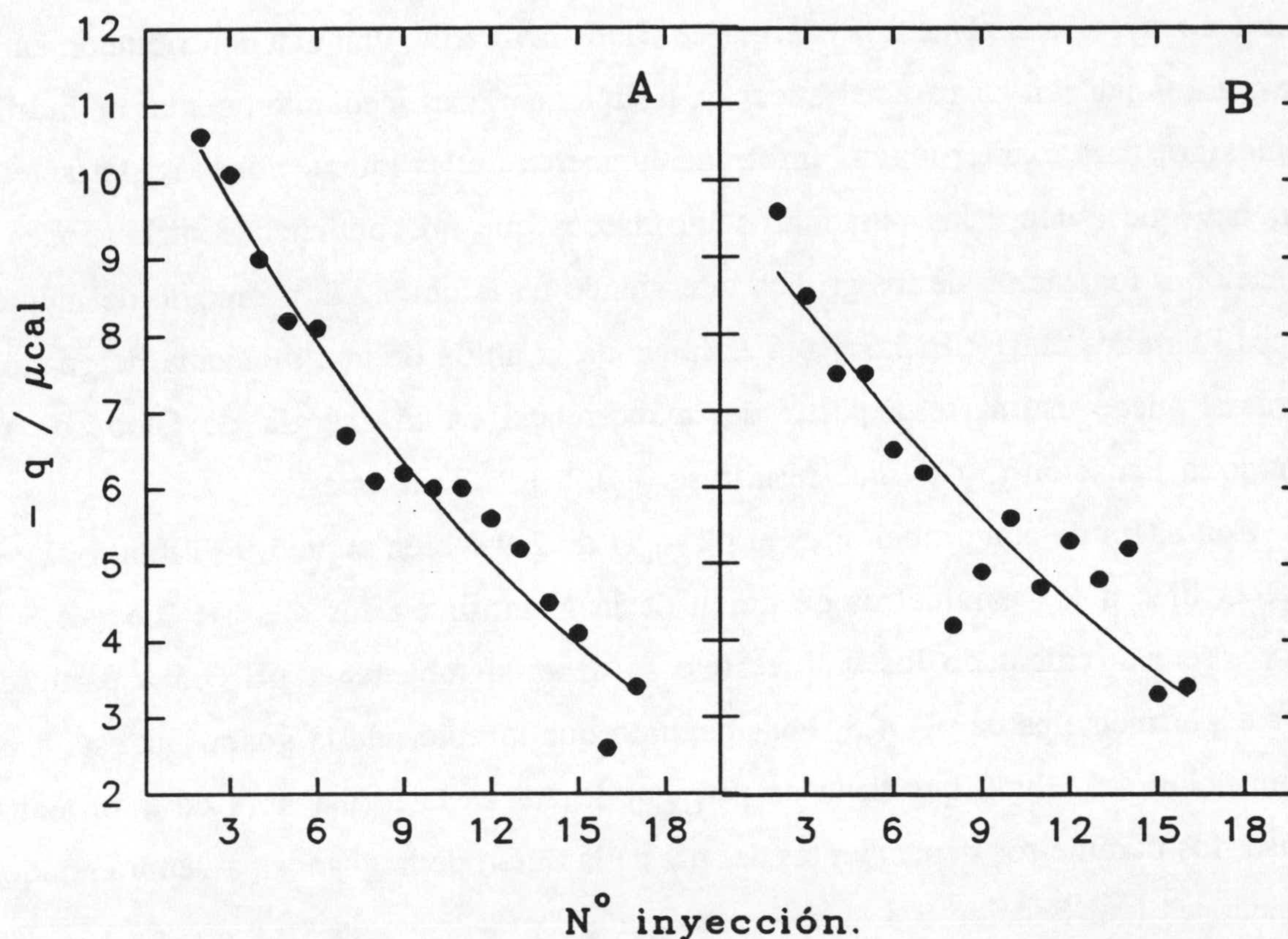


Figura 5-22: A. Calores medidos en la valoración de la guanosina 2.78 mM con inyecciones de 10 μl de la barnasa 0.603 mM, en AcK 50 mM pH 4.5 y $T = 25^\circ\text{C}$. Los calores se han corregidos por el calor de dilución de la barnasa (1.2 μcal) y el calor de agitación (-1.1 μcal). La línea continua representa el mejor ajuste de los datos de acuerdo con el modelo de 1 sitio de unión, y los parámetros obtenidos a partir del ajuste han sido $\Delta H_{\text{obs}}^\circ = -4.5 \pm 0.8 \text{ kcal/mol}$ y $k_{\text{obs}} = 260 \pm 70 \text{ M}^{-1}$. La desviación estándar del ajuste es 0.5 μcal . B. Calores medidos en la valoración del fosfato 1.93 mM con inyecciones de 10 μl de la barnasa 0.676 mM, en AcK 50 mM pH 4.5 y $T = 25^\circ\text{C}$. Los calores han sido corregidos por el calor de dilución de la barnasa (1.2 μcal) y el calor de agitación (-0.2 μcal). La línea continua representa el mejor ajuste de los datos de acuerdo con el modelo de 1 sitio de unión, y los parámetros obtenidos a partir del ajuste han sido $\Delta H_{\text{obs}}^\circ = -2.6 \pm 1 \text{ kcal/mol}$ y $k_{\text{obs}} = 650 \pm 250 \text{ M}^{-1}$. La desviación estándar del ajuste es 0.8 μcal .

A partir de los valores de la Tabla 5-23, y a primera vista, parece que la entalpía contribuye mayoritariamente a la energía de Gibbs favorable, con una contribución entrópica desfavorable, que son las características de las interacciones mediante puentes de hidrógeno. Sin embargo, para extraer alguna información acerca de las interacciones importantes en la unión, hay que obtener los parámetros intrínsecos que no contienen contribuciones de la protonación o ionización de los grupos interviniendo en la unión. El promedio del número de protones liberados entre pH 3.5 y 4.5 después de la unión de una molécula de guanosina a la barnasa puede estimarse a partir de la diferencia en la energía de Gibbs de unión, utilizando la Ecuación (5.41), que resulta ser -0.2 ± 0.3 protones.

Con el fin de comprobar si es el pK'_{Glu60} de 2.9 o bien el de 5.9 (Tabla 5-21) el que representa bien a los parámetros de unión de la guanosina a los dos pH 3.5 y 4.5 (tabla anterior), se han calculado los valores que se deberían obtener a pH 3.5 a partir de los valores experimentales de pH 4.5, considerando que la unión de la guanosina está asociada a la ionización del Glu60 que tiene un pK_{Glu60} de 3.9 en la forma libre de la proteína. En este caso, los parámetros dependientes del pH de la unión de la guanosina vendrán dados por las ecuaciones (ver Sección 5.4.4 para más detalle):

$$\Delta G_{obs}^o = \Delta G_a^o + RTLn \frac{1+10^{pH-pK_{\text{Glu60}}}}{1+10^{pH-pK'_{\text{Glu60}}}} \quad (5.67)$$

$$\Delta H_{obs}^o = \Delta H_a^o + \frac{\Delta H_{p,\text{Glu60}}^o}{1+10^{pK_{\text{Glu60}}-pH}} - \frac{\Delta H'_{p,\text{Glu60}}^o}{1+10^{pK'_{\text{Glu60}}-pH}} \quad (5.68)$$

en donde el subíndice *a* se refiere a los parámetros correspondientes a la unión de la guanosina cuando el Glu60 está protonado tanto en la forma libre de la proteína como en el complejo. Los parámetros termodinámicos calculados así a pH 3.5 a partir de los observados a pH 4.5, aplicando las ecuaciones anteriores, para los dos casos posibles de pK'_{Glu60} igual a 2.9 y 5.9 se dan en la Tabla 5-24. A partir de esta tabla, y dentro de los intervalos de errores, parece que ΔG_{obs} de -3.1 ± 0.2 kcal/mol a pH 3.5 (Tabla 5-23) está más de acuerdo con el valor calculado asignando un pK' de 2.9 para el glutamato en el complejo que asignando el otro valor de 5.9, por lo cual nuestra asignación de los pK' del glutamato y del fosfato en el estudio anterior de la interacción barnasa-3'GMP sería correcta. Esto se

Tabla 5-24

Valores (en kcal/mol) calculados a pH 3.5 a partir de los valores medidos a pH 4.5 (Tabla 5-23) para la interacción de la guanosina con la barnasa, suponiendo la participación de un grupo ionizable, el Glu60, cuyos parámetros de protonación se dan en la Tabla 5-21.

pK'_{Glu60}	$\Delta G_{\text{cal}}^{\circ} (3.5)$	$\Delta H_{\text{cal}}^{\circ} (3.5)$
2.9	-2.8 ± 0.3	-3.3 ± 2
5.9	-4 ± 0.55	-4.3 ± 3

Los errores han sido calculados por el método de propagación de los errores (consistiendo en la diferenciación de las Ecuaciones (5.67) y (5.68)) de pK_{Glu60} , pK'_{Glu60} , $\Delta H_{p,\text{Glu60}}^{\circ}$, $\Delta H'_{p,\text{Glu60}}^{\circ}$, que se dan en la Tabla 5-21, y de los errores de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}(4.5)$ y $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}(4.5)$ que se dan en la Tabla 5-23.

confirmará también en el estudio de la interacción barnasa-fosfato la sección siguiente.

Si suponemos que los parámetros termodinámicos de ionización del Glu60 en el complejo barnasa-guanosina son los mismos que en el complejo barnasa-3'GMP (Tabla 5-21), y que no hay, ni cambios conformacionales significativos, ni cambios en los estados de agregación de ninguno de los reactivos, podemos calcular los parámetros intrínsecos de la unión de la guanosina a partir de la corrección solamente por la ionización del Glu60, como se expone en la Tabla 5-25.

Tabla 5-25

Parámetros termodinámicos intrínsecos correspondientes a la unión de la guanosina a la barnasa cuando el Glu60 está protonado tanto antes de la reacción como después.

pH	ΔG_a° kcal/mol	ΔH_a°	ΔS_a° u.e
3.5	-2.4 ± 0.4	-1 ± 5	13 ± 18
4.5	-2.0 ± 0.4	1 ± 4	18 ± 15
media:	-2.2 ± 0.2	0 ± 5	16 ± 16

Esta claro que hay una buena correlación entre los parámetros intrínsecos calculados a partir de los dos pH, lo cual indica que los parámetros de ionización del Glu60 en presencia de la guanosina no difieren significamente de los parámetros en presencia de 3'GMP. Los errores grandes obtenidos en ΔH_a° y ΔS_a° dificultan la obtención de una información precisa sobre las fuerzas moleculares de la interacción de la guanosina, pero, parece que la reacción está conducida por efectos entrópicos ($\Delta S^\circ > 0$ y $\Delta H^\circ \approx 0$) que pueden reflejar las características de interacciones hidrofóbicas (Kauzmann, 1959). En la estructura cristalina de la barnasa-3'GMP (Guillet et al., 1993a), se ha encontrado que la fenilalanina 56 forma interacciones hidrofóbicas con la base de 3'GMP, por lo cual, nuestros datos termodinámicos concuerdan con esta información estructural, y parece que estas interacciones hidrofóbicas son tan importantes como las interacciones mediante puentes de hidrógeno en la unión de la guanosina a la barnasa.

Interacción barnasa-fosfato:

En la Figura 5-22B, se da una curva de valoración calorimétrica del fosfato con barnasa así como el análisis de la misma de acuerdo con el modelo de n sitios independientes e idénticos. Al igual que la reacción de la barnasa con la guanosina, los calores obtenidos han sido bajos como se puede ver en la misma figura. A pesar de ello, los datos se ajustan bien teniendo en cuenta de la pequeña desviación estándar obtenida en el ajuste de $0.8 \mu\text{cal}$. Las entalpías y las constantes de equilibrio de asociación encontradas a pH 4.5 y 5.7 han sido -2.6 ± 1 , $-3.4 \pm 1.2 \text{ kcal/mol}$ y 650 ± 250 , $380 \pm 160 \text{ M}^{-1}$ respectivamente. Esta vez también, hemos tenido que fijar el número de sitios en 1 (Meiering et al., 1991). La barnasa puede tener varios sitios no específicos para la unión de ligandos con baja afinidad (Day et al., 1992), pero, a bajas concentraciones del fosfato, que es nuestro caso, hay preferencia para la unión al sitio específico del fosfato que tiene una alta afinidad en comparación con los sitios no específicos (Meiering et al., 1991). El valor de la constante de equilibrio a pH 4.5 no difiere del valor 750 M^{-1} medido tanto por inhibición de la transesterificación del dinucleótido GpC como por desnaturalización del complejo barnasa-fosfato en presencia de urea, a la misma temperatura, pero a fuerza iónica un poco más baja: 30 mM, (Meiering et al., 1991). Los parámetros termodinámicos obtenidos a los dos pH se exponen en la Tabla 5-26.

Tabla 5-26

Parámetros termodinámicos de la unión del fosfato a la barnasa a 25°C y fuerza iónica 50 mM. En estos valores no influye la ionización del tampón debido al pequeño calor molar de ionización del acetato. Valores en kcal/mol.

pH	$\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$	$\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$	$T\Delta S_{\text{obs}}^{\circ}$
4.5	-3.8 ± 0.2	-2.6 ± 1	$+1.2 \pm 1.2$
5.7	-3.5 ± 0.2	-3.4 ± 1.2	$+0.1 \pm 1.4$

A partir de los datos de la Tabla 5-26 se puede estimar, a partir de la variación de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ con el pH, Ecuación (5.41), un promedio del número de protones unidos entre pH 4.5 y 5.7 de 0.2 ± 0.2 cuando se une una molécula de fosfato a la barnasa. Para el primer análisis, se ve que la reacción está largamente favorecida por los efectos entálpicos, y que a medida que aumenta el pH, la contribución entrópica disminuye a favor de un aumento en la entalpía. Es decir que hay una especie de compensación entropía - entalpía, fenómeno que se observa en la mayoría de reacciones (Lumry y Rujender, 1970). Como las interacciones mediante puentes de hidrógeno se caracterizan generalmente por pérdida de entropía y con una entalpía favorable negativa (Kauzmann, 1959), parece entonces como si hubiera un aumento en los puentes de hidrógeno cuando el fosfato está ionizado que cuando está protonado. Este tipo de interacciones es importante en la estabilización del complejo barnasa-3'GMP (Guillet et al., 1993a; ver también Figura 5-3). Es posible también que a medida que aumenta el pH la His102 está menos protonada y consiguientemente hay una disminución en la contribución de las interacciones electrostáticas que forma el fosfato mayoritariamente con la misma.

Sin embargo, los parámetros termodinámicos observados contienen también la contribución de la protonación de los grupos que intervienen en la unión, y fundamentalmente la His102 y el segundo grupo OH del fosfato, y consiguientemente la determinación de los parámetros intrínsecos será más informativa. De la misma manera que se hizo en la sección anterior con la reacción barnasa-guanosina, se ha intentado ver cual es el pK'_{p_i} de 2.9 ó 5.9 del fosfato en el complejo que interpreta mejor a los parámetros observados a los dos pH. Si suponemos que la reacción del fosfato con la barnasa está asociada a la ionización de la

histidina 102 y del fosfato, con los mismos parámetros que se obtuvieron en la unión de 3'GMP a la barnasa (Tabla 5-21), podemos calcular los valores de los parámetros termodinámicos de la interacción del fosfato a pH 5.7, por ejemplo, a partir de los valores experimentales de pH 4.5 (utilizando ecuaciones similares a (5.67) y (5.68) que recogemos en la Tabla 5-27.

Tabla 5-27

Valores calculados a pH 5.7 a partir de los valores medidos a pH 4.5 (Tabla 5-26) para la interacción del fosfato con la barnasa, suponiendo la participación de dos grupos ionizables: la His102 y el fosfato, cuyos parámetros termodinámicos de protonación se dan en la Tabla 5-21.

pK'_{Pi}	ΔG_{cal}° (5.7)	ΔH_{cal}° (5.7) kcal/mol
2.9	-4.9 ± 0.6	-5 ± 3
5.9	-3.5 ± 0.4	-3.3 ± 2

Los errores han sido calculados por el método de propagación de los errores de pK_{His102} , pK'_{His102} , $\Delta H_{p,His102}^{\circ}$, $\Delta H'_{p,His102}^{\circ}$, pK'_{Pi} , y $\Delta H'_{p,Pi}^{\circ}$ que se dan en la Tabla 5-21, y de los errores de $\Delta G_{obs}^{\circ}(4.5)$ y $\Delta H_{obs}^{\circ}(4.5)$.

Esta vez, con el fosfato, está más claro que con la guanosina que el valor experimental de ΔG_{obs}° a pH 5.7 de -3.5 kcal/mol concuerda con el calculado suponiendo el pK'_{Pi} de 5.9 y no de 2.9, con lo que, se comprueba de nuevo que la asignación de los pK' del fosfato y el glutamato de la Tabla 5-21 es correcta. Si suponemos que no hay diferencia apreciable en los parámetros termodinámicos de la ionización de la His102 y del fosfato en el complejo con 3'GMP y con el fosfato sólo, podemos calcular los parámetros intrínsecos de la unión del fosfato a partir de los observados a los dos pH, después de su corrección por la protonación de la His102 y del fosfato, que se suman en la Tabla 5-28. A partir de estos datos, se ve claramente que hay una buena correlación entre los parámetros obtenidos a los dos pH, lo que muestra que los parámetros de ionización de la His102 y del fosfato en el complejo barnasa-3'GMP son bien aplicables al complejo barnasa-fosfato. De otra parte, la entropía positiva indica que la reacción está dominada por las interacciones electrostáticas frente a los puentes de hidrógeno.

Tabla 5-28

Parámetros termodinámicos intrínsecos correspondientes a la unión del fosfato a la barnasa con todos los grupos protonados tanto antes de la reacción como después.

pH	ΔG_a° kcal/mol	ΔH_a°	ΔS_a° u.e
4.5	-3.8 ± 0.2	-2.5 ± 1	12 ± 4
5.7	-3.8 ± 0.4	-2.6 ± 2	12 ± 8
media:	-3.8 ± 0.3	-2.6 ± 1.5	12 ± 6

Comparación de la interacción de 3'GMP-barnasa con la del fosfato-barnasa y guanosina-barnasa:

Con el fin de poder extraer alguna información termodinámica a partir de la comparación de los parámetros de 3'GMP de un lado y los de la guanosina y el fosfato de otro lado, se necesita conocer los parámetros intrínsecos que, como se dijo anteriormente, son el resultado de solamente dos fenómenos consecutivos: el cambio en la solvatación de los reactivos, y después la interacción entre ellos mediante los diferentes tipos de fuerzas moleculares (Eftink y Biltonen, 1980). Si suponemos que no hay ni cambios conformacionales significativos, ni tampoco cambios en los estados de agregación para los tres sistemas, tenemos que corregir los valores observados por solamente la protonación o ionización de los grupos que intervienen en la unión para obtener estos parámetros intrínsecos. Esto ha sido aplicado en los apartados anteriores a las tres reacciones y los valores obtenidos se exponen juntos en la Tabla 5-29, a efectos de comparación.

A partir de la Tabla 5-29 podemos ver que la unión de 3'GMP es menos favorable en 2.1 kcal/mol que la suma de la unión de la guanosina y del fosfato. El mismo valor se ha observado en la unión de 3'CMP a la ribonucleasa A, en las mismas condiciones experimentales que las nuestras (Eftinck y Biltonen, 1980). El problema de la unión de una molécula A-B y de sus partes A y B ha sido bien discutido por Jencks (1981) en donde sugiere que la unión de A-B es la suma de la unión "intrínseca" de A y B y de otro término adicional ΔG^s correspondiente a la energía de conexión. El término "intrínseco" utilizado

Tabla 5-29

Parámetros intrínsecos de unión de 3'GMP, guanosina, y el fosfato a la barnasa a 25°C y fuerza iónica 50 mM. Valores obtenidos a partir de los observados después de su corrección por la protonación/ionización de la His102, del Glu60, y del fosfato, como se describió en los apartados anteriores.

Complejo	ΔG_a° kcal/mol*	ΔH_a° kcal/mol	ΔS_a° cal/K.mol*
barnasa-3'GMP	-8.7 ± 0.3	-6.4 ± 3	$+8 \pm 11$
barnasa-guanosina	-4.6 ± 0.2	0 ± 5	$+16 \pm 16$
barnasa-fosfato	-6.2 ± 0.3	-2.6 ± 1.5	$+12 \pm 6$

* Valores expresados en fracción molar, corresponden a los valores en el estado estándar de 1 mol/l más -2.4 kcal/mol en el caso de la energía de Gibbs y 8 cal/K.mol en el caso de la entropía (Kauzmann, 1959).

por Jencks (1981) corresponde a la unión ideal en la que no hay pérdida de entropía, y la mayor contribución a ΔG^s es por consiguiente de origen entrópico correspondiente a la pérdida de la entropía translacional y rotacional. Puede incluir también cualquier energía debida a los efectos estéricos que son diferentes en la unión de A-B de un lado y A y B del otro lado. Entonces la presencia de un nuevo enlace covalente en A-B puede hacer que la unión de A-B es menos favorable debido a la pérdida de entropía rotacional en el mismo, y también puede hacer que la macromolécula esté más rígida debido a la pérdida de entropía interna de la misma (Eftinck y Biltonen, 1981). En nuestro caso, y teniendo en cuenta de los errores grandes, parece que hay pérdida de -20 cal/K.mol de entropía de más en la unión de 3'GMP que en la suma de la unión de la guanosina y el fosfato, que puede corresponder a la entropía rotacional perdida en el enlace entre la guanosina y el fosfato. La formación de una molécula A-B a partir de la combinación de A y B mediante un enlace covalente puede resultar en la pérdida de hasta -32 cal/K.mol de entropía (Jencks, 1981), por lo cual una parte de la misma aparecerá en la unión de A-B, debilitando su energía de interacción con respecto a la suma de A y B. Para la interacción de 3'CMP con la ribonucleasa A, la diferencia en la entropía de unión entre la reacción de 3'CMP y la suma de las reacciones de la citosina y del fosfato es -16 cal/K.mol (Eftinck y Biltonen, 1980), que es muy aproximable al valor de -20 cal/K.mol del caso de la unión de 3'GMP a la barnasa.

Parece que las fuerzas primarias en la unión de 3'GMP a la barnasa son de origen entálpico y entrópico, con más de 75% de contribución entálpica, lo cual pone en manifiesto la importancia de los puentes de hidrógeno observados en la estructura cristalina del complejo (Guillet et al., 1993a). Sin embargo, los parámetros de la unión de la guanosina y el fosfato muestran que en realidad la reacción de 3'GMP está conducida mayoritariamente por interacciones entrópicas. Estas últimas están representadas por las interacciones electrostáticas de la parte selectiva de la barnasa que une el fosfato a través de la His102 fundamentalmente, y las posibles interacciones hidrofóbicas de la parte específica con la base de la guanosina con el ciclo aromático de la fenilalanina 56, como se observó también en la estructura cristalina. No obstante hay que decir que los errores grandes en los parámetros termodinámicos de la unión de la guanosina (Tabla 5-29) no permiten sacar una información precisa sobre su interacción. Los puentes de hidrógeno entre la guanosina y el Glu60 son a lo mejor igual de importancia que las interacciones hidrofóbicas con la Phe56.

Por último, hay que notar que la constante de equilibrio intrínseca de unión de la guanosina es solamente 40 M^{-1} , que es un valor bajo para considerar que el sitio de unión de la guanosina sea muy específico; la barnasa también puede cortar después de una adenina en los ácidos ribonucleicos. No obstante, la unión de 3'GMP es más específica (la constante de asociación es mil veces mayor que la de la guanosina) debido principalmente a la selectividad en la unión del fosfato que es diez veces más fuerte que la de la guanosina. Estos resultados muestran, desde el punto de vista termodinámico, que la interacción más importante entre los sustratos, en general, y la barnasa, es la que tiene lugar con el grupo fosfato. Lo mismo se ha encontrado en la inhibición fuerte del barstar a la barnasa, que tiene lugar bloqueando el acceso del sustrato al sitio de unión del fosfato y no tiene gran efecto sobre las interacciones del "loop" de reconocimiento de la base (Guillet et al., 1993b).

5.5 RESUMEN Y CONCLUSIONES.

La interacción de la barnasa con su inhibidor 3'GMP se ha caracterizado mediante calorimetría isoterma de titulación, en diferentes condiciones experimentales de temperatura y pH. También se ha caracterizado la interacción con 3'GMP de algunos mutantes de la barnasa, en los cuales se han sustituido residuos importantes en la actividad catalítica con una alanina. Además se ha estudiado la interacción de la barnasa con las dos partes del ligando, guanosina y fosfato. Los datos calorimétricos se analizaron suponiendo que n moléculas de 3'GMP se unen a la barnasa, independientemente del estado de ionización del fosfato. El valor de n obtenido en todo los intervalos de pH y temperatura estudiados ha sido 1, que concuerda con los resultados de Sancho et al. (1992) en la unión de 3'GMP y de Meiering et al. (1991) en la unión del fosfato. En todos los experimentos, se ha encontrado que la energía de Gibbs de la reacción está compuesta por un término entálpico favorable al cual se opone un término entrópico desfavorable (ver Tablas 5-10, 5-13, 5-14, 5-23 y 5-26).

A partir de la variación de la entalpía de reacción con la temperatura, se ha encontrado que la unión de 3'GMP a la barnasa se acompaña con una pequeña variación en la capacidad calorífica de -60 cal/K.mol . Este valor indica que la reacción no se acompaña con un cambio conformacional significativo, lo que está de acuerdo con los datos estructurales de rayos X y RMN. El valor de ΔC_p° es negativo, el signo encontrado en la mayoría de interacciones macromolécula-ligando, e indica que la reacción a temperaturas altas tiene una entalpía cada vez más negativa. Este valor negativo también de ΔC_p° indica que la reacción está acoplada a cambios en la accesibilidad del disolvente a las superficies de contacto entre el ligando y la proteína, con un predominio del ΔC_p° debido a la disminución en la exposición de los grupos apolares al disolvente (efecto hidrofóbico). Estas superficies incluyen las apolares, casi 300 \AA^2 que contribuyen al ΔC_p° en -140 cal/K.mol , y las polares, casi 300 \AA^2 también contribuyendo en $+80 \text{ cal/K.mol}$. Esta deconvolución de ΔC_p° se hizo de acuerdo con las ecuaciones del modelo de Murphy et al. (1992).

Los parámetros termodinámicos obtenidos en la unión de 3'GMP a los mutantes, His102-Ala y Lis27-Ala, a pH 4.5 también muestran valores pequeños negativos de ΔC_p° ; -85 y -9 cal/K.mol respectivamente. A partir de estos valores parece entonces que es el residuo de la Lis27 el que contribuye mayoritariamente al valor negativo de ΔC_p° observado

en la unión de 3'GMP a la barnasa. Los parámetros termodinámicos de este residuo indican una interacción de tipo hidrofóbico con el ligando. La contribución positiva de la His102 al ΔC_p° total puede indicar que forma mayoritariamente interacciones electrostáticas con el ligando, lo que está de acuerdo con su carga positiva y la presencia de la carga negativa del fosfato. A partir de las diferencias entre la afinidad de unión a la barnasa y los mutantes, se calcularon las contribuciones de la His102 y la Lis27 en la estabilización del complejo que resultó ser 1.6 y 0.6 kcal/mol en la energía de Gibbs respectivamente, a 25°C, mostrando así la importancia de estos residuos en la actividad de la barnasa, y fundamentalmente la His102. Estos parámetros se estimaron también a temperaturas altas (Figura 5-17) y muestran que a medida que aumenta la temperatura aumenta también la contribución de los mismos a la energía de Gibbs de reacción.

La interacción de la barnasa con el 3'GMP se ha estudiado a diferentes pH, entre 3.5 y 8 y a temperatura 25°C. La constante de equilibrio obtenida a pH 6.3, por interpolación entre pH 6 y 6.5 (Tabla 5-14), aunque del mismo orden de magnitud, es casi cuatro veces más baja que la determinada por Sancho et al. (1991) por espectroscopía diferencial, lo que puede explicarse por la diferencia en la fuerza iónica entre nuestros experimentos y los suyos y por errores experimentales. La energía de Gibbs de interacción máxima se encontró sobre pH 5 (Figura 5-18) lo que está de acuerdo con el pH de máxima actividad de la barnasa en la hidrólisis de sustratos pequeños (Mossakowska et al., 1989). Este pH no es muy diferente del caso de la unión de varios nucleótidos con la ribonucleasa A, con energía de Gibbs máxima a pH 5.6 (Anderson et al., 1968) o a pH 5.4 para 3'CMP (Flogel y Biltonen, 1975a,b). No obstante, sobre pH 5 por ejemplo, la constante de unión de 3'GMP con la barnasa es un orden de magnitud más grande que la de 3'CMP con la ribonucleasa A, en las mismas condiciones experimentales (Flogel y Biltonen, 1975b).

Los parámetros termodinámicos obtenidos muestran una dependencia con el pH (Tabla 5-14) de los ΔG_{obs}° y ΔH_{obs}° , variando hasta en 1.7 y 5 kcal/mol respectivamente al cambiar aquel. Esta dependencia con el pH se interpretó como el resultado de la asociación de la reacción a la ionización de algunos grupos tanto en la proteína como en el ligando, cuyos estados de ionización son diferentes en los reactivos libres y en el complejo, es decir que tienen diferentes pK en la forma libre y en la forma complejada. Estos cambios en los estados de ionización se reflejan por una liberación de protones por debajo de pH 5 y una absorción

de protones por encima de pH 5, con un máximo de absorción de un promedio de ≈ 0.6 protones sobre pH 6.5 (Figura 5-9).

En el modelo que se ha propuesto para interpretar esta dependencia con el pH, se han considerado dos grupos ionizables de la proteína, la histidina 102 y un grupo carboxílico, y un grupo del ligando, el segundo grupo OH del fosfato. El grupo carboxílico de la proteína, es posible que fuese el Glu73 o el Glu60, o bien un promedio de los dos; sin embargo, y por las razones que se han comentado anteriormente, pensamos que el candidato más favorable es el Glu60. Hay que decir que la elección de estos únicos grupos (His102, Glu60 y el fosfato) está basada en que los tres pertenecen al sitio de contacto entre los dos reactivos y tienen normalmente un pK dentro del intervalo de pH experimental. Los grupos ionizables no pertenecientes al sitio de contacto no han sido incluidos ya que no se han observado cambios conformacionales significativos en las estructuras cristalinas o en disolución del complejo en relación a la estructura tridimensional de la barnasa libre. Hay que decir que la consideración se basa también en que el 3'GMP se une al sitio activo de la barnasa, cuyos residuos están bien caracterizados en la bibliografía. En el modelo, se ha considerado que el estado de ionización de uno de estos grupos en el complejo es independiente de los estados de ionización de los demás. Por último hemos supuesto que no hay cambios conformacionales significativos inducidos por los cambios del pH. Aunque la reversibilidad de la valoración potenciométrica de la barnasa (Figura 5-6) no signifique que necesariamente no hay tales cambios, los valores normales para las entalpías de ionización determinados en la valoración calorimétrica de la barnasa con HCl en el intervalo de pH 3.54-7.52 apoyan dicha suposición.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, los parámetros termodinámicos medidos a los diferentes pH han sido interpretados considerando tres efectos: 1) El cambio en la solvatación de los dos reactivos y la formación después de los enlaces de interacción, que constituye la unión intrínseca como se ha definido por Eftink y Biltonen (1980); 2) La liberación o absorción de protones por los tres grupos; 3) Absorción o liberación de protones por el tampón del experimento (se ha considerado que todos los protones liberados o absorbidos por los reactivos han sido intercambiados solamente con el tampón, debido a su alta concentración con respecto a la de los reactivos). La validez del modelo se refleja bien en la buena representación de tanto los datos calorimétricos de $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ y $\Delta H_{\text{obs}}^{\circ}$ como los potenciométricos del intercambio protónico ΔN , ver Figura 5-20. Esto no significa que este

sea el único modelo que puede interpretar nuestros datos, pudiéndose aplicar modelos más complicados con más parámetros, pero carecemos de suficiente información para obtener resultados precisos.

Para poder aplicar adecuadamente las ecuaciones derivadas del modelo al análisis de los parámetros termodinámicos de la unión de 3'GMP a la barnasa, se han hecho tanto valoraciones calorimétricas como potenciométricas del ligando y la proteína para determinar los parámetros termodinámicos de la ionización de los tres grupos: His102, Glu60 y el fosfato. En estos experimentos, se ha encontrado que sólo 6 de los 13 grupos carboxílicos que se preve a partir de la estructura de la barnasa son valorables hasta pH 3.5. Lo más probable que los demás 7 grupos carboxílicos tienen pK por debajo de 2.5 por lo menos, que puede explicarse por la interacción que pueden estar formando con grupos cargados positivamente. La magnitud de esta interacción puede estimarse en más de 1.4 kcal/mol en la energía de Gibbs ($\Delta G^\circ = 2.3RT\Delta pK$). También, en la valoración potenciométrica de la barnasa, se ha encontrado la participación de un grupo de pK 8.4 no predecible por la estructura, que puede ser el efecto promedio de las 6 tirosinas que tiene la proteína si éstas tienen pK normal de 9.6, o bien puede atribuirse solamente a la tirosina 103 que está formando interacciones con grupos cargados positivamente. Para el pK de la His102, se ha encontrado que tanto los datos calorimétricos como potenciométricos se representan mejor con un pK de 5.9 que con el valor de 6.3, determinado por Sali et al. (1988) a fuerza iónica 20 mM, que es más baja que la de nuestros experimentos. El efecto de esta última no puede explicar esta diferencia en el pK ya que los grupos cargados positivamente se estabilizan más al aumentar la polaridad del medio y consiguientemente el pK tiene que aumentar. En la valoración calorimétrica de la barnasa, se ha obtenido una entalpía de protonación de -7.7 kcal/mol para la His102, que no es un valor anormal, lo mismo parece también para la His18, a pesar de que esta última tiene un pK anormal de 7.8. Para los calores de protonación del Glu60 y del fosfato se han encontrado valores cerca de cero.

Para determinar el intercambio protónico ΔN (número de protones intercambiados por el sistema con el medio después de la reacción) se realizaron valoraciones potenciométricas del ligando y la proteína solas y después del complejo ligando-proteína. Esta determinación se ha hecho con combinación de dos métodos: pH-stat y titulación diferencial, obteniéndose datos precisos (ver Figura 5-9) con un gasto pequeño de material, para todo el intervalo de

pH experimental.

La aplicación del modelo a nuestros datos nos ha permitido evaluar tanto los pK y las entalpías de protonación de los tres grupos (His102, Glu60, y el fosfato) en el complejo como los parámetros termodinámicos intrínsecos de la unión (independientes del pH). Estos se resumen en la Tabla 5-21. Se ha encontrado que mientras la His102 aumenta su pK en el complejo por 1.3 unidades, el del Glu60 disminuye por 1 unidad, y el del fosfato apenas cambia. Aunque la asignación de los pK' en el complejo no es deducible a partir de las ecuaciones del modelo, es razonable desde el punto de vista termodinámico esperar que el pK de la His102 aumente en el complejo, debido a la presencia del fosfato cargado negativamente, y por consiguiente el pK' de 7.2 ha sido asignado a la His102. Para el fosfato, podría esperarse que su pK disminuyese drásticamente debido a la concentración de cargas positivas en el sitio de unión formado por la His102, la Lis27 y las Arg87, 83, por lo que el pK' de 2.9 podría haberse asignado al fosfato en lugar del Glu60. Esta hipótesis se ha rechazado, ya que los parámetros termodinámicos de la interacción de la guanosina y del fosfato separadamente a dos pH distintos no pueden interpretarse por una disminución en el pK del fosfato y un aumento en el del glutamato (ver Sección 5.4.5). Además, los dos oxígenos del grupo carboxílico del Glu60 se encuentran en el complejo formando puentes de hidrógeno con la base, y como este tipo de enlaces aumenta la acidez del grupo aceptor (Laskowski y Sheraga, 1954) se ha asignado más bien el pK' de 2.9 al Glu60 que al fosfato.

Hay que decir que siempre ha habido problemas en saber cuál es la forma ionizada del fosfato que se une a las ribonucleasas. Si en los modelos de Hummel y Witzel (1966) y Anderson et al. (1968), se ha considerado que solamente las formas monoaniónicas del fosfato de varios nucleótidos se unen a la ribonucleasa, en el de Flogel y Biltonen (1975a,b), se ha considerado que sólo la forma dianiónica del fosfato del 3'CMP se une. Por lo tanto, ha habido siempre contradicciones en este tema y el mecanismo de unión del fosfato puede ser más complicado. En nuestro caso, hemos supuesto tanto en el análisis de los datos calorimétricos para la obtención de los parámetros termodinámicos como en el análisis de la dependencia de éstos con el pH que ambas formas ionizadas del fosfato pueden estar unirse a la barnasa.

El conocimiento de los parámetros relacionados con la ionización de los grupos en la forma libre y en el complejo nos permitió evaluar las contribuciones de los protones a los

parámetros termodinámicos observado en la unión de 3'GMP a la barnasa (Figura 5-21) y consiguientemente los parámetros termodinámicos intrínsecos de la reacción. Estos últimos se evaluaron en una energía de Gibbs de -6.3 y -5.9 kcal/mol cuando los tres grupos están protonados y no protonados respectivamente, y una entalpía de -6.4 y -7.1 kcal/mol en los dos casos también. La diferencia entre el pK y pK' de cada grupo refleja de una manera o otra la magnitud de la interacción que forma este grupo en el complejo, y que generalmente es de carácter electrostático si este grupo se encuentra en presencia de un grupo cargado. El valor de esta interacción puede estimarse usando las Ecuaciones (5.64), (5.65) y (5.66), que corresponde a casos hipotéticos en los cuales el grupo específico pasa de un estado protonado, tanto en la forma libre como en el complejo, a otro no protonado y sin cambios en los estados de ionización de los demás grupos. Para la His102, la forma protonada interacciona más favorablemente con $\Delta(\Delta G)_{\text{His102}} = 1.8$ kcal/mol que la forma no protonada, y al contrario, la forma protonada del Glu60 interacciona menos favorablemente en 1.3 kcal/mol que la forma ionizada. Sin embargo, la fuerza de interacción del fosfato es independiente de su estado de ionización. La magnitud de 1.8 kcal/mol de la His102 es prácticamente la misma que la que forma la His102 con el fosfato sólo (Meiering et al., 1991) o con 3'GMP (Tabla 5-13), a pH 4.5 en donde la His102 está totalmente protonada. Por lo cual se puede concluir que la interacción de la His102 con 3'GMP es prácticamente de origen electrostático, y precisamente con el fosfato. Para el Glu60, la disminución en la energía de Gibbs de su interacción cuando está protonado puede explicarse por la pérdida de entropía, debido a la formación de puentes de hidrógeno, que es largamente compensada por la entalpía favorable. Si la entalpía media de la formación de un puente de hidrógeno es de -2 kcal/mol (Kreshbeck y Sheraga, 1965; Gill y Noll, 1972), la magnitud de la diferencia de la entalpía de interacción del Glu60 a pH ácido y básico de -6 ± 3 kcal/mol observada corresponde a la formación por lo menos de 1 hasta 4 puentes de hidrógeno nuevos a pH ácido con respecto a pH básico. En todo caso, no pensamos que la disminución del pK del glutamato es debida a la estabilización de su carga negativa en presencia de una carga positiva del ligando, ya que el único grupo de este último que puede tener una carga positiva (NH^+ de pK = 2, ver Figura 5-2) se encuentra bastante lejos del Glu60 en la estructura cristalina del complejo (ver Figura 5-3) y no hay información de que interaccione directamente con él. Para el fosfato, $\Delta(\Delta G)_{\text{P}_i}$ es prácticamente cero, lo que puede hacer pensar que la ionización del fosfato, precisamente del

segundo grupo OH, no afecta a la energía de interacción de 3'GMP con la barnasa. Sin embargo $\Delta(\Delta H)_{P_i} = 5$ kcal/mol y $\Delta(\Delta S)_{P_i} = 25$ u.e significa que la forma ionizada del fosfato interacciona con una entalpía y una entropía más negativa que la forma protonada. Esto parece ser una característica de una interacción mediante puente de hidrógeno, cuando se esperaba una interacción electrostática entre el fosfato cargado negativamente y la His102, la Lis27, y la Arg87 cargadas positivamente. Sin embargo esto no es en contradicción con la naturaleza de las interacciones observadas en la estructura cristalina del complejo (Figura 5-3) en donde hay varios puentes de hidrógeno entre el fosfato y la proteína.

En todo caso, a partir de los valores de los pK', se puede decir que al pH 5 de máxima actividad catalítica de la barnasa, la His102, que actúa como el ácido general, está totalmente protonada en el complejo y el Glu60, que tiene un gran papel en la unión de la base del sustrato, se encuentra totalmente ionizado en el complejo. Sin embargo, el fosfato que es fundamental en la selección de los sustratos de la proteína, no es totalmente ionizado, mostrando la importancia de otras interacciones además de las electrostáticas en la unión del fosfato a este pH.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
4 ABR. 1994
COMISION DE DOCTORADO

Bibliografía.

- ** Alberty, R.A. (1969) *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 3899.
- ** Alvarez, J. y Biltonen, R. (1973) *Biopolymers* 12, 1815.
- ** Anderson, D.G., Hammes, G.G. y Walz, F.G. (1968) *Biochemistry* 1, 1637.
- ** Atha, D.H. y Ackers, G.K. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5845.
- ** Bains, G., Lee, R.T., Lee, Y.C. y Freire, E. (1992) *Biochemistry* 31, 12624.
- ** Baldwin, R.L. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 83, 8069.
- ** Barnhill, M.T.Jr. y Trowbridge, C.G. (1975) *J. Biol. Chem* 250, 5501.
- ** Barón, C., Gonzalez, J.F, Mateo, P.L. y Cortijo, M. (1989) *J. Biol. Chem* 264, 12872.
- ** Baudet, S. y Janin, J. (1991) *J. Mol. Biol.* 219, 123.
- ** Beaven, G.H., Holiday, E.R. y Johnson, E.H. (1955) en "*Nucleic Acids*" vol.1, p. 513, Chargaff, E. y Davidson, J.N., eds., Academic Press, Nueva York.
- ** Beres, L. y Sturtevant, J. M. (1971) *Biochemistry* 10, 2120.
- ** Bevington, P.R. (1969) en "*Data Reduction And Error Analysis For The Physical Sciences*" Ed. Mac Graw - Hill.
- ** Bieth, J. y Frechin, J-C. (1974) *Biochimica et Biophysica Acta* 364, 97.
- ** Biltonen, R.L. y Langerman, N. (1979) *Meth. Enzym.* 61, 287.
- ** Bjurulf, C., Laynez, J. y Wadso, I. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 47.
- ** Bjurulf, C. y Wadso, I. (1972) *Eur. J. biochem.* 31, 95.
- ** Blackburn, G.M. y Gait, M.J. (1990) en "*Nucleic Acids in Chemistry and Biology*" IRL Press at Oxford University Press.
- ** Bolen, D.W., Fogel, M. y Biltonen, R. (1971) *Biochemistry* 10, 4136.
- ** Brandts, J.F. y Lin, L-N. (1990) *Biochemistry* 29, 6927.
- ** Bunville, L.G. y Schwalbe, S.J. (1966) *Biochemistry* 5, 3521.
- ** Buzzell, A. y Sturtevant, J.M. (1951) *J. Am. Chem. Soc.* 73, 2454.
- ** Bycroft, M., Sheppard, R.N., Lau, F.T.-K. y Fersht, A.R. (1990a) *Biochemistry* 29, 7425.
- ** Bycroft, M., Matouschek, A., Kellis, J.T., Serrano, L. y Fersht, A.R. (1990b) *Nature*

- (London) 346, 488.
- ** Bycroft, M., Ludvigsen, S., Fersht, A.R. y Poulsen, F.M. (1991) *Biochemistry* 30, 8697.
- ** Calvet, E. y Prat, H. (1963) en "*Recent Progress en Microcalorimetry*" (translated by H.A. Skinner). Pergamon, Oxford.
- ** Chase, T. y Shaw, E. (1967) *Biochem. biophys. Res. Commun.* 29, 508.
- ** Christensen, J.J., Rytting, J.H. y Izatt, R.M. (1970) *Biochemistry* 9, 4907-4913.
- ** Christensen, J.J., Gardner, J.W., Eatough, D.J., Izatt, R.M., Watts, P.J. y Hart, R.M. (1973) *Rev. Sci. Instrum.* 44, 481.
- ** Christensen, J.J., Hansen, L.D. y Izatt, R.H. (1976) en "*Handbook of Proton Ionization Heats and Related Thermodynamic Quantities*" Wiley Interscience, N. Y.
- ** Clarke, J. y Fersht, A.R. (1993) *Biochemistry* 32, 4322.
- ** Connelly, P.R., Thomson, J.A., Fitzgibbon, J. y Bruzzese, F.J. (1993) *Biochemistry* 32, 5583.
- ** Day, A.G., Parsonage, D., Ebel, S., Brown, T. y Fersht, A.R. (1992) *Biochemistry* 31, 6390.
- ** Di Cera, E., Gill, S.J. y Wyman, J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5077.
- ** Dobry, A. y Sturtevant, J.M. (1952) *Arch. Biochem. Biophys.* 37, 252.
- ** Donner, J., Caruthers, M. y Gill, S.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14826.
- ** Edsall, J.T. (1935) *J. Am. Chem. Soc.* 57, 1506.
- ** Eftink, M. y Biltonen, R.L. (1980) en "*Biological Microcalorimetry*" (Ed. Beezer, A.E) p 343. Academic Press, New York.
- ** Engel, P.C. (1977) en "*Enzyme Kinetics*" Chapman y Hall, Londres.
- ** Epand, R.M., Segrest, J.P. y Ananthramaiah, G.M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20829.
- ** Fersht, A.R. (1985) en "*Enzyme Structure and Mechanism*" 2nd ed W.H. Freeman, New York.
- ** Fersht, A.R. (1988) *Biochemistry* 27, 1577.
- ** Fersht, A.R., Bycroft, M., Horovitz, A., Kellis, J.T., Matouschek, A. y Serrano, L. (1991) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 332, 171.
- ** Fisher, H.F., Subramanian, S., Stickel, D.C. y Colen, A.H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2509.
- ** Flogel, M. y Biltonen, R.L. (1975a) *Biochemistry* 14, 2603.

-
- ** Flogel, M. y Biltonen, R.L. (1975b) *Biochemistry* 14, 2610.
- ** Flogel, M., Albert, A. y Biltonen, R.L. (1975c) *Biochemistry* 14, 2616.
- ** Forrest, W.W. y Sturtevant, J.M. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* 82, 585.
- ** Freire, E., Mayorga, O.L. y Straume, M. (1990) *Anal. Chem.* 62, 950A.
- ** Freire, E. y Xie, D (1994), resultados no publicados todavía.
- ** Gill, S.J. y Noll, L. (1972) *J. Phys. Chem.* 76, 3065.
- ** Gill, S.J., Richey, B., Bishop, G. y Wyman, J. (1985) *Biophysical Chemistry* 21, 1.
- ** Gill, S.J. (1989) *Pure and Appl. Chem.* 61, 1009.
- ** Gill, S.J., Murphy, K.P. y Robert, C.H. (1990) *Journal of Chemical Education* 67, 928.
- ** Gucker, F.T.-Jr., Pickard, H.B. y Planck, R.W. (1940) *J. Amer. Chem. Soc.* 62, 459.
- ** Guillet, V., Laphorn, A. y Mauguén, Y. (1993a) *FEBS* 330, 137
- ** Guillet, V., Laphorn, A., Hartley, R.W. y Mauguén, Y. (1993b) *STRUCTURE* 1, 165.
- ** Gutfreund, H. (1975) en "*Enzymes: Physical Principles*" John Wiley and Sons.
- ** Handbook of Biochemistry, 2 edición (1970), CRC Press, Cleveland.
- ** Handbook of Chemistry and physics, 59 edición, (1978-1979), CRC Press, Florida.
- ** Hartley, R.W. y Barker, E.A. (1972) *Nature (London), New Biol.* 235, 15.
- ** Hartley, R.W. (1975) *Biochemistry* 14, 2367.
- ** Hartley, R.W. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3252.
- ** Hartley, R.W. (1980) *J. Mol. Evol.* 15, 355.
- ** Hartley, R.W. (1988) *J. Mol. Biol.* 202, 913.
- ** Hartley, R.W. (1993) *Biochemistry* 32, 5978.
- ** Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tischenko, G., polyacob, K. y Pavlovsky, S. (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8, 364.
- ** Hinz, H.-J, Shiao, D.D.F., Sturtevant, J.M. (1971) *Biochemistry* 10, 1347.
- ** Hinz, H.-J y Schmid, F. (1977) en: Sund H(ed) *Pyridine Nucleotide dependent dehydrogenases*. De Gruyter, Berlin, pp 292-306.
- ** Hinz, H.-J. (1983) *Ann. Rev. Biophysics* 12, 285.
- ** Hofmann, G.E., Knier, B.L. y Allewell, N.M. (1979) *Biophysical Chemistry* 10, 47.
- ** Horovitz, A., Serrano, L. y Fersht, A.R. (1991) *J. Mol. Biol.* 219, 5.
- ** Horovitz, A., Matthews, J. M. y Fersht, A.R. (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 560.
- ** Huber, A.H., Kelley, R.F., Gastinel, L.N. y Bjorkman, P.J. (1993) *J. Mol. Biol* 230,

1077.

- ** Hummel, J.P. y witzel, H.H. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 1023.
- ** Ito, W., Iba, Y. y Kurosawa, W. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 16639.
- ** Janssen, L.H.H. y Nelen, T.H.A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 5300- 5303.
- ** Jencks, W.P (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 4046.
- ** Jin, L., Yang, J. y Carey, J. (1993) *Biochemistry* 32, 7302.
- ** Johnson, R.E. y Biltonen, R.L. (1975) *J. Am. Chem. Soc* 97, 2349.
- ** Kauzmann, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* 14,1.
- ** Kellis, J.T.-Jr., Nyberg, K., Sali, D. y Fersht, A.R. (1988) *Nature (London)* 333, 784.
- ** Kellis, J.T.-Jr., Nyberg, K. y Fersht, A.R. (1989) *Biochemistry* 28, 4914.
- ** Khalifah, R.G., Zhang, F., Parr, J.S. y Rowe, E.S. (1993) *Biochemistry* 32, 3058.
- ** Kreshbeck, G.C. y Scheraga, H.A. (1965) *J. Phys. Chem.* 69, 1704.
- ** Langerman, N. y Biltonen, R.L. (1979) *Meth. Enzym.* 61, 287.
- ** Laskowski, M.Jr. y Finkenstadt, W.R. (1972) *Methods Enzymol.* 26, 193-227.
- ** Laskowski, M.Jr. y Sheraga, H.A. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 20, 6305-6319.
- ** Lebowitz, J. y Laskowski, M.Jr. (1962) *Biochemistry* 1, 1044.
- ** Loewenthal, R., Sancho, J. y Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* 30, 6775.
- ** Loewenthal, R., Sancho, J. y Fersht, A.R. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 759.
- ** Lumry, R. y Rajender, S. (1970) *Biopolymers* 9, 1125.
- ** Mandal, D.K., Kishore, N. y Brewer, C.F. (1994) *Biochemistry* 30, 6775.
- ** Martínez, J.C., El Harrous, M., Filimonov, V., Mateo, P.L. y Fersht, A.R. (1994) *Biochemistry*, en prensa.
- ** Mateo, P.L. y Sturtevant, J.M. (1977) *BioSystems* 8, 247.
- ** Matouschek, A., Kellis, J.T.-Jr, Serrano, L. y Fersht, A.R. (1989) *Nature (London)* 340, 122.
- ** Matouschek, A., Kellis, J.T.-Jr, Serrano, L., Bycroft, M. y Fersht, A.R. (1990) *Nature (London)* 346, 440.
- ** Mauguén, Y., Hartley, R.W., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Bricogne, G., Chothia, C., y Jack, A. (1982) *Nature (London)* 297, 162.
- ** Mayorga, O.L., Van Osdol, W.W., Lacomba, J.L. y Freire, E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9514.

- ** McGlashan, M.L. (1979) en "*Chemical Thermodynamics*" Academic Press, Londres, p 48.
- ** McKinnon, I.R., Parody-Morreale, A. y Gill, S.J. (1984) *Anal. Biochem.* 139, 134.
- ** Meiering, E.M., Bycroft, M. y Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* 30, 11348.
- ** Meiering, E.M., Serrano, L. y Fersht, A.R. (1992) *J. Mol. Biol.* 225, 585.
- ** Meiering, E.M., Bycroft, M., Lubienski, M.J. y Fersht, A.R. (1993) *Biochemistry* 32, 10975.
- ** Monk, P. y Wadso, I. (1968) *Acta Chem. Scand.* 22, 1842.
- ** Morin, P.E. y Freire, E. (1991) *Biochemistry* 30, 8494.
- ** Mossakowska, D.E., Nyberg, K. y Fersht, A.R. (1989) *Biochemistry* 28, 3843.
- ** Murphy, K.P. y Gill, S.J. (1989) *J. Chem. Thermodynamics* 21, 903.
- ** Murphy, K.P. y Gill, S.J. (1990) *Thermochim. Acta* 172, 11.
- ** Murphy, K.P. y Gill, S.J. (1991) *J. Mol. Biol.* 222, 699.
- ** Murphy, K.P., Bakuni, V., Xie, D. y Freire, E. (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 293.
- ** Murphy, K.P., Xie, D., Garcia, K.C., Amzel, L.M. y Freire, E. (1993) *Proteins: Structure, Function, and Genetics.* 15, 113.
- ** Nedler, J.A. y Mead, R. (1965) *Computer Journal* 7, 308-313.
- ** Nishimura, S. y Nomura, M. (1958) *Biochem. Biophys. Acta* 30, 430.
- ** Ojeland, G. y Wadso, I. (1968) *Acta Chem. Scand.* 22, 2691.
- ** Pace, C.N., Laurents, D.V. y Erickson, R.E. (1992) *Biochemistry* 31, 2728.
- ** Page, M. y Jencks, W. (1971) *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 68, 1678.
- ** Parody, M.A., Robert, C.H., Bishop, G.A. y Gill, S.J. (1987) *J. Biol. Chem* 262, 10994.
- ** Pavlovsky, A.G., Borisova, S.N., Strokopytov, B.V., Sanishvili, R.G., Vagin, A.A. y Chepurna, N.K. (1988) en "*Metabolism and Enzymology of Nucleic Acids Including Genes Manipulations*", pp 217-221, Plenum Press, New York.
- ** Pennington, S.N. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 230.
- ** Privalov, P.L., Monaselidze, D.R., Mrevlishvili, G.M. y Magaldadze, V.A. (1965) *Soviet Physics JEPT Letters* 20, 1393.
- ** Privalov, P.L. (1980a) *Pure and Appl. Chem.* 52, 479.
- ** Privalov, P.L. (1980b) en "*Biological Microcalorimetry*" (Ed. Beezer, A.E) p 413, Academic Press, New York.

-
- ** Rajender, S. y Lumry, R. (1970) *Biopolymers* 9, 1125.
- ** Richards, F.M. y Wycoff, H.W. (1970) *Enzymes* (3rd Ed.) 4, 647-806.
- ** Ross, P.D. y Subramanian, S. (1981) *Biochemistry* 20, 3096.
- ** Rushizky, G.W., Greco, A.E., Hartley, R.W. y Sober, H.A. (1963) *Biochemistry* 2, 787.
- ** Sali, D., Bycroft, M. y Fersht, A.R. (1988) *Nature (London)* 335, 740.
- ** Sali, D., Bycroft, M. y Fersht, A.R. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 779.
- ** Sancho, J., Meiering, E.M. y Fersht, A.R. (1991) *J. Mol. Biol.* 221, 1007.
- ** Sancho, J., Serrano, L. y Fersht, A.R. (1992) *Biochemistry* 31, 2253.
- ** Schellman, J.A. (1975) *Biopolymers* 14, 999.
- ** Schwarz, F.P., Puri, K. y Surolia, A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 24344.
- ** Sehl, L.C. y Castellino, F.J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 5482.
- ** Sela, M. y Anfinsen, C.B. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* 24, 229.
- ** Serrano, L. y Fersht, A.R. (1989) *Nature (London)* 342, 296.
- ** Serrano, L., Bycroft, M. y Fersht, A.R. (1991) *J. Mol. Biol.* 218, 465.
- ** Serrano, L., Sancho, J., Hirshberg, M. y Fersht, A.R. (1992a) *J. Mol. Biol.* 227, 544.
- ** Serrano, L., Neira, J-L., Sancho, J. y Fersht, A.R. (1992b) *Nature (London)* 356, 453.
- ** Sevcik, J., Sanishvili, R.G., Pavlovsky, A.G. y Polyakov, K.M. (1990) *Trends Biochem. Sci* 15, 158.
- ** Shiao, D.D.F. y Sturtevant, J.M. (1969) *Biochemistry* 8, 4910.
- ** Shiao, D.D.F. y Sturtevant, J.M. (1976) *Biopolymers* 15, 1201-1211.
- ** Shreiber, G. y Fersht, A.R. (1993) *Biochemistry* 32, 5145.
- ** Shroeder, D.D. y Shaw, E. (1968) *J. Biol. Chem.* 283, 2943.
- ** Spink, C. y Wadso, I. (1976) *Methods. Biochem. Anal.* 23, 1.
- ** Spokane R.B. y Gill, S.J. (1981) *Rev.Sci.Instrum.* 52, 1728.
- ** Spolar, R.S., Livingstone, J.R. y Record, T.Jr. (1992) *Biochemistry* 31, 3947.
- ** Sturtevant, J.M. y Lyons, P.A. (1969) *J. Chem. Thermodyn.* 1, 201.
- ** Sturtevant, J.M. (1972) *Meth. Enzym.* 26, 227.
- ** Sturtevant, J.M. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74, 2236.
- ** Suurkuusk, J. (1974) *Acta Chem. Scand. Ser. B* 28, 409.
- ** Takahashi, K. y Moore, S. (1982) *Enzymes* (3rd Ed.) 15, 435-467.
- ** Tanford, C. (1962) *Adv. Protein. Chem.* 17, 69-165.

- ** Tanford, C. y Wagner, M.L. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3331.
- ** Tanford, C., Swanson, S.A. y Shore, W.S. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* 77, 6414-6421.
- ** Tanford, C. y Hauenstein, J.D. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5287-5291.

- ** Tanford, C. (1973) "*The Hydrophobic Effect*" John Wiley, New York.
- ** Thomas, P.G. y Seelig, J. (1993) *Biochem. J.* 291, 397.
- ** Tian, A. (1923) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 33, 427.
- ** Timasheff, S.N. (1966) *Biopolymers* 4, 107.
- ** Uchida, T. y Egami, F. (1971) *Enzymes* (3rd Ed.) 4, 205-250.
- ** Varadarajan, R., Connelly, P.R., Sturtevant, J.M. y Richards, F.M. (1992) *Biochemistry* 31, 1421.
- ** Wadso, I. (1968) *Acta. Chem. Scand.* 22, 927.
- ** Wadso, I. (1985) *Thermochimica Acta* 88, 35.
- ** Walsh, K.A. y Wilcox, P.E. (1971) *Methods Enzymol.* 19, 31.
- ** Wiesinger, H. y Hinz, H-j. (1986) "*Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*" Springer Verlag, Heidelberg, p 221.
- ** Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. y Lin, L-N. (1989) *Analytical Biochemistry* 179, 131.
- ** Wishnia, A., Weber, I. y Warner, R.C. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 2071.
- ** Wu, Y.V. y Sheraga, H.A. (1962) *Biochemistry* 1, 698.
- ** Wyman, J. (1964) *Adv. Protein Chem.* 19, 223.
- ** Wyman, J. (1965) *J. Mol. Biol.* 11, 63.
- ** Wyman, J. y Gill, S.J. (1990) "*Binding and Linkage, Functional Chemistry of Biological Macromolecules*" University Science Books.
- ** Yoshida, K., Shibata, T., Masai, J., Sato, K., Noguti, T., Go, M. y Yanagawa, H. (1993) *Biochemistry* 32, 2162.
- ** Yung, B.Y.K. y Trowbridge, C.G. (1980) *J. Biol. Chem* 255, 9724.

Apéndice 1: Compensador.

Un problema con el que tropezamos frecuentemente en la medida de una magnitud consiste en la contraposición entre sensibilidad y fondo de escala o intervalo de medida. Así si queremos distinguir fluctuaciones de una magnitud que son muy pequeñas comparando con el valor absoluto de la misma necesitaremos aumentar la sensibilidad de la medida, lo que nos lleva generalmente a un desbordamiento del fondo de escala o saturación del instrumento. Para solucionar este problema, se ha construido un aparato, que hemos llamado compensador, que se conecta a la entrada del instrumento de medida y permite en primer lugar variar el voltaje de entrada y llevarlo a cero, y en segundo lugar amplificar y filtrar el ruido. Este instrumento ha sido construido bajo la dirección del Dr. Lopez Mayorga.

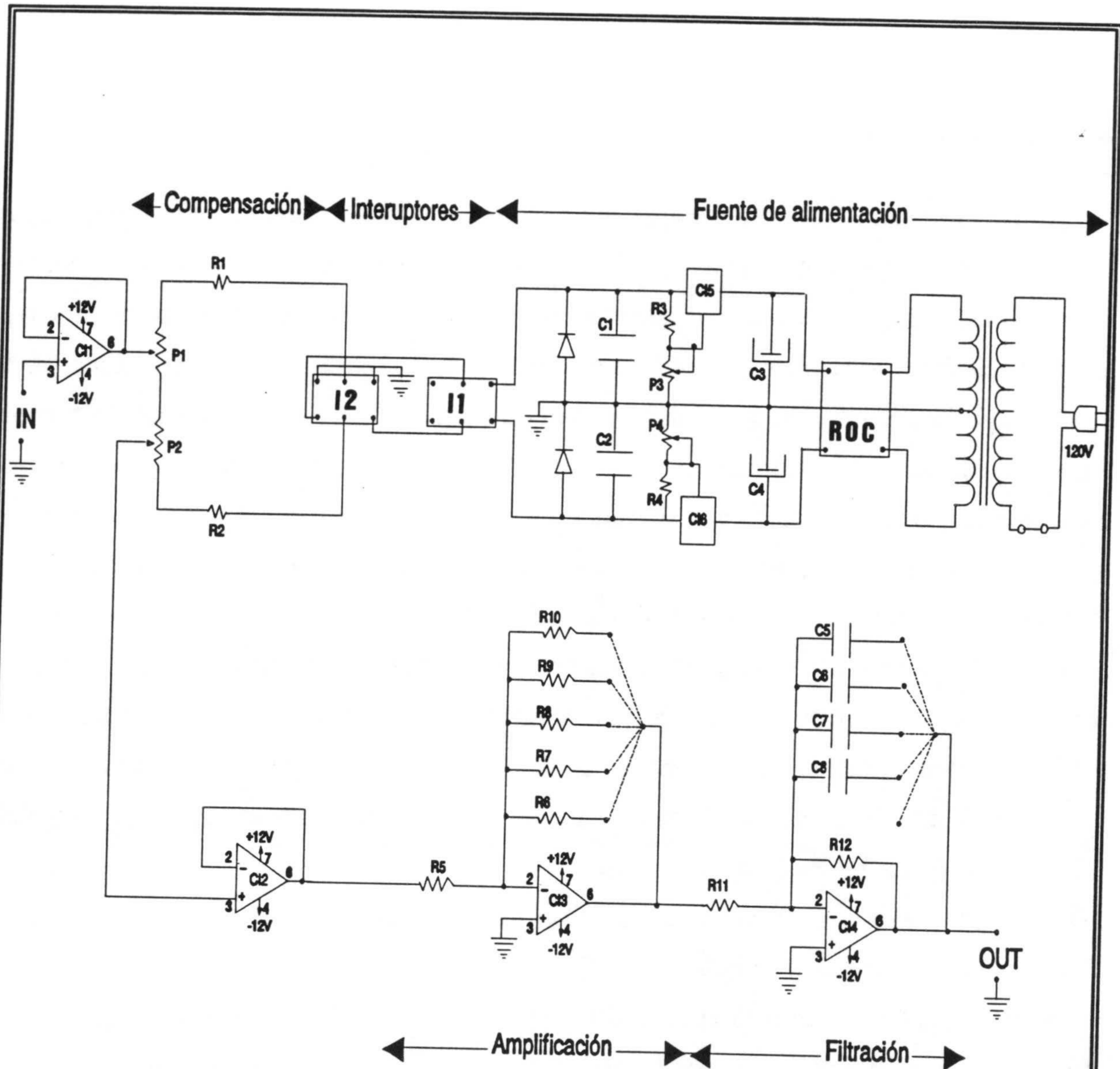
En la figura de la siguiente página, podemos ver el esquema del circuito eléctrico del compensador, que consta de cinco partes; una fuente de alimentación, dos interruptores, un sistema de compensación, un sistema de amplificación y un sistema de filtración del ruido.

La fuente de alimentación es una fuente de corriente continua, de voltaje regulable entre ± 5 y ± 15 V. Está constituida por:

- Un transformador que convierte el voltaje del sector (120 V alterna) a 12 V alterna.
- Un rectificador de onda completa R.O.C.
- Dos condensadores electrolíticos de alta capacidad (2200 μ F cada uno) C3,C4, y cuya función es de convertir el voltaje de salida del rectificador en voltaje continuo.
- Dos reguladores de voltaje (LM317 y LM137) CI5,CI6 que, mediante dos potenciómetros ajustables de 2.5K, se ajustó el voltaje de la fuente a ± 12 V.
- Dos condensadores de 1 μ F C1,C2 cada uno para filtrar el ruido del voltaje a la salida de los dos reguladores.
- Dos diodos D1,D2 de protección contra posibles sobretensiones de la red.

El sistema de compensación en si mismo consta de dos potenciómetros P1,P2; el grueso de 15K y el fino de 1K, en serie con dos resistencias R1,R2 de 474K cada una. Teniendo en cuenta de los valores máximos de los dos potenciómetros y de estas dos últimas resistencias, el voltaje máximo de entrada (IN) que se puede compensar es de ± 200 mV.

El sistema de amplificación está constituido por un amplificador operacional en



- CI1: ship TL071
- CI2: ship TL071
- CI3: ship TL071
- CI4: ship TL071
- CI5: Regulador LM317
- CI6: Regulador LM137
- CI7: Rectificador de onda completa
- C1 : Condensador de 1 μF
- C2 : Condensador de 1 μF
- C3 : Condensador electrolito 2200 μF , 16V
- C4 : Condensador electrolito 2200 μF , 16V
- C5 : Condensador 4.7 μF
- C6 : Condensador 1 μF

- C7 : Condensador 0.47 μF
- C8 : Condensador 0.1 μF
- P1 : Potenciómetro de 15K
- P2 : Potenciómetro de 1K
- P3=P4: Potenciómetro de ajuste de 2.5K
- R1=R2: Resistencia de 100K
- R3=R4: Resistencia de 180
- R5=R6: Resistencia de 1K
- R7: Resistencia de 10K
- R8: Resistencia de 100K
- R9: Resistencia de 474K
- R10=R11=R12: Resistencia de 1M

configuración inversora. Consta de un "ship" (TL071) CI3 y seis resistencias; cinco de ellas están conectadas en paralelo entre las dos patas 2 y 6 del "ship" y una entre la salida del sistema de compensación y la pata 2 del mismo "ship". La relación entre el valor de la resistencia de esta última y las otras cinco determina el factor de amplificación. Este factor varia de 1, 10, 100, 474 y 1000, y se puede seleccionar mediante un botón en el panel frontal del aparato. Para que las resistencias del sistema de compensación no afecten a los factores de amplificación, se puso un separador a la entrada del amplificador que consta de un "ship" (TL071) CI2 cortocircuitado entre las patas 2 y 6.

El sistema de filtración del ruido del voltaje a la salida del sistema amplificador consta de un filtro activo pasa baja. Está construido por un "ship" (TL071) CI4 y cuatro condensadores en paralelo con una resistencia R12. La frecuencia de corte del filtro varia de aproximadamente 10, 2, 1 y 0.2 Hz, que se puede seleccionar también mediante un botón en el panel frontal. Dicha frecuencia de corte está dada por el inverso del producto de la resistencia R12 por el valor de la capacidad de cada uno de los condensadores.

Por último hay que decir que el aparato tiene también otro separador a la entrada CI1, del mismo tipo descrito anteriormente, un interruptor (ON/OFF) I1 y un interruptor bipolar I2 para la compensación de tanto bien los voltajes positivos como negativos.

Apéndice 2: Programa MEDCAL.

MEDCAL es el programa de control y medida de los calores de una valoración calorimétrica. El programa está hecho con el lenguaje Basic del ordenador de control HP-85. Para su funcionamiento se necesita una extensión de memoria de 16K y una memoria IO/ROM para la comunicación con los periféricos. La medida del calor puede realizarse con o sin compensación eléctrica. El listado del programa se da en las páginas 255-260 y los aspectos esenciales del mismo se han mostrado en el diagrama de flujo de la Figura 3-3. También en el Capítulo 3, se ha dado una descripción resumida del funcionamiento del mismo y vamos a dar aquí la colocación en el listado de los diferentes bloques del diagrama de flujo, con algunas explicaciones adicionales.

El primer bloque (sentencias 125-260) está reservado a los parámetros del usuario en donde tiene que introducir, como máximo, ocho datos. Estos datos son:

- Método de medida, es decir con compensación o sin compensación.
- Número de inyecciones que va a contener la curva de valoración y el volumen por cada inyección (este volumen es constante en cada inyección y hay que tener en cuenta que en toda la curva de valoración no se pueden inyectar más de los 180 μ l del reactivo en la jeringa).
- Número de agitaciones a realizar y el tiempo que va a durar cada agitación (estas agitaciones se realizarán cuando terminan todas las inyecciones). El tiempo de agitación está dividido en dos: un tiempo para la agitación en sentido horario y otro en sentido antihorario. El tiempo se deja a opción del usuario ya que dependerá del volumen inyectado y de la viscosidad de los reactivos.
- Número de evaluaciones del ruido de línea base (es decir el calor que se mide cuando no se está realizando ningún evento de los dos anteriores). Estas evaluaciones se realizarán después de las agitaciones.
(Tanto las inyecciones como las agitaciones y el ruido de línea base constituyen eventos y se puede realizar uno o otro independientemente de los demás, pero hay que tener en cuenta que el número máximo total de los eventos está programado a 60).
- Tiempo de medida (constituye el tiempo que va a durar la medida del efecto térmico producido en un sólo evento y es constante para todos los eventos. Aquí se ha dejado este

parámetro a opción del usuario ya que algunas reacciones pueden ser lentas, pero generalmente las reacciones son rápidas y este tiempo es de 80-90 s cuando se va a medir con compensación y 10-12 min si es sin compensación. Por falta de memoria del ordenador, el máximo tiempo de medida está programado a 360 s cuando se va a medir con compensación y 2700 s en caso contrario.

- Máximo calor esperado en un evento (generalmente en una interacción macromolécula-ligando es del orden de 100 μ cal). A partir del valor de este calor se calcula la intensidad de línea base sobre la cual se efectúa la compensación eléctrica.

Dependiendo de que eventos se quiere realizar y del método de medida, se introducirá justo los datos necesarios. Hay que decir que el programa está protegido contra algunos errores que puede cometer el usuario durante la introducción de sus datos, y en caso de que esto ocurra, aparece en la pantalla el mensaje explicativo del error y se tiene que volver a correr desde el principio el programa.

El segundo bloque (sentencias 270-432) del programa consiste en la programación de los modos de operación y de comunicación de los aparatos periféricos: el nanovoltímetro (Keithley 181), la fuente de alimentación (Keithley 224/2243) y la etapa de potencia de los motores de agitación e inyección. El nanovoltímetro y la fuente de alimentación comunican con el ordenador a través del interfaz IEEE HP-IB habiéndose seleccionado como código el número 7. Para la dirección del nanovoltímetro se seleccionó el 702 y para la de la fuente de alimentación el 710. El nanovoltímetro está programado a un filtrado determinado según que las medidas se van a realizar con compensación (sentencia 340) o sin compensación (sentencia 336). El modo de operación de la fuente de alimentación se da en la sentencia 380. Estos dos aparatos están programados también contra acceso desde el panel frontal durante la realización del experimento (sentencia 320). La etapa de potencia de los motores de agitación e inyección comunica con el ordenador a través del interfaz HP-GPIO habiéndose seleccionado como código el número 4. Los modos de transferencia de los datos a través de la misma se seleccionan en las sentencias 331 y 333.

Una vez programados los periféricos, se manda la intensidad I_0 de línea base de compensación, que se realiza en la sentencia 381 del programa.

El tercer bloque (sentencias 470-475) es la evaluación del voltaje de la línea base antes de empezar la ejecución de los eventos. Esta evaluación se hace en 30 s.

El cuarto bloque es la activación periódica (cada segundo) de la subrutina de adquisición de datos. Esta activación se hace en la sentencia 570 y la subrutina de datos se encuentra en las sentencias 970-1010. Esta subrutina tiene varias funciones: Leer el voltaje del nanovoltímetro, contabilizar el tiempo, medir el area voltaje-tiempo, calcular la nueva intensidad de compensación, calcular la potencia calorífica total, mandar esa intensidad a la resistencia calefactora y almacenar su valor en una matriz.

El quinto bloque (sentencias 601-690) consiste en la ejecución de los eventos programados. La inyección se realiza en las sentencias 607-630 y hay sentencias comunes a los tres diferentes eventos.

El sexto bloque (sentencias 693-900) corresponde al cálculo del calor total, una vez acabado el tiempo de medida programado inicialmente. Este calor, como se explicó en el Capítulo 3, se compone de dos términos: el calor no compensado, medido a partir del área de la curva voltaje-tiempo y el calor compensado eléctricamente medido a partir de las intensidades de compensación. El calor no compensado se va calculando a medida que se va ejecutando el evento y esto se hace en la sentencia 970 de la subrutina de adquisición de datos. El cálculo del area se hace simplemente por un método trapezoidal. Este calor se corrige después por posible deriva de línea base en la sentencia 700 y el valor corregido se da en la sentencia 703. Para hacer esta corrección se necesita evaluar el voltaje de la línea base cuando se acaba el tiempo de medida y esto se hace previamente en las sentencias 693-698. El calor compensado se calcula en las sentencias 830-880 a partir de las intensidades de compensación que se han almacenado durante el tiempo de medida, después de restarlas la debida al mantenimiento de la línea base. El calor total se calcula en la sentencia 890 como suma de los dos. Después del cálculo del calor total se imprime su valor (sentencia 900) y se representa en la pantalla el pico de la potencia total frente a tiempo (sentencias 2000-2120).

Finalmente cuando se termina la ejecución de todos los eventos programados se puede imprimir la gráfica de la potencia-tiempo, representar la curva de valoración e imprimirla (sentencias 3000-4000). Hay que decir que durante el desarrollo del experimento existe la posibilidad de parar la ejecución de las inyecciones, agitaciones o la evaluación del ruido de línea base antes de que termine el número programado inicialmente de los mismos.


```

5 REM ** MEDCAL : PROGRAMA DE
  CONTROL DE LA MEDIDA DE LOS
  CALORES EN EL CALORIMETRO
  GILL **
6 !
10 ! Escrito por MOHAMED EL HAR
  ROUS, 1990-1993
11 ! =====
12 CLEAR @ DISP
13 DISP " Programa para medir
  calores de reaccion, agitaci
  on y ruido de linea base."
14 DISP @ DISP " Las medidas s
  e pueden efectuarcon compens
  acion electrica o sincompens
  acion"
15 DISP " El tiempo de medida
  minimo es 60s,10min con y si
  n compensacion"
16 DISP @ DISP @ DISP "-----
  -----"
17 DISP " Pulse la tecla ' SCRA
  TCH/CONT ' para continuar"
18 PAUSE
20 !
30 ! DECLARAR VARIABLES.
40 ! =====
41 REAL A,E,E0,E1,E2,K1,L
42 INTEGER C1,C,I,J,S,D0,D1,D2,
  M1,M2,M3
43 SHORT I0,I1,W(2800),H(60)
45 DIM I(500),D$(96)
47 !
50 R1=99 ! Resistencia
70 K1=2.78 ! J/V/S Constante de
  calibracion.
80 D0=48 @ D1=16 @ D2=32 ! Codi
  gos del motor de agitacion:P
  arar y agitar en los dos sen
  tidos.
90 M1=200 @ M2=40 @ M3=100 ! Et
  apas/revolucion, revl./inch,
  µl/inch.
95 !
100 P1(1)=10 @ P1(2)=9
110 P1(3)=5 @ P1(4)=6 ! Codigos
  del motor a paso de inyeccio
  n.
111 !
112 Z7=0 @ Z8=0 @ Z9=0
113 K9=0 @ B9=0 @ P8=0
114 C1=0 @ C=0 @ Q=0
115 A=0 @ Y3=0 @ S=0
116 F1=0 @ F3=1
117 N9=30 @ N4=0 @ L=10 @ J=-1
120 !
125 ! DATOS DEL USUARIO
126 ! =====
127 CLEAR @ DISP @ DISP @ DISP
128 DISP "Comentario:"
129 DISP "(No mas de 3 lineas y
  sin comas)";@ INPUT D$
130 !
133 CLEAR
140 GRAPH @ GCLEAR
142 SCALE 0,100,-1,12
146 MOVE 0,10 @ LABEL "-MEDIR CO
  N COMPENSACION(S/):"
148 MOVE 0,8 @ LABEL "-NUMERO DE
  INYECCIONES..."
150 MOVE 0,7 @ LABEL "-NUMERO DE
  AGITACIONES..."
152 MOVE 0,6 @ LABEL "-NUMERO DE
  LINEAS BASE..."
154 MOVE 0,5 @ LABEL "-VOLUMEN /
  INYECCION(µl)..."
156 MOVE 0,4 @ LABEL "-MAX.CALOR
  ESPERADO(µcal)"
158 MOVE 0,3 @ LABEL "-TIEMPO DE
  MEDIDA (s)..."
160 MOVE 0,2 @ LABEL "-TIEMPOS D
  E AGITACION"
161 MOVE 0,1 @ LABEL " 30,15s EN
  LOS 2 SENTIDOS"
162 MOVE 0,-1 @ LABEL "-CAMBIAR
  ALGUN DATO(S/):"
163 !
164 MOVE 90,10 @ INPUT C$
165 IF C$="S" OR C$="s" THEN T5=
  360 ELSE T5=2700
166 IF C$="S" OR C$="s" THEN F8=
  1 ELSE F8=0
167 !
168 MOVE 80,8 @ INPUT N0
169 MOVE 80,7 @ INPUT N1
170 MOVE 80,6 @ INPUT N2
171 IF N0+N1+N2=0 THEN 12
172 IF N0+N1+N2<=60 THEN 175
173 BEEP @ DISP "DEMASIADOS EVEN
  TOS PARA LA MEMORIA DEL PROG
  RAMA"
174 GOSUB 4100 @ GOTO 12
175 !
176 IF N0=0 THEN 183
177 MOVE 80,5 @ INPUT L
178 IF N0*L/100<=1.8 THEN 183
179 GCLEAR @ BEEP
180 DISP " NO PUEDO INYECTAR";N0
  ;" INYECCIONES DE";L;"µl CAD
  A UNA"
181 GOSUB 4100 @ GOTO 12
182 !
183 IF F8=0 THEN 194
184 MOVE 80,4 @ INPUT E1
185 E1=E1*.000001*4.184
186 I0=SQR(E1/(R1*20))
187 IF I0<=.01 THEN 194
188 GCLEAR @ BEEP
190 DISP " NO PUEDO MEDIR TANTO
  CALOR CON LA COMPENSACI
  ON"

```



```

192 GOSUB 4100 @ GOTO 12
193 !
194 MOVE 80,3 @ INPUT W4
196 IF W4<=T5 THEN 200
197 BEEP @ DISP " TIEMPO DE MEDI
DA DEMASIADO GRANDE PARA LA
MEMORIA DEL PROGRAMA"
198 GOSUB 4100 @ GOTO 12
199 !
200 IF N0=0 AND N1=0 THEN 228
220 MOVE 80,1 @ INPUT W1,W2
221 IF W1+W2<=W4 THEN 228
222 BEEP @ DISP " TIEMPO DE AGIT
ACION MAYOR QUE EL TIEMPO
DE MEDIDA!"
223 GOSUB 4100 @ GOTO 12
224 !
228 MOVE 80,-1 @ INPUT C9$
230 IF C9$="S" OR C9$="s" THEN 1
2
231 !
234 N=L/M3*M2*M1
235 N=INT(N/2+.5)*2 ! Numero de
Pasos/inyeccion.
236 !
239 IF F8=0 THEN 245
240 G1=IP(-150*(1+LGT(E1)))
242 IF G1<0 THEN G1=0
243 GOTO 270
244 !
245 G1=0 @ I0=0
260 !
270 ! PROGRAMACION DE PERIFERICO
S
271 ! =====
274 CLEAR
275 DISP @ DISP " ESTAN TODOS LO
S PERIFERICOS ENCENDIDOS
?"
276 DISP @ DISP
277 DISP "-----"
-----"
278 DISP " Pulse la tecla [SCRAT
CH/CONT] para continuar"
279 PAUSE
280 !
290 RESET 7
300 RESET 4
310 CLEAR 702,710
320 LOCAL LOCKOUT 7
330 REMOTE 702,710
331 CONTROL 4,4 ; 192
333 CONTROL 4,16 ; 0
334 !
335 IF F8=1 THEN 340
336 OUTPUT 702 ; "R1T0XB1XP2XD1XK
0X"
337 GOTO 387
338 !
340 OUTPUT 702 ; "R1T0XB0XP1XD0XK
0X"
380 OUTPUT 710 ; "R0XV10XD0F1G1X"
381 OUTPUT 710 ; "I";I0;"X"
385 ENTER 710 ; I0
386 !
387 SEND 4 ; LISTEN 5 DATA 0 ! E
vitar calentamiento del moto
r a Paso.
390 !
400 CLEAR
410 DISP @ DISP @ DISP @ DISP
420 DISP " Pulse la tecla [SCRA
TCH/CONT] cuando se estabi
lize la linea base"
430 PAUSE
431 !
432 OUTPUT 702 ; "Z1X"
433 !
435 !
436 CLEAR @ PRINT @ PRINT
437 PRINT D$
438 IF N0<>0 THEN PRINT "Volumen
exacto inyectado:";INT(N*10
0/80+.5)/100;"µl."
439 PRINT "=====
=====
"
440 PRINT "N#";TAB(8);"Cal.Comp.
";TAB(22);"Cal.Total" @ PRIN
T
445 IF N0<>0 THEN PRINT " Calore
s de inyeccion (µcal):" @ PR
INT "-----"
"
460 DISP @ DISP @ DISP @ DISP "
EXPERIMENTO EN MARCHA"
461 DISP "
-----"
"
463 WAIT 90000
465 !
466 !
470 V0=0
471 FOR I=1 TO N9
472 WAIT 1000 @ ENTER 702 ; V
473 V0=V0+V
474 NEXT I
475 V5=V0/N9 ! Voltaje de linea
base.
550 !
560 ! COMIENZO DE LA SUBROUTINA D
E ADQUISICION DE DATOS
561 ! =====
570 ON TIMER# 1,1000 GOSUB 970
571 !
574 !
575 S=S+1 ! Contador de eventos
576 !
577 IF S=N0+1 AND N1<>0 THEN 578
ELSE 580
578 PRINT @ PRINT " Calores de a
sitacion (µcal):" @ PRINT "
-----"
"
579 IF N0<>0 THEN GCLEAR -2*Y1/1
.2 @ GOTO 585

```



```

580 IF S=N0+N1+1 AND N2<>0 THEN
581 ELSE 585
581 PRINT @ PRINT " Ruido de lin
ea base (µcal):" @ PRINT "--
-----"
582 IF N0<>0 OR N1<>0 THEN GCLEAR
R -2*Y1/1.2
583 !
585 IF S>N0 THEN Z7=1
586 IF S>N0+N1 THEN Z8=1
587 IF S>N0+N1+N2 THEN Z9=1
588 !
589 !
590 F3=1 @ V0=0
591 FOR I=1 TO N9
592 IF F1=1 THEN F1=0 ELSE 592
593 V0=V0+V
594 NEXT I
595 V5=V0/N9
596 !
597 F3=0 @ C1=0 @ A=0
598 IF S<=N0 THEN 606
599 IF S<=N0+N1 THEN 602 ELSE 69
0
600 !
601 ! ---- AGITACIONES-----
602 K9=K9+1
603 SEND 4 ; LISTEN 5 DATA D1
604 GOTO 650
605 !
606 ! ----- INYECCIONES-----
607 J=J
608 FOR I=1 TO N/2
609 J=J+2
610 SEND 4 ; LISTEN 5 DATA P1(J)
+D1
615 SEND 4 ; LISTEN 5 DATA P1(J+
1)+D1
620 IF J=3 THEN J=-1
630 NEXT I
640 !
641 !
645 P8=P8+N @ N4=S-1
646 !
650 IF C1<W1 THEN 650
651 !
660 SEND 4 ; LISTEN 5 DATA D2
661 !
670 IF C1<W1+W2 THEN 670
671 !
680 SEND 4 ; LISTEN 5 DATA D0
681 !
685 ! ----LINEA BASE-----
690 IF C1<W4 THEN 690
691 F3=1
692 !
693 V0=0
694 FOR I=1 TO N9
695 IF F1=1 THEN F1=0 ELSE 695
696 V0=V0+V
697 NEXT I
698 V6=V0/N9
699 !
700 A=A-W4*(V6-V5)*K1/2
701 !
703 A4=A*1000000/4.184 ! µcal
704 !
707 E=0
708 IF F8=0 THEN 880
709 !
720 ! Calculo del calor compensa
do (E4).
730 !
830 FOR I=1 TO W4
850 E=E+(I(I)^2-I0^2)
860 NEXT I
861 !
880 E4=E*R1*1000000/4.184 ! µcal
885 !
886 ! CALOR TOTAL H<>
887 !
890 H(S)=INT((E4+A4)*100)/100
891 !
895 Q=MAX(Q,ABS(H(S))) @ N5=N4+1
896 !
900 PRINT USING 943 ; S,INT(E4*1
00)/100,H(S)
901 !
902 IF C1<80 THEN 902
903 !
904 GOSUB 2000 ! Grafica-senal
905 !
906 IF S=N0+N1+N2 THEN 915
907 !
908 GOTO 575 ! Mas eventos.
909 !
910 PEN -1 @ GCLEAR -2*Y1/1.4
911 MOVE -X2/6,-2*Y1/1.2
912 LABEL "EXPTO.ABORTADO POR EL
USUARIO"
913 B9=1 @ SEND 4 ; LISTEN 5 DAT
A D0
914 !
915 OFF TIMER# 1
916 !
917 OUTPUT 702 ;"B1XP2XD1X"
918 IF F8=0 THEN 920
919 OUTPUT 710 ;"I";I0;"X"
920 !
921 GOSUB 3000 ! Grafica-Calor
922 !
923 IF N0=0 THEN 932
924 MOVE 0,1 @ LABEL " DEVOLVER
MICROMETRO(S/)"
925 MOVE 8,1 @ INPUT R$
926 IF R$<>"S" AND R$<>"s" THEN
932
927 J=J+2 @ GCLEAR 2 @ MOVE 3,1
@ LABEL "ESPERE UN MOMENTO"
928 FOR I=P8 TO 1 STEP -1

```



```

929 SEND 4 ; LISTEN 5 DATA P1(J)
930 J=J-1 @ IF J<1 THEN J=4
931 NEXT I
932 IF F8=0 THEN 940
933 GCLEAR 2 @ MOVE 0,1
934 LABEL " CORTAR CORRIENTE (S/
)"
935 MOVE 8,1 @ INPUT R$
936 IF R$<>"S" AND R$<>"s" THEN
940
937 CLEAR 710 @ OUTPUT 710 ;"F0X
"
938 !
940 !
941 RESET 7
942 !
943 IMAGE ZZ,5X,SZZZZZ.DD,5X,SZZ
ZZZ.DD
944 !
946 GCLEAR 2
947 MOVE 0,1
948 LABEL " Pulse [RUN] para
correr"
949 MOVE 0,0 @ LABEL " el Pro
grama de nuevo."
950 !
951 SEND 4 ; LISTEN 5 DATA 0 ! E
vitar calentamiento del moto
r a Paso.
952 !
955 END
960 !
965 ! SUBROUTINA DE ADQUISICION
DE LOS DATOS
966 ! =====
970 ENTER 702 ; V@ C1=C1+1 @ F1=
1 @ A=A+(V-V5)*K1 @ C=C+1
971 I1=I0+(V-V5)*G1
972 IF I1<0 THEN I1=0
973 IF I1>.01 THEN I1=.01
980 W(C)=(K1*(V-V5)+R1*(I1^2-I0^
2))*1000000/4.184
985 IF F8=0 THEN RETURN
986 !
990 OUTPUT 710 ;"I";I1;"X" @ ENT
ER 710 ; I1@ IF F3=1 THEN RE
TURN
1000 I(C1)=I1
1010 RETURN
1050 !
1060 !
1065 ! SUBROUTINA DE GRAFICAS
1066 ! =====
1801 !
2000 IF S>1 THEN GOTO 2050
2001 !
2002 FOR I=1 TO W4 @ Y3=MAX(Y3,A
BS(W(I))) @ NEXT I
2003 !
2004 IF F8=0 THEN F9=5 ELSE F9=1
2005 U=180*F9 @ Y1=Y3 @ X2=20*15
0*F9
2006 IF ABS(H(1))<5 THEN Y1=Y1*1
0
2007 IF H(1)<0 THEN S9=-1 ELSE S
9=1
2008 IF S9=-1 THEN S$="-" ELSE S
$="+"
2009 GCLEAR
2010 SCALE -X2/5,X2,-2*Y1,Y1*2
2020 XAXIS -2*Y1/3,180*F9,0,X2
2021 YAXIS 0,Y1*2/4,0,Y1+Y1/1.9
2022 Y$=VAL$(INT(Y1*2*10)/10) @
L1=LEN(Y$)
2023 IF L1<=4 THEN GOTO 2027
2024 O1=L1-4 @ Y2=Y1/10^O1
2025 GOTO 2031
2027 Y2=Y1 @ O1=0
2031 FOR I=0 TO 3 STEP 3
2032 MOVE -X2/7,Y1*2*I/4 @ LABEL
VAL$(INT(Y2*20*I/4)/10)
2033 NEXT I
2034 LDIR 90 @ FOR I=0 TO X2/180
/F9 STEP 5
2035 MOVE I*180*F9,-Y1 @ LABEL V
AL$(I*3)
2036 NEXT I
2037 MOVE -X2/6,-Y1 @ LABEL S$&"
dQ/dt.E-"&VAL$(O1)&" µcal/s
"
2038 LDIR 0 @ MOVE X2/5,-2*Y1/1.
5 @ LABEL "Tiempo/"&VAL$(F9
)&" (min)"
2040 MOVE -X2/5,-2*Y1/1.35 @ LAB
EL "-----"
2041 MOVE -X2/7,-2*Y1/1.2 @ LABE
L "<K4>:ABORTAR EL EXPERIME
NTO"
2045 ON KEY# 4,"ABORTAR EXPERIME
NTO" GOTO 910
2046 !
2048 MOVE 180*F9,0
2049 !
2050 C3=C-1
2051 FOR I=1 TO C3
2052 U=U+1
2060 DRAW U,S9*W(I)
2070 NEXT I
2071 !
2075 M9=S9*W(I)
2085 IF S=1 AND N0>1 THEN 2086 E
LSE 2090
2086 GCLEAR -2*Y1/1.2
2087 MOVE -X2/7,-2*Y1 @ LABEL "<
K1>:ABORTAR INYECCIONES"
2088 ON KEY# 1,"ABORTAR INYECCIO
NES" GOSUB 4300
2089 !
2090 IF K9=1 AND S-N0=1 AND N1>1
THEN 2091 ELSE 2095

```



```

2091 GCLEAR -2*Y1/1.2
2092 MOVE -X2/7,-2*Y1 @ LABEL "<
K2>:ABORTAR AGITACIONES"
2093 ON KEY# 2,"ABORTAR AGITACIO
NES" GOSUB 4400
2094 !
2095 IF S=N0+N1+1 AND N2>1 THEN
2096 ELSE 2110
2096 GCLEAR -2*Y1/1.2
2097 MOVE -X2/7,-2*Y1 @ LABEL "<
K3>:ABORTAR LINEA BASE"
2098 ON KEY# 3,"ABORTAR LINEA BA
SE" GOSUB 4500
2100 !
2110 MOVE U,M9
2111 !
2115 C=0
2116 IF C<20 THEN 2116
2120 RETURN
2200 !
2201 !
3000 PEN -1
3010 IF B9=0 THEN GCLEAR -2*Y1/1
.4 ELSE GCLEAR -2*Y1/1.2
3020 MOVE 0,-2*Y1
3030 LABEL "IMPRIMIR PANTALLA"
3040 MOVE 11*180*F9,-2*Y1 @ INPU
T R$
3050 IF R$="N" OR R$="n" THEN GO
TO 3054
3051 PEN 1 @ GCLEAR -2*Y1/1.4
3052 MOVE X2/5,-2*Y1/1.5 @ LABEL
"Tiempo/"&VAL$(F9)&" (min)
"
3053 PRINT @ PRINT @ COPY
3054 IF N0=0 THEN 3360
3055 PEN -1 @ GCLEAR -2*Y1/1.4
3056 MOVE 0,-2*Y1 @ LABEL "GRAFI
CA DE DATOS"
3057 MOVE 11*180*F9,-2*Y1 @ INPU
T R$
3058 IF R$="S" OR R$="s" THEN 30
61 ELSE 3360
3061 PEN 1 @ GCLEAR
3062 N0=N0+1
3070 SCALE -7*N0/18,N0,-Q/2,Q*1.
5
3080 XAXIS -Q/8,1,0,N0
3090 YAXIS 0,Q*1.5/5,0,Q*1.5
3100 !
3105 IF FP(N0/5)=0 THEN L7=5 ELS
E L7=0
3110 FOR I=0 TO IP(N0/5)*5-L7 ST
EP 5
3120 MOVE I,-Q/4 @ LABEL VAL$(I)
3130 NEXT I
3140 MOVE 5*N0/18,-Q/2 @ LABEL "
N.de inyeccion"
3150 !
3160 Q$=VAL$(INT(Q*15)/10) @ L0=
LEN(Q$)
3170 IF L0<=4 THEN GOTO 3195
3180 O=L0-4
3190 Q2=Q/10^O @ GOTO 3200
3195 Q2=Q @ O=0
3200 FOR I=0 TO 4 STEP 4
3210 MOVE -4*N0/18,I*Q*1.5/5 @ L
ABEL VAL$(INT(Q2*15*I/5)/10
)
3220 NEXT I
3230 W$=S$&"Q.E-"&VAL$(O)&" ucal
"
3235 LDIR 90
3240 MOVE -6*N0/18,0 @ LABEL W$
3250 FOR I=1 TO N5
3260 MOVE I+.1,S9*H(I) @ LABEL "
+"
3270 NEXT I
3280 WAIT 3000 @ PEN -1
3290 GCLEAR -Q/3 @ LDIR 0
3300 MOVE 0,-Q/2 @ LABEL "IMPRIM
IR PANTALLA"
3310 MOVE 14*N0/18,-Q/2 @ INPUT
R$
3320 IF R$="N" OR R$="n" THEN GO
TO 3360
3330 PEN 1 @ GCLEAR -Q/3
3340 MOVE 5*N0/18,-Q/2 @ LABEL "
N.de inyeccion"
3345 PRINT @ PRINT
3350 COPY
3360 PEN -1
3405 SCALE -7,18,-Q/2,Q*1.5
3406 GCLEAR -Q/3
3410 MOVE -7,-Q/2 @ LABEL "Pulse
'SCRATCH/CONT'para terminar
"
3412 PAUSE
3413 !
3415 PEN 1 @ GCLEAR
3416 SCALE 0,10,0,10
3420 MOVE 1,6 @ LABEL " FIN DEL
EXPERIMENTO"
3430 MOVE 1,5 @ LABEL " Espero q
ue este satisfecho"
3440 MOVE 1,4 @ LABEL " del resu
ltado."
3450 MOVE 0,7 @ IDRAW 10,0 @ IDR
AW 0,-4 @ IDRAW -10,0 @ IDR
AW 0,4
4000 RETURN
4050 !
4051 !
4052 ! SUBROUTINA DE ERRORES
4053 ! =====
4100 DISP @ DISP @ DISP "-----
-----"
4101 DISP "Pulse la tecla [SCRAT
CH/CONT] para volver a co
rrer el programa"
4102 PAUSE

```



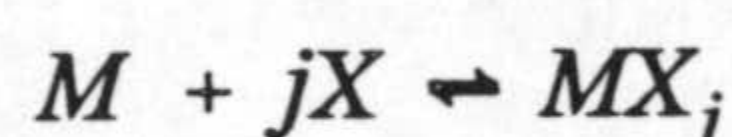
```

4103 RETURN
4150 !
4250 !
4251 ! SUBROUTINA DEL ABORTO
4252 ! =====
4300 IF Z7=1 THEN 4301 ELSE 4303
4301 BEEP @ RETURN
4303 N0=S @ Z7=1
4304 GCLEAR -2*Y1/1.2 @ MOVE -X2
      /6,-2*Y1 @ LABEL "INYECCION
      ES VAN A SER ABORTADAS"
4305 MOVE U,M9 @ RETURN
4350 !
4351 !
4400 IF Z8=1 THEN 4401 ELSE 4403
4401 BEEP @ RETURN
4403 N1=S-N0 @ Z8=1
4404 GCLEAR -2*Y1/1.2 @ MOVE -X2
      /6,-2*Y1 @ LABEL "AGITACION
      ES VAN A SER ABORTADAS"
4405 MOVE U,M9 @ RETURN
4450 !
4451 !
4500 IF Z9=1 THEN 4501 ELSE 4503
4501 BEEP @ RETURN
4503 N2=S-N0-N1 @ Z9=1
4504 GCLEAR -2*Y1/1.2 @ MOVE -X2
      /5,-2*Y1 @ LABEL "LINEAS BA
      SES VAN A SER ABORTADAS"
4505 MOVE U,M9 @ RETURN

```


Apéndice 3: Programa SIMCAL.

SIMCAL es un programa para simular valoraciones calorimétricas en el caso general de que la macromolécula M, sin disociarse ni agregarse durante la valoración, puede interaccionar con un sólo tipo de ligando X. La macromolécula puede tener n sitios diferentes o iguales, numerados desde 1 hasta n. La unión de j moléculas de ligando está descrita por el equilibrio:



con una variación en la entalpía de reacción ΔH_j^0 y una constante de equilibrio macroscópica β_j . Las ecuaciones utilizadas en el programa están descritas en los Capítulos 1 y 3. La ecuación básica de la simulación de los calores q_i a cada inyección i está dada por:

$$q_i = \frac{\sum_{j=0}^n \beta_j x_i^j \Delta H_j^0}{\sum_{j=0}^n \beta_j x_i^j} M_{t,i} V_e - \left[\frac{\sum_{j=0}^n \beta_j x_{i-1}^j \Delta H_j^0}{\sum_{j=0}^n \beta_j x_{i-1}^j} M_{t,i-1} (V_e - v) + \frac{\sum_{j=0}^n \beta_j x_j^j \Delta H_j^0}{\sum_{j=0}^n \beta_j x_j^j} M_j v \right]$$

x_i es la concentración de ligando libre en la célula después de la inyección número i y x_j la concentración libre de ligando en la jeringa. M_t M_j son las concentración totales de la macromolécula en el bulbo de reacción y en la jeringa respectivamente.

El programa, cuyo listado se da en las páginas 263-272, se ha escrito con el lenguaje QBASIC versión 4.5. El programa necesita al principio la introducción de diferentes parámetros como las concentraciones de los reactivos (la concentración de macromolécula inicial en la célula y las concentraciones de macromolécula y ligando en la jeringa), el número de sitios por macromolécula (n), el volumen de inyección (v) y el volumen efectivo del bulbo de reacción (V_e), el número de inyecciones, las constantes de equilibrio β_j y sus correspondientes entalpías ΔH_j^0 , y el valor de la tolerancia en la concentración de ligando libre (tolerancia que tiene que ser menor que 1, siendo el valor por defecto 0.0001). En el caso de que los n sitios son independientes e idénticos, hay que tener en cuenta de que las constantes β_j , que se introducen en el programa, se relacionan con la constante intrínseca k

de unión, que es la misma para todos los sitios, por la expresión:

$$\beta_j = \frac{n!}{(n-j)!j!} k^j$$

y ΔH_j^0 se relaciona con ΔH^0 ; la variación en la entalpía de reacción, por:

$$\Delta H_j^0 = j\Delta H^0$$

Para simular los valores de q_i , la concentración de ligando libre x_i se calcula a partir de las concentraciones totales de macromolécula y ligando y las constantes de equilibrio β_j , y es la solución de una ecuación de grado $n+1$ (ver Capítulo 1).

$$-X_t + \sum_{j=1}^n (jM_t\beta_j - X_t\beta_j + \beta_{j-1})x^j + \beta_n x^{n+1} = 0$$

Esta solución se encuentra obviamente comprendida entre cero y la concentración total de ligando X_t , y se determina por el método iterativo Regula Falsi. Este método consiste simplemente en dividir el intervalo $[0, X_t]$ en pequeños intervalos iguales de magnitud $= X_t$ multiplicada por la tolerancia, y ir después buscando en que intervalo de éstos ocurre un cambio en el signo de la ecuación anterior. Una vez encontrado el intervalo que contiene a la solución, se procede después iterativamente a refinar la solución exacta. Este procedimiento se repite para cada inyección i . En el caso de que la unión es muy fuerte, x_i es muy pequeña y por consiguiente el valor de la tolerancia introducido por el usuario en el programa tiene que ser muy pequeño también, menor que el valor establecido por defecto 0.0001. Los valores simulados así se presentan en una tabla junto con las concentraciones de los reactivos. Existe la posibilidad de grabar los datos que pueden ser importados después con algún procesador gráfico o con el programa ANALCAL (ver Apéndice siguiente). Finalmente se puede ver una serie de gráficas de diferentes tipos (q vs. número de inyección, fracción de saturación vs. logaritmo neperiano de x , representación de Hill, etc.).

'Programa para simular calores en el calorímetro de titulación Gill

```
DIM Lt(110), Mt(110), LigLib(110), LnLigLib(110), EntalpiaMol(110)
DIM Calor(110), ParUnion(110)
DIM i, j, Incremento, variable AS INTEGER
DIM Beta(10), Entalpia(10), a(9, 110)
DIM X(110), Y(110), XGr(110), YGr(110)
```

SCREEN 9

Menu:

ON ERROR GOTO Errores

CLS 0: CLS : COLOR 7, 1

```
LOCATE 1, 18: PRINT " Mohamed El Harrous, 1991 "
LOCATE 2, 16: PRINT "===== "
LOCATE 10, 16: PRINT "Programa para la simulaciones de calores de unión "
LOCATE 11, 16: PRINT "macromolécula-ligando en el microcalorímetro de "
LOCATE 12, 16: PRINT "titulación Gill. "
LOCATE 21, 1: PRINT STRING$(80, 205)
LOCATE 22, 16: INPUT " 1) Empezar simulación      2) Salir del programa "; Opcion
```

IF Opcion <> 1 THEN GOTO SalidaFinal

```
CLS 0: CLS
SCREEN 9
VIEW (10, 40)-(630, 300), 1, 7: WINDOW (0, 0)-(1000, 1000)
LOCATE 3, 25: PRINT " Simulacion de calores de union "
```

'Introducción de parámetros

```
LOCATE 6, 4: PRINT " Concentración de Ligando en      la Jeringa (mol/l): "
LOCATE 7, 4: PRINT " Concentración de Macromolécula en la Jeringa (mol/l): "
LOCATE 8, 4: PRINT " Concentración de Macromolecula en la Célula (mol/l): "
LOCATE 10, 4: PRINT " Número de sitios por Macromolécula (No mayor que 8): "
LOCATE 12, 4: PRINT " Volumen por cada inyección (microlitro): "
LOCATE 13, 4: PRINT " Volumen efectivo de la célula (microlitro): "
LOCATE 15, 4: PRINT " Número de inyecciones (No mayor que 100): "
```

LOCATE 22, 1: PRINT STRING\$(80, 205)

LOCATE 6, 65: INPUT "", Lig: LOCATE 7, 65: INPUT "", MacJeri: LOCATE 8, 65: INPUT "", MacCel

DO

```
LOCATE 10, 65: PRINT "      ": LOCATE 10, 65: INPUT "", Nsitios
LOOP UNTIL Nsitios <= 8 AND Nsitios <> 0
```



```

LOCATE 12, 65: INPUT "", Volumen0: LOCATE 13, 65: INPUT "", VolumenEf
VolumenEf = VolumenEf * .000001: Volumen0 = Volumen0 * .000001

DO: LOCATE 15, 65: PRINT "      ": LOCATE 15, 65: INPUT "", Nudat%
LOOP UNTIL Nudat% <= 100

CLS 0

LINE (10, 300)-(1000, 1000), , B

LOCATE 18, 3: PRINT " Vaya introduciendo las Constantes de unión y sus correspondientes Entalpías"
LOCATE 19, 36: PRINT CHR$(225); "n": LOCATE 21, 36: PRINT CHR$(127); "Hn"
LOCATE 20, 25: PRINT "M + n L "; CHR$(27); "-----"; CHR$(26); " MLn "
LOCATE 22, 1: PRINT STRING$(80, 205)

FOR i = 1 TO Nsitios
  LOCATE 5 + i, 8: PRINT CHR$(225); i; "( M-"; i; ") = "
  LOCATE 5 + i, 45: PRINT CHR$(127); "H"; i; " ( Kcal/mol) = "
NEXT i
LOCATE 15, 8: PRINT "Tolerancia en [Ligando libre] ( 0.0001 por defecto ):"

FOR i = 1 TO Nsitios
  LOCATE 5 + i, 23: INPUT "", Beta(i): LOCATE 5 + i, 65: INPUT "", Entalpia(i)
NEXT i

LOCATE 15, 62: INPUT "", Tolerancia: IF Tolerancia = 0 THEN Tolerancia = .0001

COLOR 14, 1
LOCATE 23, 10: PRINT " [ End ]- Continuar           [ Esc ]- Menu "
COLOR 7, 1

DO
  DO: Tecla$ = INKEY$: LOOP UNTIL Tecla$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT$(Tecla$, 1))
  LOOP UNTIL NumeroTecla% = 13 OR NumeroTecla% = 27
  IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu

LOCATE 23, 10: PRINT "

'-----'
' Comienzo de la simulación
'-----'

LINE (250, 420)-(800, 800), , BF
LOCATE 9, 25: PRINT "      ": LOCATE 10, 25: PRINT " Simulaciones en
marcha "
LOCATE 11, 25: PRINT "      ": LOCATE 13, 35: PRINT "Inyección : "

'Calculo de la concentración de Macromolécula y Ligando a cada paso en la célula

Dil = 1 - Volumen0 / VolumenEf
Lt(0) = 0: Mt(0) = MacCel
FOR i = 1 TO Nudat%
  Lt(i) = Lig * (1 - Dil ^ i): Mt(i) = MacCel * Dil ^ i + MacJeri * (1 - Dil ^ i)
NEXT i

```

'Determinación de la concentración de Ligando libre en la célula a cada paso

'Cálculo de los coeficientes del polinomio de la ecuación en la concentración de ligando libre en la célula

```
Beta(0) = 1: Flag=0
FOR j = 1 TO Nsitios
  FOR i = 1 TO Nudat%
    a(j, i) = j * Mt(i) * Beta(j) - Lt(i) * Beta(j) + Beta(j - 1)
  NEXT i
NEXT j
```

```
FOR i = 1 TO Nudat%
  a(0, i) = -Lt(i): a(Nsitios + 1, i) = Beta(Nsitios)
NEXT i
```

GOSUB LigLib

'Determinación de la concentración de Ligando libre en la Jeringa

'Calculo de los coeficientes del polinomio de la ecuación en la concentración de ligando libre en la Jeringa

```
Flag = 1: a(0, 1) = -Lig
FOR j = 1 TO Nsitios
  a(j, 1) = j * MacJeri * Beta(j) - Lig * Beta(j) + Beta(j - 1)
NEXT j
```

GOSUB LigLib

'Cálculo de los calores simulados por cada inyección

'Cálculo de la Entalpía por mol de Macromolécula en la Célula (EntalpiaMol)

```
EntalpiaMol(0) = 0
FOR i = 1 TO Nudat%
  Numerador = 0: Denominador = 1
  FOR j = 1 TO Nsitios
    Numerador = Numerador + Entalpia(j) * Beta(j) * LigLib(i) ^ j
    Denominador = Denominador + Beta(j) * LigLib(i) ^ j
  NEXT j
  EntalpiaMol(i) = Numerador / Denominador
NEXT i
```

'Cálculo de la entalpia por mol de Macromolécula en la Jeringa (Entalpia0)

```
Numerador = 0: Denominador = 1
FOR j = 1 TO Nsitios
  Numerador = Numerador + Entalpia(j) * Beta(j) * LigLibJeri ^ j
  Denominador = Denominador + Beta(j) * LigLibJeri ^ j
NEXT j
Entalpia0 = Numerador / Denominador
```

'Cálculo de los calores en microcalorías


```
FOR i = 1 TO Nudat%
  Calor(i) = (Mt(i) * VolumenEf * EntalpiaMol(i) - Mt(i - 1) * (VolumenEf - Volumen0) * EntalpiaMol(i - 1) - Volumen0 * MacJeri * Entalpia0) * 1E+09
NEXT i
```

'Presentacion de los datos

Presentacion:

```
CLS 0: CLS
SCREEN 9
VIEW (0, 40)-(630, 280), 1, 7: WINDOW (0, 0)-(1000, 1000)
```

```
FOR i = 0 TO 4
  LINE (80 + i * 185, 0)-(80 + i * 185, 1000)
NEXT i
```

```
LOCATE 1, 2: PRINT " N#"; TAB(10); "[Lig.tot.]"; TAB(25); "[Lig.lib.]"; TAB(39); "[Mac.tot.]";
TAB(53); "[Mac.lib] "; TAB(69); "Calor"
LOCATE 2, 2: PRINT " (mM) (mM) (mM) (mM) (mic.cal)"
LOCATE 21, 1: PRINT STRING$(80, 205)
COLOR 14, 1
LOCATE 22, 1: PRINT " [ AvPág ]- Mas datos [ Inicio ]- Primeros datos [ F1 ]- Graficas "
LOCATE 23, 1: PRINT " [ S ] - Salvar datos [ Esc ]- Inicio Programa."
COLOR 7, 1
```

PrimerosDatos:

```
i = 1: n = 1: resta = 0: Factor1 = 0
```

MasDatos:

```
FOR i = i TO 15 * n
  IF i > Nudat% THEN Factor1 = 1
  LOCATE 5 + i - resta, 2: PRINT USING "##"; i - i * Factor1
  LOCATE 5 + i - resta, 9: PRINT USING "###.#####"; Lt(i) * 1000! - Lt(i) * Factor1 * 1000
  LOCATE 5 + i - resta, 24: PRINT USING "###.#####"; LigLib(i) * 1000! - LigLib(i) * Factor1 * 1000
  LOCATE 5 + i - resta, 39: PRINT USING "###.#####"; Mt(i) * 1000! - Mt(i) * Factor1 * 1000
  LOCATE 5 + i - resta, 53: PRINT USING "###.#####"; (Mt(i) - (Lt(i) - LigLib(i)) / Nsitios) * 1000! * (1 - Factor1)
  LOCATE 5 + i - resta, 68: PRINT USING "#####.#"; Calor(i) - Calor(i) * Factor1
NEXT i
```

DO

```
DO: Tecla$ = INKEY$: LOOP UNTIL Tecla$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT$(Tecla$, 1))
LOOP UNTIL NumeroTecla% = 71 OR NumeroTecla% = 81 OR NumeroTecla% = 59 OR NumeroTecla% = 27 OR NumeroTecla% = 115
```

IF NumeroTecla% = 81 THEN

IF n = 7 THEN GOTO PrimerosDatos

n = n + 1: resta = resta + 15: GOTO MasDatos

END IF


```
IF NumeroTecla% = 71 THEN GOTO PrimerosDatos
IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu
```

'Salvar datos de la simulación

```
IF NumeroTecla% = 115 THEN
  LOCATE 22, 1: PRINT " Nombre del fichero (especificar directorio):"
  LOCATE 23, 1: PRINT " Comentario:"
  LOCATE 22, 48: INPUT "", Nombre$: LOCATE 23, 13: INPUT " ", Comentario$

  CLS 0: CLS : LOCATE 22, 30: PRINT " Salvando datos....."

  OPEN "o", #1, Nombre$ + ".dat"
  WRITE #1, Nudat%, MacCel, MacJeri, Lig, Volumen0 * 1000000!, VolumenEf * 1000000!
  FOR i = 1 TO Nudat%
    WRITE #1, Calor(i)
  NEXT i
  WRITE #1, Comentario$
  CLOSE #1
  GOTO Presentacion
END IF
```

'Graficas

Grafica1: 'Representación de los calores frente al número de inyección.

```
FOR i = 1 TO Nudat%
  X(i) = i: Y(i) = Calor(i)
NEXT i
X$ = "Calor/inyeccion (mic.cal.) VS Inyección "
Y$ = " N#          N#      Calor  "
```

GOSUB Graficas: IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Presentacion

Grafica2: 'Representación del calor por mol de ligando libre añadido frente a Ligando total/Macromolecula total

```
FOR i = 1 TO Nudat%
  X(i) = Lt(i) / Mt(i): Y(i) = Calor(i) * 1E-09 / (Volumen0 * LigLibJeri)
NEXT i
X$ = "Calor/mol de ligando añadido VS Ltot./Mtot."
Y$ = " N#          Ltot./Mtot. Calor  "
```

GOSUB Graficas: IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Grafica1

Grafica3: 'Representación de la fracción de sitios ocupados frente a logaritmo de la concentración de ligando libre

```

FOR i = 1 TO Nudat%
  Numerador = 0: Denominador = 1
  FOR j = 1 TO Nsitios
    Numerador = Numerador + j * Beta(j) * LigLib(i) ^ j
    Denominador = Denominador + Beta(j) * LigLib(i) ^ j
  NEXT j
  ParUnion(i) = Numerador / Denominador: Y(i) = ParUnion(i) * 100 / Nsitios
NEXT i

```

```

FOR i = 1 TO Nudat%
  LnLigLib(i) = LOG(LigLib(i)): X(i) = LnLigLib(i)
NEXT i
X$ = "Fraccion de saturacion VS Ln( Lig.Lib. )"
Y$ = " N#      Ln(Lig.Lib) Fra.Sat. "

```

GOSUB Graficas: IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Grafica2

Grafica4:

'Representación de Hill

```

FOR i = 1 TO Nudat%
  X(i) = LnLigLib(i)
  Y(i) = LOG(ParUnion(i) / (Nsitios - ParUnion(i)))
NEXT i
X$ = "      Representación de Hill      "
Y$ = " N#      Ln(Lig.Lib) Ordenada "

```

GOSUB Graficas: IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Grafica3

Grafica5:

'Representacion de la entalpia por mol de Macromolécula frente a logaritmo de la concentracion de ligando libre

```

FOR i = 1 TO Nudat%
  X(i) = LnLigLib(i): Y(i) = EntalpiaMol(i)
NEXT i
X$ = " (Hi - Ho)Kcal/mol VS Ln( Lig.Lib. ) "
Y$ = " N#      Ln(Lig.Lib) (Hi-Ho). "

```

GOSUB Graficas: IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Grafica4

Grafica6:

'Representacion de la entalpia por mol de Macromolécula frente a la relación: Ligando total/Macromolécula total

```

FOR i = 1 TO Nudat%
  X(i) = Lt(i) / Mt(i): Y(i) = EntalpiaMol(i)
NEXT i
X$ = " (Hi - Ho)Kcal/mol VS Ltot./Mtot. "
Y$ = " N#      Ltot./Mtot. (Hi-Ho). "

```

GOSUB Graficas: IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Grafica5


```

IF NumeroTecla% = 81 THEN
  VIEW (320, 150)-(570, 200), 4
  LOCATE 13, 42: PRINT " No hay más graficas ( O.K ) "
  DO
    DO: Tecla$ = INKEY$: LOOP UNTIL Tecla$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT$(Tecla$, 1))
  LOOP UNTIL NumeroTecla% = 13

  GOTO Grafica6
END IF

```

```

'*****
'                                     'SUBROUTINAS
'*****
'
'Subrutina del calculo de la concentración de ligando libre.
'

```

LigLib:

```

i = 0
Suma:
i = i + 1

t = .00001
X1 = 0: v = X1: GOSUB Funcion: Y1 = S
IF Flag = 1 THEN X3 = Lig ELSE X3 = Lt(i)
XS = X3 * Tolerancia
X = X1

```

Incremento:

```

X = X + XS: v = X: GOSUB Funcion: Y = S
IF SGN(Y) = SGN(Y1) THEN
  X1 = X: Y1 = Y: GOTO Incremento
  ELSE
  X2 = X: Y2 = Y
END IF

```

GOSUB Mohamed

```

IF SGN(Y) = SGN(Y2) THEN
  X2 = X: Y2 = Y
  ELSE
  X1 = X2: Y1 = Y2: X2 = X: Y2 = Y
END IF

```

Iterar:

GOSUB Mohamed

```

IF Flag = 1 THEN
  IF ABS(X1 - X) < t THEN LigLibJeri = X
  ELSE
  IF ABS(X1 - X) < t THEN LigLib(i) = X

```



```
LOCATE 13, 46: PRINT "  ": LOCATE 13, 47: PRINT i
END IF
```

```
IF i = Nudat% OR Flag = 1 THEN
RETURN
```

```
ELSE
GOTO Suma
END IF
```

```
IF ABS(X1 - X) >= t THEN
X1 = X: Y1 = Y
GOTO Iterar
END IF
```

'Sub-subrutinas de la concentración de ligando libre

Mohamed:

```
X = (X1 * Y2 - X2 * Y1) / (Y2 - Y1): v = X: GOSUB Funcion
Y = S
RETURN
```

Funcion:

```
S = 0
FOR j = 0 TO Nsitios + 1
S = S + a(j, i) * v ^ j
NEXT j
RETURN
```

'Subrutina de Graficas

Graficas:

```
IF NumeroTecla% = 59 THEN CLS 0 ELSE CLS 1
```

```
SCREEN 9: VIEW (50, 20)-(610, 290), 7, 0: VIEW (10, 10)-(300, 260), 1, 7
WINDOW (-100, -100)-(1100, 1100)
```

```
LOCATE 20, 8: PRINT X$: LOCATE 5, 40: PRINT Y$
LOCATE 12, 40: PRINT " [ M ]Cel.": LOCATE 12, 55: PRINT USING "####.###"; MacCel * 1000!:
LOCATE 12, 65: PRINT " mM "
LOCATE 13, 40: PRINT " [ M ]Jer.": LOCATE 13, 55: PRINT USING "####.###"; MacJeri * 1000!:
LOCATE 13, 65: PRINT " mM "
LOCATE 14, 40: PRINT " [ L ]Jer.": LOCATE 14, 55: PRINT USING "####.###"; Lig * 1000!: LOCATE
14, 65: PRINT " mM "
LOCATE 15, 40: PRINT " Vol./Iny.": LOCATE 15, 55: PRINT USING "####.###"; Volumen0 * 1000000!:
LOCATE 15, 65: PRINT " "; CHR$(230); "l "
LOCATE 16, 40: PRINT " Vol.Cel. ": LOCATE 16, 55: PRINT USING "####.###"; VolumenEf * 1000000!:
LOCATE 16, 65: PRINT " "; CHR$(230); "l "
```

```
LOCATE 22, 1: PRINT STRING$(80, 205)
COLOR 14, 1
```

```
LOCATE 23, 2: PRINT "[AvPág / RePág]- Continuar [ "; CHR$(27); " / "; CHR$(26); " ]- Leer datos [
Esc ]- Inicio Programa"
```


COLOR 7, 1

'---Cálculo de los factores de escala

Max = -1E+10: Min = 1E+10: IndiceMax = 0: IndiceMin = 0

FOR i = 1 TO Nudat%

IF X(i) > Max THEN Max = X(i): IndiceMax = i

IF X(i) < Min THEN Min = X(i): IndiceMin = i

NEXT i

IntervaloX = ABS(X(IndiceMax) - X(IndiceMin))

Max = -1E+10: Min = 1E+10: IndiceMax = 0: IndiceMin = 0

FOR i = 1 TO Nudat%

IF Y(i) > Max THEN Max = Y(i): IndiceMax = i

IF Y(i) < Min THEN Min = Y(i): IndiceMin = i

NEXT i

IntervaloY = ABS(Y(IndiceMax) - Y(IndiceMin))

'---Graduación de los ejes

FOR i = 0 TO 5

LINE (-100, i * 1200 / 5 - 100)-STEP(20, 0), 7

LINE (i * 1200 / 5 - 100, -100)-STEP(0, 20), 7

LINE (1100, i * 1200 / 5 - 100)-STEP(-20, 0), 7

LINE (i * 1200 / 5 - 100, 1100)-STEP(0, -20), 7

NEXT i

'---Conversión de las coordenadas (X,Y) en coordenadas gráficas (XGr,YGr) y dibujo de los puntos

FOR i = 1 TO Nudat%

XGr(i) = ABS(X(i) - X(1)) * 1000 / IntervaloX

YGr(i) = ABS(Y(i) - Y(IndiceMin)) * 1000 / IntervaloY

LINE (XGr(i) - 4, YGr(i) - 10)-(XGr(i) + 4, YGr(i) + 10), 7, BF, 0

NEXT i

'---Unir puntos por lineas

FOR i = 1 TO Nudat% - 1

LINE (XGr(i), YGr(i))-(XGr(i + 1), YGr(i + 1)), 7

NEXT i

PuntoInicial = 1: PuntoFinal = Nudat%: i = 1

LINE (XGr(1) - 4, YGr(1) - 10)-(XGr(1) + 4, YGr(1) + 10), 14, BF, 0

LOCATE 7, 41: PRINT USING "###"; 1: LOCATE 7, 55: PRINT USING "####.###"; X(1): LOCATE 7, 65:

PRINT USING "####.###"; Y(1)

DO

DO

DO: Tecla\$ = INKEY\$: LOOP UNTIL Tecla\$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT\$(Tecla\$, 1))

LOOP UNTIL NumeroTecla% = 75 OR NumeroTecla% = 77 OR NumeroTecla% = 81 OR NumeroTecla% = 27 OR NumeroTecla% = 73

IF NumeroTecla% = 81 OR NumeroTecla% = 73 THEN RETURN

IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu

'---Leer las coordenadas de los puntos

IF NumeroTecla% = 77 THEN

IF i = PuntoFinal THEN GOTO Saltar

i = i + 1

LINE (XGr(i - 1) - 4, YGr(i - 1) - 10)-(XGr(i - 1) + 4, YGr(i - 1) + 10), 7, BF, 0

LINE (XGr(i) - 4, YGr(i) - 10)-(XGr(i) + 4, YGr(i) + 10), 14, BF, 0

ELSE

IF i = PuntoInicial THEN GOTO Saltar

i = i - 1

LINE (XGr(i + 1) - 4, YGr(i + 1) - 10)-(XGr(i + 1) + 4, YGr(i + 1) + 10), 7, BF, 0

LINE (XGr(i) - 4, YGr(i) - 10)-(XGr(i) + 4, YGr(i) + 10), 14, BF, 0

END IF

LOCATE 7, 41: PRINT USING "##"; i: LOCATE 7, 55: PRINT USING "####.###"; X(i)

LOCATE 7, 65: PRINT USING "####.###"; Y(i)

Saltar:

LOOP

RETURN

'Subrutina de los Errores

Errores:

CLS 0: COLOR 7, 0

VIEW (10, 40)-(630, 280), 7, 4: WINDOW (0, 0)-(1000, 1000)

LINE (220, 300)-(820, 700), 4, BF: LINE (170, 350)-(770, 750), 0, BF

SELECT CASE ERR

CASE ELSE

LOCATE 11, 25: PRINT " Error no identificado "

LOCATE 12, 25: PRINT " Vuelve a correr el programa "

LOCATE 13, 25: PRINT " introduciendo otros datos. "

END SELECT

DO

DO: Tecla\$ = INKEY\$: LOOP UNTIL Tecla\$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT\$(Tecla\$, 1))

LOOP UNTIL NumeroTecla% = 27

CLS : RESUME Menu

'Fin del programa

SalidaFinal:

END

Apéndice 4: Programa ANALCAL.

ANALCAL es un programa para analizar experimentos de valoración calorimétrica con el objeto de determinar, en un proceso de unión de un ligando X a una macromolécula M con n sitios independientes e idénticos, la variación en la entalpía por mol de ligando unido ΔH° , la constante de equilibrio de asociación k y el número de sitios de unión del ligando a la macromolécula n.

El programa, cuyo listado puede verse en las páginas 279-301, se ha escrito con el lenguaje QBASIC versión 4.5.

El programa puede considerarse dividido en cinco partes, a saber: Entrada de datos, análisis de datos, errores en los parámetros del ajuste, tabulación de datos experimentales junto con los del ajuste y finalmente algunas representaciones gráficas. El programa empieza con un menú principal de tres opciones: Entrada de datos, Análisis de datos y Salir.

La primera opción es, como indica su nombre para entrar los datos y salvarlos después en un fichero (con la extensión .DAT). Los datos a introducir son: el nombre del fichero con que se grabarán los datos, los valores de las concentraciones de los reactivos en la célula y la jeringa; M_0 , M_J y X_J , el volumen de inyección v, el volumen efectivo V_e de la célula de reacción, el número de inyecciones N_d , un comentario y finalmente los calores (sin ninguna corrección todavía) de la valoración medidos en el calorímetro en cada inyección i. Los datos se almacenan después, en el orden: N_d , M_0 , M_J , X_J , v, V_e , q, y finalmente el Comentario.

La segunda opción de "Análisis de datos" es la más importante del programa, que consiste en ajustar los calores de reacción q_i al modelo de n sitios independientes e idénticos:

$$q_i = \frac{n\Delta H^\circ k x_i}{1+kx_i} M_{t,i} V_e - \left[\frac{n\Delta H^\circ k x_{i-1}}{1+kx_{i-1}} M_{t,i-1} (V_e - v) + \frac{n\Delta H^\circ k x_J}{1+kx_J} M_J v \right]$$

El origen de esta ecuación y el significado de las notaciones utilizadas está dado en los Capítulos 1 y 3.

Esta ecuación corresponde al caso ideal en el que el efecto térmico en la célula sea

enteramente debido al proceso de unión del ligando a la macromolécula. Sin embargo, experimentalmente, el calor medido conlleva además contribuciones del calor de agitación q_a , de inyección de disolvente en disolvente q_{iny} , y de dilución de los reactivos q_d y especialmente del ligando. La dilución del ligando está caracterizada por una entalpía relativa molar aparente ΦL_2 , que corresponde al calor disipado cuando se lleva un mol de ligando de una concentración x a dilución infinita. La ecuación completa tiene que tener en cuenta de estos tres efectos caloríficos adicionales. q_a , q_{iny} y ΦL_2 se determinan en experimentos independientes y se introducen después en el programa. La determinación de ΦL_2 a partir de los calores de dilución del ligando puede hacerse con el mismo programa en donde, por supuesto, en la opción de "Entrada de datos" la concentración de la macromolécula en la célula y en la jeringa son cero. En los casos analizados en esta Tesis las dependencias de ϕL_2 con las concentraciones encontradas han sido del tipo:

$$\phi L_2 = \zeta x \quad \text{ó} \quad \phi L_2 = \zeta \sqrt{x}$$

en donde ζ es un factor de proporcionalidad. Al contrario de q_a y q_{iny} , el calor de dilución del ligando q_d no es constante y varia a lo largo de la valoración, viendo dado para cada inyección por la expresión (ver Capítulo 1 y 4).

$$q_{d,i} = V_e x_i \phi L_2(x_i) - [(V_e - v) x_{i-1} \phi L_2(x_{i-1}) + v x_j \phi L_2(x_j)]$$

En un experimento en que los calores de dilución sean significativos la ecuación a la que se ajustan los calores totales tras la resta de los términos constantes q_a y q_{iny} es la suma de las dos ecuaciones anteriores.

En general los parámetros determinados a partir del ajuste de una curva de valoración calorimétrica son ΔH° , k y n , pero a veces la falta del conocimiento adecuado de la concentración de uno de los reactivos no permite llevar a cabo el ajuste, por lo que, aparte de los tres parámetros anteriores, existe la posibilidad de ajustar un parámetro adicional (parámetro X) que puede ser dicha concentración, a costa de conocer el valor de n (o bien k) que tiene que fijarse en el ajuste (no se puede ajustar más de tres parámetros a la vez).

Como normalmente el calor medido en la primera inyección no es correcto, hay la posibilidad de escoger un intervalo de número de inyecciones a analizar, eliminando puntos al principio o al final de la curva de valoración.

El ajuste se lleva a cabo minimizando SRC; la suma del cuadrado de las diferencias entre los calores experimentales y los calores teóricos. Antes de empezar el ajuste, el programa necesita una estimación razonable de los parámetros ΔH° , k y n o el parámetro X . Si se conoce alguno de estos parámetros, existe la posibilidad de fijarlo en el ajuste. El método iterativo del ajuste utilizado está basado en el algoritmo Simplex (Nedler y Mead, 1965) que consiste en mover, en nuestro caso, una pirámide de cinco vértices y de base rectangular hacia el mínimo de una superficie S representando la variación de SRC con los valores de los 4 parámetros. Cada vértice entonces está definido por cinco coordenadas (ΔH° , k , n , parámetro X , SRC), y el movimiento de la pirámide hacia el mínimo de S se hace mediante una serie organizada de reflexiones, expansiones, contracciones y encogimientos, tratándose en cada iteración siempre de reemplazar el vértice (o los vértices) de mayor SRC por otro (o otros) de menor SRC. El criterio de salida está condicionado a que la diferencia entre la media de SRC de los cinco vértices en dos iteraciones consecutivas sea menor que un valor denominado tolerancia. Este último es un parámetro a opción del usuario y debe depender de la precisión de los datos experimentales. Nosotros hasta hoy no sabemos esta dependencia y escogemos siempre cero como valor para la tolerancia. Hay que decir también que si el número de iteraciones exceda 2000, el ajuste se para dando el mensaje de que la convergencia no ha sido alcanzada. Pero normalmente se llega al mejor ajuste en mucho menos de 2000 iteraciones (entre 150-200 iteraciones), y en tiempo de 5 segundos aproximadamente en un PC 486.

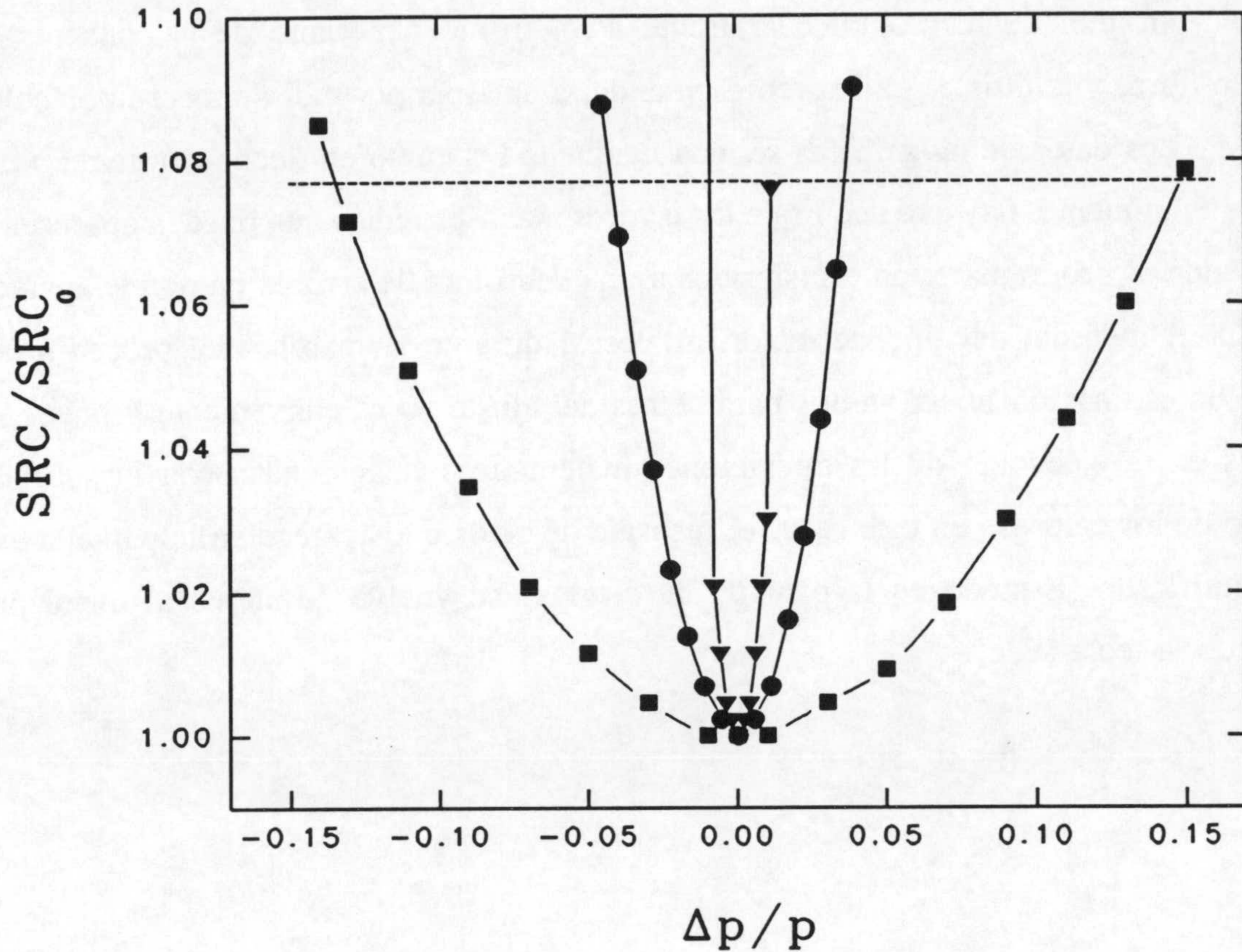
A veces el criterio de salida se cumple en un mínimo local y no absoluto. Esto se puede comprobar a simple vista de como se ha quedado la calidad del ajuste, que se presenta en la pantalla en una representación gráfica al final de cada ajuste. En este caso para mejorar el ajuste, existe la posibilidad de volver a reajustar de nuevo partiendo de una estimación inicial de los parámetros diferente de la del ajuste anterior y eso pulsando simplemente la tecla [F3]. A veces también, la superficie S presenta varios mínimos absolutos, correspondientes a diferentes valores en los parámetros del ajuste. En este caso no hay un sólo conjunto de los mismos que mejor representa a los datos, y para obtener un ajuste único hay que fijar más parámetros en valores conocidos si es posible. En cualquier caso, para asegurarse de que los parámetros obtenidos son los únicos que representan a los datos, hay que hacer más de un ajuste partiendo de estimaciones iniciales diferentes.

Al final de cada ajuste, se puede consultar los valores de los parámetros que se presentan en una página de pantalla junto con la desviación estándar del ajuste. Los parámetros se presentan con sus unidades y sus estados; A: parámetro ajustado y F: parámetro fijado en el ajuste. En el caso de que la unión del ligando a la macromolécula es muy fuerte o muy débil, no se puede determinar k a partir del ajuste y aparece en la pantalla el mensaje de que k puede no ser correcto.

Estando en la misma pantalla, la determinación del error del ajuste en cada parámetro se realiza pulsando la tecla [F10]. El método de la determinación de los errores está basado en el de Bevington (1969) que consiste en hacer varios ajustes determinando cada vez SRC final cuando se fija el parámetro p , al cual se está determinando su error, en un valor $p_0 + \Delta p$, siendo p_0 el valor obtenido en el mejor ajuste. El error absoluto Δp se obtiene cuando se cumple la relación $SRC = SRC_0(N_d - n_p + 1)/(N_d - n_p)$, siendo n_p el número de parámetros a ajustar y SRC_0 suma de los residuos al cuadrado correspondiente al mejor ajuste. El valor del parámetro p se incrementa hacia la derecha y izquierda, y normalmente se obtiene una parábola representando SRC en función de Δp , con un mínimo en el punto $(0, SRC_0)$ (ver la figura de la página siguiente). En el caso de n , la parábola es un poco asimétrica, pero en todo caso el error considerado es el valor máximo de Δp izquierdo y derecho. Los parámetros se incrementan por valores constantes en la búsqueda del cumplimiento de la relación anterior, de manera que la precisión en los errores es de 0.05 Kcal/mol para ΔH , 1% del valor de k para k , 0.002 para n y 1% del valor del parámetro X para cada parámetro X . La determinación de los errores puede tardarse hasta 5 min en un PC 486.

Los calores experimentales y los del ajuste y las concentraciones de macromolécula total, ligando total y libre en la célula a cada etapa de la valoración se recogen en una tabla, en la pantalla. Los datos de la tabla pueden grabarse pulsando la tecla [S]. Los datos se almacenan en columnas en el mismo orden con que aparecen en la pantalla, con el mismo nombre del fichero de entrada de datos y con la extensión .CAL. Las concentraciones se almacenan en mM y los calores en μcal . El fichero puede ser importado por cualquier procesador de gráficos (Sigma-Plot por ejemplo) para representar cualquier tipo de gráficas y sacarlas por impresora.

Estando en la misma página y pulsando la tecla [F1], se accede a una serie de



Representación de la suma de los residuos al cuadrado, SRC, del ajuste de los calores de una valoración calorimétrica de la barnasa con 3'GMP (pH 7, T = 25°C) al modelo de n sitios independientes e idénticos cuando sólo uno de los tres parámetros ajustables (\blacksquare k, \bullet ΔH , \blacktriangledown n) se fijó en el ajuste en un valor $p_0 + \Delta p$. SRC está normalizado por SRC_0 , correspondiente al caso del mejor ajuste, con los parámetros p_0 , cuando no se fijó ningún parámetro. A partir de las abscisas del corte de la línea horizontal en trazo discontinuo que corresponde a $SRC/SRC_0 = (N_d - n_p + 1)/(N_d - n_p)$, siendo N_d y n_p el número de datos de la curva de valoración y el número de parámetros ajustables, se estimaron unos errores del 15% en k, 4% en ΔH^0 y 1% en n.

gráficas, representando la primera el parámetro de unión frente a logaritmo neperiano de la concentración de ligando libre, la segunda el calor por mol de ligando libre añadido frente al cociente entre las concentraciones totales de ligando y macromolécula X_t/M_t , la tercera la entalpía por mol de macromolécula frente a logaritmo neperiano de la concentración de ligando libre, y la última gráfica representando la entalpía por mol de macromolécula frente a X_t/M_t . Los datos de las gráficas se leen mediante los cursores flecha izquierda y derecha.

Finalmente, hay que decir que los errores más frecuentes que pueden aparecer al estar ejecutando el programa están transferidos a una subrutina de errores en donde aparece en la pantalla el mensaje del tipo del error. A veces, durante la marcha del procedimiento del ajuste, la estimación inicial de los parámetros del ajuste no es conveniente y puede llevar a errores en la ejecución de las operaciones matemáticas relacionadas con la subrutina del cálculo de los calores. En este caso, el mensaje de error que aparece en la pantalla es: error no identificado. Estando en la pantalla de errores, se vuelve de nuevo al menú principal pulsando la tecla [Esc].


```
*****
'Programa para analizar los calores medidos en el calorímetro de valoración Gill
*****
```

```
DIM Calor(75), CalVar(75), CalVarIn(75), CalAjuste(75)
DIM EntalpiaMol(75), EntalpiaEx(75), EntalpiaAj(75)
DIM Mt(75), Lt(75), LigLib(75), LnLigLib(75)
DIM a(5), b(5), c(5), d(5), az(200), bz(200), cz(200), dz(200), r(2000), Ssr(5)
DIM X(75), Y1(75), Y2(75), xGr(75), y1Gr(75), y2Gr(75)
DIM ParUnion(75), col(3), Nom AS STRING
```

Menu:

```
'=====
'Iniciación de algunas variables
'=====
```

```
Flota0 = 0: Flotb0 = 0: Flotc0 = 0: Flotd0 = 0: ErPar$ = " ": Opcion$ = " "
ParametroX = 0: Posicion = 0: Posicion2 = 0: Posicion3 = 0: NumPar = 0: CalCo = 0: L2 = 0
AjusteMc$ = "[F]": AjusteMj$ = "[F]": AjusteL$ = "[F]": AjusteL2$ = "[F]"
```

ON ERROR GOTO Errores

```
CLS 0: CLS : COLOR 15, 9
SCREEN 9: VIEW (10, 40)-(630, 280), 1, 7: WINDOW (0, 0)-(1000, 1000)
```

```
LOCATE 2, 5: PRINT " Mohamed El Harrous, 1992."
LOCATE 5, 3: PRINT " Programa para analizar los datos del calorímetro"
LOCATE 6, 3: PRINT " isotérmico de titulación Gill. "
LOCATE 8, 3: PRINT " Determinación de : "
LOCATE 9, 3: PRINT " - Calor molar de la reacción.. "; CHR$(127); "H."
LOCATE 10, 3: PRINT " - Constante de asociación..... k."
LOCATE 11, 3: PRINT " - Número de sitios..... n."
LOCATE 12, 3: PRINT " - Entalpia de dilución..... "; CHR$(237); "L2."
LOCATE 14, 3: PRINT " En el caso de los sitios independientes e idénticos."
```

```
'=====
'Elegir una opción: Entrar datos, Analizar datos o salir del programa
'=====
```

VolverMenu:

```
VIEW (450, 40)-(630, 280), 7, 10: WINDOW (0, 0)-(1000, 1000)
```

```
LOCATE 5, 61: PRINT " Entrar datos "
LOCATE 7, 61: PRINT " Analizar datos "
LOCATE 9, 61: PRINT " Salir "
LOCATE 21, 61: PRINT STRING$(80, 205)
COLOR 7, 9: LOCATE 23, 2: PRINT " ["; CHR$(24); " "; CHR$(25); "]"- Seleccionar opción
": COLOR 15, 9
```


LINE (140, 860)-STEP(770, 100), 14, B

Incremento = 0: Condicion = 0

DO

DO

DO: Tecla\$ = INKEY\$: LOOP UNTIL Tecla\$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT\$(Tecla\$, 1))

LOOP UNTIL NumeroTecla% = 72 OR NumeroTecla% = 80 OR NumeroTecla% = 13

IF NumeroTecla% = 13 THEN GOTO OK

IF NumeroTecla% = 72 THEN

Incremento = Incremento - 1: IF Incremento <= -1 THEN Incremento = 0
ELSE

Incremento = Incremento + 1: IF Incremento > 2 THEN Incremento = 2

END IF

FOR i = 0 TO 2: col(i) = 7: NEXT i

FOR i = 0 TO 2

IF Incremento = i THEN col(i) = 14

NEXT i

FOR i = 0 TO 2: LINE (140, 860 - i * 120)-STEP(770, 100), col(i), B: NEXT i

LOOP

OK:

ON Incremento + 1 GOTO Entradato, Anadato, Salir

'Entrada de datos

Entradato:

CLS 0: COLOR 7, 1: VIEW (45, 100)-(615, 290), 9

LOCATE 1, 1: PRINT " Entrada de datos.": LOCATE 1, 40: PRINT " Fichero: "
LOCATE 7, 1: PRINT STRING\$(80, "-")

LOCATE 3, 1: PRINT " [M]Cel.": LOCATE 3, 15: PRINT "[M]Jer.": LOCATE 3, 30: PRINT "[L]jer.":
LOCATE 3, 40: PRINT " V0 / V.Cel ": LOCATE 3, 58: PRINT "Numero de inyecciones"
LOCATE 6, 1: PRINT "Comentario:"

COLOR 14, 9: LOCATE 5, 65: PRINT "[1 - 48]": COLOR 7, 1

LOCATE 8, 9: PRINT " N# Calor N# Calor N# Calor N# Calor "
LOCATE 2, 1: PRINT STRING\$(80, "-")

Resta = 0: Suma = 8

FOR i = 1 TO 48

IF i = 13 THEN Resta = 12: Suma = 25

IF i = 25 THEN Resta = 24: Suma = 42

IF i = 37 THEN Resta = 36: Suma = 59

LOCATE 9 + i - Resta, 1 + Suma: PRINT USING "##"; i

LOCATE 9 + i - Resta, 3 + Suma: PRINT "]": LOCATE 9 + i - Resta, 5 + Suma: PRINT " "

NEXT i

LOCATE 22, 1: PRINT STRING\$(80, 205)


```

Condicion = 0
DO
  LOCATE 1, 50: PRINT " "
  LOCATE 23, 1: PRINT "Nombre del fichero especificando el directorio "
  LOCATE 1, 50: INPUT "", Nom$
  IF LEN(Nom$) > 10 OR LEN(Nom$) < 3 THEN BEEP
  Directorio$ = UCASE$(LEFT$(Nom$, 1))
  IF Directorio$ = "B" OR Directorio$ = "A" OR Directorio$ = "C" THEN Condicion = 1
LOOP UNTIL LEN(Nom$) <= 10 AND LEN(Nom$) > 2 AND Condicion = 1

LOCATE 23, 1: PRINT " Concentración de la muestra [Macromolecula] en la celula ( en mol/l ) "
LOCATE 5, 2: INPUT "", MacCel
LOCATE 23, 1: PRINT "Concentracion de la muestra [Macromolecula] en la jeringa ( en mol/l ) "
LOCATE 5, 15: INPUT "", MacJeri
LOCATE 23, 1: PRINT "Concentración de la muestra [Ligando] en la Jeringa ( en mol/l ) "
LOCATE 5, 30: INPUT "", Lig
LOCATE 23, 1: PRINT "Volumen por cada inyección ( en microlitros ) "
LOCATE 5, 42: INPUT "", V0
LOCATE 23, 1: PRINT "Volumen efectivo de la celula de reacción ( en microlitros ) "
LOCATE 5, 48: INPUT "", V
LOCATE 23, 1: PRINT " "

DO
  LOCATE 5, 61: PRINT " ": LOCATE 5, 61: INPUT "", Nudat%
LOOP WHILE Nudat% > 48 OR Nudat% < 1
LOCATE 5, 65: PRINT " "
LOCATE 6, 13: LINE INPUT "", Comentario$
IF LEN(Comentario$) > 65 THEN GOTO Entradato

Resta = 0: Suma = 8
FOR i = 1 TO Nudat%
  IF i = 13 THEN Resta = 12: Suma = 25
  IF i = 25 THEN Resta = 24: Suma = 42
  IF i = 37 THEN Resta = 36: Suma = 59
  LOCATE 9 + i - Resta, 5 + Suma: INPUT "", Calor(i)
NEXT i

'=====  

'Corrección de los datos  

'=====  

Coreccion:

LOCATE 23, 50: PRINT " ": LOCATE 23, 35: PRINT " "
LOCATE 23, 1: INPUT " Quiere corregir algun dato (s/n) :", Reponse$
IF LCASE$(Reponse$) = "s" THEN
  DO
    LOCATE 23, 64: PRINT " "
    LOCATE 23, 50: INPUT " N# del dato: ", numero
  LOOP WHILE numero <= 0 OR numero > Nudat%
  IF numero < 13 THEN FactorMult. = 0
  IF numero >= 13 AND numero <= 24 THEN FactorMult. = 1
  IF numero > 24 AND numero <= 36 THEN FactorMult. = 2
  IF numero > 36 THEN FactorMult. = 3
  LOCATE 9 + numero - FactorMult. * 12, 13 + FactorMult. * 17: PRINT " "
  LOCATE 9 + numero - FactorMult. * 12, 13 + FactorMult. * 17: INPUT "", Calor(numero)

```


GOTO Coreccion
END IF

IF LCASE\$(Reponse\$) <> "s" AND LCASE\$(Reponse\$) <> "n" THEN GOTO Coreccion

LOCATE 23, 1: PRINT " Va a salvar los datos ... Mete el disco y presione [Enter] [Esc] Cancelar"

DO

DO: Tecla\$ = INKEY\$: LOOP UNTIL Tecla\$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT\$(Tecla\$, 1))

LOOP UNTIL NumeroTecla% = 13 OR NumeroTecla% = 27

IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu

'Grabación de los datos experimentales

LOCATE 23, 1: PRINT " Esta salvando.... "

OPEN "o", #1, Nom\$ + ".dat"

WRITE #1, Nudat%, MacCel, MacJeri, Lig, V0, V

FOR i = 1 TO Nudat%

WRITE #1, Calor(i)

NEXT i

WRITE #1, Comentario\$

CLOSE #1

GOTO Menu

'Análisis de los datos

Anadato:

DO

CLS 0

LOCATE 5, 7: PRINT "Los calores van a ser ajustados a la ecuación: "

LOCATE 7, 10: PRINT "q = (n. Ve. Mt. "; CHR\$(127); "H. k. L)/(1 + K. L) + Ve. L. ";
CHR\$(237); "L2 + qa + qiny"

LOCATE 9, 7: PRINT "con :": LOCATE 11, 2: PRINT "L : concentración del ligando libre en la celula"

LOCATE 12, 2: PRINT "Mt : Concentración total de la macromolécula en la célula"

LOCATE 13, 7: PRINT "qa + qiny : Calor de agitación + calor de inyección de disolvente en disolvente"

LOCATE 13, 7: PRINT CHR\$(237); " L2 : Entalpía relativa molar aparente de dilución del ligando"

LOCATE 22, 1: PRINT STRING\$(80, 205)

'Lectura del fichero de datos.

LOCATE 23, 7: INPUT "Nombre del fichero (especificando el Directorio) ", Nom\$

IF Nom\$ = "" THEN Nom\$ = NomMemoria\$

NomMemoria\$ = Nom\$

CLS 0: LOCATE 23, 25: PRINT " Leyendo el fichero "; UCASE\$(MID\$(Nom\$, 3, LEN(Nom\$)))


```

OPEN "I", #1, Nom$ + ".DAT"
  INPUT #1, Nudat%, MacCel, MacJeri, Lig, V0, V
  FOR i = 1 TO Nudat%
    INPUT #1, Calor(i)
  NEXT i
  INPUT #1, Comentario$
CLOSE #1

```

```

MacCelEx = MacCel: MacJeriEx = MacJeri: LigEx = Lig
IF SGN(Calor(1)) = 1 THEN SigCal = 1 ELSE SigCal = -1
Dil = 1 - V0 / V: V0 = V0 * .000001: V = V * .000001

```

'Grafica de los datos.

```

PuntoInicial = 1: PuntoFinal = Nudat%: UnirPuntos = 0: EscribirY2 = 0
FOR i = 1 TO Nudat%: X(i) = i: Y1(i) = Calor(i): Y2(i) = Calor(i): NEXT i
X$ = " Calor/Iny.(Mic.Cal.) VS N.Inyección ": Y$ = " N# N# Calor/Iny."

```

GOSUB Graficas

```

LOCATE 22, 1: PRINT STRING$(80, 205)
COLOR 7, 9: LOCATE 23, 7: PRINT "[Enter]-Aceptar [Otra tecla]- Otro fichero [Esc]-Menu
principal": COLOR 15, 9

```

```

DO: Tecla$ = INKEY$: LOOP UNTIL Tecla$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT$(Tecla$, 1))
IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu
LOOP UNTIL NumeroTecla% = 13

```

'Introducción de una estimación de los diferentes parametros del ajuste.

```

CLS 0: VIEW (0, 40)-(630, 280), 7, 7: WINDOW (0, 0)-(1000, 1000)

```

```

LOCATE 1, 30: PRINT " Fichero / "; UCASE$(MID$(Nom$, 3, LEN(Nom$)))
LOCATE 14, 1: PRINT STRING$(80, 205): LOCATE 21, 1: PRINT STRING$(80, 205): LOCATE 3, 1:
PRINT STRING$(80, 205)
LOCATE 2, 1: PRINT " Estimación de los parametros :": LOCATE 3, 53: PRINT "[ ] - Ajustable, [1] - Fijo"

```

```

IF MacCel = 0 AND MacJeri = 0 THEN
  Posicion = 8: ParametroX = 4: GOTO Salto1
END IF

```

```

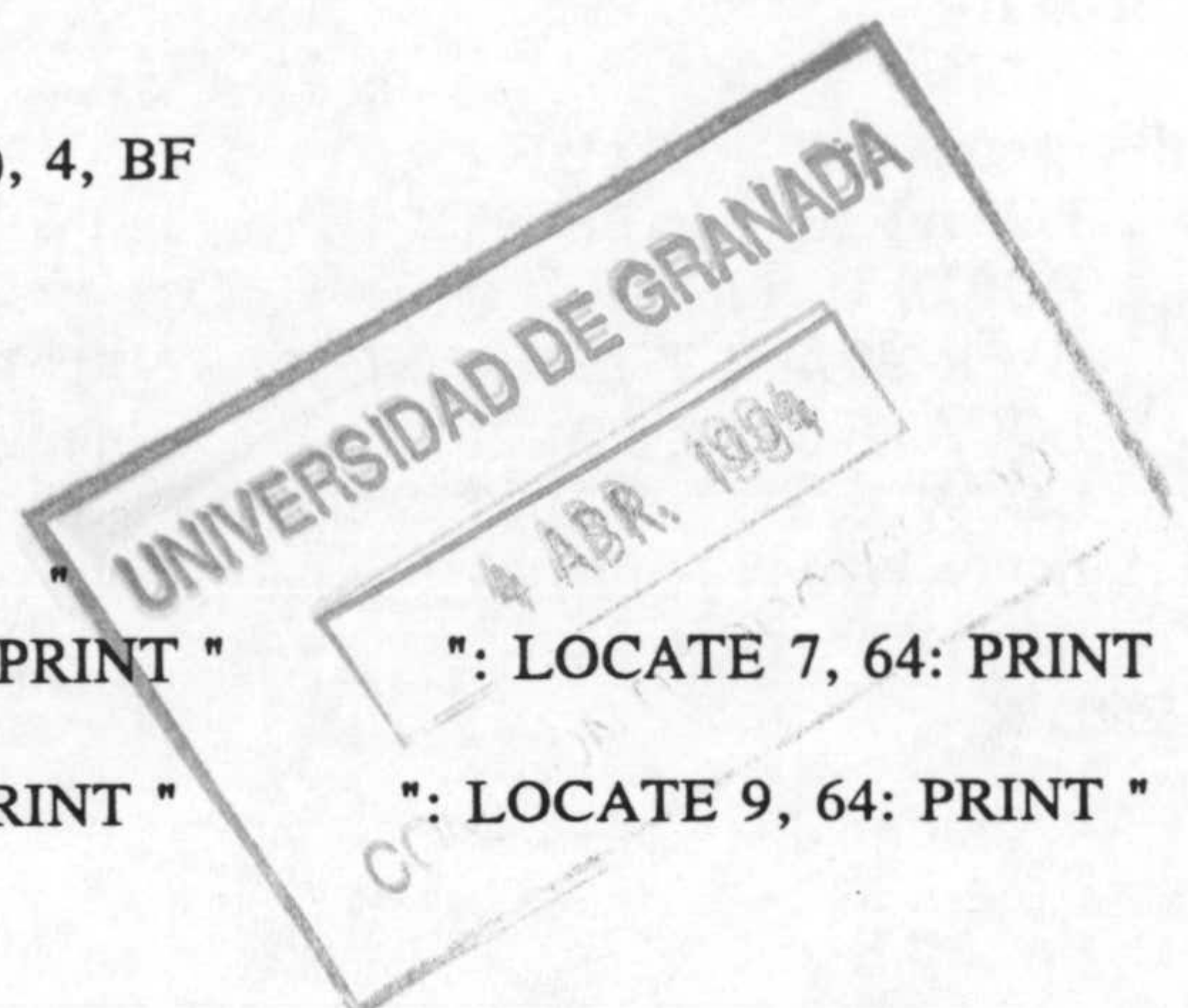
LINE (520, 860)-(670, 925), 4, BF: LINE (520, 745)-(670, 810), 4, BF

```

```

LOCATE 7, 43: PRINT " 100 - 1E+06 "
IF SigCal = 1 THEN LOCATE 5, 43: PRINT " Valor > 1 "
IF SigCal = -1 THEN LOCATE 5, 43: PRINT " Valor < -1 "
LOCATE 5, 1: PRINT CHR$(127); "H (Kcal/mol)      ":"
LOCATE 5, 24: PRINT "      ":" LOCATE 5, 64: PRINT "      "
LOCATE 7, 1: PRINT " k (M-1)      ":" LOCATE 7, 24: PRINT "      "
"      "      ":" LOCATE 7, 64: PRINT "      "
LOCATE 9, 1: PRINT " n      ":" LOCATE 9, 24: PRINT "      "
"      "      ":" LOCATE 9, 64: PRINT "      "

```




```

"
LOCATE 11, 1: PRINT " Parametro X      ": LOCATE 11, 24: PRINT "      "
PRINT "      "                               ": LOCATE 11, 64:

Salto1:

LOCATE 13 - Posicion, 1: PRINT " "; CHR$(237); "L2      "
LOCATE 13 - Posicion, 24: PRINT "      " : LOCATE 13 - Posicion, 64: PRINT "      "
LOCATE 15 - Posicion, 1: PRINT "Calor de corrección ": LOCATE 15 - Posicion, 24: PRINT "      "
LOCATE 17 - Posicion, 1: PRINT "Tolerancia en SRC  ": LOCATE 17 - Posicion, 24: PRINT "      "
LOCATE 19 - Posicion, 1: PRINT "Intervalo de analisis [ 1, "; Nodat%; " ]:"
LOCATE 19 - Posicion, 35: PRINT "      "
LOCATE 23, 1: PRINT "      "

COLOR 14, 9

IF ParametroX = 4 THEN a0 = 2: b0 = 100: c0 = 1: GOTO Salto2

DO
  LOCATE 5, 24: PRINT "      " : LOCATE 5, 25: INPUT "", a0
  LOOP WHILE SigCal * a0 <= SigCal OR a0 = 0
  LOCATE 5, 65: INPUT "", Flota0
  IF Flota0 = 1 THEN Ajustea$ = "[F]" ELSE Ajustea$ = "[A]": NumPar = NumPar + 1

DO
  LOCATE 7, 24: PRINT "      " : LOCATE 7, 25: INPUT "", b0
  LOOP WHILE b0 > 1000000! OR b0 < 100
  LOCATE 7, 65: INPUT "", Flotb0
  IF Flotb0 = 1 THEN Ajusteb$ = "[F]" ELSE Ajusteb$ = "[A]": NumPar = NumPar + 1

LOCATE 9, 25: INPUT "", c0: IF c0 = 0 THEN c0 = 1
c0 = ABS(c0): LOCATE 9, 65: INPUT "", Flotc0
IF Flotc0 = 1 THEN Ajustec$ = "[F]" ELSE Ajustec$ = "[A]": NumPar = NumPar + 1

LOCATE 22, 1: PRINT " Parametro X : "
LOCATE 23, 1: PRINT " 1- [Ligando]jer  2-[Macromolecula]cel  3-[Macromolecula]jer  4-"; CHR$(237);
" L2"
LOCATE 11, 25: INPUT "", ParametroX: LOCATE 11, 24: PRINT "      "

IF ParametroX = 1 THEN
  LOCATE 11, 1: PRINT " [Ligando]jer (M)  ": LOCATE 11, 25: INPUT "", d0: LOCATE 11, 65:
  INPUT "", Flotd0
  IF Flotd0 = 1 THEN Ajusted$ = "[F]" ELSE Ajusted$ = "[A]": NumPar = NumPar + 1
END IF

IF ParametroX = 2 THEN
  LOCATE 11, 1: PRINT " [ Mac. ]cel (M)  ": LOCATE 11, 25: INPUT "", d0: LOCATE 11, 65:
  INPUT "", Flotd0
  IF Flotd0 = 1 THEN Ajusted$ = "[F]" ELSE Ajusted$ = "[A]": NumPar = NumPar + 1
  LOCATE 22, 1: PRINT "  La concentración de la macromolecula en la jeringa tiene que ser"
  LOCATE 23, 1: PRINT "  igual a la de la celula (s/n).      "
  LOCATE 11, 1: PRINT "¿[Mac.]jer=[Mac.]cel?": LOCATE 11, 25: PRINT "      " : LOCATE 11, 25:
  INPUT "", Opcion$
END IF

```



```
IF ParametroX = 3 THEN
  LOCATE 11, 1: PRINT " [ Mac. ]jer (M)  : "
  LOCATE 11, 25: INPUT "", d0: LOCATE 11, 65: INPUT "", Flotd0
  IF Flotd0 = 1 THEN Ajusted$ = "[F]" ELSE Ajusted$ = "[A]": NumPar = NumPar + 1
END IF
```

Salto2:

```
LOCATE 22, 2: PRINT CHR$(237); " L2 : Entalpía relativa molar aparente de dilución del ligando "
LOCATE 23, 2: PRINT "      1 : "; CHR$(237); " L2 = "; CHR$(224); " [L] (cal/mol)      2 : ";
CHR$(237); " L2 = "; CHR$(224); " "; CHR$(251); " [L] (cal/mol)      "
Lazo1: LOCATE 13 - Posicion, 25: PRINT "      ": LOCATE 13 - Posicion, 25: INPUT "", Ent.R.M.A
IF Ent.R.M.A <> 1 AND Ent.R.M.A <> 2 THEN GOTO Lazo1
```

```
IF ParametroX = 4 THEN
  LOCATE 13 - Posicion, 2: PRINT CHR$(224); "      "
  LOCATE 13 - Posicion, 25: PRINT "      ": LOCATE 13 - Posicion, 25: INPUT "", d0
  LOCATE 13 - Posicion, 65: INPUT "", Flotd0
  IF Flotd0 = 1 THEN Ajusted$ = "[F]" ELSE Ajusted$ = "[A]": NumPar = NumPar + 1
  ELSE
  LOCATE 13, 2: PRINT CHR$(224); "      ": LOCATE 13, 25: PRINT "      ": LOCATE
  13, 25: INPUT "", L2
END IF
```

'Corrección de los calores experimentales

```
LOCATE 22, 1: PRINT "      "
IF L2 = 0 AND ParametroX <> 4 THEN
  LOCATE 23, 1: PRINT "Calor de agitación + Calor de dilución de ligando ("; CHR$(230); "cal) "
  ELSE
  LOCATE 23, 1: PRINT "Calor de agitación + Calor de inyección de disolvente en disolvente (";
  CHR$(230); "cal) "
END IF
LOCATE 15 - Posicion, 25: INPUT "", CalCo
FOR i = 1 TO Nudat%: Calor(i) = Calor(i) - CalCo: NEXT i
LOCATE 23, 1: PRINT "      "
```

```
LOCATE 17 - Posicion, 25: INPUT "", Tolerancia: Tolerancia = ABS(Tolerancia)
```

Lazo2:

```
LOCATE 19 - Posicion, 35: PRINT "      "
LOCATE 19 - Posicion, 36: INPUT "", PuntoInicial, PuntoFinal
IF PuntoInicial < 1 OR PuntoFinal > Nudat% THEN GOTO Lazo2
```

```
COLOR 7, 9: LOCATE 23, 10: PRINT " [ Enter ]- Empezar el ajuste      [ Esc ]- Menu principal "
COLOR 15, 9
```

DO

```
DO: Tecla$ = INKEY$: LOOP UNTIL Tecla$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT$(Tecla$, 1))
IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu
LOOP UNTIL NumeroTecla% = 13
```

'Empezar el ajuste utilizando el algoritmo del simplex

s = 0: z = 0

az(1) = a0: bz(1) = b0: cz(1) = c0: dz(1) = d0
 Entalpia = a0: Beta = b0: Ns = c0: PaX = d0
 GOSUB Calor: GOSUB Ssr: r(s) = Ssr

Reajustar:

ErPar\$ = "Desactivado": ConParI\$ = "Si"

UnirPuntos = 1: EscribirY2 = 1
 FOR i = 1 TO Nudat%: X(i) = i: Y1(i) = Calor(i): Y2(i) = CalVar(i): NEXT i
 X\$ = " Calor/Iny.(Mic.Cal.) VS N.Inyección ": Y\$ = " N# N# Calor Calor(ajt.)"

GraficaX = -1
 GOSUB Graficas
 GraficaX = 0

LOCATE 23, 1: PRINT " Se esta ajustando..... "

LOCATE 22, 1: PRINT STRING\$(80, 205)

LOCATE 19, 55: PRINT "Iter:": LOCATE 20, 55: PRINT " SRC:"

DoDoDo:

z = z + 1
 IF z > 1 THEN
 az(z) = az(z - 1) - az(z - 1) / 5: bz(z) = bz(z - 1) + bz(z - 1) / 10
 cz(z) = cz(z - 1) - cz(z - 1) / 10: dz(z) = dz(z - 1) - dz(z - 1) / 10
 END IF

'Formacion de los cinco vertices del simplex inicial

a(1) = az(z): b(1) = bz(z): c(1) = cz(z): d(1) = dz(z)
 Entalpia = a(1): Beta = b(1): Ns = c(1): PaX = d(1)
 GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssr(1) = Ssr

a(2) = a(1) + a(1) / 10: b(2) = b(1) - b(1) / 10: c(2) = c(1) - c(1) / 10: d(2) = d(1) - d(1) / 100
 Entalpia = a(2): Beta = b(2): Ns = c(2): PaX = d(2)
 GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssr(2) = Ssr

a(3) = a(1) - a(1) / 10: b(3) = b(1) - b(1) / 10: c(3) = c(1) - c(1) / 10: d(3) = d(1) - d(1) / 10
 Entalpia = a(3): Beta = b(3): Ns = c(3): PaX = d(3)
 GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssr(3) = Ssr

a(4) = a(1) + a(1) / 10: b(4) = b(1) - b(1) / 10: c(4) = c(1) + c(1) / 10: d(4) = d(1) + d(1) / 100
 Entalpia = a(4): Beta = b(4): Ns = c(4): PaX = d(4)
 GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssr(4) = Ssr

a(5) = a(1) - a(1) / 10: b(5) = b(1) - b(1) / 10: c(5) = c(1) - c(1) / 10: d(5) = d(1) + d(1) / 100

Entalpia = a(5): Beta = b(5): Ns = c(5): PaX = d(5)
 GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssr(5) = Ssr

s = 0: r(0) = (Ssr(1) + Ssr(2) + Ssr(3) + Ssr(4) + Ssr(5)) / 5

Repetir:

s = s + 1

IF ErPar\$ <> "Activado" THEN

LOCATE 19, 60: PRINT "

": LOCATE 19, 60: PRINT s

LOCATE 20, 60: PRINT "

": LOCATE 20, 60: PRINT (Ssr(1) + Ssr(2) + Ssr(3) + Ssr(4) +

Ssr(5)) / 5

ELSE

LOCATE 23, 66: PRINT (Ssr(1) + Ssr(2) + Ssr(3) + Ssr(4) + Ssr(5)) / 5

END IF

'Busqueda del peor vertice y del mejor

peor = 0: mejor = Ssr(1) + Ssr(2) + Ssr(3) + Ssr(4) + Ssr(5)

FOR i = 1 TO 5

IF peor < Ssr(i) THEN peor = Ssr(i): h = i

IF mejor > Ssr(i) THEN mejor = Ssr(i): l = i

NEXT i

'Determinacion del punto central

FOR i = 1 TO 5

IF i <> l AND i <> h THEN m1 = i

NEXT i

FOR i = 1 TO 5

IF i <> l AND i <> h AND i <> m1 THEN m2 = i

NEXT i

FOR i = 1 TO 5

IF i <> l AND i <> h AND i <> m1 AND i <> m2 THEN m3 = i

NEXT i

ac = (a(l) + a(m1) + a(m2) + a(m3)) / 4: bc = (b(l) + b(m1) + b(m2) + b(m3)) / 4

cc = (c(l) + c(m1) + c(m2) + c(m3)) / 4: dc = (d(l) + d(m1) + d(m2) + d(m3)) / 4

'Refleccion del peor vertice

ar = (2 * ac) - a(h): br = (2 * bc) - b(h): cr = (2 * cc) - c(h): dr = (2 * dc) - d(h)

Entalpia = ar: Beta = br: Ns = cr: PaX = dr

GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssrr = Ssr

IF Ssrr <= Ssr(l) THEN GOTO Expansion

IF Ssrr > Ssr(l) THEN

IF Ssrr <= Ssr(h) THEN

Ssr(h) = Ssrr: a(h) = ar: b(h) = br: c(h) = cr: d(h) = dr: GOTO Aceptar

ELSE GOTO Contraccion

END IF
END IF

'Expansion del peor vertice

Expansion:

ae = 3 * ac - 2 * a(h): be = 3 * bc - 2 * b(h): ce = 3 * cc - 2 * c(h): de = 3 * dc - 2 * d(h)
Entalpia = ae: Beta = be: Ns = ce: PaX = de
GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssre = Ssr

IF Ssre <= Ssr(l) THEN
Ssr(h) = Ssre: a(h) = ae: b(h) = be: c(h) = ce: d(h) = de: GOTO Aceptar
ELSE
Ssr(h) = Ssrr: a(h) = ar: b(h) = br: c(h) = cr: d(h) = dr: GOTO Aceptar
END IF

'Contraccion del peor vertice

Contraccion:

ac1 = (ac + a(h)) / 2: bc1 = (bc + b(h)) / 2: cc1 = (cc + c(h)) / 2: dc1 = (dc + d(h)) / 2
Entalpia = ac1: Beta = bc1: Ns = cc1: PaX = dc1
GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssrc1 = Ssr

IF Ssrc1 <= Ssr(h) THEN
Ssr(h) = Ssrc1: a(h) = ac1: b(h) = bc1: c(h) = cc1: d(h) = dc1: GOTO Aceptar
ELSE GOTO Encojimiento
END IF

'Encojimiento

Encojimiento:

a(h) = (a(h) + a(l)) / 2: b(h) = (b(h) + b(l)) / 2
c(h) = (c(h) + c(l)) / 2: d(h) = (d(h) + d(l)) / 2
Entalpia = a(h): Beta = b(h): Ns = c(h): PaX = d(h)
GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssr(h) = Ssr

a(m1) = (a(m1) + a(l)) / 2: b(m1) = (b(m1) + b(l)) / 2
c(m1) = (c(m1) + c(l)) / 2: d(m1) = (d(m1) + d(l)) / 2
Entalpia = a(m1): Beta = b(m1): Ns = c(m1): PaX = d(m1)
GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssr(m1) = Ssr

a(m2) = (a(m2) + a(l)) / 2: b(m2) = (b(m2) + b(l)) / 2
c(m2) = (c(m2) + c(l)) / 2: d(m2) = (d(m2) + d(l)) / 2
Entalpia = a(m2): Beta = b(m2): Ns = c(m2): PaX = d(m2)
GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssr(m2) = Ssr

a(m3) = (a(m3) + a(l)) / 2: b(m3) = (b(m3) + b(l)) / 2
c(m3) = (c(m3) + c(l)) / 2: d(m3) = (d(m3) + d(l)) / 2
Entalpia = a(m3): Beta = b(m3): Ns = c(m3): PaX = d(m3)
GOSUB Calor: GOSUB Ssr: Ssr(m3) = Ssr

Aceptar:

$r(s) = (Ssr(h) + Ssr(l) + Ssr(m1) + Ssr(m2) + Ssr(m3)) / 5$

IF $s \leq 8$ THEN GOTO Repetir

IF $ABS(r(s) - r(s - 1)) \leq Tolerancia$ AND $ABS(r(s - 1) - r(s - 2)) \leq Tolerancia$ AND $ABS(r(s - 2) - r(s - 3)) \leq Tolerancia$ THEN

ELSE

IF $s < 2000$ THEN GOTO Repetir

END IF

IF ErPar\$ = "Activado" THEN RETURN

rFinal = r(s): sFinal = s

FOR i = PuntoInicial TO PuntoFinal: CalVarIn(i) = CalVar(i): NEXT i

Grafica0:

UnirPuntos = 1: EscribirY2 = 1

FOR i = 1 TO Nudat%: X(i) = i: Y1(i) = Calor(i): Y2(i) = CalVarIn(i): NEXT i

X\$ = " Calor/Iny.(Mic.Cal.) VS N.Inyección ": Y\$ = " N# N# Calor EX. Calor Aj."

GraficaX = 0

GOSUB Graficas

GraficaX = 1

LOCATE 22, 1: PRINT STRING\$(80, 205)

COLOR 7, 9: LOCATE 23, 7: PRINT "[AvPág]-Parametros del ajuste [F3]-Reajustar [Esc]-Menu principal"

COLOR 15, 9

DO

DO: Tecla\$ = INKEY\$: LOOP UNTIL Tecla\$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT\$(Tecla\$, 1))
 LOOP UNTIL NumeroTecla% = 61 OR NumeroTecla% = 81 OR NumeroTecla% = 27

IF NumeroTecla% = 61 THEN GOTO Reajustar

IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu

'Resultado del analisis

ParAjuste:

'---La media en cada parametro

IF ConParI\$ = "Si" THEN

a = (a(l) + a(h) + a(m1) + a(m2) + a(m3)) / 5

b = (b(l) + b(h) + b(m1) + b(m2) + b(m3)) / 5

c = (c(l) + c(h) + c(m1) + c(m2) + c(m3)) / 5

d = (d(l) + d(h) + d(m1) + d(m2) + d(m3)) / 5

END IF

IF ParametroX = 1 THEN

Posicion3 = 4


```

IF Flotd0 = 0 THEN
    Lig = d: AjusteL$ = Ajusted$
    ELSE
    Lig = d0: AjusteL$ = "[F]"
END IF
END IF

IF ParametroX = 2 THEN
    Posicion3 = 0
    IF Flotd0 = 0 THEN
        MacCel = d: AjusteMc$ = Ajusted$
        ELSE
        MacCel = d0: AjusteMc$ = "[F]"
    END IF

    IF UCASE$(Opcion$) = "S" THEN MacJeri = MacCel: AjusteMj$ = AjusteMc$
END IF

IF ParametroX = 3 THEN
    Posicion3 = 2
    IF Flotd0 = 0 THEN
        MacJeri = d: AjusteMj$ = Ajusted$
        ELSE
        MacJeri = d0: AjusteMj$ = "[F]"
    END IF
END IF

IF ParametroX = 4 THEN
    Posicion3 = 6
    IF Flotd0 = 0 THEN
        L2 = d: AjusteL2$ = Ajusted$
        ELSE
        L2 = d0: AjusteL2$ = "[F]"
    END IF
END IF

VIEW: CLS 0: VIEW (10, 70)-(615, 330), 7

LOCATE 2, 1: PRINT " Resultado del analisis del fichero : "; UCASE$(MID$(Nom$, 3, LEN(Nom$)))
LOCATE 3, 1: PRINT STRING$(80, 205)
LOCATE 4, 52: PRINT " [A] Ajustado - [F] Fijado "

IF MacCel = 0 AND MacJeri = 0 THEN Posicion2 = 12: Kass = 1: GOTO Salto3

IF Flota0 = 1 THEN DeltaH = a0 ELSE DeltaH = a
LOCATE 7, 3: PRINT " "; CHR$(127); "H = ": LOCATE 7, 12: PRINT USING "#####.##"; DeltaH
IF ErPar$ = "Activado" AND Flota0 <> 1 THEN LOCATE 7, 22: PRINT "+-": LOCATE 7, 25: PRINT
USING "#####.##"; ErrorH
LOCATE 7, 35: PRINT " Kcal/mol ": LOCATE 7, 55: PRINT Ajustea$

IF Flotb0 = 1 THEN Kass = b0 ELSE Kass = b
LOCATE 9, 3: PRINT " k = ": LOCATE 9, 12: PRINT USING "#####"; FIX(Kass)
IF ErPar$ = "Activado" AND Flotb0 <> 1 THEN LOCATE 9, 22: PRINT "+-": LOCATE 9, 25: PRINT
USING "#####"; INT(ErrorK)
LOCATE 9, 35: PRINT " M-1 ": LOCATE 9, 55: PRINT Ajusteb$

```



```

IF Flotc0 = 1 THEN Nsitios = c0 ELSE Nsitios = c
LOCATE 11, 3: PRINT "    n = ": LOCATE 11, 12: PRINT USING "#####.##"; Nsitios
IF ErPar$ = "Activado" AND Flotc0 <> 1 THEN LOCATE 11, 22: PRINT "+-": LOCATE 11, 25: PRINT
USING "#####.##"; ErrorN
LOCATE 11, 35: PRINT "    Sitios/Mac.  ": LOCATE 11, 55: PRINT Ajustec$

LOCATE 13 - Posicion2, 3: PRINT "[M]cel = ": LOCATE 13 - Posicion2, 12: PRINT USING "#####.###";
MacCel * 1000!
LOCATE 13 - Posicion2, 35: PRINT "    mM      ": LOCATE 13 - Posicion2, 55: PRINT AjusteMc$

LOCATE 15 - Posicion2, 3: PRINT "[M]jer = ": LOCATE 15 - Posicion2, 12: PRINT USING "#####.###";
MacJeri * 1000!
LOCATE 15 - Posicion2, 35: PRINT "    mM      ": LOCATE 15 - Posicion2, 55: PRINT AjusteMj$

LOCATE 17 - Posicion2, 3: PRINT "[L]jer = ": LOCATE 17 - Posicion2, 12: PRINT USING "#####.###";
Lig * 1000!
LOCATE 17 - Posicion2, 35: PRINT "    mM      ": LOCATE 17 - Posicion2, 55: PRINT AjusteL$

Salto3:

LOCATE 19 - Posicion2, 3: PRINT "    "; CHR$(224); " = ": LOCATE 19 - Posicion2, 12: PRINT USING
"#####.###"; L2
IF Ent.R.M.A = 1 THEN LOCATE 19 - Posicion2, 35: PRINT "(cal.l)/(mol.mol)" ELSE LOCATE 19 -
Posicion2, 35: PRINT " cal/(mol.M^1/2) "
LOCATE 19 - Posicion2, 55: PRINT AjusteL2$

IF ErPar$ = "Activado" AND ParametroX <> 0 AND Flotd0 <> 1 THEN LOCATE 13 - Posicion2 +
Posicion3, 22: PRINT "+-": LOCATE 13 - Posicion2 + Posicion3, 25: PRINT USING F$; ErX

LOCATE 21, 20: PRINT " Desviación del ajuste ="; INT(SQR(rFinal / (PuntoFinal - PuntoInicial)) * 100)
/ 100; CHR$(230); "cal."

IF MacCel <> 0 OR MacJeri <> 0 THEN
    IF Flotb0 <> 1 THEN
        IF Nsitios * Kass * MacCel > 1000 OR Nsitios * Kass * MacCel < 1 THEN COLOR 14: LOCATE
        9, 60: PRINT " ¡Ojo! K puede  ": LOCATE 10, 60: PRINT " no ser correcto "
        END IF
    END IF

LOCATE 22, 1: PRINT STRING$(80, 205)

Etiqueta1:

COLOR 7, 9: LOCATE 23, 1: PRINT " [F10]- Errores  [AvPág]- Datos  [RePág]- Grafica  [Esc]- Menu
principal  ": COLOR 15, 9

DO
    DO: Tecla$ = INKEY$: LOOP UNTIL Tecla$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT$(Tecla$, 1))
    LOOP UNTIL NumeroTecla% = 68 OR NumeroTecla% = 81 OR NumeroTecla% = 27 OR NumeroTecla%
    = 73

IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu
IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Grafica0

```

'Estimación del error en los parametros.

IF NumeroTecla% = 68 THEN

IF ErPar\$ = "Activado" THEN BEEP: GOTO Etiqueta1
 LOCATE 23, 1: PRINT " Determinando errores..... [[SRC]]"
 ErPar\$ = "Activado": ConParI\$ = "No": NumDat = ABS(-PuntoInicial + PuntoFinal) + 1

'Error en la entalpia.

IF Flota0 <> 1 AND MacCel <> 0 THEN

z = 0: Flota0 = 1
 a0 = DeltaH + .05
 DO: GOSUB DoDoDo
 a0 = a0 + .05
 LOOP UNTIL r(s) >= rFinal * (NumDat - NumPar + 1) / (NumDat - NumPar)
 ErrorH1 = ABS(a0 - .05 - DeltaH)

z = 0
 a0 = DeltaH - .05
 DO: GOSUB DoDoDo
 a0 = a0 - .05
 LOOP UNTIL r(s) >= rFinal * (NumDat - NumPar + 1) / (NumDat - NumPar) OR a\$ <> ""
 ErrorH2 = ABS(DeltaH - (a0 + .05))

IF ErrorH1 > ErrorH2 THEN ErrorH = ErrorH1 ELSE ErrorH = ErrorH2
 LOCATE 7, 22: PRINT "+-": LOCATE 7, 25: PRINT USING "####.##"; ErrorH
 Flota0 = 0

END IF

'Error en la constante de asociación.

IF Flotb0 <> 1 AND MacCel <> 0 THEN

z = 0: Flotb0 = 1
 b0 = Kass + Kass / 100
 DO: GOSUB DoDoDo
 b0 = b0 + Kass / 100
 LOOP UNTIL r(s) >= rFinal * (NumDat - NumPar + 1) / (NumDat - NumPar)
 ErrorK1 = ABS((b0 - Kass / 100) - Kass)

z = 0
 b0 = Kass - Kass / 100
 DO: GOSUB DoDoDo
 b0 = b0 - Kass / 100
 LOOP UNTIL r(s) >= rFinal * (NumDat - NumPar + 1) / (NumDat - NumPar)
 ErrorK2 = ABS(Kass - (b0 + Kass / 100))

IF ErrorK1 > ErrorK2 THEN ErrorK = ErrorK1 ELSE ErrorK = ErrorK2
 LOCATE 9, 22: PRINT "+-": LOCATE 9, 25: PRINT USING "#####"; INT(ErrorK)
 Flotb0 = 0

END IF

'Error en el numero de sitios.

```

IF Flotc0 <> 1 AND MacCel <> 0 THEN
  z = 0: Flotc0 = 1
  c0 = Nsitios + .002
  DO: GOSUB DoDoDo
    c0 = c0 + .002
  LOOP UNTIL r(s) >= rFinal * (NumDat - NumPar + 1) / (NumDat - NumPar)
  ErrorN1 = ABS((c0 - .002) - Nsitios)

  z = 0
  c0 = Nsitios - .002
  DO: GOSUB DoDoDo
    c0 = c0 - .002
  LOOP UNTIL r(s) >= rFinal * (NumDat - NumPar + 1) / (NumDat - NumPar)
  ErrorN2 = ABS(Nsitios - (c0 + .002))

  IF ErrorN1 > ErrorN2 THEN ErrorN = ErrorN1 ELSE ErrorN = ErrorN2
  LOCATE 11, 22: PRINT "+-": LOCATE 11, 25: PRINT USING "####.##"; ErrorN
  Flotc0 = 0
END IF

```

'Error en el parametro X.

```

IF Flotd0 <> 1 AND ParametroX <> 0 THEN
  z = 0: Flotd0 = 1
  d0 = d + d / 100
  DO: GOSUB DoDoDo
    d0 = d0 + d / 100
  LOOP UNTIL r(s) >= rFinal * (NumDat - NumPar + 1) / (NumDat - NumPar)
  ErrorX1 = ABS((d0 - d / 100) - d)

  z = 0
  d0 = d - d / 100
  DO: GOSUB DoDoDo
    d0 = d0 - d / 100
  LOOP UNTIL r(s) >= rFinal * (NumDat - NumPar + 1) / (NumDat - NumPar)
  ErrorX2 = ABS(d - (d0 + d / 100))

  IF ErrorX1 > ErrorX2 THEN ErrorX = ErrorX1 ELSE ErrorX = ErrorX2
  IF ParametroX = 4 THEN ErX = ErrorX: F$ = "#####" ELSE ErX = ErrorX * 1000: F$ =
  "###.###"
  LOCATE 13 - Posicion2 + Posicion3, 22: PRINT "+-": LOCATE 13 - Posicion2 + Posicion3, 25:
  PRINT USING F$; ErX
  Flotd0 = 0
END IF

GOTO Etiqueta1

END IF

```

'Tabulación de: concentraciones de los reactivos, calor experimental y calor del ajuste

'---Calculo de la concentracion de ligando libre y de la entalpia por mol de macromolecula en cada etapa, en la celula y la jeringa

FOR i = 1 TO Nudat%

 Lt(i) = Lig * (1 - Dil ^ i): Mt(i) = MacCel * Dil ^ i + MacJeri * (1 - Dil ^ i)
NEXT i

FOR i = 1 TO Nudat%

 LigLib(i) = (SQR((Nsitios * Kass * Mt(i) - Kass * Lt(i) + 1) ^ 2 + 4 * Kass * Lt(i)) - Nsitios * Kass * Mt(i) + Kass * Lt(i) - 1) / (2 * Kass)
 EntalpiaMol(i) = (Nsitios * DeltaH * Kass * LigLib(i)) / (1 + Kass * LigLib(i))
NEXT i

LigLibJeri = (SQR((Nsitios * Kass * MacJeri - Kass * Lig + 1) ^ 2 + 4 * Kass * Lig) - Nsitios * Kass * MacJeri + Kass * Lig - 1) / (2 * Kass)

Ental0 = (Nsitios * DeltaH * Kass * LigLibJeri) / (1 + Kass * LigLibJeri)

'---Calculo de los calores del ajuste

FOR i = 1 TO Nudat%

 IF Ent.R.M.A = 1 THEN

 CalAjuste(i) = (Mt(i) * V * EntalpiaMol(i) - Mt(i - 1) * (V - V0) * EntalpiaMol(i - 1) - V0 * MacJeri * Ental0) * 1E+09 + L2 * (V * LigLib(i) ^ 2 - V0 * LigLibJeri ^ 2 - (V - V0) * LigLib(i) - ^ 2) * 1000000!

 ELSE

 CalAjuste(i) = (Mt(i) * V * EntalpiaMol(i) - Mt(i - 1) * (V - V0) * EntalpiaMol(i - 1) - V0 * MacJeri * Ental0) * 1E+09 + L2 * (V * LigLib(i) * SQR(LigLib(i)) - V0 * LigLibJeri * SQR(LigLibJeri) - (V - V0) * LigLib(i - 1) * SQR(LigLib(i - 1))) * 1000000!

 END IF

NEXT i

'---Presentacion de los datos.

Presentacion:

CLS 0: CLS : SCREEN 9: VIEW (0, 40)-(630, 280), 1, 7: WINDOW (0, 0)-(1000, 1000)

FOR i = 0 TO 4: LINE (80 + i * 185, 0)-(80 + i * 185, 1000): NEXT i

PRINT " N"; TAB(10); "[Lig.tot.]"; TAB(25); "[Lig.lib.]"; TAB(39); "[Mac.tot.]"; TAB(52); "q.Experimental"; TAB(69); "q.Ajuste"

LOCATE 1, 2: PRINT " (mM) (mM) (mM) (mic.cal.) (mic.cal) "

LOCATE 21, 1: PRINT STRING\$(80, 205)

COLOR 7, 9

LOCATE 22, 1: PRINT " [AvPág]- Más datos [Inicio]- Primeros datos [F1]- Graficas "

LOCATE 23, 1: PRINT " [RePág]- Parametros del ajuste [S]- Salvar datos [Esc]- Menu principal "

COLOR 15, 9

PrimerosDatos:

i = 1: n = 1: Resta = 0: Factor1 = 0

MasDatos:

FOR i = i TO 15 * n

```

IF i > PuntoFinal THEN Factor1 = 1
LOCATE 5 + i - Resta, 2: PRINT USING "##"; i - i * Factor1
LOCATE 5 + i - Resta, 9: PRINT USING "###.#####"; Lt(i) * 1000! - Lt(i) * Factor1 * 1000
LOCATE 5 + i - Resta, 24: PRINT USING "###.#####"; LigLib(i) * 1000! - LigLib(i) * Factor1 * 1000
LOCATE 5 + i - Resta, 39: PRINT USING "###.#####"; Mt(i) * 1000! - Mt(i) * Factor1 * 1000
LOCATE 5 + i - Resta, 53: PRINT USING "#####.#"; Calor(i) - Calor(i) * Factor1
LOCATE 5 + i - Resta, 68: PRINT USING "#####.##"; CalAjuste(i) - CalAjuste(i) * Factor1

```

NEXT i

DO

```

DO: Tecla$ = INKEY$: LOOP UNTIL Tecla$ <> "": NumeroTecla$ = RIGHT$(Tecla$, 1):
NumeroTecla% = ASC(NumeroTecla$)
LOOP UNTIL NumeroTecla% = 71 OR NumeroTecla% = 81 OR NumeroTecla% = 59 OR NumeroTecla%
= 73 OR NumeroTecla% = 27 OR NumeroTecla% = 115

```

IF NumeroTecla% = 81 THEN

```

IF n = 5 THEN GOTO PrimerosDatos
n = n + 1: Resta = Resta + 15: GOTO MasDatos

```

END IF

IF NumeroTecla% = 71 THEN GOTO PrimerosDatos

IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO ParAjuste

IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu

'Salvar datos del ajuste.

IF NumeroTecla% = 115 THEN

```

LOCATE 22, 1: PRINT " "
LOCATE 23, 1: PRINT " "
LOCATE 22, 1: PRINT " Salvando la tabla de datos... "

```

```

OPEN "o", #1, Nom$ + ".CAL"
WRITE #1, Comentario$, Nudat%, MacCel, MacJeri, Lig, V0, V
FOR i = 1 TO Nudat%
WRITE #1, i, Lt(i) * 1000, LigLib(i) * 1000, Mt(i) * 1000, Calor(i), CalAjuste(i)
NEXT i
CLOSE #1

```

CLS 0: CLS : GOTO Presentacion

END IF

IF MacCel = 0 AND MacJeri = 0 THEN GOTO Grafica0

'Graficas

Grafica1:

'Fraccion de saturacion de la Macromolecula frente a logaritmo de ligando libre

```
FOR i = 1 TO Nudat%
  LnLigLib(i) = LOG(LigLib(i)): X(i) = LnLigLib(i)
  ParUnion(i) = Nsitios * Kass * LigLib(i) / (1 + Kass * LigLib(i))
  Y1(i) = ParUnion(i) / Nsitios: Y2(i) = Y1(i)
NEXT i
X$ = "Fraccion de saturacion VS Ln( Lig.Lib. )"
Y$ = " N# Ln(Lig.Lib) Fra.Sat. "
EscribirY2 = 0
```

GOSUB Graficas: IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Presentacion

Grafica2:

'Calor por mol de ligando libre añadido frente a [Ligando total]/[Macromolecula total]

```
FOR i = 1 TO Nudat%
  X(i) = Lt(i) / Mt(i)
  Y1(i) = Calor(i) * 1E-09 / (V0 * LigLibJeri)
  Y2(i) = CalAjuste(i) * 1E-09 / (V0 * LigLibJeri)
NEXT i
X$ = "Calor/mol de ligando añadido(Kcal/mol) VS Ltot./Mtot. "
Y$ = " N# Ltot./Mtot. CalorEx. CalorAj. "
EscribirY2 = 1
```

GOSUB Graficas: IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Grafica1

Grafica3:

'Entalpia por mol de sitios de macromolecula frente a logaritmo de ligando libre

```
EntalpiaAj(1) = CalAjuste(1) * 1E-09 / (V * Nsitios * Mt(1)): EntalpiaEx(1) = EntalpiaAj(1)
X(1) = LnLigLib(1): Y1(1) = EntalpiaEx(1): Y2(1) = EntalpiaAj(1)
```

```
FOR i = 2 TO Nudat%
  EntalpiaEx(i) = Calor(i) * 1E-09 / (V * Nsitios * Mt(i)) + EntalpiaEx(i - 1)
  EntalpiaAj(i) = CalAjuste(i) * 1E-09 / (V * Nsitios * Mt(i)) + EntalpiaAj(i - 1)
  X(i) = LnLigLib(i): Y1(i) = EntalpiaEx(i): Y2(i) = EntalpiaAj(i)
NEXT i
X$ = " (Hi - Ho)Kcal/mol VS Ln( Lig.Lib. ) "
Y$ = " N# Ln(Lig.Lib) (Hi-Ho)Ex. (Hi-Ho)Aj. "
```

GOSUB Graficas: IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Grafica2

Grafica4:

'Entalpia por mol de sitios de macromolecula frente a [Ligando total]/[Macromolecula total]

```
FOR i = 1 TO Nudat%
  X(i) = Lt(i) / Mt(i): Y1(i) = EntalpiaEx(i): Y2(i) = EntalpiaAj(i)
```



```

NEXT i
X$ = " (Hi - Ho)Kcal/mol VS Ltot./Mtot. "
Y$ = " N# Ltot./Mtot. (Hi-Ho)Ex. (Hi-Ho)Aj. "

GOSUB Graficas

OtraVez:

IF NumeroTecla% = 73 THEN GOTO Grafica3
IF NumeroTecla% = 81 THEN
  VIEW (20, 150)-(270, 200), 14
  LOCATE 13, 4: PRINT " No hay más graficas ( O.K ) "
  DO
    DO: Tecla$ = INKEY$: LOOP UNTIL Tecla$ <> ""
    NumeroTecla% = ASC(RIGHT$(Tecla$, 1))
  LOOP UNTIL NumeroTecla% = 13
  CLS 1: VIEW (10, 15)-(300, 260), 1, 7: GOSUB UltimaGrafica
  GOTO OtraVez
END IF

```

'SUBRUTINAS

'Subrutina de calculo de los calores

Calor:

```

IF Flota0 = 1 THEN Entalpia = a0
IF Flotb0 = 1 THEN Beta = b0
IF Flotc0 = 1 THEN Ns = c0
IF Flotd0 = 1 THEN PaX = d0
IF ParametroX = 1 THEN Lig = PaX
IF ParametroX = 2 THEN MacCel = PaX
IF ParametroX = 3 THEN MacJeri = PaX
IF ParametroX = 4 THEN L2 = PaX
IF Opcion$ = "s" OR Opcion$ = "S" THEN MacJeri = MacCel

FOR i = 1 TO Nudat%
  Lt(i) = Lig * (1 - Dil ^ i): Mt(i) = MacCel * Dil ^ i + MacJeri * (1 - Dil ^ i)
NEXT i

FOR i = 1 TO Nudat%
  LigLib(i) = (SQR((Ns * Beta * Mt(i) - Beta * Lt(i) + 1) ^ 2 + 4 * Beta * Lt(i)) - Ns * Beta * Mt(i) +
    Beta * Lt(i) - 1) / (2 * Beta)
  EntalpiaMol(i) = (Ns * Entalpia * Beta * LigLib(i)) / (1 + Beta * LigLib(i))
NEXT i

  LigLibJeri = (SQR((Ns * Beta * MacJeri - Beta * Lig + 1) ^ 2 + 4 * Beta * Lig) - Ns * Beta * MacJeri
    + Beta * Lig - 1) / (2 * Beta)
  Ental0 = (Ns * Entalpia * Beta * LigLibJeri) / (1 + Beta * LigLibJeri)

CalVar(0) = 0: EntalpiaMol(0) = 0: Mt(0) = MacCel: LigLib(0) = 0

FOR i = 1 TO Nudat%

```



```

IF Ent.R.M.A = 1 THEN
  CalVar(i) = (Mt(i) * V * EntalpiaMol(i) - Mt(i - 1) * (V - V0) * EntalpiaMol(i - 1) - V0 * MacJeri *
    Ental0) * 1E+09 + L2 * (V * LigLib(i) ^ 2 - V0 * LigLibJeri ^ 2 - (V - V0) * LigLib(i - 1)
    ^ 2) * 1000000!
  ELSE
  CalVar(i) = (Mt(i) * V * EntalpiaMol(i) - Mt(i - 1) * (V - V0) * EntalpiaMol(i - 1) - V0 * MacJeri *
    Ental0) * 1E+09 + L2 * (V * LigLib(i) * SQR(LigLib(i)) - V0 * LigLibJeri * SQR(LigLibJeri)
    - (V - V0) * LigLib(i - 1) * SQR(LigLib(i - 1))) * 1000000!
END IF
NEXT i

RETURN

```

'Subrutina de calculo de la suma de los residuos al cuadrado

Ssr:

```

Ssr = 0
FOR i = PuntoInicial TO PuntoFinal
  Ssr = Ssr + (Calor(i) - CalVar(i)) ^ 2
NEXT i

RETURN

```

'Subrutina de graficas

Graficas:

```

IF NumeroTecla% = 59 THEN CLS 0 ELSE CLS 1
IF GraficaX = 0 OR GraficaX = -1 THEN CLS 0

SCREEN 9: VIEW (50, 20)-(610, 330), 7, 0: VIEW (10, 15)-(300, 260), 1, 7
WINDOW (-100, -100)-(1100, 1100)

LOCATE 20, 8: PRINT X$: LOCATE 5, 40: PRINT Y$
LOCATE 3, 40: PRINT " Fichero : "; UCASE$(MID$(Nom$, 3, LEN(Nom$)))
LOCATE 12, 40: PRINT " [ M ]Cel:": LOCATE 12, 55: PRINT USING "####.###"; MacCelEx * 1000!:
LOCATE 12, 65: PRINT " mM "
LOCATE 13, 40: PRINT " [ M ]Jer:": LOCATE 13, 55: PRINT USING "####.###"; MacJeriEx * 1000!:
LOCATE 13, 65: PRINT " mM "
LOCATE 14, 40: PRINT " [ L ]Jer:": LOCATE 14, 55: PRINT USING "####.###"; LigEx * 1000!:
LOCATE 14, 65: PRINT " mM "
LOCATE 15, 40: PRINT " Vol./Iny.": LOCATE 15, 55: PRINT USING "####.###"; V0 * 1000000!:
LOCATE 15, 65: PRINT " "; CHR$(230); "1 "
LOCATE 16, 40: PRINT " Vol. Cel.": LOCATE 16, 55: PRINT USING "####.###"; V * 1000000!:
LOCATE 16, 65: PRINT " "; CHR$(230); "1 "
IF Comentario$ <> "" THEN LOCATE 1, 2: PRINT "Comentario: "; Comentario$

```

```

IF GraficaX = 0 THEN
  LOCATE 19, 55: PRINT "Iter: "; sFinal: LOCATE 20, 55: PRINT "SRC : "; rFinal
  IF S0 = 2000 THEN
    LOCATE 9, 5: PRINT " La convergencia no ha sido "
    LOCATE 10, 5: PRINT " alcanzada durante el maximo "

```



```

LOCATE 11, 5: PRINT " de iteraciones permitidas "
END IF
END IF

'---Factores de escala

Max1 = -1E+10: Min1 = 1E+10: Max2 = Max1: Min2 = Min1
FOR i = PuntoInicial TO PuntoFinal
  IF Y1(i) >= Max1 THEN Max1 = Y1(i)
  IF Y1(i) <= Min1 THEN Min1 = Y1(i)
  IF Y2(i) >= Max2 THEN Max2 = Y2(i)
  IF Y2(i) <= Min2 THEN Min2 = Y2(i)
NEXT i
IF Min1 < Min2 THEN Ymin = Min1 ELSE Ymin = Min2
IF Max1 > Max2 THEN Ymax = Max1 ELSE Ymax = Max2
IntervaloX = ABS(X(PuntoInicial) - X(PuntoFinal)): IntervaloY = Ymax - Ymin

UltimaGrafica:

'---Graduación de los ejes

FOR i = 0 TO 5
  LINE (-100, i * 1200 / 5 - 100)-STEP(20, 0), 7
  LINE (i * 1200 / 5 - 100, -100)-STEP(0, 20), 7
  LINE (1100, i * 1200 / 5 - 100)-STEP(-20, 0), 7
  LINE (i * 1200 / 5 - 100, 1100)-STEP(0, -20), 7
NEXT i

'---Conversión de las coordenadas (X,Y1), (X,Y2) en coordenadas gráficas (xGr,y1Gr), (xGr,y2Gr) y dibujo
de los puntos

FOR i = PuntoInicial TO PuntoFinal
  xGr(i) = ABS(X(i) - X(PuntoInicial)) * 1000 / IntervaloX
  y1Gr(i) = ABS(Y1(i) - Ymin) * 1000 / IntervaloY: y2Gr(i) = ABS(Y2(i) - Ymin) * 1000 / IntervaloY
  LINE (xGr(i) - 4, y1Gr(i) - 10)-(xGr(i) + 4, y1Gr(i) + 10), 15, BF, 0
NEXT i

'---Unir puntos por lineas

IF UnirPuntos = 1 THEN
  FOR i = PuntoInicial TO PuntoFinal - 1
    LINE (xGr(i), y2Gr(i))-(xGr(i + 1), y2Gr(i + 1)), 7
  NEXT i
END IF

IF GraficaX = -1 THEN RETURN

i = PuntoInicial: LINE (xGr(i) - 4, y1Gr(i) - 10)-(xGr(i) + 4, y1Gr(i) + 10), 4, BF, 0
LOCATE 7, 41: PRINT USING "##"; i: LOCATE 7, 45: PRINT USING "####.###"; X(i)
LOCATE 7, 57: PRINT USING "####.###"; Y1(i)
IF EscribirY2 = 1 THEN LOCATE 7, 68: PRINT USING "####.###"; Y2(i)

LOCATE 22, 1: PRINT STRING$(80, 205)

```


COLOR 7, 9: LOCATE 23, 7: PRINT "[AvPág/RePág]-Continuar ["; CHR\$(27); " / "; CHR\$(26); "]-Leer datos [Esc]-Menu principal": COLOR 15, 9

DO

DO

DO: Tecla\$ = INKEY\$: LOOP UNTIL Tecla\$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT\$(Tecla\$, 1))
 LOOP UNTIL NumeroTecla% = 75 OR NumeroTecla% = 77 OR NumeroTecla% = 81 OR NumeroTecla% = 27 OR NumeroTecla% = 73

IF NumeroTecla% = 81 OR NumeroTecla% = 73 THEN RETURN
 IF NumeroTecla% = 27 THEN GOTO Menu

'---Leer las coordenadas de los puntos

IF NumeroTecla% = 77 THEN

IF i = PuntoFinal THEN GOTO Saltar

i = i + 1

LINE (xGr(i - 1) - 4, y1Gr(i - 1) - 10)-(xGr(i - 1) + 4, y1Gr(i - 1) + 10), 15, BF, 0

LINE (xGr(i) - 4, y1Gr(i) - 10)-(xGr(i) + 4, y1Gr(i) + 10), 4, BF, 0

ELSE

IF i = PuntoInicial THEN GOTO Saltar

i = i - 1

LINE (xGr(i + 1) - 4, y1Gr(i + 1) - 10)-(xGr(i + 1) + 4, y1Gr(i + 1) + 10), 15, BF, 0

LINE (xGr(i) - 4, y1Gr(i) - 10)-(xGr(i) + 4, y1Gr(i) + 10), 4, BF, 0

END IF

LOCATE 7, 41: PRINT USING "##"; i: LOCATE 7, 45: PRINT USING "####.###"; X(i)

LOCATE 7, 57: PRINT USING "####.###"; Y1(i)

IF EscribirY2 = 1 THEN LOCATE 7, 68: PRINT USING "####.###"; Y2(i)

Saltar:

LOOP

RETURN

'Subrutina de Errores.

Errores:

CLS 0: COLOR 7, 0

VIEW (10, 40)-(630, 280), 7, 4: WINDOW (0, 0)-(1000, 1000)

LINE (220, 300)-(820, 700), 4, BF: LINE (170, 350)-(770, 750), 0, BF

SELECT CASE ERR

CASE 53

LOCATE 11, 25: PRINT " Fichero no encontrado "

CASE 71

LOCATE 11, 25: PRINT " Disco fuera "

CASE 68

LOCATE 11, 25: PRINT " Directorio no valido "

CASE ELSE

LOCATE 11, 25: PRINT " Error no identificado ": LOCATE 12, 25: PRINT " Vuelve a correr el programa": LOCATE 13, 25: PRINT " introduciendo otros datos."

END SELECT

DO

DO: Tecla\$ = INKEY\$: LOOP UNTIL Tecla\$ <> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT\$(Tecla\$, 1))
LOOP UNTIL NumeroTecla% = 27

CLS : RESUME Menu

'Salida del programa

Salir:

LINE (20, 200)-STEP(960, 300), 4, BF

LOCATE 14, 58: PRINT " Esta seguro de ": LOCATE 15, 58: PRINT "abandonar el programa"

COLOR 7, 9: LOCATE 23, 1: PRINT " [Enter]- Abandonar el programa [Esc]- Volver al menu
": COLOR 15, 9

DO

DO: Tecla\$ = INKEY\$: LOOP UNTIL Tecla\$-<> "": NumeroTecla% = ASC(RIGHT\$(Tecla\$, 1))
LOOP UNTIL NumeroTecla% = 27 OR NumeroTecla% = 13
IF NumeroTecla% = 27 THEN CLS 1: GOTO VolverMenu

END