

PROV. T. 15/150

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 7-3-95
ENTRADA NUM. ... 207

Departamento de Química Física

ESTUDIO DE LA DESNATURALIZACION
TERMICA E INTERACCION CON LIGANDOS
DE PROTEINAS DE BAJO PESO
MOLECULAR

Jose Cristóbal Martínez Herrerías

TESIS DOCTORAL

GRANADA
1995

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Física

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



Fdo. Jose Cristóbal Martínez Herrerías
Licenciado en Ciencias Químicas

Visado en Granada, a 24 de Febrero de 1995

Los directores de la Tesis



Fdo. Dr. Vladimir V. Filimonov,
Profesor de Investigación del Instituto
para la Investigación de Proteínas de
la Academia de Ciencias Rusa
(Pushshino-Moscú)



Fdo. Dr. Pedro Luis Mateo Alarcón,
Catedrático de Química Física de la
Facultad de Ciencias de la Universidad
de Granada.



INDICE GENERAL

1.- INTRODUCCION	1
2.- MATERIALES Y METODOS	9
2.1.- <u>CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO(CDB)</u>	9
2.1.1.- INSTRUMENTACION	9
2.1.1.1.- <u>Generalidades</u>	9
2.1.1.2.- <u>Características del aparato</u>	12
2.1.1.3.- <u>Calibración</u>	12
2.1.2.- PARTE EXPERIMENTAL	13
2.1.2.1.- <u>Preparación de muestras</u>	13
2.1.2.2.- <u>Realización del experimento</u>	14
2.1.3.- ANALISIS PRELIMINAR DE LOS DATOS EXPERIMENTALES	17
2.1.3.1.- <u>Resta de línea base instrumental</u>	18
2.1.3.2.- <u>Determinación de la capacidad calorífica molar</u> <u>parcial de la proteína</u>	18
2.1.3.3.- <u>Línea base química</u>	21
2.1.4.- ANALISIS TERMODINAMICO SEGUN MODELOS DE EQUILIBRIO	23
2.1.4.1.- <u>Modelo de dos estados</u>	24
2.1.4.2.- <u>Modelos de equilibrio multiestado</u>	30
2.1.4.3.- <u>Transiciones con cambios en</u> <u>el estado de asociación</u>	36
2.1.4.4.- <u>Efecto de ligandos en transiciones</u> <u>de equilibrio tipo dos estados</u>	39
2.1.4.5.- <u>Modelo de Lumry-Eyring</u> <u>para procesos irreversibles</u>	47

2.2.- CALIRIMETRIA ISOTERMICA DE TITULACION	51
2.2.1.- INSTRUMENTACION	51
2.2.1.1.- <u>El bloque calimétrico</u>	51
2.2.1.2.- <u>Sistema de inyección y agitación</u>	56
2.2.1.3.- <u>Cálculo del volumen efectivo</u>	
<u>del bulbo de reacción</u>	57
2.2.2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	58
2.2.2.1.- <u>Preparación de los muestras</u>	
<u>de proteínas</u>	59
2.2.2.2.- <u>Obtención de los calores</u>	
<u>de reacción</u>	60
2.2.3.- ANALISIS DE DATOS	65
2.3.- TECNICAS DE ELECTROFORESIS	69
2.3.1.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN	
PRESENCIA DE LAURIL SULFATO SODICO (SDS)	69
2.3.1.1.- <u>Reactivos</u>	70
2.3.1.2.- <u>Preparación del gel</u>	71
2.3.1.3.- <u>Preparación de las muestras de proteínas</u>	73
2.3.1.4.- <u>Aplicación y desarrollo de la muestra</u>	73
2.3.1.5.- <u>Tinción de las bandas de proteína y</u>	
<u>destinción del gel</u>	74
2.3.2.- ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NO	
DESNATURALIZANTES	75
2.3.2.1.- <u>Electroforesis nativas a pH 8.3</u>	76
2.3.2.2.- <u>Electroforesis en urea 8M a pH 8.3</u>	77
2.3.2.3.- <u>Electroforesis nativas a pH 4.3</u>	78
2.4.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA CONVENCIONAL DE EXCLUSION	
MOLECULAR	79
2.4.1.- CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-75F	81
2.4.2.- CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-50F	83

2.5.- <u>CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)</u>	86
2.6.- <u>DETERMINACION DE COEFICIENTES DE EXTINCION</u>	86
2.7.- <u>MATERIAL FUNGIBLE Y OTROS APARATOS</u>	91
2.7.1.- REACTIVOS	91
2.7.2.- MATERIAL BIOLÓGICO	92
2.7.3.- INSTRUMENTACION	92
3.- DOMINIO SH3 DE α-ESPECTRINA	
3.1.- <u>ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS</u>	95
3.1.1.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES CON DOMINIOS SH3	97
3.2.- <u>EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO</u> <u>CON EL DOMINIO SH3 DE ESPECTRINA (SPC-SH3)</u>	104
3.3.- <u>DISCUSION</u>	114
4.- BARNASA	123
4.1.- <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	123
4.1.1.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES	123
4.1.2.- ESTUDIOS DE DESNATURALIZACION	131
4.1.2.1.- <u>Estudios de calorimetría diferencial de barrido</u>	145
4.1.3.- ESTUDIOS DE UNION A NUCLEOTIDOS	146
4.2.- <u>RESULTADOS EXPERIMENTALES</u>	152
4.2.1.- EXPERIMENTOS A pH ACIDO	152
4.2.2.- ESTUDIOS A MAYORES VALORES DE pH	156
4.2.3.- DESNATURALIZACION DE ALGUNOS MUTANTES DIRIGIDOS DE BARNASA: TS16, KA27, RA87, HA102	158
4.2.4.- INTERACCION BARNASA-3'GMP	163
4.2.4.1.- <u>Método basado en el cálculo de las</u> <u>funciones de partición</u>	164
4.2.4.2.- <u>Método gráfico de aproximación</u>	169
4.2.4.3.- <u>Ajuste multidimensional de los datos</u>	

<u>experimentales</u>	171
4.3.- <u>DISCUSION DE RESULTADOS</u>	173
5.- BARSTAR	185
5.1.- <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	185
5.1.1.- ESTRUCTURA DE LA PROTEINA	186
5.1.2.- ESTRUCTURA DEL COMPLEJO BARNASA-BARSTAR .	189
5.1.3.- ESTUDIOS DE DESNATURALIZACION	193
5.1.4.- TERMODINAMICA DE LA INTERACCION BARNASA- BARSTAR	194
5.2.- <u>RESULTADOS EXPERIMENTALES</u>	196
5.2.1.- ESTABILIDAD TERMICA DE BARSTAR "WT" Y SUS MUTANTES	197
5.2.2.- EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA A pH ACIDO ...	209
5.2.3.- EXPERIMENTOS DE CDB CON EL COMPLEJO BARNASA-BARSTAR	213
5.2.4.- EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA ISOTERMICA CON EL COMPLEJO BARNASA-BARSTAR	220
5.3.- <u>DISCUSION DE RESULTADOS</u>	224
6.- CheY	235
6.1.- <u>ESTUDIO BIBLIOGRAFICO DE LA CheY</u>	235
6.1.1.- ESTUDIOS DINAMICO-ESTRUCTURALES	238
6.1.2.- ESTUDIOS DE DESNATURALIZACION	245
6.1.3.- INTERMEDIOS DE PLEGAMIENTO	245
6.2.- <u>EXPERIMENTOS DE DESNATURALIZACION</u>	250
6.2.1.- EXPERIMENTOS A pH ACIDO	256
6.2.2.- EXPERIMENTOS A pH NEUTRO	263
6.2.3.- EXPERIMENTOS A pH BASICO	270
6.3.- <u>DISCUSION DE RESULTADOS</u>	274
7.- RESUMEN Y CONCLUSIONES	279
8.- BIBLIOGRAFIA	283

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 2-1	11
FIGURA 2-2	19
FIGURA 2-3	20
FIGURA 2-4	26
FIGURA 2-5	29
FIGURA 2-6	33
FIGURA 2-7	39
FIGURA 2-8	44
FIGURA 2-9	45
FIGURA 2-11	52
FIGURA 2-12	55
FIGURA 2-13	58
FIGURA 2-14	64
FIGURA 2-15	68
FIGURA 2-16	74
FIGURA 2-17	82
FIGURA 2-18	83
FIGURA 2-19	85
FIGURA 2-20	90
FIGURA 3-1	99
FIGURA 3-2	101
FIGURA 3-3	102
FIGURA 3-4	105
FIGURA 3-5	106
FIGURA 3-6	108
FIGURA 3-7	110
FIGURA 3-8	111
FIGURA 3-9	117
FIGURA 3-10	120
FIGURA 4-1	124
FIGURA 4-2	128

FIGURA 4-3	136
FIGURA 4-4	134
FIGURA 4-5	147
FIGURA 4-6	149
FIGURA 4-8	154
FIGURA 4-9	155
FIGURA 4-10	157
FIGURA 4-11	159
FIGURA 4-12	160
FIGURA 4-13	161
FIGURA 4-14	167
FIGURA 4-15	168
FIGURA 4-16	172
FIGURA 4-17	177
FIGURA 4-18	178
FIGURA 4-19	180
FIGURA 5-1	187
FIGURA 5-2	190
FIGURA 5-3	198
FIGURA 5-4	200
FIGURA 5-5	202
FIGURA 5-6	203
FIGURA 5-7	204
FIGURA 5-8	208
FIGURA 5-9	211
FIGURA 5-10	212
FIGURA 5-11	214
FIGURA 5-12	215
FIGURA 5-13	216
FIGURA 5-14	218
FIGURA 5-15	221
FIGURA 5-16	222
FIGURA 5-17	225

FIGURA 5-18	227
FIGURA 6-1	236
FIGURA 6-2	237
FIGURA 6-3	239
FIGURA 6-4	241
FIGURA 6-5	244
FIGURA 6-6	251
FIGURA 6-7	252
FIGURA 6-8	256
FIGURA 6-9	257
FIGURA 6-10	259
FIGURA 6-11	261
FIGURA 6-12	264
FIGURA 6-13	265
FIGURA 6-14	266
FIGURA 6-15	268
FIGURA 6-16	269
FIGURA 6-17	271
FIGURA 6-18	272
FIGURA 6-19	273

INDICE DE TABLAS

TABLA 2-I	72
TABLA 2-II	77
TABLA 2-III	84
TABLA 2-IV	87
TABLA 2-V	89
TABLA 3-I	112
TABLA 3-II	116
TABLA 4-I	153
TABLA 4-II	158
TABLA 4-III	162
TABLA 4-IV	170
TABLA 5-I	199
TABLA 5-II	219
TABLA 5-III	232
TABLA 6-I	258
TABLA 6-II	267
TABLA 6-III	270
TABLA 6-IV	276

ABREVIATURAS

M: Peso molecular (g/mol)

V_{cel} : Volumen de la célula

k: constante de calibración (mV/ μ W)

v: velocidad de barrido (K/min)

$C_{p,\text{ap}}$: capacidad calorífica aparente o molar parcial

$C_p(T)$: función de capacidad calorífica experimental

C_p^m : capacidad calorífica en el máximo experimental (T_m)

T_m : temperatura del máximo experimental

$\Delta H_{N,D}^{\text{cal}}$: entalpía calorimétrica o experimental

$\Delta C_{p,\text{exc}}$: incremento de capacidad calorífica de exceso

f: factor de conversión de mV a kJ/K·mol

$\Delta C_{p,\text{int}}$: incremento de capacidad calorífica interna o intrínseca

$C_{p,N}$: capacidad calorífica del estado N

$C_{p,U}$: capacidad calorífica del estado U

$\Delta H_{N,D}^{\text{vH}}$: entalpía de van't Hoff

V_p : volumen molar parcial de la proteína

$\Delta H_{N,D}$: diferencia de entalpía entre N y D

$\Delta C_{p,N}$: incremento de capacidad calorífica de exceso respecto al estado nativo

$\Delta C_{p,N,D}$: incremento de capacidad calorífica entre N y D

K_U : constante del equilibrio de desnaturalización

T_U : temperatura a la que $K_U = 1$

r: relación $\Delta H_{N,D}^{\text{cal}}/\Delta H_{N,D}^{\text{vH}}$

$\Delta G_{N,D}$: variación de la energía de Gibbs entre los estados N y D

f_x : distribución poblaciones de la especie X con la temperatura

n: estequiometría del proceso

K_d : constante del equilibrio de disociación

K_a : constante del equilibrio de asociación

ΔH_d : entalpía de disociación

ΔH_a : entalpía de asociación

ΔS_d : entropía de disociación

ΔS_a : entropía de asociación
 $\Delta C_{p,d}$: cambio de capacidad calorífica de disociación
[L]: concentración de ligando libre
 V_R : volumen de retención
 k_F : constante cinética del proceso D→F
E: energía de activación
 T_* : temperatura a la que $k_F = 1$
 ϵ : coeficiente de extinción
WT: especie salvaje
Q: función de partición del sistema
 ΔS_u : cambio de entropía en unidades estándar o entrópicas
 $\Delta S_u(h)$: cambio de entropía hidrofóbica
 $\Delta S_u(v)$: cambio de entropía vibracional
 $\Delta C_{p,d}(h)$: incremento en capacidad calorífica hidrofóbica
 $\Delta C_{p,d}(v)$: incremento en capacidad calorífica vibracional
 $\Delta H_{N,D,r}$: cambio de entalpía por resto de aminoácido
 $\Delta C_{p,N,D,r}$: incremento de capacidad calorífica por resto de aminoácido
 $\Delta h_{N,D}$: entalpía específica (J/g)
 t_R : tiempo de retención
 $C_{p,U,ap}$: capacidad calorífica del estado desnaturalizado aparente
 $C_{p,U,calc}$: capacidad calorífica del estado desnaturalizado calculada
 ΔN : intercambio protónico con el disolvente
 ΔH_{ion} : entalpía de ionización del tampón
CD: dicroísmo circular
CDB: calorimetría diferencial de barrido
CIT: calorimetría isotérmica de titulación
UV: ultravioleta

INTRODUCCION

Las proteínas realizan la inmensa mayoría de las funciones moleculares desarrolladas en los organismos, gobernando y dirigiendo los acontecimientos celulares. El número y clase de funciones que desempeñan es tan extenso y diverso que su importancia tiende a menudo a subestimarse. Frecuentemente se las describe como simple producto genético, aunque ellas, las proteínas, están profundamente implicadas en su propia síntesis. De hecho, sería casi más razonable describir los ácidos nucleicos como productos de las proteínas. Una posible razón para esta situación estriba en que las proteínas no pueden asociarse a una única y simple función o estructura; su complejidad es parte de su fascinación, lo que significa que su esencia no es precisamente fácil de comprender y capturar.

Durante los últimos años se ha realizado un avance espectacular en el conocimiento estructural, dinámico, energético y funcional de las proteínas, debido a un gran desarrollo instrumental, teórico y metodológico específico. En particular, las técnicas de DNA recombinante han permitido la obtención de proteínas en cantidades y pureza necesarias para estudios físicos, así como la disposición de mutantes seleccionados. Además de esta investigación básica, la ingeniería de proteínas supone hoy día un apartado importante en la Biotecnología molecular. Precisamente estos aspectos de aplicación práctica han replanteado de nuevo lo que hoy día se conoce como segunda parte del código genético, es decir, cómo una secuencia dada de aminoácidos implica, bajo condiciones adecuadas, una conformación nativa específica, cuya respuesta supondría conocer las denominadas "reglas de plegamiento" de la cadena polipeptídica. Es evidente que el conocimiento de estas reglas conllevaría un salto cualitativo no solo en la investigación básica, sino que abriría las puertas al diseño racional de mutantes y de proteínas de novo para fines prácticos determinados en campos tales como la medicina, farmacología, biorreactores, biosensores, etc. En otras palabras una verdadera revolución científica e industrial.

Un aspecto íntimamente relacionado con el plegamiento es el de la estabilidad del estado nativo de las proteínas. Así, el plegamiento adecuado de la cadena conduce al sistema a la conformación nativa, en principio un máximo global

de energía para ciertas condiciones ambientales. La estabilidad, concepto obviamente termodinámico, puede expresarse como la diferencia en la energía o función de Gibbs entre el estado nativo y el desplegado, o convenientemente llamada desnaturalizado, $\Delta G_{N,D} = G_D - G_N$. El método más inmediato para obtener este parámetro es precisamente a partir del estudio de la desnaturalización de la proteína en cuestión. Este $\Delta G_{N,D}$ puede entenderse como el resultado de dos componentes, términos entálpico y entrópico, según la conocida relación termodinámica $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$. En el caso de la desnaturalización de proteínas, estas funciones, ΔH y ΔS , y consecuentemente ΔG , dependen de T de forma significativa, al existir un ΔC_p no nulo, usualmente positivo. Sin entrar ahora en la interpretación estructural de estas funciones, resulta obvio que su conocimiento es necesario para describir la energética del proceso de desnaturalización y plegamiento de una proteína y, por ende, para definir y racionalizar su estabilidad. De los diversos métodos posibles para esta investigación, la calorimetría diferencial de barrido presenta una serie de ventajas y posibilidades decisivas, como se irá describiendo a lo largo de esta Memoria.

El proceso de desnaturalización de las proteínas puede presentar mecanismos más o menos complicados, dependiendo de la naturaleza y, en general, del tamaño y complejidad de cada proteína. En este sentido el estudio de proteínas de pequeño tamaño facilita el análisis de los datos calorimétricos y permite avanzar en el desarrollo de modelos y de nuevas estrategias de cálculo, así como en la caracterización de aspectos tales como la C_p del estado desnaturalizado o la posible existencia de estados tipo "molten globule" recientemente descritos en la bibliografía. Junto a proteínas de pequeño tamaño (≈ 10 kDa), los dominios globulares aislados de proteínas de mayor tamaño son también candidatos válidos para el estudio del desplegamiento y estabilidad de estas pequeñas unidades o dominios estructurales.

Por otra parte, el análisis termodinámico de los datos calorimétricos exige que el proceso de desnaturalización sea reversible. De acuerdo con los criterios de reversibilidad establecidos se sabe, sin embargo que la mayoría de las proteínas

presentan una desnaturalización térmica irreversible. Precisamente son las proteínas de menor tamaño, así como los dominios aislados de proteínas globulares, las que tienden a experimentar una desnaturalización reversible analizable termodinámicamente.

Aparte de los estudios de desplegamiento y estabilidad, otro aspecto de suma importancia en la investigación de proteínas es la caracterización energética de su interacción con ligandos. Puede decirse que las proteínas realizan su función biológica vía múltiples interacciones con ligandos de muy diversa naturaleza. La termodinámica de esta unión puede también abordarse calorimétricamente, aunque en este caso haciendo uso de la calorimetría isotérmica de reacción a temperaturas relativamente bajas. En realidad, las interacciones que se establecen en los procesos de unión y su descripción energética son cualitativamente análogos a los correspondientes en los procesos de plegamiento/desplegamiento. Mas allá de la descripción termodinámica de la interacción proteína-ligando, el sistema complejo formado por ambas especies puede presentar una estabilidad térmica claramente diferenciada de la de la proteína sola, y este estudio sería de nuevo abordable por calorimetría de barrido. Más aún, el desarrollo termodinámico de las ecuaciones correspondientes a esta unión permite utilizar esta última técnica para caracterizar dicha unión en el entorno de la temperatura de desnaturalización. En último extremo, la combinación de las dos técnicas calorimétricas citadas, ampliamente complementarias, permite la descripción termodinámica completa tanto de los procesos de desplegamiento e interacción, como de la estabilidad térmica de las especies implicadas, en un amplio intervalo de temperaturas. Un caso de particular interés en los procesos de unión proteína-ligando se da cuando el ligando es a su vez otra macromolécula, por ejemplo otra proteína. Se habla entonces de reconocimiento molecular proteína-proteína, y en donde el desplegamiento térmico correspondería al de dos especies macromoleculares unidas con una afinidad usualmente muy elevada. Existe muy poca información bibliográfica sobre este tipo de interacciones a nivel molecular.

El objetivo de esta Memoria ha sido, en el contexto de lo que venimos

hablando, la investigación termodinámica del desplegamiento y estabilidad térmica de diversas proteínas de tamaño comparativamente pequeño y de dominios estructurales aislados y purificados de otras proteínas de mayor tamaño; asimismo se ha incluido el estudio de la unión de un ligando pequeño, un nucleótido y del correspondiente a una interacción proteína-proteína. Así, si seguimos un orden de complejidad creciente, se ha investigado el dominio SH3 de α -espectrina, un modelo de proteína "todo β ", cuya estabilidad se ha caracterizado y en el que su desplegamiento no muestra la presencia de especies intermedias detectables tanto cinética como termodinámicamente, es decir, experimenta una desnaturalización tipo dos estados de manera perfecta. Por otra parte se ha estudiado la Barnasa, proteína ampliamente investigada por el grupo del Prof. A.R. Fersht (Cambridge), analizando también su desplegamiento térmico y su interacción con el inhibidor 3'GMP. Un estudio análogo se ha realizado con otra proteína, la Barstar, inhibidora natural de la Barnasa, abordando aquí también la interacción de ambas proteínas Barnasa-Barstar por técnicas calorimétricas de barrido e isotérmica, caracterizándose la energética de su estabilidad y reconocimiento molecular. Por último hemos comprobado que la proteína CheY sigue un mecanismo de desnaturalización particularmente complejo, con una especie intermedia que presenta las características de "molten globule" y para la que la calorimetría de barrido se ha mostrado particularmente útil al mostrar la tendencia de dicho estado a autoasociarse. Ha sido la primera vez que se ha publicado (1993) esta tendencia a la asociación del estado "molten globule" y desde esta fecha otras publicaciones tienden a confirmar esta propiedad de un estado tan polémico y controvertido. En algunas de las proteínas investigadas, el uso de mutantes seleccionados ha supuesto un valor añadido a la hora de la racionalización de los procesos en estudio.

Finalmente debe añadirse que la práctica totalidad de la investigación contenida en esta Memoria ha sido publicada muy recientemente [*Biochemistry* (1993) **32**, 12906-12921; *Biochemistry* (1994) **33**, 2142-2150; *Biochemistry* (1994) **33**, 3919-3926] o se encuentra ya en prensa [*Biochemistry* (1995), en

prensa]



MATERIALES
& METODOS



2.1.- CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO (CDB)

2.1.1.- INSTRUMENTACION

2.1.1.1.- Generalidades

Desde los años 70, el desarrollo de instrumentación para la medida de la capacidad calorífica de pequeños volúmenes de líquidos, ha experimentado un desarrollo espectacular. Este desarrollo instrumental, dirigido fundamentalmente al estudio de macromoléculas biológicas necesita de muy pequeños volúmenes de muestra y trabajar con disoluciones acuosas de la macromolécula de muy baja concentración (unos pocos mg/mL) ya que éstas se purifican en cantidades parecidas en el mejor de los casos. Además, necesitamos trabajar a velocidades de barrido relativamente lentas para evitar fenómenos cinéticos en los experimentos como gradientes de temperatura en la disolución. Hoy en día ya se dispone de una instrumentación superprecisa y supersensible (Wadsö, 1970; Sturtevant, 1974; Mabrey & Sturtevant, 1978; Privalov, 1980). Los microcalorímetros actuales presentan una serie de características comunes:

1) No poseen agitación mecánica para evitar pérdidas de calor por efecto Joule que podrían ser mayores, incluso, que el efecto calorífico medido si el líquido tiene una elevada viscosidad.

2) La medida de capacidad calorífica se realiza en contínuo, calentando o enfriando la muestra a una velocidad constante. Es por esto que se denominan microcalorímetros de barrido. Esta medida contínua de pequeños cambios de capacidad calorífica genera una información más completa y permite la automatización total del proceso de medida. La principal desventaja es que la muestra en estudio no se encontrará totalmente en equilibrio térmico (el diseño de las células tiene mucho que ver con este punto).

3) En realidad, este tipo de microcalorímetros miden la diferencia en capacidad calorífica entre dos células, en una se encuentra la disolución objeto de estudio y en la otra un líquido patrón. En el estudio de proteínas este patrón sería el disolvente en el que se encuentra.

4) Estos calorímetros, como veremos a continuación, funcionan de modo

adiabático.

5) El bloque calorimétrico es fijo (no desmontable) lo que produce una mayor reproducibilidad en los datos ya que la línea base registrada no debe cambiar ni su forma ni su posición apreciablemente con el tiempo.

Al comenzar un barrido se suministra a las resistencias eléctricas asociadas a cada célula la misma intensidad de corriente, cuyo valor está fijado por la velocidad de barrido seleccionada. Para medir la diferencia en capacidad calorífica de las células se utiliza un método de compensación, de tal manera que un controlador mide la potencia de los calentadores eléctricos de ambas células para mantenerlas a la misma temperatura en todo el barrido. Esto también sucede con las corazas externa e interna de forma que el bloque de células en su conjunto corresponda a un sistema adiabático (Privalov, 1980). Cuando se produce algún efecto térmico (desnaturalización de una proteína, fusión de un lípido, etc), el control en lazo cerrado del instrumento responde realizando una compensación simétrica de potencia en ambas células, que permite obtener una relación lineal entre la señal eléctrica registrada y el efecto térmico. Como consecuencia de ello, es evidente que la diferencia de temperatura entre ambas células puede detectarse con una gran sensibilidad, la que origina en gran parte la de la medida calorimétrica.

Existen varios modelos comerciales, de los cuales los DASM-4 utilizados en la mayoría de los experimentos que presentaremos son los que tienen una mayor sensibilidad y exactitud en la determinación de la capacidad calorífica. En algunas ocasiones, también se utilizó un modelo DASM-1M. La principal diferencia entre ellos es la geometría de las células (ver Figura 2-1). Así, mientras que en un DASM-4 éstas son tubos capilares de platino (1.2 mm de diámetro interno) formando una hélice, en un DASM-1M tienen forma de moneda y son de oro. Las primeras presentan varias ventajas ya que pueden ser lavadas y llenadas más fácilmente sin burbujas y proveen un campo térmico más homogéneo sin apenas gradientes de temperatura en los líquidos en estudio. Esto permite utilizar mayores velocidades de barrido, lo que a su vez repercute en un incremento de la sensibilidad del

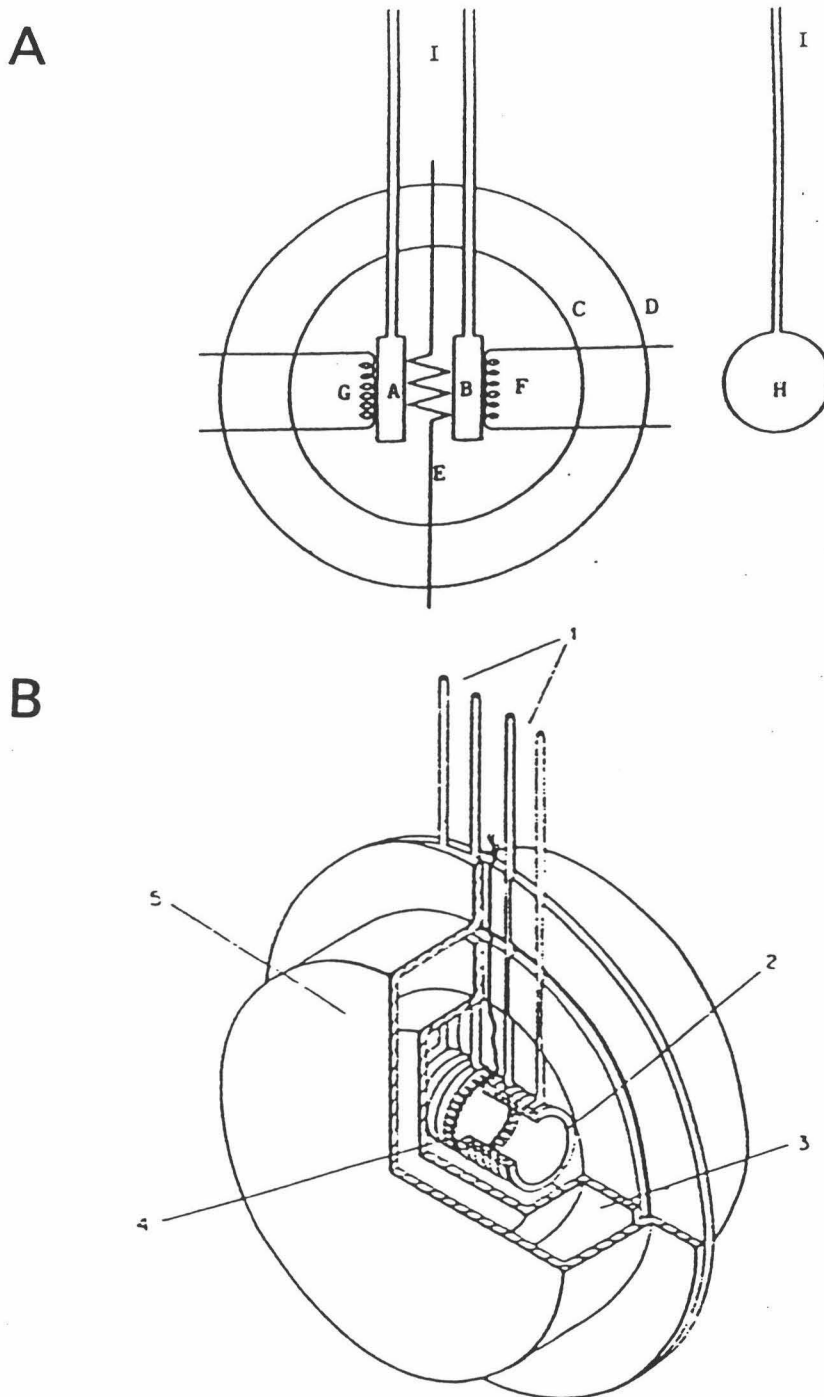


FIGURA 2-1: (A) Diagrama esquemático del bloque calorimétrico del DASM-1M. A,B) Células; C,D) corzas interna y externa; E) sistema de termopilas entre las dos células; F,G) calentadores principales; H) punto de vista lateral de una célula; I) tubos capilares de llenado. (B) Idem. para el DASM-4. 1) Entrada de los capilares; 2) calentador de las células capilares; 3) corza interna; 4) termopila; 5) corza externa.

instrumento. Además, en las células capilares no existe convección térmica en el calentamiento que es una de las principales fuentes de artefactos en calorimetría diferencial de barrido.

2.1.1.2.- Características del aparato

	<u>DASM-1M</u>	<u>DASM-4</u>
Volúmen de las células (mL)	1.0	0.5
Intervalo de temperatura de operación (K)	272-373	250-400
Velocidades de barrido (K/min)	0.1-2.0	0.1-2.0
Nivel de ruido (μW)	0.5	0.2
Error relativo en la determinación de la capacidad calorífica (%)	0.01	0.0005

(Datos tomados de Privalov & Potekhin, 1986).

2.1.1.3.- Calibración

Consiste en suministrar durante un tiempo determinado, t , una potencia eléctrica extra, P , a la resistencia de una de las dos células. Como $W = P \cdot t$, conocidos P y t inmediatamente podemos determinar el trabajo eléctrico realizado. Así, conocida el área del calibrado y su energía correspondiente, podremos calcular la entalpía calorimétrica de desnaturalización de la proteína en unidades de energía (kJ/mol). También se puede determinar el factor de conversión de milivoltios (que es la señal de salida del calorímetro) a valores de capacidad calorífica en kJ/K·mol teniendo en cuenta la altura del calibrado y los datos del experimento de concentración de proteína, velocidad de barrido, peso molecular de la proteína y volúmen de las células:

$$f = \frac{M(g/mol) \cdot 60(s/min) \cdot 10^{-6}(W/\mu W)}{k(mV/\mu W) \cdot V_{cel}(mL) \cdot c(mg/mL) \cdot v(K/min)} \quad (2.1)$$

La potencia que se puede suministrar en el DASM-4 es de 25, 50 ó 100 μW . En el DASM-1M son de 10, 50 ó 250 μW . La calibración del aparato se controla

rutinariamente cada cierto tiempo para comprobar su reproducibilidad. Además, es conveniente suministrar diferentes potencias y hacerlo a diferentes velocidades de barrido para ver si existe alguna dependencia con este parámetro. En este caso, sería necesario utilizar una constante k ($mV/\mu W$) diferente para cada velocidad de barrido.

El volúmen operacional de una célula calorimétrica, V_{cel} , puede determinarse midiendo la diferencia en capacidad calorífica de dos líquidos con diferentes capacidades caloríficas conocidas o simplemente, midiendo la diferencia en capacidad calorífica de una célula vacía y otra llena con agua pura. (Privalov & Pothekhin, 1986).

2.1.2.- PARTE EXPERIMENTAL

2.1.2.1.- Preparación de muestras

A excepción de las muestras de Barnasa que fueron suministradas como un polvo liofilizado, el resto de las muestras se encontraban en una disolución tamponada a un determinado pH y fuerza iónica. Para tener las proteínas en el medio deseado para los experimentos hemos realizado diálisis de las mismas en dichos medios. Todas estas manipulaciones con las disoluciones de proteína se hicieron en cámara fría a 4°C, procurando tenerlas el menor tiempo posible a temperatura ambiente.

Para dializar la muestra, la disolución de proteína se diluye con la cantidad adecuada de tampón para tener una concentración aproximada a la final y se introduce en una bolsa de diálisis previamente preparada con la ayuda de una pipeta Pasteur. Se cierra herméticamente la bolsa procurando dejar un poco de aire en su interior y entonces se introduce en un vaso de precipitado que contenga la disolución tamponada. Se deja con agitación en cámara fría. La diálisis se completa con un volúmen total de 1 litro de tampón durante 20 horas y puede realizarse de una vez, o cambiando volúmenes cada 4-6 horas siempre, al menos, 200 veces el volúmen de la muestra hasta completar el litro. Se comprobó que, dado que las disoluciones no estaban impurificadas con ningún agente extraño que no fuera su

propio medio tamponado, era equivalente hacerlo de una u otra forma. Sólo en el caso de tener muestras en urea o hidrocloreuro de guanidinio se comprobó que es más efectivo hacer varios cambios en la diálisis así como prolongar su tiempo de duración hasta, al menos, 40 horas. En algunos casos fué necesario concentrar disoluciones de proteína demasiado diluídas y para ello se hizo uso de unos tubos concentradores AMICON de 3.5 kDa de tamaño de poro.

Una vez dializada, la muestra se centrifuga en una centrífuga EPPENDORF a 15.000 rpm durante 15 minutos para eliminar cualquier posible resto insoluble. El sobrenadante es la disolución final de proteína con la que se va a realizar el experimento. Se necesita 1 mL aproximadamente de la misma.

La concentración de proteína de la disolución se determina mediante la medida de absorbancia a 280 nm, teniendo en cuenta su coeficiente de extinción (ver Sección 2.6). La proteína se diluye en 8-10 volúmenes de PIPES 50mM pH 7.0 para obtener una alícuota en las mismas condiciones de disolvente en las que se determinó dicho coeficiente de extinción y así evitar cambios en el espectro debidos a las variaciones de pH del medio.

2.1.2.2.- Realización del experimento

Un experimento calorimétrico consta de diversas etapas:

- Preparación de la experiencia
- Registro de línea base instrumental
- Barrido con la muestra de proteína
- Segundo barrido de la muestra

Preparación de la experiencia

Con la disolución de proteína ya en diálisis, lo único que resta por hacer es preparar el calorímetro para el experimento. En definitiva, esto consiste en el lavado de las células (fijas en el aparato) con agua Milli-Q haciéndola pasar a su través con la ayuda de una jeringa para arrastrar restos sólidos que queden de experimentos anteriores. Esta operación debe ser bastante exhaustiva, sobre todo si se ha

producido alguna agregación en las muestras de esos experimentos. En estos casos, podemos ayudarnos con una disolución de ácido fórmico 1M y hacer algún barrido de temperatura hasta 100°C, lo que facilita bastante el desprendimiento de estos restos. Se puede utilizar también disoluciones concentradas de urea y/o hidrocloreuro de guanidinio.

Además del lavado, antes de comenzar hay que fijar los controles de posición y pendiente del termograma que son parámetros ajustables del aparato y cuyos valores óptimos dependen de la velocidad de barrido. El objetivo es fijar la posición de la línea base en la escala de voltaje así como conseguir que ésta sea lo más plana posible. Así mismo, es importante hacer, al menos, uno o dos barridos de temperatura a la velocidad de barrido del experimento para asegurar una buena reproducibilidad en la misma.

Línea base

Este instrumento está diseñado para medir la diferencia de capacidad calorífica entre las muestras que existen en ambas células pero, aunque las dos células son iguales y están colocadas de la forma más simétrica posible, es realmente imposible tener dos células absolutamente idénticas, por tanto existe una diferencia de capacidad calorífica entre la dos células por otro lado inevitable. Es por esto que es necesario obtener en primer lugar un registro en el que se llenan ambas células con el tampón en que va disuelta la muestra y registrar un barrido. Esta sería la línea base instrumental.

Las células del DASM-4 se llenan con 0.8 mL, de los cuales el volúmen que sufrirá el proceso de desnaturalización es 0.48 mL. Se utiliza para ello una micropipeta de 1 mL con puntas desechables y se pasa tampón a través del capilar de platino haciendo juego con el resorte de la micropipeta varias veces para eliminar las burbujas que hay en el interior. En el otro extremo del capilar se adosa una punta de micropipeta para que recoja el líquido sobrante. Una vez llenos los capilares se tapan por uno de los extremos para evitar la salida del líquido y se administra una sobrepresión de 2.5 atmósferas para evitar la formación de burbujas

durante el calentamiento.

El calorímetro se encuentra continuamente efectuando un ciclo de calentamiento-enfriamiento en el intervalo de temperaturas seleccionado. El llenado o lavado de células es recomendable hacerlo en la fase de enfriamiento y por debajo de 30°C (lo más próximo a la temperatura ambiente).

En el caso del DASM-1M las células se llenan con una jeringa de vidrio de 2 mL que tiene una aguja metálica en su extremo. Se necesitan 1.5 mL de disolución y el líquido sobrante se recoge en un depósito que está situado encima del capilar que comunica la célula con el exterior. Además, este calorímetro no actúa cíclicamente por lo que la automatización del proceso es más complicada.

La recogida de datos comenzará en el momento en que el calorímetro comience a calentar, bien automáticamente en el caso del DASM-4 o manualmente con el DASM-1M. En cualquier caso, se realiza a través de un computador como veremos más adelante en este mismo apartado.

Es conveniente, por último, no recoger la primera línea base después del llenado puesto que el calorímetro puede estar algo desestabilizado. Es mejor hacer un calentamiento previo de las células con tampón hasta la temperatura final y recoger los datos en el segundo calentamiento, sin que exista un llenado intermedio.

Barrido con la muestra de proteína

Una vez finalizada la adquisición de datos correspondientes a la línea base, esperamos a que el calorímetro enfríe a una temperatura por debajo del comienzo de la endoterma de desnaturalización de la proteína o, en cualquier caso, por debajo de 30°C y se llena la célula de muestra con la disolución de proteína. Es conveniente secarla muy bien antes para evitar la dilución de la muestra y para controlar esto, medir concentración al resto sobrante de disolución, una vez finalizado el llenado.

En la célula de referencia se deja el tampón con el que se realizó la línea base, es decir, el mismo tampón en el que va disuelta la proteína. Estas

operaciones se deben hacer lo más rápidamente posible para tener el bloque calorimétrico destapado muy poco tiempo y así evitar irreproducibilidades.

La concentración de proteína utilizada debe ser adecuada para obtener una endoterma con una buena relación señal/ruido, para poder analizarla adecuadamente. Debido a que en un calorímetro diferencial de barrido dicha relación disminuye con la velocidad de barrido, usualmente es necesario trabajar con mayores concentraciones de proteína a velocidades bajas. Lo normal es utilizar concentraciones del orden del mg/mL.

Nótese que el termograma del barrido con la muestra aparece normalmente por debajo del de la línea base debido a que la capacidad calorífica absoluta de la proteína es menor que la del agua que desplaza (Privalov & Khechinashvili, 1974).

Segundo barrido de la muestra

Este segundo barrido de la proteína se hace después del primero sin llenado intermedio y sirve para comprobar el grado de reversibilidad del proceso de desnaturalización.

Una vez finalizado, se deben lavar las células lo más pronto posible para evitar los depósitos de restos sólidos de proteína en las paredes y dejarlas llenas con agua Milli-Q.

Adquisición de datos

Se realiza mediante un ordenador INVES PC-640x conectado directamente al calorímetro mediante un conversor analógico-digital. El programa de adquisición de datos genera un fichero de datos para cada barrido realizado. Cada fichero contiene tres columnas: temperatura en grados centígrados, altura de la señal en milivoltios y tiempo en segundos y tiene una extensión de 1000-1500 datos por barrido.

2.1.3.- ANALISIS PRELIMINAR DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Los ficheros generados por el programa de adquisición de datos contienen

la variación de la capacidad calorífica de la disolución de proteína con la temperatura. Sin embargo, antes de obtener los parámetros característicos reales de las trazas tales como temperatura del máximo, entalpía calorimétrica, etc. es necesario realizar una serie de correcciones a estos ficheros, que vamos a ilustrar con un ejemplo utilizando datos reales.

2.1.3.1.- Resta de línea base instrumental

Se pueden utilizar varios programas (DECONV, CPCALC, ANALCP, SCAL 2.0) para hacer esta operación consistente en restar los datos correspondientes a la línea base de los pertenecientes al experimento para eliminar las diferencias en capacidad calorífica inherentes al instrumento. De esta forma se obtiene la variación de la capacidad calorífica de la proteína con la temperatura en milivoltios.

En la Figura 2-2(A) vemos una representación gráfica de los datos experimentales obtenidos para Barnasa en presencia de 0.5mM de 3'GMP, donde observamos la línea base con un calibrado de 25 μ W y el primer y segundo barrido con la muestra de proteína. El resultado de restar la línea base instrumental al primer barrido se recoge en el apartado B.

2.1.3.2.- Determinación de la capacidad calorífica molar parcial de la proteína

La diferencia en capacidad calorífica entre una disolución de macromoléculas biológicas y el disolvente correspondiente es normalmente negativa, es decir, la capacidad calorífica de la disolución es menor que la del mismo volumen de disolvente (ver Figura 2-2(A)). Para esta diferencia tenemos: (para más detalles ver Privalov & Khechinashvili, 1974)

$$\Delta C_{p,ap}(T) = C_{p,ap}(T) \cdot m_p - C_{p,s}(T) \cdot \Delta m_s \quad (2.2)$$

donde $C_{p,ap}(T)$ y $C_{p,s}(T)$ son las capacidades caloríficas específicas de la disolución de proteína y del disolvente respectivamente, m_p son los gramos de proteína en la célula y Δm_s la cantidad de disolvente desplazado por la proteína en la disolución.

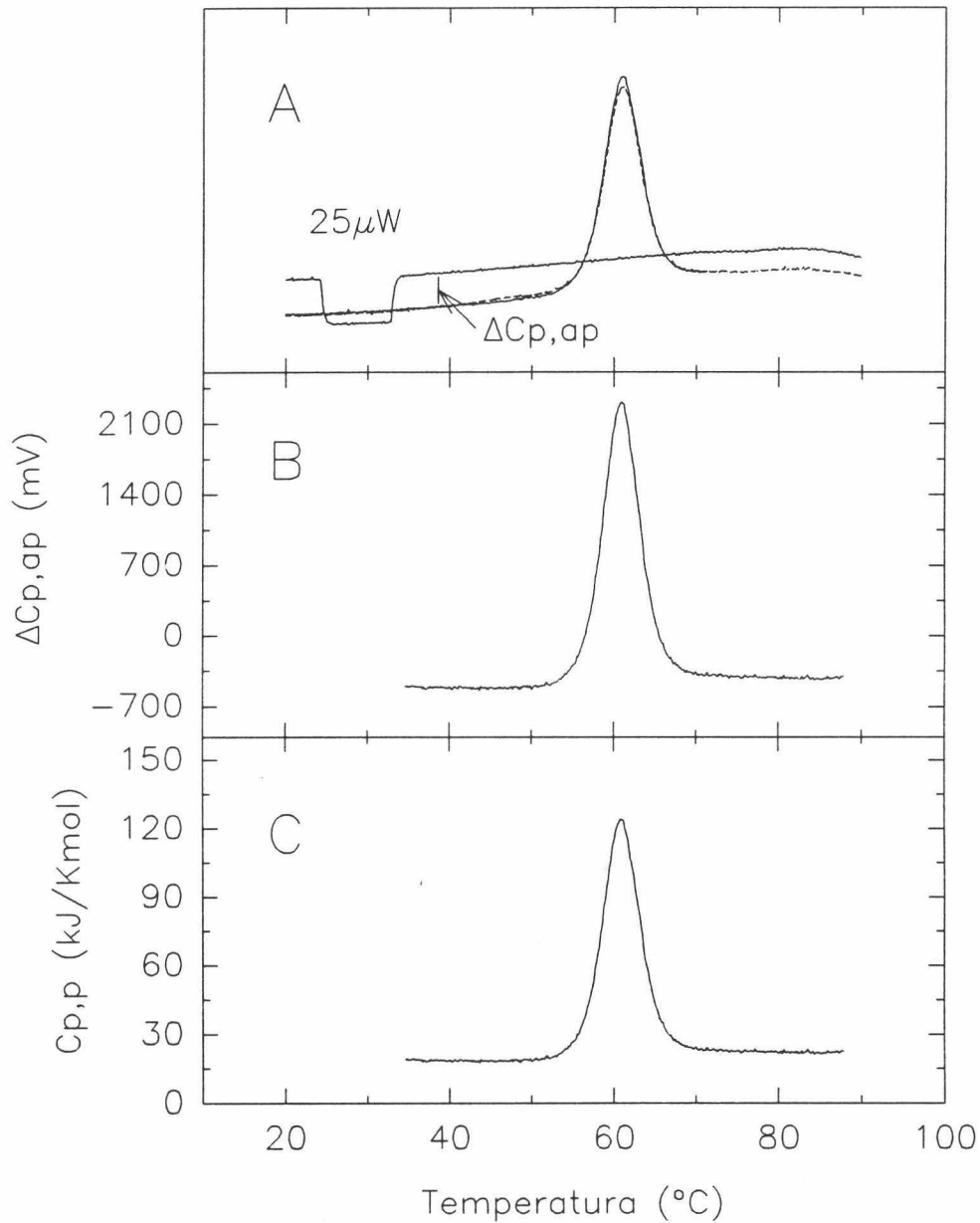


FIGURA 2-2: (A) Perfiles experimentales de capacidad calorífica frente a la temperatura, obtenidos a la velocidad de 1 K/min para Barnasa y 0.5mM de 3'GMP. En la línea base se muestra un calibrado de $25\mu W$. El primer y segundo barrido con la muestra son prácticamente indistinguibles, salvo que la altura de la endoterma en el segundo es un poco menor. En (B) tenemos el resultado de restar al primer barrido la línea base instrumental y en (C) después de la conversión de unidades a valores de capacidad calorífica absoluta.

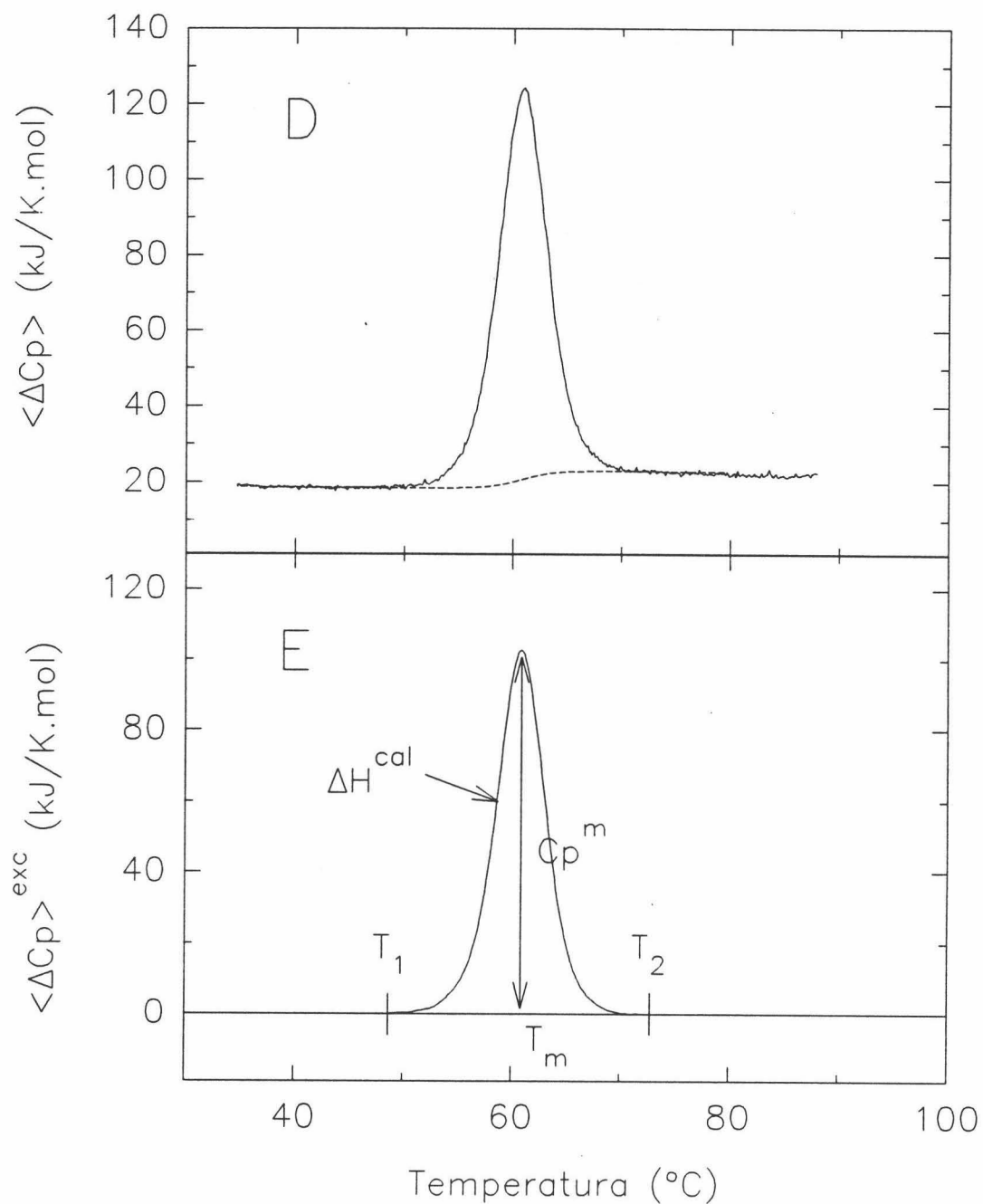


FIGURA 2-3: Construcción de línea base química (D) en la traza de calorimetría diferencial de barrido correspondiente a la desnaturalización térmica de Barnasa con 3'GMP 0.5mM. En la parte (E) se muestra el resultado de restar dicha contribución a la señal calorimétrica, obteniéndose el $\langle \Delta C_p \rangle^{exc}$.

Teniendo en cuenta que:

$$\Delta m_s = m_p \frac{V_p(T)}{V_s(T)} \quad (2.3)$$

donde $V_p(T)$ y $V_s(T)$ son los correspondientes volúmenes específicos parciales de la disolución de proteína y del disolvente, obtenemos lo siguiente:

$$C_{p,ap}(T) = C_{p,s}(T) \frac{V_p(T)}{V_s(T)} - \frac{\Delta C_{p,ap}(T)}{m_p} \quad (2.4)$$

El volumen específico y la capacidad calorífica del disolvente, $V_s(T)$ y $C_{p,s}(T)$, se pueden considerar en el caso de disolventes acuosos los del agua pura, 1 mL/g y 1 cal/K·g respectivamente. En esta situación, podemos transformar la expresión (2.4) de la siguiente manera:

$$C_{p,ap}(T) = 4.186 \cdot 10^{-3} \cdot V_p(T) \cdot M + \Delta C_{p,ap}(T) \cdot f \text{ (kJ/K}\cdot\text{mol)} \quad (2.5)$$

donde M es el peso molecular de la proteína en Daltons y f es el factor de conversión de unidades (ecuación (2.1)).

El volumen específico de la disolución de proteína se puede considerar 0.73 mL/g, valor promedio para proteínas globulares, confirmado por los cálculos realizados por Makhatadze et al. (1990) a partir de los volúmenes específicos de cada aminoácido.

El resultado de estos cálculos para nuestro ejemplo podemos verlo en la Figura 2-2(C).

2.1.3.3.- Línea base química

Un termograma corregido consiste en una representación de la capacidad calorífica de exceso del sistema debida al proceso de desnaturalización, $\Delta C_{p,exc}$, frente a la temperatura. Sin embargo, después de restar la línea base instrumental, existen contribuciones a la curva de capacidad calorífica obtenida: a) El $\Delta C_{p,exc}$ debido al proceso de desnaturalización y b) la $\Delta C_{p,int}$, capacidad calorífica intrínseca

de la mezcla de macroestados de la proteína, la cual viene dada por:

$$\langle \Delta C_{p,int} \rangle = \sum_i \Delta C_{p,int} \cdot f_i \quad (2.6)$$

donde $\Delta C_{p,int}$ es la capacidad calorífica del estado i a esa temperatura, y f_i es la fracción presente del estado i . Esta línea base química tendrá una determinada variación con la temperatura. Superpuesta a esta variación se registrará la $\Delta C_{p,exc}$ debida al proceso endotérmico de la desnaturalización de la proteína. A esto se debe que los termogramas sin línea base química restada tengan el principio y el final de la curva a diferente altura, pues el estado nativo y el desnaturalizado tienen distinta capacidad calorífica. La variación de la $\Delta C_{p,int}$ del sistema es conocida fuera de los límites de la transición pero su variación durante la transición debe determinarse por un método empírico. Una vez construida la línea base química se resta del termograma quedando así solo la contribución $\Delta C_{p,exc}$. Entre estos métodos empíricos dos son los más utilizados: a) el método del trazado de una línea recta entre los límites de la transición; b) el método de Takahashi y Sturtevant (1981). Este segundo método, que es el más fiable, consiste en establecer dos niveles de capacidad calorífica definida por las prolongaciones de la tendencia de la traza a ambos lados de la transición, y calcular valores de capacidad calorífica para la línea base química a cada temperatura entre ambos niveles según la siguiente ecuación:

$$\Delta C_{p,int} = C_{p,N} + [C_{p,U} - C_{p,N}] \frac{\Delta H}{\Delta H_t} \quad (2.7)$$

donde $C_{p,N}$ y $C_{p,U}$ son los valores de capacidad calorífica a cada temperatura definidos por las prolongaciones de la traza a ambos lados de la transición para el estado nativo N y el desnaturalizado, D, respectivamente. ΔH es el calor desarrollado hasta esa temperatura y ΔH_t es el calor total de la transición. Nótese que, según la ecuación anterior, el valor de capacidad calorífica calculado para la línea base química varía a lo largo de la transición entre los dos niveles proporcionalmente al calor desarrollado a cada temperatura, lo cual es razonable

pero totalmente empírico. La evaluación de los valores de ΔH y ΔH_t requiere que se conozca la línea base química, por tanto se realiza un cálculo iterativo comenzando por suponer ΔH_t igual al área bajo la curva respecto al nivel $C_{p,N}$. Se calcula una línea base química y con ella un nuevo valor de ΔH_t , repitiéndose el procedimiento hasta convergencia de ΔH_t . En la Figura 2-3(D) se ilustra la endoterma con la línea base química trazada según este método y la 2-3(E) el resultado de sustraer dicha línea base a la curva.

Para realizar todos estos cálculos disponemos de varios programas que permiten obtener información numérica en un listado de todos los parámetros característicos de las transiciones, tales como entalpías de desnaturalización ($\Delta H_{N,D}^{cal}$), temperatura del máximo de la transición (T_m), capacidad calorífica del máximo (Cp^m), entalpía de van't Hoff ($\Delta H_{N,D}^{vH}$), etc.

2.1.4.- ANALISIS TERMODINAMICO SEGUN MODELOS DE EQUILIBRIO

A lo largo de todo el trabajo que se describe en esta Memoria, la calorimetría diferencial de barrido (CDB) ha sido la técnica fundamental y más utilizada en el estudio de los procesos de desnaturalización de las proteínas investigadas. El análisis riguroso de los datos de CDB debe realizarse bajo la suposición de determinados modelos teóricos que describen las etapas fundamentales en el proceso de desnaturalización de la proteína. La aplicación de dichos modelos nos permite obtener información termodinámica sobre cada etapa por lo que se hace necesario, para un mejor entendimiento de este trabajo, exponer los más sencillos que, por otra parte, ya han sido desarrollados ampliamente en bibliografía.

Bajo ciertas condiciones experimentales de pH, fuerza iónica, etc, la desnaturalización de muchas proteínas sencillas de bajo peso molecular y algunas proteínas complejas es reversible (Privalov, 1979; 1982), es decir, la proteína recupera su estructura nativa (y, por tanto, su actividad biológica) tras enfriar la disolución a temperatura ambiente. En estos casos (que son los que vamos a describir fundamentalmente en esta Memoria) podemos utilizar formulaciones basadas en la termodinámica de equilibrio para obtener información sobre la

estabilidad de sus estructuras nativas (Privalov, 1979; 1982; 1989; Schellman, 1987)

2.1.4.1.- Modelo de dos estados

En la desnaturalización reversible de pequeñas proteínas globulares (Privalov, 1979) se encuentra que no existen estados significativamente poblados en el proceso de desplegamiento; o sea, la molécula de proteína puede encontrarse o bien plegada en el estado nativo (N), o bien desplegada en el estado desnaturalizado (D); se dice en este caso que estas proteínas están constituidas por una unidad cooperativa. Dado que en este caso el proceso de desplegamiento es reversible y suficientemente rápido, la desnaturalización de estas proteínas puede describirse de forma adecuada mediante el llamado modelo de equilibrio de dos estados:



Por tanto, este modelo supone la existencia de dos únicos macroestados de la proteína, nativo y desnaturalizado, los cuales se encuentran en equilibrio en todo momento. La constante de equilibrio viene dada por:

$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (2.9)$$

donde [N] y [D] son las concentraciones de cada estado. La fracción de proteína que se encuentra en estado D será:

$$f_D = \frac{[D]}{[N] + [D]} = \frac{K}{1+K} \quad (2.10)$$

La transición entre los dos estados lleva asociado un cambio de entalpía $\Delta H_{N,D} = \Delta H_D - \Delta H_N$. Tomando como estado de referencia el estado nativo, N, la función entalpía $\langle \Delta H_N \rangle$ será un promedio sobre las contribuciones a la entalpía

de todos los macroestados presentes. En nuestro caso concreto será, por tanto:

$$\langle \Delta H_N \rangle = f_N \cdot \Delta H_N + f_D \cdot \Delta H_D = \frac{K}{1+K} \Delta H_{N,D} \quad (2.11)$$

donde f_N y f_D son las fracciones de proteína nativa y desnaturalizada respectivamente, y ΔH_N y ΔH_D las entalpías de cada estado referidas al estado de referencia elegido; por ello, ΔH_N es cero y ΔH_D es el cambio de entalpía total de la transición, $\Delta H_{N,D}$.

En estas condiciones, la capacidad calorífica molar, $\langle \Delta C_{p,N} \rangle$ será:

$$\langle \Delta C_{p,N} \rangle = \left(\frac{\partial \langle \Delta H_N \rangle}{\partial T} \right)_P = \frac{(\partial K / \partial T)_P}{(1+K)^2} \Delta H_{N,D} + \left(\frac{\partial \Delta H_{N,D}}{\partial T} \right)_P \frac{K}{1+K} \quad (2.12)$$

y si tenemos en cuenta que la constante de equilibrio varía con la temperatura de acuerdo con la ecuación de van't Hoff:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_P = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (2.13)$$

y que según la ecuación de Kirchoff $\Delta C_{p,N,D} = (\partial \Delta H_{N,D} / \partial T)_P$, siendo este $\Delta C_{p,N,D}$ la diferencia de capacidad calorífica entre el estado D y el N, tenemos que:

$$\langle \Delta C_{p,N} \rangle = \frac{K}{(1+K)^2} \frac{\Delta H_{N,D}^2}{RT^2} + \Delta C_{p,N,D} \frac{K}{1+K} \quad (2.14)$$

donde K y $\Delta H_{N,D}$ varían con la temperatura según las formas integradas de la ecuación de van't Hoff y la ecuación de Kirchoff respectivamente, considerándose $\Delta C_{p,N,D}$ constante con T (Privalov & Khechinashvili, 1974).

Utilizando la ecuación (2.14) con las consideraciones que hemos mencionado, podemos simular curvas de capacidad calorífica frente a T como las que se muestran en la Figura 2-4. En dicha ecuación observamos que la función $\langle \Delta C_{p,N} \rangle$ consta de dos términos: el primero tiene la forma de un pico más o menos estrecho que depende del valor de $\Delta H_{N,D}$ a $T = T_m$ (temperatura del máximo de la transición). El segundo tiene una forma sigmoidal. La diferencia de altura

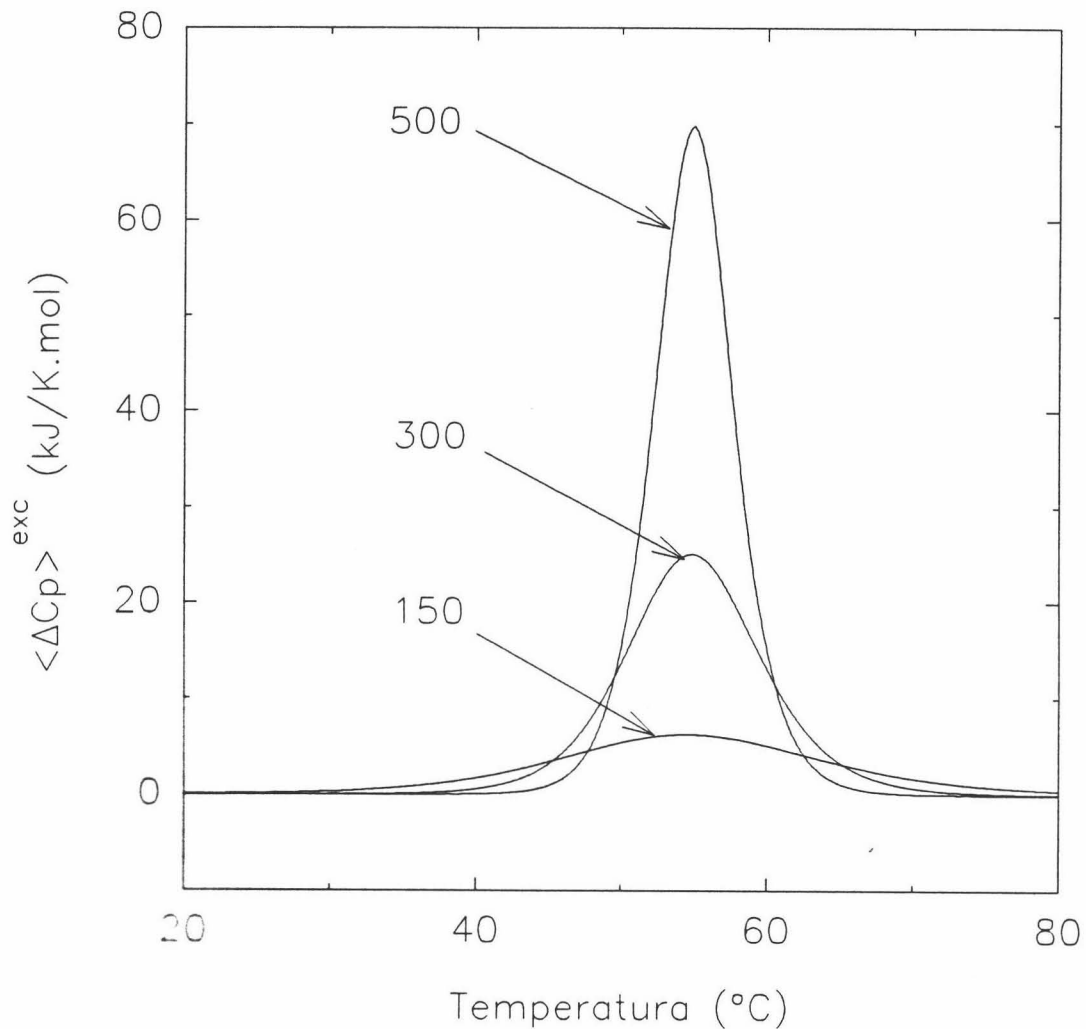


FIGURA 2-4: *Perfiles simulados de capacidad calorífica de exceso en función de la temperatura según las ecuaciones (2.14) y (2.16) para $\Delta C_p = 0$, correspondientes a un proceso de desnaturalización de equilibrio de dos estados. La temperatura $T_{1/2}$ fue de 55°C y los valores de entalpía se muestran en la figura para cada curva, en kJ/mol.*

entre los extremos de la curva coincide con el valor de $\Delta C_{p_{N,D}}$. En cuanto al primer término, y según vemos en la Figura 2-4, vemos que cuanto mayor sea la entalpía del proceso, más abruptamente cambiará K con la temperatura, pasando a favorecer uno u otro estado en un intervalo de temperatura menor. Esto origina transiciones calorimétricas más estrechas y agudas, permitiendo determinar los

parámetros termodinámicos con mayor precisión.

Por consiguiente, la entalpía del proceso de desnaturalización controla no sólo el área sino la anchura de la curva, es decir, controla la forma de la curva. Por ello, la entalpía del proceso, en el caso de que se cumpla el modelo de dos estados, puede ser determinada de dos maneras distintas:

1) Como el área bajo la curva de capacidad calorífica frente a la temperatura: esta es la denominada entalpía calorimétrica o experimental: $\Delta H_{N,D}^{cal}$:

$$\Delta H_{N,D}^{cal} = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_{p,exc}(T) \cdot dT \quad (2.15)$$

donde T_1 y T_2 son temperaturas correspondientes a antes y después de la transición (ver Figura 2-3(E)). Únicamente mediante CDB es posible medir de forma directa la entalpía del proceso de desplegamiento térmico de una proteína.

2) Podemos determinarla indirectamente a partir de la integración de la ecuación de van't Hoff, conociendo la variación de la constante de equilibrio con la temperatura:

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \quad (2.16)$$

La entalpía así calculada se llama entalpía de van't Hoff, $\Delta H_{N,D}^{vH}$. Este método es el que normalmente se utiliza cuando se estudia el desplegamiento térmico reversible de proteínas por técnicas no calorimétricas. Si aplicamos la condición de $K = 1$ a $T = T_m$ en la ecuación (2.14) con $\Delta C_{p,N,D} = 0$, obtenemos:

$$\Delta H_{N,D}^{vH} = 4RT_m^2 \frac{C_p^m}{\Delta H_{N,D}^{cal}} \quad (2.17)$$

Cuando $K = 1$ tenemos un 50% de poblaciones de N y D y la temperatura a la que corresponde esta situación se define como $T_{1/2}$ o T_U que coincide prácticamente con la T_m en el caso particular que nos ocupa. Además, C_p^m es el valor de capacidad calorífica del máximo de la transición (ver Figura 2-3(E)). En esta ecuación, el

cociente $C_p^m/\Delta H_{N,D}^{cal}$ es independiente de la concentración de proteína del experimento y de su peso molecular, por lo que el valor de la entalpía de van't Hoff no está afectado por posibles errores relacionados con la medida de la concentración de la macromolécula y puede obtenerse aunque se desconozca el peso molecular de la misma.

Es evidente que las dos entalpías deben coincidir para un proceso de dos estados que es, de hecho, el único caso en el que es correcto, estrictamente hablando, aplicar la ecuación (2.17). De hecho, la relación $r = \Delta H_{N,D}^{cal}/\Delta H_{N,D}^{vH}$, que en el modelo de dos estados será la unidad, es un parámetro muy utilizado para comprobar la validez del modelo y, en caso contrario, para orientarnos hacia el tipo de proceso que está ocurriendo, como veremos después.

De una traza experimental de CDB, mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la ecuación (2.14), podemos obtener todos los parámetros termodinámicos del proceso: $\Delta H_{N,D}$, $\Delta S_{N,D}$, $\Delta C_{p,N,D}$ y $\Delta G_{N,D}$. Para ello, una vez conocidos T_U , $\Delta H_{N,D}$ para $T = T_U$ y $\Delta C_{p,N,D}$, lo primero será conocer el valor de ΔH a cualquier temperatura que puede calcularse mediante la ecuación de Kirchoff.

En segundo lugar, dado que a la temperatura T_U el cambio de energía de Gibbs de desplegamiento es cero, el cambio de entropía a esa temperatura vendrá dado por: $\Delta S_{N,D}(T_U) = \Delta H_{N,D}(T_U)/T_U$ y a otras temperaturas se puede calcular a partir de la siguiente relación termodinámica:

$$\left(\frac{\partial \Delta S}{\partial T}\right)_P = \frac{\Delta C_p}{T} \quad (2.18)$$

Por tanto, es fácil conocer ambos parámetros a cualquier temperatura suponiendo un $\Delta C_{p,N,D}$ constante con T . El cambio de energía de Gibbs en función de la temperatura será: $\Delta G_{N,D} = \Delta H_{N,D} - T\Delta S_{N,D}$.

Así, por ejemplo, en la Figura 2-5 se muestra una representación de $\Delta H_{N,D}(T)$, $T\Delta S_{N,D}(T)$ y $\Delta G_{N,D}(T)$ para unos parámetros típicos de una proteína globular pequeña. Observamos cómo el estado nativo está favorecido a temperatura ambiente y cómo la función $\Delta G_{N,D}$ va disminuyendo con la temperatura hasta

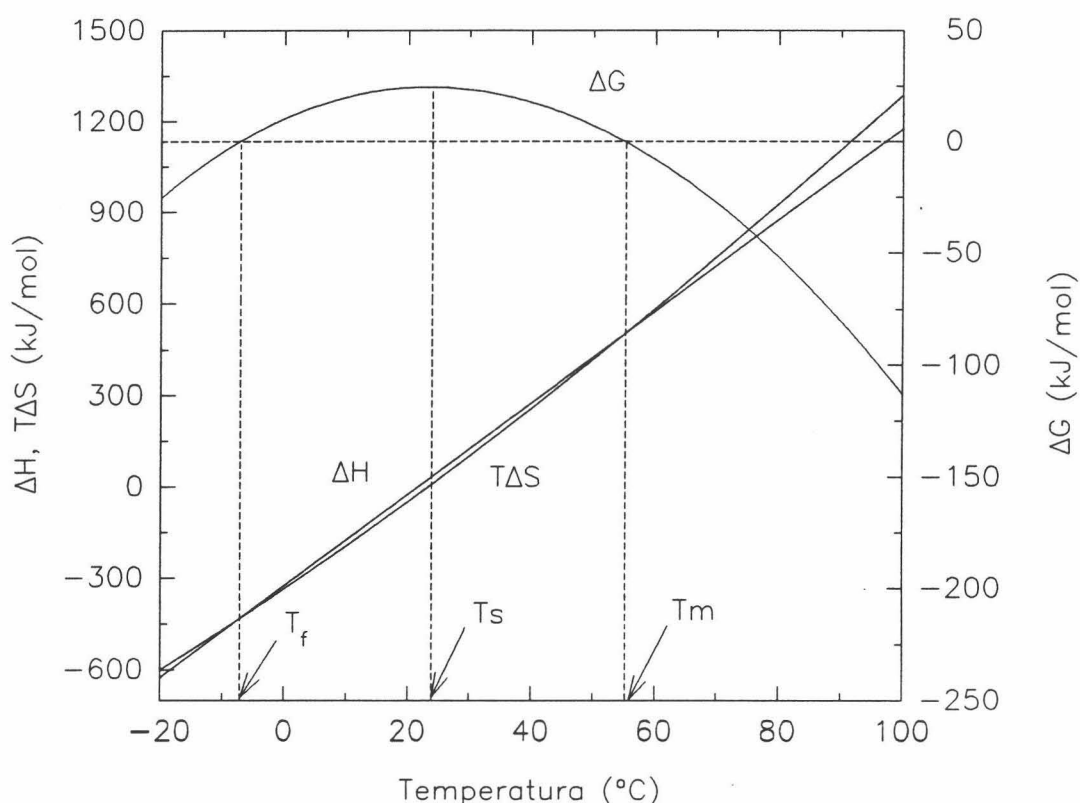


FIGURA 2-5: Variación con la temperatura de las funciones ΔH , $T\Delta S$ y ΔG para el desplegamiento térmico de una proteína hipotética con los siguientes parámetros: $T_m = 55^\circ\text{C}$, $\Delta H(T_m) = 500 \text{ kJ/mol}$ y $\Delta C_p = 15 \text{ kJ/K}\cdot\text{mol}$. T_f es la temperatura de desnaturalización "por frío" y T_s la temperatura de máxima estabilidad.

hacerse negativa (favorece el estado desnaturalizado) a temperaturas mayores que la T_u . Sin embargo, el valor absoluto del cambio de energía de Gibbs de desplegamiento es muy pequeño (unos 50-60 kJ/mol). Esto significa que la estabilidad de las proteínas a temperaturas fisiológicas es marginal, y resulta de la compensación de grandes efectos entálpicos y entrópicos. Por otra parte, el desplegamiento de las proteínas muestra un $\Delta C_{p,N,D}$ grande y positivo, muy probablemente debido a las mismas razones por las cuales la transferencia de sustancias o grupos apolares (compuestos modelo) de un medio apolar a un medio acuoso conlleva un aumento de la capacidad calorífica (Tanford, 1973; Breslauer et al., 1974; Gill & Wadsö, 1976; Sturtevant, 1977; Dec & Gill, 1984; 1985)

debido a la interacción de estos grupos apolares con las moléculas de disolvente (Privalov & Gill, 1988). En el caso del desplegamiento de una proteína, este aumento de capacidad calorífica se atribuye a la exposición al ambiente acuoso de los restos hidrofóbicos que estaban "enterrados" previamente en el interior de la proteína nativa (Sturtevant, 1977).

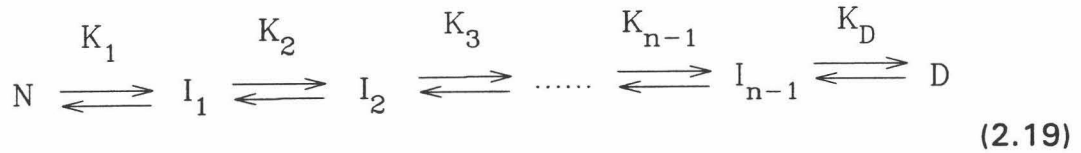
Así mismo, en el perfil de $\Delta G_{N,D}$ frente a T podemos ver cómo existe una tendencia a disminuir en la zona de bajas temperaturas (inferiores a 0°C normalmente) por lo que podrá existir otra temperatura, T_f a la que la función $\Delta G_{N,D}$ sería cero y conllevaría un nuevo proceso de desnaturalización a baja temperatura. Esta desnaturalización "por frío" se ha encontrado experimentalmente en los últimos años (Privalov et al., 1986; Griko et al., 1988; Azuaga et al., 1992), lo que apoya la validez de los datos de las magnitudes termodinámicas determinadas por CDB.

2.1.4.2.- Modelos de equilibrio multiestado

En muchos casos podemos encontrar transiciones calorimétricas reversibles que no pueden explicarse con un modelo tan sencillo como el descrito en el apartado anterior. Pueden aparecer varias transiciones más o menos separadas dentro de un mismo termograma, o bien aparecer un sólo pico pero con valores diferentes para las entalpías de van't Hoff y calorimétrica. Evidentemente, esto no significa que existan dos entalpías diferentes, sino que la ecuación (2.17) no es aplicable. En estos casos, el parámetro $r = \Delta H_{N,D}^{cal} / \Delta H_{N,D}^{vH}$ anteriormente descrito es de gran utilidad: si $r > 1$, quiere decir que existen más de dos estados significativamente poblados implicados en el equilibrio de desnaturalización. Si $r < 1$ existe cooperatividad intermolecular, es decir, la unidad cooperativa no es en este caso un monómero, sino un dímero u otro estado de agregación superior al que se suponía inicialmente. En este apartado vamos a centrarnos en el primer caso ($r > 1$) dejando el segundo para el apartado siguiente.

Esquema secuencial

Freire y Biltonen (1978a) fueron los primeros en describir un método generalizado de análisis de equilibrio de trazas de CDB en el que se suponen varios estados durante el proceso de desnaturalización. El mecanismo general del esquema sería el siguiente:



donde N es el estado nativo que evoluciona con la temperatura hasta un estado desnaturalizado D a través de n-1 estados intermedios.

La función de partición del sistema se puede definir como:

$$Z(T) = 1 + \sum_{i=1}^{i=n} \exp(-\Delta G_{N,i}/RT) \quad (2.20)$$

donde se toma como estado de referencia el N con lo que $\Delta G_{N,i} = G_i - G_N$.

La fracción de moléculas que se encuentran en un estado cualquiera i, f_i , respecto a la concentración total de moléculas presentes será:

$$f_i = \frac{[I_i]}{\sum_{i=0}^{i=n} [I_i]} = \frac{\exp(-\Delta G_{N,i}/RT)}{Z(T)} \quad (2.21)$$

Definamos el cambio de entalpía respecto al estado inicial, $\langle \Delta H_N \rangle$ como un promedio de las contribuciones a la entalpía de todos los estados presentes. Este será el observable utilizado para estudiar la transición y será:

$$\langle \Delta H_N \rangle = \sum_{i=0}^{i=n} \Delta H_{N,i} \cdot f_i = \sum_{i=1}^{i=n} \left(\Delta H_{N,i} \frac{\exp(-\Delta G_{N,i}/RT)}{Z(T)} \right) \quad (2.22)$$

donde $\Delta H_{N,i}$ es la diferencia de entalpía a cualquier temperatura entre el estado i y el estado inicial ($\Delta H_i = H_i - H_N$).

La función $\langle \Delta C_{pN} \rangle$ puede obtenerse derivando la ecuación anterior respecto de T:

$$\langle \Delta C_{p,N} \rangle = \frac{1}{RT^2} \left[\sum_{i=1}^{i=n} \frac{\Delta H_{N,i}^2 \exp(-\Delta G_{N,i}/RT)}{Z(T)} - \left(\sum_{i=1}^{i=n} \frac{\Delta H_{N,i} \exp(-\Delta G_{N,i}/RT)}{Z(T)} \right)^2 \right]$$

$$+ \sum_{i=0}^{i=n} \Delta C_{p,N,i} \cdot f_i = \langle \Delta C_{p,int} \rangle + \frac{\langle \Delta H_{N,D}^2 \rangle - \langle \Delta H_{N,D} \rangle^2}{RT^2} \quad (2.23)$$

donde $\langle \Delta C_{p,int} \rangle$ es la variación de capacidad calorífica interna o intrínseca del sistema y será equivalente al trazado de línea base química (apartado 2.1.3.3.). Por tanto, el otro sumando se podría equiparar con un $\Delta C_{p,exc}$. De esta manera se podrían calcular teóricamente los parámetros termodinámicos de cada estado mediante ajuste no lineal de mínimos cuadrados a la función descrita de $C_p(T)$, suponiendo a priori el número de estados presentes en el equilibrio.

La mayor dificultad viene del hecho de que el número de parámetros ajustables puede ser grande y se necesita tener unos valores aproximados de ellos para que las estimaciones finales sean reales. Es difícil, en la mayoría de los casos, hacer estimaciones correctas de los parámetros termodinámicos. Es por ello que Freire y Biltonen (1978a,b,c) propusieron un método de deconvolución de las transiciones que, sin hacer ninguna suposición previa acerca del número de estados significativamente poblados en el equilibrio, permite obtener tanto éstos como los parámetros termodinámicos de cada estado. Para ello, derivamos la ecuación (2.20) y con la ayuda de la ecuación (2.22) se obtiene:

$$\frac{d(\ln Z(T))}{dT} = \frac{\langle \Delta H_{N,D} \rangle}{RT^2} \quad (2.24)$$

y la integración de esta expresión no da lo siguiente:

$$Z(T) = \exp \int_{T_0}^T \frac{\langle \Delta H \rangle}{RT^2} dT \quad (2.25)$$

donde T_0 es una temperatura a la cual todas las moléculas se encuentran en el estado inicial. De esta manera, conocida la dependencia de $\langle \Delta H_N \rangle$ con T por

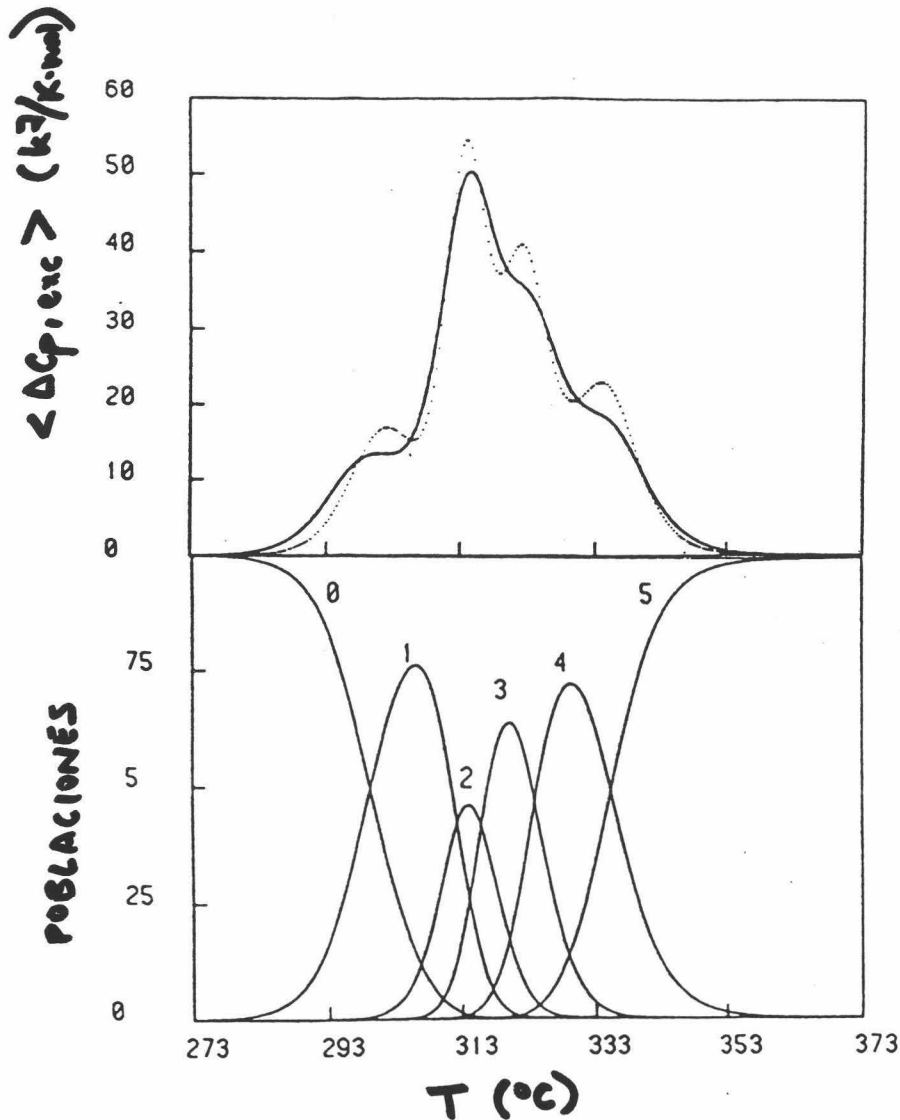


Figura 2-6: Desnaturalización térmica del t-RNA^{Phe} en 20mM de NaCl. En la figura superior y en línea continua se muestra la curva de capacidad calorífica experimental, y en línea de puntos la curva predicha por el esquema secuencial, suponiendo que son cinco los estados significativamente poblados durante el proceso de desnaturalización. La inclusión de un sexto estado origina una curva teórica indistinguible de la experimental. La figura inferior representa las fracciones de cada estado en función de la temperatura obtenidas por el esquema secuencial (tomado de Gill et al., 1985).

integración de las curvas de capacidad calorífica experimentales, podremos determinar la función de partición del sistema, $Z(T)$, de la cual puede obtenerse toda la información termodinámica y el número de estados presentes.

Podemos ilustrar todo esto con un ejemplo sacado de la bibliografía. En la

Figura 2-6 se muestra la curva de capacidad calorífica experimental y la calculada por el esquema secuencial de Freire y Biltonen para la desnaturalización térmica del t-RNA^{Phe}.

Esquema de transiciones independientes

La mayoría de las proteínas presentes en la naturaleza no son tan sencillas como las que pretendemos estudiar en esta Memoria. Suelen tener elevado peso molecular y muchas de ellas, además, pueden estar formadas por varias cadenas polipeptídicas (proteínas oligoméricas). Generalmente, las cadenas polipeptídicas grandes suelen plegarse formando, no una estructura compacta y cooperativa, sino en diferentes dominios estructurales capaces de formar independientemente una estructura cooperativa (Privalov, 1989). Un ejemplo lo constituye el dominio SH3 de espectrina que estudiaremos en resultados y que constituye un dominio tanto estructural como funcional de la proteína mencionada.

Es lógico pensar que durante el desplegamiento de una proteína compleja que presenta estados intermedios significativamente poblados, estos estados se correspondan con situaciones en que unos dominios están plegados y otros desplegados. Así, en general, los estados probables de la macromolécula en su conjunto serían 2^j , siendo j el número de dominios cooperativos. De esta manera surge un modelo que supone que cada una de las etapas del proceso de desnaturalización en el caso de estas proteínas grandes se debe al desplegamiento independiente de los distintos dominios o regiones cooperativas de la macromolécula, y de tal forma que el desplegamiento de unos no influye en los otros; es decir, los dominios de que consta la macromolécula son independientes y no interaccionan entre sí. El modelo también supone que cada dominio o región que desnaturaliza independientemente lo hace según el modelo de dos estados. Por ello, el proceso global podrá describirse como una simple suma de etapas de equilibrio de dos estados, y la capacidad calorífica de exceso vendrá dada por: donde ΔH_i es el cambio de entalpía producido como consecuencia del desplegamiento del dominio i respecto a su estado nativo y, por tanto, se cumple

$$\langle \Delta C_{p, exc} \rangle = \frac{1}{RT^2} \sum_{i=1}^{i=n} \left(\Delta H_{N,i}^2 \frac{K_i}{(1+K_i)^2} \right) \quad (2.26)$$

que $\sum \Delta H_{N,i} = \Delta H_{N,D}$ siendo éste el cambio de entalpía total de la transición. K_i es la constante de equilibrio del proceso de desplegamiento para el dominio i .

Si se dispone de información estructural de la macromolécula en estudio, un procedimiento útil para corroborar el modelo consiste en cortar la molécula en fragmentos con la ayuda de enzimas proteolíticas, que van a cortarla por zonas relativamente accesibles como uniones entre dominios, y obtener el perfil calorimétrico de cada fragmento por separado en un intento de correlacionar el desplegamiento de cada fragmento con las transiciones calorimétricas obtenidas tras realizar la deconvolución (Privalov et al., 1975; Privalov & Filimonov, 1978; Privalov, 1979; Privalov et al., 1981; Privalov, 1982; Pothekin & Privalov, 1982; Privalov & Medved, 1982; Novokhatny et al., 1984; Rigell et al., 1985; Tsalkova & Privalov, 1985; Medved et al., 1989; López-Lacomba et al., 1989).

Podemos ver como ejemplo las curvas de desnaturalización del t-RNA^{Phe} (Privalov & Filimonov, 1978). El análisis según este modelo da cinco transiciones calorimétricas cuya suma reproduce exactamente la curva experimental. Los estudios estructurales mediante procedimientos ópticos y cinéticos realizados por Coutts et al. (1975) apoyan esta evidencia.

Podemos comparar este método con el de Freire y Biltonen (esquema secuencial) que no presupone nada acerca de la naturaleza física de los estados intermedios implicados en el desplegamiento. Según Privalov y Filimonov, ambos ajustan perfectamente los datos experimentales sin embargo, del análisis por el esquema secuencial resultan ser seis los estados significativamente poblados, frente a los cinco dominios cooperativos obtenidos por el modelo de transiciones independientes. La coincidencia entre ambos modelos se encontró al calcular las fracciones de los estados significativamente poblados por el modelo de transiciones independientes, ya que se correspondía muy aproximadamente a la población de los seis estados encontrados mediante el tratamiento de Freire y Biltonen. El

esquema secuencial, por tanto, selecciona los estados significativamente poblados directamente, mientras que el modelo de transiciones independientes encuentra los mismos estados, pero implica la existencia de muchos otros que se encuentran en una proporción muy baja (Gill et al., 1985).

En la práctica, cabe esperar que existan interacciones más o menos fuertes entre los dominios que constituyen la macromolécula. En este sentido, recientemente se han desarrollado modelos que tienen en cuenta esta posibilidad (Brandts et al., 1989; Freire & Murphy, 1991; Freire et al., 1991) introduciendo una energía de Gibbs de interacción entre pares de dominios. El modelo implica una integridad estructural de ambos dominios para que el ΔG no se anule y coincide con el de transiciones independientes cuando el $\Delta G=0$ y con el esquema secuencial cuando ΔG tiene un valor grande.

2.1.4.3.- Transiciones con cambios en el estado de asociación

Existen casos en los que, durante el desplegamiento, la proteína sufre cambios en el estado de asociación. Estos cambios pueden ser debidos a que la proteína está constituida por la asociación de varias subunidades (proteínas oligoméricas) o bien porque las condiciones experimentales "obligan" a los monómeros a asociarse o al oligómero a disociarse.

La termodinámica de equilibrio permite abordar este tipo de casos a través de la formulación matemática de, por ejemplo, el proceso de desnaturalización acoplada a un proceso de disociación de un n-ámero (Takahashi & Sturtevant, 1981; Privalov & Potekhin, 1986; Freire, 1989):



donde la constante de equilibrio del proceso viene dada por:

y se ha supuesto un proceso de desnaturalización tipo dos estados acoplado a la disociación de las subunidades de la proteína. N y D son los estados nativo y

$$K = \frac{[D]^n}{[N_n]} \quad (2.30)$$

desnaturalizado respectivamente y n representa la estequiometría del oligómero.

La fracción de moléculas en estado D a cualquier temperatura será:

$$f_D = \frac{[D]}{[D] + n[N_n]} = \frac{K^{1/n} [N_n]^{1/n}}{K^{1/n} [N_n]^{1/n} + n [N_n]} \quad (2.31)$$

de donde se obtiene que:

$$\frac{f_D}{1-f_D} = \frac{K^{1/n} [N_n]^{1/n}}{n [N_n]} \quad (2.32)$$

Las expresiones (2.31) y (2.32) están en función de la concentración de la especie N_n que es desconocida. Podemos reestructurar estas expresiones en función de la concentración total de proteína $[P]_T$ en moles de monómero, si tenemos en cuenta que $[N_n] = [P]_T(1-f_D)/n$ con lo cual:

$$\frac{f_D}{(1-f_D)^{1/n}} = \frac{K^{1/n} [P]_T^{\frac{1}{n}-1}}{n^{1/n}} \quad (2.33)$$

La derivada respecto de la temperatura de f_D será, a partir de la ecuación anterior:

$$\frac{\partial f_D}{\partial T} = \frac{n \cdot f_D (1-f_D)}{n(1-f_D) + f_D} \frac{\Delta H_{N,D}}{RT^2} \quad (2.34)$$

donde, por conveniencia, $\Delta H_{N,D}$ ha sido normalizado con respecto a la concentración de proteína expresada en unidades de monómero.

La capacidad calorífica $\langle \Delta C_{p_N} \rangle$, tomando el estado N_n como referencia será:

$$\begin{aligned} \langle \Delta C_{p,N} \rangle &= \frac{\partial \langle \Delta H_N \rangle}{\partial T} = \frac{\partial (\Delta H_{N,D} \cdot f_D)}{\partial T} = \\ &= \frac{n \cdot f_D (1 - f_D)}{n \cdot (1 - f_D) + f_D} \frac{\Delta H_{N,D}^2}{RT^2} + f_D \cdot \Delta C_{p,N,D} = \langle \Delta C_{p,exc} \rangle + \langle \Delta C_{p,int} \rangle \end{aligned} \quad (2.35)$$

De esta manera, mediante la ecuación (2.35) y tras la resolución numérica de la (2.33) podemos simular curvas de $C_p(T)$ para diferentes valores de n , tal y como vemos en la Figura 2-7. Como podemos ver, conforme aumenta el valor de n las transiciones se vuelven más agudas y asimétricas, lo que hace que la temperatura del máximo de la transición, T_m , sea cada vez menor. Esto implica que no coincida con el valor de $T_{1/2}$, temperatura a la que estaría desnaturalizada la mitad de la proteína y que no depende del estado de asociación.

Es importante en estas situaciones el cálculo del parámetro $r = \Delta H_{N,D}^{cal} / \Delta H_{N,D}^{vH}$ ya que aunque $\Delta H_{N,D}^{vH}$ carezca de sentido físico alguno en este caso, su valor nos puede orientar sobre la estequiometría del proceso. Así, para $T = T_{1/2}$ tenemos que $r = (n + 1) / 2n$ pero en cambio, para $T = T_m$:

$$r = \frac{1}{4} \left(\frac{n-1}{n-\sqrt{n}} \right)^2 \quad (2.36)$$

donde vemos que para $n = 2$, $r \approx 0.73$, para $n = 4$ $r \approx 0.56$, etc. Es decir, todos los valores son menores que la unidad tal y como se indicó anteriormente.

Las transiciones acopladas a equilibrios de asociación-disociación exhiben dependencia de la concentración determinada por el mecanismo específico de estos procesos. Para este modelo en particular, tanto la temperatura de la transición como el cambio de entropía presentan esta dependencia. Así, tras hacer varias aproximaciones, la dependencia de T_m es:

$$\ln [P]_T = \text{constante} - \frac{n}{n-1} \frac{\Delta H_{N,D}}{RT_m} \quad (2.37)$$

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

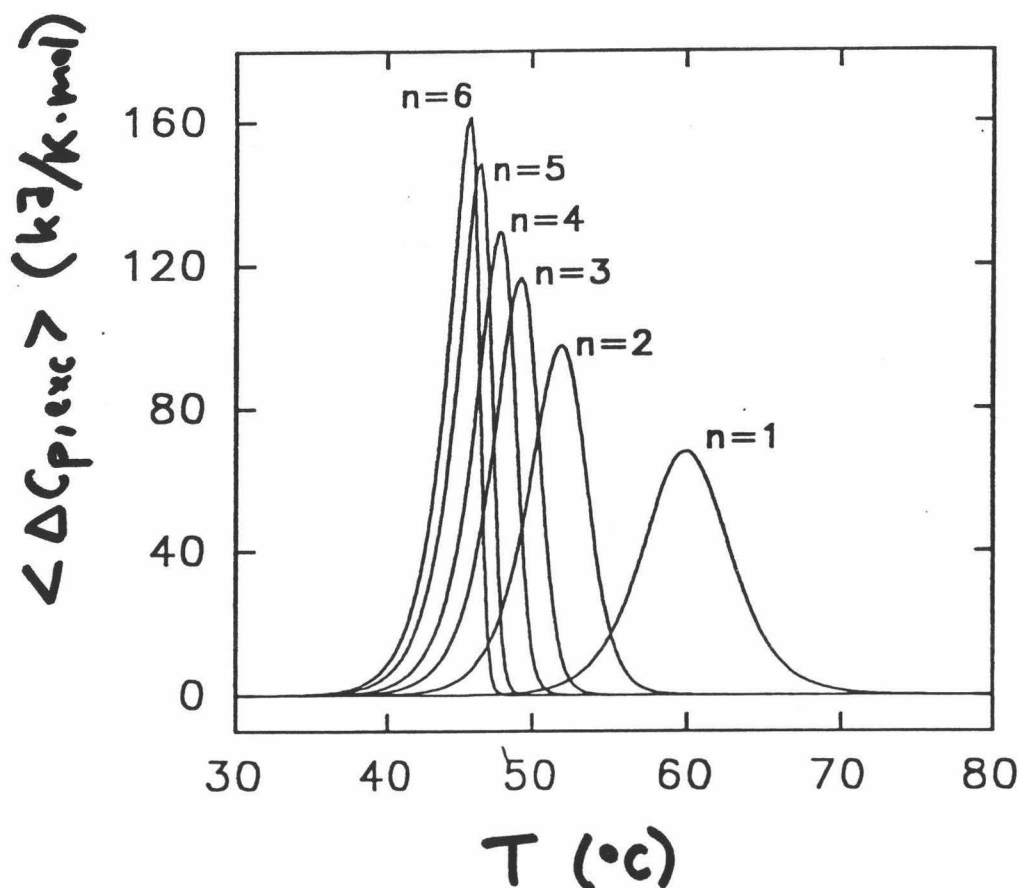


FIGURA 2-7: Curvas de capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura simuladas con las ecuaciones (2.33) y (2.35) para los valores del grado de asociación, n , que se indican en la figura. Se ha supuesto una proteína con un peso molecular de 12 kDa para el monómero y a una concentración de 1 mg/mL, $\Delta H = 500 \text{ kJ/mol}$ de monómero y la temperatura a la que la constante de equilibrio, K vale 1, $T_{K=1} = 60^{\circ}\text{C}$.

podríamos determinar $\Delta H_{N,D}$, que debería coincidir con el valor de $\Delta H_{N,D}^{\text{cal}}$ para el valor correcto de n .

2.1.4.4.- Efecto de ligandos en transiciones de equilibrio tipo dos estados

La unión de ligandos a proteínas se puede estudiar desde un punto de vista termodinámico con técnicas desarrolladas para tal fin como la calorimetría de reacción (ver Sección siguiente) que permite determinar tanto los calores de

interacción y variaciones en la capacidad calorífica, como constantes de asociación. Otras técnicas como la fluorescencia, diálisis en el equilibrio, etc, permiten también determinar las constantes K , incluso, hacer alguna estimación sobre la energética de la interacción pero, en cualquier caso, no hacen una medida directa de la misma.

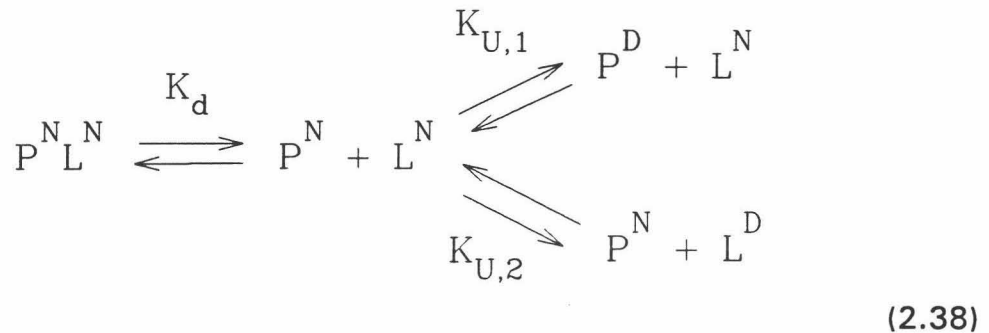
A partir de los trabajos publicados por Robert et al. (1988), Shrake & Ross (1990; 1992), Brandts & Lin (1990), Straume & Freire (1992), es posible utilizar la calorimetría diferencial de barrido para obtener información termodinámica acerca de las interacciones proteína-ligando e, incluso, proteína-proteína. Estos métodos son indirectos ya que las constantes de unión se calculan a partir del estudio del efecto de la concentración de ligando en el punto medio de la transición calorimétrica, lo que implica la construcción de un modelo donde habrá que hacer suposiciones acerca de la naturaleza del proceso de desnaturalización.

Sin embargo, existen dos ventajas de los métodos de calorimetría diferencial de barrido frente al resto de técnicas de equilibrio. Brandts et al. (1989) demostraron que a veces es posible obtener las contribuciones individuales a la energía libre en proteínas con un dominio regulador y otro catalítico de la constante de unión. Esto permite disponer de importante información para proteínas de estas características o para otras que tengan dos sustratos diferentes como las quinasas. La segunda ventaja de este método aparece en la medida de constantes de unión muy grandes. En este sentido, todos los métodos "directos" de equilibrio necesitan que, al menos un 10% del ligando añadido permanezca libre en disolución, lo que requiere que se trabaje con concentraciones de proteína y ligando muy pequeñas y técnicas de detección con una gran sensibilidad. Utilizando técnicas de marcaje isotópico se han conseguido medir constantes del orden de hasta 10^{13} M^{-1} como máximo (Riggs et al., 1970) pero esto limita la posibilidad de estudiar sistemas como complejos antígeno-anticuerpo, hormona-receptor, etc, que son interesantes desde un punto de vista biológico. La calorimetría diferencial de barrido, a pesar de ser un método indirecto, se puede utilizar para medir constantes tan grandes como 10^{50} M^{-1} ya que no necesita la existencia de ligando libre en ninguna proporción, por lo que no es necesario trabajar a concentraciones anormalmente bajas (Brandts

& Lin, 1990).

Vamos a desarrollar aquí los modelos utilizados en esta Memoria para el caso de una proteína con un único sitio de unión para un ligando y el más general cuando el ligando presente una transición en CDB.

En el caso más general en que tanto la proteína como el ligando presentan una transición de desnaturalización, asumiendo que en algunas condiciones experimentales la desnaturalización inducida por la temperatura de un complejo 1:1 de dos proteínas ocurre en equilibrio, podemos aplicar el siguiente esquema para el análisis de datos de CDB:



donde P y L son la macromolécula y el ligando que en este caso podrían corresponderse con cualquiera de las dos proteínas, con los superíndices "N" y "D" que se refieren a los estados Nativo y Desnaturalizado respectivamente. Hemos definido tres constantes de equilibrio: K_d se corresponde con el proceso de disociación del complejo macromolécula-ligando (PL) y $K_{U,1}$ y $K_{U,2}$ son las correspondientes constantes del proceso de desnaturalización de cada especie por separado. Matemáticamente, tenemos:

$$K_d = \frac{[P^N][L^N]}{[P^N L^N]} ; \quad K_{U,1} = \frac{[P^D]}{[P^N]} ; \quad K_{U,2} = \frac{[L^D]}{[L^N]} \tag{2.39}$$

La distribución de especies de la macromolécula con la temperatura será:

$$f_{PL,N} = \frac{[P^N L^N]}{[P]_T} ; f_{P,N} = \frac{[P^N]}{[P]_T} ; f_{P,D} = \frac{[P^D]}{[P]_T} \quad (2.40)$$

y, análogamente, para la del ligando tenemos:

$$f_{L,N} = \frac{[L^N]}{[L]_T} ; f_{L,D} = \frac{[L^D]}{[L]_T} \quad (2.41)$$

donde $[P]_T$ y $[L]_T$ son las concentraciones totales experimentales de cada macromolécula.

Si sustituímos en (2.39):

$$K_d = \frac{f_{P,N} \cdot f_{L,N}}{f_{PL,N}} [P]_T ; K_{U,1} = \frac{f_{P,D}}{f_{P,N}} ; K_{U,2} = \frac{f_{L,D}}{f_{L,N}} \quad (2.42)$$

Teniendo en cuenta que la sumatoria de las especies de cada macromolécula será siempre la unidad, es decir, $f_{PL,N} + f_{P,N} + f_{P,D} = 1$ y $f_{PL,N} + f_{L,N} + f_{L,D} = 1$, podemos obtener un sistema de ecuaciones con las siguientes soluciones:

$$f_{P,N} = \frac{2 \cdot K_{U,1}}{(1+K_{U,1}) \cdot Z} ; f_{L,D} = \frac{2 \cdot K_{U,2}}{(1+K_{U,2}) \cdot Z} ; f_{PL,N} = \frac{4 \cdot [P]_T}{Q \cdot Z^2} \quad (2.43)$$

donde:

$$Q = K_d (1+K_{U,1}) (1+K_{U,2}) ; Z = 1 + \left(1 + 4 \frac{[P]_T}{Q} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.44)$$

Si definimos T_d como la temperatura a la cual $Q(T_d) = [P]_T/2$, entonces $Z(T_d) = 4$ y $f_{PL,N} = 0.5$, sería la temperatura de disociación del complejo a una concentración dada del mismo. La función de entalpía de exceso, $\langle \Delta H_{PL}(T) \rangle$, respecto del estado inicial ($P^N L^N$) se podría expresar como:

$$\langle \Delta H_{PL}(T) \rangle = (1-f_{PL,N}) \Delta H_d + f_{P,D} \langle \Delta H_P(T) \rangle + f_{L,D} \langle \Delta H_L(T) \rangle \quad (2.45)$$

y la derivada de esta función se corresponde con la función de capacidad calorífica de exceso sobre el estado inicial, $\langle \Delta C_{p,PL}(T) \rangle$, que tiene la siguiente expresión:

$$\langle \Delta C_{p, PL}(T) \rangle = C_p(T) - C_{p, PL} = \frac{d\langle \Delta H_{PL}(T) \rangle}{dT} \quad (2.46)$$

Esta función puede ser calculada a partir de los datos experimentales de CDB por extrapolación lineal de la función $C_{p, PL}(T)$ a todo el intervalo de temperaturas en estudio.

Para hacer el análisis de datos por ajuste no lineal a la ecuación (2.46), las constantes de equilibrio y el resto de potenciales termodinámicos varían con la temperatura de la misma manera que en el modelo de dos estados y para reducir el número de parámetros ajustables, podemos utilizar las dependencias con la temperatura para $\langle \Delta H_p(T) \rangle$ y $\langle \Delta H_L(T) \rangle$ obtenidas de experimentos de desnaturalización por CDB para ambas macromoléculas independientemente. Esto nos deja en una situación en la que sólo tendríamos tres parámetros ajustables, ΔH_d , ΔS_d y $\Delta C_{p,d}$ que podemos definir por las siguientes expresiones:

$$\langle \Delta H_d(T) \rangle = \Delta H_d(T_{U,L}) + \Delta C_{p,d}(T - T_{U,L}) \quad (2.47)$$

$$\langle \Delta S_d(T) \rangle = \Delta S_d(T_{U,L}) + \Delta C_{p,d} \ln(T/T_{U,L}) \quad (2.48)$$

$$K_d = \exp\left(\frac{-\langle \Delta G_d(T) \rangle}{RT}\right) = \exp\left[\frac{\langle \Delta S_d(T) \rangle - \langle \Delta H_d(T) \rangle / T}{R}\right] \quad (2.49)$$

donde $T_{U,L}$ es la temperatura de desnaturalización de una de las macromoléculas (la L en este caso) siendo igual el hacerlo con una u otra. En esta formulación, como podemos ver, hemos utilizado como estado de referencia el del complejo ($P^N L^N$).

En la figura 2-8 hemos simulado algunas curvas de $\langle \Delta C_{p, PL}(T) \rangle$ para diferentes valores de la constante de asociación. Observamos cómo conforme aumenta el valor de dicho parámetro el desplazamiento en T_d para la curva respecto de las transiciones individuales cada vez se hace mayor. Así mismo, tenemos un incremento en la asimetría de la curva debido, principalmente, al proceso de disociación de ambas macromoléculas antes del desplegamiento, lo que asemeja, en cierto modo, esta situación con la descrita en el apartado 2.1.4.3. para el caso

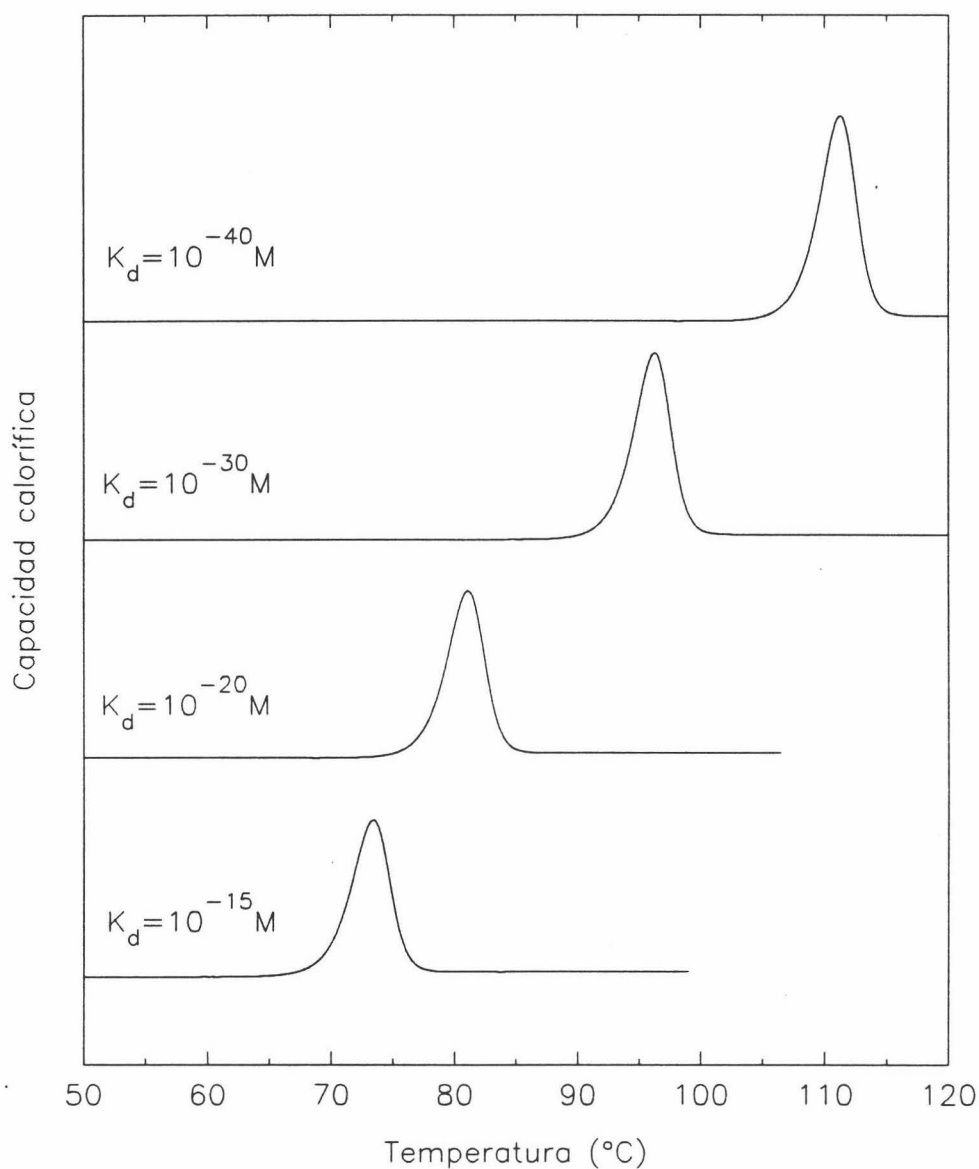


FIGURA 2-8: Curvas simuladas de capacidad calorífica frente a la temperatura para dos moléculas interaccionantes que desnaturalizan según el modelo de dos estados. Ambas transiciones se supusieron con valores de $\Delta H(T_m) = 600$ kJ/mol, $\Delta C_p = 5$ KJ/K·mol y con valores de T_m de 50°C y 65°C respectivamente. La estequiometría del proceso es 1:1 y las concentraciones de las dos se supusieron en 0.1mM. Los valores supuestos para la constante de disociación a 50°C para cada curva están indicados en la figura y se consideró una entalpía de disociación de 85 kJ/mol y un $\Delta C_{pd} = 1$ kJ/K·mol en todos los casos.

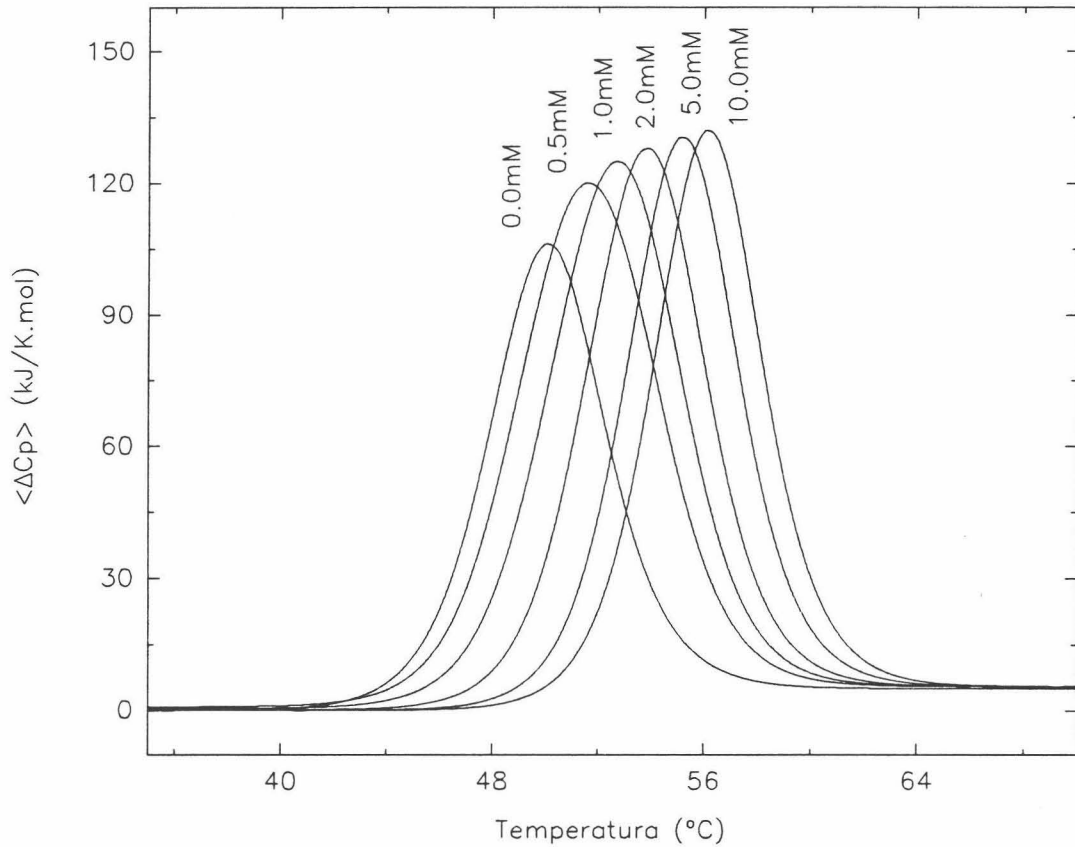
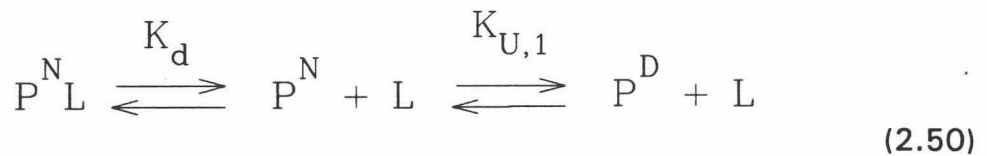


FIGURA 2-9: Perfiles simulados de capacidad calorífica para una proteína que desnaturaliza según el modelo de dos estados en presencia de diferentes concentraciones de ligando, puestas en la figura. Los parámetros de desnaturalización de la proteína son $\Delta H = 600$ kJ/mol, $\Delta C_p = 5$ kJ/K.mol y $T_m = 50^\circ\text{C}$. Para la interacción se han considerado unos valores de 10^{-5}M para la constante de disociación, 50 kJ/mol para la entalpía de la interacción y $\Delta C_{pd} = 0.5$ kJ/K.mol.

de disociación con desnaturalización de un dímero (ver Figura 2-7 para $n = 2$).

El modelo más sencillo mencionado antes en el cual el ligando L no sufre ningún proceso de desplegamiento surge, sencillamente, de la situación en que $K_{U,2} = 0$, con lo que nos queda que:



En cualquier caso, vamos a abordar el problema desde una óptica un tanto diferente para ilustrar mejor las distintas formas en que podemos formular este tipo de procesos. Podemos partir de las expresiones definidas en (2.39) para K_d y $K_{U,1}$ y en (2.40) donde $L^N \equiv L$ ya que el ligando no sufre ninguna desnaturalización durante el proceso. Si reagrupamos estas expresiones tendremos que:

$$K_d = \frac{f_{P,N}}{f_{PL,N}} [L] ; K_{U,1} = \frac{f_{P,D}}{f_{P,N}} \quad (2.51)$$

donde $[L]$ es la concentración de ligando libre que varía con la temperatura.

Si tenemos en cuenta que $f_{PL,N} + f_{P,N} + f_{P,D} = 1$ podríamos escribir que:

$$f_{PL,N} \left(1 + \frac{K_d}{[L]} + \frac{K_d \cdot K_{U,1}}{[L]} \right) = 1 \quad (2.52)$$

donde el término entre paréntesis es, en realidad, una función de partición para el sistema que si denotamos como M nos queda lo siguiente:

$$f_{PL,N} = \frac{1}{M} ; f_{P,N} = \frac{K_d}{M[L]} ; f_{P,D} = \frac{K_d \cdot K_{U,1}}{M[L]} \quad (2.53)$$

De esta manera, hemos conseguido calcular la distribución de poblaciones de todas las especies de macromolécula en función de M y $[L]$. El cálculo de la concentración de ligando libre se puede hacer a partir de las expresiones que nos dan la concentración total experimental de las especies:

$$[P]_T = [P^N L] + [P^N] + [P^D]$$

$$[L]_T = [P^N] + [L] \quad (2.54)$$

y las expresiones definidas en (2.39) para K_d y $K_{U,1}$. De esta manera, construimos un sistema de ecuaciones con cuatro incógnitas: $[P^N L]$, $[P^N]$, $[P^D]$ y $[L]$ a partir del cual podemos obtener $[L]$ en función de las constantes de equilibrio y de las concentraciones experimentales $[P]_T$ y $[L]_T$:

donde:

$$[L] = \frac{-B + \sqrt{B^2 + 4C}}{2} \quad (2.55)$$

$$B = [L]_T - [P]_T - K_d(1 + K_{U,1})$$

$$C = K_d[L]_T(1 + K_{U,1}) \quad (2.56)$$

Tomando como estado de referencia el del complejo macromolécula-ligando, $P^N L$, definimos la entalpía de exceso como:

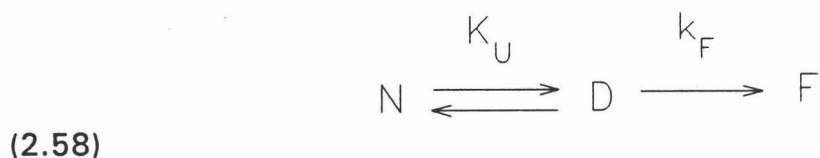
$$\langle \Delta H_{PL}(T) \rangle = (1 - f_{PL,N}) \cdot \Delta H_d + \langle \Delta H_P(T) \rangle \cdot f_{P,D} \quad (2.57)$$

y, con esto, la función $\langle \Delta C_{p,PL}(T) \rangle$ podemos calcularla tal y como describimos en (2.46).

En la Figura 2-9 hemos simulado varias curvas de calorimetría diferencial de barrido en las que hemos variado la concentración de ligando manteniendo el resto de parámetros fijo en los valores indicados en el texto.

2.1.4.5.- Modelo de Lumry-Eyring para procesos irreversibles

La forma más sencilla del modelo de Lumry y Eyring (Lumry & Eyring, 1954) puede representarse mediante el siguiente esquema:



donde N, D y F son los estados nativo, desplegado y final (desnaturalizado irreversiblemente) de la proteína respectivamente. Vamos a considerar que el equilibrio químico entre N y D está establecido en todo momento, y que el proceso irreversible es de primer orden. Tanto la constante de equilibrio, K_U , para la etapa reversible ($N \rightleftharpoons D$) como la constante de velocidad de primer orden, k_F , del proceso irreversible ($D \rightarrow F$) dependen de la temperatura. La dependencia de K_U viene dada

por la ecuación de van't Hoff (2.13) y la de k_F de acuerdo con la ecuación de Arrhenius, que puede escribirse de la forma:

$$k_F(\text{min}^{-1}) = \exp\left[-\frac{E}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_*}\right)\right] \quad (2.59)$$

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

La ecuación de velocidad de formación del estado F es:

$$\frac{d[F]}{dt} = k_F \cdot [U] \quad (2.60)$$

y si dividimos ambos términos de la ecuación anterior por la concentración de proteína total, $[P]_T = [N] + [D] + [F]$, tenemos:

$$\frac{df_F}{dt} = k_F \cdot f_D \quad (2.61)$$

donde f_D y f_F son las fracciones molares de los estados desplegado y final, respectivamente. La constante de equilibrio viene dada por $K_U = f_D/f_N$ (f_N es la fracción molar del estado nativo), por lo que:

$$f_D = (f_N + f_D) \frac{K_U}{(1 + K_U)} = (1 - f_F) \frac{K_U}{(1 + K_U)} \quad (2.62)$$

ya que $f_N + f_D + f_F = 1$. La ecuación (2.61) puede ahora reescribirse como:

$$\frac{df_F}{dt} = \frac{k_F \cdot K_U}{(1 + K_U)} (1 - f_F) \quad (2.63)$$

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

Separación de variables en la ecuación anterior y posterior integración desde

$$\frac{df_F}{dT} = \frac{1}{v} \cdot \frac{k_F \cdot K_U}{(1+K_U)} (1-f_F) \quad (2.64)$$

una temperatura suficientemente baja, T_0 (a la que la velocidad de la reacción es prácticamente cero, y $f_F=0$), hasta una temperatura T , da como resultado:

$$f_F = 1 - \exp\left[-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{k_F \cdot K_U}{(1+K_U)} dT\right] \quad (2.65)$$

Teniendo en cuenta que $K_U = f_D/f_N$ y que $f_D = (1+f_F) \cdot K_U / (1+K_U)$, las fracciones molares de los estados desplegado y nativo vendrán dadas por las siguientes ecuaciones:

$$f_D = \frac{K_U}{1+K_U} \exp\left[-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{k_F \cdot K_U}{1+K_U} dT\right] \quad (2.66)$$

$$f_N = \frac{1}{1+K_U} \exp\left[-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{k_F \cdot K_U}{1+K_U} dT\right] \quad (2.67)$$

Las ecuaciones (2.65), (2.66) y (2.67) proporcionan la dependencia de f_N , f_D y f_F con la temperatura, para un experimento realizado a una velocidad de barrido, v . La entalpía de exceso, $\langle \Delta H_N(T) \rangle$, que es un promedio de todos los estados presentes, viene dada por:

$$\langle \Delta H_N(T) \rangle = f_D \cdot \Delta H_{N,D} + f_F \cdot \Delta H_{N,F} \quad (2.68)$$

donde $\Delta H_{N,D}$ y $\Delta H_{N,F}$ son, respectivamente, las entalpías de los estados D y F (tomando el estado N como referencia).

Finalmente podemos obtener la capacidad calorífica de exceso derivando la expresión anterior igual que lo hicimos en todos los modelos anteriores.

Con estas ecuaciones podemos simular trazas de CDB para unos valores dados de los parámetros $\Delta H_{N,D}$, $\Delta H_{N,F}$, $T_{1/2}$, $\Delta C_{p,N,D}$, E , T_* y v . Evidentemente, los

resultados que se obtienen dependen de los valores elegidos para los parámetros; sin embargo, las trazas simuladas pueden clasificarse en tres grandes grupos, que vamos a denominar situaciones A, B y C y dependen de la velocidad del proceso irreversible que genera el estado F (Galisteo, 1990):

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

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

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

2.2.- CALORIMETRIA ISOTERMICA DE TITULACION

2.2.1.- INSTRUMENTACION

Desde que aparecieron los primeros calorímetros de titulación a principios de los años 70 (Christensen et al., 1973; Pennington, 1976) hasta la actualidad, el desarrollo de esta técnica ha sido tal que hoy podemos utilizarla para estudiar interacciones de macromoléculas biológicas con ligandos. La principal limitación que presenta este tipo de estudios es la cantidad de muestra de que podemos disponer, por lo que la evolución en la instrumentación se ha dirigido precisamente en este sentido, construyéndose cada vez instrumentos más sensibles.

Este calorímetro se puede considerar el primer modelo de la segunda generación de calorímetros de titulación isotérmica de los desarrollados en el laboratorio de S. J. Gill. Es similar al construido por McKinnon et al. (1984) y está diseñado especialmente para medir efectos térmicos en los procesos de interacción entre moléculas biológicas ya que el bulbo de reacción necesita sólo 200 μL de volumen y su sensibilidad es del orden de 1 μcal (Sensibilidad específica: 5 $\mu\text{cal/mL}$). Su funcionamiento se basa en la conducción de calor a través de termopilas y para la medida 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 uno de los reactivos en la célula que contiene al otro, por lo que se trata de un aparato de titulación. Tanto la realización de las inyecciones como la medida del calor se controlan mediante un computador.

2.2.1.1.- El bloque calorimétrico

En la Figura 2-11 observamos un corte transversal del bloque calorimétrico. El conjunto tiene simetría cilíndrica y el corte se ha hecho en el plano que contiene tanto al eje del bloque como a los ejes de las células de reacción y referencia. Todo el bloque está sumergido en el interior de un baño de agua.

Este calorímetro ha sido construido mediante el principio de de células

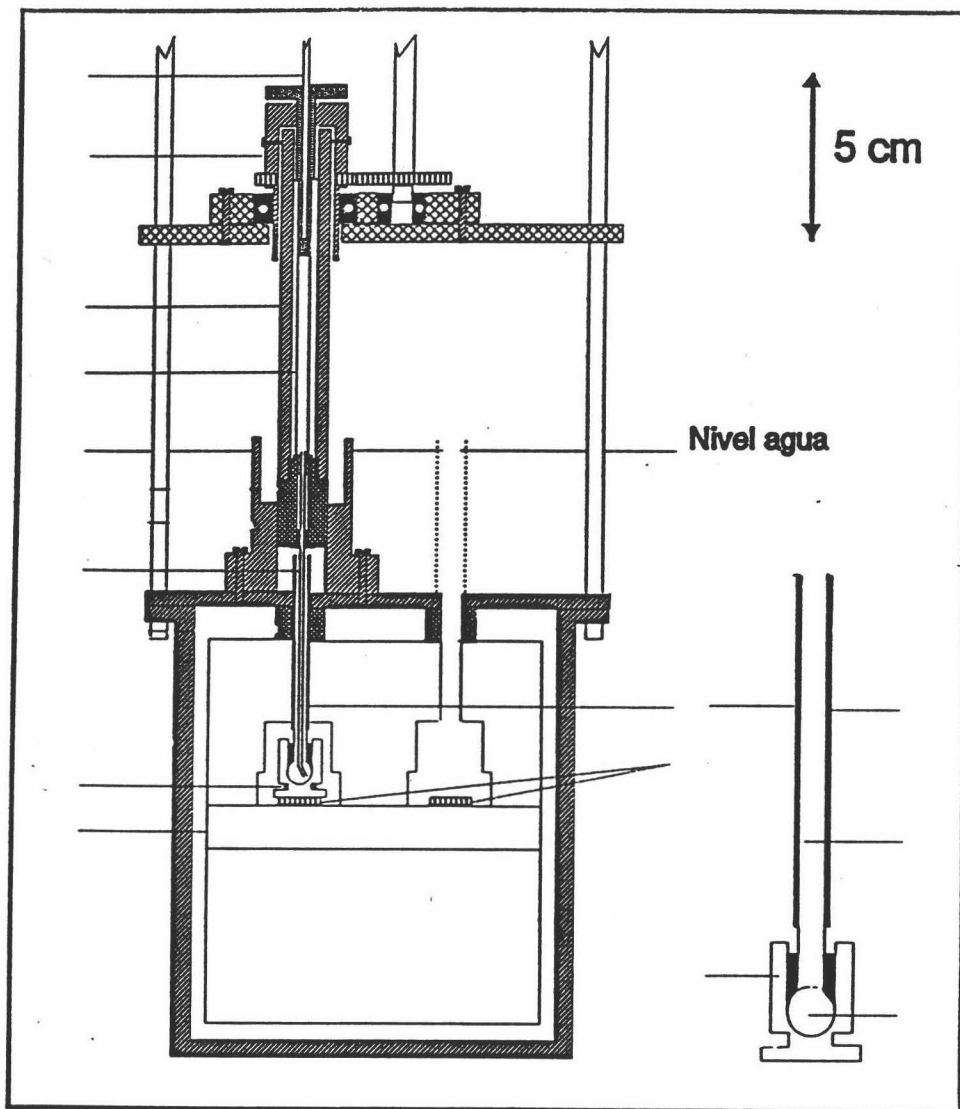


FIGURA 2-11: Dibujo a escala de un corte longitudinal del bloque calorimétrico y de la jeringa del calorímetro isotérmico de titulación. En la parte derecha se muestra un corte longitudinal ampliado de una de las células. Para más detalles ver el texto. (Tomado de El Harrous, 1994).

gemelas de tal forma que la medida de los efectos térmicos producidos se realiza a partir de la variación con el tiempo del voltaje de las dos termopilas (A), cada una en contacto con las células (de reacción y referencia respectivamente) (B) y el sumidero de calor (C), construido en aluminio. El aluminio posee una elevada

capacidad calorífica lo que permite que la temperatura del sumidero no se vea afectada por pequeñas fluctuaciones en la temperatura del baño de agua y, además, es un buen conductor de calor lo que evita la acumulación de calor en la célula y hace que la conducción del mismo hacia el sumidero sea más rápida.

Las células de reacción y de referencia son unas estructuras relativamente complejas alojadas dentro del sumidero. Su esquema se muestra, ampliado, en la Figura 2-11 donde, para mayor claridad, se muestra vacío el compartimento de la célula de referencia. La reacción en estudio tiene lugar en el bulbo inferior (B_1), de un volúmen de 0.2 mL. La parte superior del tubo de vidrio (B_2) se aloja dentro de otro tubo de acero inoxidable (B_3) que es el que contacta con el sumidero de calor. El bulbo se encuentra embebido mediante una aleación de Bismuto de bajo punto de fusión en una cápsula de cobre (D), a la que se enrolla la resistencia calefactora (E) que permite comunicar a la célula una cantidad conocida de calor y realizar la compensación eléctrica. La superficie inferior de la cápsula de cobre está en contacto con la superficie superior de la termopila (ver Figura 2-11), sirviendo ésta de contacto con el sumidero de calor por su parte inferior. Por consiguiente, y debido a la elevada 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.

De esta manera, cuando existe una 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 permanece hasta que se establezca el equilibrio térmico entre ambas partes y se hace a través de la termopila de la célula de reacción que genera un pequeño voltaje proporcional a ΔT . La célula de referencia está también en contacto térmico con el sumidero a través de otra termopila idéntica. Al estar las dos termopilas conectadas entre sí en oposición, el voltaje diferencial global que se obtiene es una medida indirecta de la diferencia de temperatura entre las dos células, supuesta uniforme la temperatura del sumidero en cada punto del mismo (Ley de Newton del enfriamiento, McGlashan, 1979):



$$\frac{dq}{dt} = -K' \cdot (T_c - T_0) \quad (2.58)$$

en la ecuación, q representa el calor, t el tiempo, T_c la temperatura de la célula y T_0 la temperatura del sumidero. K' es una constante de proporcionalidad que podemos considerar como una conductividad térmica. En nuestro caso, el voltaje que produce la termopila es directamente proporcional a la citada diferencia de temperatura (efecto Seebeck) por lo que, para una diferencia de temperatura $T_c - T_0$ el voltaje generado será:

$$V = \gamma \cdot (T_c - T_0) \quad (2.59)$$

donde γ es la constante de proporcionalidad. Sustituyendo en la ecuación (2.58):

$$\frac{dq}{dt} = -K \cdot V \quad (2.60)$$

siendo K la constante de proporcionalidad que también puede considerarse como una conductividad térmica. Si integramos la expresión anterior, tenemos que:

$$q = -K \int_{t_1}^{t_2} V \cdot dt \quad (2.61)$$

Por consiguiente, podemos evaluar el efecto térmico mediante medidas del voltaje de la termopila. Tian (1923) y Calvet después en 1948 fueron los primeros que utilizaron esta metodología de conducción a través de termopilas (Calvet & Prat, 1963). En la práctica, esto se consigue con un nanovoltímetro digital comercial KEITHLEY 181, siendo el computador el encargado de transformar la señal de voltaje recibida de aquel en términos de calor (μcal) según la ecuación (2.61).

Calibración

Para medir el efecto térmico será necesario conocer cuánto vale la

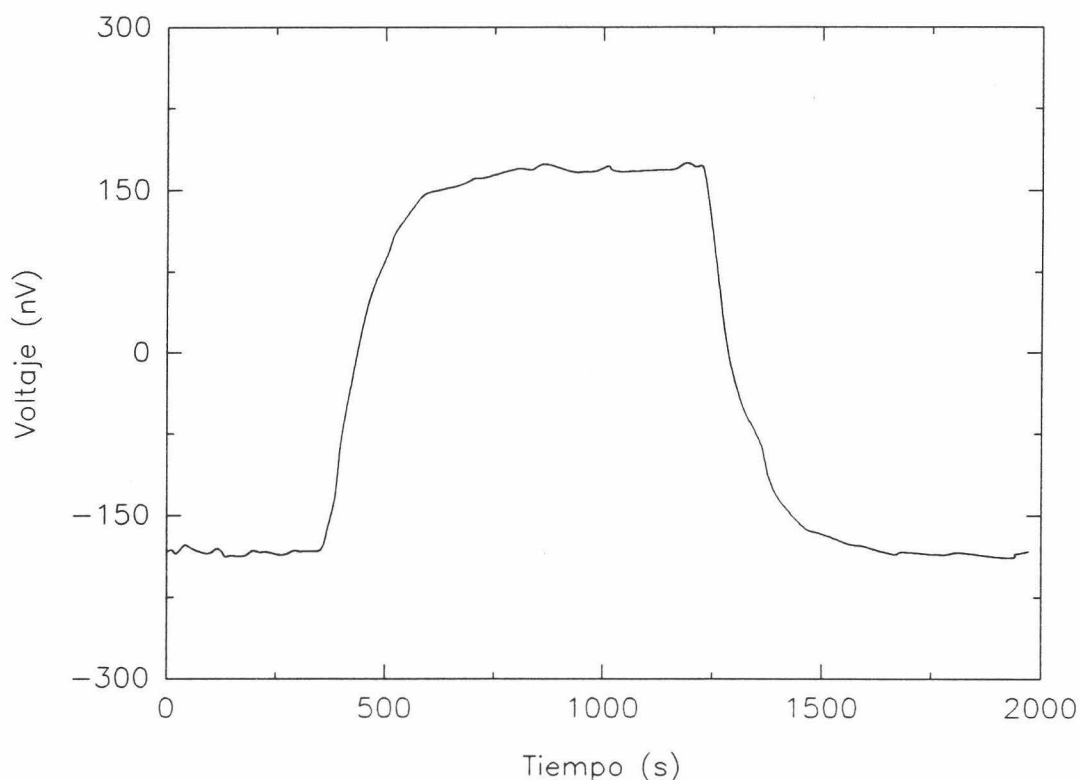


FIGURA 2-12: Respuesta del calorímetro de titulación a la aplicación de una potencia eléctrica constante de $1\mu\text{W}$ a través de la resistencia calefactora (99 ohmios). (Tomado de El Harrous, 1994).

conductividad térmica K del calorímetro. 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.

En la práctica, estos valores se obtienen aplicando una potencia eléctrica conocida a través de la resistencia calefactora del bulbo de reacción durante un tiempo suficientemente largo para alcanzar un estado estacionario, que corresponde con la situación en que el flujo de calor a través de la termopila (desde el bulbo de reacción al sumidero de calor) iguala a la potencia suministrada. En esta situación, el primer miembro de la ecuación (2.60) será dicha potencia, por lo que el cociente entre ésta y el voltaje medido de la termopila constituye la conductividad térmica K para nuestro sistema. $K = 2.80 \pm 0.04 \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}$ (El

Harrous, 1994).

Calvet y Prat (1963) demostraron que las proporciones ascendente y descendente de la curva voltaje frente a tiempo (ver Figura 2-12) 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 (más estrictamente, también habría que considerar la cápsula de cobre que lo rodea). Del ajuste exponencial de estos tramos se obtiene un valor para la constante de tiempo de 94s y del producto de esta magnitud y la conductividad térmica determinada, se obtiene un valor para la capacidad calorífica del bulbo de reacción, $C = 263 \text{ J}\cdot\text{V}^{-1}$ (El Harrous, 1994).

2.2.1.2.- Sistema de inyección y agitación

Como veremos después, la realización de una curva de valoración calorimétrica se consigue mediante la inyección sucesiva de varios volúmenes pequeños de uno de los reactivos (colocado en la jeringa) en la célula de reacción que contiene al otro reactivo. Además, para asegurar una buena mezcla de ambos se agita el contenido de la célula mediante la misma aguja de inyección que está curvada en su extremo libre.

El sistema de inyección consiste en un motor a pasos, controlado por el computador, que mueve un tornillo micrométrico que a su vez empuja el émbolo de la jeringa (F_1). La jeringa consta de dos partes: un tubo de bronce central (F_2) que aloja en su interior otro tubo, éste de vidrio (F_3), proveniente de una jeringa comercial de precisión de $250 \mu\text{L}$ y un "casquete" superior también de bronce (F_4) que contiene una rueda dentada, acoplada a otra que gira gracias al motor de agitación, controlado también por el computador. Al extremo inferior del tubo central se acopla la aguja de inyección (F_5) que es un pequeño capilar de vidrio ($25 \mu\text{L}$ de volumen interno) ligeramente doblado por su extremo, a través del cual se realiza la inyección en el bulbo de reacción.

Durante el montaje experimental, tanto el tornillo micrométrico como la jeringa y su correspondiente tubo de inyección deben quedar bien cerrados y

alineados con la célula de reacción. Este es un factor crítico en la minimización del calor de agitación y en el mantenimiento de la estabilidad de la línea base durante el desarrollo de un experimento.

2.2.1.3.- Cálculo del volúmen efectivo del bulbo de reacción

En el estudio calorimétrico de un proceso irreversible, todo el agente valorante que entra en el bulbo de reacción reacciona completamente con el reactivo a valorar hasta que se alcanza el punto de equivalencia, que dependerá lógicamente de la estequiometría de dicho proceso. En este sentido, podríamos estudiar, por ejemplo, una curva de valoración calorimétrica de una disolución de HCl con otra de NaOH (ver Figura 2-13). 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 los reactivos mediante la expresión:

$$\frac{q_k}{q_{k-1}} = \frac{(C_c + C_j) \cdot D^{k-1} - C_j}{C_j \left(\frac{1}{D} - 1 \right)} \quad (2.62)$$

donde C_c es la concentración en la célula para uno de los reactivos y C_j la concentración en la jeringa para el otro. El término D sería el factor de dilución y es un parámetro que tiene en cuenta la dinámica del experimento. Esto es debido a que el volúmen efectivo del bulbo de reacción, V_e , permanece constante, ya que la inyección de un volúmen v en él implica necesariamente la salida de un volúmen equivalente, que no participará en el proceso en estudio. Por consiguiente, y a efectos de poder calcular las concentraciones de cada reactivo en el bulbo de reacción a lo largo de una titulación, es útil definir un factor de dilución, D , como:

$$D = 1 - \frac{v}{V_e} \quad (2.63)$$

En esta situación, podemos obtener que:

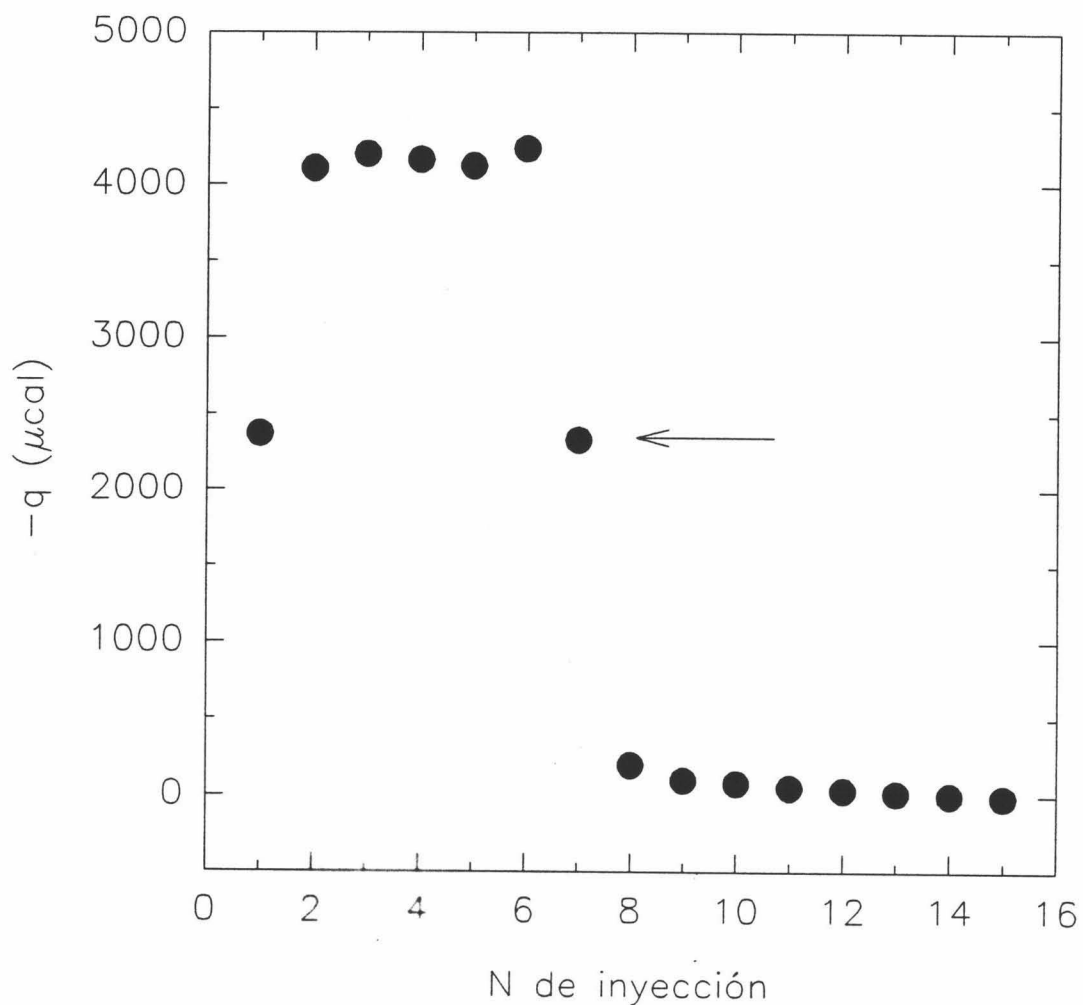


FIGURA 2-13: Valoración calorimétrica de una disolución de HCl 10mM con otra de NaOH 30mM.

$$C_{j,i} = C_j \cdot (1 - D^i) \quad ; \quad C_{c,i} = C_c \cdot D^i \quad (2.64)$$

siendo i el número de inyección.

De acuerdo con lo anterior, del experimento de valoración de HCl con NaOH se determinó un volúmen efectivo del bulbo de reacción de $203 \pm 4 \mu\text{L}$.

2.2.2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

Como ya hemos comentado, esta técnica nos permite obtener una medida directa del intercambio calorífico con el medio que se origina en el proceso de unión de una macromolécula con un ligando. En nuestro caso particular, hemos utilizado la CIT para obtener información termodinámica acerca de la unión de dos proteínas: Barnasa y Barstar. El que el ligando sea una proteína (interacción macromolécula-macromolécula) y ambas formen una unión muy fuerte conlleva una serie de ventajas experimentales, si bien hace imposible obtener toda la información termodinámica posible. Todo esto lo comentaremos en la sección siguiente.

En cualquier caso, para la realización de un experimento de valoración calorimétrica hemos de considerar dos aspectos fundamentales, por una parte la preparación de las muestras y en segundo lugar la obtención de los calores de reacción en el calorímetro. A continuación vamos a describir ambos aspectos, ilustrándolos con un ejemplo de una valoración de Barnasa con Barstar.

2.2.2.1.- Preparación de las muestras de proteína

El objetivo perseguido será tener las dos proteínas en un medio tamponado y a una determinada concentración dentro de unos límites idóneos para la obtención de datos experimentales fiables. Un punto importante, previo a todo esto, será el grado de pureza elevado que deben poseer ambas muestras, lo que se puede comprobar por electroforesis, cromatografía, etc. Además, se hace necesario el uso de una sustancia tamponante para procurar un buen control del pH de manera que éste se altere mínimamente durante el proceso de valoración debido al intercambio de protones con el medio acuoso provenientes de la reacción. Se pueden aceptar diferencias de hasta 0.03 unidades de pH.

Ambas proteínas deben encontrarse en el mismo disolvente para asegurar la constancia, tanto del pH como de la fuerza iónica. Esto se consigue introduciendo las proteínas separadas en bolsas de diálisis de un tamaño de poro adecuado (3.5 kDa de "cut off" en nuestro caso) y dializando ambas frente al mismo tampón, al menos 1 litro, durante 20 horas como mínimo. Debemos conocer el calor de ionización del tampón utilizado para así poder corregir el calor medido

con este efecto. Además es conveniente (aunque no crítico) desgasificar los tampones para evitar la formación de burbujas de aire dentro de la célula que afectan al ruido de la línea base o en la jeringa introduciendo errores en el proceso de valoración.

Las concentraciones de ambas proteínas deben determinarse con precisión, sobre todo la de la que vayamos a colocar en la jeringa que será la más concentrada. Su determinación se consigue midiendo el valor de absorbancia a 280 nm de una dilución de la muestra a pH 7.0 8-10 veces en PIPES 50mM. Así se evitan posibles cambios en el espectro de la proteína por efecto del pH, ya que los coeficientes de extinción fueron determinados en esas condiciones, tal y como veremos en la sección 2.6. En general, para una interacción con n sitios idénticos e independientes los errores en la concentración de proteína de la célula 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 más de la concentración de la proteína depositada en la jeringa.

En el caso de una interacción fuerte como la que nos ocupa, la concentración de la proteína de la jeringa debe ser entre 2 y 3 veces mayor que la de la célula, para inyecciones de 10 μ L. La concentración usual de ésta última ha sido 0.2 mM aproximadamente que nos permite obtener unos calores del orden de 70 μ cal para las primeras inyecciones. El valor mínimo de concentración permitido será aquel que nos dé calores por encima de las 20 μ cal.

2.2.2.2.- Obtención de los calores de reacción

Selección de la temperatura de trabajo

La primera acción a desarrollar en el calorímetro es fijar la temperatura del baño, teniendo en cuenta que el baño auxiliar que actúa de foco frío debe quedar aproximadamente 1 grado por debajo de la temperatura final. De esta manera se obtendrán unas pérdidas de calor en el baño del calorímetro que oscilan entre el 20 y el 50%. En esta situación, el control fino de temperatura se realiza gracias a un

módulo TRONAC PTC-41 que, mediante un termistor, va midiendo la temperatura del baño principal y mandando, en períodos de 1s, pulsos eléctricos (de potencias proporcionales a las pérdidas de calor generadas por el foco frío) a una bombilla de 230 watios sumergida en dicho baño.

Por otra parte, la habitación donde se encuentra el calorímetro no debe estar a una temperatura demasiado diferente, si bien lo más importante es que no se produzcan cambios muy bruscos que podrían afectar a la estabilidad del controlador PTC-41 y a la del resto de aparatos digitales, originándose derivas en la línea base.

La equilibración térmica del calorímetro puede tardar uno o dos días. La temperatura máxima que puede soportar el calorímetro es de 40°C ya que la aleación de Bismuto utilizada en las células posee un punto de fusión no mucho mayor.

Llenado del bulbo de reacción

Todo el conjunto compuesto por el bulbo soplado al final del tubo de vidrio puede llenarse completamente con 0.7 mL, o parcialmente con 0.5 mL. Si el volumen es menor, se corre el riesgo de medir calores de inyección elevados e irreproducibles. Además, con este volumen se logra que la disolución de ligando que se encuentra en el extremo del tubo de inyección de la jeringa se equilibre térmicamente con el excedente de disolución de macromolécula alojada en el tubo de vidrio de la célula de reacción por encima del bulbo.

El llenado se efectúa con una micropipeta Gilson de 0.2-1.0 mL a la que se adapta en la punta desechable una prolongación consistente en un tubo de teflón para poder alcanzar el extremo inferior del bulbo, accionando después la pipeta para ir soltando la disolución con suavidad y evitando introducir burbujas de aire.

Es conveniente que antes de llenar la célula, la disolución se termostatice en el mismo baño del calorímetro durante 20-30 minutos para así reducir el tiempo de espera para la equilibración térmica del sistema después del llenado. De esta manera, ésta puede ser de 30-60 minutos normalmente. Esta pre-termostatización evita también la formación de burbujas de aire en la célula.

Preparación del sistema de inyección

Cuando se recupere la estabilidad de la línea base después de llenar la célula de reacción, el experimento puede comenzar una vez adaptada la jeringa llena con la otra disolución de proteína (la más concentrada).

Tanto el tubo de vidrio como la aguja tienen que estar limpios y secos antes de su utilización. Se llena el tubo hasta el borde con la proteína ayudándonos de una pipeta Pasteur. Hay que procurar que no queden burbujas de aire. Después se elimina el exceso con un Kleenex. Se coloca el tubo de vidrio dentro del soporte y se fija con un tapón de plástico. Se llena la aguja de vidrio con el líquido de la jeringa empujando el émbolo suavemente hasta que salga una gota de líquido. Se seca todo perfectamente y comprobamos que en posición vertical el mecanismo no pierde disolución por ninguna junta, siendo necesario desmontarlo todo y secar bien las partes si no fuera así. Para esta operación se necesitan unos 0.3 mL de disolución.

Un detalle crucial es comprobar que el émbolo quede perfectamente alineado con el resto del sistema de inyección ya que sus oscilaciones pueden dar lugar a alguna deriva de línea base durante las inyecciones.

Ahora se introduce todo el sistema con suavidad dentro de la célula poniéndolo lo más vertical posible para que roce lo menos posible las paredes internas de la célula. Una vez dentro, se comprueba que la jeringa gira con facilidad y se conecta su émbolo al tornillo micrométrico con un adaptador metálico. Serán suficientes 20 minutos para la equilibración del sistema, lo que se comprueba registrando línea base.

Adquisición de datos

Se hace por medio de un ordenador HP-85 equipado con un lector de cintas, donde se utiliza el programa MEDCAL de control y toma de datos (El Harrous, 1994). Al encender el ordenador se carga automáticamente el programa y se introducen los parámetros de medida. En un experimento de valoración de Barnasa con Barstar serían los siguientes:

- ¿Medir con compensación? (S/N)	S
- Nº de inyecciones	15
- Nº de agitaciones	6
- Nº de líneas base	0
- Volúmen de inyección (μL)	10
- Máximo calor esperado (μcal)	100
- Tiempo de integración (s)	70
- Tiempos de agitación (s)	30,15

El dato del máximo calor esperado se utiliza para medir con compensación, de tal manera que se establece una nueva línea base al enviar una intensidad determinada I_0 a las células. Habrá que esperar unos 15 minutos para construir esa nueva línea base. Su estabilidad se comprueba por medio del registro gráfico.

Hay que procurar hacer esto nada más acabar de montar el sistema de inyección para no acumular los tiempos de espera pues en esta situación se corre el riesgo de que se produzcan fenómenos de difusión entre ambas disoluciones con lo que más de una inyección sería incorrecta. En este sentido, en la mayoría de los casos ocurre que la primera inyección da un calor de reacción por debajo de lo esperado debido, precisamente, a esta causa. En el resto de las inyecciones, puesto que están separadas por un intervalo de tiempo de 3 minutos, la difusión podemos considerarla despreciable.

Cuando se estabiliza la nueva línea base se inicia el experimento pulsando cualquier tecla del ordenador y se comienzan a producir las inyecciones y agitaciones automáticamente, sin que se exija ninguna intervención externa. De los 3 minutos que separan las inyecciones, se reparten en 20s que tarda el proceso de inyección de los 10 μL , poniéndose en marcha simultáneamente la agitación de la mezcla del bulbo, girando la propia aguja de inyección a 170 rpm. El resto del tiempo se emplea en la integración del pico y en evaluaciones del ruido de línea base si han sido programadas, porque no son necesarias si el sistema está perfectamente estabilizado.

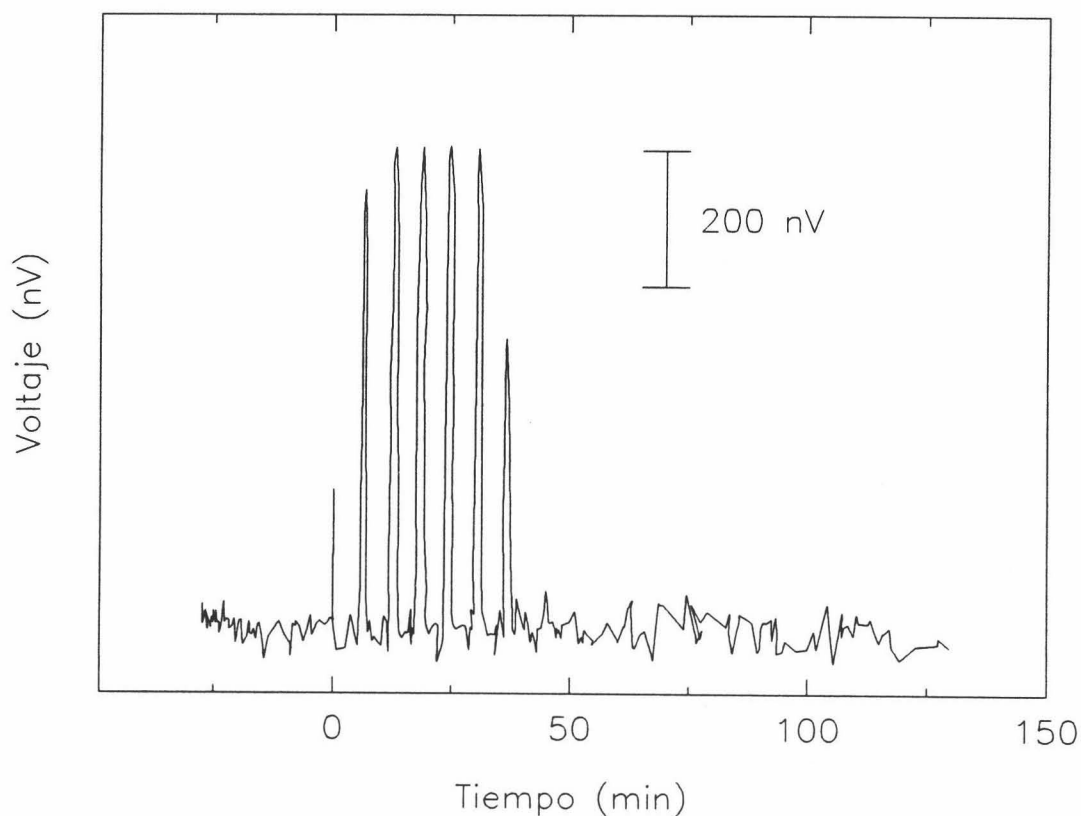


FIGURA 2-14: Registro de la variación de la señal del calorímetro a lo largo de la valoración. Estos datos fueron obtenidos para la interacción Barnasa-Barstar en CAPS 50mM pH 10.0 a 25°C.

Un experimento como el programado anteriormente, con 15 inyecciones y 6 agitaciones dura aproximadamente una hora.

Hay que procurar desmontar todo el sistema y lavarlo lo más pronto posible para evitar obturaciones de la aguja de inyección o depósitos de restos sólidos provenientes de la posible agregación de las proteínas o de las sales del disolvente. La célula de reacción se deja perfectamente limpia pasando agua Milli-Q con una jeringa varias veces, dejándola llena al final.

En la Figura 2-14 podemos ver un experimento llevado a cabo con Barnasa y Barstar en tampón CAPS 50mM pH 10.0 y 25°C.

2.2.3.- ANALISIS DE DATOS

Correcciones previas

En nuestros resultados experimentales tenemos medidos los calores totales para cada inyección y habrá que realizar algunas correcciones para obtener los que son debidos exclusivamente a la interacción entre ambas macromoléculas, que son los calores de reacción. En primer lugar habrá que restar las contribuciones de calor producidas por las inyecciones y agitaciones de una molécula en la otra. En nuestro caso, como ya anunciamos anteriormente, se nos presenta una ventaja y es la de poder medir estos calores al final del experimento, en las inyecciones posteriores al punto de equivalencia, ya que tal y como vemos en la Figura 2-14, una vez saturada la macromolécula del bulbo de reacción, al ser la unión tan fuerte, no aparecen más contribuciones de calor debidas a la unión. Todo esto se comprobó por simulación en el ordenador, por lo cual, las contribuciones mencionadas las tendremos directamente evaluadas en el experimento y no será necesario hacer ninguna valoración adicional de tampón en tampón o de agua en agua para determinar estos calores de corrección.

En otro orden, habrá que conocer y restar el calor de dilución de la macromolécula que coloquemos en la jeringa, realizando inyecciones de ésta en la célula llena de tampón. Aquí cabrían dos posibilidades dependiendo de la magnitud del efecto: así, si los calores no exceden de las 2-3 μcal se resta a todos los datos experimentales el mismo valor, promedio de la población obtenida; sin embargo, si este calor es significativo frente al calor de reacción, la corrección del mismo no es tan trivial ya que varía para cada inyección y debemos analizar estos calores de dilución para determinar la dependencia de la entalpía molar aparente del ligando, ϕL_2 , con la concentración. Nosotros hemos comprobado en algún experimento de inyección de las proteínas en tampón que el efecto calorífico está en 2.2 μcal aproximadamente, por lo que no consideramos necesario el tener que determinar el parámetro ϕL_2 . Además, esta contribución, al igual que las anteriores, se puede considerar recogida en el valor de calor obtenido en las últimas inyecciones ya que,

en definitiva, en ellas se recogerán todas las aportaciones de calor que no son debidas a la reacción. Por tanto, el calor de corrección se tomará como un valor promedio de estos calores de inyección (datos 7-15 en el ejemplo).

Análisis de datos

De acuerdo con el proceso básico de mezcla de los reactivos en el calorímetro, en un experimento de valoración calorimétrica se van midiendo los calores producidos en las sucesivas adiciones de un volúmen v de disolución de ligando X desde la jeringa a un volúmen $V_0 - v$ de disolución de macromolécula M en el bulbo de reacción (para más detalles ver apartado 2.2.1.3), de manera que el volúmen de reacción V_0 queda constante durante la valoración.

En un experimento de valoración podemos considerar dos situaciones: **1)** la célula contiene inicialmente sólo una proteína a una concentración M_0 y la jeringa, además de ligando a concentración X_j , contiene macromolécula a una concentración M_j ó **2)** la jeringa contiene sólo ligando (la otra macromolécula en nuestro caso particular). El primer caso es conveniente cuando se pueden dar fenómenos de agregación en el proceso de mezcla por cambios en el estado de asociación, por lo cual no interesará variar M_0 durante el experimento ($M_j = M_0$ en este caso). De cualquier manera, el gasto de reactivo es mayor ya que una de las proteínas se encuentra tanto en célula como en la jeringa y el calor total obtenido sería menor por lo que, salvo en la situación mencionada, lo normal es seguir la situación **2)**.

De la deconvolución de los datos de calor se podría obtener información numérica acerca del cambio de entalpía de la reacción, del número de sitios de unión de la macromolécula para el ligando y de la constante de asociación de cada sitio. Cuando consideramos una interacción fuerte, cuya constante de asociación es mayor de 10^8 M^{-1} , este parámetro quedaría bastante indeterminado en un experimento de este tipo ya que la proporción de macromolécula libre en disolución es demasiado pequeña para poder evaluarla correctamente. El valor de entalpía se puede conocer directamente en estos experimentos calculando el promedio de las primeras inyecciones y restando el valor promedio de las últimas, de tal manera que

esta diferencia (calor neto de unión) dividida por los moles de macromolécula inyectados nos da ΔH_u .

En cualquier caso disponemos de un programa denominado ANALCAL (El Harrous, 1994) que nos permite obtener por ajuste no lineal a un modelo de n sitios iguales e independientes, cada uno de los valores mencionados. Este programa tiene la posibilidad añadida de estimación de los errores experimentales de acuerdo con el método de Bevington (1969).

En nuestro ejemplo, a partir de los datos expuestos en la Figura 2-4 podemos deducir que el calor de corrección será:

$$q_{corr} = \bar{q}(\text{datos7-15}) = +3.85 \mu cal$$

y la variación de entalpía se podría evaluar directamente como:

$$\Delta H_u = \frac{\bar{q}(\text{datos2-5}) - q_{corr}}{X_j \cdot V_{iny}} \left(\frac{kcal}{mol} \right)$$

dónde sustituyendo cada dato por su valor en las unidades correspondientes, teniendo en cuenta que X_j será el valor de concentración de la proteína de la jeringa y V_{iny} el volúmen de inyección (10 μL), obtenemos un valor de $\Delta H_u = -16.51$ kcal/mol. Por otra parte, la evaluación de datos utilizando el programa ANALCAL nos dá un valor idéntico para ΔH_u , mientras que $n = 0.95$. El valor de la constante de asociación, por las razones ya mencionadas, queda totalmente indeterminado obteniendo un intervalo de error grandísimo para el mismo. En el análisis se eliminó el dato de calor correspondiente a la primera inyección. En la Figura 2-15 se representan los datos experimentales corregidos y el ajuste obtenido del programa ANALCAL.

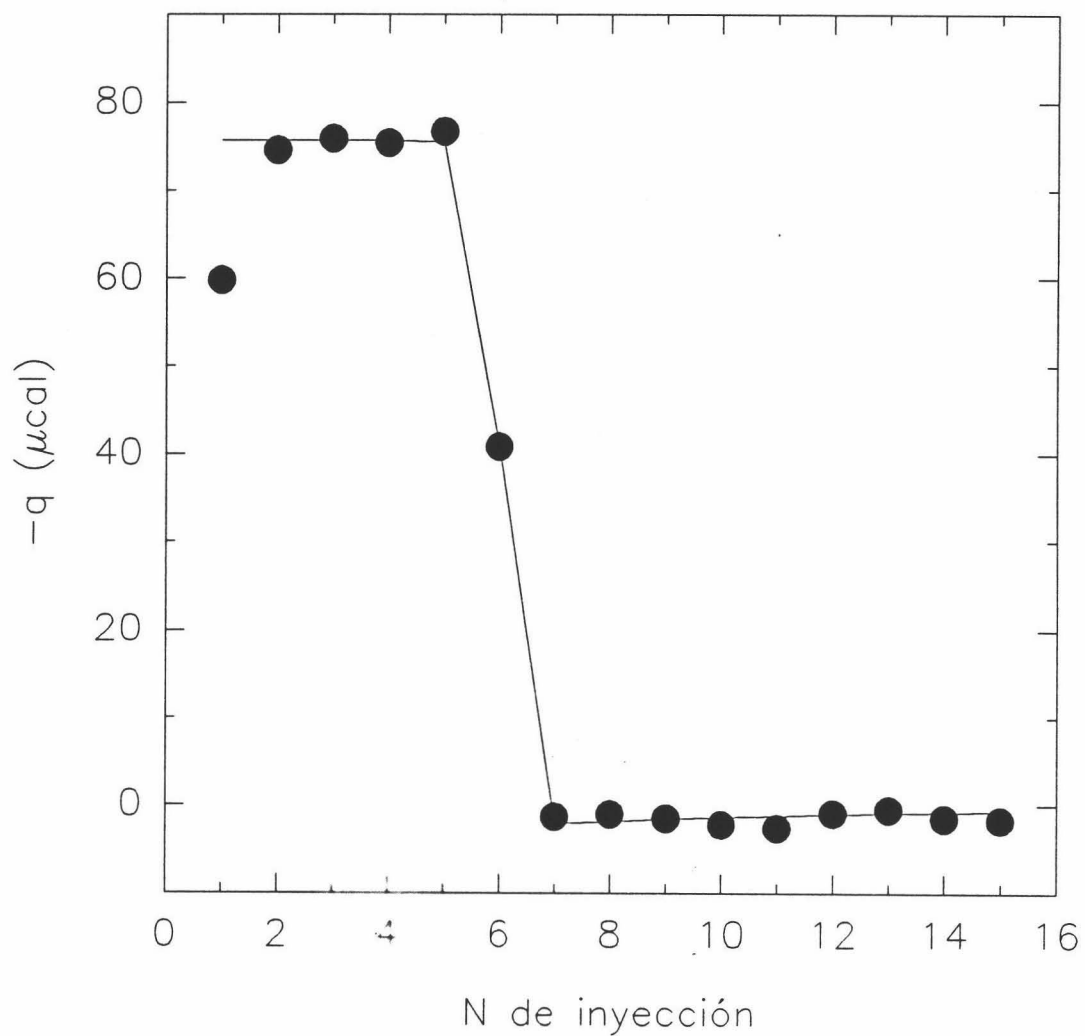


Figura 2-15: Calores corregidos (símbolos) del experimento de valoración calorimétrica de Barnasa con Barstar en CAPS 50mM pH 10.0 a 25°C. La línea representa el mejor ajuste de dichos datos al modelo de n sitios idénticos e independientes. La concentración de Barnasa en la jeringa fué de 0.47mM.

2.3.- TECNICAS ELECTROFORETICAS

Se denomina electroforesis al transporte de una partícula cargada (una proteína en nuestro caso) por la acción de un campo eléctrico. Si una partícula de carga q en un medio determinado se somete a la acción de un campo eléctrico, E , alcanzará una velocidad estacionaria v , determinada por el balance entre la fuerza que sobre la misma origina el campo, $E \cdot q$, y el rozamiento viscoso, $f \cdot v$, donde f es el coeficiente de rozamiento; es decir, $E \cdot q = f \cdot v$. La movilidad m se define como la velocidad por unidad de campo eléctrico:

$$m = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \quad (2.65)$$

Las técnicas de electroforesis son muy utilizadas debido a su capacidad de separar sustancias. Esta capacidad se debe al efecto de las diferencias en la carga y/o el coeficiente de rozamiento en la movilidad electroforética de cualquier molécula. Para la puesta en práctica de esta técnica es necesario disponer de una matriz tridimensional constituida por un gel de poliacrilamida, que evita la aparición de corrientes de convección en el movimiento de las macromoléculas contribuyendo a que el tamaño de las mismas sea un factor determinante en la separación, conjuntamente con la carga. La variable experimental que se obtiene es una movilidad relativa, m' , que se define como el cociente entre la distancia recorrida en el gel por la proteína y la distancia, siempre mayor, recorrida por una sustancia de bajo peso molecular que se utiliza como referencia.

2.3.1.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE LAURIL SULFATO SODICO (SDS)

El método más utilizado para este tipo de electroforesis es el de Laemmli (1970). La separación de las proteínas se realiza en función de su peso molecular sobre una matriz tridimensional constituida por un gel de poliacrilamida, resultante de la polimerización del monómero acrilamida $CH_2=CH-CO-NH_2$ y el entrecruzamiento de las cadenas por el monómero N,N' -metilén-bis-acrilamida (Bis)

$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$. La reacción de polimerización se inicia con la presencia de radicales libres y el sistema más comúnmente empleado para su producción es la pareja persulfato amónico y N,N,N',N'-tetrametiletiléndiamina (TEMED).

El lauril sulfato sódico (SDS), es un detergente que actúa desnaturalizando la proteína y formando una micela cargada negativamente alrededor de la proteína desnaturalizada. Cada agregado de proteína solubilizada por el SDS tiene idéntica carga por unidad de volumen (Reynolds & Tanford, 1970). Al someter a estas micelas a un campo eléctrico se desplazarán del polo negativo al positivo. En el desplazamiento hacia el polo positivo, la poliacrilamida actúa como un tamiz molecular separándose los complejos proteína-micela según su tamaño. Dado que las proteínas desnaturalizadas adquieren una estructura de varilla rígida, no son importantes los artefactos producidos por las formas no esféricas de las estructuras proteicas nativas.

En todos los casos se han seguido los principios de electroforesis discontinua ("disc electroforesis") de Ornstein (1964) y Davis (1964) según el cual, sobre el gel en que se realiza la separación (separador) se coloca otra pequeña capa de gel (apilador) de menor concentración de acrilamida, menor fuerza iónica y diferente pH. Las características del apilador hacen que, una vez iniciada la electroforesis, en las proximidades de la interfase con el separador se produzca un fenómeno de apilamiento de las proteínas en bandas muy concentradas y ordenadas según las diferentes movilidades. Este efecto simultáneo de concentración y ordenamiento aumenta la calidad de la separación en el gel separador (para más detalles sobre la técnica ver van Holde, 1985).

2.3.1.1.- Reactivos

- **Disolución A:** Acrilamida al 29.2% (p/v) y Bis-acrilamida al 0.8%. Esta disolución se filtra con papel de filtro, se guarda a 4°C y se puede utilizar durante un mes.

- **Disolución B:** Tampón del gel separador. TRIS 1.5M ajustado a pH 8.8 con

ácido clorhídrico concentrado. Se almacena a 4°C.

- **Disolución C:** Tampón del gel apilador. TRIS 0.5M ajustado a pH 6.8 con ácido clorhídrico concentrado. Se almacena a 4°C.

- **Disolución D:** SDS al 10%. Se puede almacenar a temperatura ambiente.

Nota: Las disoluciones **A**, **C** y **D** se desgasifican antes de preparar los geles separador y apilador.

- **Disolución E:** Persulfato amónico al 10% (p/v). Se prepara justo en el momento de su uso.

- **Disolución F:** Tampón de disolución de la muestra (pH 7.2): se compone de 1mL de disolución C, 0.8mL de glicerol, 1.6mL de disolución D, 0.4mL de 2-mercaptoetanol, 0.2mL de azul de bromofenol al 0.05% (p/v) y agua destilada hasta 8mL.

- **Disolución G:** Tampón de desarrollo (pH 8.3). Se compone de TRIS 0.125M, Glicina 1M y SDS al 0.5%. Diluimos 1 volúmen de esta disolución en 4 volúmenes de agua destilada para cada electroforesis.

- **Disolución para fijar las bandas de proteína en el gel:** está formada por un 40% de metanol y un 7% de ácido acético glacial en agua.

- **Disolución para teñir las bandas de proteína:** se compone de un 0.1% de Coomassie Brilliant Blue R, un 40% de metanol y un 7% de ácido acético glacial.

- **Disolución para destañir el gel:** para la destinción se utiliza la misma disolución fijadora.

- **Disolución para secar el gel:** sería metanol al 40% y glicerol al 10% en agua.

2.3.1.2.- Preparacion del gel

Se prepara el gel separador mezclando los volúmenes de las disoluciones anteriores que vienen especificados en la tabla 2-I:

TABLA 2-I
VOLUMENES EN mL DE LAS DISOLUCIONES PREPARADAS, NECESARIOS PARA HACER UN GEL SEPARADOR DE ACRILAMIDA A LOS PORCENTAJES INDICADOS EN UNA LANINA DE 1x160x120 mm.

% ACRILAMIDA	8%	10%	12.5%	15%
Disolución A	6.85	8.5	10.3	12.75
Disolución B	6.25	6.25	6.25	6.25
Disolución D	0.25	0.25	0.25	0.25
Agua Milli-Q	11.65	10	8.2	5.75
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01
APS 16%	0.125	0.125	0.125	0.125

En todos los casos hemos empleado la poliacrilamida en láminas (electroforesis en lámina). En ella, el gel se prepara entre dos placas de vidrio paralelas y separadas por dos espaciadores laterales de 1 mm de grosor. Ello supone algunas ventajas con respecto a los geles formados en tubos: en primer lugar, para un mismo número de muestras se consumen menos reactivos; además, como todas las muestras se desarrollan en el mismo gel, la comparación entre ellas es más fácil y precisa. El TEMED, que inicia la reacción de polimerización, se añade justo antes de introducir la disolución de acrilamida entre las placas en posición vertical. Las placas están herméticamente cerradas por tres de sus aristas formando una especie de "bolsa" donde dejamos caer la mezcla poco a poco con la ayuda de una pipeta Pasteur procurando que no se formen burbujas. Se llenan las placas hasta una altura de 10cm aproximadamente y se echa un poco de agua por encima para evitar que se forme un menisco en el frente del gel. Se necesitan unos 25mL de disolución.

Cuando ya ha gelificado el gel separador en las placas, terminamos de preparar el gel apilador. Para 10mL se mezclan 1.3mL de disolución A, 2.5mL de disolución C, 0.1mL de disolución D, 6.1mL de agua, 50 μ L de APS al 10% y 10 μ L

de TEMED. Se seca el agua que añadimos antes con papel de filtro y a continuación se echa esta disolución. Se coloca el peine y, rellenos todos los huecos, se deja gelificar.

2.3.1.3.- Preparación de las muestras de proteína

Tomamos un volumen de muestra de proteína que contenga entre 25-50 μg de ésta. Si la muestra está muy diluída (volumen mayor de 50 μL) se añade igual volumen de ácido tricloroacético al 10% para precipitarla y la centrifugamos en tubos EPPENDORF de 1.5mL de capacidad a 4°C y 15.000 rpm durante 15 minutos. Se desecha el sobrenadante. A las proteínas precipitadas se les añaden 10 μL de disolución de TRIS 2M para disolverlas y elevarles el pH. Se le añaden 50 μL de disolución E y se introducen en una estufa a 80°C durante 5 minutos.

2.3.1.4.- Aplicación y desarrollo de la muestra

Las placas de vidrio (una o dos por experimento) se colocan en el aparato de electroforesis con la cubeta inferior llena de tampón de desarrollo. Debemos evitar la formación de burbujas de aire entre el gel y el tampón de la cubeta ya que impiden el paso de la corriente eléctrica y, por tanto, la separación de las proteínas en bandas.

Las muestras, ya preparadas según se describe en 2.3.1.3, se ponen cada una en una calle de las formadas por el peine en el gel y se llena la cubeta superior de tampón hasta que haga contacto con las muestras y el gel. Se aplica una intensidad de corriente de 16mA por lámina (para láminas de 1x160x120 mm) mientras las muestras recorren el gel apilador y cuando el frente de azul de bromofenol alcanza la interfase del gel separador se aumenta la intensidad a 30mA por lámina. Se le aplica el campo eléctrico hasta que el frente de azul de bromofenol de referencia ha cruzado toda la lámina del gel.

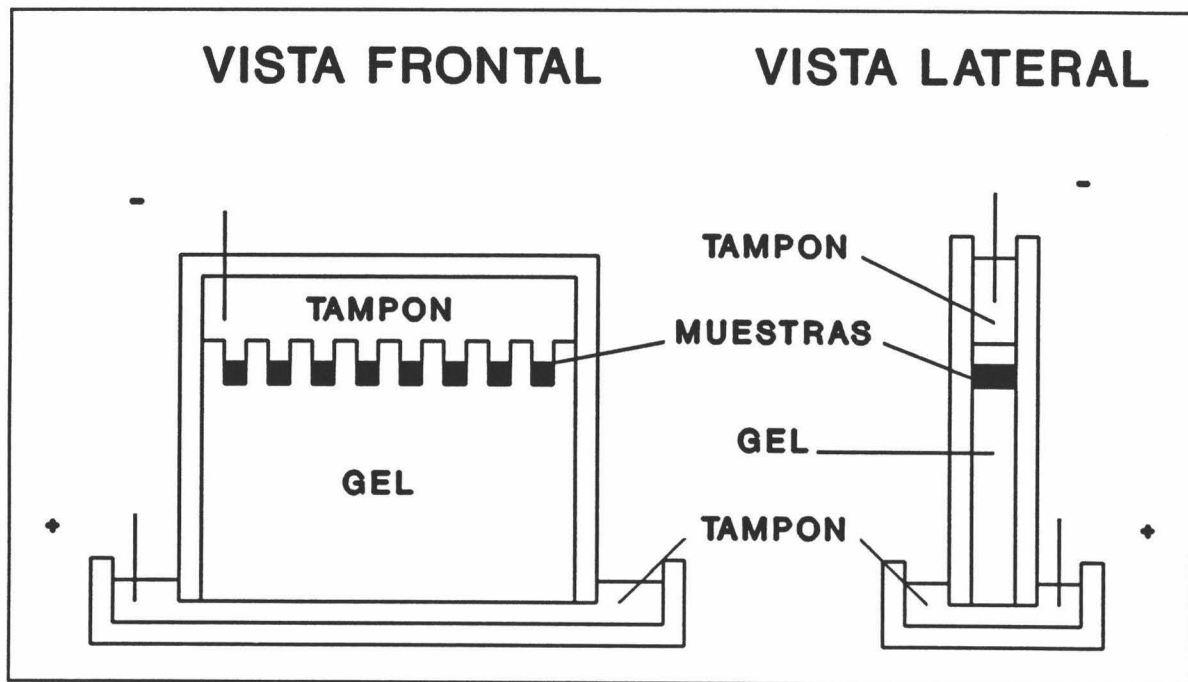


FIGURA 2-16: Vistas lateral y frontal de un montaje de electroforesis en lámina. El paso de corriente eléctrica a través de la lámina de gel desde el polo negativo (arriba) hacia el polo positivo (abajo) obliga a las proteínas a hacer su recorrido en este mismo sentido, separándose unas de otras según puedan penetrar mejor o peor en el entramado formado por el gel.

2.3.1.5.- Tinción de las bandas de proteína y destinción del gel

Retiradas las placas del aparato, se separa la lámina de gel y se introduce en la disolución para fijar el gel durante 30 minutos. A continuación se tiñen las bandas con la disolución de tinción durante 30 minutos. El Coomassie Brilliant Blue se fija a las proteínas coloreándolas de azul. El colorante penetra además en toda la estructura del gel, por lo que las bandas de proteína permanecen todavía indistinguibles. Por ello se lava el gel exhaustivamente con disolución para desteñir geles, renovándola varias veces hasta completa desaparición del color azul en la matriz, con la excepción de las bandas de proteína. Se seca la lámina con disolución para secar el gel durante 30 minutos y se envuelve en papel de celofán sobre una placa de cristal, dejando a temperatura ambiente durante varios días.

En los casos en los que interese reducir el tamaño de los geles, antes de

secarlos se introducen éstos en una disolución de etanol al 50% a 4°C durante 1-2 horas antes de secarlos.

Tinción cuantitativa

Para cuantificar cantidades de proteína sobre el gel de poliacrilamida es aconsejable utilizar la tinción con Procion Navy MX-R (Goodwin et al., 1977). El procedimiento a seguir es el siguiente: para la tinción se sumerge el gel en una disolución con 0.4g del colorante en 100mL de etanol y una vez disuelto éste añadiendo 20mL de ácido acético glacial y 80mL de agua. Se agita suavemente el gel hasta que el colorante penetre totalmente (de 1 a 2 horas). Después desteñimos el fondo con una disolución de etanol al 10% y ácido acético glacial al 10%, con continúa agitación y cambiando la disolución hasta que ésta no presente coloración. Esto puede durar más de un día. El gel se seca igual que en el otro caso.

2.3.2.- ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES (NATIVAS)

Una electroforesis en condiciones nativas se utiliza generalmente como una técnica complementaria que nos permite analizar los distintos estados conformacionales que puede tener una macromolécula en disolución. Este tipo de electroforesis es muy sensible a los cambios de carga, si bien el tratamiento cuantitativo de este aspecto es muy complicado, puesto que las interacciones entre la molécula cargada y el campo eléctrico externo son muy complejas y se debe tener en cuenta, además, la nube de contraiones que rodea la proteína. También ocurre algo parecido con las relaciones existentes entre el tamaño, forma y movilidad electroforética de cada especie cargada.

En cualquier caso, este tipo de electroforesis ha sido utilizado para hacer, incluso, tratamientos cuantitativos para resolver especies isómeras de una proteína (Mitchell, 1976), pudiendo calcular la cinética de este proceso en algunos casos concretos. En esta Memoria la hemos utilizado para comprobar e, incluso,

cuantificar las diferentes especies que puedan aparecer en la desnaturalización de las muestras, como veremos más adelante.

2.3.2.1.- Electroforesis nativas a pH 8.3

Reactivos

- **Disolución A:** Acrilamida al 28% (p/v) y bis-acrilamida al 0.74%. Esta disolución se filtra en papel de filtro, se desioniza pasándola a través de una resina AG 501-X8(D) (Bio-Rad) y se guarda a 4°C. La desionización es conveniente volver a hacerla también antes de preparar el gel. La disolución se conserva en buen estado durante un mes.

- **Disolución B:** Acrilamida al 10% (p/v). Podemos hacer las mismas consideraciones que en caso anterior, si bien, por formar parte del gel apilador, su desionización no es tan crítica.

- **Disolución C:** Tampón del gel separador: TRIS 3M y TEMED al 0.23% (v/v) a pH 8.9. Esta disolución se guarda a 4°C.

- **Disolución D:** Tampón del gel apilador: TRIS 0.5M y TEMED al 0.46% (v/v). Se guarda a 4°C.

- **Disolución E:** Sacarosa al 5% (p/v). Se guarda a 4°C y se puede usar mientras no se observe crecimiento bacteriano.

- **Disolución F:** Tampón de desarrollo: TRIS 5mM y Glicina 38mM a pH 8.3 a 25°C. Se guarda a 4°C.

- **Disolución G:** Tampón de disolución de la muestra: se mezclan 1mL del tampón del gel apilador, 1mL de glicerol y 1mL de agua conteniendo trazas de azul de bromofenol.

Procedimiento

Se prepara el gel separador mezclando las cantidades de cada disolución señaladas en la Tabla 2-II:

TABLA 2-II

Volúmenes en mL de las disoluciones preparadas, necesarios para hacer un gel a los diferentes porcentajes de acrilamida indicados en condiciones no desnaturizantes

% ACRILAMIDA	5%	8%	10%	15%	20%
Disolución A	2.15	3.43	4.29	6.44	8.6
Disolución C	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Disolución E	7.64	6.32	5.47	3.31	1.15
APS al 16%	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75

Estos volúmenes son para un volumen total de 10mL de gel separador de cada %. En el caso de necesitar más o menos volumen se utilizan las cantidades proporcionales. En todos los casos el persulfato amónico (APS) se añade al final. Se preparan los geles en láminas de las dimensiones antes mencionadas de 1x160x120 mm de la misma manera como describimos en el apartado 2.3.1.2 para los geles en SDS.

Para el gel apilador se mezclan 4mL de disolución B, 2mL de disolución D, 8mL de disolución E y 1mL de agua. En esta mezcla se disuelven 0.1g de bis-acrilamida sólida y después se añade 1mL de APS al 16%. Inmediatamente se vierte en las placas pues esta disolución gelifica muy rápidamente.

Para los geles así preparados se utilizan los mismos intervalos de intensidad de corriente que para los geles en condiciones desnaturizantes y los procesos de tinción y destinción son también los mismos.

2.3.2.2.- Electroforesis en urea 8M a pH 8.3

Este tipo de electroforesis es útil para estudiar estados conformacionales de proteínas en estado desnaturizado y se han realizado, simplemente, añadiendo urea en cantidad suficiente para tenerla en las disoluciones finales de los geles separador, apilador y tampón de la muestra en concentración 8M. La composición de dichas disoluciones es, por consiguiente, la misma que describimos en el

apartado anterior para la electroforesis nativa a pH 8.3.

Hay que tener la precaución de pasar la disolución de urea a través del intercambiador AG 501-X8(D) para desionizarla.

Las condiciones experimentales son las mismas que en los casos anteriores.

2.3.2.3.- Electroforesis nativas a pH 4.3

Esta electroforesis fué útil para poder hacer experimentos con muestras de Barnasa que, como su punto isoeléctrico está en 8.9, no tiene movilidad electroforética a pH 8.3 al no tener carga.

Reactivos

- **Disolución A: Tampón del gel separador:** ácido acético glacial al 17.2% (v/v), KOH 1N al 48% (v/v) y TEMED al 4% (v/v). El pH es de 4.3. Se guarda a 4°C.

- **Disolución B:** Acrilamida al 60% (p/v) y bis-acrilamida al 0.4% (p/v). Esta disolución se filtra en papel de filtro, se desioniza pasándola a través de la resina AG 501-X8(D) y se guarda a 4°C. La desionización es conveniente volver a hacerla también antes de preparar el gel. La disolución se conserva en buen estado durante un mes.

- **Disolución C: Tampón del gel apilador:** ácido acético glacial al 2.87% (v/v), KOH 1N al 48% (v/v) y TEMED al 0.46% (v/v). Se comprueba el pH que debe estar en 6.7 y se guarda a 4°C.

- **Disolución D:** Acrilamida al 10% (p/v) y bis-acrilamida al 2.5% (p/v). Se sigue el mismo tratamiento que para la disolución A si bien no es tan crítico tener la disolución desionizada.

- **Disolución E:** Persulfato amónico (APS) al 4.5%. Esta disolución se prepara en el momento de usar.

- **Disolución F: Tampón de desarrollo:** se compone de β -alanina al 31.2% y ácido acético glacial al 8%. Se comprueba el pH en 4.5 y se utiliza diluída al 10% en agua.

- **Disolución G: Tampón de disolución de la muestra:** se compone de 1 mL de disolución C, 1 mL de glicerol y 1 mL de agua.

Procedimiento

La composición del gel separador sería, para un 15% de acrilamida: 3 mL de disolución A, 6 mL de disolución B, 0.75 mL de disolución E y 14.25 mL de agua. Por su parte, el gel apilador se forma mezclando 2 mL de disolución C, 4 mL de disolución D, 3.55 mL de disolución E y 6.45 mL de agua. Por supuesto, la disolución E se añade al final, justo antes de montar el gel en las placas.

Para la preparación del gel procedemos igual que en los casos anteriores, si bien el tiempo de polimerización puede ser un poco mayor. Así mismo, a la hora de conectar la fuente de alimentación a la cubeta de electroforesis hay que cuidar de invertir la polaridad, pues en este caso las proteínas, de naturaleza básica, presentan una carga neta negativa al estar a un pH por debajo de su punto isoeléctrico y andarán hacia el ánodo.

Esta electroforesis es más difícil de seguir porque no se utiliza ninguna sustancia coloreada de bajo peso molecular para marcar el frente, sino que se hace manteniendo las intensidades de la fuente en 15 mA por gel desde el comienzo y dejando correr durante 6-8 horas, tiempo suficiente para que se complete la electroforesis.

El teñido y desteñido de los geles se hace igual que en los casos anteriores.

2.4.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA CONVENCIONAL DE EXCLUSION MOLECULAR

Las técnicas de cromatografía en columna son métodos basados en el hecho de que las proteínas pueden ser adsorbidas por un gran número de fases sólidas, por lo general de forma selectiva. Esto ha dado origen a diferentes tipos de cromatografía líquida según sea el mecanismo implicado en la adsorción, o más generalmente, en la separación.

Una de estas técnicas es la cromatografía de exclusión molecular que es una cromatografía de partición utilizada para separar moléculas de diferentes tamaños.

El principio básico es que las moléculas son repartidas entre el disolvente y una fase estacionaria de porosidad definida. El proceso de separación se consigue utilizando un gel poroso empaquetado en una columna (fase estacionaria) y rodeado de disolvente (fase móvil). Si consideramos una mezcla de moléculas de diferente tamaño, lo que ocurrirá es que las moléculas menores penetrarán en un mayor número de poros de la fase estacionaria y, por tanto, bajan más lentamente a través de la columna al tener un recorrido mayor; las moléculas mayores serán eluidas, por este motivo, las primeras de la columna.

Este tipo de cromatografía, por consiguiente, permite la separación de proteínas en función de su peso molecular, así como el intercambio de tampones en los que se encuentran disueltas, mediante el retardo en la elución de las sustancias de menor peso molecular (tampón en este caso) respecto de las mayores (proteínas). Además, como veremos, es muy útil para el estudio de los equilibrios de asociación de macromoléculas en los que esté involucrado un cambio apreciable del tamaño molecular. Un requisito fundamental en este sentido es que las diferentes especies a separar no interaccionen entre sí y si están en equilibrio que éste sea suficientemente lento en comparación con el tiempo de la separación cromatográfica o, en caso contrario, obtendremos un sólo pico ancho con un tiempo de retención intermedio entre el peso molecular de las especies en equilibrio.

Los experimentos de cromatografía de exclusión han sido realizados en esta Memoria con dos finalidades: por una parte, con fines preparativos para obtener una disolución de complejo Barnasa-Barstar en estequiometría 1:1 eliminando el posible exceso de cualquiera de las proteínas y, en un segundo orden de cosas, estudiar los posibles estados de asociación del Barstar en disolución a diferentes condiciones de pH. Los resultados obtenidos de estos últimos experimentos se mostrarán más detalladamente en Resultados y Discusión, si bien aquí describiremos todo lo relacionado con la técnica experimental y el calibrado de la columna.

2.4.1.- CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-75F

Como acabamos de comentar, para los experimentos de calorimetría diferencial de barrido realizados con el complejo Barnasa-Barstar utilizamos disoluciones con ambas proteínas en igual estequiometría. Como la afinidad que presentan es muy fuerte se planteó la posibilidad de separarlas mediante una técnica de cromatografía convencional, del exceso de alguna de ellas tal y como lo plantearon en su día Hartley y Smeaton (1973) en un estudio analítico realizado con este complejo de proteínas.

La columna utilizada presenta unas dimensiones de 0.6cm de diámetro por 150cm de largo (la separación es mejor en columnas con elevada relación longitud/diámetro) y se montó en cámara fría a 4°C. Para ello se dispuso un tubo de vidrio de esas dimensiones y la cantidad suficiente de gel y se dejaron termostatar en la habitación durante una noche. Antes del empaquetado, es conveniente desgasificar el gel para evitar la aparición de burbujas; éste debe fluir por la columna lo más homogéneamente posible y a una velocidad constante y se debe evitar la formación de "frentes" que impiden el buen funcionamiento de la columna.

Una vez finalizado el montaje, se procedió al equilibrado con una disolución de acetato amónico 1M a pH 8.2. Se pasaron de 3 a 5 volúmenes de columna (con unos 50mL de volumen) para completar el proceso. El flujo se mantuvo constante fijando la diferencia de altura entre el menisco del gel y el depósito de tampón. A la salida se adaptó un detector de absorbancia a 280nm, conectado a un registro gráfico, para monitorizar el perfil cromatográfico.

El calibrado se realizó con diversas muestras patrón de peso molecular conocido disueltas en el mismo tampón del equilibrado. Los patrones utilizados fueron: azul dextrano (2000 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ribonucleasa A (14 kDa) y rojo fenol (0.5 kDa). Las muestras de Barnasa-Barstar se aplicaron en un volumen no superior a 2mL (5% del volumen del lecho según recomendaciones de la casa comercial).

En la Figura 2-17 presentamos los cromatogramas de las sustancias patrón

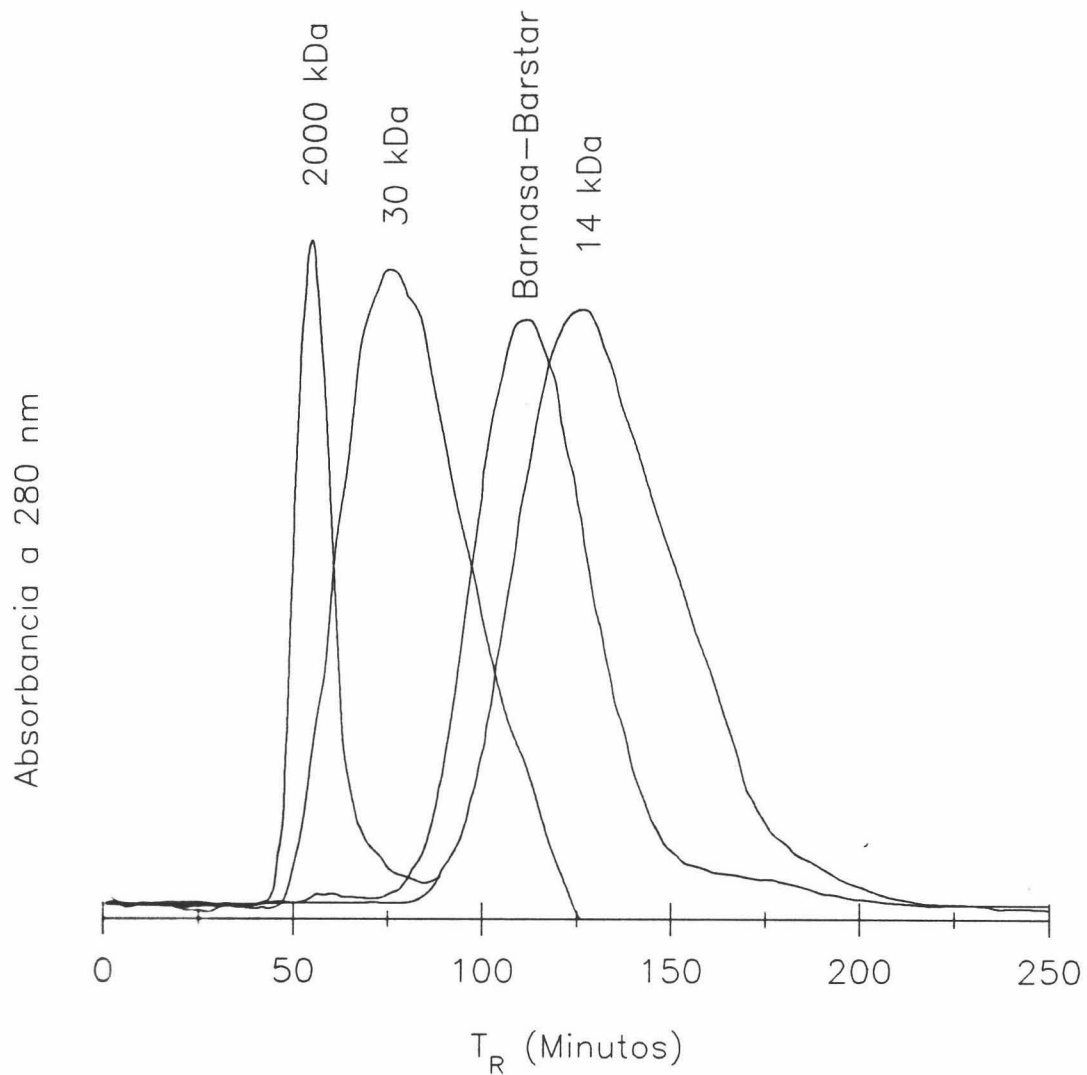


FIGURA 2-17: *Perfiles cromatográficos obtenidos en el calibrado de una columna de 0.6cm x 150cm de Sephadex G-75F con los patrones de peso molecular que se indican (línea continua). En trazo discontinuo se muestra un perfil típico para una elución de la mezcla Barnasa-Barstar.*

utilizadas y uno de los obtenidos para la elución de Barnasa-Barstar.

Este método permite la obtención de 2-3mg de complejo Barnasa-Barstar en condiciones estequiométricas, lo cual se comprobó por comparación de los tiempos de retención de las muestras eluidas en relación a los patrones con vimos en la

1 2 3 4 5

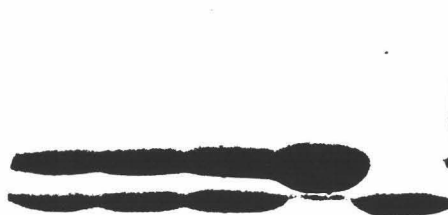


FIGURA 2-18: Electroforesis en condiciones desnaturizantes a pH 8.8 de muestras de complejo Barnasa-Barstar (calles 1,2,3) eluidas de la columna de Sephadex G-75F. Las calles 4 y 5 contienen ambas proteínas por separado. Las densitometrías realizadas a las tres primeras calles arrojan un porcentaje relativo del $50 \pm 10\%$ para cada banda.

Figura 2-17. Además, las electroforesis en condiciones desnaturizantes presentan dos bandas cuya densitometría arroja un porcentaje relativo para cada banda del $50 \pm 10\%$ (ver la Figura 2-18).

2.4.2.- CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-50F

Este tipo de gel se utilizó para los estudios de los posibles estados de agregación del Barstar en disolución a diferentes valores de pH. Al tener un grado fino permite una mejor resolución de picos, si bien el montaje es más complicado porque la tendencia a formar burbujas es mayor, sobre todo si incrementamos la temperatura de termostatación de la columna. Por consiguiente, el empaquetado se hizo a una temperatura de 60°C , bastante mayor que las de trabajo (25°C y

45°C). Se termostataron tanto la columna como el relleno por separado durante una noche y al día siguiente se procedió al llenado con el gel a esa misma temperatura. Una vez montada se disminuyó ésta a 37°C y se dejó equilibrándose dos días. Por último, se bajó la temperatura a 25°C para comenzar los experimentos. La columna tenía unas dimensiones de 1cm de diámetro por 40cm de largo.

El flujo se mantuvo constante en 0.7 mL/min manteniendo constante la presión de agua que ejercía el tampón sobre la resina. Los experimentos de calibración se realizaron en Glicina 20mM a pH 2.50. Se comprobó su reproducibilidad en el resto de condiciones de trabajo introduciendo alguno de los patrones y comparando su volúmen de elución en dichas condiciones con las de pH 2.50. Los patrones utilizados se muestran en la Tabla 2-III, junto con los resultados obtenidos en el calibrado, donde se exponen los pesos moleculares, PM y volúmenes de retención, V_R , obtenidos. V_0 es el volúmen de exclusión total, correspondiente al volúmen de retención del azul dextrano.

Tabla 2-III
Patrones de calibración para la columna de Sephadex G-50F

PATRON	PM (Da)	V_R (mL)	V_R/V_0	$\ln(\text{PM})$
Azul dextrano	$2 \cdot 10^6$	13.30	-	-
Ovoalbúmina	45000	18.20	1.37	10.71
Anhidrasa carbónica	29000	19.04	1.43	10.28
Inhibidor tripsina	20100	22.40	1.68	9.91
Lisozima	14300	24.50	1.84	9.57
Citocromo C	12400	24.92	1.87	9.42
Aprotinina	6500	27.30	2.05	8.78

La recta de calibración se obtuvo representando el $\ln(\text{PM})$ frente a V_R/V_0 y se muestra en la Figura 2-19. A partir de ella podemos determinar el peso

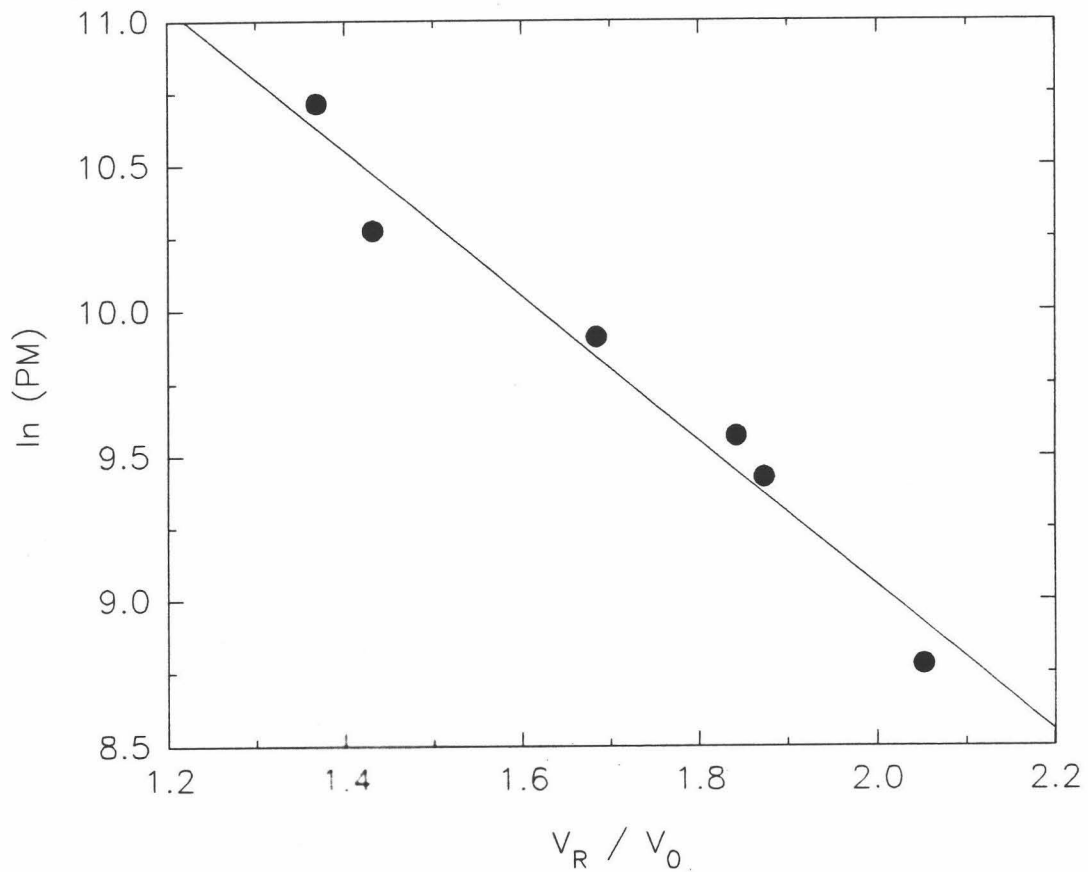


Figura 2-19: Recta de calibrado resultante de los perfiles cromatográficos obtenidos en el calibrado de la columna de Sephadex G-50F (0.5cm de diámetro x 40cm de largo) con los patrones de peso molecular indicados en la Tabla 2-III. La recta de regresión es: $Y = (14.04 \pm 0.43) - (2.5 \pm 0.2)X$.

molecular de las especies de Barstar en las distintas condiciones de trabajo.

La columna, una vez equilibrada en las condiciones elegidas en cada caso, se utilizó para eluir las muestras problema de Barstar pre-dializadas en el mismo tampón de equilibración. Se aplicaron en alícuotas de 0.1-0.5mL, obteniendo los perfiles de elución en el registro gráfico. Estos perfiles se digitalizaron y analizaron como se describirá en el capítulo de Resultados y Discusión.

2.5.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

Esta técnica se ha utilizado para cromatografiar muestras de Barstar y separar las diferentes especies que se forman en estado nativo y/o desnaturalizado. Se utilizó una columna de intercambio aniónico MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Esta columna se equilibró en tampón TRIS 20mM pH 8.3 y se efectuó un gradiente de cloruro sódico disponiendo de otra disolución de TRIS 20mM, NaCl 0.5M pH 8.3. Todo esto se realizó automáticamente gracias al control por computador de que dispone el aparato, también de la casa Pharmacia/LKB.

Los tampones se prepararon con agua Milli-Q, se filtraron (tras disolver sales y ajustar pH) por filtros Millipore de 0.45 μ m. Una vez filtrados se desgasificaron en una cubeta de ultrasonidos, sonicando durante, al menos, 15 minutos.

Las muestras a utilizar se centrifugaron durante 15 minutos en una centrífuga para tubos Eppendorf a 15000 rpm, después de haber sido dializadas en el mismo tampón de equilibrado de la columna.

El sistema de detección fué un detector contínuo de absorbancia UV-visible a 280 nm.

Todos los disolventes utilizados fueron de calidad HPLC.

2.6.- DETERMINACION DE COEFICIENTES DE EXTINCION

En el desarrollo experimental que exponemos en esta Memoria, un punto fundamental y que requiere una gran precisión de trabajo es la determinación de la concentración de las especies de proteína presentes. Generalmente, ésta se realiza por medida de la absorbancia a 280nm de la disolución de proteína en comparación con un "blanco" que suele ser el mismo tampón donde ésta va disuelta. Para esto es necesario conocer el coeficiente de extinción que es, sencillamente, la constante de proporcionalidad entre el valor de absorbancia medido y la concentración de muestra. Según la Ley de Beer esto se traduce en que:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (2.66)$$

donde **A** es la absorbancia, **b** es el ancho del paso de luz en cm y **c** la concentración en las unidades correspondientes. El coeficiente ϵ tiene unidades de cm^{-1} y la inversa de las unidades de concentración.

La medida de concentración de proteína por espectroscopía UV-visible es un método muy sensible. Puede ir afectado, tan sólo, de un error estándar del 1-3% si el coeficiente de extinción está bien determinado.

En bibliografía existen muchos métodos para la determinación del coeficiente de extinción de proteínas: por pesada en seco, determinación de nitrógeno (Johnson, 1941; Yeh, 1966), métodos espectroscópicos (Whitaker & Granum, 1980; Scopes, 1974) de muestras puras, o por técnicas colorimétricas como las de Bradford (1976) y Lowry (Lowry et al., 1951). Sin embargo, estos métodos son poco usuales porque, o bien se necesitan cantidades muy grandes de proteína, o bien existen elevados grados de error en sus resultados.

El método más generalmente utilizado es el de Gill y von Hippel (1989) basado en la información sobre la composición de aminoácidos de la proteína problema y los datos espectrales de ésta y de compuestos modelo medidos en disolventes "nativos" y desnaturalizantes (ver Tabla 2-IV).

Tabla 2-IV

Coeficientes de extinción molares de compuestos modelo en 6.0M de GuHCl (datos tomados de Edelhoch, 1967). Los coeficientes de extinción están en unidades de $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

COMPUESTO MODELO	$\epsilon(276\text{nm})$	$\epsilon(278)$	$\epsilon(279)$	$\epsilon(280)$	$\epsilon(282)$
N-acetil-L-triptofanamida	5400	5600	5660	5690	5600
Gly-L-Tyr-Gly	1450	1400	1345	1280	1200
Cistina	145	127	120	120	100

Para la determinación experimental, calculamos primeramente el coeficiente de extinción molar de la proteína desnaturalizada en GuHCl 6M a partir del número de restos de triptófano, tirosina y cisteína por molécula, utilizando los coeficientes de los compuestos modelo correspondientes dados en la Tabla 2-IV. Estos son los únicos restos que contribuyen significativamente a la densidad óptica medida de una proteína en el intervalo de 276-282 nm (Edelhoch, 1967). A partir de estos datos, el coeficiente de extinción de la proteína en GuHCl 6M será:

$$\epsilon_{M,GuHCl} = a \cdot \epsilon_{M,Tyr} + b \cdot \epsilon_{M,Trp} + c \cdot \epsilon_{M,Cys} \quad (2.67)$$

donde $\epsilon_{M,Tyr}$, $\epsilon_{M,Trp}$ y $\epsilon_{M,Cys}$ son los coeficientes de extinción molares de los restos de Tyr, Trp y Cys dados en la tabla 2-IV, y a, b y c son el número de cada resto por molécula de proteína.

Para determinar el coeficiente de extinción de la proteína nativa podemos utilizar la Ley de Beer enunciada en (2.66) tanto para la especie nativa como para la desnaturalizada. Si hacemos un espectro en ambas condiciones, con la misma concentración de proteína en ambos casos, $C_{NAT} = C_{GuHCl}$, con lo que:

$$\epsilon_{M,NAT} = \frac{(Abs_{NAT}) (\epsilon_{M,GuHCl})}{(Abs_{GuHCl})} \quad (2.68)$$

En definitiva, todo consiste en preparar dos diluciones de la misma muestra, una en tampón PIPES 50mM pH 7.0 (o en las condiciones nativas en que se desee determinar el coeficiente) y otra dilución igual en el mismo tampón pero con GuHCl para una concentración final del desnaturalizante 6M y tomar la medida de absorbancia a la longitud de onda elegida (generalmente 280nm o la del máximo de absorción de la proteína) en el intervalo 276-282nm.

Con este método, y en las condiciones descritas, se han obtenido los coeficientes de extinción para todas las proteínas naturales y mutantes que se han utilizado en los estudios de esta Memoria y se describen en la tabla 2-V.

La determinación del coeficiente de extinción para el complejo de proteínas Barnasa-Barstar en estequiometría 1:1 se realizó de una manera un tanto diferente:

tomamos cuatro cubetas de cuarzo iguales de 0.5cm de paso óptico y, en cada una, añadimos lo siguiente:

- C.1.: Tampón PIPES 50mM pH 7.0 (400 μ L)
- C.2.: Tampón (400 μ L) + Barnasa (10 μ L cada vez)
- C.3.: Barstar (400 μ L) + Tampón (10 μ L cada vez)
- C.4.: Barstar (400 μ L) + Barnasa (10 μ L cada vez)

De esta manera, la C.1. se utiliza como "blanco" experimental, la C.2. nos permite obtener el coeficiente de extinción de Barnasa, la C.3. el de Barstar y la C.4. el que debemos obtener para la disolución de ambas proteínas. Por consiguiente, si partimos de dos disoluciones una de Barnasa y otra de Barstar con concentración perfectamente conocida, podremos saber el coeficiente de extinción

Tabla 2-V

Coefficientes de extinción obtenidos a 280nm para las proteínas objeto de estudio en las secciones siguientes, en PIPES 50mM pH 7.0

PROTEINA	ϵ_{NAT} (cm ⁻¹ mg ⁻¹ mL)
Dominio SH3 de espectrina	2.26
Barnasa "salvaje"	2.21
Barnasa T16S	2.17
Barnasa K27A	2.21
Barnasa R87A	2.10
Barnasa H102A	2.09
Barstar "salvaje"	2.28
Barstar C40A	2.26
Barstar C82A	2.16
Barstar C40/82A	2.21
Barstar C40/82A-P48A	2.45
Barstar C40/82A-P48L	2.30
Che-Y	0.67

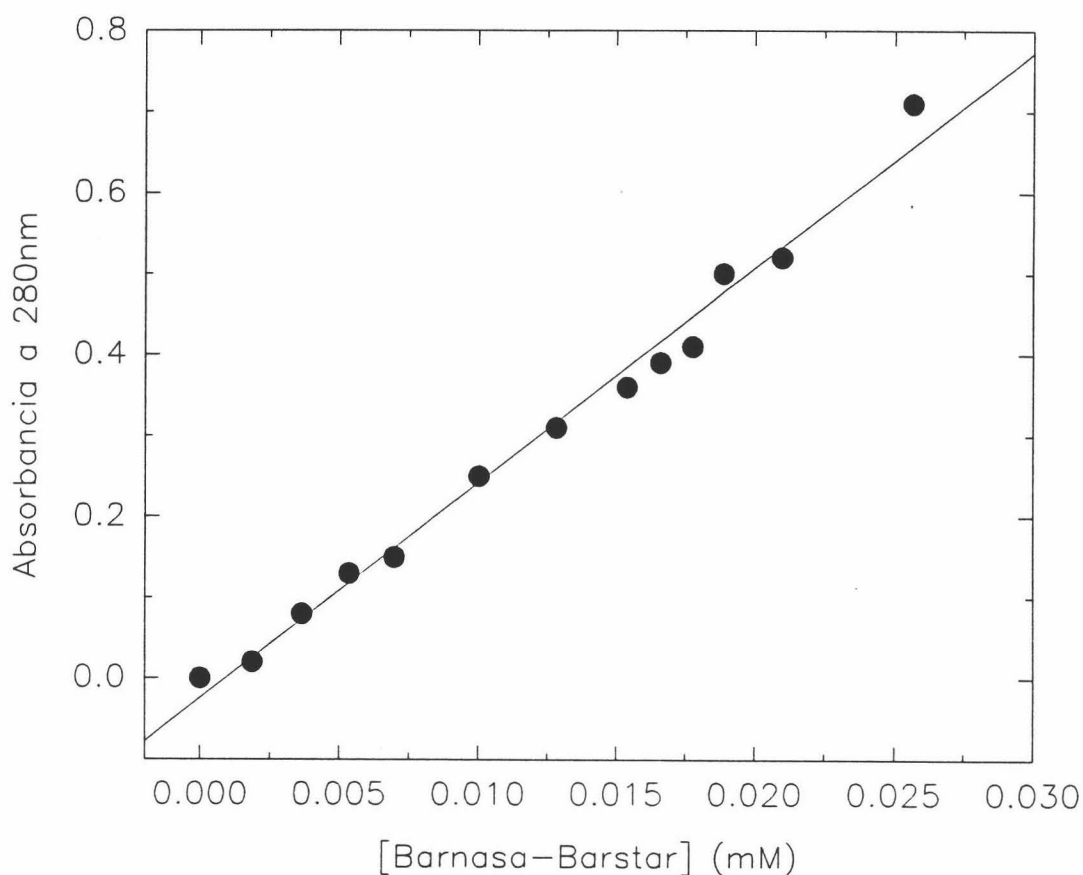


FIGURA 2-20: Representación gráfica de los valores de absorbancia obtenidos para el complejo Barnasa-Barstar en función de la concentración del mismo. De la pendiente podemos obtener el valor del coeficiente de extinción de la mezcla equimolar de ambas proteínas que resultó ser de $2.2 \pm 0.1 \text{ cm}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}$.

de una mezcla equimolar de ambas midiendo valores de absorbancia a 280nm después de cada adición y representando gráficamente este valor frente a la concentración de complejo en cada punto, teniendo en cuenta que el valor de absorbancia tendrá dos componentes, una debida a la absorción de luz del complejo formado y otra la del exceso de una de la proteínas monitorizada paralelamente en C.2. y/o C.3. La representación gráfica se observa en la Figura 2-20 y de su pendiente obtenemos el coeficiente de extinción molar, que transformado a unidades de mg/mL resultó ser de $2.2 \pm 0.1 \text{ cm}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}$ (el peso

molecular del complejo es de 22.6 kDa).

El método es bastante preciso como lo demuestran los valores obtenidos para el coeficiente de extinción de cada proteína por separado a partir de C.2. y C.3. que coinciden dentro de los límites de error, con los calculados por método de Gill y von Hippel. Hemos supuesto que toda la concentración de proteína añadida de la especie en menor concentración se encuentra formando complejo con la otra en exceso, lo cual no introduce demasiado error dado el valor tan pequeño que tiene la constante de disociación en esta unión, del orden de 10^{-13} M a 25°C (Hartley, 1993).

2.7.- MATERIAL FUNGIBLE Y OTROS APARATOS

2.7.1.- REACTIVOS

Fosfato monosódico, glicina, acetato sódico, cloruro sódico, hidróxido sódico, ácido clorhídrico, ácido acético glacial, urea, citrato sódico, hidróxido amónico, ácido fórmico, ácido nítrico, β -alanina, cacodilato sódico, β -glicerofosfato, bicarbonato sódico, hidróxido potásico, azida sódica, acetato amónico, rojo fenol, azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol, glicerol, metanol, etanol, persulfato amónico, sacarosa, TEMED, ácido tricloroacético fueron adquiridos a MERCK (calidad para análisis).

Los tampones de Good como: TRIS, HEPES, PIPES, CAPS, MES, etc. fueron de la casa SIGMA. También el Coomassie Brilliant Blue R, Procion Navy MX-R (Reactive Blue 4), imidazol, L-histidina.

El dodecil sulfato sódico (SDS) fué de FLUKA.

El cloruro de guanidinio (sequal grade) de PIERCE.

La acrilamida y el EDTA disódico de SERVA.

La bis-acrilamida de BOEHRINGER.

Los materiales cromatográficos como Sephadex G-50F y G-75F fueron adquiridos de PHARMACIA, así como la columna de HPLC MonoQ HR 5/5.

La resina para desionizar las disoluciones de urea y acrilamida, AG 501-

X8(D) era de BIO-RAD.

Se utilizaron membranas de diálisis de SPECTRAPOR (3.5kDa de "cut off") que se preparan calentandolas en agua Milli-Q tres veces hasta 80°C. Se guardan en disolución acuosa de azida sódica al 0.02%

El agua para la preparación de disoluciones fue de calidad Milli-Q (MILLIPORE). Todas las disoluciones se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 μ m. Para filtrar disoluciones de proteína se utilizaron microfiltros Millex-GV₁₃ de MILLIPORE de 0.22 μ m y para concentrarlas filtros de 3kDa de tamaño de poro de la casa AMICON.

Otros reactivos utilizados en este trabajo, de los que no se haya mencionado su origen, fueron siempre de la máxima calidad disponible en ese momento.

2.7.2.- MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras de Barnasa y Barstar, tanto "salvajes" como los diferentes mutantes empleados fueron suministradas por el laboratorio del Dr. Alan R. Fersht, de la Universidad de Cambridge (Inglaterra), en el ámbito del proyecto BRIDGE al que pertenecían ambos laboratorios.

Las proteínas Che-Y y el dominio SH3 de espectrina fueron clonados y purificados en el laboratorio del Dr. Luis Serrano en el Instituto Europeo de Biología Molecular (EMBL) de Heidelberg (Alemania).

El resto de proteínas utilizadas como patrón para el calibrado de aparatos, columnas y electroforesis fueron adquiridas comercialmente a SIGMA, PHARMACIA, BOEHRINGER o casas que los suministren con grados de pureza adecuados.

Los ácidos grasos para el calibrado de temperatura de los calorímetros diferenciales de barrido son de FLUKA.

2.7.3.- INSTRUMENTACION

Las medidas de concentración de las muestras de proteína se realizó indistintamente en un espectrofotómetro Cary 210 de la casa VARIANT o en un

espectrofotómetro Beckman DU-70, obteniéndose los espectros de las mismas entre 240-400nm. En éste último, se realizaron también las densitometrías de los geles de electroforesis cuando fue necesario.

Las cromatografías convencionales se monitorizaron a 280nm mediante un detector de absorbancia ultravioleta de casa PHARMACIA/LKB, modelo UV-1. Se utilizaron bombas peristálticas LKB 2132. El colector de fracciones fue el RediFrac de PHARMACIA/LKB. La termostatación de la columna de Sephadex G-50F se realizó mediante un baño termostático circulador LAUDA de Hucoa Erlöss.

El equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) era, como ya hemos señalado antes, de la casa PHARMACIA/LKB, es biocompatible y va equipado con dos bombas modelo 2248 con capacidad de flujo de hasta 10 mL/min, un mezclador de alta presión y un detector dual UV-visible de longitud de onda variable modelo VWM 2141. Todo el conjunto está controlado mediante un software de la casa PHARMACIA/LKB por un computador Tandon AT.

Para la obtención del agua ultrapura, tanto para HPLC como para la preparación de tampones, se utilizó un equipo de purificación Milli-Q Plus de MILLIPORE, alimentado con agua destilada.

Las medidas de pH se hicieron en pHmetros CRISON con electrodos de vidrio combinados INGOLD de diferentes tamaños, proporcionando una sensibilidad de ± 0.01 unidades de pH. Estos pHmetros se calibraron con tampones estándar de pH 7.02 y 4.00 a 25°C de la marca CRISON.

Para la centrifugación de pequeños volúmenes de muestra se utilizó una centrífuga para tubos Eppendorf HERAEUS CHRYST. Para volúmenes mayores se empleó un KOKUSAN H-251. Para concentrar las muestras con los tubos concentradores AMICON se empleó una P-SELECTA con capacidad para cuatro tubos.

El aparato de electroforesis utilizado fue el modelo Protean II de BIO-RAD, alimentado con una fuente de tensión constante de la casa ARROSU RADIO.



RESULTADOS
& DISCUSION



Dominio SH3 de α -espectrina

3.1.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS DE LA SH3

Cuando un factor de crecimiento se une a su receptor de la membrana celular, normalmente induce este último a dimerizarse y autofosforilar sus restos de tirosina con reacciones intermoleculares, que transfieren el grupo fosfato terminal del ATP al grupo hidroxilo de la cadena lateral de una tirosina de la proteína (Pawson & Bernstein, 1990; Ullrich & Schlessinger, 1990). En este estado de fosforilación el receptor activado se asocia físicamente con proteínas del citoplasma celular, que controlan rutas específicas de traducción de señales (Cantley et al., 1991; Koch et al., 1991). Estas proteínas poseen actividades enzimáticas muy distintas, pero tienen una característica común y es la presencia de dominios denominados "Src homology (SH) regions 2 y 3" (Koch et al., 1991).

La fosforilación de tirosinas puede ocurrir, y de hecho ocurre, en muchos sistemas celulares normales pero algunas proteínas quinasas específicas para restos de tirosina tienen su importancia porque, generalmente, están codificadas por oncogenes (cerca de un tercio de los oncogenes conocidos codifican tirosina quinasas). Estas proteínas, al autofosforilarse desencadenan la acción incontrolada de ciertas rutas metabólicas que transforman el conjunto celular.

Los dominios SH3 constan de unos 50 a 80 aminoácidos y están presentes desde en organismos unicelulares (donde no se han encontrado los SH2) hasta en vertebrados. Muy posiblemente, este hecho es debido a que podemos encontrar dominios SH3 en proteínas que no están funcionalmente relacionadas y cuya única propiedad en común es la de asociarse con la membrana plasmática por su parte interna. Su función no se ha esclarecido del todo actualmente, debido quizá a esta excesiva especialización evolutiva que ha contribuido a que se diversifiquen sus posibles funciones.

Se han identificado en una variedad de proteínas que unen actina y que comprenden o se asocian con el citoesqueleto celular como la α -espectrina (Wasenius et al., 1989; Sahr et al., 1990), miosina 1b, en la ABPLp implicada en el ensamblaje del citoesqueleto (Drubin et al., 1988; 1990) y en la cortactina, descubierta recientemente (Wu & Parsons, 1993).

Muchas proteínas con dominios SH3 parecen contribuir a la polarización celular durante el proceso de división (Drubin et al., 1988; 1990; Chant et al., 1991; Chenevert et al., 1992). Por otra parte, en su interacción con factores de crecimiento, algunas estructuras tienen como únicas partes en común sus dominios SH2 y SH3 que parecen, por tanto, mediar en estas asociaciones (Bar-Sagi et al., 1993).

Un caso bastante sorprendente es el de las proteínas denominadas "adaptadores" (Koch et al., 1991); la proteína Sem5 del nematodo *C. elegans* (Clark et al., 1992) y su homóloga en vertebrados Grb2 (Lowenstein et al., 1993): están constituidas exclusivamente de dominios SH2 y SH3. La fosforilación de tirosinas induce la unión del SH2 a la fosfoproteína. Por otro lado, los dominios SH3 se consideran como mediadores en la asociación con el citoesqueleto y la membrana celular (Koch et al., 1991; Rodaway et al., 1989). Koch et al. (1991) proponen que estas proteínas sirven como adaptadores que facilitan la asociación de componentes catalíticos de algunas "signaling pathways" con sus sustratos o para retener estos componentes en su ubicación celular correcta. Clark et al. (1992) sugieren que la Sem5 es necesaria como proteína "señal" entre tirosina quinasa y proteínas Ras, pareciendo estar involucrada en procesos de maduración sexual.

Estudios más recientes realizados por Baltimore y colaboradores (Cichetti et al., 1992; Ren et al., 1993) con la tirosina quinasa procedente del oncogén c-abl, que contiene una region SH3, ponen de manifiesto que en esta proteína el dominio no actúa como un lugar de anclaje al citoesqueleto ya que el abl-SH3 no se une a la F-actina pero, en cambio, han identificado una proteína llamada 3BP-1 que se une claramente con él. En el trabajo más reciente (Ren et al., 1993) se ha logrado,

incluso, identificar una secuencia de diez aminoácidos muy rica en restos de Pro: APPTPPPLP a la que se une el dominio abl-SH3 directamente. Paralelamente, estos mismos autores han identificado otra proteína, la 3BP-2, que no está relacionada funcionalmente con la anterior, pero que también contiene una secuencia rica en Pro. Estos descubrimientos han permitido la identificación de nuevas interacciones con regiones ricas en Pro por parte de otros dominios SH3. (Liu et al., 1993; Buday & Downward, 1993; Chardin et al., 1993; Egan et al., 1993; Gale et al., 1993; Li et al., 1993; Olivier et al., 1993; Rozakis-Adcock et al., 1993; Simon et al., 1993; etc).

3.1.1.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES CON DOMINIOS SH3

Ha sido muy recientemente cuando han comenzado a publicarse las estructuras tridimensionales de algunos miembros de la familia SH3, entre ellas la de α -espectrina, resueltas tanto por cristalografía de rayos X como por RMN en disolución. Todas se caracterizan por tener el mismo patrón de plegamiento consistente en un empaquetamiento formado por cinco o seis cadenas β antiparalelas, de forma globular (con un diámetro aproximado de 30 Å) con sus extremos N- y C-terminales próximos en el espacio. Para abordar su estudio vamos a centrarnos principalmente en la descripción estructural de una de ellas, la α -espectrina (objetivo experimental de esta Memoria) para después compararla con el resto de estructuras conocidas hasta la fecha.

La espectrina es el constituyente mayoritario del citoesqueleto que sostiene la membrana plasmática (tenemos revisiones en Marchesi, 1985 y en Speicher, 1986). Es un heterodímero compuesto de estructuras α y β dispuestas cara a cara de forma antiparalela. Ambas subunidades consisten principalmente en secuencias homólogas repetidas, unas 20 en cada una. Aparte, en la α -espectrina existe una incursión de unos 60 aminoácidos que es, en realidad, un dominio SH3 (Sahr et al., 1990; Wasenius et al., 1989). El SH3 podría servir a la proteína como anclaje en el citoesqueleto, según lo dicho anteriormente.

La estructura secundaria del dominio SH3 de α -espectrina podemos verla en

la Figura 3-1. Tal y como la describen Musachio et al. (1992b) está formada de cinco cadenas β antiparalelas con un largo "loop" de 19 restos que interconecta las dos primeras cadenas. Todo el conjunto se presenta como una estructura empaquetada con dos láminas β dispuestas ortogonalmente entre sí, donde cada lámina consta de tres cadenas, una de ellas compartida pues comienza en una de las láminas y termina en la otra. Si denominamos cada cadena como a, b, c, d, e, una lámina estaría formada por b-a-e y la segunda por b-c-d. El "loop" que conecta las cadenas a y b forma una estructura a modo de horquilla y carece de interacciones por puentes de hidrógeno. La conexión entre las cadenas d y e se hace por medio de una vuelta de hélice 3_{10} que se inicia con la Pro54, resto bastante conservado en las distintas secuencias de SH3. Entre las cadenas c y d existe una vuelta muy ajustada; los restos 46 y 49 forman un puente de hidrógeno con átomos de la cadena principal.

Los mismos autores apuntan que los restos conservados en la secuencia están cercanos entre sí en la estructura espacial y forman una suave hendidura en la superficie, con la única excepción del Trp42 que se encuentra en una cavidad hidrofóbica en el interior de la molécula. La superficie en cuestión es rica en aminoácidos aromáticos como Tyr13, Tyr15, Trp41, Phe42 y Tyr57. Tiene también tres grupos carboxílicos ácidos: Asp14, Glu22 y Asp29. El Glu22 forma un puente de hidrógeno con el -OH fenólico de la Tyr15. Los restos Gly28 y 51 así como Pro54 están también localizados en la superficie.

Esta superficie es muy posiblemente un lugar de unión para una molécula grande, otra proteína, ya que es rica en aminoácidos aromáticos que se encuentran involucrados muy a menudo en interacciones proteína-proteína (Argos, 1988). Los aminoácidos no se conservan siempre en todas las secuencias comparadas, lo que podría indicar que los dominios SH3 reconocen secuencias parecidas, pero no completamente idénticas. Esto conlleva una cierta especialización del dominio en cada estructura en particular como ya lo han apuntado Ren et al. (1993).



FIGURA 3-1: Estructura terciaria del SPC-SH3. (Tomado de Kuriyan & Cowburn, 1993).

Se han estudiado las estructuras de otros dominios SH3 aparte del de α -espectrina. Así, disponemos de la del Src-SH3 por RMN (Yu et al., 1992), Fyn-SH3 (Noble et al., 1993), PLC γ -SH3 (Kohda et al., 1993), PI3K-SH3 (Koyama et al., 1993a,b; Booker et al., 1993) y muy probablemente habrán aparecido otros estudios de este tipo con SH3 de otras fuentes hasta el día de hoy, dada su enorme importancia biológica. Hay que destacar que los dominios SH3 presentan más homologías entre sí a nivel de estructura espacial que a nivel de secuencia. Así, por ejemplo, entre el Src-SH3 y el Fyn-SH3 la identidad de secuencia es un 77% pero, en cambio, el de espectrina sólo se compara en un 33% con el segundo y en un 18% con el PI3K-SH3. Todo esto podemos verlo mejor en la Figura 3-1 donde hemos recogido un alineamiento de secuencias de dominios SH3 de distinta procedencia.

En cuanto a organización espacial, todos los dominios SH3 estudiados tienen la misma topología, tal y como podemos ver en la Figura 3-3 donde hemos puesto varios de ellos, obtenidos de algunas de las fuentes mencionadas en el párrafo anterior.

En el caso del Fyn-SH3, estudiado en el mismo laboratorio que su homónimo de espectrina, la superposición de los carbonos α de ambas estructuras tiene un valor de 1.1 Å para el r.m.s. (root mean square deviation). El PLC γ -SH3 también se compara bastante bien con nuestra referencia pues sus estructuras secundarias sólo se diferencian en que en el SH3 de espectrina teníamos una región desordenada de 19 aminoácidos que une las dos primeras cadenas β y que en este caso se ha organizado en una cadena β adicional como en PI3K y Src (Kohda et al., 1993; Figura 3-2). Es notable el hecho de que, si bien existen algunas diferencias estructurales, la gran mayoría de aminoácidos conservados en la secuencia se encuentran en las cadenas β y en la hélice 3_{10} del extremo C-terminal conservadas en todos los dominios, lo que nos confirma la idea de que es muy probable que las regiones no conservadas confieran la especificidad para el sustrato a cada dominio en concreto.

H PI3K	MSAEGYQYRALYDYKKEREEDIDLHLGDILTVNKGSLVALGFSQGAEARPEEIGWLNQYNETTGERGDFPGTYVEYIGRKKISPP	EGDWWLAHSLTTGQTGYIPSNYVAPSDSIQ
C csrC	GGVTTFVALYDYESRTETDLDFKKGRLQIVNNT	NKDWKVEV NDRQGFVPAAYVKKLD
C specA	DETGKELVLALYDYQEKSPREVTMKKGDIILLNST	
B PI3Kb	MSAEGYQYRALYDFRRERPEDELLPGDVLVSRALQALGVAEGNERCPQSVGMPGLNERTQRGDFPGTYVEFLGPVALARP	
B PI3Ka	YRALYDYKKEREEDIDLHLGDILTVNKGSLVALGFSQGAEARPEEIGWLNQYNETTGERGDFPGTYVEYIGRKKISPP	
V src	TFVALYDYESWIEEDLSFKKGERLQIVNNT	EGNWWLAHSLVTTGQTGYIPSNYVAPSDSIQ
C nsrC	GGVTTFVALYDYESRTETDLDFKKGRLQIVNNT	EGDWWLAHSLTTGQTGYIPSNYVAPSDSIQ
H yes	IFVALYDYEARTTEDLSFKKGERFQIINNT	EGDWWEARSIATGKNGYIPSNYVAPADSISQ
H fgr	FIALYDYEARTEDDLTFTKGEKPHILNNT	EGDWWEARSLSSGKTCIPSNYVAPVDSISQ
H spec	RVMALYDFQARSPREVTMKKGDLVLLSSI	NKDWKVEA ADHQGIVPAVYVRRLAHDEF
Ac myoB	PAKQVQKÄLYDYDAQTGDELTFKEGDTIIVHQKD	PAGWEGELN KGRGWPANYVQDI
H fyn	LFVALYDYEARTEDDLDFKKGKQILNSS	EGDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSISQ
H hck	IVVALYDYEATHHEDLSFKKGDMVLEES	GEWWKARSLATRKEGYIPSNYVAPVDSLET
H lsk	LVIALHSYEPSHOGLDFEKEGQRLTLEQS	GEWWKAQSLTTQEGFIPFNFVAKANSLP
V abl	LFVALYDFVAGDNTLSITKGEKRLVLYGNH	NGEWCEAQTKN GQ GWVPSNYITPVNSLEK
H nck1	EVVVVAKFDYVAQQEQELDIKQNERLWLLDSDKS	WWRVRSNIN KTGFVPSNYVERKNSAR
H PLC	VKALYDYKAKRSDELDFRGALIHVSKE	PGGWWKGDYGTIRIQ YFPSNYVEDIATAF
H PLCg	AVKALFDYKAQREDELTFIKSATIQNVEKQ	EGGWRGDYGGKQQL WFPSNYVEEMNPV
H nck2	PAYVKFNMAEREDELSLIKGTIVMEKCS	DQWNRGSYN GQVGNFPSNYVTEEGDSP
H GRB2N	MEAIKAYDFKATADELSFKRGDILKVLNEEC	DQWNYKAEIN KGDGFIPKNIEMKHPW
Ce Sem5N	MEAVAEHDFQAGSPDELSFKRGNTLKVLNKDE	DPHYKAEID GNEGFIPSNYIRMTECNW
H vav	TAKARYDFCARDRELSESLKEGDIKILNKK	GQGWNRGEIY GRVGNFPANYVEEDYSEY
H GRB2C	TYVQALFDFDPEDEGELGFRRGDFIHMDS	DPWIKGACH GQTMFPRNYVTPVNRV
Ce Sem5C	KFVQALFDFNPQESGELAFKRGDVTILNKD	DPWIKGQLNRR GIFPSNYVCPYNSNK
H nck3	HVVQALYPFSSNDEELNFEKGDVMDVIEKPEN	DPEWIKCRKIN GWGLVPKNYVTVMKNP
H ncf1	ISYRAIADYEKTSSEMALSTGDVVEVEKS	ESGWIFCQMKAKR. GWIPASFLEPLDSD
RasGAP	RVRAILPYTKVPTDEISFLKGMFIVHNE	LEDGWWVTLNRTDEQGLIVEDLVEEVGREE

FIGURA 3-2: Alineamientos de secuencias para varios dominios SH3. El alineamiento se ha basado tanto en semejanzas estructurales como puramente de secuencia. Los puntos indican las posiciones de los restos que se afectan en la unión del ligando. Las abreviaciones para cada proteína se refieren a sus especies de origen: H, humano; B bovino; C, pollo; V, virus; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Ac, *Acanthamoeba*. (Tomado de Koyama et al., 1993).

Existe un trabajo muy reciente (Yu et al., 1994) donde los autores han conseguido resolver por técnicas multidimensionales de RMN la estructura del PI3K-SH3 junto con un ligando construido a partir de la secuencia RKLPPRPSK que llaman RLP-1. El ligando fue construido siguiendo el mismo método que Ren et al. (1993) basado en el estudio de librerías de péptidos. Es oportuno aclarar que hasta la fecha, parece ser que los péptidos ricos en Pro son ligandos de baja afinidad para los dominios SH3 y, en todo caso, son los únicos motivos identificados que presentan una afinidad por ellos. Las constantes de unión están, en el mejor de los casos, en el orden de 10^{-4} M.

El ligando RLP-1 adopta en el complejo una conformación extendida con todas sus Pro en configuración trans. La parte central de la secuencia forma una hélice levógira de poliprolina tipo II (PPII).

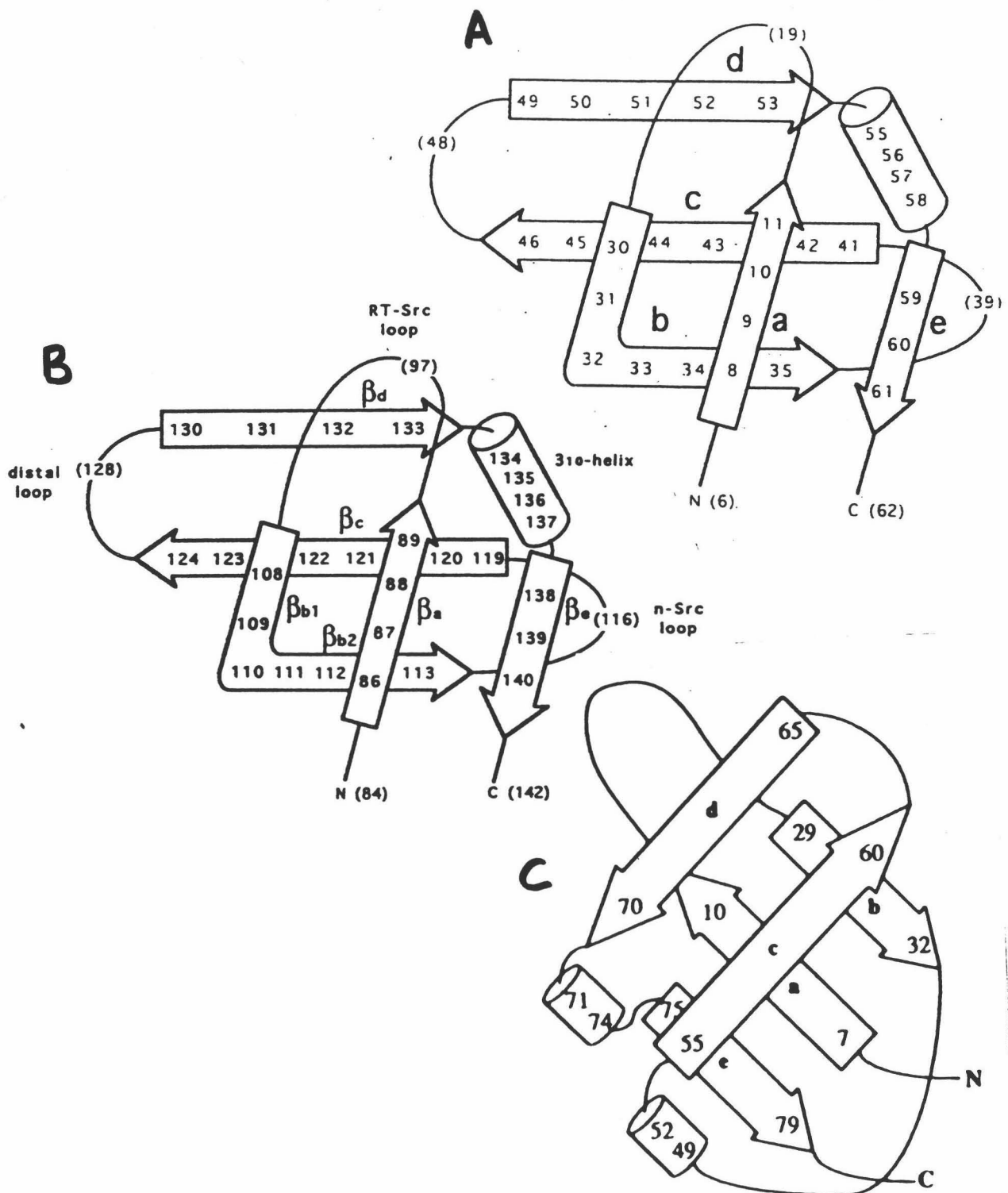


FIGURA 3-3: Diagramas topológicos de las estructuras secundarias de varios dominios SH3: a) α -espectrina (tomado de Musacchio et al., 1992b), b) Fyn (tomado de Noble et al., 1993), c) subunidad p85 α de PI3K (tomado de Kuriyan & Cowburn, 1993). En este tipo de diagramas las estructuras β se representan por flechas y las hélices por cilindros.

De todo lo expuesto se deriva la importancia del estudio de los dominios SH3, tanto a nivel funcional por estar implicados, por ejemplo, en procesos celulares relacionados con el cáncer, como a nivel estructural y energético, para lo que son unos modelos muy apropiados por su pequeño tamaño ya que son sistemas de bajo peso molecular (menos de 10 kDa), lo que es muy deseable al no tener una excesiva complejidad estructural. Esto es muy conveniente, en particular, en calorimetría diferencial de barrido para evitar problemas tales como agregaciones y otros efectos no deseados que conduzcan a la irreversibilidad en el proceso de desnaturalización. Además, no se han descrito intermediarios de desplegamiento con sistemas moleculares tan pequeños y esto permite aplicar modelos sencillos que aportan mucha más información sobre el proceso y ayudan al avance de la técnica de CDB porque podemos comprobar experimentalmente los avances teóricos aplicándolos a este tipo de sistemas tan sencillos. Destaca también, como hemos apuntado antes, que todos presentan el mismo patrón estructural de plegamiento, con lo que podemos estudiar cómo influye la secuencia de aminoácidos (mucho más variable en cada SH3) en el proceso de desnaturalización. Nótese que hasta la fecha no existe ningún trabajo en la bibliografía que trate sobre la desnaturalización térmica de estos dominios y, en general, muy pocos estudios termodinámicos con proteínas que consten casi exclusivamente de estructura β .

En esta Memoria se ha abordado el estudio de la desnaturalización por CDB del dominio SH3 de espectrina. Este estudio no es sino el comienzo de una línea de investigación más amplia para realizar un estudio termodinámico más completo de la desnaturalización de los dominios procedentes de otras fuentes como Fyn, Abl, etc así como de su interacción con péptidos que podrían formar parte de sus ligandos naturales, según hemos apuntado. En nuestro contexto se ha tomado como una estructura modelo sobre la que podemos comprobar algunos aspectos teóricos importantes desarrollados en CDB, así como ilustrar un ejemplo de aplicación del modelo de dos estados.

3.2.- EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO CON EL DOMINIO SH3 DE ESPECTRINA (SPC-SH3)

Los experimentos de CDB se realizaron en un DASM-4 (Privalov & Potekhin, 1986) a velocidades de barrido de 0.5, 1 y 2 K/min. Se mantuvo la fuerza iónica en 10mM de Glicina/HCl (pH 2.0-3.5) o Acetato sódico/HCl (pH 4.0) en el intervalo de pH 2.0-4.0. La solubilidad de la proteína decrece a partir de pH 4 quizá por la valoración de los restos Glu22, Asp14 y Asp29 que están en la superficie (Musacchio et al., 1992b) y no es soluble ni incluso por encima de pH 10 a concentraciones mayores de 1 mg/mL. De hecho, entre pH 2.0 y 3.5, la desnaturalización térmica del fragmento SH3 es prácticamente reversible en un 100%, ya que el primer y segundo barridos de temperatura de la muestra en el calorímetro son prácticamente iguales, pero a pH 3.5 y 4.0 el grado de reversibilidad disminuye hasta un 70%, debido a su mayor tendencia a agregarse (Figura 3-4). Hay que destacar que este grado de reversibilidad es lo suficientemente elevado como para poder considerar que el proceso de desnaturalización ocurre en equilibrio, más aún cuando en el primer barrido se calentó hasta 100°C (muy por encima de la transición de desnaturalización de la proteína). Además, los experimentos realizados a diferentes velocidades de barrido tampoco presentan ningún efecto en las trazas.

Debido al pequeño tamaño de la cadena polipeptídica (aproximadamente 60 aminoácidos y 7150 Daltons de peso molecular) y, como consecuencia, al bajo valor de la entalpía de desnaturalización (tenemos un ejemplo en la Figura 3-5), las curvas de desnaturalización térmica que se obtienen son pequeñas y anchas lo que complica el cálculo de los parámetros termodinámicos. Así, para facilitar y mejorar el análisis de datos necesitamos trabajar con concentraciones relativamente elevadas de proteína (hasta 5 mg/mL); de ahí que tampoco fuera posible extender el estudio por encima de pH 4.0.

También se hicieron experimentos a diferentes concentraciones de muestra, entre 1 y 5 mg/mL y en ellos no parece apreciarse ningún efecto de este parámetro. Podemos descartar, por tanto, la presencia de procesos de asociación-

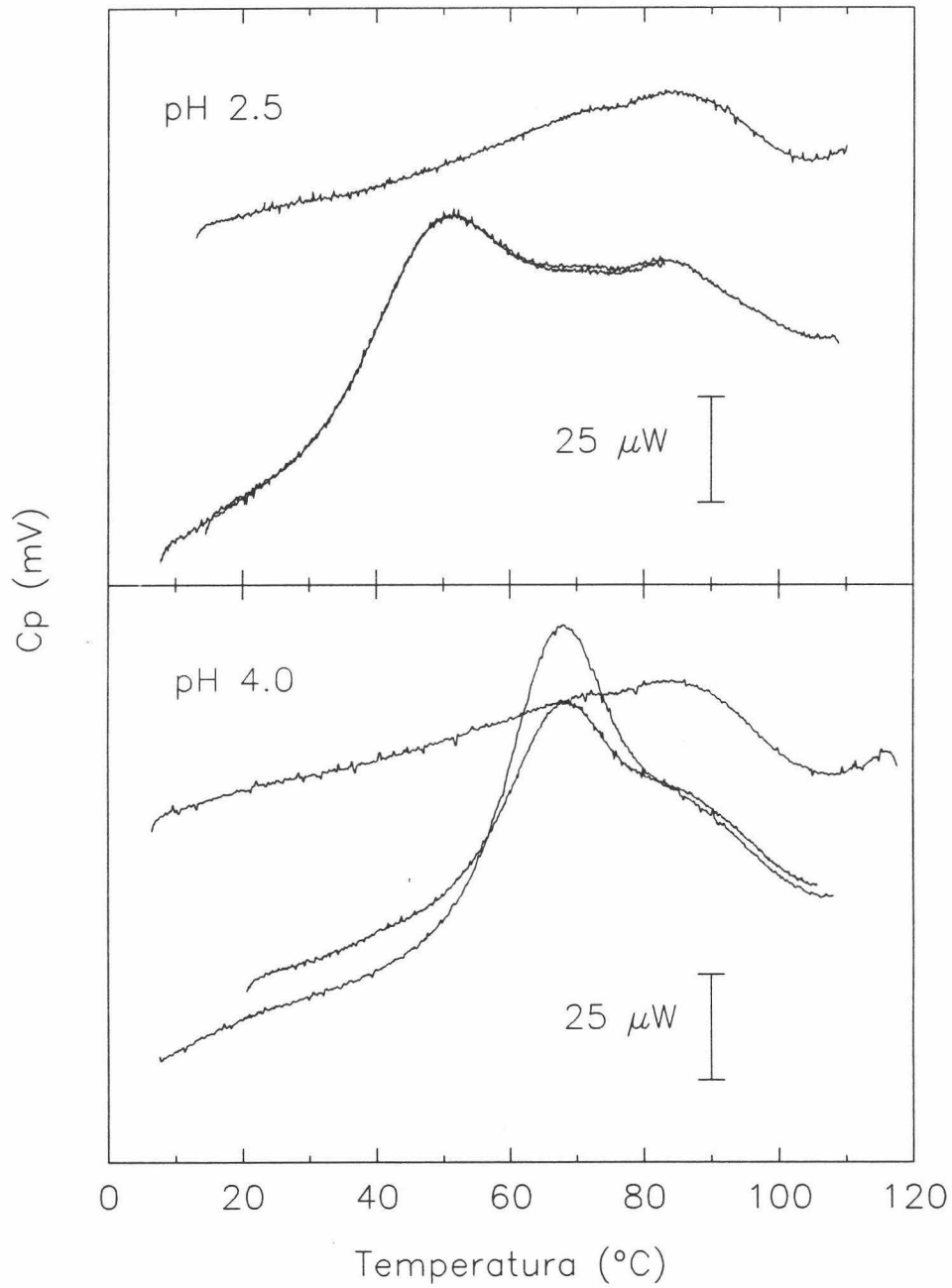


FIGURA 3-4: Datos experimentales de calorimetría diferencial de barrido del SPC-SH3 a pH 2.5 (ilustración superior) y a pH 4.0 (ilustración inferior). Se han representado la línea base instrumental y dos barridos consecutivos con la misma muestra; en el caso de pH 2.5 éstos son prácticamente indistinguibles.

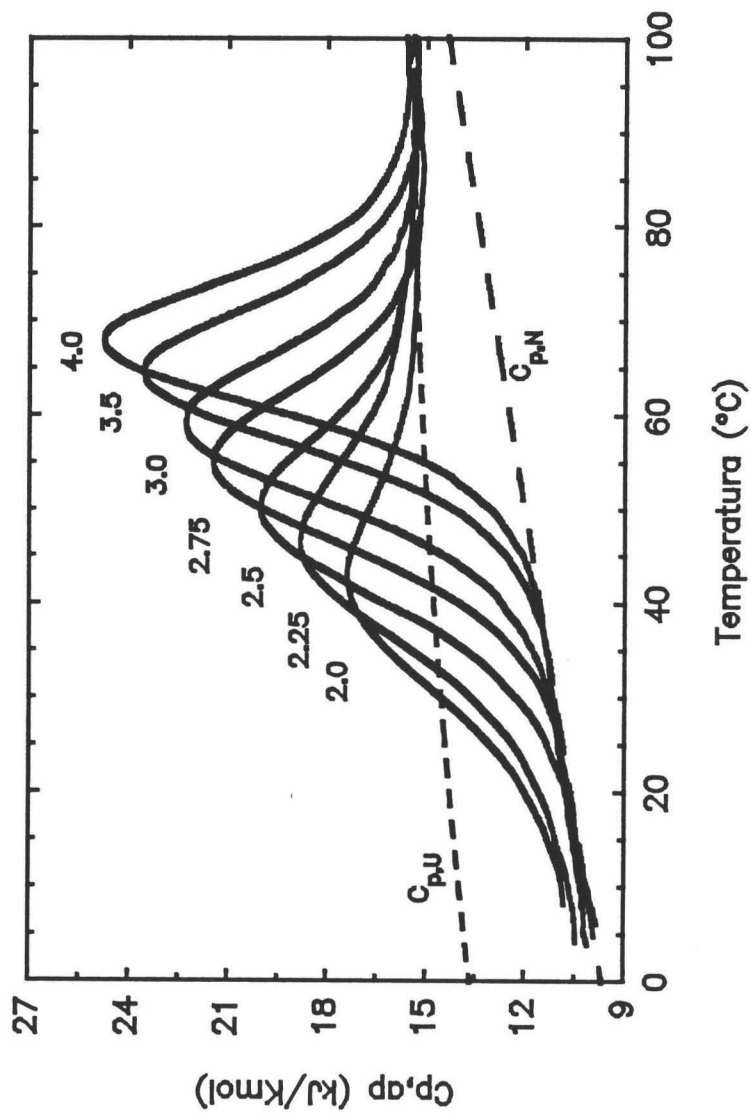


FIGURA 3-5: Dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica molar parcial para SPC-SH3 a pH ácido (línea continúa). Las líneas a trazos representan el valor medio para la dependencia con la temperatura de $C_{p,N}$ y $C_{p,U}$ encontrado por ajuste global del conjunto de curvas. El valor medio de $C_{p,N}$ a 20°C es de 10.5 ± 0.8 kJ/K·mol. Los valores de pH están indicados encima de cada una de las curvas.

disociación durante el barrido de temperatura.

Para el análisis de datos, se transformaron las curvas en términos de capacidad calorífica molar parcial (ver Materiales & Métodos) utilizando un volumen específico para la proteína de 0.73 mL/g (valor promedio calculado para pequeñas proteínas globulares). En la Figura 3-5 presentamos varias curvas de CDB, en el intervalo de pH estudiado, transformadas en unidades de capacidad calorífica molar parcial, después de restar la línea base instrumental. Podemos ver cómo el valor de capacidad calorífica del estado nativo de SH3 aumenta linealmente con la temperatura, hecho totalmente de acuerdo con el comportamiento observado en otras proteínas globulares (Privalov, 1979; Filimónov et al., 1982; Privalov & Potekhin, 1986). Sin embargo, la necesidad de utilizar una función de capacidad calorífica no lineal para el estado desnaturalizado fue demostrada por Privalov et al. (1989), a partir de medidas de capacidad calorífica con compuestos modelo de cada uno de los 20 aminoácidos que pueden formar parte de la cadena polipeptídica (Makhatadze & Privalov, 1990; Privalov & Makhatadze, 1990).

A la vista de las curvas experimentales presentadas en la Figura 3-5, podemos concluir que, efectivamente, la capacidad calorífica del SH3 nativo, $C_{p,N}(T)$, aumenta con la temperatura tal y como sucede en otras proteínas globulares y podemos formularlo de la siguiente manera:

$$C_{p,N}(T) = a_0 + b_0(T - T_0) \quad (3.1)$$

donde a_0 es la capacidad calorífica molar parcial de la proteína nativa a una temperatura $T = T_0$ y b_0 es la pendiente que nos da su crecimiento lineal con la temperatura. Si tomamos $T_0 = 293$ K (20°C), con lo que el valor medio que obtenemos, resultado de la regresión lineal de los tramos lineales de $C_{p,N}$ de varias curvas entre pH 2.5 y 4.0, es:

$$C_{p,N}(T) = (10.5 \pm 0.8) + (0.047 \pm 0.006) \cdot (T - 293) \quad \text{kJ/K}\cdot\text{mol} \quad (3.2)$$

El cálculo de la función $C_{p,U}(T)$ para el dominio SH3 está ilustrado junto con

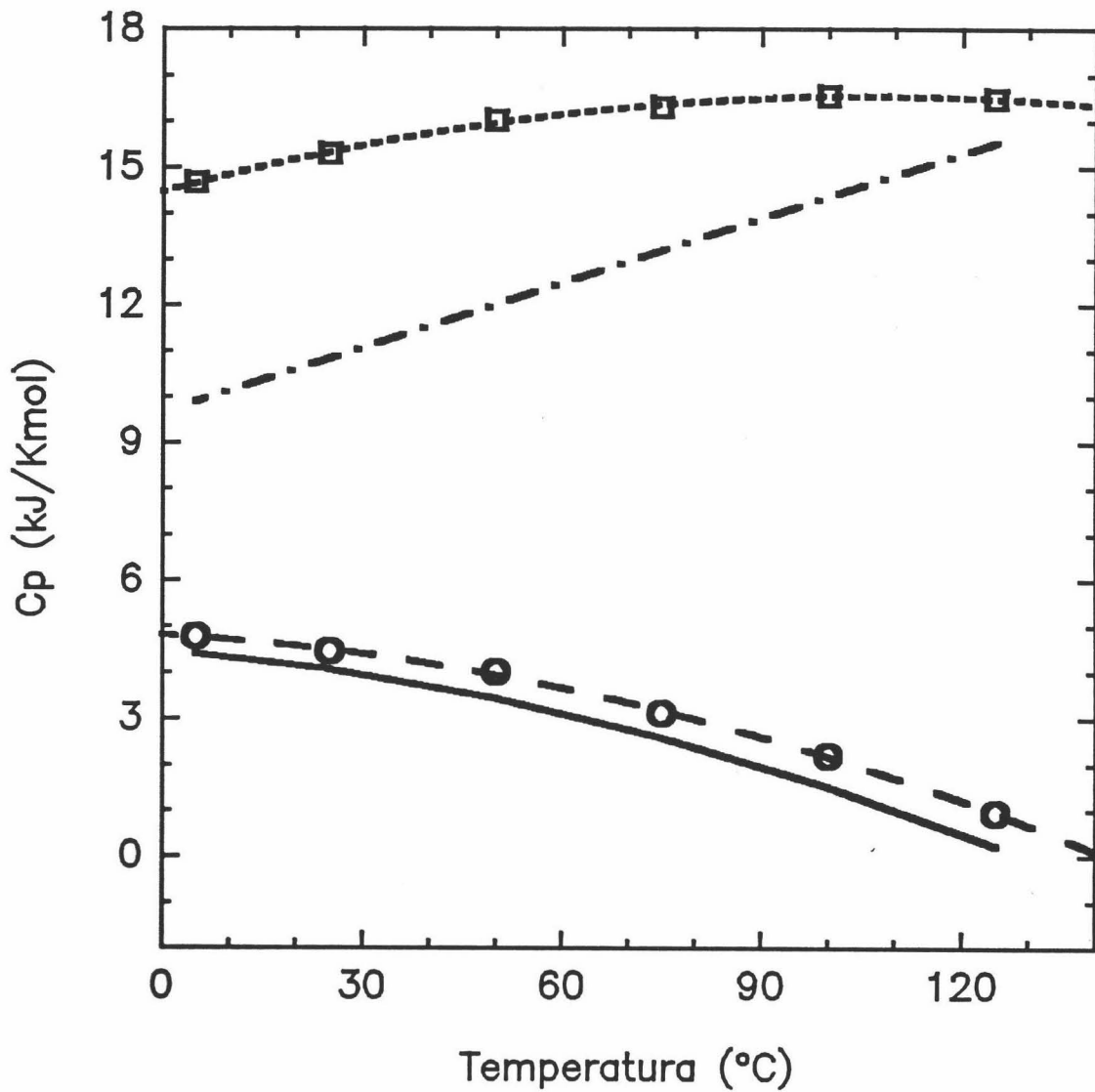


FIGURA 3-6: Cálculo de las capacidades caloríficas para el sistema SPC-SH3. La dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica molar del estado nativo ($C_{p,N}$) se calculó en el ajuste global de cada curva como una función lineal de T (-·-·-) y la del estado desnaturalizado ($C_{p,U}$) se calculó según Makhatadze & Privalov (1990) (□). La línea de puntos (·-·-·) representa el tratamiento de regresión a una función cuadrática de T de los datos calculados. En la parte inferior de la figura tenemos la diferencia de ambas funciones, es decir, el $\Delta C_{p,U,calc}(T)$ que se representa como círculos huecos (○) y la línea a trazos (- - -) es la regresión cuadrática de T , mientras que la línea continua es la función $\Delta C_{p,U}(T)$ obtenida del ajuste global de las curvas experimentales de $C_{p,ap}(T)$.

el $C_{p,N}(T)$, en la parte superior de la Figura 3-6. La expresión analítica de $C_{p,U}(T)$ es una regresión de segundo orden que se hace a través de los seis puntos calculados a partir de las contribuciones individuales de cada uno de los aminoácidos de la secuencia, en el intervalo de temperaturas de 5 a 125°C (Makhatadze & Privalov, 1990), obteniéndose que:

$$C_{p,U}(T) = a + b \cdot T + c \cdot T^2 \quad (3.3)$$

es decir, en nuestro caso:

$$C_{p,U}(T) = -9.42 + 0.1366 \cdot T - 0.0001795 \cdot T^2 \text{ kJ/K}\cdot\text{mol} \quad (3.4)$$

o introduciendo $T_0 = 293$ K como temperatura de referencia:

$$C_{p,U}(T) = 15.2 + 0.137 \cdot (T - 293) - 0.0001795 \cdot (T^2 - 293^2) \quad (3.5)$$

De esta manera, la función $\Delta C_{p,N,D}(T)$ se obtiene como diferencia de la (3.3) y la (3.1):

$$\Delta C_{p,N,D}(T) = (a - a_0) + (b - b_0) \cdot (T - T_0) + c \cdot (T^2 - T_0^2) \quad (3.6)$$

o utilizando las (3.2) y la (3.5):

$$\Delta C_{p,N,D}(T) = 4.7 + 0.090 \cdot (T - 293) - 0.0001795 \cdot (T^2 - 293^2) \quad (3.7)$$

El análisis preliminar de los barridos de CDB del fragmento SH3 de α -espectrina pone de manifiesto que la forma de las curvas es bastante simétrica y las simulaciones con otros modelos sugieren que, efectivamente, el modelo de dos estados moleculares puede ajustar bien nuestros datos. De hecho, si ajustamos con un modelo de tres estados, el estado intermedio tiene una población inferior al 5% (dentro del error experimental) y si los dos estados son bimoleculares, por ejemplo, el error del ajuste es mayor que en el modelo monomolecular, observándose desviaciones entre los datos y el ajuste. Por tanto, en el análisis termodinámico realizamos ajustes a cada traza de CDB experimental según el

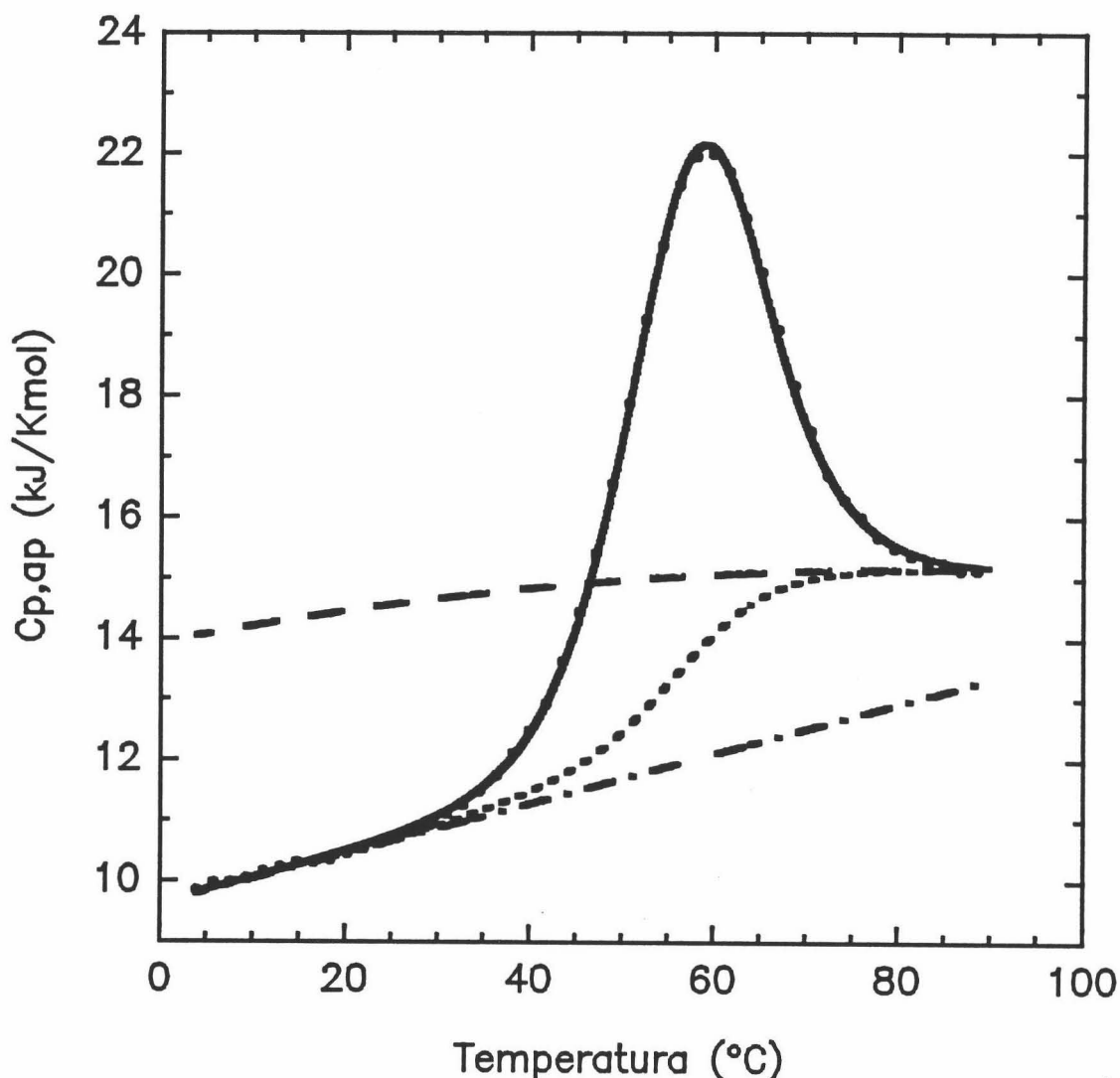


FIGURA 3-7: Ejemplo del ajuste a pH 3.0 de la curva de capacidad calorífica molar parcial de SPC-SH3. Se aplicó el modelo de dos estados con las modificaciones pertinentes en el cálculo de la capacidad calorífica (ver texto). El mejor ajuste (línea continua) obtenido para los datos experimentales (símbolos) fue para valores de $T_U = 56.5^\circ\text{C}$; $\Delta H_{N,D}(T_U) = 176$ kJ/mol; $C_{p,N}(T) = 10.4 + 0.044 \cdot (T-293)$ (-·-·-·-); $\Delta C_{p,N,D}(T) = -5.95 + 0.087 \cdot T - (1.795 \cdot 10^{-4}) \cdot T^2$. En la figura hemos representado el $C_{p,U} = C_{p,N} + \Delta C_{p,N,D}$ como una línea a trazos (- - -) y el cambio en la capacidad calorífica interna por puntos (·····).

modelo de dos estados monomoleculares, (ver Materiales y Métodos) suponiendo un $\Delta C_{p,N,D}$ variable con la temperatura según la ecuación (3.6).

Podemos ver un ejemplo del ajuste matemático en la Figura 3-7 donde

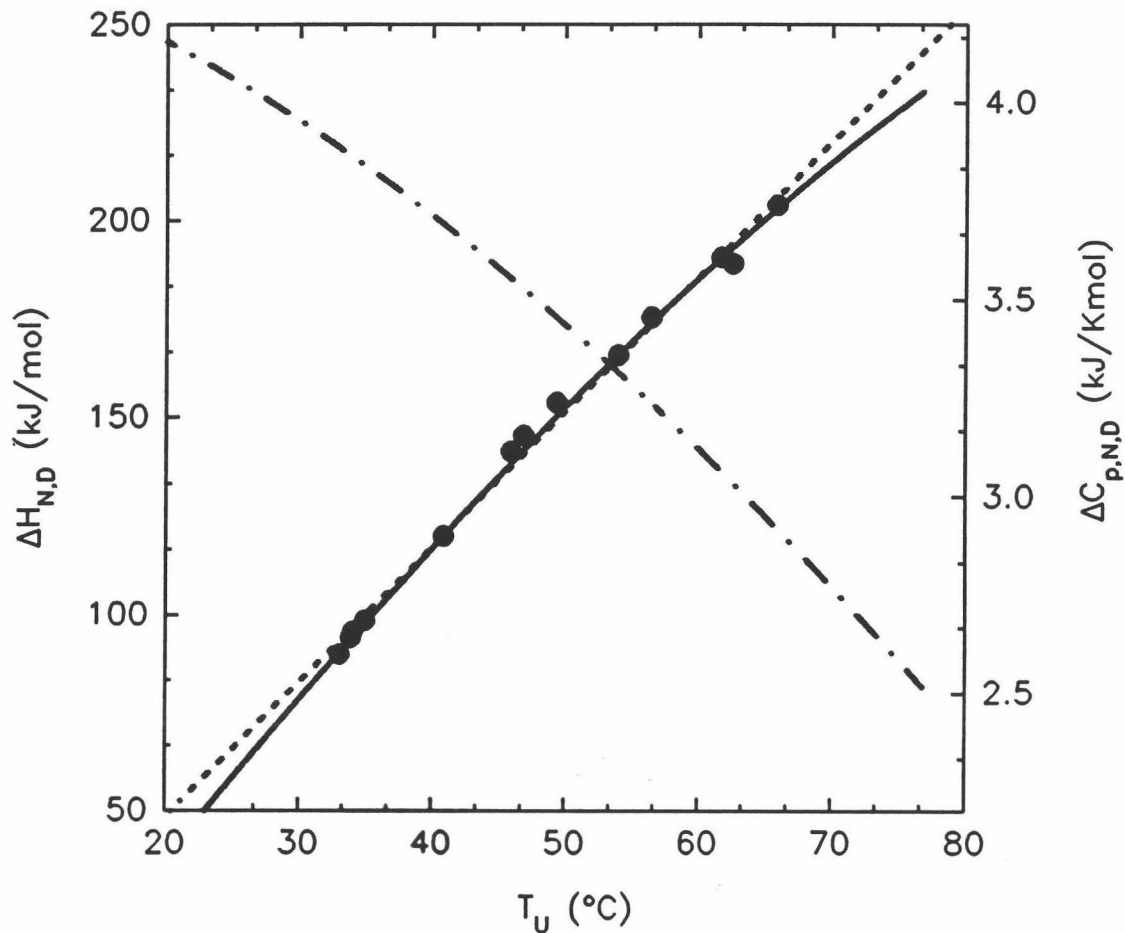


FIGURA 3-8: Representación gráfica de $\Delta H_{N,D}(T_U)$ frente a T_U con los datos recogidos en la tabla 3-1 obtenidos del ajuste global de cada curva experimental (\bullet , eje izquierdo). La línea continua representa la función parabólica de $\Delta H_{N,D}(T)$ (ecuación (3.8)) correspondiente a un valor de $\Delta C_{p,N,D} = -5.95 + 0.087 \cdot T - (1.795 \cdot 10^{-4}) \cdot T^2$ (---, eje derecho), mientras que la línea punteada (.....) corresponde a la regresión lineal a través de los puntos, con una pendiente de 3.4 kJ/K·mol.

tenemos un experimento a pH 3.0 y su mejor ajuste, junto con las funciones obtenidas de $C_{p,N}(T)$ y $C_{p,U}(T)$ a partir de los datos de Δa y Δb obtenidos de él. Generalmente, Δa se dejó flotante en todos los ajustes y c se mantuvo fijo en el valor estimado. El valor de Δb se dejó flotante en los ajustes de los experimentos a pH 2.0 y 2.25 donde a 280 K el $C_{p,N}$ es desconocido (esto se aprecia muy bien en la Figura 3-5) pues tenemos alrededor de un 10% de la proteína ya

desnaturalizada, dado el bajo valor de T_U y $\Delta H_{N,D}$ que ensanchan en exceso la transición en la escala de temperaturas. En estos casos, tampoco se fijó para b_0 el valor calculado en la ecuación (3.2) porque la dispersión en su determinación fue bastante grande, sobre un 12%.

El ajuste global de las trazas nos da una pequeña dispersión en la función de $\Delta C_{p,N,D}(T)$ experimental respecto de la calculada. En la parte inferior de la Figura 3-6 tenemos representadas ambas funciones y podemos deducir que el valor experimentalmente observado para el $\Delta C_{p,N,D}(T)$ es, aproximadamente, 0.7 kJ/K·mol menor que el estimado. Esta desviación no es demasiado significativa si tenemos en cuenta que el valor absoluto de capacidad calorífica parcial para el SH3 se ha determinado con una precisión de 0.8 kJ/K·mol.

Además de los valores que definen el cambio de capacidad calorífica con la temperatura, el ajuste a cada curva nos permite obtener los datos de T_U y $\Delta H_{N,D}(T_U)$. Estos se encuentran recogidos en la tabla 3-1 y representados gráficamente en la Figura 3-8.

TABLA 3-1
PARAMETROS TERMODINAMICOS^(*) PARA LA DESNATURALIZACION
TERMICA DEL DOMINIO SH3 A pH ACIDO Y BAJA FUERZA IONICA

pH	T_U (°C)	$\Delta H_{N,D}(T_U)$ (kJ/mol)	$\Delta G_{N,D}(298)$ (kJ/mol)
2.0	24	93	2.3
2.25	30	114	4.2
2.5	47	139	6.9
2.75	54	162	9.8
3.0	58	174	11.6
3.5	63	188	13.9
4.0	66	197	15.6

(*) Los parámetros termodinámicos derivados del modelo calorimétrico presentan un error de un 8% para la entalpía, un 20% para la energía libre de Gibbs y alrededor de 0.7 K para T_U .

Según podemos observar en la Figura 3-8, la dependencia de $\Delta H_{N,D}(T_U)$ con T_U en el intervalo de temperaturas experimentalmente accesible se ajusta bastante bien a una línea recta obtenida por regresión lineal, con una pendiente de 3.4 ± 0.1

kJ/K·mol. En cualquier caso, se consigue un mejor ajuste por regresión a una función polinómica del tipo:

$$\Delta H_{N,D}(T) = \Delta H_{N,D}(T_U) + a \cdot (T - T_U) + [b \cdot (T^2 - T_U^2) / 2] + [c \cdot (T^3 - T_U^3) / 3] \quad (3.8)$$

obtenida a partir de la consideración de que el $\Delta C_{p,N,D}(T)$ es una función parabólica con un valor:

$$\Delta C_{p,N,D}(T) = -5.95 + 0.087 \cdot T - (1.795 \cdot 10^{-4}) \cdot T^2 \quad (3.9)$$

La diferencia entre las dos regresiones llega a ser significativa sólo fuera del intervalo experimental y, particularmente, por encima del mismo. Esta situación ya fue observada por Privalov y colaboradores en algunas otras proteínas globulares (Privalov et al., 1989).

3.2.- DISCUSION

El estudio de pequeñas proteínas monoméricas muestra que en muchos casos su desnaturalización consiste en una transición simple que ocurre en equilibrio y que puede estudiarse, en consecuencia, como transiciones tipo "dos estados". Actualmente existe una evidencia creciente de que en proteínas con más de 70 restos pueden existir uno o más intermediarios de plegamiento. Estos intermediarios se pueden estudiar cinéticamente o en equilibrio, bajo ciertas condiciones de pH, disolvente, fuerza iónica, etc (ver, por ejemplo, los estudios sobre Barstar y CheY de esta misma Memoria; Ikeguchi et al., 1986; Kuwajima et al., 1988; Griko et al., 1988; Udgaonkar & Baldwin, 1990; Briggs & Roder, 1992; Lu & Dahlquist, 1992; Radford et al., 1992; Serrano et al., 1992; Varley et al., 1993; Mann & Matthews, 1993).

Por otra parte, se conocen dos casos, el inhibidor de quimotripsina (CI2) (Jackson & Fersht, 1991) y el dominio G de IgG (Alexander et al., 1992b) para los que no se ha conseguido detectar ningún intermediario cinético o en condiciones de equilibrio, utilizando una gran variedad de técnicas. El CI2 tiene 80 aminoácidos, si bien sólo 60 de ellos forman un dominio globular compacto (McPhalen & James, 1987). El dominio G contiene sólo 57 restos (Fahnestock et al., 1986). Esto nos lleva a la importante cuestión de si la existencia de intermediarios de plegamiento está correlacionada con el tamaño de la molécula y, por tanto, con su complejidad estructural. Si esto es cierto, hemos de esperar que otras estructuras con aproximadamente 60-80 restos y sin puentes disulfuro deban tener verdaderas transiciones tipo "dos estados".

Podemos considerar varios criterios cinéticos y termodinámicos para establecer que un sistema dado es de tal naturaleza: **1)** su desnaturalización por un agente desnaturalizante debe ajustarse a una curva con una sola transición, independientemente de la técnica utilizada en la medida, **2)** la endoterma de desnaturalización en CDB debe ajustarse a la función $C_p(T)$ correspondiente al modelo de dos estados y **3)** el logaritmo de la constante de velocidad de los procesos de desplegamiento y replegamiento en función de la concentración de

urea (agente desnaturalizante) debe ser una función lineal y los valores para $\Delta G_{N,D}$ y m obtenidos deben ser iguales entre sí dentro del error experimental, donde:

$$\Delta G = \Delta G_{N,D} - m \cdot [\text{desnaturalizante}] \quad (3.10)$$

Este último criterio es en muchos casos el más sensible para la detección de intermediarios de plegamiento (Jackson & Fersht, 1991).

Aparte del estudio calorimétrico recogido en esta Memoria, se han realizado otros estudios de desnaturalización térmica y en presencia de urea y GuHCl seguidos por fluorescencia y CD. También se han hecho experimentos cinéticos en un aparato de stop-flow en orden a dilucidar la presencia de intermediarios de desplegamiento, según lo dicho en el párrafo anterior. Todos estos experimentos se han llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Luis Serrano en el EMBL de Heidelberg (Alemania) y se han publicado en conjunto con los nuestros (Viguera et al., 1994).

Hay que destacar que, según los puntos citados antes: **1)** los experimentos de desnaturalización por urea a pH 3.5 se ajustan muy bien a un modelo con una simple transición, tanto los que se han hecho siguiendo el cambio en estructura por fluorescencia como por dicroísmo circular. **2)** El análisis de datos por CDB se describe perfectamente con un modelo de dos estados monomolecular. **3)** El análisis cinético de los procesos de desplegamiento y replegamiento del dominio SH3 pone de manifiesto la ausencia de cualquier tipo de intermediario a bajas concentraciones de urea, ni tan siquiera debidos a procesos de isomerización de las dos trans-Pro que posee el dominio. Adicionalmente, se ha encontrado que la contribución de este proceso a la energía de Gibbs de desplegamiento es despreciable (Jackson & Fersht, 1991).

En la tabla 3-II se han recogido los valores para $\Delta G_{N,D}$ y m obtenidos de las diferentes técnicas utilizadas y vemos que todos coinciden dentro del error experimental. Por consiguiente, podemos considerar que el dominio SH3 de espectrina se desnaturaliza según un proceso puramente de dos estados, tanto desde un punto de vista cinético como termodinámico. En este caso, los

intermediarios de plegamiento no son lo suficientemente estables como para ser detectados y su energía es indistinguible de la del estado de transición.

TABLA 3-II
COMPARACION DE LOS VALORES TERMODINAMICOS DE DESNATURALIZACION
PARA SH3 OBTENIDOS POR DESNATURALIZACION QUIMICA Y TERMICA, CDB
STOP-FLOW A pH 3.5 Y 298 K

METODO	$\Delta G_{N,D}$ (kJ/mol)	m (kJ/nol·M)	T_U (K)	$\Delta H_{N,D}(T_U)$ (kJ/mol)
CDB(a)	14 ± 3.0		336 ± 0.8	188 ± 15
TERMICA(b)	13 ± 3.0		333 ± 6	196 ± 3
FLUORESC(c)	12 ± 0.2	3.1 ± 0.03		
CD(d)	12 ± 0.1	3.2 ± 0.06		
S-FLOW(e)	13 ± 0.7	2.9 ± 0.06		

(a) CDB. (b) Desnaturalización térmica seguida por fluorescencia.

(c) Desnaturalización química con urea seguida por fluorescencia.

(d) Idem. seguida por dicroismo circular. (e) Experimentos cinéticos en stop-flow con urea como desnaturalizante.

El valor de $\Delta G_{N,D}$ del dominio SH3 a pH 3.5 y 289 K está en 13 kJ/mol aproximadamente, y para m tenemos unos 3 kJ/mol·M. El valor de $\Delta G_{N,D}$ a este pH es bastante bajo en comparación con el de otras de proteínas globulares de mayor tamaño, pero su estabilidad frente a la temperatura es comparable, incluso mayor que el de otras estructuras como Barnasa (ver en la Sección siguiente). El valor de $\Delta G_{N,D}$ para proteínas de tamaño similar como el C12 y dominio G es de 25-29 kJ/mol (Jackson & Fersht, 1991; Alexander et al., 1992a), aunque, hemos de tener en cuenta que es en el intervalo de pH 5-8 donde este dominio presenta mayor estabilidad. Este intervalo no es accesible con la técnica de CDB puesto que la proteína por encima de pH 4 no es soluble a concentraciones mayores de 1 mg/mL, pero los experimentos de desnaturalización en presencia de GuHCl no dan un valor mayor de 15.5 ± 1.3 kJ/mol para el $\Delta G_{N,D}$. Este valor tan pequeño para la energía de Gibbs no es demasiado sorprendente si tenemos en cuenta que el SH3 es un dominio perteneciente a una estructura proteica mayor y no es una proteína monomérica por lo que, consecuentemente, es razonable pensar que su interacción con otras zonas de la proteína a la cual pertenezca puedan estabilizarlo en cierta medida. En la Figura 3-9 hemos simulado la dependencia con la temperatura de las

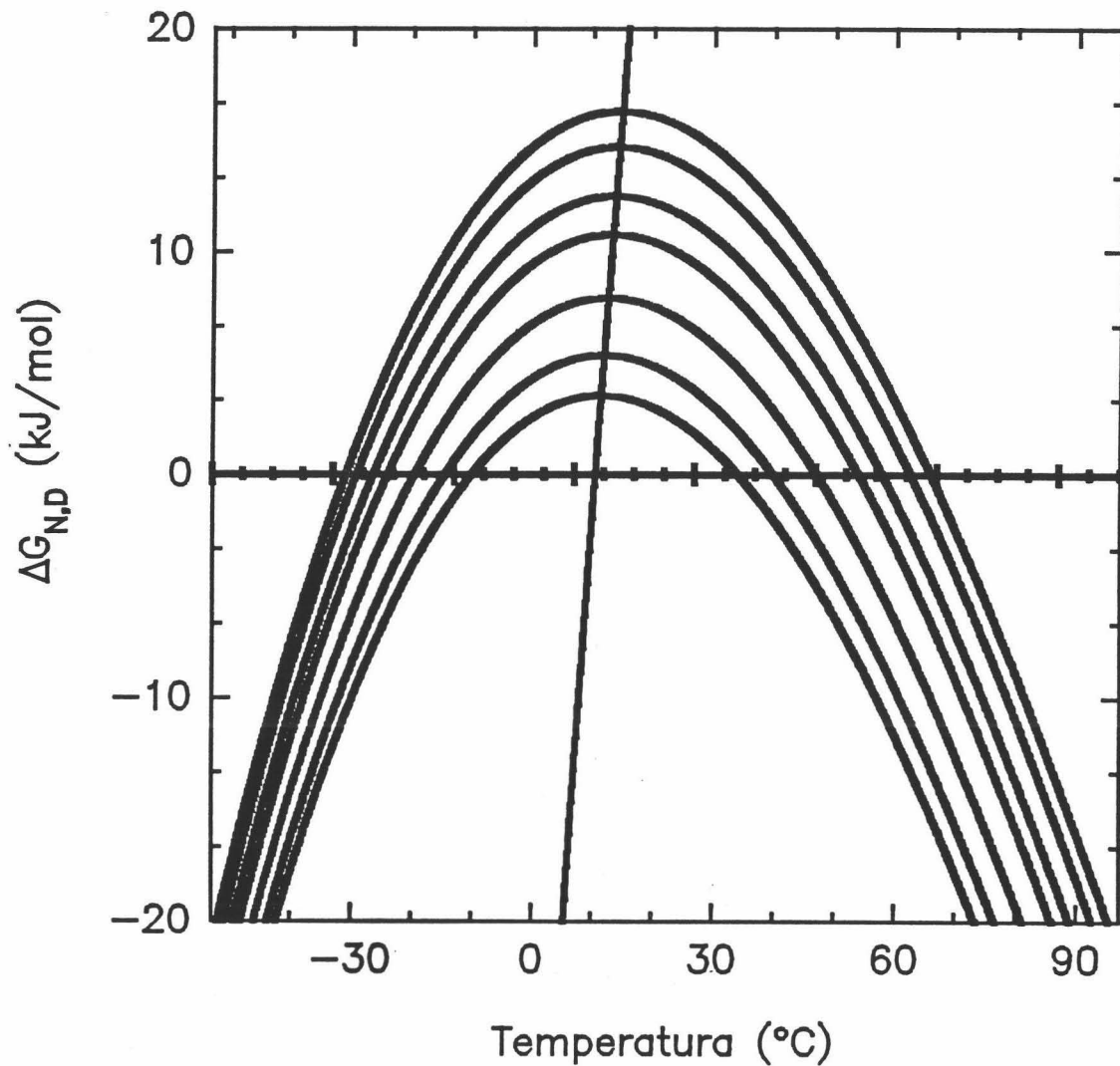


FIGURA 3-9: Dependencia con la temperatura de las energías de Gibbs de desnaturalización para el SPC-SH3 a varios valores de pH (de arriba hacia abajo, pH 4.0, 3.5, 3.0, 2.75, 2.5, 2.25, 2.0): Las funciones han sido calculadas utilizando un valor para el cambio de capacidad calorífica definido por $\Delta C_{p,N,D} = -5.95 + 0.87 \cdot T - (1.795 \cdot 10^{-4}) \cdot T^2$ (el resto de parámetros necesarios están recogidos en la tabla 3-1). La línea continua casi vertical representa la dependencia con la temperatura de los valores máximos de energía libre de desnaturalización (valores para los que $\Delta S_{N,D} = 0$).

energías de Gibbs de desplegamiento del SH3 a varios valores de pH (2.0-4.0) calculadas a partir de los datos de CDB. En los experimentos citados a pH 7.0, el valor de m (proporcional a la exposición media de los restos durante la

desnaturalización) es de 7.82 ± 0.5 kJ/mol·M, bastante similar al encontrado en el caso del CI2 (Jackson & Fersht, 1991) que posee 60 aminoácidos estructurados ($m = 7.8$ kJ/mol·M).

Desde un punto de vista calorimétrico el dominio SH3 de α -espectrina es un modelo representativo de desplegamiento de pequeñas proteínas globulares monoméricas. Sus curvas de desnaturalización (ver Figura 3-5) presentan un comportamiento bastante coherente con el esperado para una proteína con un sólo dominio estructural que desnaturaliza según el modelo de dos estados. La dificultad principal en el análisis radica en la obtención del $\Delta C_{p,exc}(T)$ a partir de los datos de capacidad calorífica molar parcial ya que debemos aproximar los valores de $C_{p,N}(T)$ y $\Delta C_{p,int}(T)$ a alguna función razonable. Normalmente, la aproximación más sencilla es considerarla como una función lineal de la temperatura (Privalov, 1979; Privalov & Potekhin, 1986; Privalov et al., 1989) o bien utilizar una sigmoide proporcional a la integral de $\Delta C_{p,exc}(T)$ tal y como vemos en la Figura 3-4 (trazo punteado) (Takahashi & Sturtevant, 1981; Filimónov et al., 1982). Estas consideraciones pueden conducirnos a una estimación correcta del $\Delta C_{p,exc}(T)$ siempre y cuando se cumplan las siguientes restricciones: a) que el incremento en la capacidad calorífica interna sea mucho menor en comparación con la capacidad calorífica de exceso y b) que la variación de la capacidad calorífica de cada estado macroscópico sea proporcional a la variación de la entalpía de dicho estado; la constante de proporcionalidad debe tener un valor aproximadamente igual para todos los estados macroscópicos del sistema. La primera condición se cumple bien con proteínas con una entalpía de desnaturalización mayor de 300 kJ/mol donde el error cometido en el cálculo de $\Delta C_{p,exc}$ es despreciable. Sin embargo, en sistemas como el dominio SH3 donde el efecto calorífico de desplegamiento es pequeño, la aproximación más correcta para el análisis de los datos calorimétricos es realizar un ajuste global de los mismos a algún modelo razonable para imponer restricciones a la variación de los parámetros y reducir la incertidumbre en el ajuste (Filimónov et al., 1982).

Hemos utilizado el modelo de dos estados descrito en Materiales y Métodos, introduciendo una modificación consistente en considerar el $\Delta C_{p,N,D}$ variable con la

temperatura. Este comportamiento ha sido descrito por Privalov & Makhatadze (1990) y, en nuestro caso, podemos demostrar su importancia si simulamos curvas de capacidad calorífica molar parcial con parámetros típicos de desnaturalización del SPC-SH3, considerando el incremento en capacidad calorífica constante (línea a trazos en Figura 3-10) o variable, según una función polinómica cuadrática de temperatura (línea continua). La comparación de ambos casos con las curvas reales, que podemos ver en la Figura 3-5, nos confirma que tenemos una aproximación más correcta en el segundo de los casos, es decir, para un $\Delta C_{p,N,D}$ variable con T. La bondad de los ajustes obtenidos (ver, por ejemplo, el de la Figura 3-7), nos permite obtener unos datos bastante fiables con los que poder hacer algunas consideraciones: así, la capacidad calorífica específica del estado nativo (1.47 ± 0.13 J/K·g a 293 K), su dependencia con la temperatura ($6.7 \pm 1.7 \cdot 10^{-3}$ J/K²·g), la entalpía específica de desnaturalización a la T_m correspondiente (por ejemplo, 26.3 ± 2 J/g a 336 K) y su cambio específico de capacidad calorífica durante la desnaturalización (0.47 ± 0.04 J/K·g, en promedio) son perfectamente comparables con los valores que se han descrito para proteínas globulares compactas (Privalov, 1979; Privalov & Khechinashvili, 1974). El $\Delta H_{N,D}$ (por mol de restos de aminoácido) tiene un valor de 5.2 ± 0.4 kJ/mol de aminoácido cuando $\Delta C_{p,N,D}$ se iguala a cero, lo que está de acuerdo con el valor encontrado recientemente para el $\Delta H_{N,D}$ de proteínas globulares a alta temperatura (Privalov et al., 1989; Privalov & Makhatadze, 1990). Para los miembros de esta familia de proteínas existe, así mismo, una correlación entre $\Delta H_{N,D}(298)$ y $\Delta C_{p,N,D}(298)$ (Murphy et al., 1992); los valores encontrados por nosotros para el SH3 [$\Delta H_{N,D}(298) = 917$ J/mol res y $\Delta C_{p,N,D}(298) = 62$ J/K·mol res] concuerdan bastante bien con la correlación obtenida por los citados autores.

En definitiva, podemos decir que el dominio SH3 de espectrina constituye un modelo excelente para estudios de plegamiento-desplegamiento de proteínas debido a la sencillez de su mecanismo consistente en una transición puramente dos estados. Este caso es sorprendente ya que es una de las pocas proteínas "todo β " estudiadas por CDB con un desplegamiento térmico reversible y, por tanto, ni

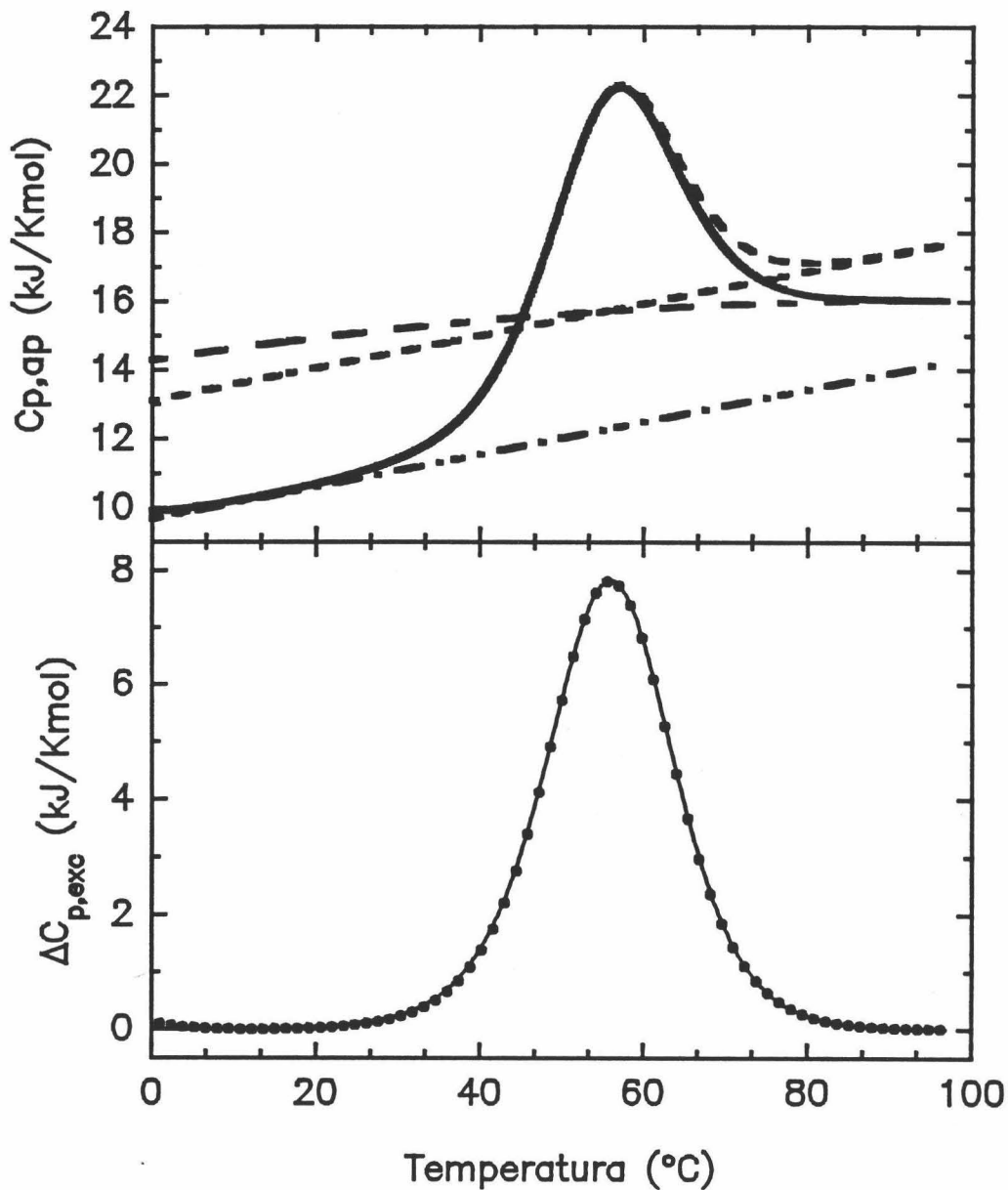


FIGURA 3-10: Simulaciones de la capacidad calorífica molar parcial (parte superior) para una transición de dos estados con los parámetros termodinámicos calculados para el SPC-SH3 a pH 2.75 (ver tabla 3-1). La línea sólida en la gráfica superior representa la curva simulada para el caso de que $\Delta C_{p,N,D} = -5.95 + 0.087 \cdot T - (1.795 \cdot 10^{-4}) \cdot T^2$, mientras que la curva simulada con línea a trazos (- - -) supone el caso de un $\Delta C_{p,N,D} = 3.4 \text{ kJ/K} \cdot \text{mol}$ constante con la temperatura. En esta misma gráfica también se han simulado los valores de $C_{p,N}$ (-·-·-) y $C_{p,U}$ calculada según ambos casos, constante (trazo corto) y variable (trazo largo). En la gráfica inferior tenemos las funciones $\Delta C_{p,exc}(T)$ calculadas a partir de ambas simulaciones (puntos y línea).

mucho menos de dos estados. Además, la coincidencia de las energías de Gibbs de desplegamiento obtenidas por las diferentes técnicas cinéticas y de equilibrio sugiere que el estado desnaturalizado final conseguido es energéticamente el mismo, lo que sugiere que se trate de un estado completamente desplegado si tenemos en cuenta la comparación entre el $\Delta C_{p,N,D}(T)$ experimental y el calculado a partir de las contribuciones individuales de cada aminoácido (ver la parte inferior de la Figura 3-6). El valor obtenido para $\Delta G_{N,D}$ es apreciablemente bajo en comparación con el normal para otras proteínas globulares (como el resto en esta Memoria), lo cual es explicable por el hecho de que se trata de un dominio estructural independiente. En cambio como acabamos de ver, los parámetros específicos concuerdan con los que se predicen en las correlaciones experimentales. El tratamiento matemático de las curvas de CDB necesita de la consideración de un $\Delta C_{p,N,D}$ dependiente de la temperatura para poder hacer un tratamiento de datos apropiado. Esto está de acuerdo con los últimos trabajos publicados que muestran que sólo en determinadas situaciones la utilización de un $\Delta C_{p,N,D}$ constante consigue los mismos resultados dentro de la incertidumbre experimental. Por otra parte, como ya hemos mencionado, sólo existen en la bibliografía dos casos, aparte del nuestro, en los que no se ha descubierto un intermediario de plegamiento, el CI2 y el dominio G de IgG. Las tres estructuras tienen en común su pequeño tamaño (aproximadamente 60 aminoácidos) que hace que posean un núcleo hidrofóbico muy pequeño, casi en los límites de lo que ha sido postulado para ser un dominio de plegamiento estable sin puentes disulfuro (Privalov & Gill, 1988). La diferencia principal entre el Dominio SH3 de α -espectrina y los otros dos sistemas es su patrón de plegamiento, una hélice α empaquetada en torno a una lámina β antiparalela en aquellas (Lian et al., 1991; Gronenborn et al., 1991; Orban et al., 1992; McPhalen & James, 1987), mientras que un dominio SH3 es sólo una agrupación de láminas β . Esto nos lleva a la conclusión de que es el tamaño el causante de la aparición de intermediarios de plegamiento, debido a la existencia de mayores núcleos hidrofóbicos o, incluso, de dos o más subdominios. En cualquier caso, sería necesario el estudio de más proteínas de este

tamaño para confirmar estas hipótesis.

Barnasa

4.1.- REVISION BIBLIOGRAFICA

El *Bacillus amyloliquefaciens* produce una ribonucleasa extracelular designada como Barnasa (EC 3.1.27.3). Es un monómero de 12.382 Da compuesto de 110 aminoácidos sin puentes disulfuro ni metales unidos (Lees & Hartley, 1966; Hartley & Barker, 1972). Fue purificada por primera vez por Nishimura et al. (1958) y su gen ha sido clonado y expresado en *Escherichia coli* por Hartley utilizando técnicas de ADN recombinante (Paddon & Hartley, 1987; Hartley, 1988). Esto ha permitido el poder purificar esta enzima en suficiente cantidad como para poder abordar estudios de tipo químico-físico así como producir mutantes dirigidos de la misma, muy útiles en estudios estructurales y de plegamiento (Mossakowska et al., 1989).

La Barnasa, al igual que otras ribonucleasas, es considerada como un modelo básico en los estudios sobre la estabilidad y el plegamiento de proteínas. Su pequeño tamaño así como otras características que describiremos después hacen de ella una estructura muy conveniente para estudiar el efecto de las mutaciones en su estabilidad.

4.1.1.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES

La estructura cristalina por rayos X se resolvió inicialmente a 2Å de resolución por Mauguen et al. (1982) y, posteriormente, en disolución por RMN (Bycroft et al., 1990; 1991) (Figura 4-1).

La Barnasa se compone de tres hélices α que se forman en el tercio N-terminal de la cadena. La primera hélice ($\alpha 1$) se extiende entre los restos 6-18 donde los ángulos ϕ de unión de Tyr17 y His18 se desvían de los encontrados normalmente en otras hélices con valores de 112° y 46° respectivamente. La segunda hélice α ($\alpha 2$) se extiende entre los restos 26-34 y es más regular, encontrándose valores normales para los ángulos de enlace. Las dos hélices se encuentran unidas entre sí por un loop que contiene una vuelta tipo I formado por

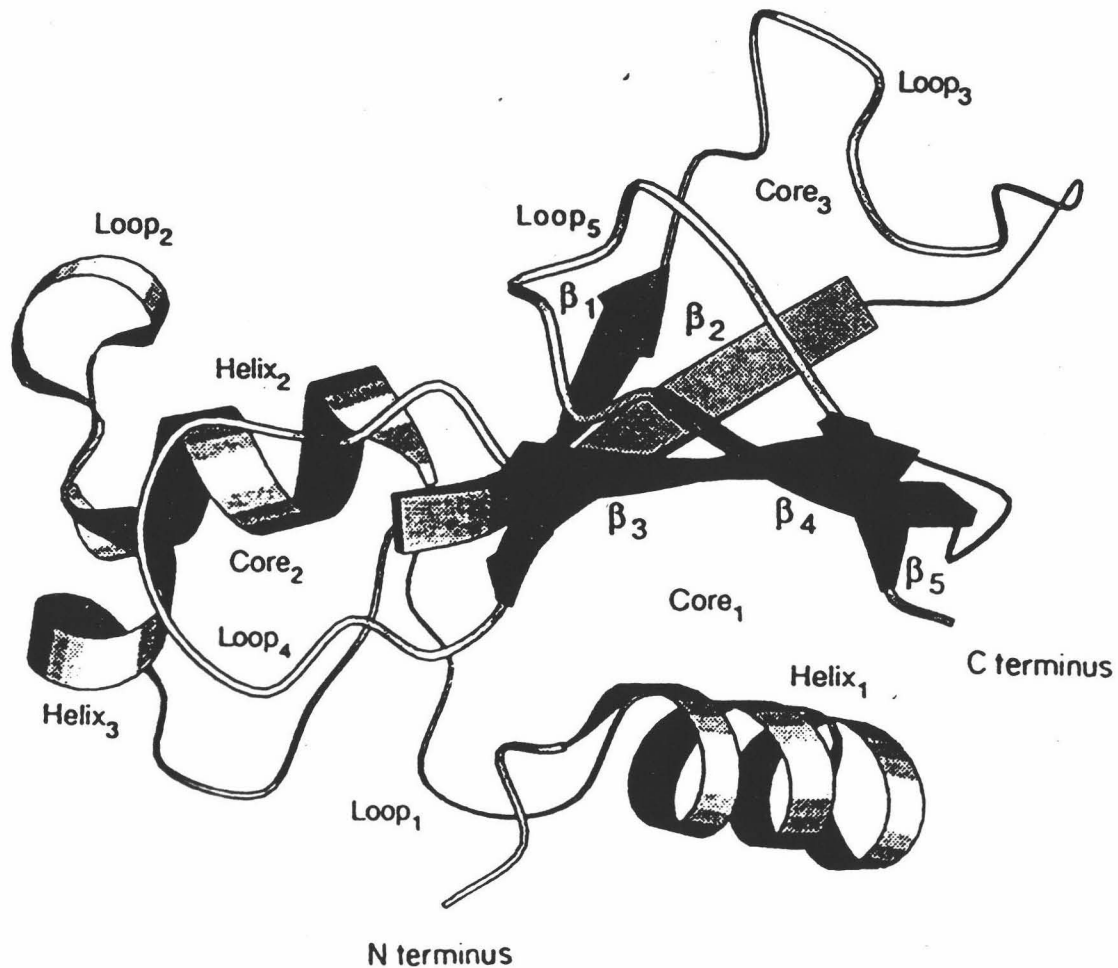


FIGURA 4-1: Vista general de la Barnasa. Podemos encontrar los siguientes elementos de estructura secundaria: 1) la región N-terminal (restos 1-5). 2) La hélice α_1 (restos 6-18). 3) Loop1 (restos 19-25). 4) Hélice α_2 (restos 26-34). 5) Loop2 (restos 35-40). 6) Hélice α_3 (restos 41-46). 7) Vuelta β (restos 92-93). 8) Cadena β_1 (restos 50-55). 9) Loop3 (restos 56-69). 10) Cadena β_2 (restos 70-76). 11) Loop4 (restos 77-84). 12) Cadena β_3 (restos 85-91). 13) Vuelta β (restos 92-93). 14) Cadena β_4 (restos 94-99). 15) Loop5 (restos 100-105). 16) Cadena β_5 (restos 106-108). 17) Extremo C-terminal (restos 109-110). (Tomada de Serrano et al., 1992c).

los restos 21-24. La hélice α_3 se compone de una sola vuelta de hélice α entre los restos 41-46 que se une a α_2 por el loop2 (restos 35-40).

La proteína contiene además una lámina compuesta por cinco cadenas β antiparalelas, formada en la parte C-terminal de la cadena donde los restos 50-55 forman la β_1 , los 70-76 la β_2 , 85-91 la β_3 , 94-99 para la β_4 y 106-108 la β_5 . La distribución de puentes de hidrógeno en la lámina es bastante regular excepto para la cadena β_1 que contiene una prominencia formada por los restos 53 y 54 (Richardson, 1981).

Las cadenas β_3 y β_4 están unidas por una vuelta tipo I y las cadenas β_4 y β_5 por otra vuelta tipo III' (Venkatachalam, 1968). Las otras uniones entre cadenas de la lámina se unen a través de loops de 15 restos de longitud (entre β_1 y β_2) o de 10 restos (entre β_2 y β_3).

El principal núcleo hidrofóbico de la proteína (core1) se forma gracias al empaquetamiento de la hélice α_1 en la lámina β . Esto sucede de una manera típica a como lo suelen hacer muchas otras proteínas α/β y comprende la interdigitación de los restos hidrofóbicos de ambas estructuras (Chotia, 1984). La otra hélice α (α_2) se empaqueta en uno de los bordes de la lámina β dando lugar al core2 (Serrano et al., 1992c). Este core2 constituye un pequeño subdominio de la Barnasa y tiene muy pocos contactos con el resto de la proteína.

El loop de unión para guanosina es el que existe entre β_1 y β_2 y se empaqueta en la lámina β por la cara opuesta de la hélice α_1 dando lugar al core3. Esta disposición se asegura gracias a la interacción de Leu63 con un bolsillo hidrofóbico que forman los restos Phe56, Trp71, Leu89, Tyr97, Tyr103 y Phe106. De todos ellos, sólo la Leu89 está totalmente aislada del disolvente mientras que el resto presentan accesibilidades compendidas entre 3 y 44 Å². Este loop se encuentra bastante conservado entre las ribonucleasas dada por su importancia biológica como sitio de unión del sustrato (Sevcik et al., 1990) e, incluso, parece conferir su especificidad por guanina a la Barnasa (Baudet & Janin, 1991).

El loop que enlaza la hélice α_2 y la cadena β_1 , y el que hace lo propio con β_3 y β_4 se empaquetan en la cara opuesta del core3. El primero, formado por los

aminoácidos 76-84 presenta una conformación extendida. El otro tiene una estructura más compacta pues el resto de Leu42 interacciona con el anillo de Trp35. Además, los protones amida de los restos 45 y 46 forman puentes de hidrógeno con los oxígenos carbonílicos de Asn41 y Leu42 respectivamente. Este resultado es consistente con la observación de que estos protones están muy protegidos del disolvente (Bycroft et al., 1990). Estos restos forman una pequeña estructura helicoidal que se rompe por una vuelta tipo II formada por los siguientes restos 46-49. Ambos loops quedan entrelazados entre sí principalmente por las interacciones entre Tyr78, Arg83, Trp35, Leu42 y Ala43.

El sitio activo de la Barnasa está formado principalmente por la His102 y Glu73 que actúan como un par ácido-base en el mecanismo catalítico de la proteína (Hill et al., 1983). Estos restos han sido identificados además por mutagénesis dirigida (Mossakovska et al., 1989). En las estructuras en disolución (Bycroft et al., 1990; 1991) estos aminoácidos están localizados en una ranura poco profunda de la proteína. Existen otros restos implicados en la actividad catalítica de la Barnasa que describiremos en el apartado 4.1.3.

Si hacemos un estudio comparativo con otras ribonucleasas conocidas, vemos que todas ellas consisten en un empaquetamiento α/β similar al descrito: una hélice α apilada con una lámina β antiparalela. En el caso de Barnasa y Binasa, la ribonucleasa de *Bacillus intermedius*, el loop entre la hélice α y la primera cadena β incluye otra hélice α aproximadamente perpendicular a la primera ($\alpha 3$ en la Barnasa). De todas maneras, todos los restos implicados en la catálisis se encuentran en la lámina β (Hill et al., 1983). Según los mismos autores, la lámina β parece ser el motivo estructural más conservado, lo que tendría su explicación por las restricciones geométricas que presenta. El caso más divergente lo presentó la ribonucleasa de páncreas bovino (Ribonucleasa A) que también consiste en el mismo motivo estructural pero difiere de la Barnasa en que la lámina β , aparte de estar enrollada tiene una curvatura en medio que le da una forma en V (Richards & Wychoff, 1971; Carlisle et al., 1974). Además, los restos que forman el sitio

activo en las dos moléculas se ubican en zonas no homólogas y tienen especificidades diferentes: la Barnasa es específica para purinas (Rushizky et al., 1963) y la Ribonucleasa A para pirimidinas (Richards & Wychoff, 1971). Tengamos en cuenta que debemos esperar una mayor divergencia estructural entre una ribonucleasa de eucariotas y otra microbiana que dentro de cada grupo. De hecho, la Binasa y las ribonucleasas microbianas extracelulares de *Streptomyces erythraeus* (St) y de los hongos *Aspergillus oryzae* (T1) y *Ustilago sphaerogena* (U2), presentan secuencias de aminoácidos que son bastante homólogas a la de Barnasa (Hartley, 1980; Aphanasenko et al., 1980; Yoshida et al., 1976).

Una técnica muy importante para el diseño de proteínas y el análisis de su plegamiento es el diseño de mutantes dirigidos por ingeniería de proteínas. En este sentido, la Barnasa se presenta como un sistema excelente como base para este tipo de estudios, sobre todo porque podemos eliminar determinadas interacciones sin introducir otras nuevas o menos favorables, es decir, obtener mutantes no disruptivos construidos en base a la estructura cristalina de la proteína "salvaje" (WT) (Fersht et al., 1987). Esto es especialmente importante para el análisis de su plegamiento puesto que la energía libre del proceso depende de los estados inicial y final y así ambos quedan perturbados lo menos posible. En esta situación, las medidas experimentales que se obtengan pueden ser utilizadas en el diseño experimental y proveen datos bastante fiables para el refinamiento de métodos computerizados de análisis (Kellis et al., 1988). La estrategia general será, por tanto, hacer una mutación conservativa en la estructura para romper (o añadir) una interacción particular y entonces comparar las propiedades estructurales y termodinámicas del mutante respecto a la proteína "salvaje".

Un ejemplo práctico lo tenemos en Buckle et al. (1993) que han resuelto por rayos X la estructura cristalina de cinco mutaciones en los núcleos hidrofóbicos para elucidar las bases estructurales de la contribución de los restos hidrofóbicos y del empaquetamiento, en la estabilidad de la proteína. La tendencia general ha sido la de mutar cada resto por otro con una cadena lateral de menor volumen, en

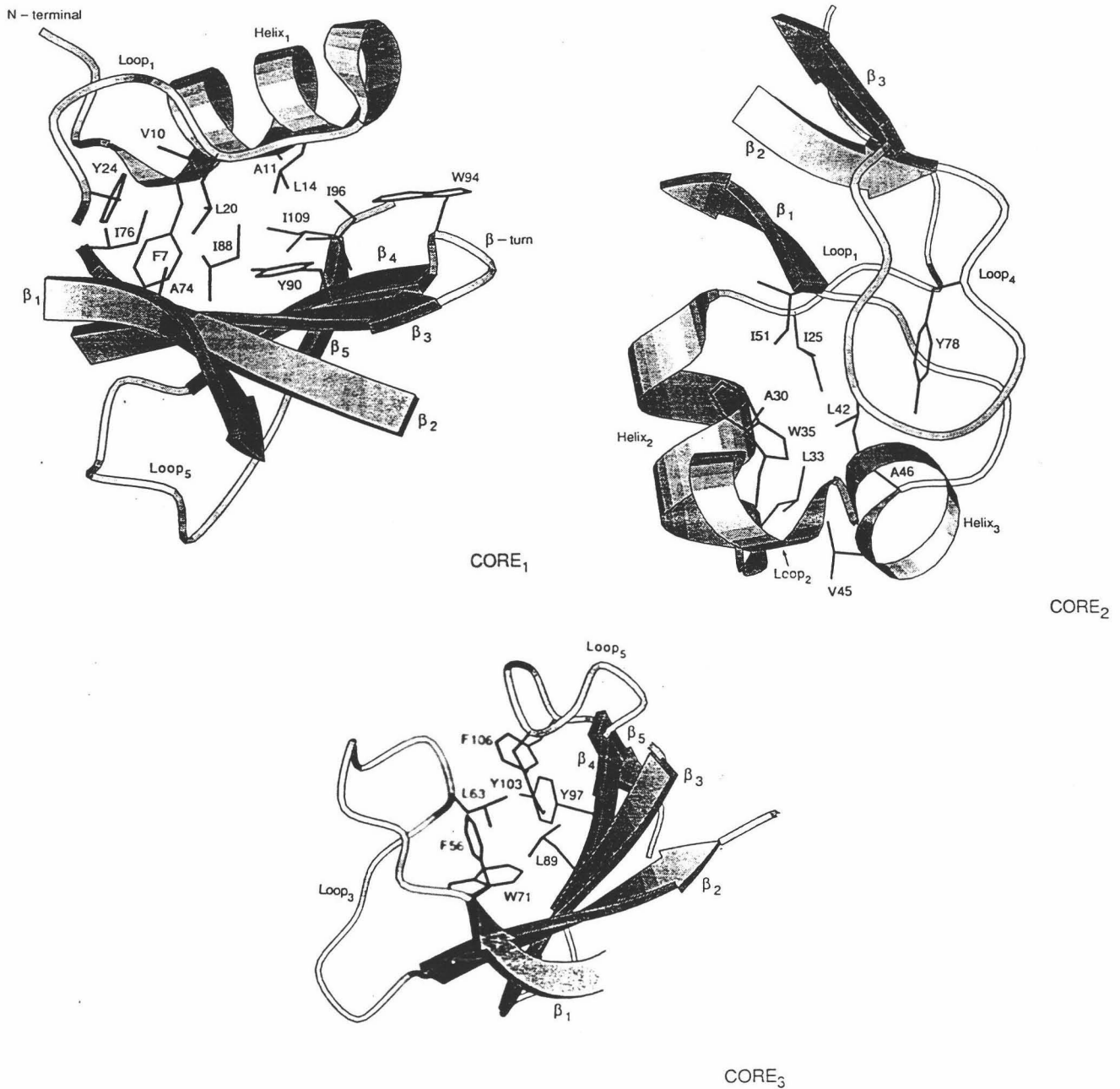


FIGURA 4-2: Perspectivas de los núcleos hidrofóbicos de Barnasa. (A) El core1 es el mayor y está formado por el empaquetamiento de la hélice α_1 con la lámina β , restos Phe7, Val10, Ala11, Leu14 (de la α_1), Leu20, Tyr24 (loop1), Ala74, Ile76 (cadena β_2), Ile88, Tyr90 (cadena β_3), Trp94, Ile96 (cadena β_4) y Ile109 (C-terminal). El core1 se centra alrededor de Ile88. (B) El core2 se compone con loop1 (resto Ile25) y loop2 (Trp35), la hélice α_2 (Ala30 y Leu33), la α_3 (Leu42 y Val45) y la primera cadena β (Ile51). Este núcleo contiene varias moléculas de agua en su estructura. (C) El core3 se forma por el empaquetamiento de Leu63 en el loop3 (de unión de guanosina) en la lámina β , restos Trp71 (β_2), Leu89 (β_3), Tyr97 (β_4) y Phe106 (β_5), Phe56 (loop3) y Tyr103 (loop5). Leu63 y Leu89 se enfrentan entre sí y constituyen la parte central del core3. Los cinco restos

aromáticos componen un círculo en torno a ellos. (Tomado de Serrano et al., 1992c). concreto mutaciones tipo Ile→Val (restos 51, 76, 88 y 96) y Leu→Val (resto 89). Los movimientos estructurales en el núcleo hidrofóbico como consecuencia de la mutación dependen del microambiente local, siendo los más significativos los de las cadenas laterales del resto mutado hacia la cavidad creada.

En general, en el core1 la pérdida de un grupo metileno en la cadena lateral de algún aminoácido resulta en una cavidad que se mantiene, mientras que en el core2 las mutaciones conllevan un mayor movimiento conformacional que permite rellenar la cavidad hasta en un 90%. No existen moléculas adicionales de disolvente en ningún caso [Eriksson et al. (1992) tampoco las encontraron en estudios similares con Lisozima T4]. La existencia de cavidades en el core1 (Figura 4-2) indica que está empaquetado muy rígidamente por lo que la cavidad se mantendrá al ser un reempaquetamiento energéticamente infavorable.

El core2 (ver Figura 4-2) se diferencia de los otros en que posee algunos restos hidrofílicos y sólo uno de ellos, la Ala30, está completamente aislado del disolvente. Estructuralmente se diferencia tanto del core1 como del core3 en que no consiste en una cadena central en torno a la cual se empaquetan otros restos sino que es el resultado de una asociación entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Este core2 contiene tres moléculas de agua y es más flexible ya que se producen mayores cambios estructurales como resultado de la mutación.

Más recientemente se han realizado otro tipo de estudios estructurales con Barnasa que consisten en la descomposición de todo el entramado estructural en módulos. Los módulos son definidos como estructuras compactas o dominios globulares cada uno de los cuales es un segmento polipeptídico continuo con una conformación compacta (Go, 1981). Estas estructuras así definidas se correlacionan con los exones del material genético por lo que se sugiere que podrían comportarse como unidades evolutivas para producir nuevas proteínas al combinarse entre ellas (Go, 1981; Straus & Gilbert, 1985). La Barnasa ha sido

descompuesta en seis módulos (M1-M6) cuyas uniones se definen por las posiciones 24, 52, 73, 88 y 98 (Noguti et al., 1993). Su tamaño varía entre 10 y 28 aminoácidos. Estos módulos en disolución parecen mantener alrededor de la mitad de las estructuras secundarias que originan en la proteína intacta (Ikura et al., 1993).

Los estudios realizados con trifluoroetanol (TFE) hacen que se incremente la población de hélices α pero no cambia su localización. Esto ya fue comprobado por Sancho et al. (1992b) que estudiaron un fragmento N-terminal de Barnasa compuesto por los aminoácidos 1-36. Observaron la formación de las dos hélices α que existen en Barnasa en esas posiciones a un 35% de TFE en disolución. El TFE es una molécula cuyo efecto es estabilizar las estructuras en hélice α en disolución (Wright et al., 1988; Segawa et al., 1991; Dyson et al., 1992a; 1992b)

Por último, cabe citar otro estudio también muy reciente con espectros de CD en diferentes condiciones experimentales (Vuilleumier et al., 1993). Se utilizaron mutantes dirigidos de los restos aromáticos de la Barnasa para estudiar las contribuciones de estos restos al espectro resultante. La proteína "salvaje" presenta un espectro bastante atípico para una estructura α/β con intensidades muy bajas y un mínimo a 231nm en el UV-lejano. Este mínimo es asociado a la presencia del Trp94. En este estudio se encontró que las contribuciones de los Trp son aditivas y constituyen la mayor parte de la intensidad de rotación en el UV-cercano, siendo el resto debida a Tyr78 y Tyr97. En el UV-lejano contribuyen todos los restos aromáticos pero el mínimo a 231nm sólo lo origina el Trp94 como demuestran los experimentos de mutagénesis. Por consiguiente, este resto es la mejor prueba estructural de la Barnasa en estudios de CD mientras que el Trp35 lo es en los estudios de fluorescencia (Loewenthal et al., 1991).

Estas descripciones concluyen que como la desnaturalización química de la Barnasa en presencia de urea presenta curvas idénticas tanto si es seguida por CD como por fluorescencia, la naturaleza global del proceso de desnaturalización detectado es la misma (un proceso de dos estados como veremos a continuación).

4.1.2.- ESTUDIOS DE DESNATURALIZACION (FOLDING/UNFOLDING)

La Barnasa se considera actualmente como un verdadero modelo en los estudios de desnaturalización que intentan explicar cual es el contenido del llamado "segundo código genético" (el camino por el cual una secuencia de aminoácidos es capaz de adoptar una determinada disposición espacial en determinadas condiciones). Prueba de esto es la enorme avalancha de publicaciones que existen en las revistas especializadas (*Biochemistry*, *Journal of Molecular Biology* y *Nature* principalmente) sobre el Barnasa, pudiendo afirmar que es la proteína de la que se dispone de una mayor cantidad de datos relativos a este tema.

Los mayores atractivos que presenta la Barnasa son:

- Presenta una estructura α/β globular y de pequeño tamaño (110 aminoácidos).
- Se han medido los cambios de energía libre en su desnaturalización por diversas técnicas (Kellis et al., 1988; 1989; Sali et al., 1988b; Serrano & Fersht, 1989; Serrano et al., 1990; 1991; Horovitz et al., 1990).
- La proteína desnaturaliza reversiblemente.
- No contiene restos de Cys.
- Sólo tiene tres restos de Pro, todos en conformación *trans* por lo que las complicaciones que surgen por la cinética de la isomerización *cis-trans* son menores (Matouschek et al., 1989; 1990). La ausencia de puentes disulfuro minimiza el contenido en estructuras residuales del estado desnaturalizado.

Los primeros estudios de desnaturalización se realizaron en el laboratorio del Dr. R.W. Hartley (Hartley, 1968; 1969). Son estudios sencillos de desnaturalización térmica o en presencia de urea en los que estudian variaciones en la temperatura de desnaturalización al añadir ligandos o cambiar el pH del medio. Estos estudios comprenden técnicas espectrofotométricas y de filtración en gel principalmente.

En el laboratorio del Dr. A.R. Fersht se procedió después a un análisis exhaustivo de la ruta de desnaturalización de la proteína haciendo uso de la

mutagénesis dirigida. En este tipo de estudios el primer paso sería la identificación (por examen de la estructura tridimensional de la proteína) de una interacción que parezca ser importante para la estabilidad de la estructura para, entonces, eliminarla modificando la cadena lateral del resto por mutagénesis. De esta manera, podemos medir el cambio en estabilidad de la proteína por desnaturalización con urea por ejemplo. Así se irá construyendo una base de datos empíricos que se pueden utilizar para estimar la importancia de las interacciones y refinar cálculos. El segundo paso consiste en medir las velocidades de desplegamiento y replegamiento de los mutantes y utilizar los datos para obtener información sobre los cambios estructurales que acontecen durante el desplegamiento y replegamiento del sitio mutado (Matouschek et al., 1989; 1990). Esto se puede hacer construyendo diagramas de energía donde se representan las diferencias energéticas entre la proteína "salvaje" y el mutante (Winter et al., 1982; Wells & Fersht, 1986; Fersht et al., 1987; Fersht, 1988; Matouschek et al., 1989; 1990).

Esta metodología se ha aplicado al estudio del plegamiento de Barnasa, habiéndose construido y purificado más de 60 mutantes de la proteína en el laboratorio del Dr. A.R. Fersht. La mayoría de los restos mutados son los que presumiblemente existen para mantener la estructura terciaria, independientemente de su implicación en la catálisis o en la unión de ligandos. Esto ha generado una importante base de datos de energías de interacción y ha proveído una gran cantidad de pruebas para analizar el proceso de plegamiento que vamos a tratar de describir a continuación lo más someramente posible.

Las interacciones electrostáticas entre restos expuestos al disolvente o pares iónicos son poco frecuentes en las estructuras y no suelen conservarse evolutivamente (Barlow & Thornton, 1983). El análisis de "double mutant cycles" en Barnasa ha puesto de manifiesto que un puente salino sólo contribuye entre 0.3 y 1 kcal/mol a la energía libre de la proteína (Horovitz et al., 1990; Serrano et al., 1992c) y consecuentemente su contribución a la estabilidad de la proteína es pequeña. Por otra parte, la creación de una carga sin su compañera puede resultar en un mayor efecto desestabilizante, entre 3 y 4 kcal/mol (Fersht, 1972; 1988).

Los puentes de hidrógeno (ver Figura 4-4) son interacciones bastante importantes en la estabilidad pudiendo llegar a ser determinantes en la ruta de plegamiento. La energética de su formación en disolución es compleja pues depende de los cambios entálpicos y entrópicos tanto en el disolvente como en los otros grupos de la proteína (Fersht et al., 1985; Fersht, 1987). Es, por tanto, muy difícil hacer generalizaciones aplicables a todos los tipos de enlaces de hidrógeno debido a su variabilidad. Podemos clasificarlas en tres grupos (Serrano et al., 1992c): primero, las mutaciones en las que los cambios son isostéricos, es decir, se ponen otras cadenas de tamaño similar pero con diferentes propiedades químicas (por ejemplo, Thr \rightleftharpoons Val, Asn \rightleftharpoons Asp). Segundo, las mutaciones en que el grupo responsable del enlace es eliminado (por ejemplo, Ser \rightarrow Ala, Tyr \rightarrow Phe). Tercero, mutaciones en las que se eliminan varios puentes de hidrógeno (Asn \rightarrow Ala, Asp \rightarrow Ala).

Por término medio, un puente de hidrógeno junto con las interacciones de van der Waals asociadas a él, entre dos grupos expuestos al disolvente puede contribuir muy poco, entre 0 y 0.5 kcal/mol. Una excepción es el segmento N-cap de las hélices α (desde 1.5 a 2.3 kcal/mol) (Serrano & Fersht, 1989). En restos no expuestos al disolvente, su contribución dependerá principalmente de la naturaleza del resto mutado, los contactos de van der Waals que origine y del número y tipo de puentes de hidrógeno, aunque suele estar comprendida entre 1 y 2 kcal/mol para cada puente de hidrógeno.

El enterramiento de restos hidrofóbicos es considerado como la mayor fuerza conductora del plegamiento de una proteína y de su estabilidad (tenemos una revisión en Dill, 1990). Es por este motivo que existe una gran cantidad de bibliografía dedicada a la estimación de las contribuciones netas de los restos hidrofóbicos a la estabilidad (tenemos revisiones en Rose et al., 1985; Nakai et al., 1988; y para trabajos experimentales ver Shortle & Meeker, 1986; Kellis et al., 1988; 1989; Alber et al., 1987; Yutani et al., 1987; Matsumura et al., 1988; Shortle et al., 1990; Sandberg & Terwilliger, 1991). Kellis et al. (1988; 1989) han desarrollado un procedimiento para medir cambios energéticos que consiste en

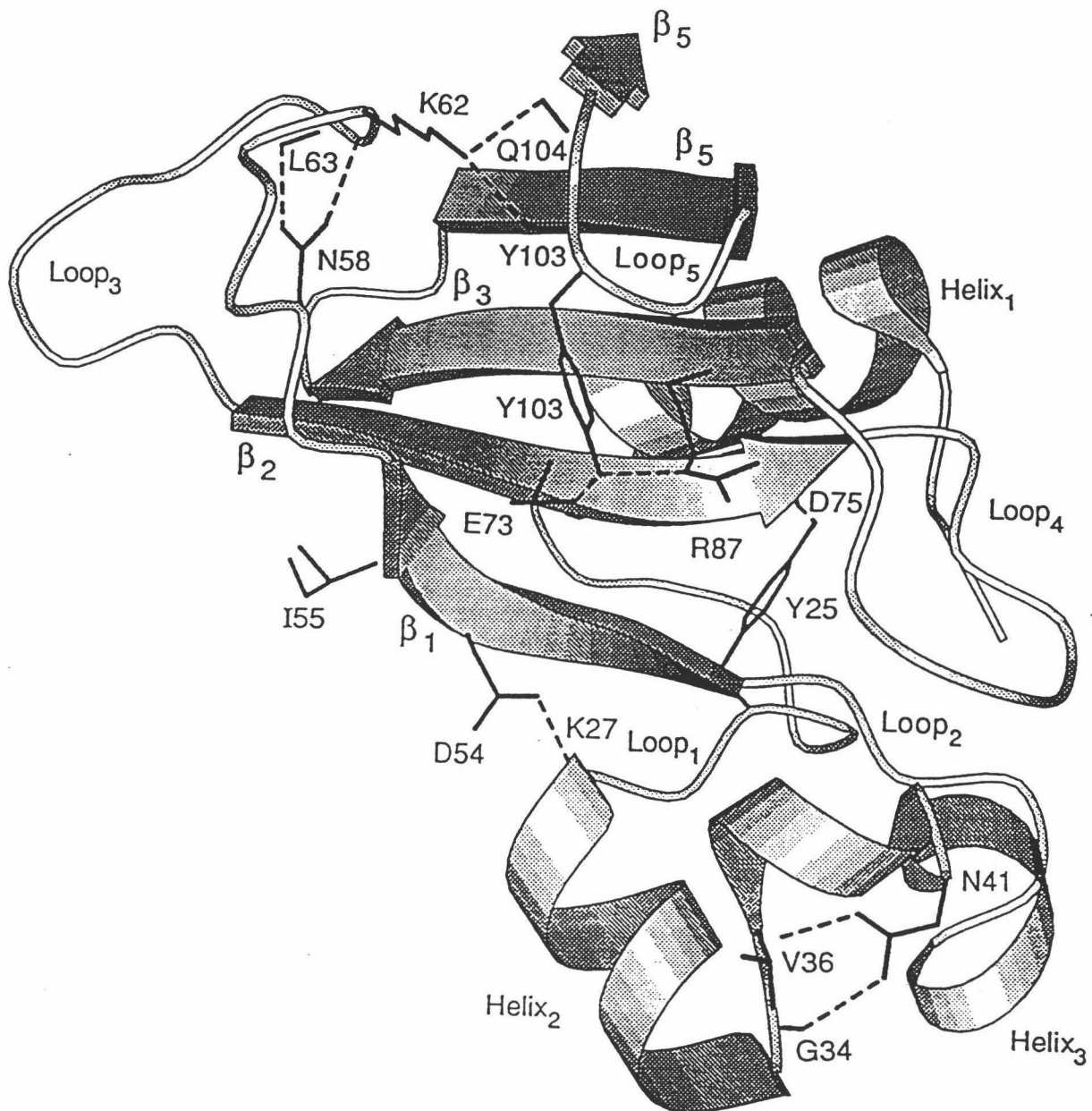


FIGURA 4-4: Vista en perspectiva de algunas de las interacciones terciarias entre elementos de estructura secundaria en Barnasa. Los puentes de hidrógeno se ilustran con líneas discontinuas. (Tomado de Serrano et al., 1992c).

crear cavidades en la proteína truncando las cadenas hidrofóbicas. En concreto, han construido para tal fin 15 mutantes en los que se ha eliminado algún grupo hidrofóbico y han medido los cambios en energía libre de desplegamiento. Han encontrado que la contribución a la estabilidad de un grupo metil (o metileno) es, en promedio, de 1.5 ± 0.6 kcal/mol. Este valor es aditivo para cadenas más largas con lo que la diferencia entre Ile o Leu y Ala esta en torno a 5 kcal/mol. De todas formas, un factor muy importante para la estabilidad del sistema es el efecto de estas mutaciones sobre la densidad del empaquetamiento y, consecuentemente, sobre la rigidez de la estructura (Serrano et al., 1992c).

Basándose en los resultados de sus experimentos cinéticos de desplegamiento y replegamiento, Matouschek et al. (1989) han intentado caracterizar el estado de transición en Barnasa, que según ellos puede componerse de varias estructuras que imitan las fluctuaciones de estructura en los estados plegados. Por tanto, el estado de transición es algo que afecta a toda la macromolécula y no a una serie de enlaces localizados como en un sencillo mecanismo químico. Han estudiado más de 50 mutantes en los que los restos reemplazados se distribuyen estratégicamente por toda la proteína. Representan, por tanto, pruebas locales de estructura en el estado de transición. A cada mutación se le han calculado los cambios en energía libre de desplegamiento y se comparan con la "salvaje" (Serrano et al., 1992c).

El análisis estructural de los datos cinéticos obtenidos sugiere la presencia de una serie de elementos de estructura secundaria en este estado de transición que describiremos un poco a detalle (Figura 4-3):

HELICES α : Los resultados parecen indicar que las dos últimas vueltas de la hélice α_1 se encuentran completamente formadas en el estado de transición mientras que la primera vuelta parece parcialmente desplegada. Para la hélice α_2 sólo existen pruebas de la primera vuelta, que indican que está desplegada en el estado de transición. El resto de la hélice se ha estudiado por RMN (Bycroft et al., 1990; Matouschek et al., 1992b) y sí parece existir alguna estructuración en el

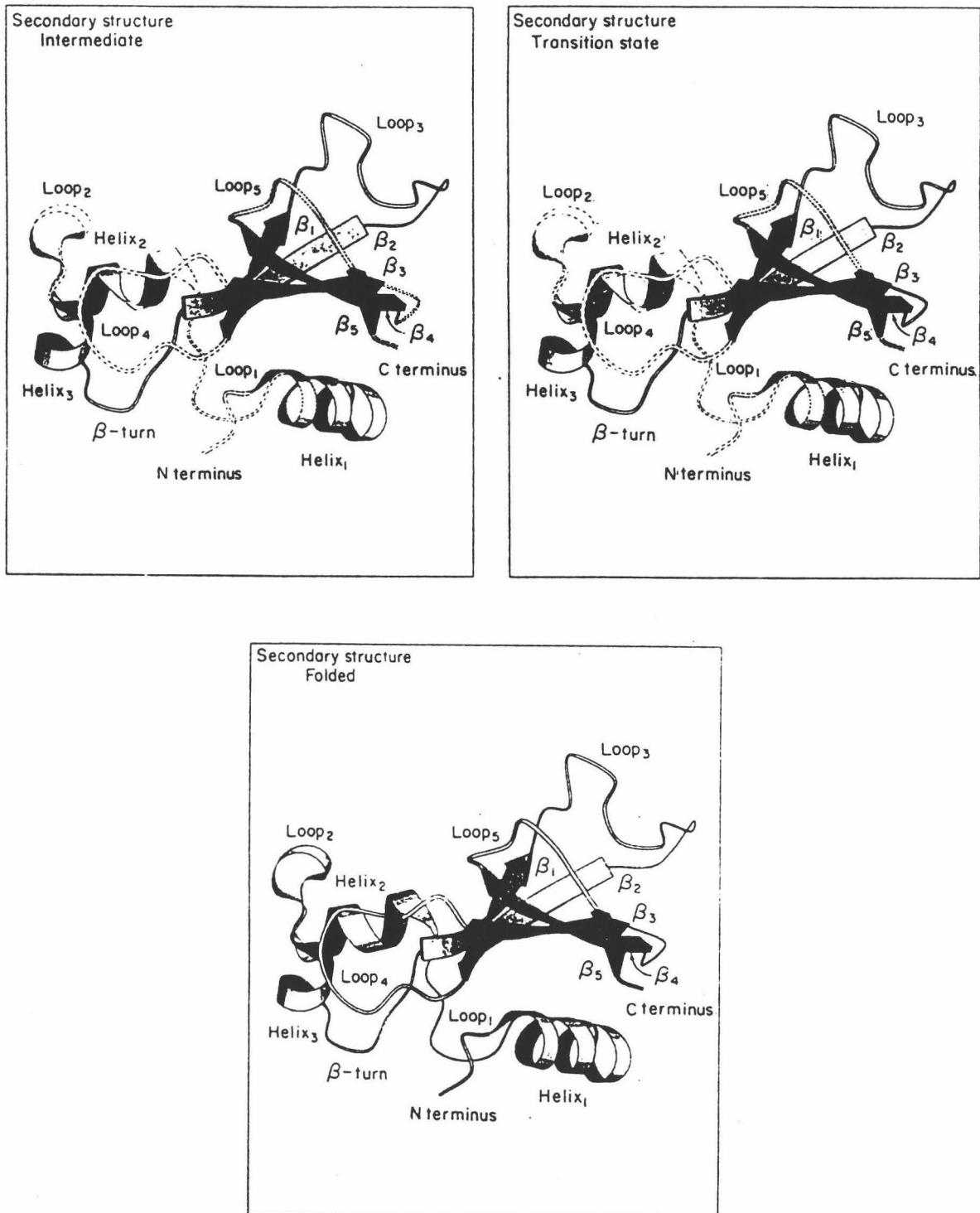


FIGURA 4-3: Estructura de Barnasa en su estado intermedio (izquierda), en su estado de transición (derecha) y en su estado nativo (abajo). Las regiones de estructura secundaria que están desplegadas se representan por líneas a trazos.

estado de transición, sobre todo en la última vuelta de la hélice.

LAMINA β : disponen de nueve pruebas para ella. También han hecho un estudio completo por RMN para el replegamiento de Barnasa que indican que esta organización estructural ya existe en el estado de transición. En una descripción general las tres cadenas β centrales (β_2 , β_3 y β_4) están completamente formadas, mientras que las cadenas β laterales (β_1 y β_5) están presentes pero con enlaces bastante débiles, indicando que se forman más tarde que el resto de la lámina.

EXTREMOS N- Y C-TERMINALES: los primeros restos de la secuencia se encuentran desplegados mientras que los últimos del extremo C-terminal se encuentran en el estado de transición dispuestos en una conformación similar a la del estado nativo.

LOOPS: tenemos cinco loops entre los segmentos de estructura secundaria. Los dos primeros no mantienen sus interacciones en el estado de transición. El tercero (loop de unión para guanosina), en cambio, sí retiene su conformación. Esto está de acuerdo con que la cadena β_3 también la retenga. El cuarto loop está completamente expuesto al disolvente y el quinto y último presenta una estructura algo distorsionada pero muy probablemente se encuentra presente. Estos resultados están de acuerdo con el análisis de la unión de 3'GMP al estado de transición de Barnasa (Sancho et al., 1991).

Los puentes de hidrógeno responsables de la estructura terciaria parecen no existir en el estado de transición o, al menos, los de Asn5, Asn23 y Asp54 no están.

NUCLEOS HIDROFORICOS: el análisis de las seis mutaciones de prueba en el core1 muestra que las interacciones entre los restos de la primera vuelta de la hélice α_1 y la lámina β han desaparecido completamente, con lo que el borde del core1 en el extremo N-terminal de la hélice α_1 está alterado. En el core2 se tienen cuatro mutaciones de prueba en las hélices α_2 y α_3 y en los loops 1 y 2. Este core2 está completamente disgregado en el estado de transición.

Para el core3 sólo tenemos una prueba (Leu89). Está formado por la lámina β y los loops 3 y 5. El análisis indica que el núcleo del pequeño core3 está

totalmente presente en el estado de transición.

Un repaso general de estos resultados sugiere que el estado de transición presenta restos estructurales correspondientes al estado nativo, fundamentalmente a nivel de estructuras secundarias ya que las interacciones de tipo terciario y los loops prácticamente desaparecen en dicho estado. Un núcleo hidrofóbico ha desaparecido completamente y está expuesto al disolvente, mientras que el sitio activo del core3 se encuentra totalmente estructurado. El core1 está debilitado, especialmente por el borde del extremo N-terminal de la hélice $\alpha 1$. Los primeros acontecimientos en el desplegamiento serán, por consiguiente, la desorganización de tres de los cinco loops, de los N-terminales de las hélices, la interrupción de un pequeño núcleo hidrofóbico (core2) y el debilitamiento del núcleo principal.

Otra evidencia experimental importante desarrollada por Fersht y colaboradores y, en cierto modo, relacionada con la anteriormente descrita es la presencia de un intermediario cinético de replegamiento en la renaturalización de la Barnasa. En el procedimiento experimental se empleó una disolución de HCl 32mM (pH 1.5) para desnaturalizar la proteína por efecto del pH y posteriormente renaturalizarla por dilución en un tampón MES 100mM pH 6.3 en proporción 1:1. También se utilizó urea entre 0 y 2M. El proceso se siguió por emisión de fluorescencia a 25°C y se estudiaron más de 40 mutantes dirigidos de la proteína.

Generalmente, este tipo de conformaciones, termodinámicamente estables en determinadas condiciones experimentales (y, por tanto, estudiadas en bibliografía) se caracterizan por mantener un alto contenido de estructuras secundarias y un nivel fluctuante de estructuras terciarias (tenemos revisiones en Ptitsyn, 1987; Kuwajima, 1989). Las características experimentales y estructurales más detalladas las describimos más adelante, en las Secciones dedicadas a CheY y Barstar.

La novedad de la aportación de esta descripción es quizá el estudio de estas estructuras por mutagénesis dirigida, ya que generalmente se hace por técnicas de

fluorescencia, cinéticas, dicroísmo circular o, en algunos casos muy recientes, por CDB. Se construyeron mutantes para servir de prueba de diferentes zonas de la estructura para hacer un seguimiento tanto de interacciones secundarias como terciarias.

Esta gran cantidad de datos experimentales ha llevado a los autores a describir un orden para la distribución temporal de la formación de las subestructuras en Barnasa según el cual la lámina β , las últimas dos vueltas de la hélice $\alpha 1$, la segunda vuelta de $\alpha 2$, la hélice $\alpha 3$, el loop de unión para guanosina (parte del loop3) y la región C-terminal se forman en un primer momento. La vuelta N-terminal de la hélice $\alpha 1$ y la lámina β se consolidan durante el plegamiento. El empaquetamiento hidrofóbico de la hélice $\alpha 1$ con la lámina β (para formar el core1) y el del loop de unión para guanosina con la lámina β (para formar el core3) se encuentran casi totalmente formados muy temprano, pero se consolidan en una segunda etapa que parece ser limitante de la velocidad de la reacción. Esta consolidación afectaría principalmente al core1, concretamente a las interacciones entre estructuras secundarias. El análisis de los mutantes Val \rightarrow Thr sugiere que esta etapa crítica posiblemente comprende la expulsión de moléculas de agua de core1 y core3 (Serrano et al., 1992d; Matouschek et al., 1992a). Por otra parte, la primera vuelta de la hélice $\alpha 2$, parte de los loops 1 y 3, así como el core2 no se completan hasta que la proteína se encuentra completamente plegada. La segunda vuelta de la hélice $\alpha 2$ y la $\alpha 3$ se completan un poco antes, si bien su empaquetamiento con el resto de la estructura no se completa hasta el final, sugiriendo que se pliegan independientemente (Serrano et al., 1992e).

Las conclusiones extraíbles en lo que se refiere a los primeros acontecimientos del replegamiento en Barnasa es que se forman primeramente las estructuras que interaccionan mayormente con la lámina β (hélice $\alpha 1$, loop3 y el extremo C-terminal). Estas interacciones implican predominantemente interacciones de tipo hidrofóbico y el enterramiento de superficies hidrofóbicas muy extensas, en las que se establecen muchos contactos de restos hidrofóbicos entre sí muy estrictamente. Todos estos contactos se establecen en torno a un grupo central de

restos alifáticos (Leu63 y Leu89 en el core3 y Leu14, Ile88 y Ile96 en el core1). También es destacable que no existe ningún enterramiento de restos hidrofílicos en estas regiones y los que resultan parcialmente apantallados del disolvente forman puentes de hidrógeno (caso de Asn58 y Lys62) (Matouschek et al., 1992a).

En cuanto a las regiones más tardías en el plegamiento podríamos decir, contrariamente, que son aquellas que no interaccionan con la lámina β (extremo N-terminal, loop1, core2 y loop4). Estas regiones deben enterrar una extensa superficie hidrofóbica (principalmente el loop1 y el core2), pero no existen restos hidrofóbicos centrales que actúen de núcleo alrededor del cual se empaqueten otros similares. Además, en estas regiones existe un gran enterramiento de restos hidrofílicos (como Asn41, Glu73, Asp75 y Asp86 en core2; Asn77 y Asn84 en loop4).

En definitiva, la combinación de los resultados detallados obtenidos en este caso con los de otras proteínas, indica que la estructura del intermediario se caracteriza por la presencia de una gran proporción de estructuras secundarias, aunque algunas de ellas se encuentren parcialmente formadas. También existen algunas interacciones terciarias en los núcleos hidrofóbicos, sin embargo, están muy debilitadas. Este debilitamiento no es uniforme, afectando más a los lados y tiene una posible explicación en la presencia de moléculas de agua dentro del núcleo para solvatar los restos hidrofóbicos. En este contexto, también es interesante explicar que en estudios con compuestos modelo se ha encontrado que las interacciones hidrofóbicas pueden ocurrir entre cadenas laterales no polares que se separan por una capa de moléculas de agua (Wood & Thompson, 1990). Finalmente, decir que algunas regiones de la proteína, incluyendo los núcleos hidrofóbicos, no se forman en el intermediario pero sí pueden estar parcialmente formadas las estructuras secundarias que las componen (Serrano et al., 1992e).

En otro orden, Pace et al. (1992) han realizado un estudio sobre la dependencia con el pH de la desnaturalización por urea de Barnasa. Anteriormente

ya habían hecho estudios similares con Ribonucleasa A y con la T1 (Pace et al., 1990). Como ya sabemos, la Ribonucleasa T1 es bastante parecida a la Barnasa tanto en secuencia como en estructura y la Ribonucleasa A tiene una característica en común (aparte de su función) y es que posee un punto isoeléctrico en torno a 9 (Hill et al., 1983). Han demostrado, gracias a una técnica espectroscópica denominada "Solvent Perturbation Difference Spectroscopy" (mide el grado de exposición de Tyr y Trp al disolvente) que la Barnasa tiene un estado desnaturalizado que es más "random coil" en 8M de urea que el de la Ribonucleasa T1 que parece desnaturalizar un 25% menos, incluso cuando tiene sus puentes disulfuro rotos.

No debemos olvidar que este trabajo no es el primero en presentar una curva de desnaturalización por urea de Barnasa (el primero fue Hartley en 1968). Incluso se han determinado para la mayoría de sus mutantes (Kellis et al., 1988; 1989; Serrano et al., 1990; Horovitz et al., 1990). Todos los casos coinciden en un valor para $[urea]_{1/2} = 4.6 \pm 0.5$ M a pH 6.3. El $\Delta G_{N,D} = 9$ kcal/mol, valor máximo conseguido a pH 5-6.

En general, el mayor grado de desnaturalización de Barnasa se debe, según los autores, a que entierra más grupos hidrofóbicos en su interior, lo que podría contribuir hasta en 25 kcal/mol a su estabilidad. Además, es capaz de formar hasta 91 puentes de hidrógeno intramoleculares (Serrano et al., 1992d) frente a sólo 86 de la Ribonucleasa T1 (Pace et al., 1990).

Se ha recurrido también a la construcción de puentes disulfuro en Barnasa para comprobar su ruta de desplegamiento. Clarke & Fersht (1993) han hecho esto construyendo uno entre los restos 85-102 (que enlaza dos loops que, sabemos, se empaquetan juntos al principio del plegamiento) y otro entre 43-80 (que une dos estructuras que se empaquetan al final). Gracias a esta estrategia han comprobado por medidas cinéticas su formación porque las curvas obtenidas se alteran en los lugares donde interviene el puente disulfuro ya que estabiliza las estructuras y facilita su empaquetamiento. En general, si un puente disulfuro conecta dos partes

que se empaquetan al principio (caso del 85-102), antes de la etapa limitante del plegamiento, provoca una estabilización relativa del estado de transición y del intermediario respecto al estado desnaturalizado. En caso contrario (puente entre 43-80) los tres estados se desestabilizan en igual proporción.

Muy en la línea anterior, Sanz & Fersht (1993) afirman que sería posible estabilizar un estado intermedio de plegamiento creando mutaciones que desestabilicen el estado nativo respecto de él. De esta manera, la acumulación de tales mutaciones podría originar que el intermediario fuese la especie más estable en determinadas condiciones experimentales. Si esto fuera posible se podrían tener evidencias directas tanto de su estructura como de su comportamiento.

Un trabajo más reciente (Kippen et al., 1994) consiste en la fragmentación de la enzima en dos trozos, uno con las hélices α (fragmento 1-36) y otro con la lámina β (37-110) para evitar las interacciones de tipo terciario que se forman entre ellas, con lo que estas regiones adoptarían la misma conformación que tendrían al comienzo del proceso de plegamiento. En este caso, la unión de ambos fragmentos daría como resultado una especie con propiedades enzimáticas y estructurales similares a las de la proteína intacta que ha sido estudiada por Fersht y colaboradores (Sancho & Fersht, 1992; Sancho et al., 1992b).

Ya por último, Freire & Xie (1994) han hecho un estudio de tipo teórico en el que han intentado aplicar los datos termodinámicos del desplegamiento (entalpía y cambio en capacidad calorífica) de Barnasa (existentes ya en Bibliografía como comentaremos seguidamente) para hacer un estudio predictivo de su "molten globule". Han utilizado un estudio suyo anterior en el que realizaron una parametrización estructural de los datos termodinámicos (Murphy et al., 1992) según el cual, la capacidad calorífica relativa de un estado conformacional arbitrario puede ser expresada en términos de la diferencia en áreas superficiales accesibles polares (ΔA_{pol}) y apolares (ΔA_{ap}) entre ese estado y el nativo (tomado como estado de referencia) según:

$$\Delta C_{p,N,D} = 0.45 \cdot \Delta A_{ap} - 0.26 \cdot \Delta A_{pol} \quad (4.1)$$

donde 0.45 y -0.26 son las contribuciones elementales por Å² de las áreas polares y apolares expuestas al agua (en cal/K·mol). Estos valores se obtienen a partir del análisis estadístico de un conjunto de proteínas de las que se dispone de información estructural suficiente y del estudio termodinámico de dipéptidos en disolución (Murphy & Freire, 1992). La exactitud en la determinación de $\Delta C_{p,N,D}$ es de un $\pm 9\%$.

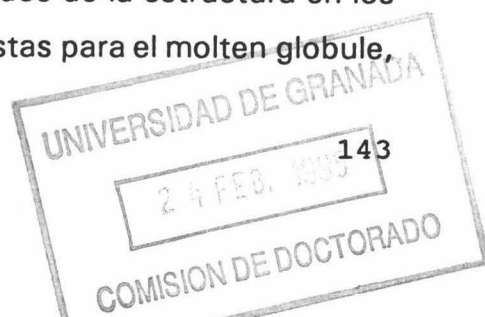
En cuanto al cambio de entalpía, aquí tenemos varias contribuciones que hay que tener en cuenta, aunque más del 90% del cambio entálpico se debe a tres hechos principales: **1)** contribuciones polares que surgen como consecuencia del cambio en el número de puentes de hidrógeno, **2)** interacciones de van der Waals entre grupos polares y apolares y **3)** contribuciones que surgen de la hidratación de grupos que se expongan al disolvente durante el cambio conformacional. Matemáticamente, obtienen que:

$$\Delta H_{N,D}(T) = 34.5 \cdot \Delta A_{pol} + \Delta C_p(T-100) \quad (4.2)$$

Esta parametrización para $\Delta C_{p,N,D}$ y $\Delta H_{N,D}(T)$ ha sido utilizada para predecir los parámetros de desnaturalización de varias proteínas (Murphy et al., 1992; Thompson et al., 1993), la unión de péptidos a proteínas (Murphy et al., 1993) y para cálculos energéticos de estados parcialmente plegados (Hayne & Freire, 1993).

El análisis de datos termodinámicos con proteínas tales como α -Lactalbúmina o Citocromo C nos indica una elevada proporción de interacciones polares y apolares rotas en el estado de molten globule pero no todos los estados parcialmente desplegados exponen la misma proporción de estas superficies ya que su distribución en las proteínas no es regular. De todas maneras, suele estar en torno a un 20-25% mayor en el molten globule respecto al estado nativo.

El algoritmo utilizado es capaz de identificar estados de la estructura en los que se cumplen las restricciones termodinámicas impuestas para el molten globule,



utilizando la estructura nativa como una plantilla que se descompone en unidades que se corresponden con elementos de estructura secundaria. En el caso de la Barnasa tendríamos ocho unidades:

UNIDAD	SECUENCIA
1	(2-22)
2	(23-40)
3	(41-49)
4	(50-58)
5	(59-69)
6	(70-76)
7	(77-84)
8	(85-110)

lo que nos da un total de $2^8 = 256$ estados totales. De todos ellos sólo seis cumplen las restricciones impuestas y, curiosamente, todos presentan algunas características en común como que las unidades 1 y 8 están plegadas y las 2, 5 y 7 desplegadas. La unidad 6 está plegada en cuatro de ellos. Estos resultados sugieren que la primera hélice junto con la mayor parte de la lámina β y el loop 5 forman el núcleo hidrofóbico de la proteína que está presente en el molten globule. Todo esto estaría de acuerdo con lo predicho por Fersht et al. y que ha sido comentado anteriormente. La única región ambigua sería el loop 3 que constituye el sitio de unión para guanosina que según este estudio siempre estaría desplegado. De todas maneras, en los estudios de cristalografía tenemos una molécula de nucleótido unida que afectaría a la estabilidad de este loop.

La relación de áreas superficiales polares respecto a las apolares es de 0.77-0.87 para el molten globule respecto a 0.66 para el estado desnaturalizado, lo que

indica que el estado intermedio se estabiliza principalmente por fuerzas de tipo hidrofóbico, como ya apuntaron Serrano et al. (1992e) que dicen que los primeros acontecimientos en el plegamiento se caracterizan por el encerramiento de superficies hidrofóbicas casi exclusivamente.

Desde un punto de vista entálpico, este estado puede ser energéticamente no favorable, es decir, su estabilización tiene necesariamente un origen entrópico, puesto que el molten globule presenta una entropía configuracional menor que el estado desnaturalizado.

4.1.2.1.- ESTUDIOS DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO

El trabajo que describimos en Resultados y Discusión se publicó en *Biochemistry* en 1994 (Martínez et al., 1994). Es la primera caracterización termodinámica de la desnaturalización térmica de Barnasa a pH ácido y en presencia del inhibidor 3'GMP a pH 4.5. En él incluimos la descripción de varios métodos (alguno de ellos novedoso) para estimar los parámetros de la unión a partir de datos de CDB a varias concentraciones de ligando total. Además, el estudio de la desnaturalización de la proteína en función del pH demuestra que la proteína sigue un modelo reversible de dos estados con un cambio de entalpía mayor que el esperado para una proteína de su tamaño.

Dos años antes, en 1992, tenemos conocimiento de unos datos obtenidos por Makarov et al. (1992) en un calorímetro DASM-1M que presentan un desdoblamiento de la curva a pH 2.5 y baja fuerza iónica. Los comentarios y comprobaciones hechas por nosotros se detallan en Resultados y Discusión aunque adelantamos que muy posiblemente se deban a algún proceso de desnaturalización parcial de la estructura que ocurre a baja fuerza iónica y con una cinética apreciablemente lenta. En este proceso también parece influir la geometría de las células calorimétricas y es bastante complejo. Existe otro trabajo más reciente (Sanz et al., 1994) realizado en un MicroCal MC-2D con la proteína "salvaje" y algunos mutantes que ayuda a confirmar estas consideraciones. En cualquier caso, la finalidad de este estudio es comprobar la acumulación del estado intermedio en

el plegamiento estabilizándolo introduciendo mutaciones que desestabilizan el estado nativo respecto de este estado. Es, por tanto, una comprobación experimental por CDB de la acumulación de dicho estado predicho por ellos anteriormente (Sanz & Fersht, 1993), en lo cual la técnica parece ser bastante útil.

En el laboratorio del Dr. Privalov han desarrollado otro trabajo de CDB de la desnaturalización de Barnasa a pH ácido que ha arrojado resultados muy parecidos a los nuestros y que ha aparecido en prensa recientemente (Griko et al., 1994). Como aportación novedosa, destaca la aplicación del cálculo de las áreas superficiales accesibles polares y apolares de la proteína para obtener las contribuciones de hidratación tanto a la entalpía (Makhatadze & Privalov, 1993) como a la entropía y a la energía libre de Gibbs (Privalov & Makhatadze, 1993).

4.1.3.- ESTUDIOS DE UNION A NUCLEOTIDOS

La función catalítica de la Barnasa consiste en la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en la posición 3' de los nucleótidos componentes del ARN (Hill et al., 1983). En general, las ribonucleasas microbianas catalizan la hidrólisis del ARN en dos pasos (figura 4-5): el primer paso es la etapa de transesterificación en la que se forma un intermediario cíclico 2'-3' seguido después por la hidrólisis de éste para originar un nucleótido 3'-monofosfato (Mossakowska et al., 1989; Day et al., 1992). Esto se consigue gracias a dos restos conservados, la His102 y Glu73 en Barnasa, que actúan como un par ácido-base durante la catálisis (Mossakowska et al., 1989). Tenemos también un resto de Arg, Arg87 en Barnasa, que ayuda a mantener la arquitectura del sitio activo y también interacciona con el grupo fosfato del nucleótido (Meiering et al., 1991). Otro resto, la Lys27, apunta hacia el sitio activo y forma varios contactos de van der Waals e interacciona también con el 3'-fosfato. La His102 hace lo propio con los restos 84-86 y el Glu73 forma interacciones electrostáticas muy fuertes con la Arg87, Arg83 y Lys27 (Guillet et al., 1993a). En la Figura 4-6 podemos ver la disposición relativa de estos restos en la estructura del sitio activo de la proteína. La Barnasa, en concreto, presenta una gran especificidad por la Guanina y es a este nivel donde suele producir el corte.

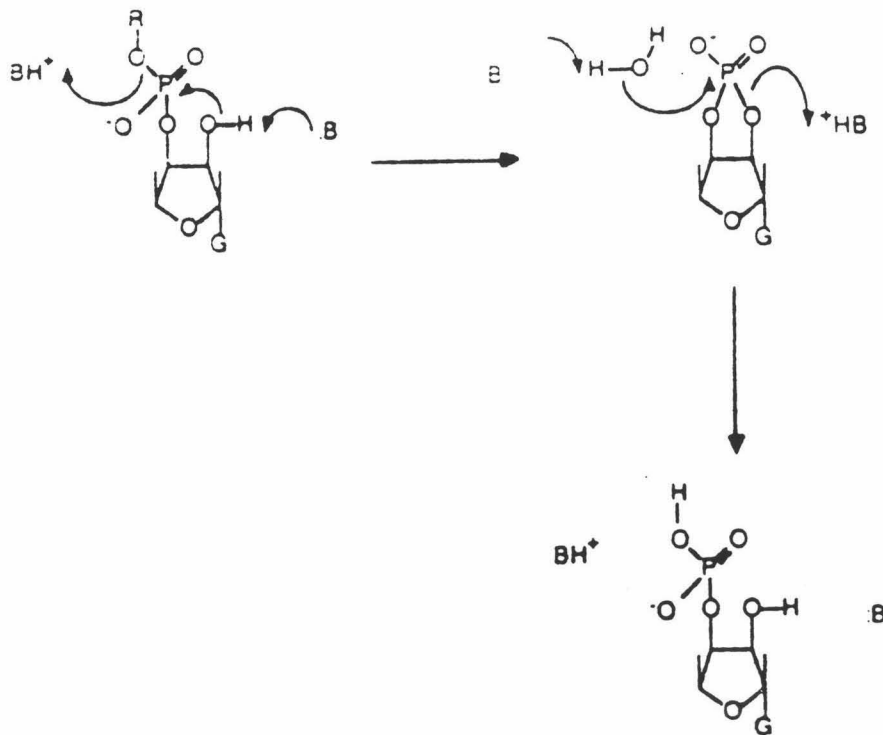


FIGURA 4-5: Mecanismo clásico de acción propuesto para las ribonucleasas. El primer paso consiste en una transesterificación (o ciclación) entre la base general (Glu73 en Barnasa) y el ácido general (His102). El papel de los restos se invierte en el segundo paso de hidrólisis. (Tomado de Mossakowska et al., 1989).

En la unión del nucleótido (y, por tanto, en la especificidad) interviene un loop compuesto por la secuencia Phe56-Ser57-Ans58-Arg59-Glu60-Gly61 donde los restos marcados son los más conservados (Sevcick et al., 1990).

En todo caso, la especificidad por guanosina, también en Binasa, se pierde bastante cuando hidrolizan restos de más de 4-5 bases de largo. Esto ha sido atribuido a la existencia de otros sitios de unión secundarios (Mossakowska et al., 1989) que además contribuyen aumentando la velocidad de hidrólisis (Day et al., 1992). Un estudio de modeling molecular con un ribonucleótido 5'3' (ApAp2'3'GMPApAp) (Gordon et al., 1991) ha confirmado estos resultados indicando que la Phe82 podría ser un buen candidato para un segundo sitio de unión para bases.

Dada la especificidad de la Barnasa por la guanosina en la hidrólisis de ARN y que por tanto el 3'GMP actúa como un inhibidor de su acción catalítica, se ha puesto de manifiesto la importancia de aclarar y conocer bien esta interacción. Los primeros estudios de cristalografía de rayos X se han realizado con un dinucleótido d(GpC) que se localiza en una suave hendidura que forma el sitio activo (Baudet & Janin, 1991). La estructura del complejo Barnasa-3'GMP no se resolvió hasta bastante después y hasta ese momento, en los pocos estudios de unión de ambas moléculas que existen en bibliografía se recurría a la estructura cristalina del complejo Binasa-3'GMP (Pavlovsky et al., 1988; Sevcick et al., 1990), teniendo en cuenta que Binasa y Barnasa presentan un 80% de similitud en su secuencia (Hill et al., 1983). En este complejo se mostró que los restos equivalentes a Lys27 y His102 en Barnasa forman interacciones electrostáticas con el grupo fosfato del ligando y el Glu60 forma dos puentes de hidrógeno con el grupo amino del anillo de la guanina. La estructura cristalina por rayos X (Guillet et al., 1993a; 1993b) y en disolución por RMN (Meiering et al., 1993) del complejo Barnasa-3'GMP se ha resuelto recientemente y en la Figura 4-6 tenemos los contactos que se forman en el sitio activo entre las dos moléculas. Según estos estudios, las cadenas laterales de Lys27, Arg83, Arg87 y His102 se encuentran muy cerca del fosfato del 3'GMP formando posibles interacciones electrostáticas con él. La base de guanina interacciona con los restos del loop de unión (Phe56, Ser57, Arg59 y Glu60 principalmente). El Glu73 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno 2' del nucleósido.

Por efecto de la unión del 3'GMP la Barnasa no presenta cambios conformacionales importantes y ocurren sobre todo en el loop de unión de guanosina. Incluso, el sitio activo parece convertirse en una estructura menos flexible sin que esto influya en el resto de la proteína (Meiering et al., 1993). Un efecto parecido se ha encontrado en la Ribonucleasa T1 (Shimada & Inagaki, 1990).

Un hecho bastante interesante observado por varios autores es que existe una cierta libertad conformacional en el 3'GMP cuando se encuentra unido a

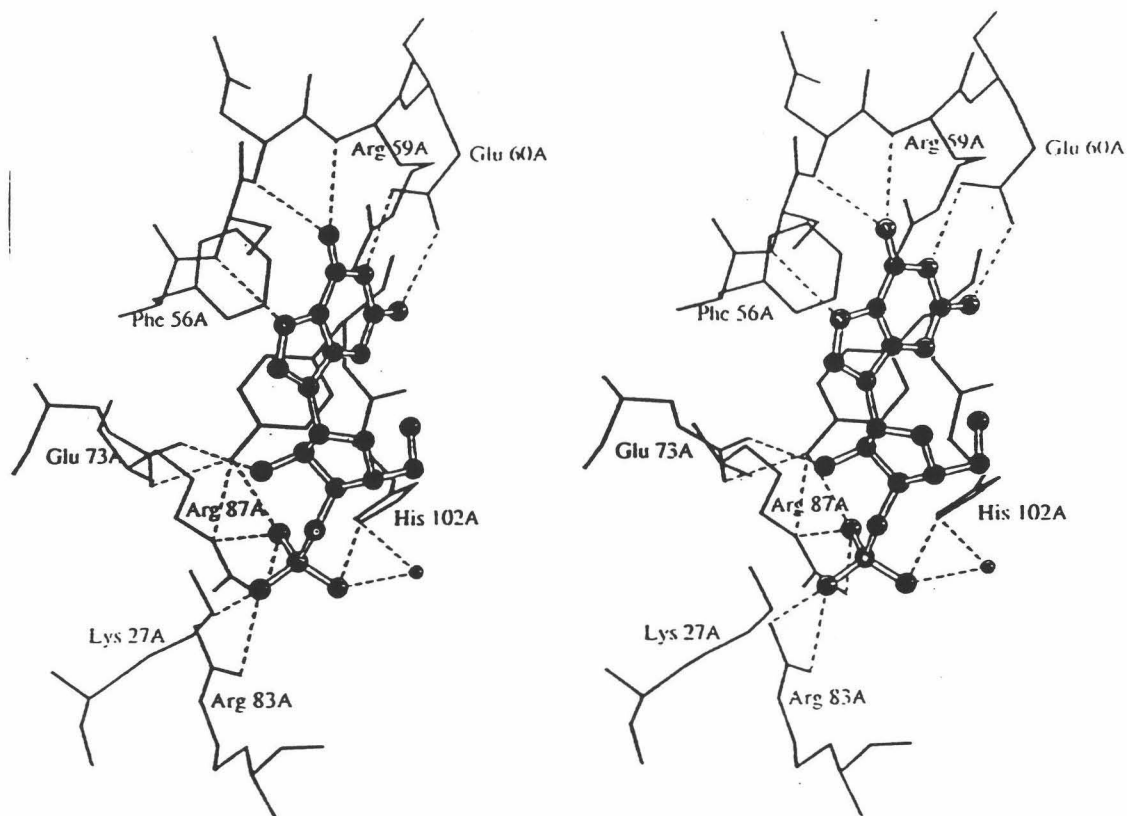


FIGURA 4-6: Esquema mostrando los contactos entre 3'GMP y Barnasa en el sitio activo. La molécula de 3'GMP se ilustra con puntos negros y las líneas de trazo discontinuo representan los puentes de hidrógeno. En la figura tenemos también una molécula de agua (punto pequeño) que forma dos puentes de hidrógeno con His102 y con un oxígeno del fosfato. (Tomado de Guillet et al., 1993b).

algunas ribonucleasas microbianas como T1, Binasa o Barnasa (Pavlovsky et al., 1988; Sevcick et al., 1991; Meiering et al., 1993) ya que estas diferentes conformaciones quedan "congeladas" en los cristales de rayos X. Esto se explicaría porque como el 3'GMP es el producto de la hidrólisis de estas enzimas, se intenten minimizar las interacciones con el nucleótido para promover su disociación.

Aunque la Barnasa ha sido ampliamente estudiada como modelo en el análisis de los efectos que contribuyen a la estabilidad de las proteínas y sus mecanismos de plegamiento, se han realizado muchos menos estudios en

proporción de unión de ligandos. Meierenig et al. (1991) han caracterizado la unión del fosfato a la Barnasa y a algunos mutantes del sitio activo (HA102, KA27 y RA87) 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 se une una sola molécula de fosfato a Barnasa con una constante de equilibrio de 700 M^{-1} a pH 4.5, y que el sitio de unión es específico para el fosfato. Parecen existir, además, varios sitios no específicos, diferentes del sitio catalítico, y de baja afinidad a los que puede unirse el fosfato cuando esté en elevada concentración (Day et al., 1992). En el caso de los tres mutantes estudiados se ha encontrado una disminución en la afinidad de la unión, lo que indica que el fosfato se une al sitio activo de la Barnasa. Esta disminución en la actividad se interpretó como el resultado de la eliminación de cargas positivas que interaccionan electrostáticamente con el fosfato.

En cuanto a datos de tipo termodinámico, sólo existe en bibliografía en estudio de Sancho et al. (1991) que consiste en el desplegamiento por urea de Barnasa en presencia de 3'GMP en donde se determinó el ΔG de interacción del ligando con la forma nativa y la del estado de transición a pH 6.3. En nuestro laboratorio se han realizado unos experimentos que son la primera caracterización termodinámica directa y completa de esta interacción por calorimetría isotérmica de titulación (El Harrous, 1994; Martínez et al., 1994) y por calorimetría diferencial de barrido (que es parte del trabajo experimental que describiremos a continuación).

En definitiva, hoy en día está descrita toda la ruta de desplegamiento de la Barnasa y existe una enorme cantidad de mutantes de toda su estructura. Las determinaciones energéticas hechas hasta ahora son importantes pero indirectas a partir de medidas espectroscópicas o cinéticas. Con la CDB podemos abordar este problema directamente, midiendo los parámetros termodinámicos en cada caso. Aquí hemos abordado la primera etapa haciendo una descripción termodinámica exhaustiva de la Barnasa salvaje y describimos someramente tres mutantes del sitio activo y otro de la hélice $\alpha 1$. Aparte, vamos a describir una

nueva metodología para el cálculo de interacciones proteína-ligando que hemos aplicado, de hecho, a la interacción Barnasa-3'GMP que parece tener una dinámica similar a la de otras interacciones proteína-nucleótido.

4.2.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

Hemos utilizado la Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) para caracterizar la estabilidad térmica de Barnasa en el intervalo de pH 2.0-10.5. También para obtener los datos termodinámicos de la interacción con su inhibidor 3'GMP a pH 4.5 y a temperaturas superiores a la T_m y así poderlos comparar con los obtenidos por Calorimetría de Titulación (CIT) a 15-30°C (El Harrous, 1994; Martínez et al., 1994).

La Barnasa fue purificada en Cambridge por el equipo del Dr. A.R. Fersht según describen Serrano et al. (1990) y antes de realizar los experimentos se dializó frente al tampón adecuado (ver Materiales & Métodos). La medida de concentración se hizo a partir de la absorbancia de la disolución a 280nm utilizando un coeficiente de extinción de $2.21 \text{ mg}^{-1}\text{mLcm}^{-1}$ (Loewenthal et al., 1991; esta Memoria).

Para la mayoría de los experimentos se utilizó un calorímetro DASM-4 a velocidades de barrido de 1 y 2 K/min y con concentraciones de proteína en torno a 1.5 mg/mL. El efecto de la concentración de proteína se comprobó a pH 4.5 (utilizado también para los experimentos con 3'GMP) con un amplio intervalo de concentraciones desde 0.8 a 4 mg/mL. También se hicieron algunos experimentos en un calorímetro DASM-1M (ver Materiales & Métodos). Para el cálculo de la capacidad calorífica molar parcial se utilizó para la Barnasa un volumen específico parcial de 0.73 mL/g (valor medio para muchas proteínas confirmado por su cálculo en Makhatadze et al. (1990) y 12.4 kDa de peso molecular (Hartley & Barker, 1972).

La reversibilidad del proceso se chequeó rutinariamente volviendo a calentar las muestras después de enfriar hasta 4°C dentro de la célula calorimétrica.

4.2.1.- EXPERIMENTOS A pH ACIDO

La desnaturalización térmica de la Barnasa es un proceso altamente reversible por debajo de pH 5 y sobre pH 10, mientras que a pH neutro es mucho menor, debido a la agregación de las moléculas desnaturalizadas que tienen una

TABLE 4-I
PARAMETROS TERMODINAMICOS PARA LA DESNATURALIZACION TERMICA DE
BARNASA A pH ACIDO

pH	T _U (°C)	ΔH _{N,D} (T _U) (kJ/mol)	ΔS _{N,D} (298) ^a (kJ/K·mol)	ΔG _{N,D} (298) ^a (kJ/mol)	ΔG _{N,D} (298) ^b (kJ/mol)
2.0	23.8	345	1.189	-3.4	-1.9
2.5	31.4	394	1.151	7.8	7.6
3.0	39.4	449	1.115	18.4	21.7
3.5	46.5	497	1.082	28.4	31.7
4.0	50.3	523	1.063	34.0	35.6
4.5	52.8	540	1.051	37.7	37.9
5.0	53.7	546	1.046	39.1	38.7

^a Estos parámetros fueron calculados a partir de la regresión lineal de los datos experimentales de acuerdo con la ecuación (4.3) y de los valores experimentales de T_U en función del pH. ^b Cambios en la energía de Gibbs calculados con la dependencia con la temperatura de ΔC_{p,N,D} según la ecuación (4.19) a ΔH_{N,D}(298.2)=344 kJ/mol (el mejor valor obtenido a partir de la regresión polinómica).

carga neta próxima a cero (pl 8.9 según A.R. Fersht, comunicación personal).

La región alcalina es mucho menos deseable que la ácida para estudios de desplegamiento térmico a causa de los elevados calores de ionización de los grupos amino y la gran dependencia del pH con la temperatura de los tampones. Por tanto, para caracterizar la estabilidad térmica de la Barnasa hemos hecho experimentos de CDB en el intervalo de pH 2.0-5.0 en tampones 50mM de Glicina/HCl (pH 2.0-3.5) y Acetato Sódico/HCl (pH 4.0-5.0). En este intervalo, la proteína desnatura en equilibrio con una reversibilidad mayor del 90% y no presenta dependencia apreciable con la velocidad de barrido o la concentración de muestra, como ya hemos apuntado.

En el análisis de datos hemos empleado algoritmos de ajuste no lineal según el modelo de dos estados (ver Materiales & Métodos) para obtener los parámetros

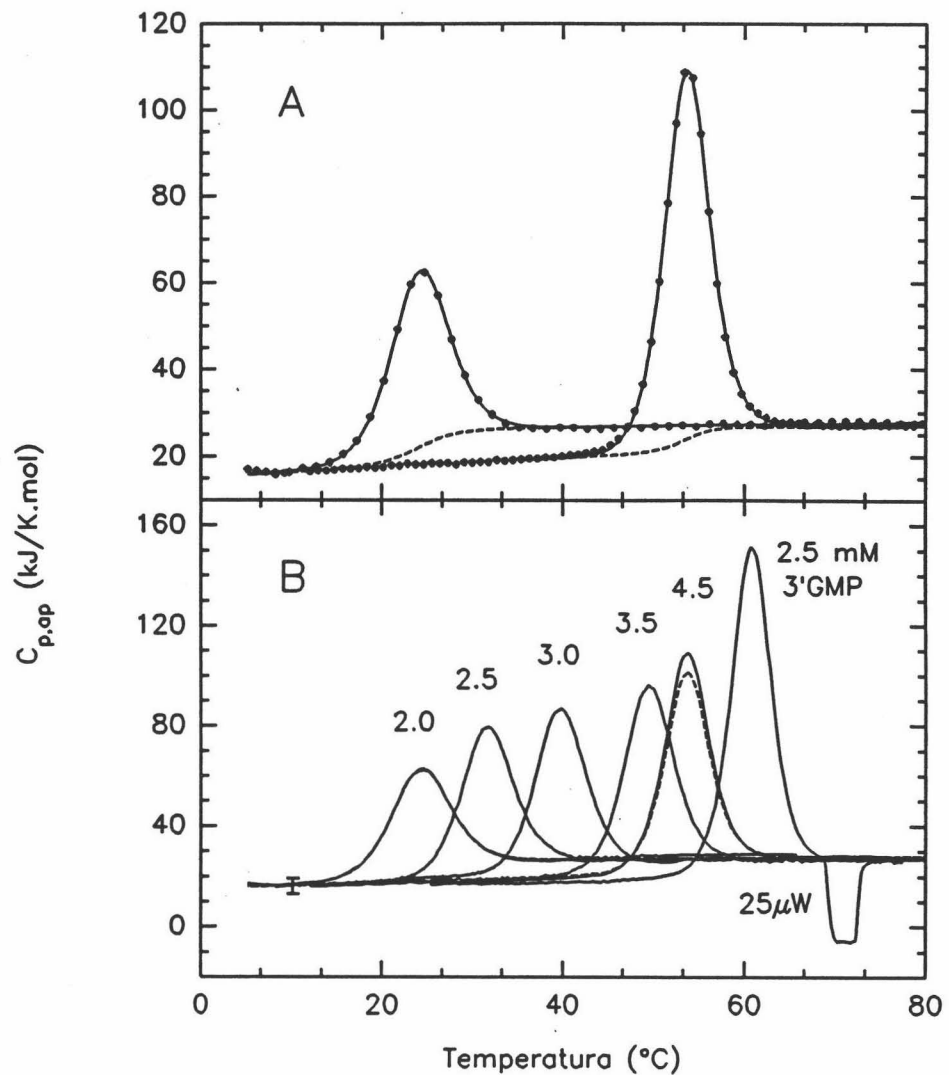


FIGURA 4-8: (A) Registros de CDB de capacidad calorífica molar parcial para Barnasa a pH 2.0 y 4.5 (●) y sus mejores ajustes a una transición de dos estados (líneas continuas). Las líneas sigmoidales a trazos se corresponden con la capacidad calorífica interna o química calculada en el ajuste. (B) Dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica molar parcial de Barnasa a varios valores de pH (puestos encima de cada transición). Las curvas correspondientes a pH 2.5, 3.5 y 4.5 fueron registradas a una velocidad de barrido de 1 K/min y las otras a 2 K/min. La concentración de proteína estuvo comprendida entre 1 y 2 mg/mL, excepto a pH 4.5 donde fue de 3.6 mg/mL. La línea a trazos representa el segundo barrido a pH 4.5. El calibrado de 25μW(31.9 kJ/K·mol) se registró a 1 K/min. La barra de error a 10°C representa la dispersión en la posición de las curvas en la escala de capacidad calorífica. También presentamos la curva de CDB en presencia de 2.5mM de 3'GMP, pH 4.5.

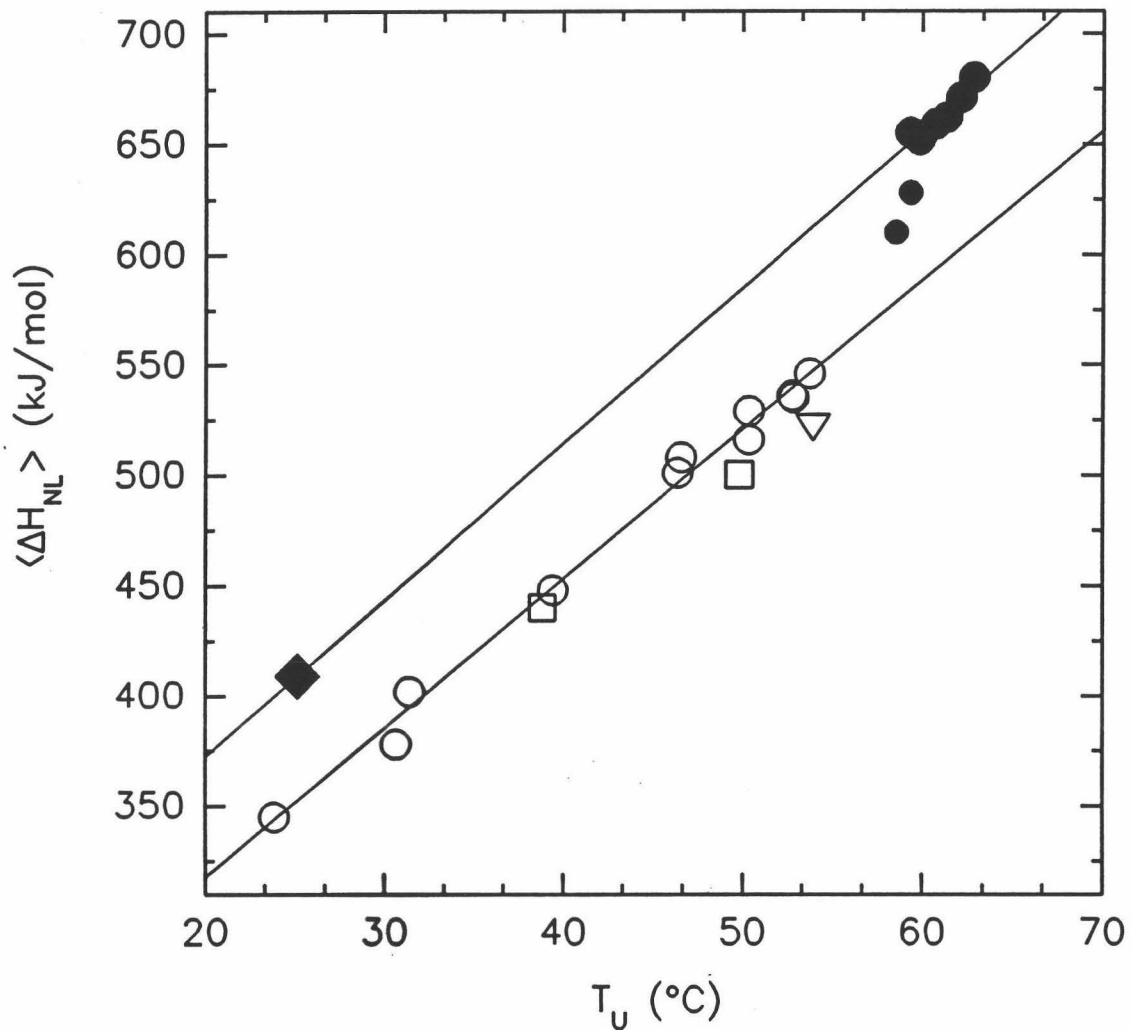


FIGURA 4-9: Dependencia de $\Delta H_{N,D}$ con T_U para Barnasa libre (símbolos huecos) y en presencia de 3'GMP (símbolos llenos) de acuerdo con este estudio (○) y con la bibliografía (□, ▽). Los datos se han obtenido a concentraciones totales de 3'GMP entre 0.2 y 10mM, pH 4.5, y a una concentración de proteína en torno a 0.15mM. Para una comparación, las entalpías de van't Hoff obtenidas por Kellis et al. (1989) (□) y Hartley (1968) (▽) se muestran también en la figura. Las líneas rectas se corresponden con el ajuste por mínimos cuadrados de nuestros propios valores. El valor de $\Delta H_{N,D}(298)$, calculado como se describe en el texto, se representa por "◆".

de desnaturalización a partir de la ecuación que nos da la variación de la capacidad calorífica con la temperatura pues, como vemos en la Figura 4-8 este modelo ajusta perfectamente los datos experimentales. Además, los valores de $\Delta H_{N,D}$ obtenidos

de los ajustes al modelo coinciden (tabla 4-I), entre los límites de error, tanto con la entalpía calorimétrica, $\Delta H_{N,D}^{cal}$ (obtenida a partir del área bajo la curva experimental) como con la de van't Hoff (calculada a partir de su forma) (Privalov & Potekhin, 1986).

Debido a su elevado valor absoluto hemos podido determinar la entalpía con tan sólo un 5% de error, aunque el $\Delta C_{p,N,D}$ se calculó con un error un poco mayor. Las razones de esto las explicamos en el caso del Dominio SH3 de α -espectrina donde ya comentábamos las dificultades que surgen a la hora de extrapolar el $C_{p,N}$ a todo el intervalo de la transición calorimétrica, siendo peor cuando la T_U decrece. Por debajo de pH 3.0 la proteína comienza a desnaturizar a temperatura ambiente y es mucho más difícil calcular la pendiente con exactitud [Figura 4-8(B)]. La incertidumbre se podría estimar en torno al 13%, con un valor medio de 6.2 kJ/K·mol. Este dato es un 10% menor que la pendiente de la línea de regresión de los datos (Figura 4-9) a la que corresponde la siguiente ecuación empírica:

$$\Delta H_{N,D}(T) = \Delta H_{N,D}(T_0) + \Delta C_{p,N,D}(T-T_0) = 351 + 6.8(T-298.2) \quad (kJ/mol) \quad (4.3)$$

Utilizando esta ecuación podremos, por tanto, calcular los cambios de los parámetros termodinámicos a diferentes valores de pH.

4.2.2.- ESTUDIOS A MAYORES VALORES DE pH

La reversibilidad de la Barnasa decrece muy rápidamente por encima de pH 5.0, siendo el proceso de desnaturización a pH 7.0 prácticamente irreversible y se forman agregados visibles en la disolución de proteína si se calienta por encima de la transición. Esto se mantiene hasta pH 10.0 donde la proteína vuelve a calentarse reversiblemente, acontecimiento que va asociado a una disminución muy acusada de la T_m . Los tampones utilizados en cada experimento se presentan junto con el resto de los datos en la tabla 4-II y en la Figura 4-10 tenemos una comparación de los mismos con la recta de regresión calculada a pH ácido.

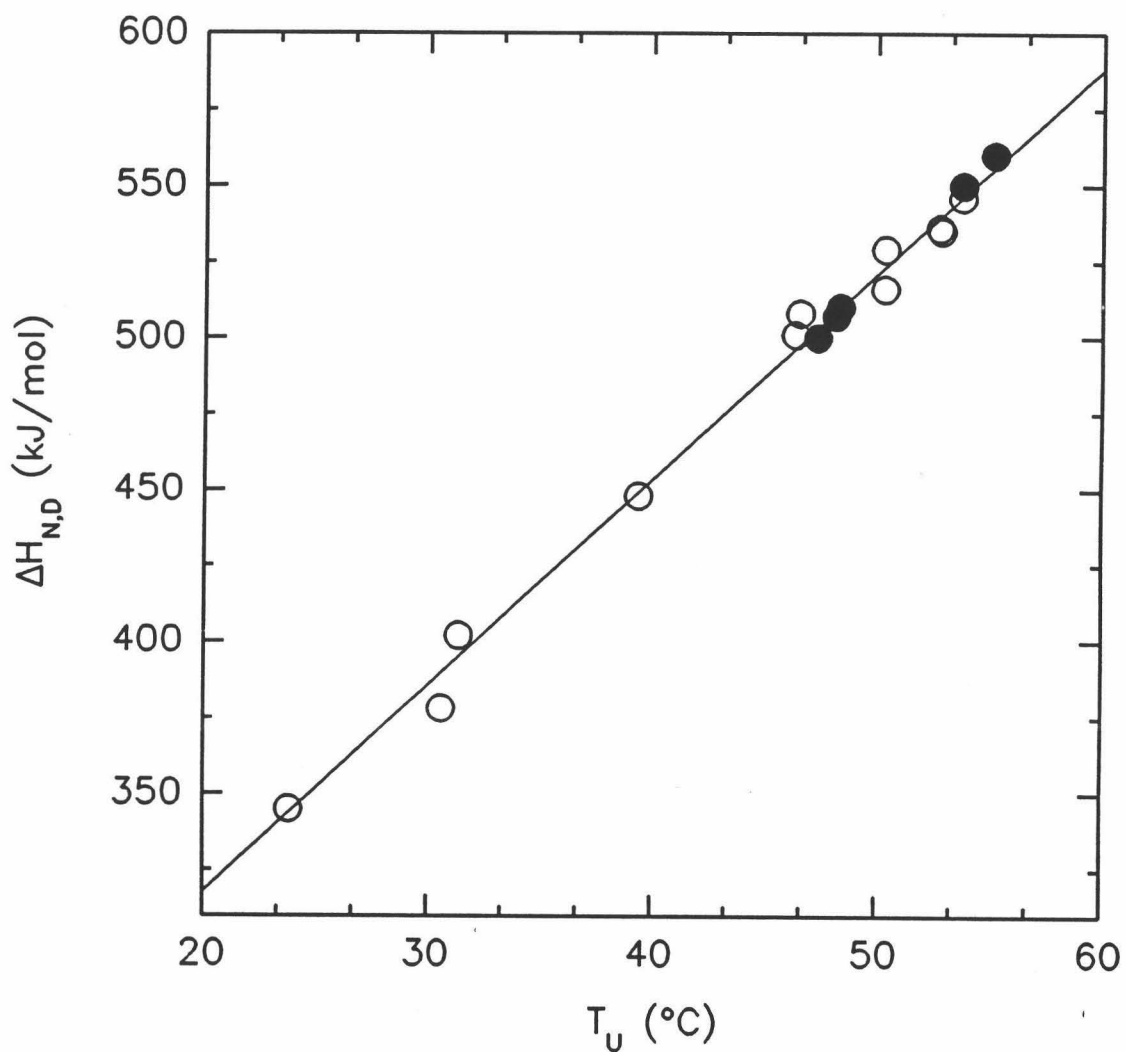


FIGURA 4-10: Dependencia de $\Delta H_{N,D}$ con T_U para Barnasa libre a pH ácido (símbolos huecos) y a otros valores de pH mayores (símbolos llenos). La recta de regresión es la misma que en la Figura 4-9 y sólo se han introducido los experimentos a pH 6.0, 7.0, 10.0, 10.3 y 10.5 (tabla 4-II) para comparar sus parámetros termodinámicos con aquellos.

TABLA 4-II
PARAMETROS TERMODINAMICOS PARA LA DESNATURALIZACION TERMICA DE
BARNASA A pH NEUTRO Y BASICO

pH	T _m (°C)	ΔH _{N,D} (T _m) (kJ/mol)	ΔS _{N,D} (298) ^a (kJ/K·mol)	ΔG _{N,D} (298) ^a (kJ/mol)
Citrato 50mM pH 6.0	55.2 ± 0.5	560 ± 20	1.049	38.2
PIPES 50mM pH 7.0	53.8 ± 0.5	550 ± 20	1.055	36.4
CAPS 50mM pH 10.0	48.4 ± 0.5	510 ± 20	1.072	31.3
CAPS 50mM pH 10.3	48.2 ± 0.5	507 ± 20	1.068	32.5
CAPS 50mM pH 10.5	47.4 ± 0.5	500 ± 20	1.072	31.3

^a Estos parámetros fueron calculados a partir de la regresión lineal de los datos experimentales de acuerdo con la ecuación (4.3) y de los valores experimentales de T_m en función del pH.

En los casos irreversibles (los dos primeros), el valor de entalpía será el ΔH_{N,D}^{cal} obtenido a partir del área bajo la transición calorimétrica y, en ningún caso, coincide con ΔH_{N,D}^{vH} o con el ΔH_{N,D} que se obtendría del ajuste al modelo de dos estados.

El interés de estos datos, visto que no aportan nada nuevo a nuestro estudio, radica en que describiremos en el apartado siguiente el estudio por CDB del complejo Barnasa-Barstar y los necesitaremos para poder aplicar el modelo de desnaturalización planteado (ver Materiales & Métodos).

4.2.3.- DESNATURALIZACION DE ALGUNOS MUTANTES DIRIGIDOS DE BARNASA: TS16, KA27, RA87, HA102

Paralelamente a la caracterización de la Barnasa "salvaje" a pH ácido se llevó a cabo un estudio en las mismas condiciones del mutante TS16. Esta posición se

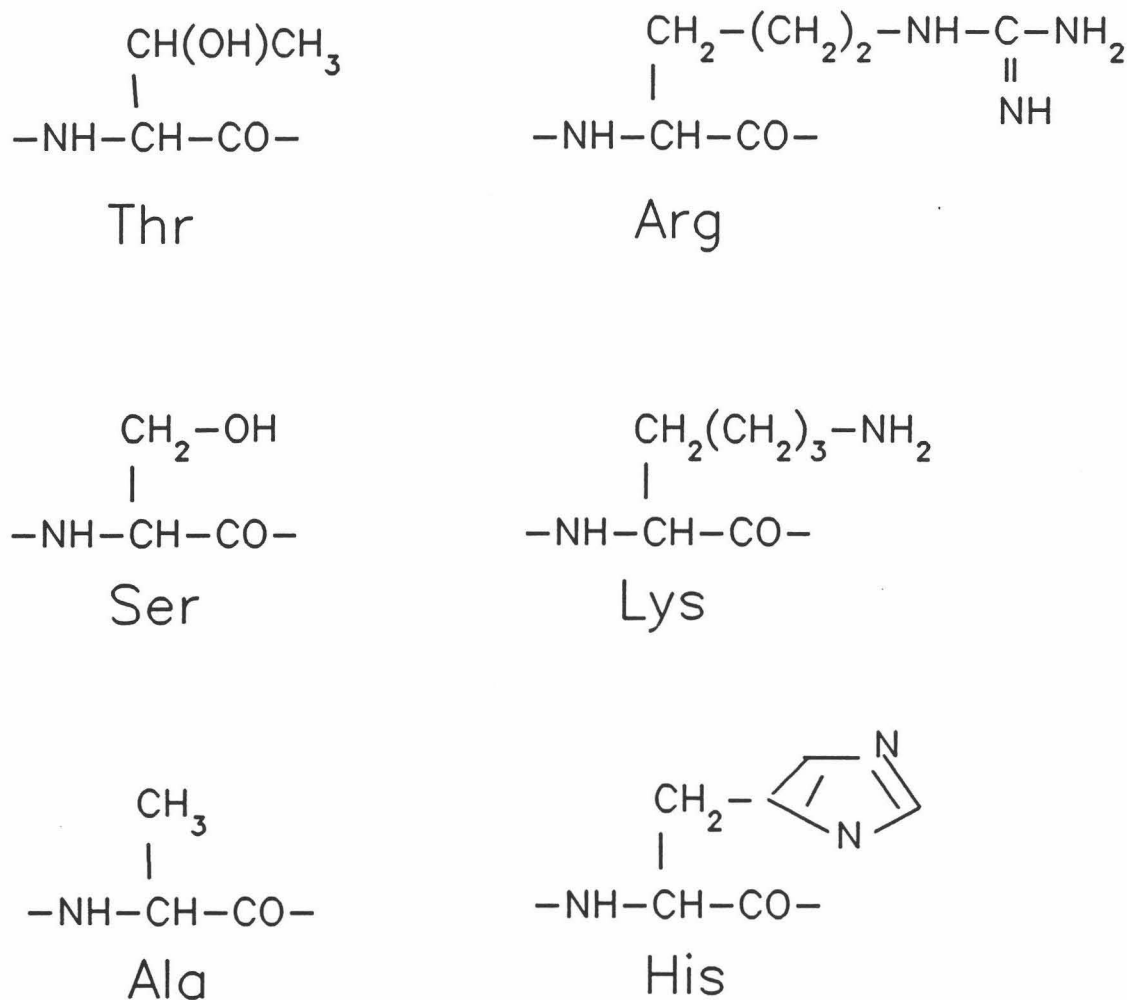


FIGURA 4-11: Cadenas laterales de los aminoácidos utilizados en los experimentos de mutagénesis con Barnasa. Mutantes: T16S, K27A, R87A y H102A.

encuentra en el extremo C-terminal de la hélice $\alpha 1$. El grupo -OH de la cadena lateral de la Thr origina un puente de hidrógeno con el grupo cetónico de la cadena principal de Asp12. Además, empaqueta el grupo γ -metilo (que no existe en la Ser) con la cadena aromática de Tyr17 lo que origina interacciones hidrofóbicas entre ellos. En Barnasa este resto es una Arg y, de hecho, esta mutación en Barnasa (mutante TR16) origina las mismas interacciones con Asp12 y Tyr17 (Matouschek et al., 1989).

La mutación TS16 (Figura 4-11), aparte de no poseer interacción alguna con

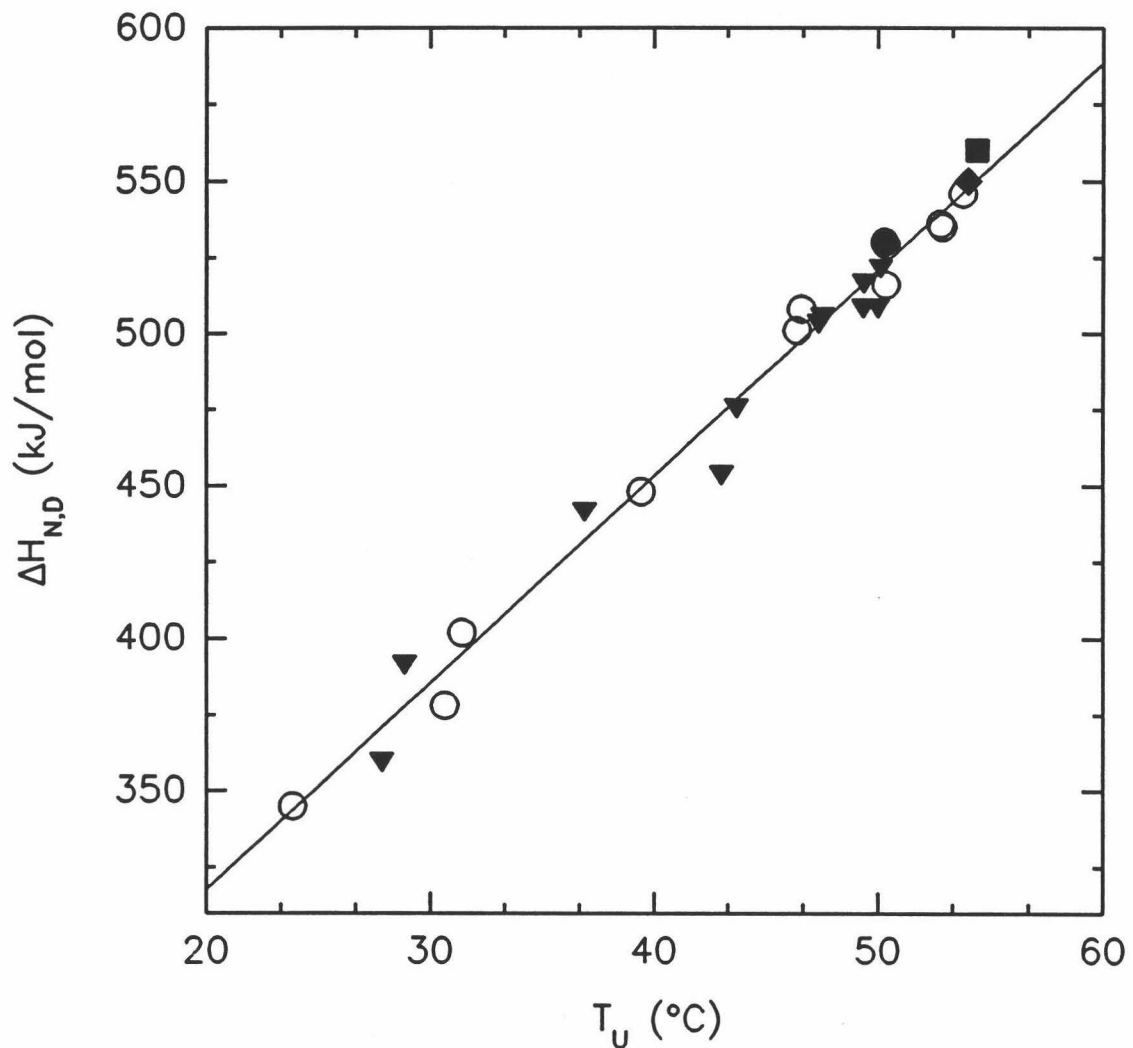


FIGURA 4-12: Dependencia de $\Delta H_{N,D}$ con T_U para *Barnasa* "salvaje" (WT) a pH ácido (símbolos huecos). La recta de regresión es la misma que la de la figura 4-9 y sobre ella se comparan los datos termodinámicos de los mutantes T16S a pH ácido (∇), K27A a pH 4.5 (\blacksquare), R87A a pH 4.5 (\blacklozenge) y H102A a pH 4.5 (\bullet).

Tyr17, no produce ningún otro efecto apreciable; es una mutación bastante conservativa. Esta sustitución ha sido utilizada por Matouschek et al. (1990) como una "prueba" del desplegamiento de la hélice α_1 en la cinética de su desnaturalización.

En la Figura 4-12 tenemos una representación de $\Delta H_{N,D}$ frente a T_U para la *Barnasa* salvaje en la que se comparan los valores obtenidos, tanto para el mutante

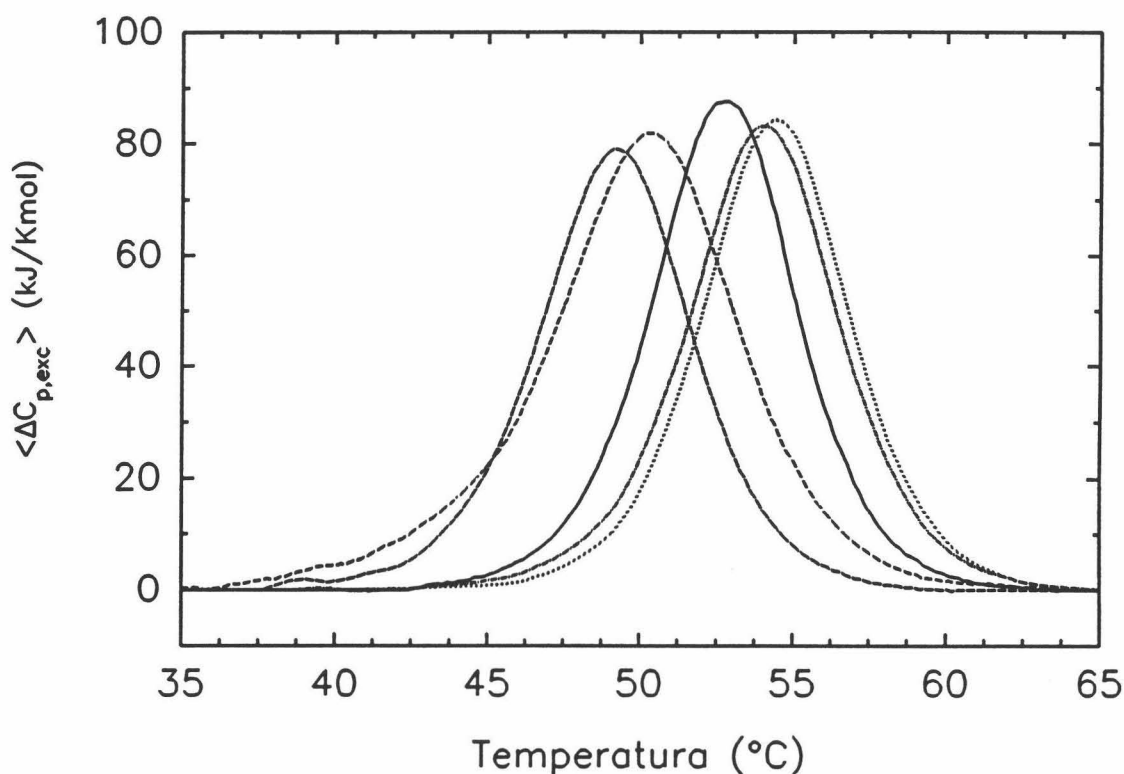


FIGURA 4-13: Curvas de capacidad calorífica de exceso para Barnasa WT (—) y los mutantes T16S (— — — —), K27A (·····), R87A (-·-·-) y H102A (----) a pH 4.5 en Acetato Sódico/HCl 50mM.

TS16 como para el resto de los estudiados: KA27, RA87 y HA102. Todos ellos se comportan como verdaderos sistemas de dos estados tal y como vemos en la Figura 4-13.

Las tres mutaciones mencionadas están dirigidas al sitio activo de la Barnasa que ya hemos descrito en la Introducción. En estos mutantes se pierden muchos grupos de las cadenas laterales que son de las más complejas con la consiguiente pérdida de un gran número de interacciones.

Lo verdaderamente interesante de estas mutaciones es que, muy al contrario de lo que esperaríamos, la pérdida de las cadenas laterales de Lys27 y Arg87 se traduce en un aumento de la estabilidad de la Barnasa como podemos ver en la tabla 4-III, donde hemos recogido el valor de $\Delta\Delta G_{N,D}$ calculado a partir de los datos

de CDB en Acetato Sódico/HCl 50mM pH 4.5. El de ambos mutantes es negativo, lo que confirma este hecho. Estos valores se calcularon a partir de las siguientes expresiones:

$$\Delta\Delta H_{N,D} = \Delta H_{N,D} - \Delta H_{N,D}^* = \Delta H_{N,D} - [\Delta H_{N,D}^* + \Delta C_{p,N,D}(T_U - T_U^*)] \quad (4.4)$$

$$\Delta\Delta S_{N,D} = \Delta S_{N,D} - \Delta S_{N,D}^* = \Delta S_{N,D} - [\Delta S_{N,D}^* + \Delta C_{p,N,D} \cdot \ln T_U / T_U^*] \quad (4.5)$$

$$\Delta\Delta G_{N,D} = \Delta G_{N,D} - \Delta G_{N,D}^* = \Delta H_{N,D}^*(T_U / T_U^* - 1) + \Delta C_{p,N,D}(T_U^* - T_U + T_U \cdot \ln T_U / T_U^*) \quad (4.6)$$

donde los términos con "*" son los correspondientes al mutante y los otros los de la Barnasa salvaje.

El mutante TS16 tiene un valor de $\Delta\Delta G_{N,D} = 5.9$ kJ/mol, lo que quiere decir que la interacción entre el γ -metilo de Thr y el anillo de Tyr17 es bastante débil en comparación con el resto de interacciones hidrofóbicas [en el core1, por ejemplo, tienen un valor medio de 8 kJ/mol (Kellis et al., 1988; 1989)].

TABLA 4-III
PARAMETROS TERMODINAMICOS CORRESPONDIENTES A LA
DESNATURALIZACION TERMICA DE ALGUNOS MUTANTES DE BARNASA A pH
4.5

MUTANTE	T_U (°C)	$\Delta H_{N,D}(T_U)$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta H_{N,D}$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta S_{N,D}$ (J/K·mol)	$\Delta\Delta G_{N,D}$ (kJ/mol)
SALVAJE	52.8	540			
T16S	49.2	515	0.5	-16.5	5.9
K27A	54.4	560	-9.1	-19.7	-2.7
R87A	54.0	550	-1.8	0.5	-2.0
H102A	50.3	530	-7.0	-34.2	4.2

En el caso de la Lys27, su grupo NH_3^+ de la cadena lateral interacciona con el fosfato del 3'GMP (Meiering et al., 1991) y es importante para estabilizar el

estado de transición en la hidrólisis de dinucleótidos (Mossakowska et al., 1989). Así mismo, en el caso del mutante RA87 se pierden cargas positivas de los grupos amino de la cadena lateral de la Arg. Por consiguiente, esto parece estar de acuerdo con lo que ya apuntaron Meiering et al. (1992) referente a que las cargas positivas provenientes de restos de carácter básico desestabilizan a la Barnasa, por lo que los mutantes son más estables.

Con la His102, si bien perdemos cargas positivas por la pérdida de su anillo imidazólico [a pH 4.5 estará protonado casi en un 100% ya que su valor de pKa está en torno a 7.4 en Barnasa (El Harrou, 1994)] se pierden bastantes interacciones, fundamentalmente de van der Waals con otros restos como los 84-86 y 101. El mutante es como resultado menos estable que la WT, ya que el efecto estabilizante de la pérdida de cargas positivas libres es de unos 2 kJ/mol mientras que la magnitud de la pérdida de cada interacción es al menos igual a ese valor.

4.2.4.- INTERACCION BARNASA-3'GMP

Hemos intentado utilizar la CDB, no sólo para caracterizar la desnaturalización de la Barnasa sino también para evaluar los parámetros de su interacción con 3'GMP a pH 4.5. La aplicabilidad de la CDB a los estudios sobre interacciones proteína-ligando ha sido analizada recientemente por varios autores (Robert et al., 1988; Shrake & Ross, 1990; 1992; Brandts & Lin, 1990; Straume & Freire, 1992). Esto ha confirmado que la CDB es una técnica apropiada para medir constantes de equilibrio de muy elevada afinidad. Además, también en situaciones no tan extremas, las técnicas isotérmicas convencionales dan sus resultados por debajo de la temperatura de desnaturalización ($T < T_U$). La CDB es una técnica complementaria muy adecuada pues sus datos se dan a temperaturas mayores ($T > T_U$) y así poder estudiar las propiedades de una interacción tanto por debajo como por encima de su transición de desnaturalización y evitar la incertidumbre en las extrapolaciones. Aquí mostramos un estudio de este tipo y lo compararemos con el realizado por El Harrou (1994) con la calorimetría isotérmica

de titulación (CIT). Los resultados han sido publicados, de hecho, conjuntamente (Martínez et al., 1994) y con ellos mostramos cómo, efectivamente, podemos utilizar una combinación de ambas técnicas para determinar los parámetros de la interacción con la exactitud suficiente en un muy amplio intervalo de temperaturas.

En el procedimiento experimental, el 3'GMP se preparó en el tampón Acetato Sódico/HCl 50mM pH 4.5, disolviendo la cantidad adecuada para tenerlo en concentración 50mM. La concentración exacta del nucleótido se midió en el UV-Vis utilizando un coeficiente de extinción molar de $13400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a 252nm. Para ello se hacían diluciones en tampón PIPES 50mM pH 7.0 a las que se midió la absorbancia. Esta disolución se adicionaba en alícuotas a la muestra de proteína, previamente dializada, para obtener las concentraciones deseadas de proteína y 3'GMP.

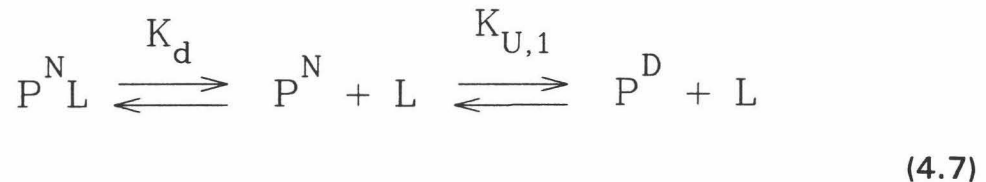
Los experimentos de CDB se realizaron recogiendo una línea base con las dos células llenas con disolución tampón con la concentración experimental de 3'GMP. De todas maneras, el nucleótido no afecta apreciablemente a la forma de la línea base. De este modo, se hicieron varios experimentos a diferentes concentraciones de 3'GMP, procurando mantener la de proteína constante en torno a $1 * 10^{-4}\text{M}$.

Para calcular los parámetros de la interacción a partir de los datos de CDB hemos utilizado dos métodos principalmente. Por un lado, hemos desarrollado y aplicado un nuevo procedimiento bastante sencillo basado en el cálculo de las funciones de partición de los sistemas con y sin ligando unido. Y por otro lado, hemos realizado un ajuste más complejo extendido a todo el conjunto de datos recogidos. Para este propósito hemos usado principalmente la opción de ajustes del programa Sigma Plot 5.0 (Jandel Co.) y un programa para ajustes multidimensionales no lineales desarrollado por E. Freire en la Johns Hopkins University (Straume & Freire, 1992). A continuación vamos a describir más detalladamente ambos métodos:

4.2.4.1.- Método basado en el cálculo de las funciones de partición

Esta aproximación es bastante sencilla y se basa en unas formulaciones originalmente sugeridas por Freire & Biltonen (1978). En su formulación vamos a considerar únicamente el caso que nos ocupa aunque, como podremos intuir, puede ser aplicado a esquemas multiestado más complejos.

Consideremos que la desnaturalización de la proteína en presencia de un ligando se explica con un modelo de dos estados y que sólo tenemos un sitio de unión para el ligando en la proteína nativa, es decir, matemáticamente:



Si consideramos que $[P^N L]$ es la concentración de complejo proteína-ligando, $[P^N]$ y $[P^D]$ son las concentraciones de proteína nativa y desnaturalizada respectivamente, y $[L]$ es la concentración de ligando libre, las constantes de disociación, K_d , y de desnaturalización, $K_{U,1}$, se pueden expresar como:

$$K_d = \frac{[P^N][L]}{[P^N L]} ; \quad K_{U,1} = \frac{[P^D]}{[P^N]} \quad (4.8)$$

Las concentraciones totales de proteína $[P]_T$ y ligando $[L]_T$ se calculan como:

$$[P]_T = [P^N L] + [P^N] + [P^D] ; \quad [L]_T = [P^N L] + [L] \quad (4.9)$$

según estas expresiones podemos considerar que si $[L]_T \gg [P]_T$, entonces $[L] \approx [L]_T$ y permanece constante con la temperatura. Por tanto, K_d puede ser sustituida por una constante monomolecular efectiva, K_e que será:

$$K_e = \frac{K_d}{[L]_T} = \frac{[P^N]}{[P^N L]} \quad (4.10)$$

Por otra parte, la función de partición Q_L para el esquema propuesto en (4.7), tomando como estado de referencia el $P^N L$, tendrá la siguiente expresión: donde $Q = 1 + K_{U,1}$ para el proceso de desnaturalización de dos estados propuesto.

$$Q_L = 1 + K_e + K_e \cdot K_{U,1} = 1 + K_e (1 + K_{U,1}) = 1 + K_e \cdot Q \quad (4.11)$$

A partir de esa expresión, tendremos que:

$$K_e = \frac{Q_L - 1}{Q} \quad (4.12)$$

Ambas funciones de partición pueden calcularse a partir de los datos experimentales de CDB de acuerdo con las siguientes expresiones (Freire & Biltonen, 1978):

$$\left(\frac{\partial \ln Q_L}{\partial T} \right)_L = \frac{\langle \Delta H_{NL} \rangle}{RT^2} ; \quad \left(\frac{\partial \ln Q}{\partial T} \right) = \frac{\langle \Delta H_N \rangle}{RT^2} \quad (4.13)$$

y como $\langle \Delta H_N(T) \rangle = H(T) - H_N(T)$ puede ser encontrada a partir de $\langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle = C_p(T) - C_{p,N}(T)$, entonces:

$$\frac{d\langle \Delta H_N(T) \rangle}{dT} = \langle \Delta C_{p,N} \rangle \quad (4.14)$$

Expresiones idénticas se pueden obtener a partir de $\langle \Delta H_{NL} \rangle$ que es el calor total de desnaturalización en presencia del ligando.

En la práctica, hemos de transformar la curva de $C_p(T)$ experimental integrándola por dos veces (ver ecuaciones 4.13 y 4.14) para obtener $Q_L(T)$ y $Q(T)$. Esto introduce bastante ruido en los datos obtenidos lo que se evitó en lo posible haciendo un "suavizado" de los mismos con una ventana de hasta 50 puntos (ver Materiales & Métodos).

Aunque esta aproximación es del todo correcta, pueden surgir también algunas complicaciones por haber sustraído a los datos la capacidad calorífica del estado inicial. Su extrapolación y posterior sustracción puede introducir algún error que puede ser amplificado también en los dos cálculos de integración. Como resultado, el factor $Q_L - 1$ es evaluable con suficiente precisión por encima del máximo de la transición calorimétrica ($T > T_U$). Por consiguiente, la función $K_d(T)$

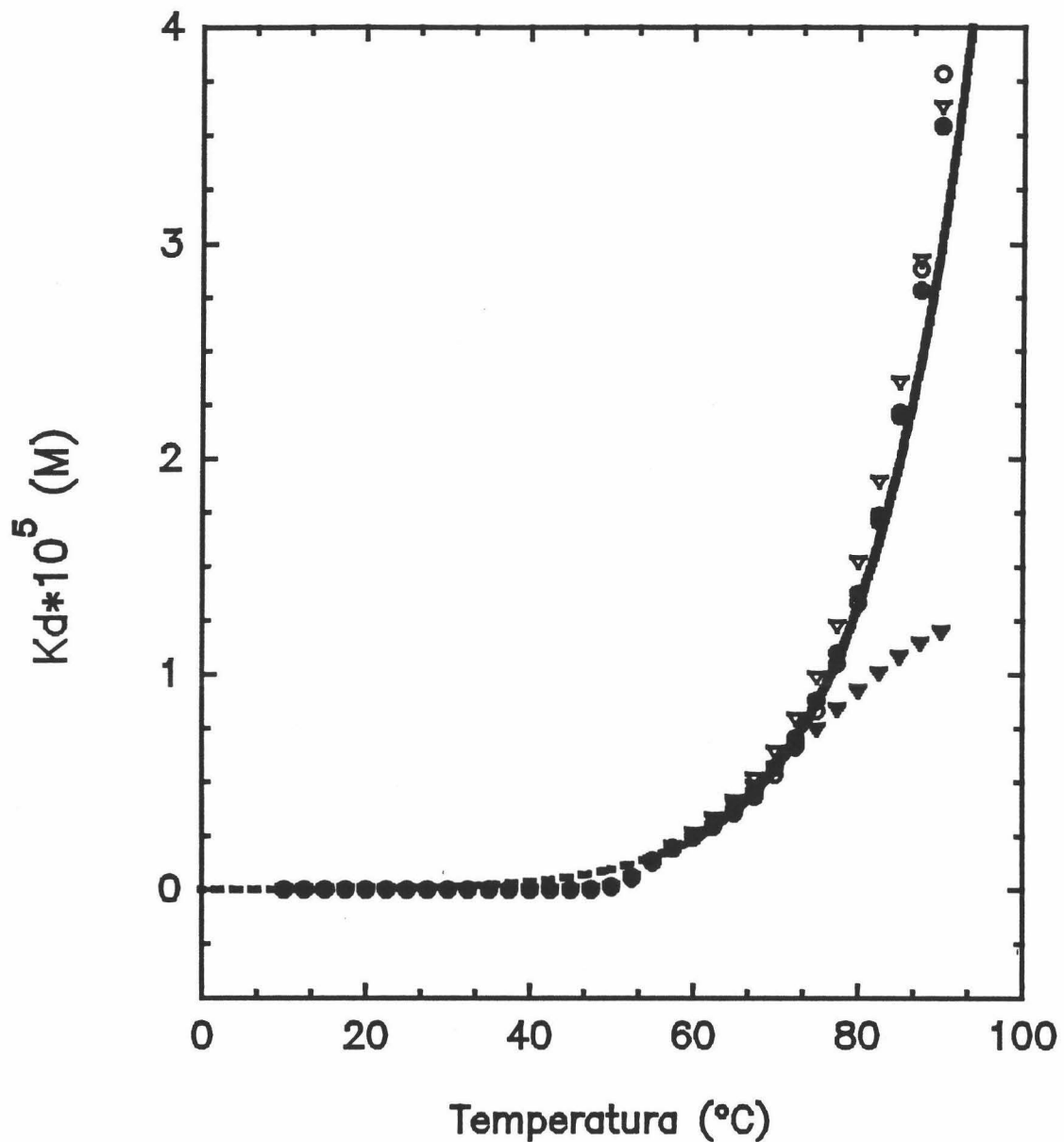


FIGURA 4-14: Resultados del ajuste global de los datos experimentales de K_d frente a temperatura para la interacción Barnasa-3'GMP según el modelo de las funciones de partición. Las curvas utilizadas tenían las siguientes concentraciones de ligando: 0.5mM (∇), 1.0mM (\circ), 2.7mM (\triangle) y 5.0mM (\bullet). El ajuste se hizo sólo para los datos obtenidos para $T > 60^{\circ}\text{C}$ (línea continua) pues por debajo de esta temperatura la función $K_d(T)$ experimental no está definida. En este intervalo hemos extrapolado la función obtenida del ajuste (línea discontinua).

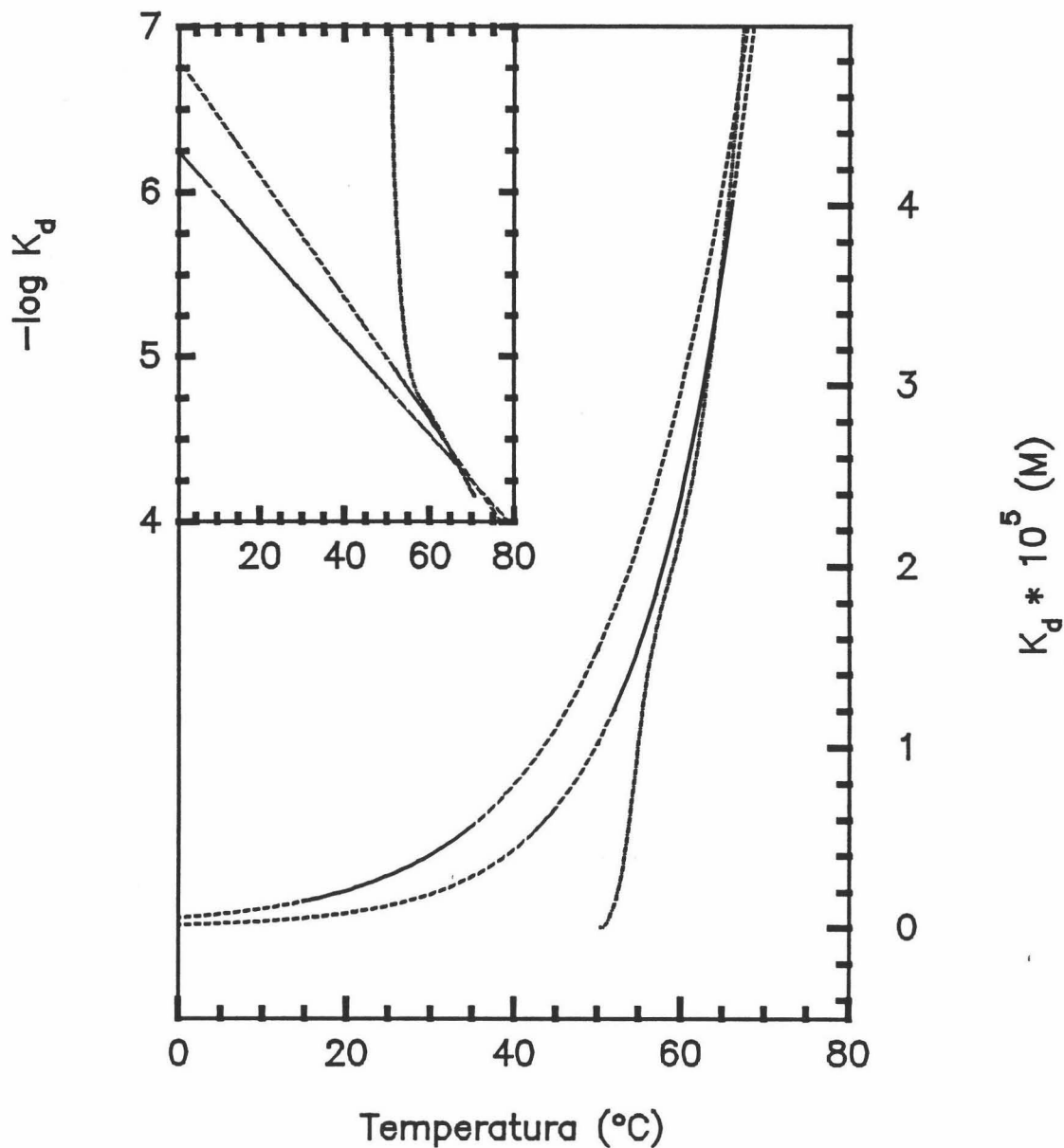


FIGURA 4-15: Dependencia con la temperatura de la constante de disociación, K_d , de 3'GMP y Barnasa a pH 4.5, calculada a partir de los datos de CIT de El Harrous (1994; Martínez et al., 1994) (línea continua a bajas temperaturas extrapolada por un trazo punteado) y la obtenida a partir del ajuste multidimensional de los datos de CDB en presencia de ligando (línea continua a altas temperaturas extrapolada por otra punteada). Para una comparación hemos representado también la curva $K_d(T)$ obtenida experimentalmente en presencia de 5mM de 3'GMP (-·-·-). La gráfica superior muestra los mismos datos en escala logarítmica. Las líneas continuas se corresponden con el intervalo de temperaturas de trabajo de cada método.

calculada está definida sólo para esos valores de temperatura, siendo nula en el resto de temperaturas (para $T < T_U$), tal y como vemos en la Figura 4-14.

En la citada Figura 4-14 sólo hemos ajustado los datos para $T > T_U$ y para minimizar errores hemos realizado un ajuste global de todas las funciones $K_d(T)$, calculadas a cada concentración de ligando. En todos estos ajustes y en los siguientes hemos asumido que el $\Delta C_{p,N,D}$ es constante con la temperatura.

En la figura 4-15 tenemos una comparación de los datos obtenidos por CDB con los de calorimetría de titulación (El Harrous, 1994; Martínez et al., 1994). Este método permite la estimación directa de la dependencia con la temperatura de la constante de unión sin tener que suponer, a priori, ningún parámetro, excepto para el esquema de la reacción.

4.2.4.2.- Método gráfico de aproximación

También hemos representado los valores de $\langle \Delta H_{NL} \rangle$ medidos a pH 4.5 y a concentraciones crecientes de 3'GMP. En la figura 4-9 los tenemos conjuntamente con los datos para la proteína libre a pH ácido. El interés de este tipo de representación es que, como vemos, entre ambos conjuntos de datos sólo existe una diferencia apreciable y es la presencia o no del ligando, por lo que se diferencian exclusivamente en su efecto sobre la proteína. De hecho, si tenemos un exceso suficiente de ligando, las transiciones de capacidad calorífica obtenidas experimentalmente, se ajustan perfectamente a una transición de dos estados, puesto que en estas condiciones el estado intermedio, N, no se encuentra significativamente poblado a ninguna temperatura. Si este estado de saturación por ligando no se satisface se pueden obtener curvas distorsionadas, predecibles teóricamente a partir del modelo matemático.

De acuerdo con esto, la línea de regresión lineal se ha trazado sólo a través de los puntos que exceden del 90% de saturación (más de 10 veces de diferencia en términos de concentración molar) que, de hecho, son los únicos que parecen guardar una relación lineal entre sí. De todas maneras, los datos se encuentran demasiado cercanos entre sí como para no dar una regresión fiable, por lo que

decidimos incluir el dato de CIT a 25°C (El Harrou, 1994; Martínez et al., 1994) sumado al de desnaturalización a estas condiciones experimentales pues $\Delta H_{NL,D}(298) = \Delta H_{N,D}(298) + \Delta H_d(298)$. La línea de regresión responde a la siguiente ecuación:

$$\Delta H_{NL,D} = \Delta H_{N,D} + \Delta H_d = 400 + 7.3 (T - 298.2) \quad (kJ/mol) \quad (4.15)$$

En definitiva, la diferencia entre las ecuaciones (4.15) y la (4.3) puede corresponderse con la dependencia con la temperatura de ΔH_d , que sería:

$$\Delta H_d(T) = 49 + 0.5 (T - 298.2) \quad (kJ/mol) \quad (4.16)$$

lo que constituye una nueva aproximación, hecha gráficamente, a los datos de la interacción Barnasa-3'GMP. El valor de $\Delta C_{p,d} = 0.5$ kJ/K·mol es el doble que el encontrado por CIT (ver tabla 4-IV) aunque en el ajuste global a las funciones $K_d(T)$ se obtuvo un valor de 0.45 kJ/K·mol, con lo que ambos valores se comparan bien entre sí.

TABLA 4-IV
DATOS TERMODINAMICOS CORRESPONDIENTES A LA INTERACCION BARNASA-3'GMP CALCULADOS A PARTIR DE LOS DATOS DE CDB

METODO	ΔH_d (kJ/mol)	$\Delta C_{p,d}$ (kJ/K·mol)	$K_d \cdot 10^5$ (M)
CIT*	56 ± 1.5	0.25 ± 0.05	1.7
Funciones de partición	79 ± 30	0.45 ± 0.25	1.3
Cálculo gráfico	62 ± 20	0.5 ± 0.3	
Ajuste multidimensional	59 ± 15	0.3	1.1

* Parámetros calculados por extrapolación de los datos de CIT a 15-30°C hasta la $T_U = 52.8^\circ\text{C}$

4.2.4.3.- Ajuste multidimensional de los datos experimentales

Este método es bastante más complejo que los anteriores pero tiene la gran ventaja de ser más preciso al no tener que hacer un tratamiento de datos previo de los experimentos que no sea el habitual (Materiales & Métodos). De hecho, tiene la ventaja de que no es necesario tener concentraciones de ligando saturantes puesto que la concentración de ligando libre [L] se puede calcular exactamente a cada temperatura con una ecuación matemática exacta.

Este modo de operar puede ser aplicado a casos más complejos, como veremos en el caso de la interacción Barnasa-Barstar aunque también es cierto que una complejidad excesiva implicaría un aumento considerable del número de parámetros ajustables y, consecuentemente, incrementar la ambigüedad de los resultados.

El ajuste se realizó con todas las funciones $\langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle$ simultáneamente, cada una a concentraciones de ligando distintas, para obtener el valor de $\Delta H_d(T_U)$ y $K_d(T_U)$ mientras que $\Delta C_{p,d}$ se fijó en 0.3 kJ/K·mol. Este valor fue calculado promediando los datos de $\Delta C_{p,d}$ obtenidos por CIT y por los dos métodos anteriores, teniendo en cuenta el error cometido en su determinación (es un valor medio ponderado). El valor obtenido de 0.3 kJ/K·mol es bastante cercano, lógicamente, al obtenido por CIT de 0.25 kJ/K·mol (El Harrou, 1994; Martínez et al., 1994). En el ajuste también se fijaron los parámetros de la desnaturalización en ausencia de ligando (tabla 4-I) y se utilizaron los valores de $\Delta H_d(T_U)$ y $K_d(T_U)$ obtenidos con la aproximación de las funciones de partición como valores de partida o iniciales en el ajuste. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4-IV y representados gráficamente en la Figura 4-16.

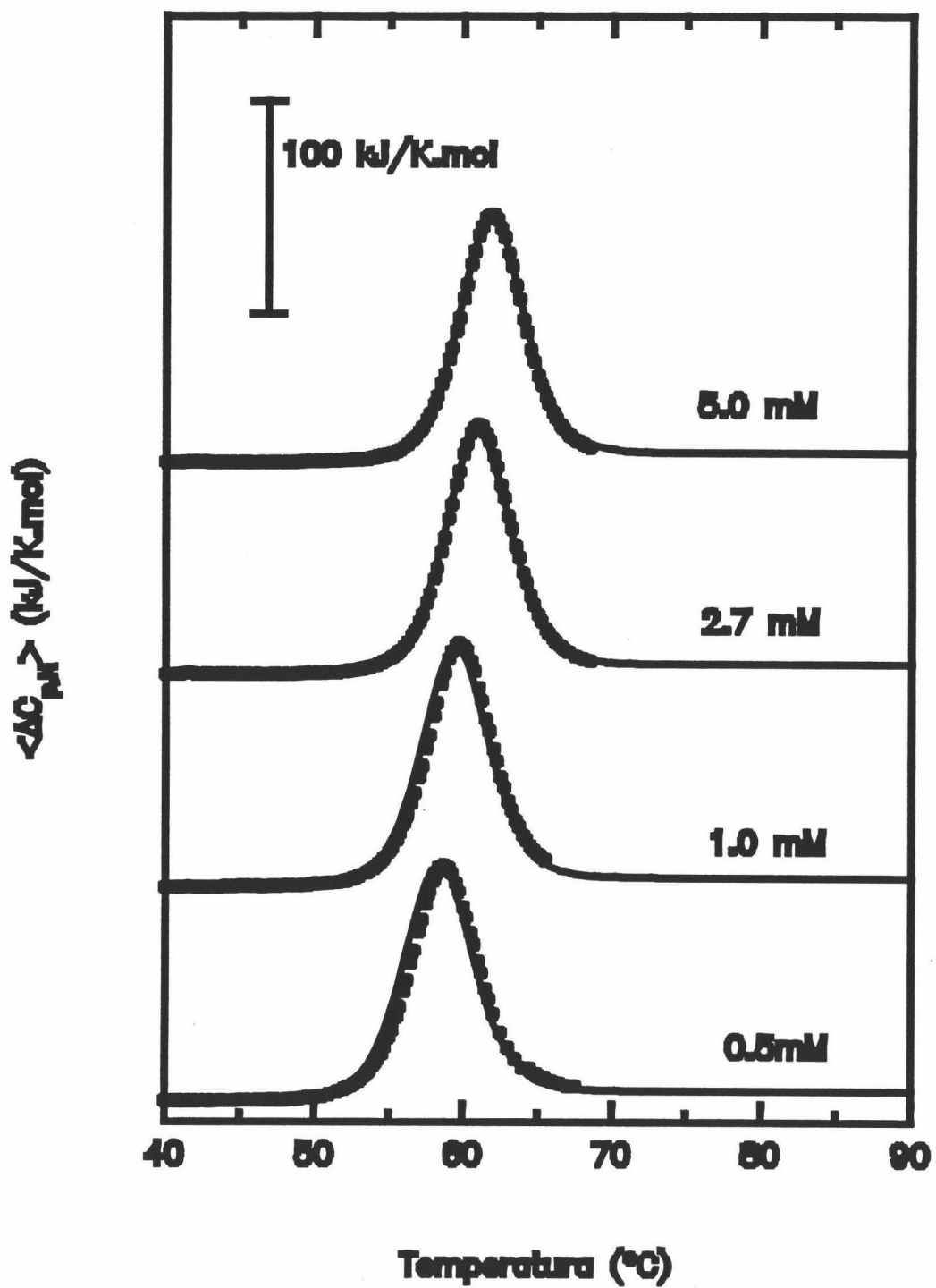


FIGURA 4-16: Resultado del ajuste multidimensional global (línea continua) de las funciones de capacidad calorífica de exceso (puntos) para Barnasa en presencia de diferentes concentraciones (mM) de 3'GMP puestas en la figura.

4.3.- DISCUSION DE RESULTADOS

La energética de la interacción del 3'GMP con Barnasa ha sido estudiada por CDB y los experimentos muestran que la afinidad del ligando a su único sitio de unión en la proteína no es muy alta, comparable a la encontrada para otras proteínas que unen nucleótidos, en particular ribonucleasas (Flogel et al., 1975). Tomando en cuenta la dependencia con el pH de la constante de unión, nuestro valor de $3.6 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$ extrapolado a 25°C y pH 4.5 está bastante cercano al determinado por Sancho et al. (1991) por técnicas cinéticas de $4.35 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$ a pH 6.3.

El valor de $\Delta C_{p,d}$ encontrado tiene un valor positivo, como debemos esperar para una unión normal proteína-ligando (Sturtevant, 1977; Wiesinger & Hinz, 1986). La principal contribución al $\Delta C_{p,d}$ normalmente deriva a partir de un factor hidrofóbico, como hemos demostrado aplicando el método de Sturtevant (1977) al análisis de los datos de la interacción. Esta aproximación se basa en la descomposición del $\Delta C_{p,d}$ y ΔS_u en términos vibracionales, $\Delta C_{p,d}(v)$ y $\Delta S_u(v)$, e hidrofóbicos, $\Delta C_{p,d}(h)$ y $\Delta S_u(h)$ [el subíndice "u" de la entropía indica que estamos utilizando unidades estándar para este término (Kauzmann, 1959)]. Nuestros cálculos nos dan los siguientes valores promediados para los parámetros: $\Delta C_{p,d}(v) = -74$; $\Delta C_{p,d}(h) = -197$; $\Delta S_u(v) = -78$ y $\Delta S_u(h) = 55$ (J/K·mol). Como las contribuciones vibracionales son negativas, parece que existe alguna restricción estructural debida a la unión del nucleótido. De hecho, el valor máximo de la capacidad calorífica por cada modo vibracional es igual a R (8.314 J/K·mol), por lo que el valor calculado por nosotros se correspondería con la pérdida de 9 modos vibracionales, aunque se pueden afectar algunos más en el complejo proteína-nucleótido.

El valor negativo de $\Delta C_{p,d}(h)$ y el positivo de $\Delta S_u(h)$ puede ser atribuido al efecto hidrofóbico, es decir, a un decrecimiento en el número de moléculas de agua unidas a los grupos hidrofóbicos. La magnitud de ambos parámetros, sin embargo, es bastante baja en comparación con la calculada en otros casos con otros nucleótidos (Wiesinger & Hinz, 1986; Mateo et al., 1986; Barón et al., 1989), lo

que tiene su explicación en una menor hidrofobicidad del centro de unión del ligando en Barnasa. Como el valor medio para la unión de una molécula de agua a la superficie de una proteína ha sido calculado en unos 5.5 J/K·g (Suurkuusk, 1974), nuestro $\Delta C_{p,d}(h)$ se correspondería con una liberación de tan sólo 2 moléculas de agua de sus contactos con grupos no polares. Por consiguiente, la reacción de unión parece estar favorecida por las contribuciones entálpicas e hidrofóbico-entrópicas mientras que existiría un efecto opuesto provocado por la entropía vibracional.

El efecto de la unión de 3'GMP a la estabilidad de la Barnasa es similar al efecto estabilizante de otros ligandos descritos en la literatura (Fukada et al., 1983; Brandts & Lin, 1990; Straume & Freire, 1992). Esto puede ser explicado fácilmente por el principio de acción de masas sin necesidad de recurrir a "cambios conformacionales inducidos por la unión del ligando".

En cuanto al método de análisis de datos, hemos encontrado que la determinación más precisa y fiable a partir de los datos de CDB nos la da el método de ajuste multidimensional de las curvas de capacidad calorífica obtenidas a varias concentraciones de ligando. Sin embargo, es destacable el método de aproximación basado en la evaluación de los parámetros de la interacción a partir de las funciones de partición del sistema, totalmente novedoso en la bibliografía y muy práctico pues nos da una muy buena aproximación a los verdaderos valores. De hecho, esta aproximación acompañada del ajuste multidimensional sería bastante recomendable cuando no se disponga de la cantidad suficiente de material como para hacer un estudio calorimétrico completo cambiando las concentraciones del ligando o cuando existan problemas de solubilidad con el mismo.

Hemos de puntualizar, sin embargo, que los datos de CDB sólo permiten determinar la K_d con gran precisión pues ΔH_d y, sobre todo, $\Delta C_{p,d}$ podemos estimarlos con mucha menos exactitud por varias razones, la más importante de las cuales sería que su valor absoluto es mucho menor que el de los parámetros de desnaturalización, es decir, estos valores se calculan como una diferencia entre dos valores bastante mayores. El error estándar en la determinación de $\Delta H_{N,D}$ y $\Delta H_{NL,D}$

está en torno a 15 kJ/mol, que será, por consiguiente, el error umbral en la determinación de ΔH_d a partir de los datos de CDB. Una situación más dramática ocurre en el caso del $\Delta C_{p,d}$ puesto que su valor es de la misma magnitud (o incluso menor) que el error cometido en la determinación directa del $\Delta C_{p,N,D}$ de los registros de CDB. Por otra parte, la forma y la posición del máximo de cada transición en presencia del ligando parecen depender principalmente de los valores de $K_d(T_U)$ y de $\Delta H_d(T_U)$ y mucho menos del de $\Delta C_{p,d}$. Por este motivo, por ejemplo, si hacemos un ajuste global de los datos para el sistema proteína-ligando, obtenemos prácticamente los mismos resultados fijando $\Delta C_{p,d}$ en 0.3, en 0.25 o incluso en 0.5 kJ/K·mol. Para evitar en lo posible estos problemas, hemos de determinar $\Delta C_{p,d}$ a partir de la dependencia con la temperatura de ΔH_d . Esto no es muy accesible desde el punto de vista experimental a causa de la baja solubilidad del nucleótido, lo que no nos permite estudiar un intervalo de concentraciones lo suficientemente amplio para este propósito.

En definitiva, la temperatura de desnaturalización para el sistema proteína-ligando varía en un intervalo muy estrecho de valores (Figura 4-9), lo que introduce un error apreciable en la determinación de $\Delta C_{p,d}$ a partir de la pendiente de la gráfica de $\Delta H_d(T)$ si no utilizamos el valor de CIT a 25°C. Finalmente, con los niveles actuales de error en los experimentos de CDB, es prácticamente imposible detectar cualquier tipo de dependencia de $\Delta C_{p,d}$ con la temperatura, aunque podemos esperar que su variación relativa sea tan alta como los cambios inducidos con la temperatura en $\Delta C_{p,N,D}$.

En cuanto a los parámetros termodinámicos de la desnaturalización de Barnasa, con o sin ligando unido, muestran que a pH ácido la Barnasa se comporta como un único dominio estructural que desnaturaliza como un auténtico sistema de dos estados, es decir, bajo condiciones de equilibrio todos los estados intermedios están mucho menos poblados que los estados nativo y desnaturalizado. Esta conclusión está de acuerdo con otros resultados anteriores no calorimétricos (Hartley, 1968; 1969). Recientemente, sin embargo, Makarov et

al. (1992) mostraron que la endoterma de capacidad calorífica puede ser asimétrica cuando la Barnasa es calentada a pH 2.4 en un tampón de baja fuerza iónica (10mM). En nuestro trabajo nosotros también hemos encontrado una asimetría en las trazas calorimétricas a pH 2.5 y tampón glicina/HCl 10mM (figura 4-17). Lo que parece ocurrir en estas condiciones es que la distorsión de la transición calorimétrica es causada por una oligomerización lenta y no específica de la proteína nativa (según han descubierto en algunos experimentos en Cambridge). El proceso de oligomerización es reversible y puede ser suprimido fácilmente aumentando la fuerza iónica sobre 50mM y/o el pH sobre 3.5 [Figura 4-18(B)]. Esto se apoyaría en cierta manera por nuestra observación de que a baja fuerza iónica la forma de la traza y su posición dependen de la velocidad de barrido [Figura 4-18(A)] y además que este fenómeno sea más acusado cuando hacemos el experimento en un DASM-1M de células cilíndricas (modelo utilizado por Makarov en sus experimentos con Barnasa) que cuando es en un DASM-4 de células capilares.

La Barnasa no pertenece al grupo de proteínas caracterizadas por tener una estructura nativa particularmente estable, como lo demuestra el análisis del cambio en energía de Gibbs que acompaña al desplegamiento (tabla 4-I). El valor obtenido por nosotros en CDB concuerda bastante bien con los medidos por otras técnicas no calorimétricas (Kellis et al., 1988; 1989; Clarke & Fersht, 1993).

Con todo esto, la Barnasa parece ser un elemento típico representativo de la familia de proteínas pequeñas con un único dominio globular. En este sentido es interesante comparar sus parámetros termodinámicos específicos con los de otros miembros de la citada familia. Así, su capacidad calorífica específica es de 0.55 J/K·g (0.13 cal/K·g) y se compara bastante bien con la de otras proteínas globulares compactas (Privalov, 1979). Por otra parte, hace ya bastante tiempo, Privalov (1979) encontró que los valores de los calores específicos de desnaturalización ($\Delta h_{N,D}$) para las proteínas globulares se intersectan a unos 110°C (385K), donde el valor para $\Delta h_{N,D}$ para todas es de unos 54 J/g. Las excepciones las constituyen algunas proteínas que poseen varios puentes disulfuro o sus estructuras no son globulares.

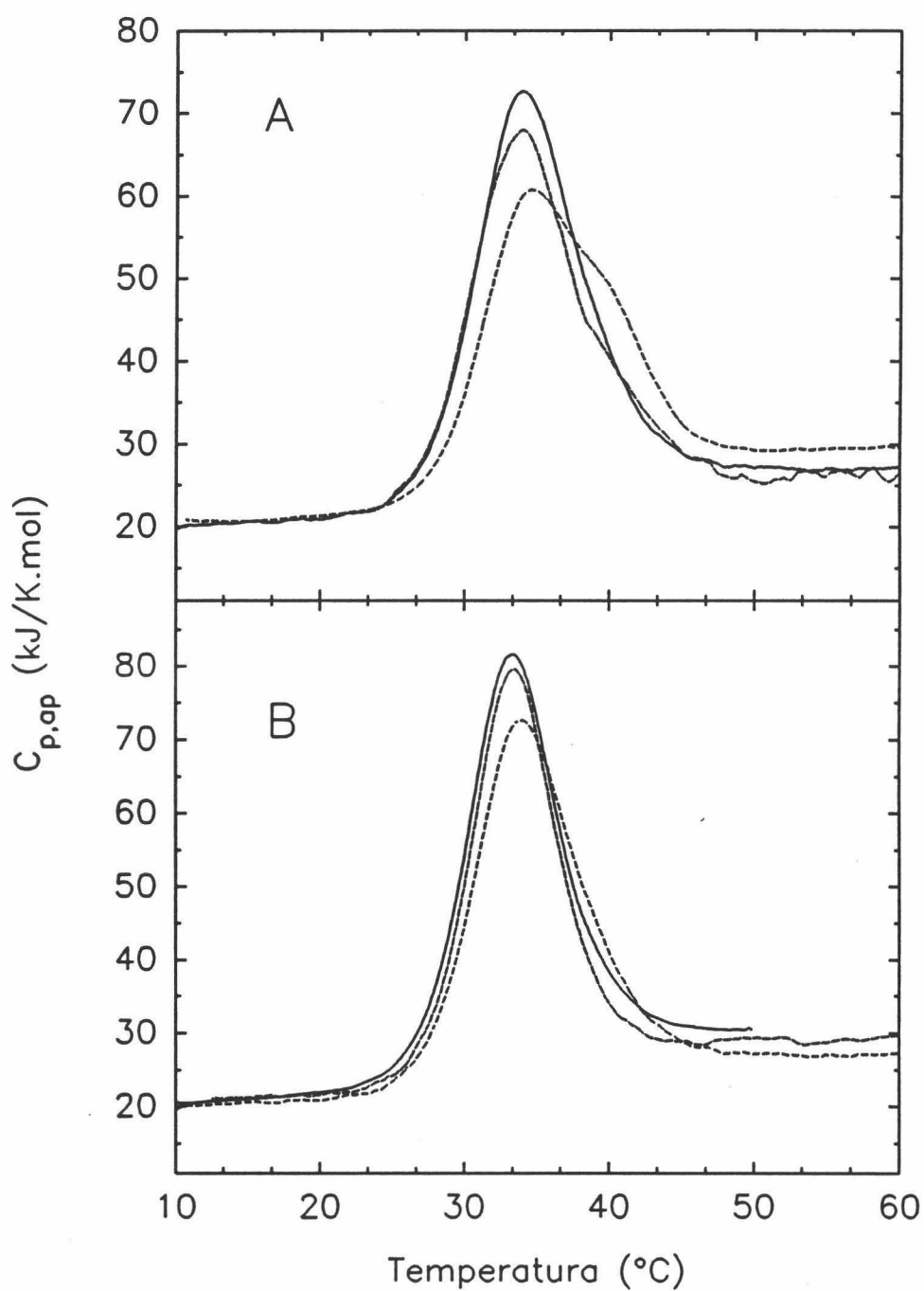


FIGURA 4-17: Experimentos de CDB hechos con Barnasa en un medio tamponado de Glicina/HCl a pH 2.5, (A) en un DASM-1M a 2 K/min (-----) y 1 K/min (—————) y en un DASM-4 a 1 K/min (—————). (B) A diferentes concentraciones de tampón en un DASM-4: 10mM (.....), 50mM (—————) y 100mM (—————).

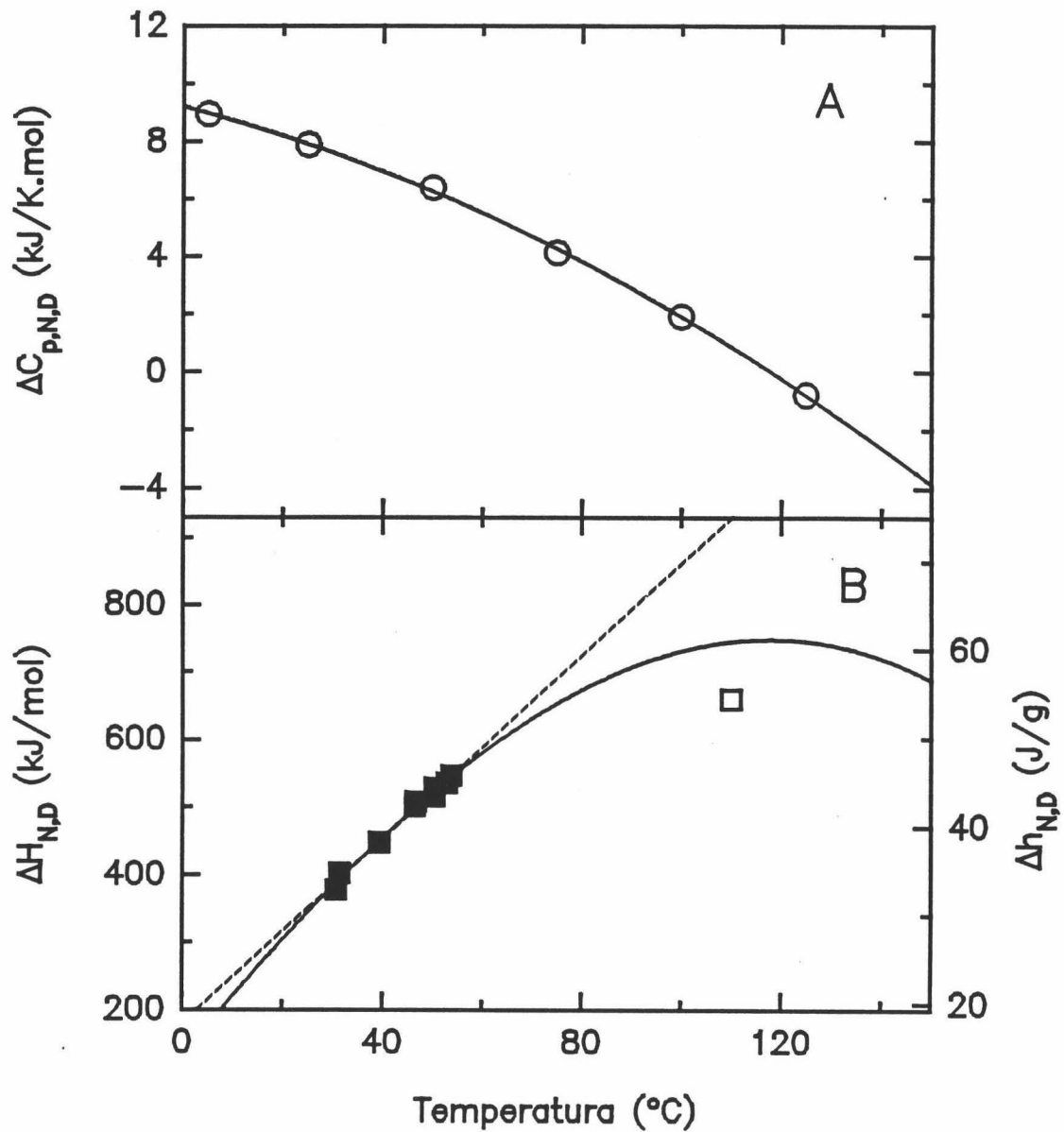


FIGURA 4-18: (A) Dependencia con la temperatura de $\Delta C_{p,N,D}$ calculado como se describe en el texto. (B) Dependencia experimental de $\Delta H_{N,D}$ con T_U para Barnasa (■) representado junto con las funciones $\langle \Delta H_N(T) \rangle$ simuladas suponiendo un valor de $\Delta C_{p,N,D}$ constante de 6.8 kJ/K.mol (línea punteada) y con un $\Delta C_{p,N,D}$ variable con la temperatura (ecuación (4.19); línea continua). El símbolo "□" representa el valor límite de entalpía específica calculado por Privalov de 54 J/g a 110°C.

Inicialmente, estas extrapolaciones se hicieron con la suposición de un $\Delta C_{p,N,D}$ constante con la temperatura pero existe otro trabajo posterior de Privalov et al. (1989) sugiere que el $\Delta C_{p,N,D}$ podría ser una función cuadrática con la temperatura con su máximo cercano a 37°C (310K) y que alcanza el valor cero sobre 140°C (413K). Con esta función, los calores específicos de desnaturalización pueden aproximarse al mismo valor de 54 J/g asintóticamente, en lugar de intersectarse con él a 110°C. Sin embargo, como el máximo de la función curvada es bastante ancho, las variaciones absolutas de $\Delta C_{p,N,D}$ en el intervalo de temperaturas del calentamiento son relativamente pequeñas y, consecuentemente, las gráficas de $\Delta H_{N,D}$ vs. T_U deben ajustar las funciones lineales bastante bien, con una pendiente que se corresponde con un valor medio del actual $\Delta C_{p,N,D}$ (Figura 4-18)

Teniendo en cuenta que las grandes extrapolaciones hechas por Privalov et al. (1989) pueden ser ambiguas, puede ser interesante tener en cuenta otras correlaciones que quizá puedan ser más fiables. Así, por ejemplo, Murphy et al. (1990) afirman que el comportamiento de la entalpía con la temperatura puede también proveernos de otra correlación entre $\Delta C_{p,N,D,r}$ y $\Delta H_{N,D,r}$ calculados por mol de restos de aminoácido a una temperatura estándar de 25°C y, de hecho ellos la han encontrado utilizando más de 10 proteínas (figura 4-19). Es más, esta lista fue extendida por Murphy et al. (1992) y por Spolar et al. (1992). Estos últimos autores han encontrado que la única excepción la constituye la Ribonucleasa T1, cuyos valores de $\Delta C_{p,N,D,r}$ y $\Delta H_{N,D,r}$ se calcularon a partir de los datos de CDB (Hu et al., 1992) y no se ajustan a la mencionada relación, principalmente debido al elevado valor de $\Delta C_{p,N,D,r}$. Sin embargo, otro análisis de CDB para la T1 realizado por Plaza del Pino et al. (1992) obtiene un valor bastante menor para el $\Delta C_{p,N,D,r}$ (1.16 kcal/K·mol o 11.15 cal/K·mol-resto) en lugar del de 1.59 kcal/K·mol, que en combinación con el valor de 573 cal/mol-resto para $\Delta H_{N,D,r}$ se ajusta perfectamente bien en la gráfica de Murphy.

Hemos intentado también hacer una extrapolación de tipo curvado para el $\Delta C_{p,N,D}$ para estudiar su comportamiento y comparar con la extrapolación lineal.

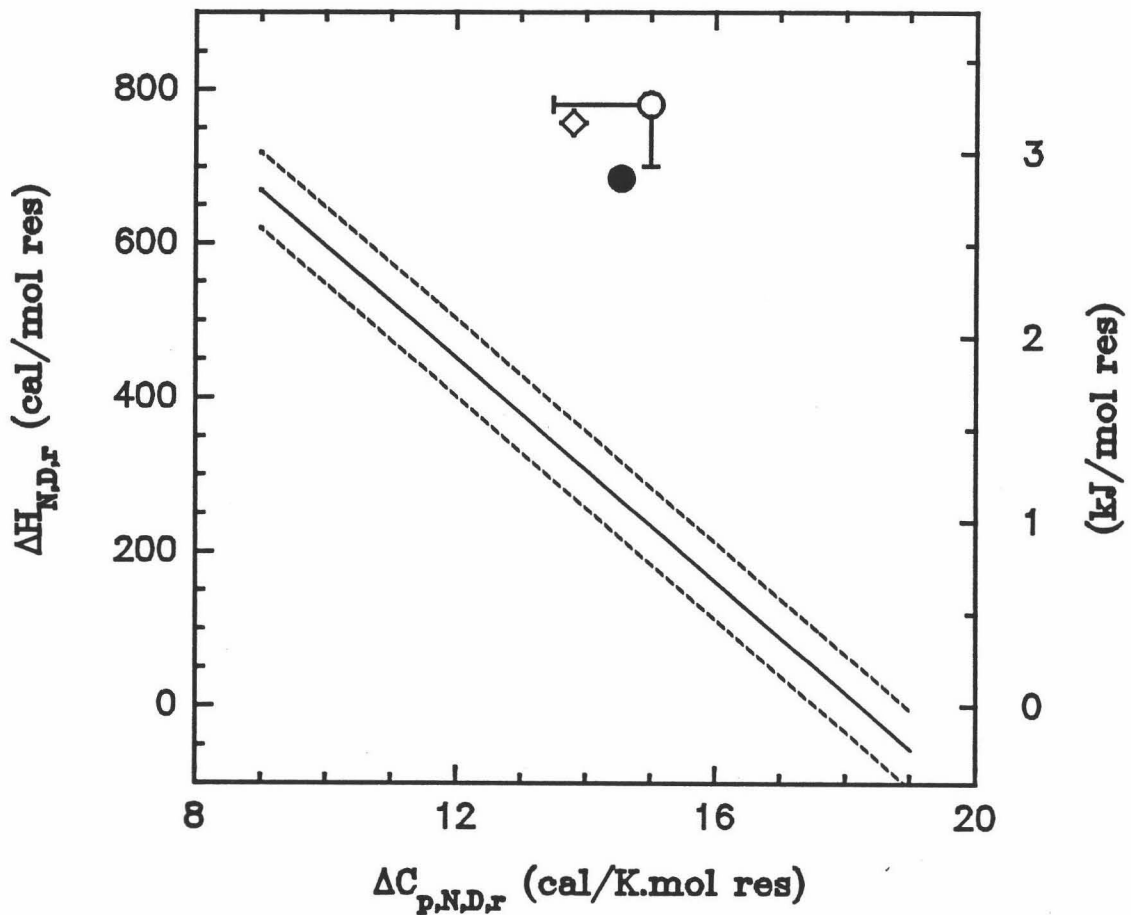


FIGURA 4-19: Correlación lineal entre $\Delta H_{N,D,r}$ (298) y $\Delta C_{p,N,D,r}$ (calculados por mol de restos de aminoácido) encontrada por Murphy et al. (1990) para más de 10 proteínas globulares (línea continua). Las líneas punteadas representan los límites dentro de los cuales entran todos los datos calculados para esas proteínas. El símbolo "○" con las barras de error representa nuestros datos para Barnasa. El símbolo "●" sería el valor para Barnasa WT y el "◇" sería un valor medio obtenido a partir de los datos de ocho mutantes sencillos, ambos calculados con datos no publicados cedidos por Matouschek & Fersht.

Para hacer este cálculo, lo que hicimos fue estimar la dependencia con la temperatura de $C_{p,N,D}(T)$ según el procedimiento desarrollado por Privalov & Makhatadze (1990), a partir del contenido aminoacídico de Barnasa, que resultó tener la siguiente expresión:

$$C_{p,v}(T) = -14.4 + 0.218 \cdot T - 0.00028 \cdot T^2 \quad (\text{kJ/K}\cdot\text{mol}) \quad (4.17)$$

Ahora, analizando nuestros datos calorimétricos podemos describir la siguiente dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica del estado nativo, $C_{p,N}$, estimada como un promedio de cada experimento y aproximada adecuadamente a una función lineal que sería:

$$C_{p,N}(T) = 17.8 + 0.11(T - 298.2) \quad (\text{kJ/K}\cdot\text{mol}) \quad (4.18)$$

(donde cada uno de los parámetros numéricos es conocido con un 10% de exactitud). La diferencia entre estas dos funciones nos da la siguiente fórmula empírica para $\Delta C_{p,N,D}$:

$$\Delta C_{p,N,D}(T) = 0.6 + 0.108 \cdot T - 0.00028 \cdot T^2 \quad (\text{kJ/K}\cdot\text{mol}) \quad (4.19)$$

En la Figura 4-18 tenemos simulada la función $\Delta H_{N,D}(T)$ que se obtiene a partir de ese valor variable de $\Delta C_{p,N,D}$, ya que:

$$\frac{d\langle \Delta H_N(T) \rangle}{dT} = \langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle \quad (4.20)$$

Esta función ajusta perfectamente los datos experimentales, incluso mejor que la regresión lineal. En cualquier caso, aunque el valor de $\Delta h_{N,D}$ extrapolado a 110°C ha disminuido un poco, no alcanza el valor universal establecido. Por consiguiente, la dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica de desnaturalización no puede explicar nuestra observación.

En las gráficas de Murphy (figura 4-19) se observa aún una discrepancia mucho mayor. Una vez más, los datos de Barnasa se quedan lejos de cumplir la correlación, bastante universal según lo expuesto. Para que se cumpliera esto, la Barnasa debería tener o bien un $\Delta H_{N,D,r}$ en torno a tres veces menor o un $\Delta C_{p,N,D,r}$ unas dos veces más pequeño, o bien valores menores para ambos parámetros simultáneamente.

La pregunta que nos planteamos llegado este punto es la siguiente: ¿Esta discrepancia puede ser causada por errores en la determinación de los parámetros termodinámicos para la desnaturalización de la proteína? Esto parece muy poco

probable por varias razones: la primera de ellas es que, como ya hemos mencionado, la desnaturalización de la Barnasa, en nuestras condiciones experimentales, es un proceso altamente reversible y con carácter de dos estados. Esta observación elimina la posibilidad de que se cometieran, por ejemplo, grandes errores en la determinación de la concentración de proteína, que surgen frecuentemente por la determinación errónea del coeficiente de extinción. Más aún, el coeficiente de extinción ha sido determinado por varios autores (Loewenthal et al., 1991; Hartley, 1993) y comprobado en nuestro laboratorio según el método de Gill & Von Hippel (1989) que ha demostrado ser bastante fiable para este tipo de estimaciones.

En segundo lugar, en nuestras condiciones experimentales, las curvas de desnaturalización son totalmente simétricas y no dependen de la velocidad de barrido o de la concentración de proteína.

Además, existen en la literatura algunas estimaciones de la entalpía de van't Hoff a partir de medidas no calorimétricas y, como podemos ver en la Figura 4-9, se adecuan perfectamente a nuestros datos. También disponemos de unos datos calorimétricos no publicados recogidos por Matouschek & Fersht (cedidos amablemente por ellos mismos) que se ajustan bastante bien a la dependencia lineal de $\Delta H_{N,D}$ con T_U con una pendiente correspondiente a un valor para $\Delta C_{p,N,D}$ de 6.7 kJ/K·mol y un $\Delta H_{N,D}(298)$ de 325 kJ/mol (para su comparación ver la ecuación 4.3 y la figura 4-19).

Finalmente, los cambios de la energía de Gibbs calculados a partir de los valores experimentales a diferentes valores de pH (ver tabla 4-1) se corresponden aceptablemente con los obtenidos a partir de experimentos de desnaturalización química en urea, normalmente hechos a una concentración de proteína mucho menor ya que se utilizaron métodos fluorimétricos en la mayoría de los casos (Kellis et al., 1988; 1989; Pace et al., 1992; Clarke & Fersht, 1993).

En definitiva, es imposible ajustar los parámetros de desnaturalización de la Barnasa con las correlaciones de Privalov et al. (1989) o Murphy et al. (1990). Adicionalmente, diferentes grupos de investigación que trabajan en este campo,

incluyendo los ya mencionados, han desarrollado muy recientemente algunos métodos y algoritmos para evaluar los parámetros termodinámicos de la desnaturalización a partir de datos estructurales basados en el cálculo de las áreas accesibles al disolvente hidrofílicas e hidrofóbicas, número de puentes de hidrógeno internos, etc. Hasta la fecha, en nuestro grupo de investigación no hemos podido desarrollar nuestros propios métodos de análisis estructural (aunque están en curso) para poder dar una explicación coherente de los hechos. De todas maneras, creemos que esta explicación debe surgir a partir de las propiedades de los estados nativo y desnaturalizado de la Barnasa. Es altamente probable, por ejemplo, que el estado desnaturalizado inducido por temperatura pueda tener mucha menos estructura residual que el de otras proteínas. Esto nos conduciría a que este estado desnaturalizado pueda ser muy específico y muy cercano a un "random-coil". Si este fuera el caso, el calentamiento cooperativo de todos los elementos estructurales, incluyendo las estructuras secundarias, vendría acompañado por unos cambios de entalpía y entropía mayores a la media. De hecho, Pace et al. (1992) han demostrado que la Barnasa presenta una mayor exposición de sus restos aromáticos (Tyr y Trp principalmente) en el estado desnaturalizado que la Ribonucleasa T1, incluso aunque en ésta última se hayan reducido previamente sus puentes disulfuro. Según estos autores, el mayor grado de desnaturalización encontrado surgiría como consecuencia de que la estructura nativa es capaz de enterrar un mayor número de restos hidrofóbicos en su interior, lo que podría contribuir hasta en 100 kJ/mol a su estabilidad. Además, Serrano et al. (1990) han confirmado que la Barnasa es capaz de formar hasta 91 puentes de hidrógeno intramoleculares, frente a los 86 de Ribonucleasa T1 (Pace et al., 1990).

También, recientemente se han publicado las estructuras de rayos X de Barnasa acomplejada con 3'GMP (Guillet et al., 1993a; 1993b) y con Barstar (Guillet et al., 1993c). en la última publicación, los autores hacen una observación bastante interesante acerca de la presencia de moléculas de agua en la estructura. (en el core3, ver Introducción) que permanecen atrapadas en el complejo Barnasa-Barstar y que parecen estar muy estructuradas ya que actúan como intermediarios

en las interacciones que se producen entre restos hidrofílicos e hidrofóbicos en el corazón hidrofóbico. Como este agua está estructurada también en la Barnasa sin ligando, la desnaturalización de este "cluster" proteína-agua podría perfectamente aumentar la entalpía del proceso de desnaturalización.

Barstar

5.1.- REVISION BIBLIOGRAFICA

Fue en 1967 cuando Smeaton & Elliot descubrieron que el mismo organismo que secreta la ribonucleasa Barnasa, el *Bacillus amyloliquefaciens*, producía intracelularmente un inhibidor específico de la misma, que llamaron Barstar y cuya principal función (y posiblemente la única) era la de protegerlo de los efectos nocivos de aquella.

La Barstar consiste en una única cadena polipeptídica de 89 aminoácidos (Hartley et al., 1972) que forma un complejo 1:1 de naturaleza no covalente con la Barnasa e inhibe completamente su actividad biológica (Hartley & Smeaton, 1973). Esto abre las puertas a la descripción estructural y funcional tanto de la propia proteína como de la interacción Barnasa-Barstar que originaría así una pequeña estructura con dos dominios.

En un sentido puramente biológico tenemos un trabajo de Mariani et al. (1992) hecho con plantas de tabaco (*Brassica napus*) en el que se demuestra que los genes que codifican a las ribonucleasas T1 y Barnasa pueden inducir esterilidad en el sexo masculino ya que se destruye un tipo de células que forman el polen. La co-expresión dentro de las plantas citadas de la Barstar restaura su fertilidad debido a la formación del complejo con las ribonucleasas.

Si bien sobre la Barnasa se dispone de una gran cantidad de información de este tipo (ya comentada en esta Memoria) se conocen muchos menos detalles sobre la Barstar. Esta proteína es bastante atractiva para estudios de desnaturalización pues según algunos trabajos preliminares (ver, por ejemplo, Hartley & Fitzgerald, 1988) es de un carácter netamente reversible con una temperatura de desnaturalización en torno a 70°C. El problema surge por la presencia de dos restos de Cys (en posiciones 40 y 82) que confieren una heterogeneidad apreciable a la transición que, por tanto, no parece ser de dos estados. Así, mientras que algunas moléculas parecen formar puentes disulfuro, la

mayoría ($\approx 80\%$) no lo hacen. De aquí la necesidad de construir mutantes dirigidos del inhibidor para eliminar estas Cys que, por otro lado, no afectan significativamente a la interacción Barnasa-Barstar.

5.1.1.- ESTRUCTURA DE LA PROTEINA

Los estudios por cristalografía de rayos X con Barstar han sido un fracaso, debido a la inevitable presencia de la mezcla de especies con las Cys oxidadas y reducidas, por lo que sólo se han podido hacer estudios en disolución por RMN.

En una primera aproximación con la estructura en disolución por RMN de ^1H y ^{15}N (Lubienski et al., 1993), la proteína consta de tres hélices α paralelas, una cuarta hélice peor definida y tres cadenas β paralelas.

Muy recientemente, ha aparecido otra descripción más completa (Lubienski et al. 1994) en la que las Cys parecen estar en estado reducido y también han descubierto que la Pro27 está en *trans* pero la Pro48 en *cis*. La secuencia de estructuras a lo largo de la cadena polipeptídica sería: $\beta 1$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\beta 3$. Sus dimensiones son de $29 \times 22 \times 21$ Å. Las tres hélices α paralelas ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$) se forman entre los restos 14-25, 33-43 y 68-81 respectivamente y están empaquetadas dentro de la lámina β paralela formada por tres cadenas entre los restos 1-6, 49-54 y 83-89. La hélice adicional ($\alpha 3$, restos 56-63) se une a la cadena central $\beta 2$ y a la hélice $\alpha 4$. Esta tercera hélice no forma parte del "bundle" y no está tan bien definida al no tener demasiadas restricciones estructurales.

En la Figura 5-1 vemos cual es la disposición espacial de todas estas estructuras secundarias con el "bundle" compuesto por las tres hélices y la lámina β . Aparte, tenemos la hélice desordenada encima de la estructura unida a la cuarta hélice por un loop también bastante desordenado. De esta manera, las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 4$ interaccionan con la lámina β , mientras que la $\alpha 2$ se empaqueta con las dos anteriores y forma contactos con ellas exclusivamente.

En Barstar tenemos 24 aminoácidos cargados: 11 Glu, 4 Asp, 6 Lys y 3 Arg. Esta distribución confiere a la estructura una carga neta negativa, puesto que están uniformemente repartidos por la superficie. En especial, la región comprendida



FIGURA 5-1: Diagrama esquemático de la estructura tridimensional de Barstar (tomado de Lubienski et al., 1994).

entre la segunda hélice y el extremo C-terminal de la cuarta que contiene los restos Asp35, Asp39, Glu76, Glu80 y ningún resto con carga positiva. Es la zona de interacción con Barnasa.

El corazón hidrofóbico se forma entre las cadenas laterales de las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$ y las de la lámina β . Está compuesto por 10 de las 12 Leu que tiene la cadena, 3 de sus 5 Val, 4 de sus 6 Ile, Trp53, Phe56, Phe74, Ala3, Ala67 y Ala77. Esta gran cantidad de Leu en el core es un suceso bastante común en proteínas formadas por un "helix bundle". La mayoría de ellas pertenecen a las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ y a $\beta 2$. Las Ile son de las cadenas $\beta 1$ y $\beta 3$. La $\alpha 4$ aporta dos Val y dos Ala así como el resto central del core, Phe74 (Lubienski et al., 1994). Todos están expuestos menos de un 25%, la mayoría con valores cercanos al 0%. Un hecho interesante es que el anillo aromático de la cadena lateral de Phe74 (resto central del core) posee el mismo ambiente químico en ambas caras, por lo que puede moverse dentro del core razonablemente rápido. Esto podría indicar que o bien el core en Barstar no es rígido, sino de un carácter fluido, o bien que no está bien empaquetado en las cercanías de Phe74 (Lubienski et al., 1994).

Todas las hélices son anfipáticas con la excepción de la $\alpha 3$ que se compone principalmente de restos polares y contribuye sólo con Phe56 al core (con una exposición al disolvente del 15%), sin embargo, la hélice está extensivamente empaquetada ya que la estructura pierde un 21% de accesibilidad al empaquetarse la hélice (Guillet et al., 1993b).

Las dos Cys se encuentran en los extremos C-terminales de las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 4$. En opinión de Hartley (Hartley, 1993) pueden formar un puente disulfuro que estabiliza la proteína y parece favorecer la interacción con Barnasa. Sin embargo, según Guillet et al. (1993b) estos restos parecen estar demasiado alejados para interactuar. Lubienski et al. (1994) consensúan a ambos afirmando que la rotación de algunos restos en $\alpha 2$ y un pequeño movimiento del loop cercano a Cys82 puede facilitar la interacción entre ambas Cys aunque este hecho ocurre en un bajo porcentaje. Estos restos están bastante protegidos del disolvente (accesibilidades del 5% y 25% respectivamente; Guillet et al., 1993b).

Las cadenas laterales en la lámina β no son alternativamente hidrofílicas e hidrofóbicas como es de esperar. Se forman "clusters" hidrofóbicos cuya función puede ser la de restringir las cadenas para formar una única estructura posible durante el proceso de plegamiento. La estructura de la Barstar constituye un tipo de plegamiento bastante novedoso. Es una estructura muy económica ya que presenta vueltas muy fuertes y definidas inducidas por restos con ángulos ϕ y ψ anormales y una Pro en *cis* en lugar de optar por largos loops. El plegamiento puede ser observado de dos maneras diferentes (Lubienski et al., 1994): como un "four helix bundle" donde una hélice es sustituida por una lámina β compuesta por tres cadenas o, más obviamente, como el de una proteína clásica α/β con un loop y una hélice insertados entre la primera hélice y la segunda cadena β . Según Lubienski et al. (1994) su arquitectura molecular es un modelo ideal para realizar su función de bloqueo en el sitio activo de Barnasa. El loop y la hélice que comprenden los restos 26-44 sobresalen del resto de la molécula y presentan una conformación muy estable que es perfecta para entrar dentro de la estructura de Barnasa.

5.1.2.- ESTRUCTURA DEL COMPLEJO BARNASA-BARSTAR

En este caso sí existen estudios estructurales por cristalografía de rayos X pero no con la Barstar salvaje sino con el doble mutante, C40/82A, que no presenta problemas de heterogeneidad en los cristales y que se ha mostrado prácticamente tan efectivo en su unión a Barnasa como la proteína intacta (Hartley, 1993).

El modo de inhibición de la Barstar es bastante sencillo: bloquea estéricamente el sitio activo de Barnasa con su hélice $\alpha 2$ y el loop que la une con $\alpha 1$ (Figura 5-2). En la formación del complejo se entierran unos 1600 Å² de superficie accesible al disolvente en la interfase que se reparten aproximadamente por igual entre ambas proteínas (Guillet et al., 1993b). Los restos catalíticamente importantes en Barnasa, como son His102, Arg83, Arg87 y Lys27 interaccionan con la Barstar por medio de interacciones electrostáticas como puentes salinos y

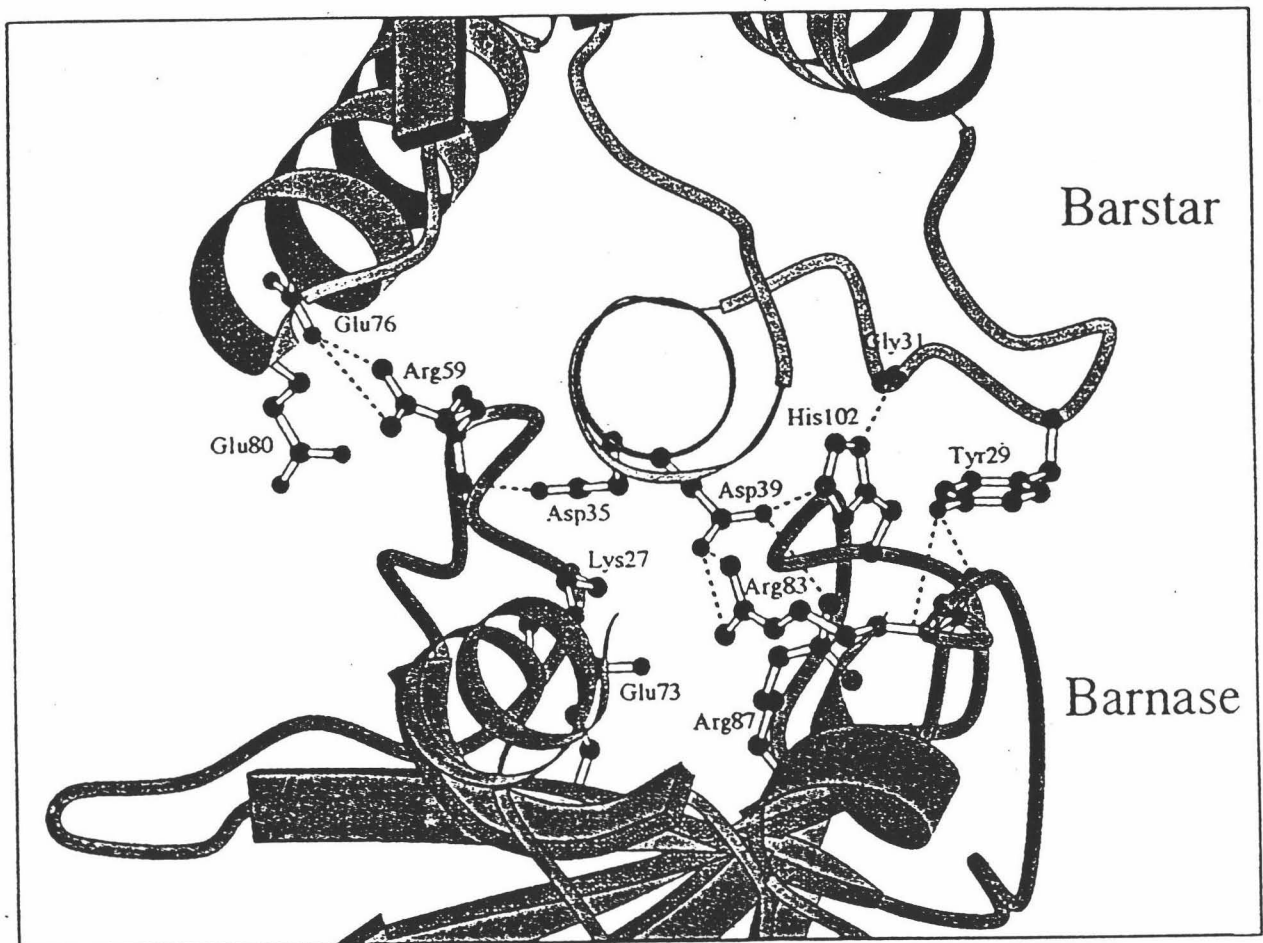
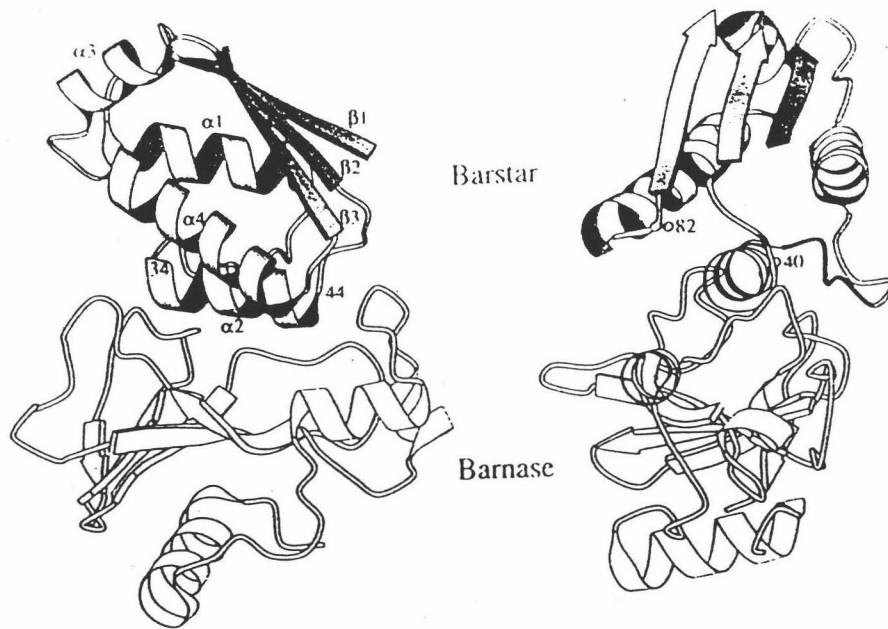


FIGURA 5-2: Parte superior: puntos de vista ortogonales del complejo Barnasa-Barstar (tomado de Buckle et al., 1994). En la parte inferior tenemos un detalle ampliado de la interfase, mostrando las interacciones y restos más importantes. Los puentes de hidrógeno se dibujan con líneas a trazos (tomado de Schreiber et al., 1994).

de hidrógeno de los que existen 14 en total entre ambas estructuras (Buckle et al., 1994). De los puentes de hidrógeno, seis implican grupos aceptores y donores cargados, cuatro sólo tienen un grupo cargado y otros cuatro ninguno. En general, las superficies que interaccionan presentan un elevado grado de complementariedad en el que el potencial electrostático negativo de Asp35 y Asp39 de Barstar (hélice $\alpha 2$) interacciona favorablemente con la base electropositiva del sitio activo de Barnasa, formada por el cluster de los restos Lys27, Arg83 y Arg87.

En la interfase existen en realidad dos áreas bien definidas separadas por la hélice $\alpha 2$ de Barstar (Buckle et al., 1994): en un lado tenemos varias interacciones entre Asp39 de Barstar y los restos básicos del sitio activo de Barnasa caracterizadas por un elevado grado de complementariedad entre las superficies y muy pocos huecos en la interfase y en el lado opuesto tenemos una complementariedad mucho peor, particularmente en el loop de unión de guanosina formándose huecos entre las superficies que están casi completamente ocupadas por moléculas de agua ordenadas. Este loop contiene 9 moléculas de agua (Guillet et al., 1993a) y se forma por el ordenamiento de Arg59 en Barnasa que es un resto que presenta una gran movilidad en la estructura libre pero que se ordena en presencia del sustrato y se amontona en la base de guanina (Buckle & Fersht, 1994).

En comparación con la interacción de Barnasa con 3'GMP (Guillet et al., 1993a), el sitio de ruptura del enlace fosfodiéster (sitio principal de unión de fosfato) es ocupado por Asp39 en el complejo con Barstar. Las interacciones electrostáticas son similares en ambos casos. El segundo sitio de unión de fosfato (Meiering et al., 1991) es ocupado parcialmente por Gly43 y una molécula de agua no expuesta al medio. Además, la interacción His102(BN)-Tyr29(BS) es similar a la interacción His102-adenina en el complejo Barnasa-d(CGAC) (Buckle & Fersht, 1994) aunque presenta algunas diferencias apreciables. El empaquetamiento planar entre la base de guanina y Arg59(BN) se parece al de Arg59(BN)-Trp38(BS) aunque éste último no tiene carácter planar pero es posible que el anillo aromático de

Trp38 facilite la disposición de Arg59 para formar un puente de hidrógeno con Glu76(BS).

Como vemos el disolvente juega un papel crucial en la interacción entre ambas proteínas existiendo un total de 35 moléculas de agua que pueden ser analizadas según su grado de exposición al disolvente: 5 median puentes de hidrógeno entre ambas proteínas y 6 de las 7 moléculas que están totalmente enterradas en la interfase rellenan la región que peor se complementa en el sitio de unión para guanina (Buckle et al., 1994). De las 12 moléculas con accesibilidades menores a 10 \AA^2 , 5 están en la estructura de la Barnasa libre. Esta situación es mucho más acusada que en otros complejos tipo proteasa-inhibidor por ejemplo (Lawrence & Colman, 1993), lo que enfatiza el importante papel que juegan en la complementariedad de las interacciones formadas. Además, Guillet et al. (1993b) afirman que la unión tan fuerte entre ambas proteínas se debe entre otros motivos a que estas moléculas de agua ya existen en las estructuras libres, para minimizar el coste entrópico de enterrarlas en la interfase.

La estructura de Barnasa no se afecta apreciablemente por la unión de la Barstar, en cambio esta última presenta diferencias que se distribuyen por toda su estructura (sobre todo en las hélices y los loops), que hacen que su estructura sea menos compacta en el complejo. Según Buckle et al. (1994) es muy posible que se debilite el empaquetamiento del core como consecuencia de la interacción de Barnasa con la hélice $\alpha 2$, ya que en ella se fijan las posiciones de los principales aminoácidos que interaccionan con los restos del sitio activo de Barnasa a costa de desestabilizar otras interacciones en otros sitios menos importantes.

Estos mismos autores han publicado otro trabajo (Schreiber et al., 1994) en el que intentan demostrar por construcción de mutantes dirigidos que la Barstar ha comprometido, durante su evolución, su estabilidad en una considerable extensión para optimizar su actividad específica *in vivo*, lo que apoyaría en cierto modo su mayor libertad conformacional en el complejo ya que no sería tan importante su estabilidad, una vez ha bloqueado con efectividad el sitio activo de Barnasa.

5.1.3.- ESTUDIOS DE DESNATURALIZACION

Existe muy poca bibliografía de estudios de este tipo con Barstar, hecho sorprendente si tenemos en cuenta la gran cantidad de publicaciones sobre Barnasa. Tenemos un trabajo de Schreiber & Fersht (1993b) que estudia el proceso de desnaturalización-renaturalización desde un punto de vista cinético con el doble mutante C40/82A considerado como una especie "pseudo-salvaje" de acuerdo con las consideraciones ya mencionadas de heterogeneidad con las Cys. Se describe una ruta de desplegamiento de tres estados en la que el primer paso consistiría en el plegamiento hasta un estado intermedio, proceso bastante rápido en comparación con el segundo en el que la estructura evoluciona hasta un estado parecido al nativo pero que se diferencia en que la Pro48, en *trans*, se isomeriza lentamente a *cis* en una tercera y última etapa. Estas etapas se mantienen al estudiar el proceso en sentido contrario, si bien, primeramente se desnaturalizaría la estructura y después se isomerizaría la Pro48. Estos resultados los confirma el uso de peptidil-prolil isomerasa (PPI) que cataliza procesos de isomerización *cis-trans* en Pro y afecta a las cinéticas. Resultados similares a los anteriores han obtenido Shastry et al. (1994) estudiando la ruta de desnaturalización en presencia de GuHCl.

Quizá más interesante es el estudio por técnicas espectroscópicas de la desnaturalización en condiciones de equilibrio a pH neutro y ácido. Según Khurana & Udgaonkar (1994) la Barstar existe en una conformación diferente a pH ácido y baja fuerza iónica, denominada A, que presenta características propias de un "molten globule" (ver revisión bibliográfica de CheY en esta Memoria). Esta conformación parece desnaturalizarse por un mecanismo bastante complejo si es que lo hace pues a pH 3 no presenta ninguna transición por debajo de 100°C. A pH neutro, en cambio, el proceso es un 80% reversible con una temperatura de desnaturalización de 72°C y parece ser de dos estados (estos resultados son bastante consistentes con los nuestros como veremos después). La transición entre N (pH 7) y A (pH 3) es un proceso que parece estar acoplado a la valoración de un sólo grupo ionizable con un valor de pK_a de 4.6 aunque no se ha conseguido

identificar dicho grupo. Otro dato importante es que, en presencia de desnaturalizantes como GuHCl, el estado A necesita mayores cantidades de ellos para perder su contenido estructural que el N (3.7M frente a 2.0M de GuHCl). En cualquier caso, no tenemos datos sobre como es el contenido en estructuras secundarias de este estado A y si es o no similar al del estado N, a pesar de ser lo suficientemente estable como para ser estudiado por técnicas estructurales como la RMN.

5.1.4.- TERMODINAMICA DE LA INTERACCION BARNASA-BARSTAR

Existen sólo dos trabajos publicados coetáneamente sobre esta interacción, uno de Schreiber & Fersht (1993a) y otro de Hartley (1993). En el primero, los autores han medido las constantes cinéticas de asociación y disociación de la interacción Barnasa-Barstar en un amplio intervalo de pH (4.5-9.0) y las han comparado con las de varios mutantes a pH 8.0, lo que les ha permitido conocer cuáles son las contribuciones específicas de algunos restos a la interacción que, por otra parte, resulta ser bastante fuerte ($K_d \sim 10^{-14}M$). El efecto de la fuerza iónica disminuye la constante cinética de asociación en un factor de 40 e incrementa la de disociación unas 5 veces en 500mM de NaCl, lo que da como resultado una disminución de dos órdenes de magnitud en la constante de equilibrio. Esto pone de manifiesto la importancia de las interacciones de tipo electrostático en la unión de ambas proteínas.

El trabajo de Hartley (1993) es con el complejo Barnasa-Barstar C40/82A y con otros mutantes de ambas proteínas. Se ha realizado por medidas de actividad y se comparan los complejos formados por ambas especies salvajes y con la C40/82A que es un orden de magnitud inferior ($K_d \sim 10^{-13}M$), también con las constantes de equilibrio obtenidas para mutantes sencillos y dobles de algunas posiciones de Barnasa importantes en la unión (Arg59 y His102), por varios restos de diferente carácter (D, Q, A, L, K, G, etc.).

Estos trabajos no son muy explícitos a la hora de discutir sus resultados, por lo que su importancia radica casi exclusivamente en el generoso aporte de

constantes de equilibrio para esta variedad de mutantes y condiciones experimentales.

De lo expuesto se deduce que existe una información estructural sobre la Barstar suficientemente detallada. Tenemos descritas las interacciones más importantes y disponemos de detalles estructurales bastante interesantes que necesitan ser explicados con técnicas como la CDB que nos den una aproximación energética a estos acontecimientos. En la Bibliografía tan sólo existe un trabajo (Khurana & Udgaonkar, 1994) que se introduce levemente en esta problemática pero la debemos abordar directamente para calcular los parámetros termodinámicos correspondientes y esclarecer su proceso de desnaturalización.

Algo parecido sucede en el caso de la interacción Barnasa-Barstar con trabajos estructurales importantes pero seguimos sin tener una explicación energética de ella. Aparte, las interacciones proteína-proteína no han sido muy estudiadas desde un punto de vista energético (al menos, no por CDB) quizá por su gran complejidad. Ahora tenemos la oportunidad de hacerlo con este sistema "modelo" dado su pequeño tamaño y la información estructural disponible. Esto puede considerarse como un hallazgo muy importante dentro de los estudios de interacción proteína-proteína puesto que su tamaño es relativamente pequeño (199 aminoácidos) y ambos componentes son relativamente estables, lo que hace que sea un sistema excelente para su descripción termodinámica utilizando técnicas como la CDB y CIT. Estas dos técnicas en concreto poseen ya un desarrollo teórico bastante claro en este tipo de estudios pero la falta de sistemas como este que presenten unas características tan buenas, trae como consecuencia el que no exista un desarrollo y aplicación experimental de estos modelos teóricos. En esta Memoria, éste es uno de los objetivos fundamentales.

5.2.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

Las muestras de Barstar salvaje (WT) y de los mutantes sencillos C40A, C82A (con las Cys 40 y 82 sustituidas por Ala), el doble mutante C40/82A (DM) y los mutantes triples C40/82A-P48A (TMPA) y C40/82A-P48L (TMPL) (con el resto de Pro48 del DM sustituido por Ala o Leu) las purificó en Cambridge el equipo del Dr. A.R. Fersht y nos las enviaron congeladas en tampón TRIS 50mM, NaCl 0.1M pH 8.0. A todos los envíos se les hicieron pruebas de electroforesis en SDS a pH 8.8 y en condiciones no desnaturizantes a pH 8.3 para comprobar su pureza.

Los experimentos de CDB tanto con Barstar como con el complejo Barnasa-Barstar se hicieron normalmente a una concentración de 50mM de varios tampones: CAPS y Glicina a pH alcalino (10-11); PIPES, HEPES y Citrato Sódico a pH neutro (6-8); y Acetato Sódico y Glicina a pH ácido (2.5-5.5). Las muestras se prepararon por diálisis tal y como hemos descrito en Materiales & Métodos. La concentración de proteína se hizo midiendo la absorbancia a 280nm de diluciones de la muestra en PIPES 50mM pH 7.0, condiciones en las que se calculó su coeficiente de extinción según el método de Gill & von Hippel (1989). Estos datos están recogidos en Materiales & Métodos. Para los experimentos se utilizó un calorímetro DASM-4 a velocidades de barrido de 0.5, 1 y 2 K/min, con concentraciones de muestra de 1.5-4 mg/mL para Barstar y 0.6-1.2 mg/mL para el complejo Barnasa-Barstar. La reversibilidad de la desnaturización dentro del calorímetro se comprobó rutinariamente para todas las condiciones experimentales elegidas. Para calcular la capacidad calorífica molar parcial de la proteína a partir de las trazas experimentales se utilizó un volumen específico parcial de 0.73 mL/g (valor promedio para pequeñas proteínas globulares) tanto para Barstar como para el complejo con Barnasa.

Los experimentos de CIT de la interacción Barnasa-Barstar se hicieron en un calorímetro construido en nuestro Departamento (El Harrous, 1994; Martínez et al., 1994). Su descripción detallada se da en Materiales & Métodos donde la hemos ilustrado con un ejemplo de análisis de esta interacción.

5.2.1.- ESTABILIDAD TERMICA DE BARSTAR "WT" Y SUS MUTANTES

La Barstar WT presenta una transición de desnaturalización bastante compleja. Este problema, como ya hemos visto en la Introducción, ha sido atribuido (Hartley, 1989) a los dos restos de Cys (en posiciones 40 y 82) que son bastante reactivas en la estructura nativa de la proteína. Las curvas de desnaturalización obtenidas por nosotros son bastante complejas e irreproducibles (tabla 5-I) y aunque el dato de T_m a pH 7.0 de 72°C coincide totalmente con el de Khurana & Udgaonkar (1994) y Hartley & Fitzgerald (1988) las entalpías sólo tienen un valor estimativo con una incertidumbre bastante considerable. Para evitar todos estos problemas en nuestro estudio por CDB, utilizamos mutantes en los que al menos una de las Cys se sustituyó por Ala. Todos estos mutantes exhiben unos datos bastante reproducibles a pH neutro y alcalino [Figura 5-3(A)]. A la vista de estos registros experimentales, parece que claro que la complejidad en la especie WT resulta por la formación de puentes disulfuro intramoleculares durante el calentamiento.

Los espectros de Dicroísmo Circular a pH 7.0 para las cuatro variantes C40A, C82A y C40/82A [que hicimos en el Instituto para la Investigación de Proteínas de Pushchino (Moscú)] (Figura 5-4) nos muestran que en el UV lejano los espectros de los mutantes son prácticamente indistinguibles de la WT sin embargo, los espectros en el UV cercano son un poco más diferentes y parece que la sustitución de Cys por Ala altera apreciablemente el microambiente de algunos grupos cromóforos, lo que se refleja por efectos casi aditivos en esta región espectral.

La Barstar pierde su conformación nativa a pH ácido y a temperatura ambiente (Schreiber & Fersht, 1993b; Khurana & Udgaonkar, 1994) por lo que su desnaturalización térmica sólo se puede estudiar a pH neutro y alcalino. Estas condiciones experimentales se han utilizado en este trabajo para cambiar la estabilidad de la conformación nativa. A $\text{pH} \geq 6$, la reversibilidad del desplegamiento para todos los mutantes de Barstar estudiados es bastante alta (sobre un 80%). No existe una dependencia de la posición de la curva o de su forma con la velocidad

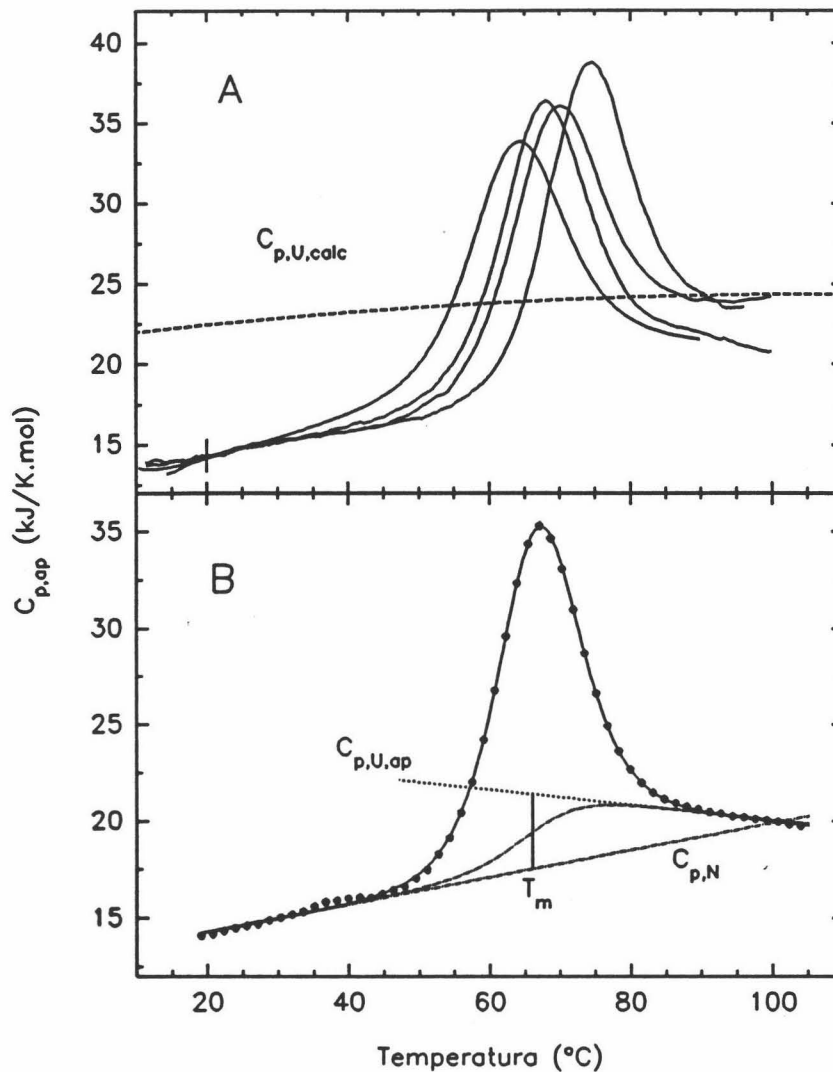


FIGURA 5-3: (A) Dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica molar parcial para algunos mutantes de Barstar en diferentes condiciones experimentales, que en orden de estabilidad decreciente son: DM en citrato sódico 50mM pH 6.0, 1.75 mg/mL, 1 K/min; TMPL en CAPS 50mM pH 10.0, 1.0 mg/mL, 2 K/min; DM en Glicina 50mM pH 10.3, 3.2 mg/mL, 1 K/min; DM en CAPS 50mM pH 10.8, 2.0 mg/mL, 2 K/min. Las trazas de CDB se alinearon haciendo coincidir su valor de $C_{p,ap}$ a 20°C con un valor medio de 14.3 kJ/K·mol (la barra vertical nos indica los límites de error de $C_{p,ap}$ (293)). La línea a trazos es la función $C_{p,U,calc}(T)$ (ver texto). **(B)** Ajuste de una de las curvas de CDB para Barstar DM a pH 10.3 en CAPS 50mM, 2.0 mg/mL, 1 K/min. La línea continua es la curva del mejor ajuste al modelo de dos estados y los datos experimentales se representan por puntos. También hemos representado las funciones $C_{p,U,ap}(T)$ (·····), $C_{p,N}(T)$ (- - - -) y $C_{p,int}(T)$ (- · - · -) obtenidas del ajuste. La barra vertical en la T_m representa el valor obtenido del ajuste para $\Delta C_{p,N,D}$ que en este caso particular fue de 3.9 kJ/K·mol.

TABLA 5-I
PARAMETROS TERMODINAMICOS PARA BARSTAR WT

CONDICIONES	Concentración de proteína (mg/mL)	Descripción	T _m (°C)	$\Delta H_{N,D}^{OH}$ (kJ/mol)	$\Delta H_{N,D}^{VH}$ (kJ/mol)	r	$\Delta C_{p,N,D}$ (kJ/Kmol)	Reversibilidad
Glicina 100mM pH 2.5	0.53	SIN TRANSICION						
Glicina 50mM pH 3.0	0.84	SIN TRANSICION						
Glicina 20mM pH 3.5		AGREGADA						
Acetato 50mM pH 5.5 (N)		AGREGADA						
Citrato 50mM pH 6.0 (N)	2.52		71.6	184	327	0.56	8.2	0%
PIPES 50mM pH 7.0 (N)	2.95		72.8 72.7	284 141	310 335	0.91 0.42	5.0 7.0	50%
PIPES 10mM pH 7.5	1.81		69.0 69.1	221 253	317 271	0.70 0.94	7.2 ---	100%
PIPES 1mM DTT 0.1mM pH 7.5 (N)	2.01 2.01		69.3 70.0	137 153	309 249	0.44 0.62	5.4 3.0	100%
	1.25		69.6	219	309	0.71	4.7	
CAPS 50mM pH 10.0 (N)	2.06		60.6 60.0	119 139	222 121	0.54 1.15	0.7 1.8	100%
Glicina 20mM DTT 0.1mM pH 10.3 (N)	1.44	PARCIALMENTE DESNATURALIZADA						
CAPS 20mM DTT 0.1mM pH 10.6 (N)	2.11	DESNATURALIZADA						

La velocidad de barrido en todos estos experimentos fue de 1 K/min. (N) significa que se mantuvo atmósfera de nitrógeno en las disoluciones, para evitar el contacto del ditiotreitól (DTT) con el oxígeno del aire.

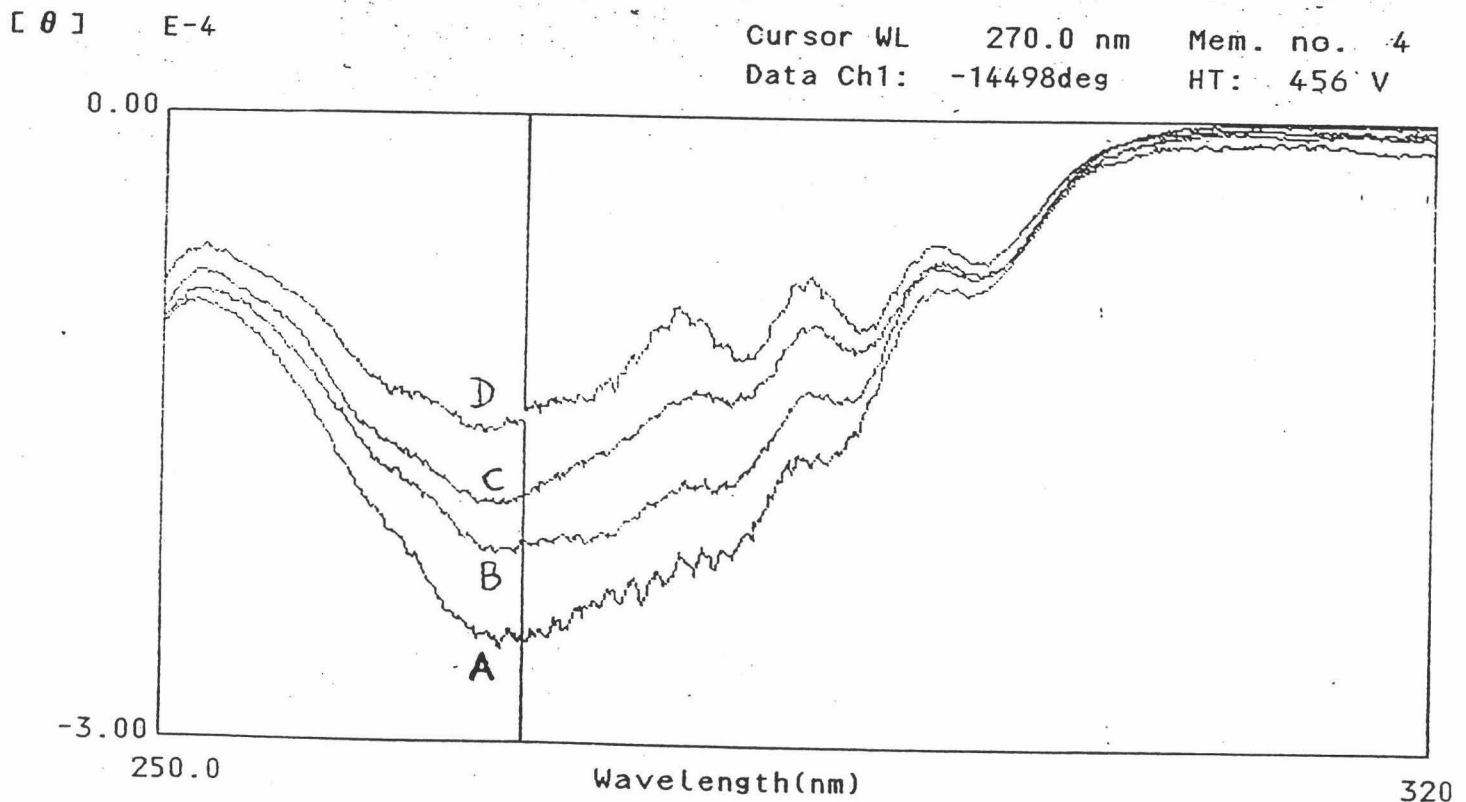
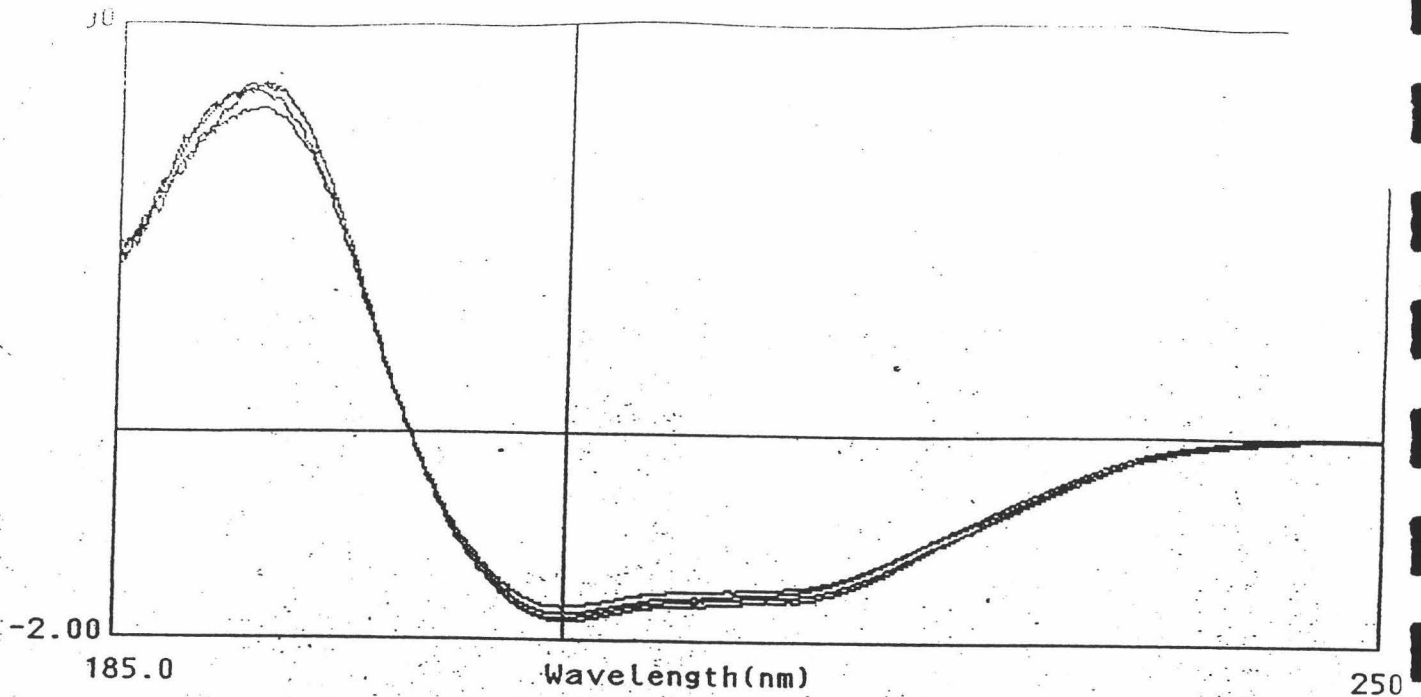


FIGURA 5-4: Espectros de dicroísmo circular para Barstar WT y sus mutantes C40A, C82A y C40/82A a pH 7.0 en MOPS 20mM, calculados por mol de proteína en unidades arbitrarias. (A) Espectros de la zona del UV lejano. (B) En el UV cercano. Símbolos: A (WT), B (C40A), C (C82A) y D (DM).

de barrido. De todas maneras, se ha observado que el calentamiento de la muestra por encima de su transición de desnaturalización resulta en un decrecimiento gradual de la reversibilidad. Esto debe ser el resultado de algún proceso irreversible que ocurre a continuación de la desnaturalización y puede relacionarse, en principio, con la oligomerización irreversible de la cadena desplegada y/o con su modificación química (Klibanov & Ahern, 1987). Sin embargo, no tenemos formación de precipitados visibles en los calentamientos hasta 100°C.

Las electroforesis en SDS y pH 8.8 de las muestras de Barstar nativas y calentadas en el calorímetro no presentan bandas adicionales con otro peso molecular distinto al de la Barstar intacta [Figura 5-5(A)] lo que excluye la posibilidad de una degradación química de la estructura. Las realizadas en Urea 8M y pH 8.3 parecen mostrar también un único estado desnaturalizado químicamente [Figura 5-5(B)]. Sin embargo, en las electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (pH 8.3) de las muestras de proteína calentadas a $\text{pH} \geq 6$ aparecen otras bandas con una movilidad mayor a la de la proteína nativa (Figura 5-6). Esta observación sugiere la existencia de modificaciones químicas y/o un repliegamiento incorrecto de las especies de Barstar después de su exposición a temperaturas elevadas. La cinética lenta de los procesos irreversibles que acompañan a la desnaturalización sería consistente con la existencia de modificaciones químicas en la estructura. Esta conclusión también se apoya en la imposibilidad de conseguir renaturalizar las muestras calentadas en el calorímetro, incluso con la adición de urea 6M y su posterior eliminación por diálisis; el grado de renaturalización nunca alcanzó el 90%.

Se hicieron experimentos de HPLC en una columna Mono Q (Pharmacia) de intercambio aniónico con gradientes de NaCl entre 0.20 y 0.25 M. En la Figura 5-7 vemos que tenemos un único pico con muestras nativas ($t_R \approx 20\text{min}$) que igual que en las columnas de filtración en HPLC y Sephadex G-50 tiene el peso molecular del monómero. En las desnaturalizadas aparecen dos picos adicionales (t_R de 25 y 45min) en proporciones muy parecidas a las de las bandas de electroforesis (Figura 5-6; comparadas por densitometría). Esto apoya la idea anterior ya que se

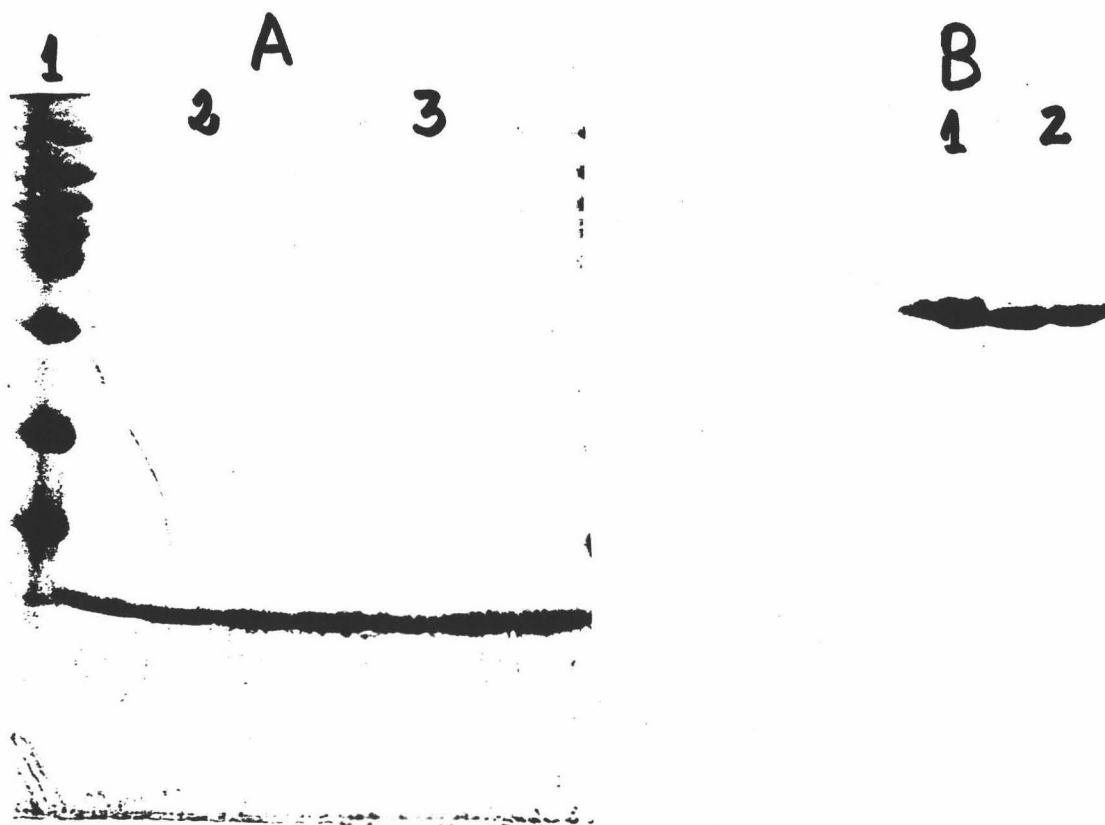


FIGURA 5-5: (A) Electroforesis en SDS pH 8.8 de muestras nativas de Barstar (2) y calentadas en CDB hasta 110°C (3). Todos los mutantes aquí descritos dan una única banda igual a la mostrada. En (1) tenemos un conjunto de proteínas patrón de pesos moleculares comprendidos entre 340 y 14.3 kDa. (B) Electroforesis en Urea 8M pH 8.3 de muestras de Barstar C40/82A, TMPA y TMPL (1) y del complejo Barnasa-Barstar(DM) (2).

demuestra que las especies son heterogéneas por tener una carga neta diferente (mucho mayor en las especies "no nativas").

Resultados de CDB con los mutantes de Barstar

La capacidad calorífica del estado inicial (nativo) de las preparaciones con mutantes de Barstar, $C_{p,N}(T)$, aumenta linealmente con la temperatura (Figura 5-3)

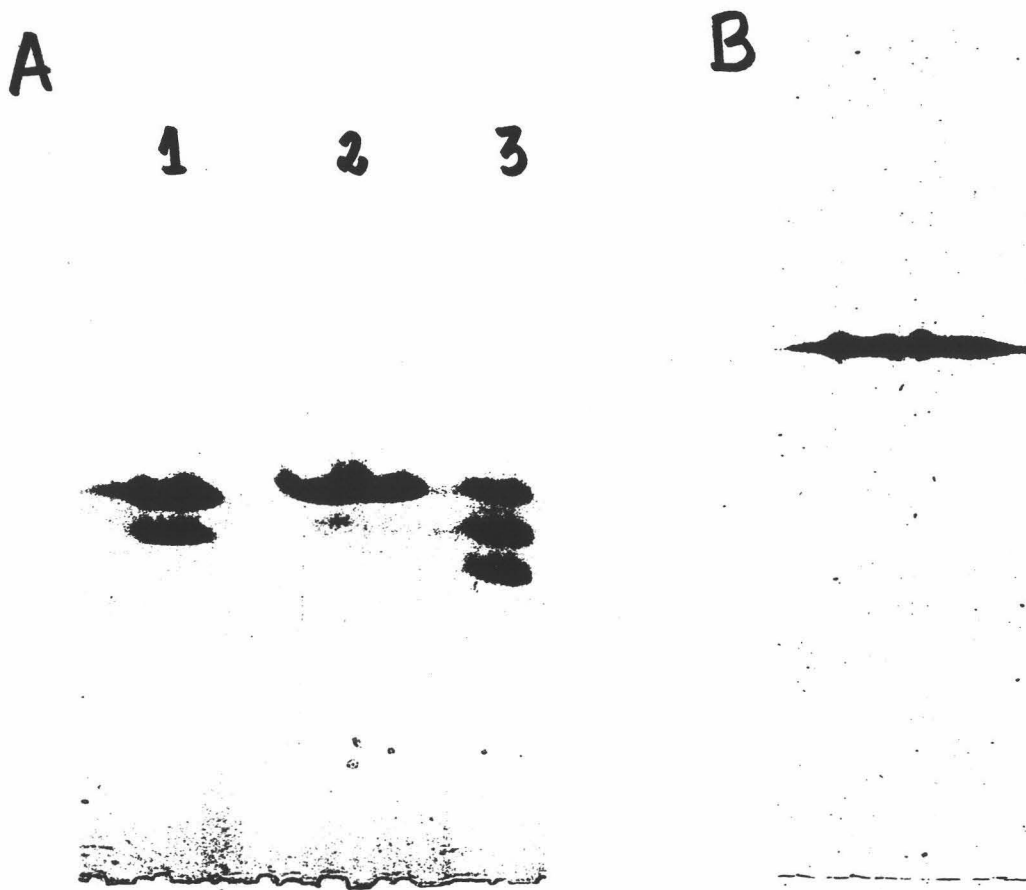


FIGURA 5-6: (A) Electroforesis nativa a pH 8.3 de muestras de Barstar C40/82A: (1) calentada hasta 100°C en baño de agua durante 5 minutos, (2) nativas y (3) desnaturalizadas en CDB a 110°C. Resultados similares se obtuvieron con los mutantes TMPA y TMPL. Las muestras pre-dializadas a pH 3.0 dan también la misma banda que en (2). (B) Idem. para el complejo Barnasa-Barstar(DM) donde tenemos una sola banda de menor movilidad electroforética que para Barstar. Nota: la Barnasa no entra en el gel a pH 8.3 puesto que en estas condiciones se encuentra muy próximo su punto isoeléctrico cuyo valor es de 8.9.

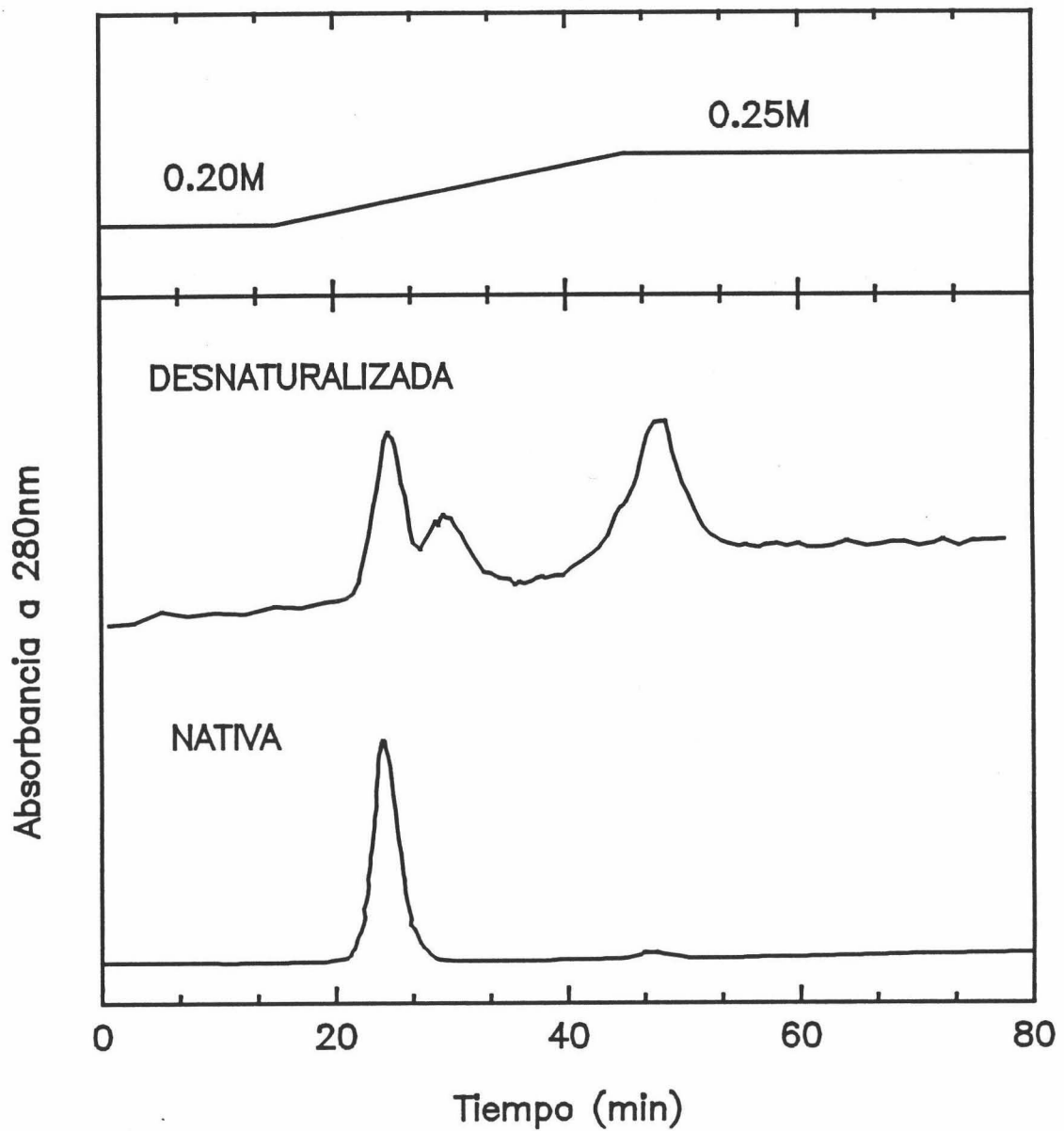


FIGURA 5-7: Experimentos de HPLC en una columna de intercambio aniónico (MonoQ - Pharmacia) equilibrada en tampón TRIS 20mM pH 8.3. Se practicó un gradiente de NaCl entre 0.20 y 0.25M de concentración (parte superior) que se determinó por ser el intervalo en el que se separan más picos en la especie desnaturalizada.

de una forma totalmente normal para una proteína globular de tan pequeño tamaño. Haciendo un promedio de las contribuciones obtenidas en las distintas condiciones experimentales, hemos deducido la siguiente fórmula empírica para los mutantes:

$$C_{p,N}(T) = (14.3 \pm 1.5) + (0.08 \pm 0.008) \cdot (T - 293.2) \quad (kJ/K \cdot mol) \quad (5.1)$$

En general, la línea base del calorímetro DASM-4 tiene una forma muy reproducible pero puede moverse de su posición media, lo que constituye una contribución apreciable (sobre 5-10%, dependiendo de la concentración de proteína) al error total en la determinación del $C_{p,N}(T)$. La dispersión en este valor puede ser minimizada procurando una diálisis completa, con una total equilibración con el disolvente; de todos modos en nuestros experimentos hemos utilizado concentraciones de proteína relativamente pequeñas lo que se traduce en una dispersión que alcanza el 10% para el valor de la pendiente del tramo inicial. Estos cambios conducen a una incertidumbre todavía mayor de la curva de desnaturalización a temperaturas superiores, lo que complica la determinación de la capacidad calorífica para el estado desnaturalizado, $C_{p,U}(T)$.

En los experimentos con la especie C40/82A a pH básico (Glicina 50mM) especialmente a pH 10.3, se observa una pequeña pre-transición totalmente irreversible en la $C_{p,N}(T)$ que no supone en ningún caso más de un 10% de área total de la endoterma. Por cromatografía de exclusión en Sephadex G-50 a 25°C y 45°C (valor de temperatura entre ambas transiciones; Figura 5-10) y en las mismas condiciones experimentales, no se observa ningún estado de asociación molecular, obteniendo un sólo pico correspondiente al peso molecular del monómero. Una posible causa podría hallarse en la isomerización de Pro48 [la posición *cis* que es la suya en el estado nativo es unos 8 kJ/mol menos estable que la *trans*] ya que la barrera energética entre ambos isómeros es suficientemente pequeña. Los experimentos con los mutantes TMPA y TMPL, efectivamente no presentan esa pre-transición en las mismas condiciones lo que parece indicar, no concluir, que es un fenómeno asociado con ella. Un hecho parecido lo tenemos en

la "Staphylococcal nuclease" que tiene un resto de Pro en *cis* y presenta dos formas "nativas" bastante similares que coexisten en equilibrio (Evans et al., 1989). La mutagénesis por Gly evitaba este comportamiento. Además, ya hemos comentado los resultados experimentales de Schreiber & Fersht (1993b) sobre la cinética tan lenta de isomerización de la Pro48 en Barstar.

En la zona donde tenemos definida experimentalmente la función $C_{p,U}(T)$ (después de la transición calorimétrica) hemos observado una tendencia sistemática para ella a disminuir con la temperatura [Figura 5-3(A)], en lugar de permanecer más o menos constante como se ha observado para otras proteínas globulares pequeñas (Privalov, 1979; Privalov, 1989; Privalov et al., 1989; esta Memoria). Nuestra experiencia en desnaturalización de proteínas por CDB pone de manifiesto que muchas modificaciones irreversibles de la cadena polipeptídica, similares a las descritas antes, pueden ir acompañadas por un efecto exotérmico que, dependiendo de la cinética del proceso en sí, debe resultar en un decrecimiento continuo en la capacidad calorífica, como comentaremos en Discusión. Efectos parecidos se han encontrado en otras proteínas globulares (Takahashi & Sturtevant, 1981; Azuaga et al., 1992). Takahashi & Sturtevant (1981) sugieren un procedimiento general de análisis de datos para estas situaciones, basado en aproximar linealmente las capacidades caloríficas iniciales y finales sobre el intervalo de la transición. Nosotros hemos utilizado una aproximación similar en nuestros cálculos, que matemáticamente se traduce en que podemos expresar las capacidades caloríficas como:

$$C_{p,N}(T) = a_N + b_N \cdot (T - T_U) \quad (5.2)$$

$$C_{p,U,ap}(T) = a_D + b_D \cdot (T - T_U) \quad (5.3)$$

donde a_N , a_D , b_N y b_D son parámetros de variación independiente, específicos para cada curva individual. La temperatura de desnaturalización, T_U , se ha elegido como temperatura de referencia sin que exista ninguna razón especial para ello, sólo de

cálculo ya que aparece en todas las fórmulas que determinan la forma del pico y su posición.

Si tenemos definidas las capacidades caloríficas de los estados inicial y final y asumimos que sólo estos dos estados están poblados significativamente en el equilibrio (modelo de dos estados), podemos elegir el estado nativo, N, como referencia y describir así la función $C_p(T)$ por las siguientes expresiones:

$$\Delta C_{p,Uap}(T) = (a_D - a_N) + (b_D - b_N) \cdot (T - T_U) = \Delta C_{p,N,D} + \Delta b_{N,D} \cdot (T - T_U) \quad (5.4)$$

$$\Delta C_{p,exc}(T) = \frac{\langle \Delta H_N(T) \rangle}{RT^2} \frac{K_U}{(1+K_U)^2} \quad (5.5)$$

$$\Delta C_{p,ni}(T) = C_{p,N}(T) + \Delta C_{p,Uap}(T) \frac{K_U}{1+K_U} \quad (5.6)$$

$$\langle \Delta S_N(T) \rangle = \frac{\Delta H_{N,D}}{T_U} + (\Delta C_{p,N,D} - \Delta b_{N,D} \cdot T_U) \ln \frac{T}{T_U} + \Delta b_{N,D} (T - T_U) \quad (5.7)$$

$$\langle \Delta H_N(T) \rangle = \Delta H_{N,D} + \Delta C_{p,N,D} (T - T_U) + \frac{\Delta b_{N,D}}{2} (T - T_U)^2 \quad (5.8)$$

donde $\langle \Delta H_N(T) \rangle$ y $\langle \Delta S_N(T) \rangle$ son los cambios de entalpía y entropía, y $\Delta C_{p,N,D}$ y $\Delta H_{N,D}$ son las variaciones en la capacidad calorífica y en la entalpía en el punto medio de la transición, T_U . Estas ecuaciones contienen 6 parámetros independientes que pueden ser ajustados: a_N , b_N , a_U , b_U , $\Delta H_{N,D}$ y T_U . Sin embargo, a causa de la estabilidad relativamente alta de Barstar, la capacidad calorífica del estado inicial es medida en un amplio intervalo de temperatura y puede ser aproximada con suficiente exactitud. Esto reduce el número de parámetros ajustables a 4.

La aplicación de este procedimiento de ajuste a una curva experimental individual la tenemos en la Figura 5-3(B). En ella hemos ilustrado las aproximaciones lineales de las capacidades caloríficas inicial y final según las

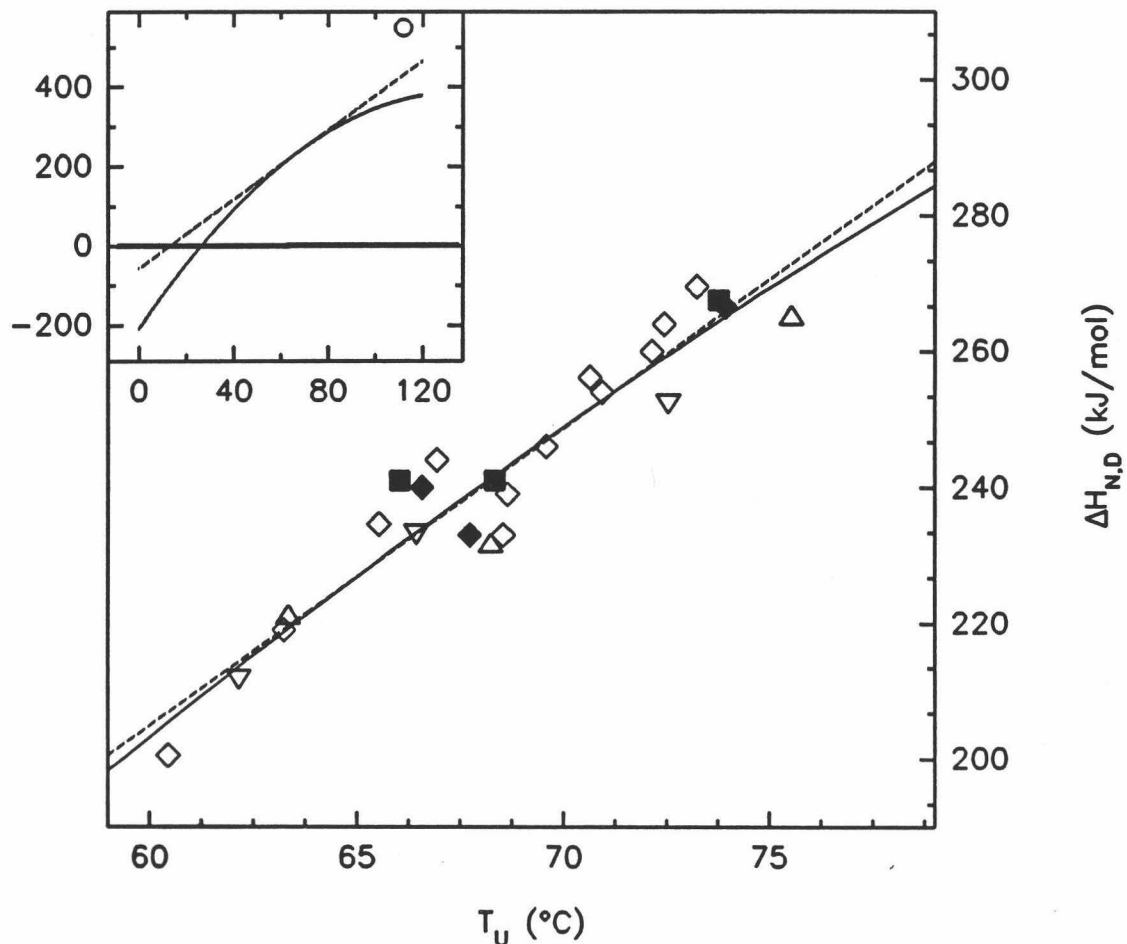


FIGURA 5-8: Correlación entre las entalpías de desnaturalización y la T_U para mutantes de Barstar, C40A (Δ), C82A (∇), DM (\diamond), TMPA (\blacklozenge) y TMPL (\blacksquare). Los datos se obtuvieron en el intervalo de pH 6.0-10.8 para el DM y 7.0-10.3 para el resto de mutantes. La regresión lineal a través de los puntos experimentales (---) y la regresión parabólica (—) se comentan en el texto. En la parte superior tenemos la misma regresión en una escala más amplia de temperaturas y el círculo representa el valor límite estimado por Privalov (ver texto).

expresiones calculadas para ellas a partir del ajuste, así como $\Delta C_{p,int}(T)$, la T_U y el $\Delta C_{p,N,D}$, que en este caso abarca como mucho el 20% de la altura total del pico. Como vemos, la curva experimental se ajusta al modelo de dos estados bastante bien.

Los valores de $\Delta H_{N,D}$ encontrados por ajuste de los experimentos a diferentes condiciones experimentales y con distintos mutantes de Barstar los tenemos

representados en la Figura 5-8 frente a sus correspondientes temperaturas de desnaturalización. La regresión lineal de estos datos se puede describir por la siguiente ecuación:

$$\Delta H_{N,D}(T_U) = -56 + 4.35 \cdot (T_U - 273.2) \quad (\text{kJ/mol}) \quad (5.9)$$

con errores estandar en $\Delta H_{N,D}$ y T_U de ± 15 kJ/mol y ± 0.5 K respectivamente. La media de los valores de $\Delta C_{p,N,D}$ encontrados en el ajuste en el intervalo de temperaturas de desnaturalización 60-75°C, es de 4.1 kJ/K·mol con un error estandar tan alto como ± 2.5 kJ/K·mol. Este error es lógico si tenemos en cuenta que la caída experimental de la función $C_{p,U,ap}(T)$ aunque sistemática es muy poco reproducible y esto nos lleva a la indeterminación en su extrapolación hasta T_U , donde medimos el $\Delta C_{p,N,D}$ [Figura 5-3(B)].

5.2.2.- EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA A pH ACIDO

Según hemos podido constatar, ni la WT ni el mutante C40/82A presentan transición por CDB a pH 2.5 que sea similar a las de $\text{pH} \geq 6$, pero tampoco su función $C_p(T)$ es la típica para una proteína completamente desnaturalizada (Figura 5-9). A bajas temperaturas el mutante C40/82A tiene una capacidad calorífica molar parcial apreciablemente mayor que el valor medio de 14.3 kJ/K·mol encontrado para la proteína nativa a 20°C y $\text{pH} \geq 6$ y, al mismo tiempo, es menor que el valor de $C_{p,U}(T)$ calculado como describimos en Discusión y representado también en la Figura 5-9. El primer barrido con la muestra resulta en un incremento lineal de la capacidad calorífica a temperaturas por debajo de 55°C. La posición y la pendiente de la capacidad calorífica para este estado inicial no dependen de la velocidad de barrido entre los límites de error. Si aumentamos la temperatura sobre 55°C se origina un proceso endotérmico, seguido a unos 90°C por una exoterma muy aguda. Estas exotermas son típicas cuando ocurren procesos de agregación y, de hecho, su posición y su forma dependen de la velocidad de barrido ya que el proceso está cinéticamente controlado. En el segundo barrido de las muestras vemos que a bajas temperaturas la capacidad calorífica molar parcial está mucho

más cercana aún a la del estado nativo (medida a $\text{pH} \geq 6$) que a la del desnaturalizado (Figura 5-9).

Las muestras de proteína calentadas a $\text{pH} 2.5$ presentan un aumento en su "light scattering" medido en el Visible del mutante C40/82A en el siguiente orden: $\text{pH} 7.0$, $\text{pH} 2.5$ antes del calentamiento y $\text{pH} 2.5$ después de calentar en el calorímetro hasta 100°C [la absorbancia a 330nm de estas muestras es: ≈ 0 , 0.05 y 0.15 respectivamente, para una concentración de DM alrededor de 3.5 mg/mL]. Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular en una columna de

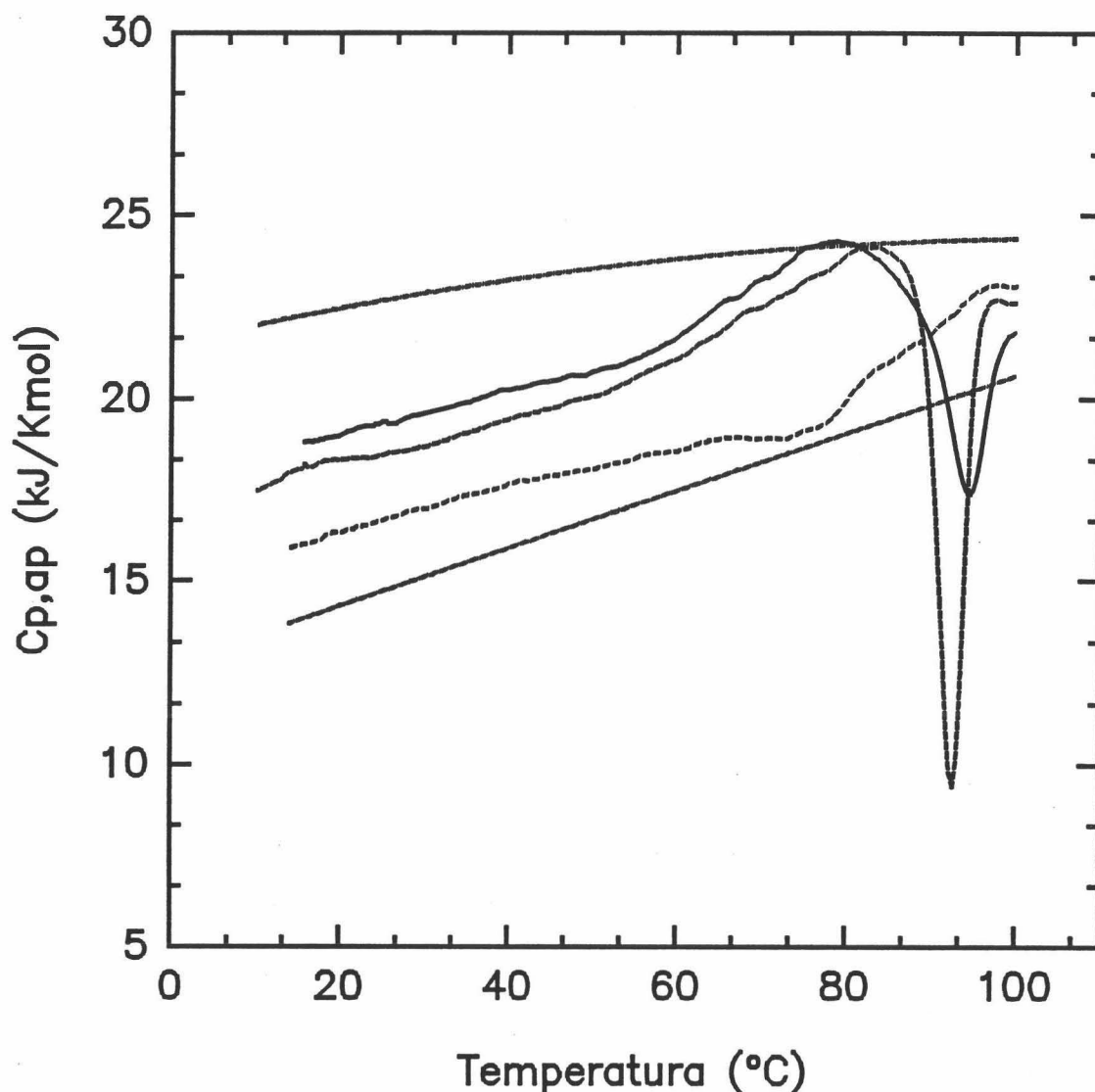


FIGURA 5-9: Dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica molar parcial de Barstar DM a pH 2.5, 20mM Glicina, 1.9 mg/mL. El primer barrido a 2 K/min (—), a 1 K/min (---) y el segundo barrido a 1 K/min (····). Para comparar hemos incluido la capacidad calorífica del estado desnaturalizado calculada (-·-·-) y la aproximación empírica de $C_{p,N}(T)$ (- - - -) para $\text{pH} \geq 6$.

Sephadex G-50 (ver Materiales & Métodos) del mutante C40/82A en Glicina 20mM a pH 2.5 (Figura 5-10) nos dicen que el mutante tiene un índice de retención muy pequeño e igual al volumen de exclusión, mientras que a pH 7.0 (PIPES 50mM) y a pH 10.0 (Glicina 50mM) aparece un sólo pico en la posición del monómero. Por

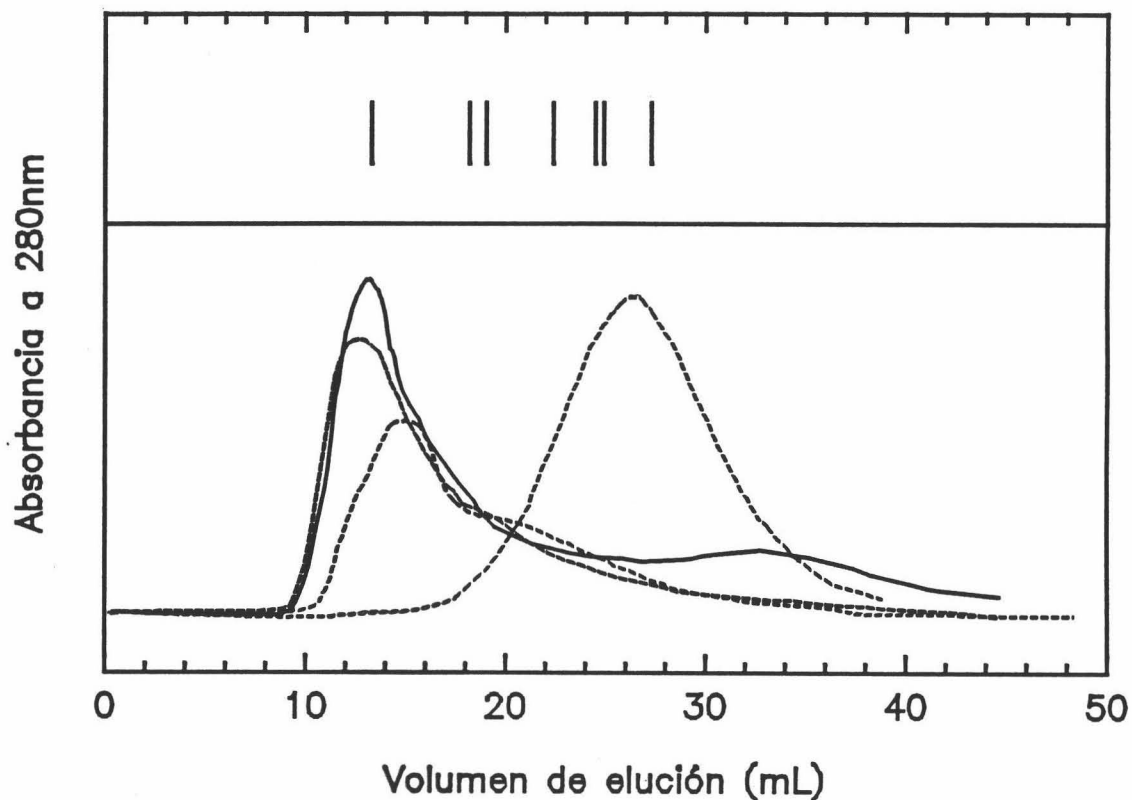


FIGURA 5-10: Experimentos de cromatografía de exclusión en una columna de Sephadex G-50 (ver Materiales & Métodos para una descripción experimental) equilibrada en diferentes tampones y temperaturas con muestras de Barstar DM: (—) en Glicina 200mM pH 2.50 a 25°C; (---) Idem. a 20mM y 25°C; (—) la anterior calentada hasta 100°C en un CDB; (····) en PIPES 50mM pH 7.0 a 25°C. Picos similares en posición a este último se obtuvieron a pH 10.0 en Glicina 50mM a 25°C y 45°C. Las marcas superiores son patrones de peso molecular dispuestos en el siguiente orden (de izquierda a derecha): Volumen de exclusión (Blue Dextran), 45kDa, 29kDa, 20.1kDa, 14.3kDa, 12.4kDa y 6.5kDa.

consiguiente, el DM se comporta claramente como un monómero a $\text{pH} \geq 6$ mientras que, debido a las diferencias de tipo conformacional de la especie a pH 2.5, a estas condiciones tiene una gran tendencia a la asociación que aumenta con la temperatura.

Para medir el intercambio calorífico entre el estado nativo N, y este estado a pH ácido que podemos llamar A, llevamos a cabo un experimento en un

calorímetro isotérmico de titulación (García-Fuentes, 1994) que consistía en valorar el mutante C40/82A (dializado en PIPES 50mM pH 7.0) con sucesivas inyecciones de una disolución de Glicina 1M a pH 2.5 a la que previamente se midió su calor de dilución. Este cambio de pH desde 7.0 a 2.5 se hizo a 25°C. Aunque el $\Delta H_{N,A}$ esperado era de unos 50 kJ/mol (ecuación 5.10), nosotros obtuvimos un valor de -95 ± 5 kJ/mol lo que se traduce en que deben de existir otros procesos concomitantes, con un cambio de entalpía de aproximadamente 145 kJ/mol. Obviando algunos factores (como, por ejemplo, la valoración de ciertos grupos de la proteína) este proceso podría ser muy bien la asociación de la proteína a pH 2.5 ya que, por ejemplo, la disociación y desnaturalización del molten globule dimérico de CheY a pH 2.5 (ver la Sección siguiente; Filimonov et al., 1993) tiene un cambio de entalpía de -155 ± 20 kJ/mol. Según los experimentos de electroforesis nativa (pH 8.3) este proceso sería totalmente reversible puesto que las calles con muestras pre-incubadas a pH 2.5 presentan una sola banda de idéntica movilidad a la del estado N a pH 7.0 (Figura 5-6).

5.2.3.- EXPERIMENTOS DE CDB CON EL COMPLEJO BARNASA-BARSTAR

La Barnasa forma un complejo muy fuerte con el mutante C40/82A de Barstar a pH 7.0 (casi tanto como con la WT), con una constante de disociación de $2 \cdot 10^{-13}$ M (Hartley, 1993; Schreiber & Fersht, 1993b). Esto nos ha permitido desarrollar un método sencillo para su purificación a partir de una mezcla de Barnasa y Barstar como un complejo 1:1 eliminando los restos de monómeros por exclusión molecular (ver Materiales & Métodos).

Esta elevada afinidad es comparable a la de la interacción Ribonucleasa A-PRI que forma también un complejo 1:1 con una $K_d = 4.4 \cdot 10^{-14}$ M. Con la angiogenina-PRI tenemos una $K_d = 7.1 \cdot 10^{-16}$ M (Lee et al., 1989).

El complejo Barnasa-DM no se forma a valores de pH por debajo de 3.5 y, si se forma, no es una especie muy soluble en el intervalo de pH 3.5-6.0 (Schreiber & Fersht, 1993b). La imposibilidad de la Barstar para formar el complejo con Barnasa a pH ácido también se demuestra con los registros de CDB, que tienen un

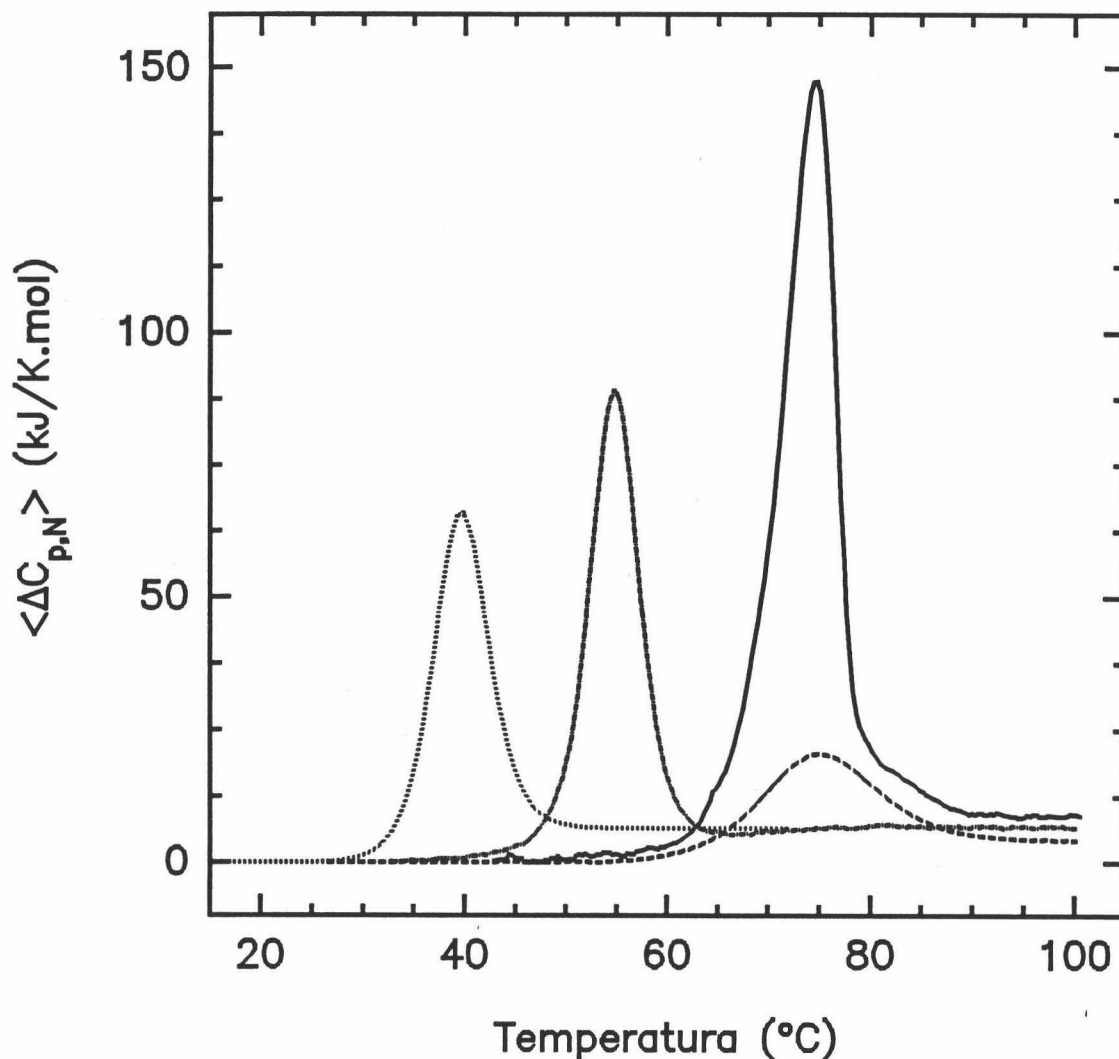


FIGURA 5-11: Dependencia con la temperatura de los datos de $\langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle$ a pH 7.0 en PIPES 50mM para el complejo Barnasa-Barstar(DM) (—) y para sus componentes: DM (---) y Barnasa (-·-·-). Hemos ilustrado también con una curva de CDB del complejo a pH 3.0 (····) que sería en realidad perteneciente a Barnasa a esas condiciones pues la Barstar está desnaturalizada y no unida a este pH (ver texto).

sólo pico simétrico con unos parámetros de desnaturalización correspondientes a los del calentamiento independiente de Barnasa en las mismas condiciones (Figura 5-11). Por consiguiente, en estas condiciones la conformación de la Barstar es tan desfavorable energéticamente que, a una concentración de 0.1mM de ambas proteínas en disolución, ni su elevada afinidad por Barnasa puede compensar el

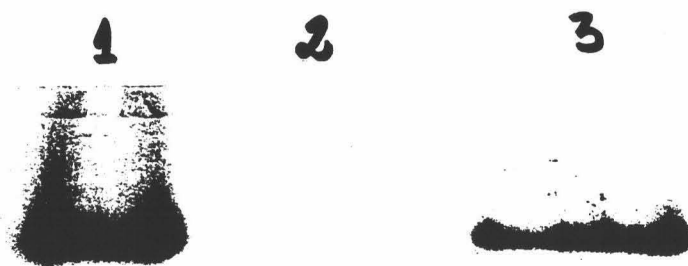


FIGURA 5-12: Electroforesis en condiciones no desnaturizantes para muestras de Barstar (1), Barnasa (2) y del complejo (3) formado a diferentes condiciones de pH (6.0, 7.0, 10.0 y 10.5). Como vemos, en estas condiciones sólo obtenemos una única banda de movilidad igual que la de Barnasa. La Barstar no presenta ninguna banda en el gel dada la proximidad de su punto isoeléctrico (en torno a 5).

valor positivo de la energía de Gibbs del plegamiento. Las electroforesis nativas a pH 4.3 (Figura 5-12) tampoco revelan ningún comportamiento diferente para la Barnasa en presencia o en ausencia de Barstar, dando bandas de movilidades idénticas. En cambio, como vemos en la Figura 5-6, a pH 8.3 la movilidad relativa de la Barstar sí se afecta por la presencia de Barnasa.

La solubilidad del complejo nativo es elevada a pH neutro y a bajas temperaturas; la desnaturización de cada componente en estas condiciones es solo parcialmente reversible, muy probablemente debido a la proximidad de sus puntos isoeléctricos [recordemos que a pH 6.0-10.0 la Barnasa desnaturiza irreversiblemente con formación de agregados visibles en disolución]. A pH 6.0 las curvas de desnaturización del complejo no son reversibles y dependen

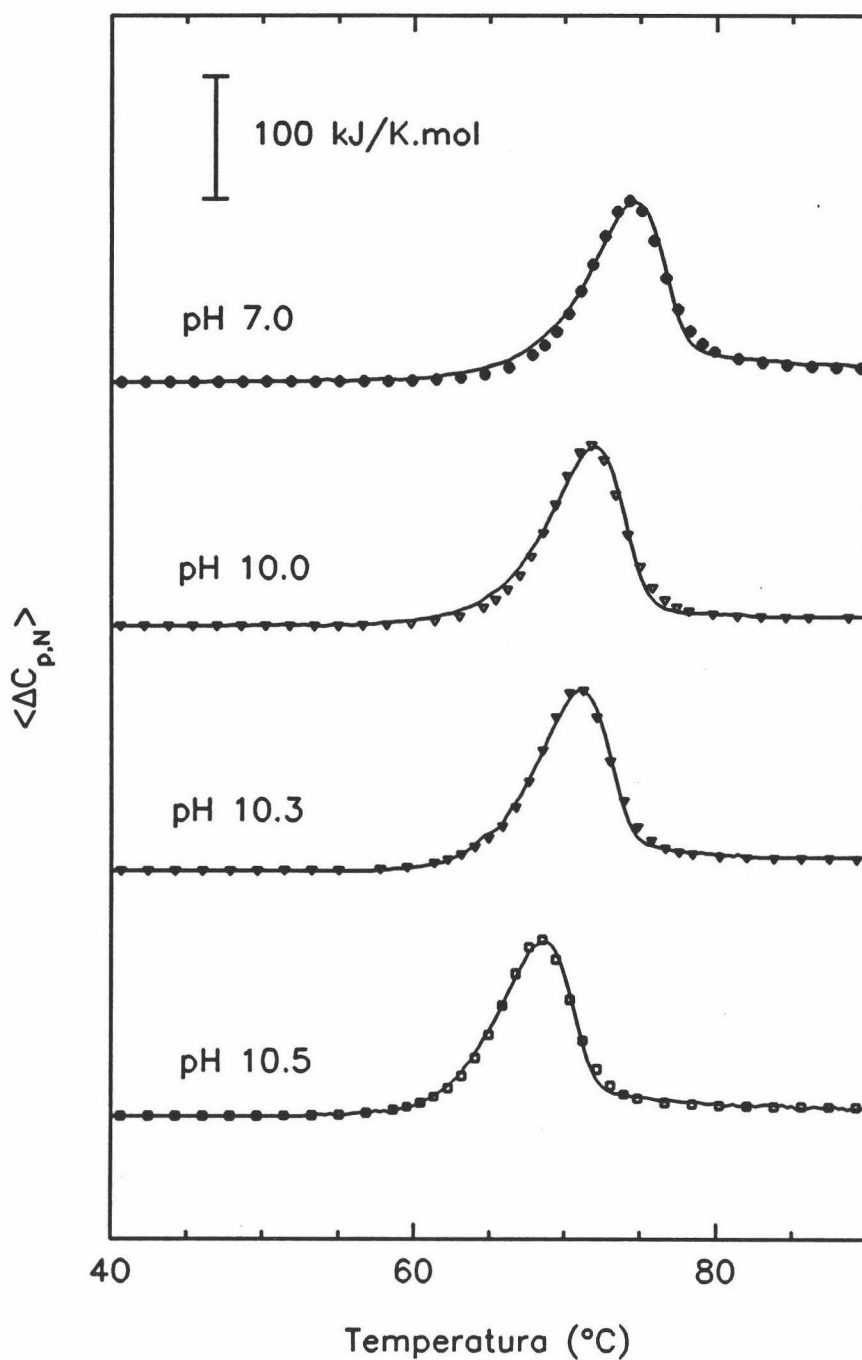


FIGURA 5-13: Dependencia con la temperatura de los datos de $\langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle$ para el complejo Barnasa-Barstar(DM) a varios valores de pH (puestos en la figura) y su mejor ajuste de acuerdo con el modelo propuesto (ver texto). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas son el mejor ajuste obtenido en cada caso. Los parámetros se dan en la tabla 5-II.

fuertemente de la velocidad de barrido. A $\text{pH} \geq 7.0$ la situación cambia y no existe un efecto apreciable de la velocidad de barrido, siendo reversible en un 60%. Hay que destacar que la asimetría observada en las curvas de CDB (ver Figuras 5-11 y 5-13) no implica ningún carácter irreversible en la desnaturalización, sino que es una propiedad relacionada con el proceso de asociación-disociación acoplado a la desnaturalización del complejo (Brandts & Lin, 1990).

La Figura 5-11 nos muestra que a $\text{pH} 7.0$ la Barnasa es el componente del complejo que llega a ser más estable (unos 20°C a las concentraciones de proteína utilizadas), mientras que en esas mismas condiciones el complejo es sólo unos 2°C más estable que el DM libre. Esta escasa estabilización de la Barstar provoca que después de la disociación del complejo, acompañada por la desnaturalización de Barnasa, tengamos hasta un 40% de moléculas de DM en estado nativo. Esta fracción de proteína nativa puede desnaturalizarse de acuerdo con los parámetros de desplegamiento de Barstar, y por tanto lo hará en un amplio intervalo de temperatura. Este proceso de desnaturalización se ha observado como una pequeña curvatura en la parte derecha de la transición (Figura 5-11).

Para el análisis termodinámico de los experimentos hemos utilizado el modelo definido en Materiales & Métodos para el caso de una interacción con desnaturalización de las dos especies que interaccionan (Sección ??) y allí ya obtuvimos la expresión matemática que nos relaciona la variación de la capacidad calorífica con la temperatura, $\langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle$. Esta función se puede encontrar a partir de los datos de CDB sin demasiada dificultad, sencillamente restando a los datos experimentales la contribución de la función $C_{p,N}(T)$ que es una línea recta. En nuestro caso, dada la relativamente alta estabilidad del complejo, la función anterior queda bastante definida y se puede aproximar muy bien por regresión lineal. Con el fin de reducir el número de parámetros ajustables en el análisis, se utilizaron las funciones $\langle \Delta H_N(T) \rangle$ calculadas a partir de los datos de la desnaturalización de Barnasa y Barstar independientemente. Esto nos deja sólo tres parámetros ajustables que se corresponden con el proceso de interacción: ΔH_d , ΔS_d y $\Delta C_{p,d}$ que se definen como:

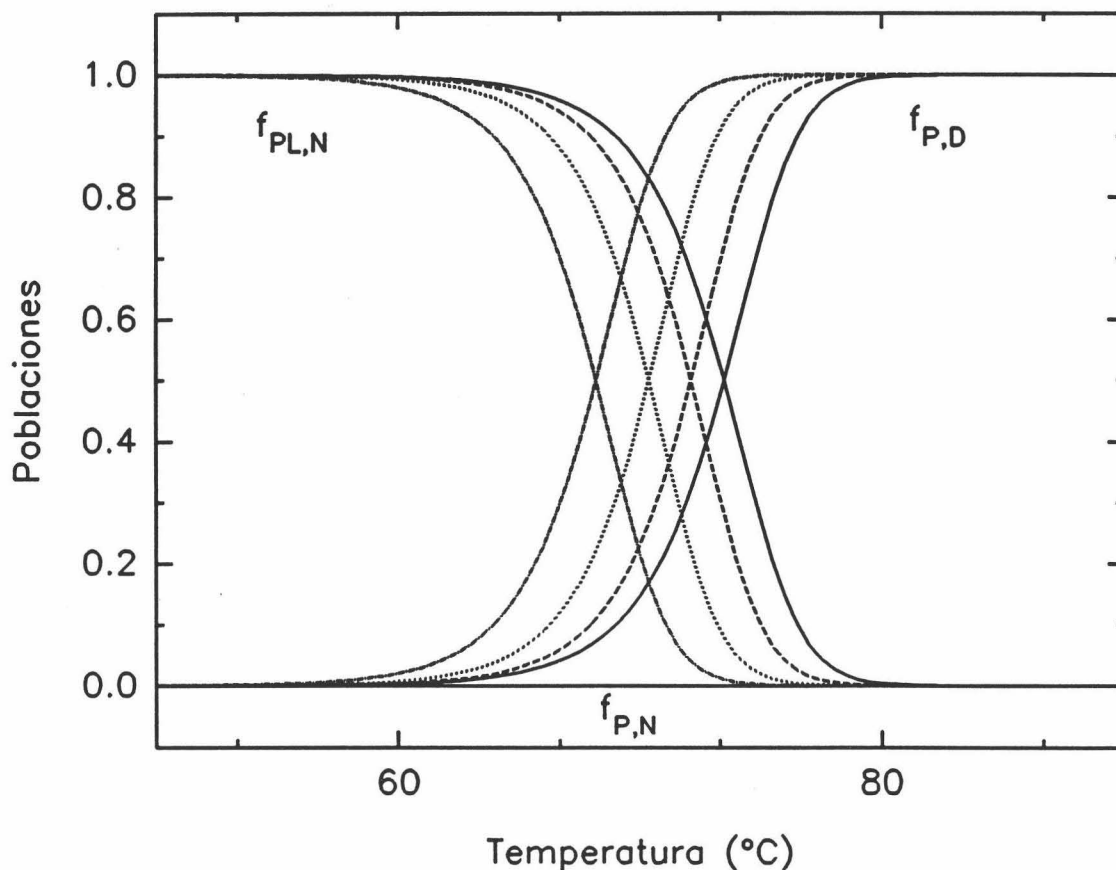


FIGURA 5-14: Cálculo de la distribución de poblaciones con la temperatura para el complejo Barnasa-Barstar(DM) obtenida a partir del modelo (ver Materiales & Métodos): a pH 7.0 (—), pH 10.0 (---), pH 10.3 (.....) y pH 10.5 (-.-.-).

$$\langle \Delta H_d(T) \rangle = \Delta H_d(T_U) + \Delta C_{p,d} \cdot (T - T_U) \quad (5.10)$$

$$\langle \Delta S_d(T) \rangle = \Delta S_d(T_U) + \Delta C_{p,d} \cdot \ln \frac{T}{T_U} \quad (5.11)$$

$$K_d = \exp\left(\frac{-\langle \Delta G_d(T) \rangle}{RT}\right) = \exp\left(\frac{\langle \Delta S_d(T) \rangle - \langle \Delta H_d(T) \rangle / T}{R}\right) \quad (5.12)$$

donde todas las funciones se calculan tomando como estado de referencia el complejo de ambas proteínas. T_U sería la temperatura de referencia, que en este caso hemos tomado la de desnaturalización de Barstar para reducir los errores de extrapolación, ya que desnaturaliza casi a la misma temperatura a la que se disocia el complejo. Los resultados del ajuste de los datos experimentales para el complejo Barnasa-Barstar(DM), utilizando este modelo se muestran en la Figura 5-13 y en la tabla 5-II.

TABLA 5-II
PARAMETROS TERMODINAMICOS PARA LA INTERACCION BARNASA-BARSTAR(DM)

Condiciones	ΔH_d^A (kJ/mol)	ΔS_d^A (J/K·mol)	K_d^A ($\cdot 10^{-14}M$)	$\Delta C_{p,d}^B$ (kJ/K·mol)	ΔH_d^B (kJ/mol)	ΔN^B	ΔN^C
Citrato 50mM pH 6.0					49 ± 2	-0.16 ±0.06	-0.23 ±0.06
PIPES 50mM pH 7.0	45 ± 20	-51 ± 5	15 ± 4	0.8 ± 0.1	58 ± 3 (62 ± 3) ^D	-0.37 ±0.06	-0.31 ±0.06
CAPS 50mM pH 10.0	45 ± 20	-93 ± 7	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.1	107 ± 5 (71 ± 5) ^D	0.76 ±0.06	
CAPS 50mM pH 10.3	35 ± 20		4.0 ± 1.0	(0.9)			
CAPS 50mM pH 10.5	54 ± 20		5.5 ± 1.5	(0.9)			

Los parámetros de la interacción Barnasa-Barstar(DM) se dan a una temperatura de referencia de 25°C (298 K), tanto los encontrados por CDB (^A) como por CIT (^B). Los últimos han sido corregidos con los efectos caloríficos del tampón (Figura 5-16), aunque mostramos los efectos de CAPS y PIPES (^D) para comparar con los datos de ΔH_d obtenidos por CDB. El número de protones intercambiados en la interacción, ΔN , ha sido determinado directamente por medidas potenciométricas (^C). Los valores de $\Delta C_{p,d}$ a pH 10.3 y 10.5 se han supuesto que son el mismo que a pH 10.0 y se han utilizado para extrapolar los parámetros de CDB hasta 25°C.

En la Figura 5-14 tenemos la distribución de poblaciones en función de la temperatura y vemos que sólo tenemos dos estados significativamente poblados: el asociado y el desnaturalizado, lo cual nos da una idea de la sencillez del proceso de desnaturalización.

5.2.4.- EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA ISOTERMICA CON EL COMPLEJO BARNASA-BARSTAR

También hemos determinado los efectos caloríficos de la interacción Barnasa-Barstar(DM) a varios valores de pH, de temperatura y en diferentes medios tamponados por CIT. Esto último fue necesario ya que los calores de ionización de los tampones a pH neutro y básico son relativamente elevados y afectan a la determinación de ΔH_d . Además, el uso de varios tampones nos conduce a una estimación del intercambio protónico que ocurre en la interacción (referencia??). Las valoraciones calorimétricas de Barnasa con Barstar a varias temperaturas a 15, 20, 25 y 35°C nos han permitido determinar el incremento en capacidad calorífica de la unión (Figura 5-15) a partir de la pendiente de la regresión lineal de los datos experimentales.

Los calores de la interacción en diferentes medios tamponados a 25°C se han representado frente a los calores de ionización de estos tampones a tres valores de pH en la Figura 5-16. Las líneas rectas en esta figura se corresponden con las regresiones lineales de los datos experimentales (símbolos). Las pendientes serían iguales al número de protones intercambiados entre las dos proteínas y el tampón en la interacción, mientras que sus ordenadas en el origen serían las entalpías de unión corregidas. Estos resultados están recogidos en la tabla 5-II, así como los resultados de la determinación directa del número de protones intercambiados por potenciometría.

Los experimentos potenciométricos nos han servido para contrastar los datos de ΔN que se han obtenido por CIT. El procedimiento experimental es muy sencillo: ponemos ambas proteínas por separado en un medio no tamponado de fuerza iónica determinada (50mM NaCl) al valor de pH al que queremos determinar ΔN .

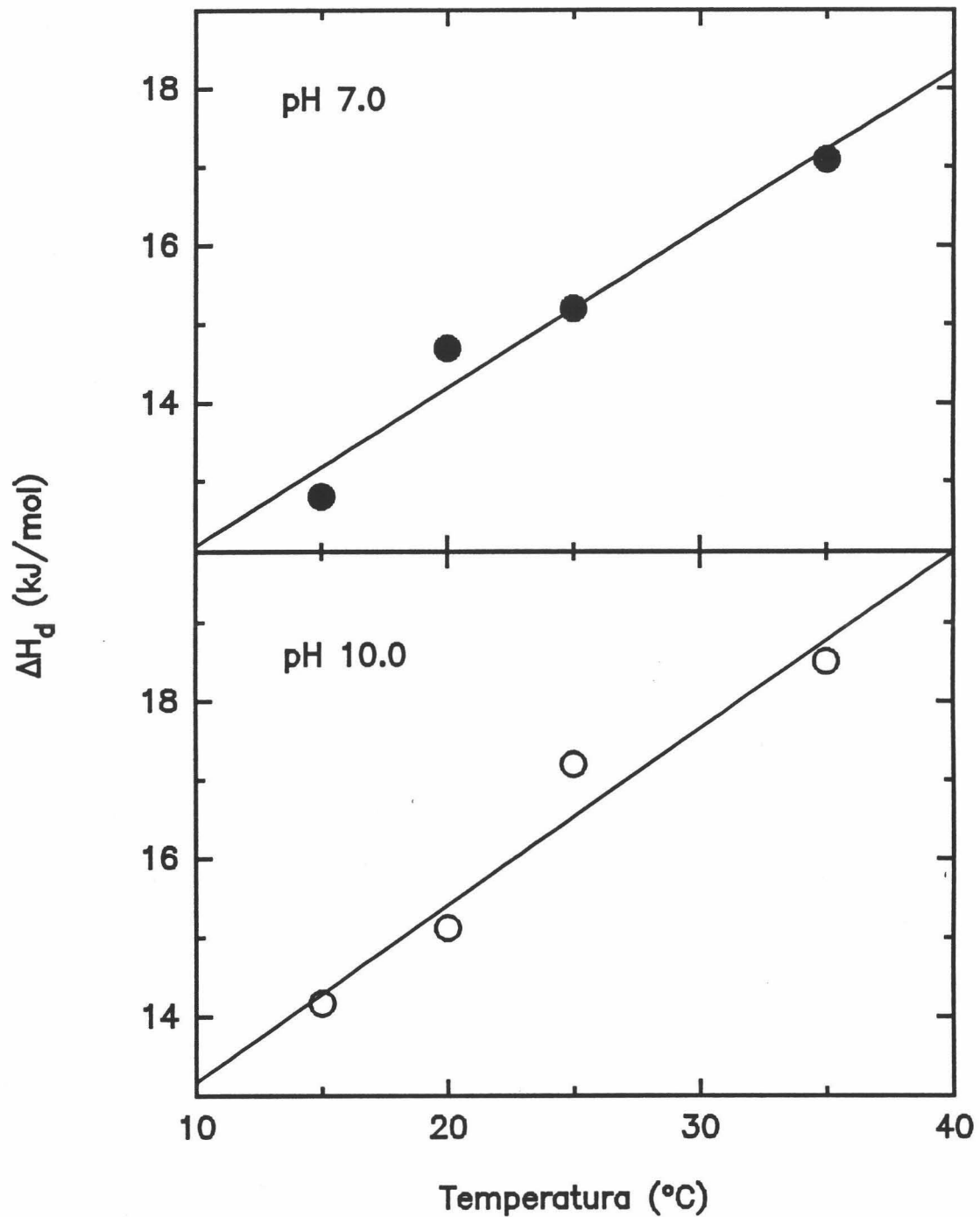


FIGURA 5-15: Resultado de los experimentos de CIT con el complejo Barnasa-Barstar(DM) a pH 7.0 y 10.0 a diferentes temperaturas. Hemos representado las entalpías de disociación en función de la temperatura y de la pendiente de la regresión lineal (—) podemos obtener el valor para $\Delta C_{p,d}$ a cada valor de pH (ver tabla 5-II).

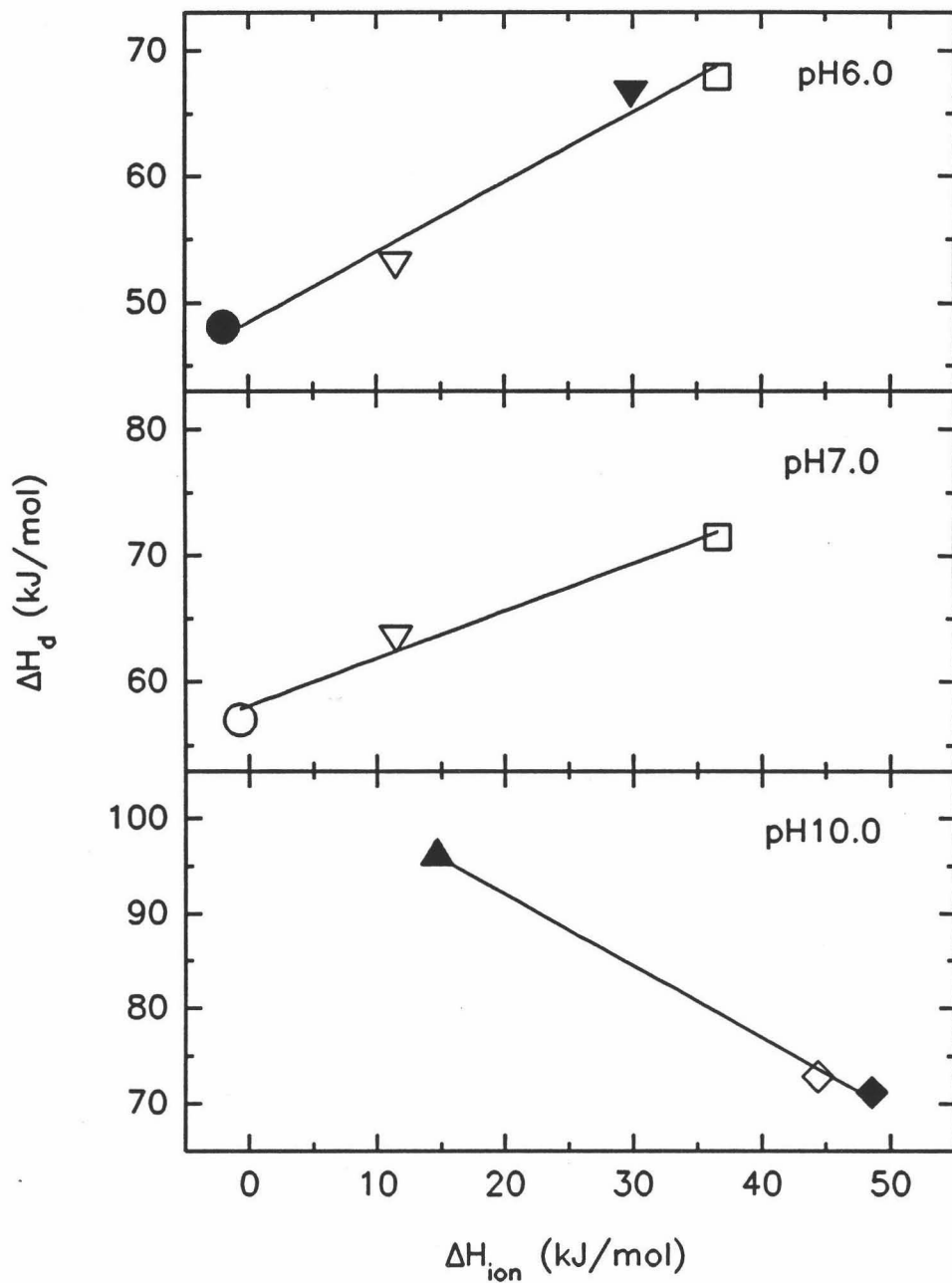
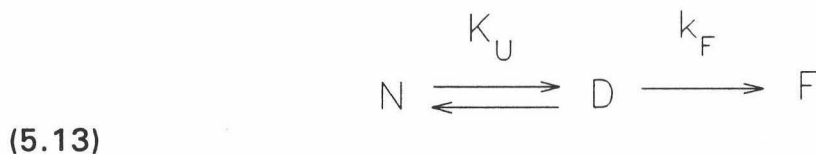


FIGURA 5-16: Calores de disociación, ΔH_d , del complejo Barnasa-Barstar(DM) a 25°C y tres valores de pH representados frente al calor de ionización del tampón, ΔH_{ion} , de los correspondientes tampones: (○) β-glicerofosfato; (●) cacodilato sódico; (▽) PIPES; (▼) histidina; (□) imidazol; (▲) bicarbonato sódico; (◇) glicina; (◆) CAPS. Las líneas continuas son la regresión lineal de los datos de cuya pendiente obtenemos el intercambio protónico con el medio de la interacción y de la ordenada en el origen el valor de ΔH_d sin la contribución del calor de protonación.

La mezcla de ambas proteínas en una cantidad equimolar originará un cambio de pH en el medio debido a la absorción o liberación de protones por la interacción. Contrarrestamos esta variación con volúmenes medidos de disoluciones contrastadas de HCl y/o NaOH y así podremos saber cuales son los protones liberados por mol de complejo formado. Como precaución, a las disoluciones se les mide el pH en atmósfera de nitrógeno (pasando una corriente del gas permanentemente a través de la disolución) y en una cubeta termostaticada a 25°C.

5.3.- DISCUSION DE RESULTADOS

En general, la desnaturalización inducida por la temperatura de los mutantes de Barstar a las concentraciones utilizadas en nuestros experimentos de CDB a $\text{pH} \geq 6$ es bastante reversible. Las transiciones obtenidas son prácticamente independientes de la velocidad de barrido y el segundo barrido da unos porcentajes normales de reversibilidad, similares a los de otras proteínas globulares. Por consiguiente, el análisis de datos presentado en la Figura 5-8 parece ser correcto. Sin embargo, como ya dijimos en Resultados, la reversibilidad disminuye tanto con la temperatura final del calentamiento como con el tiempo que permanezca la muestra a estas temperaturas, lo que también han comprobado Khurana & Udgaonkar con estudios de CD (1994). Más aún, existe una tendencia sistemática de la función de capacidad calorífica a disminuir después de la desnaturalización (Figura 5-3). Este comportamiento normalmente indica que la desnaturalización o bien se desvía del esquema monomolecular planteado o bien se afecta apreciablemente por algún proceso irreversible. La primera posibilidad no se apoya con los resultados de electroforesis ya que éstas revelan que no existe degradación o agregación de las estructuras cuando se exponen a altas temperaturas. Por otra parte, la no existencia de distorsiones en las curvas de $\langle \Delta C_{p,\text{exc}}(T) \rangle$ sugiere que los procesos irreversibles son en este caso muy lentos en comparación con la cinética del proceso de desplegamiento a temperaturas por encima de la T_m de la proteína. Si estos procesos irreversibles vienen acompañados de efectos caloríficos exotérmicos, podemos tener alguna distorsión en la función $\langle \Delta C_{p,\text{int}}(T) \rangle$ produciendo una disminución aparente en la capacidad calorífica después de la transición, como se puede demostrar por simulación (Figura 5-17) de acuerdo con el modelo de Lumry-Eyring (ver Materiales & Métodos):



que ha sido ya utilizado para el análisis de las curvas irreversibles de varias

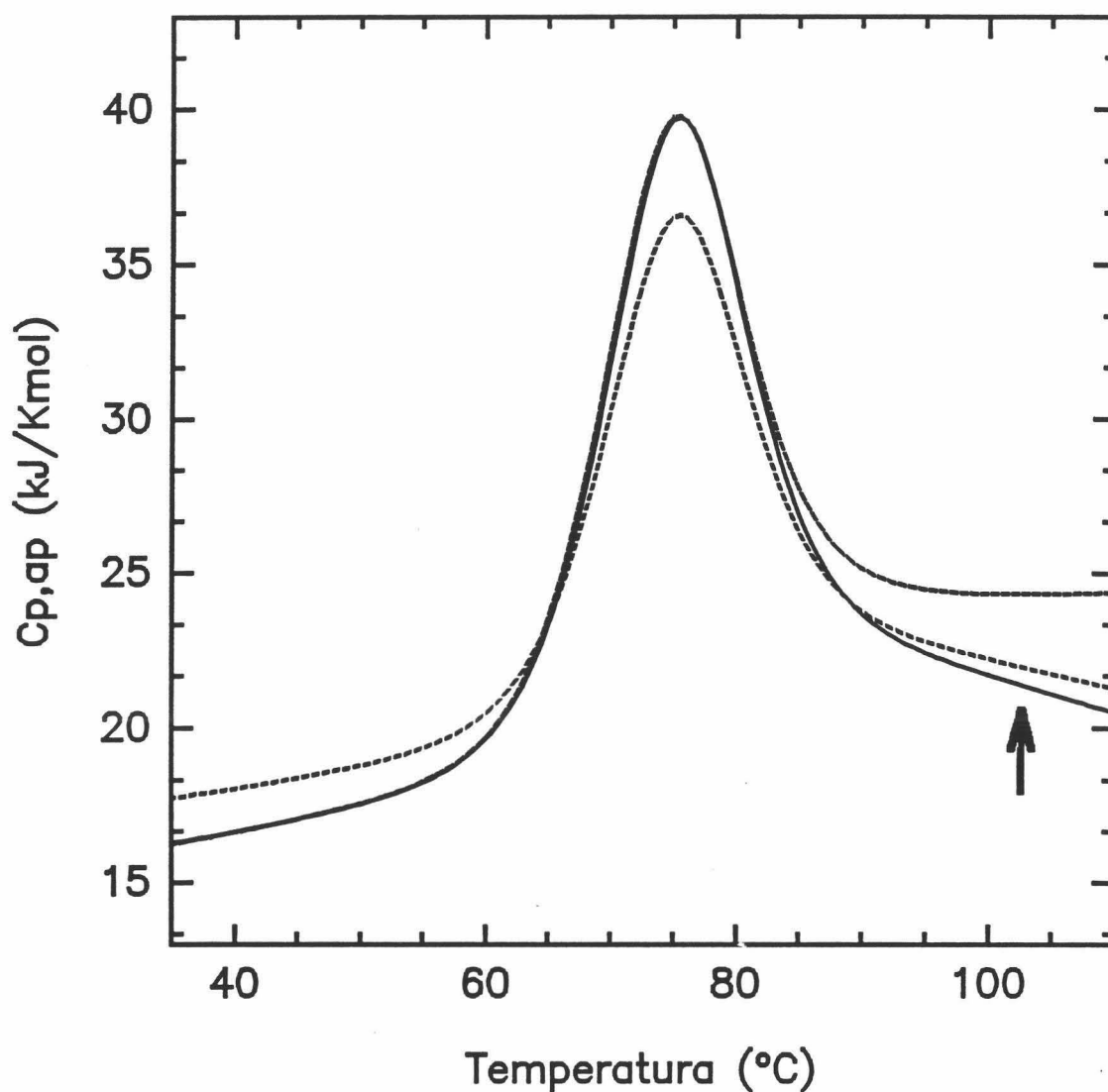


FIGURA 5-17: Simulaciones de las curvas de CDB para Barstar(DM) utilizando el modelo de equilibrio de dos estados (---) y el modelo de Lumry-Eyring con parámetros de desnaturalización similares a los obtenidos experimentalmente para el DM a pH 7.0: $C_{p,N}(T) = 15 + 0.08(T-293)$; $C_{p,U}(T) = 24 + 0.01(T-T_U)$; $T_U = 74^\circ\text{C}$; $\Delta H_{N,D} = 265 \text{ kJ/mol}$. Los parámetros para el proceso irreversible son: $\Delta H_{D,F} = -60 \text{ kJ/mol}$; $\Delta C_{p,D,F} = 0$; $T_s = 162^\circ\text{C}$; $E = 90 \text{ kJ/mol}$; $v = 1 \text{ K/min}$. El primer barrido (—) y el segundo (---) se han simulado según este modelo. Para el segundo barrido se consideró una reversibilidad del 80%.

proteínas (Sánchez-Ruiz et al., 1988; Conejero-Lara et al., 1991). El desarrollo completo de este modelo está en Sánchez-Ruiz (1992) y Lepock et al. (1992). Utilizando sus fórmulas con una combinación razonable de parámetros termodinámicos y cinéticos, pero asumiendo que la etapa final viene acompañada de un cambio de entalpía negativo podemos simular curvas de desnaturalización como las de la Figura 5-17. Por tanto este modelo puede explicar la caída de la capacidad calorífica. La citada Figura 5-17 demuestra además por qué los parámetros $\Delta H_{N,D}$ y T_U prácticamente no cambian por la existencia de esta etapa irreversible aunque la capacidad calorífica aparente del estado desnaturalizado esté totalmente distorsionada.

También hemos calculado la capacidad calorífica para el estado totalmente desnaturalizado de Barstar de acuerdo con el método propuesto por Makhatadze & Privalov (1990). En el intervalo de temperaturas del cálculo, la función $C_{p,U,calc}(T)$ del DM tiene una forma típicamente parabólica (Figura 5-18), que se describe por la siguiente ecuación empírica obtenida por regresión no lineal a un polinomio de segundo orden:

$$C_{p,U,calc}(T) = 22.0 + 0.043 \cdot (T - 293.2) - 2.45 \cdot 10^{-4} \cdot (T - 293.2)^2 \quad (5.14)$$

y si restamos a la ecuación anterior la (5.1) tenemos la función $\Delta C_{p,N,D}(T)$ siguiente:

$$\Delta C_{p,N,D}(T) = 7.5 - 0.037 \cdot (T - 293.2) - 2.45 \cdot 10^{-4} \cdot (T - 293.2)^2 \quad (5.15)$$

La comparación de esta función con las curvas experimentales [Figura 5-3(A)] muestra que ambos valores son bastante próximos en la zona de temperaturas posterior a la transición pero el valor teórico permanece un poco más alto. Además, la función calculada, $C_{p,U,calc}(T)$, no presenta ninguna tendencia a disminuir en el intervalo de 80-110°C, como observamos experimentalmente a pH neutro o básico. Por consiguiente, para mejorar el análisis de las trazas calorimétricas hemos utilizado un valor lineal para la función en lugar de una estimación parabólica.

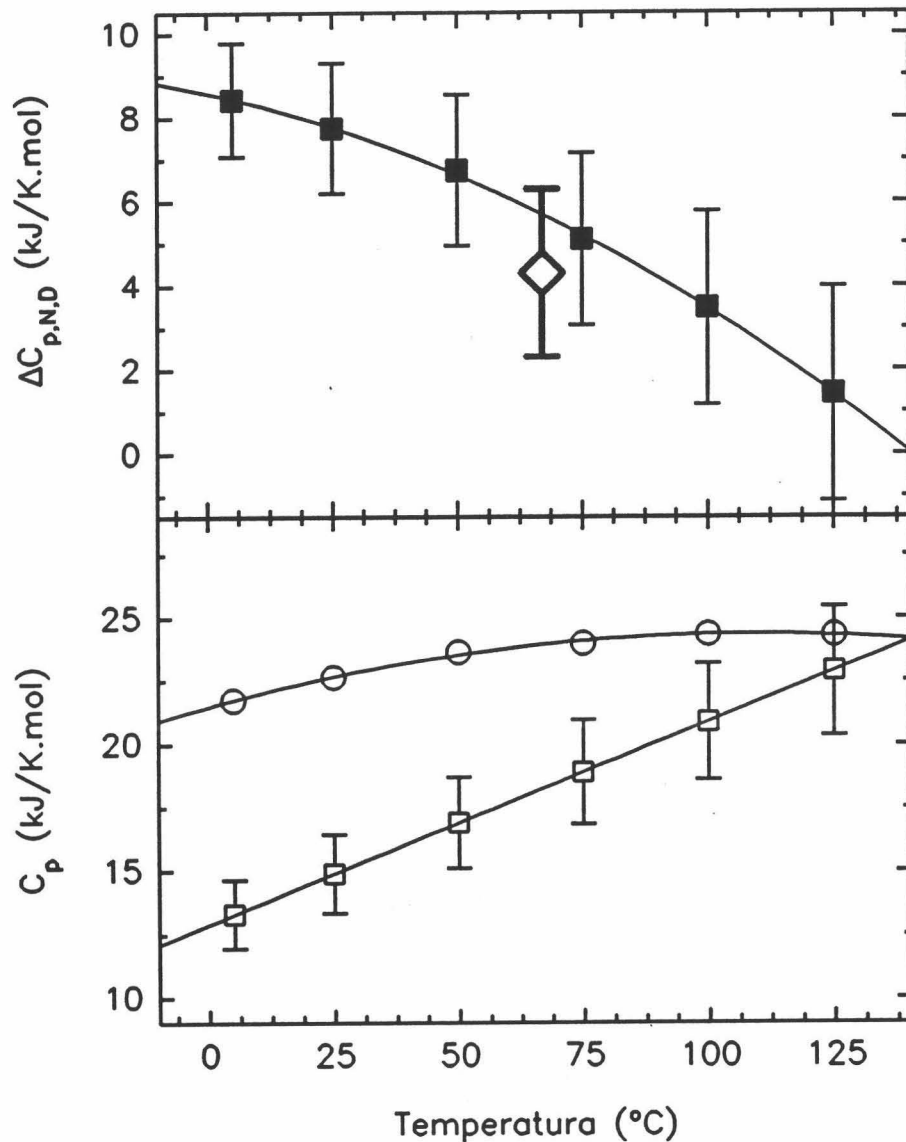


FIGURA 5-18: Representación gráfica del cálculo de $C_{p,U,calc}(T)$ para Barstar(DM) de acuerdo con Makhatadze & Privalov (1990) (ver texto). En la parte inferior tenemos los valores calculados, $C_{p,U,calc}(T)$ (○) y la regresión de segundo orden de estos valores; la línea recta se refiere al valor empírico de $C_{p,N}(T)$ calculada como promedio de los datos experimentales (ecuación 5.1), donde los cuadrados con barras de error muestran el correspondiente error en su determinación. En la parte superior tenemos el incremento de capacidad calorífica en la desnaturalización del DM que surge como diferencia entre las dos líneas representadas en la gráfica inferior, incluyendo los intervalos de error. El símbolo (◇) se corresponde con el valor medio experimental de $\Delta C_{p,N,D}$ para una temperatura "promedio" de 67°C (ver texto).

Otra aproximación hecha para evaluar el incremento de capacidad calorífica de desplegamiento es analizar la dependencia con la temperatura de la entalpía de desnaturalización. La calidad del ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales depende de si utilizamos una función de ajuste lineal o cuadrática (Figura 5-8). La aproximación más sencilla se corresponde con la aproximación lineal de los datos con un valor constante para $\Delta C_{p,N,D}$ de 4.3 kJ/K·mol. Este valor se compara bastante bien con el de 4.1 kJ/K·mol encontrado como valor medio de los ajustes al modelo y también es razonablemente cercano al valor de 5.3 kJ/K·mol que predice la ecuación ($\Delta C_{p,U,calc}(T)$) para una temperatura "promedio" de 65°C. Hay que destacar que los datos obtenidos aquí para Barstar, como sucede con muchos otros datos de la Bibliografía, tienen una precisión un tanto cuestionable a la hora de extrapolar fiablemente el efecto calorífico a 140°C o incluso a 110°C por las razones discutidas. De todas maneras, la aproximación lineal de la entalpía específica de desnaturalización basándonos en la ecuación (11 artículo ??) pasa muy cerca, aunque un poco por debajo, del punto de corte "universal" de 52 J/g a 110°C, mientras que la aproximación parabólica de los datos experimentales que, de acuerdo con Privalov et al. (1989) puede ser más real, se distancia aún más de dicho valor incluso a 140°C (Figura 5-8).

La pregunta que aún permanece es en qué extensión es válida la aplicación del modelo de dos estados para la desnaturalización de Barstar. La aplicabilidad de este modelo puede ser contrastada por la comparación de la calidad del ajuste con la de cualquier otro modelo razonable. Por ejemplo, la introducción de una etapa intermedia adicional generalmente mejora la calidad del ajuste sencillamente porque el ajuste tiene mucha más libertad con parámetros variables adicionales. En este caso es necesario tener en cuenta no solo la calidad del ajuste sino también considerar la distribución de poblaciones del estado intermedio. Así, cuando el intermedio sólo está marginalmente poblado (menos de un 10% en el máximo) podemos concluir que la aproximación de dos estados es suficiente entre los límites del error experimental. Este es el caso de los datos experimentales a pH neutro y básico.

Las trazas de CDB a pH 2.5 no indican ninguna cooperatividad en la desnaturalización aunque la capacidad calorífica de la proteína a baja temperatura es más cercana a la del estado nativo que a la del estado completamente desnaturalizado. Sin embargo, los resultados de los experimentos de "light scattering" y de cromatografía de exclusión con esta forma A parecen indicar la formación de oligómeros, hecho no observado a $\text{pH} \geq 6$. Parece que la asociación de los monómeros puede estabilizar elementos residuales de estructura secundaria y, en determinada extensión, la estructura terciaria, de acuerdo con las características que presentan los estados de "molten globule" (esta Memoria, Sección 6.1; Khurana & Udgaonkar, 1994; Lubienski et al., 1994). Khurana & Udgaonkar (1994) han descubierto que la conformación ácida de Barstar tiene un contenido en estructura secundaria y terciaria mucho menor que el estado nativo ($\text{pH} \geq 6$), aunque necesita concentraciones de agentes desnaturalizantes para desplegar mayores que aquel. Estos resultados son compatibles con un estado de asociación de Barstar a pH 2.5 en el intervalo de concentración estudiado por nosotros. Es relevante mencionar aquí que el estado de "molten globule" también detectado a pH 2.5 para CheY (ver Sección 6 de esta Memoria) presenta una fuerte tendencia a formar al menos dímeros en disolución (Filimonov et al., 1993) y que Sanz et al. (1994) también han mostrado que el estado A de Barnasa se encuentra asociado en disolución a pH 2.7. Según Kuwajima (1986) la tendencia a la asociación para aumentar su estabilidad marginal puede ser una característica general de estos estados.

Las muestras de Barstar(DM) utilizadas se han mostrado para ser totalmente funcionales *in vivo* e *in vitro* (Hartley, 1993). El valor de $\Delta G_{N,D}$ para la desnaturalización, 21.0 ± 1.6 kJ/mol (5.0 ± 0.4 kcal/mol) concuerda bastante bien con el de Schreiber & Fersht (1993a) de 4.84 ± 0.18 kcal/mol (ambos valores a 25°C y a pH 8.0) calculado a partir de los datos de desnaturalización en presencia de Urea del DM. Los valores de entalpía específica de desnaturalización para los mutantes utilizados aquí (Figura 5-8) son ligeramente menores a la T_m

correspondiente que los establecidos para otras proteínas globulares pequeñas y compactas, mientras que el incremento en capacidad calorífica específico está cercano al límite inferior de error dado para estas proteínas (Privalov, 1979). La Barstar tiene un corazón hidrofóbico bien definido con una accesibilidad del disolvente bastante baja, sin embargo el anillo aromático de Phe74 (resto central del core) puede "aletear" libremente en su interior, lo que puede indicar que la Barstar tiene un core no demasiado rígido y no muy empaquetado, sino de carácter más fluído (Lubienski et al., 1994). Este carácter se puede reflejar en estos valores relativamente bajos de entalpía e incremento de capacidad calorífica de la desnaturalización.

Las técnicas de CDB y CIT ya hemos probado en el trabajo con Barnasa que son muy eficientes utilizadas complementariamente para caracterizar la energética de interacciones proteína-ligando y aquí nos hemos servido de esta situación para caracterizar la interacción Barnasa-Barstar(DM). La constante de unión ha sido determinada a 25°C a partir de esta estrategia experimental ya que la CIT no puede por sí sola determinar constantes de un orden de magnitud tan elevado. El valor obtenido para este parámetro (tabla 5-II) está de acuerdo con los calculados a partir de estudios cinéticos (Hartley, 1989; Hartley, 1993; Schreiber & Fersht, 1993b), lo que es importante si tenemos en cuenta que nuestro valor ha sido extrapolado en un intervalo de temperatura de unos 50°C. Los errores obtenidos en la entalpía de unión calculada por CDB son obviamente mayores que los de CIT por lo ya comentado de que el primero se calcula a partir de otros efectos entálpicos mucho mayores. Sin embargo, todos concuerdan bastante bien dentro de la incertidumbre experimental. Los valores de entropía de la tabla 5-II se han obtenido de los datos de CDB también con un error considerable (sobre el 30%), el mismo que los valores de ΔH_d .

La interacción Barnasa-Barstar está dirigida tanto entrópica como entálpicamente, sin embargo, el término entálpico es unas cuatro veces mayor que el entrópico a pH 7.0 y 25°C (tabla 5-II). Este valor de entalpía tan negativo está

de acuerdo con nuestro conocimiento estructural actual del complejo (ver Introducción; Hartley, 1993; Jones et al., 1993; Guillet et al., 1993b; Buckle et al., 1994). Así, la interfase Barnasa-Barstar está formada por superficies altamente cargadas y polares, formando un conjunto de interacciones polares con 14 puentes de hidrógeno y varios puentes electrostáticos, interacciones caracterizadas por unas pocas kcal/mol (Guillet et al., 1993b; Buckle et al., 1994). Además, existe una cantidad apreciable de moléculas de agua ordenadas en la interfase, algunas de ellas formando puentes de hidrógeno y salinos entre ambas estructuras, lo que da un cierto grado de flexibilidad a la interfase. La entalpía de unión puede, por consiguiente, originarse por la creación de este conjunto de interacciones electrostáticas. Dado el carácter polar de las superficies de unión proteína-proteína y la ordenación de agua en ellas, podríamos esperar una contribución entrópica comparativamente menor, como es el caso. El signo negativo del valor, sin embargo, sugiere que se pierden algunas moléculas de agua durante la interacción o bien que la estructura global se vuelve menos rígida, lo cual está de acuerdo con los cambios conformacionales que ocurren en la estructura de la Barstar durante la interacción, que parecen expandir la estructura (ver Introducción; Schreiber et al., 1994).

Aparte de esto, las contribuciones negativas a la entropía pueden esperarse si existen puentes salinos fuertes y localizados que disminuyan los grados de libertad rotacionales y vibracionales del complejo. También debido a la inmovilización de partes de la estructura de la Barstar en la interacción con el sitio activo de Barnasa, bastante rígido en comparación. De hecho, los restos de este sitio activo son los que dirigen las interacciones con Barstar que deberá afrontar cambios conformacionales importantes (Buckle et al., 1994). Estos cambios no alteran significativamente su estabilidad como lo demuestran los experimentos de CDB (Figura 5-11) aunque sí disminuyen sus grados de libertad vibracionales y rotacionales. Sin embargo, hemos de tener en cuenta también el efecto hidrofóbico, considerando el valor positivo del $\Delta C_{p,d}$, que es generalmente aceptado para tener principalmente un origen hidrofóbico y en el cambio en los grados

internos de libertad. La descomposición de $\Delta C_{p,d}$ según el método propuesto por Sturtevant (1977) nos conduce de hecho a valores positivos para las contribuciones hidrofóbicas y vibracionales (tabla 5-III).

TABLA 5-III
CALCULO DE LAS CONTRIBUCIONES HIDROFOBICAS Y VIBRACIONALES DE LOS
PARAMETROS TERMODINAMICOS DE LA INTERACCION BARNASA-BARSTAR

	Barnasa-Barstar(DM)	Barnasa-3'GMP
$\Delta C_{p,d}(h)$ [cal/K·mol]	168	47
$\Delta C_{p,d}(viv)$ [cal/K·mol]	22	18
$\Delta S_{d,u}(hid)$ [u.e.]*	-44	-12
$\Delta S_{d,u}(viv)$ [u.e.]*	24	19
Nº de moléculas de agua ganadas	30	8

* Las unidades entrópicas (u.e.) se calculan, según Kauzmann (1959) sumando una contribución de 8 cal/K·mol al valor de entropía expresado en el estado estándar de 1 mol/L. De esta manera, expresados en términos de fracción molar, no se incluye la contribución crítica a la entropía.

En base a todas estas evidencias, creemos que la formación del complejo está dirigida por una disminución de la entropía que surge de la pérdida de moléculas de agua de la interfase (unas 30 según nuestros cálculos) pero, sobre todo, por la contribución entálpica (cuatro veces mayor) de las interacciones proteína-proteína y el conjunto de puentes de hidrógeno mediados por el disolvente. Esto no tiene porqué ser una característica común al resto de interacciones proteína-proteína ya que el carácter químico de las interfases será el que determine la predominancia de uno u otro tipo de interacciones.

En definitiva, la desnaturalización de Barstar sigue un mecanismo esencialmente de dos estados a pH neutro y básico cuya reversibilidad depende de alguna modificación química y/o estructural de naturaleza cinética e irreversible.

Los cambios de entalpía y de capacidad calorífica son ligeramente menores a los esperados para una estructura de este tamaño lo que estaría relacionado con la existencia de un corazón hidrofóbico no demasiado rígido o empaquetado.

La excasa información bibliográfica existente nos ha llevado a desarrollar experimentos adicionales de cromatografía y electroforesis principalmente para explicar ciertas cuestiones. Así sabemos que a pH ácido, donde no presenta transición de desnaturalización, la Barstar desarrolla una tendencia a la agregación a temperatura ambiente no observada en otras condiciones. Además, la formación de este estado A a partir del N es reversible.

El complejo se forma exclusivamente con la forma N o nativa de la Barstar y la combinación de las técnicas CIT y CDB nos ha llevado a la caracterización termodinámica completa de la interacción. Esto nos ha permitido conocer que existen contribuciones entrópicas y entálpicas que favorecen la interacción, aunque los datos reflejan que las segundas son cuatro veces más importantes. Esto se debería a la naturaleza predominantemente polar de la interacción. El aporte entrópico se debe a la pérdida de grados de libertad de las estructuras a causa de la interacción.



CheY

6.1.- ESTUDIO BIBLIOGRAFICO DE LA CheY

Podríamos comenzar haciéndonos la siguiente pregunta: ¿cómo utilizan las células la información que reciben de su medio ambiente externo para elaborar respuestas adaptativas? Los estudios más recientes (tenemos una revisión en Parkinson, 1993) dicen que el acoplamiento estímulo-respuesta es debido a dos familias diferentes de proteínas envueltas en rutas de transducción de señales. Una familia es la de proteínas receptores de membrana y la otra está integrada por un conjunto de proteínas citoplasmáticas que funcionan como "reguladores de respuesta", es decir, transportando información desde los receptores hasta los elementos adecuados que controlan la respuesta adaptativa. Actualmente se han identificado bastantes miembros de estas rutas biológicas involucrados en procesos tales como la esporulación, competencia, motilidad flagelar, transporte de membrana, patogenicidades, regulación osmótica, etc (Stock et al., 1990).

La proteína objeto de nuestro estudio, la CheY, se encuentra involucrada en una de estas rutas de transducción de señales: la quimiotaxis. Actualmente sabemos que la motilidad de algunas bacterias como *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli* se debe al uso de flagelos que son prolongaciones formadas por un conjunto de filamentos helicoidales controlados por un motor rotatorio situado en la superficie de la célula. Este orgánulo permite a la célula dirigirse hacia los "atrayentes" (normalmente nutrientes tales como aminoácidos, péptidos y carbohidratos) y alejarse de sustancias "repelentes" (generalmente toxinas), pues dota a la célula de un movimiento de traslación en una dirección determinada. En esta situación, los filamentos giran en contra de las agujas del reloj (CCW) y en ausencia de estímulos el motor los hará girar en la dirección contraria (CW) en cuyo caso la célula dispondrá de un movimiento de tipo browniano (sin ninguna dirección determinada). Todo esto se ilustra más claramente en la Figura 6-1. Por consiguiente, la respuesta táctica a un determinado estímulo se basa,

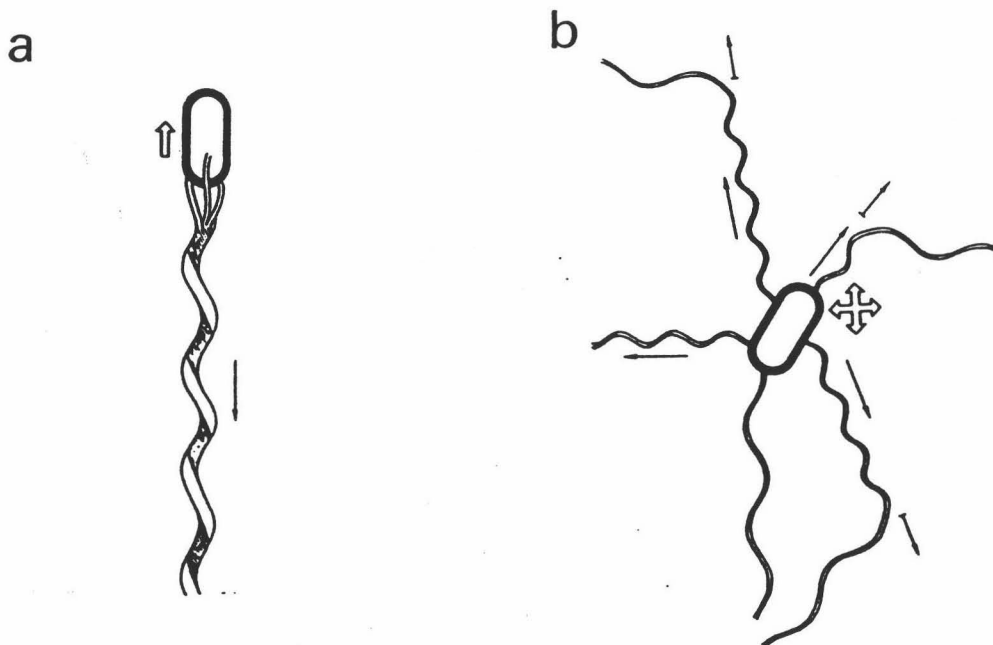


FIGURA 6-1: Comportamiento del flagelo de *E. coli* o *S. typhimurium* durante la quimiotaxis. (a) Movimiento de traslación: los motores rotan en sentido CCW y los filamentos forman un paquete propulsor, ondulándose progresivamente desde la base hasta el final. (b) Movimiento browniano: en este caso la rotación es CW y origina una separación de los filamentos, con lo que el movimiento de traslación es propulsado en más de una dirección. (Tomado de Macnab, 1987).

fundamentalmente, en el control de la dirección de giro del motor flagelar (tenemos un estudio muy detallado en Macnab, 1987).

La ruta biológica que nos lleva de un extremo a otro (ver Figura 6-2) consiste en una familia de receptores de membrana que se activan cuando suceden cambios en la composición química del medio circundante (Koshland, 1988; Ames et al., 1988; Borkovich et al., 1989; Stock et al., 1985). Se produce una interacción con la CheW que controla la actividad quinasa que posee la CheA (Borkovich et al., 1989; Stock et al., 1987; Wolfe et al., 1987), que se autofosforila el resto de His48 y, en una siguiente etapa, el grupo fosforilo es transferido a un resto de Asp ubicado en el regulador de respuesta del motor quimiotáctico, la proteína CheY (Stock et al., 1988; Hess et al., 1988; Sanders et al., 1989). Existen, a este respecto, claras evidencias de que la CheY-P interacciona con el motor flagelar para controlar su funcionamiento (Stock et al., 1992). El sistema está controlado por

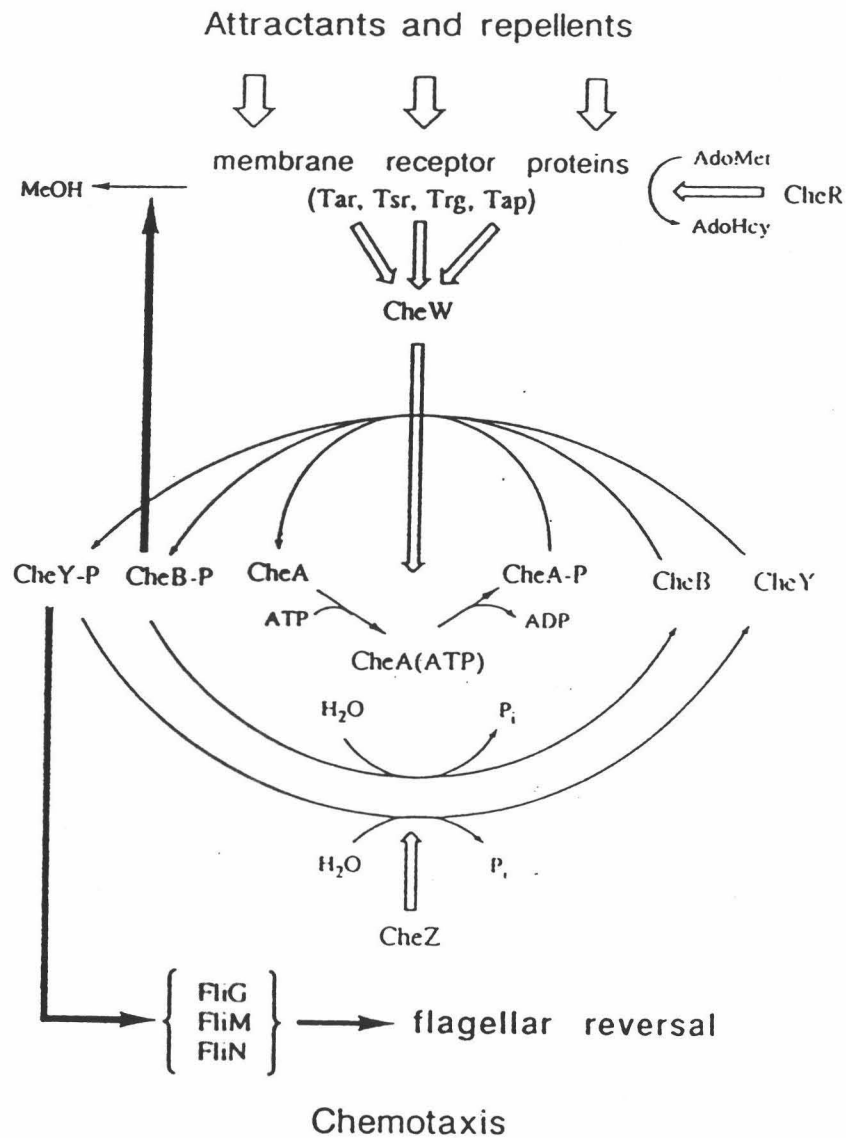


FIGURA 6-2: Ruta de transducción de la quimiotaxis en bacterias. Los receptores de membrana son: Tar (receptor de aspartato), Tsr (el de serina), Trg (para ribosa y galactosa), Tap (para péptidos). Los componentes del motor del flagelo son FliG, FliM y FliN. La explicación detallada de esta figura se da en el texto. (Tomado de Stock et al., 1990).

una proteína denominada CheZ que actúa como una fosfatasa que acelera la desfosforilación de CheY-P (Hess et al., 1988).

6.1.1.- ESTUDIOS DINAMICO-ESTRUCTURALES

La CheY de *E. coli* es una pequeña proteína monomérica de 128 aminoácidos (14 kDa). Tiene un contenido grande de estructuras secundarias distribuidas entre un 40% de hélices α y un 20% de cadenas β y forman un núcleo hidrofóbico con cinco cadenas β paralelas rodeado por cinco hélices α (Stock et al., 1989). Como vemos en la Figura 6-3 y tal y como la describen Voltz & Matsumura (1991), la secuencia se alinea alternando las hélices α con las cadenas β (parte inferior), si bien en la estructura tridimensional, las cadenas β se disponen en el orden $\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ en la lámina β central. A un lado de esta lámina se disponen las hélices αB , αC y αD y las αA y αE quedan en la parte opuesta (parte superior).

Las cinco cadenas β presentan una distribución de puentes de hidrógeno bastante regular. Así mismo, los nueve "loops" que conectan las estructuras secundarias están bastante ordenados y presentan vueltas clasificadas en diferentes tipos (ver Wilmot & Thornton, 1988), de las cuales podemos destacar una vuelta γ entre los restos Pro61 y Met63, que completa un ángulo de 180° en la cadena con sólo tres aminoácidos. Y la otra es la vuelta tipo VIb entre los restos 108-111 que comprende un enlace peptídico en *cis* entre la Lys109 y Pro110. Estos enlaces *cis* tienen más energía que los *trans* (normalmente encontrados) y generalmente son típicos en restos de Pro (Stewart et al., 1990). La Lys109 es un resto que está totalmente conservado en las CheY de todas las fuentes estudiadas (Voltz, 1993), fundamentalmente debido a su función dentro de la proteína, como veremos a continuación. Así mismo la Pro110 se encuentra totalmente conservada para mantener la conformación *cis* del enlace peptídico y así disponer el resto de Lys en una posición espacial adecuada.

Sitio de fosforilación

Existen tres restos funcionalmente importantes en la CheY que son Asp13,

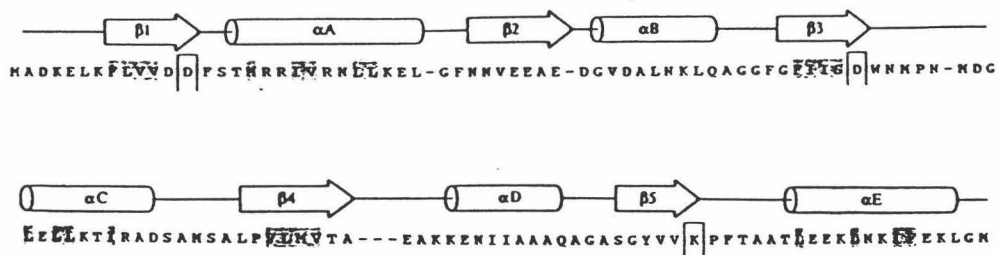
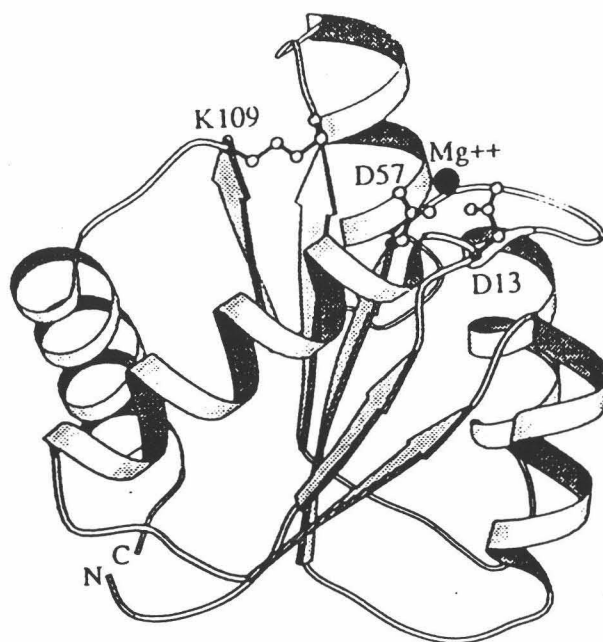


FIGURA 6-3: En la parte superior tenemos un diagrama de la estructura tridimensional de CheY donde vemos el plegamiento α/β de la cadena y la localización de los restos conservados del sitio activo: Asp13, Asp57 y Lys109 así como del ión Mg^{2+} coordinado con los dos primeros. (Tomado de Stock et al., 1993). En la parte inferior se muestra la secuencia de aminoácidos alineada con las estructuras secundarias que origina. Los restos encuadrados son los tres mencionados antes y los sombreados son los que se encuentran en el sitio activo de la proteína. (Tomado de Stock et al., 1990). Asp57 y Lys109

(localizados en los extremos C-terminal de $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 5$ respectivamente) y que definen el sitio activo de la molécula (Bourret et al., 1990). En la Figura 6-4 se muestra un esquema de la disposición de los aminoácidos que lo forman (los tres anteriores más Asp12 y Asn59) así como de las moléculas de disolvente. Tenemos también una molécula de SO_4^{2-} que procede del proceso de cristalización en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y que muy probablemente interacciona con el sitio activo dada su similitud química y estructural con el PO_4^{3-} (Voltz & Matsumura, 1991).

La posición de Lys109, como ya hemos comentado, es la correcta gracias al enlace *cis* con Pro110. El grupo ϵ -amino de Lys109 forma un puente salino con uno de los oxígenos del grupo ácido de Asp57 (distanciado 2.7 Å). Forma además un puente de hidrógeno con el grupo carboxilo de Asp12 y un corto enlace (de 2.5 Å) con uno de los átomos de oxígeno del SO_4^{2-} . El otro oxígeno carboxílico del Asp57 forma un puente de hidrógeno con el nitrógeno del grupo amida de Asn59 (a 2.8 Å de distancia). Los dos enlaces de hidrógeno potenciales del grupo carboxilo de Asp57 se completan por dos moléculas de agua que existen en el sitio activo. Por último, el Asp13 sólo posee dos enlaces de hidrógeno: uno con su propio átomo de nitrógeno y otro con una molécula de agua (Voltz & Matsumura, 1991).

El sitio de fosforilación en CheY es el resto de Asp57 (Sanders et al., 1989). Para este proceso, el Mg^{2+} unido al sitio activo (como veremos a continuación) ejerce de cofactor tanto en la fosforilación como en la desfosforilación de este resto (Lukat et al., 1990). La unión del fosfato al sitio activo es muy lábil (sólo unos pocos segundos) (Hess et al., 1988), por lo que no ha sido posible hacer un estudio por cristalografía de rayos X. Se ha postulado que el puente salino formado entre Lys109 y Asp57 juega un papel clave en la activación ya que actuaría como un "interruptor" biológico (Lukat et al., 1991).

De todas maneras, un estudio más reciente al anterior, realizado por RMN de ^{19}F (Drake et al., 1993) ha revelado que la posición de la Lys109 no se ve alterada por la unión del fosfato, aunque no muestran claramente si se mantiene o no el puente salino. En cualquier caso, el proceso de fosforilación provoca

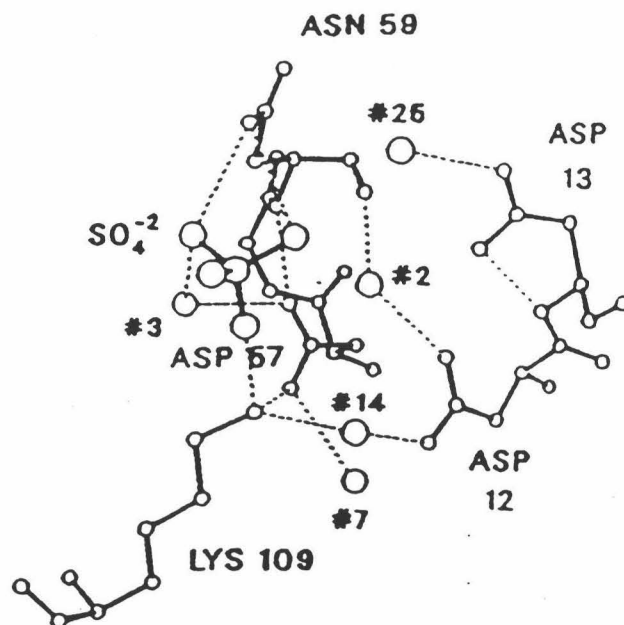


FIGURA 6-4: Detalle de las interacciones entre los principales restos que forman el sitio activo en CheY, así como de las moléculas de agua y SO_4^{2-} que forman parte de la estructura cristalina. (Tomado de Voltz & Matsumura, 1991).

cambios conformacionales en otros lugares de la molécula, por lo que estos autores han postulado un mecanismo según el cual la gran densidad de carga negativa del grupo acil-fosfato del Asp57 puede repeler a los grupos carboxilo cercanos de Asp12 y Asp13, lo que produciría una mayor separación entre las cadenas $\beta 1$ y $\beta 3$ (el Asp57 está en $\beta 3$ y los Asp12 y 13 en el "loop" que conecta $\beta 1$ con αA). Por tanto, la señal atraviesa la lámina β central completamente. Esta situación tendría, al menos, dos papeles fisiológicos importantes: por un lado, esta comunicación intramolecular puede ser utilizada para regular la CheY en un sitio distante del sitio de activación, con lo que el proceso de fosforilación modularía alostéricamente la unión a CheA otras proteínas de la ruta metabólica, incluyendo las del motor flagelar.

El estudio anterior lo han completado en el mismo laboratorio con otro similar hecho con mutantes, básicamente de las posiciones del sitio activo (Bourret et al., 1993). Este estudio fundamentalmente confirma el modelo de activación propuesto en el anterior artículo destacando, además, que el puente salino Asp57-Lys109 no

es tan importante para la funcionalidad de la proteína puesto que su ruptura no impide a la Lys109 mantener su disposición espacial en el sitio activo y actuar como "interruptor" en la unión al motor flagelar.

Sitio de unión de Mg²⁺

El Mg²⁺ como ya hemos apuntado, es un ión fundamental para los procesos de fosforilación y desfosforilación en CheY (Sanders et al., 1989; Hess et al., 1989; Lukat et al., 1990). En el estudio de rayos X de CheY de *E. coli* (Voltz & Matsumura, 1991) no se han encontrado iones Mg²⁺ coordinados con la molécula, sin embargo, existe una molécula de agua muy ordenada que forma puentes de hidrógeno con el grupo carboxilo de Asp12 y el oxígeno carbonílico de Asn59. El microambiente que rodea esta molécula (afirman los autores) sería ideal para la unión de un pequeño catión metálico. Hay que destacar que la CheY puede acoger en su estructura otros cationes divalentes, distintos al Mg²⁺, como Cd²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ y/o Ca²⁺ (Kar et al., 1992a).

Dada la localización del ión metálico en la estructura, muy cercano al sitio de fosforilación en Asp57, es de esperar (como de hecho ocurre) que en algún momento en la transferencia del fósforo, uno de sus oxígenos forme parte de la esfera de coordinación del metal (Lukat et al., 1990). Los estudios realizados por Koshland en 1952 ponen de manifiesto que el Mg²⁺ puede formar un complejo 1:1 con acetil-fosfato a pH neutro para facilitar su hidrólisis a acetato y ortofosfato. Es por esto que se ha propuesto un estado de transición formado por el complejo metal-fosfato-carboxilato (ver Figura 6-5) que se formaría tanto en el proceso de fosforilación como en el de desfosforilación. De esta manera, la actividad fosfatasa de CheZ podría consistir simplemente en una interacción de ésta con CheY-P en la que induciría un pequeño cambio conformacional para provocar un ataque nucleofílico al complejo por una molécula de agua (Lukat et al., 1990). En este sentido, Hess et al (1989) han demostrado que el Mg²⁺ es necesario para la autodesfosforilación de CheY-P en ausencia de CheZ.

Los estudios de mutagénesis de los restos Asp13 y Asp57 por Asn,

demuestran que ambos restos son imprescindibles para la unión del ión metálico, es decir, el bolsillo ácido que forman estos restos es el sitio de unión de Mg^{2+} (Stock et al., 1989).

Kar et al (1992a), utilizando técnicas de RMN bidimensionales han confirmado que la CheY presenta dos conformaciones diferentes que se corresponden con la presencia o no de Mg^{2+} en su estructura, llamadas CheY1 y CheY2 respectivamente. La adición de Mg^{2+} a CheY2 origina una especie llamada CheY1' aparentemente idéntica a CheY1 pero que se diferencian por tener propiedades diferentes en la unión de fosfato (Kar et al., 1992b). Ellos no han conseguido obtener la CheY1 a partir de CheY2 in vitro (desnaturalizando con urea la CheY2 seguido de su renaturalización en presencia de exceso de Mg^{2+}) por lo que piensan que podría existir algún otro cofactor del que no se tiene ninguna evidencia hasta ahora.

Según afirman estos mismos autores, el cambio conformacional detectado por la presencia de Mg^{2+} se limita a unos pocos restos pertenecientes al sitio de unión (el mismo que el de fosfatos según hemos indicado anteriormente), aunque puede jugar un papel crítico en la función de la CheY. Se han encontrado restos como el Trp58, Thr87, Tyr106 y una metionina (posiblemente la Met60) que están cercanos al sitio de unión de cationes y que están involucrados en el cambio conformacional producido por la unión del Mg^{2+} .

Estudios por cristalografía de rayos X de la especie CheY1 (Stock et al., 1993) confirman que el Mg^{2+} presenta una primera esfera de coordinación consistente en los oxígenos carboxílicos de Asp13 y Asp57, el oxígeno carbonílico de Asn59 y tres moléculas de agua. Estas moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno con otros restos de la cadena polipeptídica y dos moléculas adicionales de agua, que forman parte de la segunda esfera de coordinación. Nótese que los restos Asp13 y Asp57 que interaccionan directamente con el catión están altamente conservados en toda la familia de reguladores de respuesta (Voltz, 1993).

Según se deriva del estudio de Stock et al. (1993), las principales diferencias

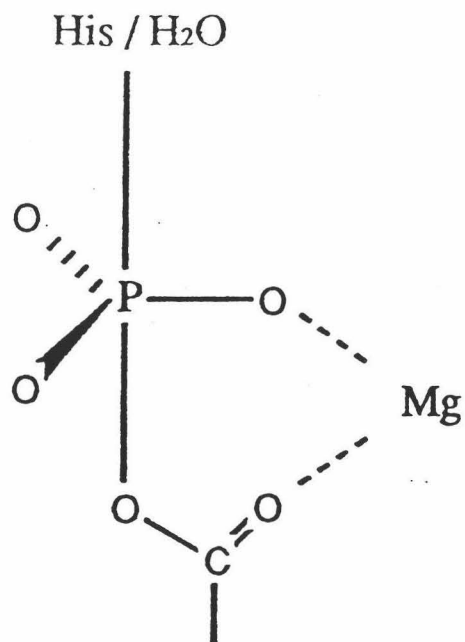


FIGURA 6-5: Posible estado de transición para los procesos de fosforilación y desfosforilación en el sitio activo de CheY. (Tomado de Lukat et al., 1990).

entre CheY1 y CheY2 se localizan en el sitio activo, lo que ya apuntaron Lukat et al. (1990) y Kar et al. (1992a). El Mg^{2+} desplaza la molécula de agua que ocupa su sitio en CheY2 (Voltz & Matsumura, 1991) de tal manera que su coordinación implica distancias de enlace menores para los enlaces de hidrógeno, con lo que las cadenas laterales de los Asp que forman estas interacciones se mueven en consecuencia.

La carga positiva del ión metálico puede servir potencialmente para activar el ataque nucleofílico, estabilizar algunos grupos, potenciar la electrofilicidad del fósforo polarizando el enlace P-O y proteger al grupo fosfato cargado negativamente de algunas repulsiones electrostáticas con grupos adyacentes (Herschlag & Jencks, 1990).

En definitiva, el mecanismo propuesto por Stock et al. (1993) nos dice que la rotación que experimenta el Asp57 por la presencia del Mg^{2+} en el sitio de unión

posiciona el oxígeno carboxílico del átomo de fósforo pentavalente para recibir un ataque nucleofílico. Se origina así un estado de transición donde el anillo imidazólico de la His que aporta el fosfato desde CheA se puede situar en el sitio activo de CheY sin necesidad de ningún arreglo conformacional adicional. Este modelo explica que sea el Asp57 el resto fosforilado y que no sea, por ejemplo, el Asp13 ya que en este caso existe un impedimento estérico provocado por la Phe14 con los oxígenos del fósforo pentavalente, necesitándose un movimiento mucho más significativo de la cadena principal para poder disponer el oxígeno carboxílico del Asp13 en una posición adecuada para un desplazamiento nucleofílico.

6.1.2.- ESTUDIOS DE DESNATURALIZACION

Con posterioridad a la publicación del estudio termodinámico de la desnaturalización de la CheY de *E. coli*, en el cual se incluyeron la mayor parte de nuestros resultados experimentales (Filimonov et al., 1993), ha aparecido otro trabajo referente a un estudio desde el punto de vista cinético realizado también en el laboratorio del Dr. Luis Serrano. En este artículo se propone la existencia de un intermedio cinético de desplegamiento resultante de la isomerización *cis-trans* del resto de Pro110. Puesto que la interpretación de estos resultados es posterior a la aparición de los nuestros en prensa nos referiremos a este trabajo en la sección de Resultados y Discusión de esta Memoria, para no alterar demasiado el orden lógico de las cosas, anticipando aquí lo que allí se comentará. En esta Sección y para terminar vamos a incluir una revisión de las características más importantes de estos estados intermedios y de las metodologías experimentales empleadas.

6.1.3.- INTERMEDIOS DE PLEGAMIENTO

Una de las principales metas de la investigación biológica es conocer cómo una secuencia determinada de aminoácidos de una pequeña proteína globular codifica toda la información necesaria para su plegamiento espontáneo hacia una única conformación tridimensional que constituye su estructura nativa (Anfisen & Scheraga, 1975). Tenemos multitud de conformaciones que son potencialmente

accesibles para un determinado polipéptido por lo que el tránsito entre una disposición desordenada y la estructura nativa no puede involucrar una búsqueda aleatoria entre todas las conformaciones posibles (Levinthal, 1968). Lleno aún más allá los experimentos de replegamiento cinético indican que las unidades estructurales submoleculares se obtienen a partir del estado desordenado en un segundo o menos, un intervalo de tiempo mucho más corto (en varios órdenes de magnitud) que el necesario para una búsqueda de ese tipo. Durante el plegamiento de la cadena desordenada se forman los elementos de estructura secundaria y los enlaces específicos no covalentes que constituyen la estructura terciaria. De lo dicho se desprende que el estudio de estructuras parcialmente plegadas que se forman a lo largo del camino de plegamiento es de una importancia fundamental para comprender los mecanismos por los cuales una cadena polipeptídica alcanza su conformación nativa (Kim & Baldwin, 1990; Dobson, 1991).

El principal interrogante que surge es cual es la naturaleza de estos estados intermedios. Existe una evidencia a partir de una variada cantidad de estudios que utilizan criterios espectroscópicos e hidrodinámicos con los que podemos hacer dos aproximaciones principales: una engloba las especies intermedias detectadas cinéticamente y asociadas a las rutas de plegamiento y la otra a las especies termodinámicamente estables presentes bajo ciertas condiciones experimentales, normalmente inducidas por agentes desnaturizantes (estados H), valores de pH extremos muy ácidos (estados A) o muy básicos (estados B), disolventes orgánicos (estados O) o por temperatura (estados I).

En general, el término de "molten globule" es descriptivo de estas especies que se caracterizan por tener una conformación intermedia entre la de los estados nativo y desplegado y que son estables termodinámicamente en determinadas condiciones. Estos estados han sido caracterizados para un número relativamente excaso de proteínas que exhiben este comportamiento. La persistencia de estos estados depende de un balance muy fino que se establece entre las energías libres de los estados nativo e intermedio que es menor que el que existe entre el nativo y el desnaturizado. En una revisión de Christensen & Pain (1991) se recogen

varios ejemplos de dichos estados indicando las técnicas por las que se han estudiado y la bibliografía correspondiente.

Las principales características de un "molten globule" serían:

a) **Presenta un alto contenido de estructuras secundarias:** se comprueba por dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano. Esta es una herramienta bastante poderosa que mide el contenido en estructuras secundarias de la cadena y muy recientemente se ha comenzado a aplicar en estudios cinéticos como un sistema de detección en Stopped-flow (Elöve et al., 1992; Radford et al., 1992). La elección de una longitud de onda a 222nm donde el dicroísmo de las hélices α tiene un máximo es una herramienta poderosa del estado de plegamiento de las cadenas peptídicas. Incluso, es posible resolver diferentes fases cinéticas y reconstruir el espectro de los intermedios cinéticos eligiendo otras longitudes de onda lo que abre la posibilidad de deconvolucionarlo en términos de sus componentes de estructura secundaria (Chaffotte et al., 1992).

También se ha comenzado a utilizar técnicas de RMN con el mismo fin aunque, hasta ahora, sólo se han empleado con muy pocas estructuras termodinámicamente estables.

b) **Las interacciones terciarias se encuentran bastante debilitadas o ausentes:** de hecho, en estos estados intermedios, los restos aromáticos exhiben en general una elevada si no total accesibilidad al disolvente (según se demuestra con experimentos de espectroscopía diferencial, Robson & Pain, 1976) y también pierden asimetría en su microambiente (con UV-CD, Mitchinson & Pain, 1985). Los espectros de RMN suelen mostrar una pérdida de ordenación de bastantes restos alifáticos y aromáticos (Thomas et al., 1983).

Los espectros de fluorescencia son bastante útiles en este sentido debido a su elevada sensibilidad a cambios en la solvatación del medio. Se utilizan como "marcadores" los restos de Trp cuya fluorescencia es muy sensible tanto en intensidad como en longitud de onda al microambiente que posean en cada momento. Últimamente se suele utilizar la mutagénesis en este contexto para

eliminar restos de Trp de las estructuras que tienen más de uno y estudiar sus contribuciones separadamente o se disponen en sitios estratégicos de las estructuras (Khorazadizadeh et al., 1993).

c) El estado intermedio tiene una distribución globular: desde luego que intuitivamente, las interacciones necesarias para la persistencia de hélices estables deben conducir a un estado más compacto que el desplegado. Experimentalmente, se han hecho estudios de algunos de estos estados por difracción de rayos X (Damaschun et al., 1986), por medidas de viscosidad (Dolgikh et al., 1981), cromatografía de exclusión en gel (Ptitsyn et al., 1990), "light scattering" (Gast et al., 1986) o electroforesis en gradiente de urea (Creighton & Pain, 1980).

En general, los estados intermedios estables presentan un radio hidrodinámico de giro (radio de Stokes) aproximadamente 2 veces mayor que el de sus estados nativos correspondientes (Christensen & Pain, 1991).

d) Los estados estables tienden a agregar: esta propiedad se refleja sobre todo en la unión de la sonda fluorescente que es el ácido 8-anilino naftalén sulfónico (ANS) por estos estados, en mucha mayor extensión que a los estados nativos y desplegados (Semisotnov et al., 1991). Esto indicaría la presencia de partes con carácter sustancialmente no polar en la superficie de los estados compactos no empaquetados completamente o, alternativamente, la intercalación de la prueba dentro del glóbulo. Esto último puede estar de acuerdo con la naturaleza un tanto móvil del corazón hidrofóbico y con el valor de la capacidad calorífica de dicho estado que sugiere la existencia de un cierto porcentaje de agua de inclusión entre las superficies no polares (Pfeil, 1987). Los estudios de cromatografía de exclusión molecular son muy informativos como veremos.

e) Los estados se comportan termodinámicamente como si estuvieran "fundidos": generalmente, la transición entre el estado nativo y el del intermedio suele ser de dos estados como se ha demostrado a partir de los puntos

isosbéticos para la transición (Goto et al., 1990) o por la pérdida de otros estados poblados caracterizados por tamaño (Creighton & Pain, 1980). La estabilidad termodinámica de estos estados es menor que la del estado nativo y mayor que la del desnaturalizado (unos 10 kJ/mol de diferencia entre cada uno de ellos para, por ejemplo, el caso de la β -lactamasa, Mitchinson & Pain, 1985). Existen además algunas evidencias de que la desnaturalización térmica de estos estados en las condiciones experimentales en que son estables a temperatura ambiente es no cooperativa (Kim & Baldwin, 1990; Xie et al., 1993; Hayne & Freire, 1993)

Hay que destacar que los estados intermedios que se acumulan durante el plegamiento existen con tiempos de vida media menores a un segundo por lo que son más difíciles de estudiar. De las pocas descripciones estructurales existentes se desprende que son bastante similares a los de equilibrio como lo demuestran los estudios hechos con Barnasa que ya describimos en la Sección dedicada a ella en esta Memoria. También en la citada Sección describimos muy someramente algunos estudios encaminados a predecir sus estructuras de forma indirecta a partir de datos termodinámicos, en los que la CDB se revela para ser una técnica muy útil (Freire & Xie, 1994; Freire, 1994).

En general, podríamos afirmar que la mayoría de las proteínas, si no todas, se pliegan a su estado nativo correspondiente a través de un intermedio compacto que se forma muy rápidamente y que presenta características muy similares a las de los estados estables denominados como "molten globules" (Christensen & Pain, 1991). Vamos a tener una demostración de esta afirmación en nuestro estudio con CheY que describimos a continuación. Esta estructura ha sido elegida por su carácter α/β paralelo con alternancia de ambas estructuras, lo que constituye una estructura bastante característica con una lámina β central compuesta de 5 cadenas β y 5 hélices α rodeando esta estructura.

6.2.- EXPERIMENTOS DE DESNATURALIZACION

Los experimentos de calorimetría se hicieron en un calorímetro diferencial de barrido DASM-4 (Privalov & Potekhin, 1986) en un amplio intervalo de pH entre 2.5 y 10.3. Las muestras se dializaron frente al tampón adecuado (al menos frente a 1 L) y, posteriormente, se midió su concentración por espectrofotometría UV-Visible a 280nm empleando un coeficiente de extinción de 1.5 mg/mL por cada unidad de densidad óptica a pH 7.0 (para más detalles ver Materiales & Métodos).

La estabilidad de la proteína depende de la fuerza iónica del medio, probablemente debido a la presencia de los tres restos de Asp muy próximos entre sí en el sitio activo. Por tanto, y de acuerdo con nuestra experiencia, la fuerza iónica se mantuvo lo más baja posible utilizando pequeñas concentraciones de tampón (5 a 20mM).

La capacidad calorífica molar parcial de la CheY se calculó a partir de los datos experimentales aplicando el método descrito por Privalov & Potekhin (1986) (ver Materiales & Métodos). Se tomó un volumen específico para la proteína de 0.73 mL/g y un peso molecular de 14000 Da.

Para el análisis de datos se construyó la función de capacidad calorífica de exceso $\langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle$ sobre la capacidad calorífica del estado nativo ($C_{p,N}$) que se aproximó como una función lineal de la temperatura (Makhatadze & Privalov, 1990; Privalov & Makhatadze, 1990). La función que obtenemos consiste en dos términos:

$$\langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle = C_p(T) - C_{p,N}(T) = \Delta C_{p,exc}(T) + \Delta C_{p,int}(T) \quad (6.1)$$

El término $\Delta C_{p,exc}(T)$ es la contribución calorífica de exceso y $\Delta C_{p,int}(T)$ es la función de exceso química o intrínseca respecto del estado nativo. La sustracción de la capacidad calorífica del estado nativo puede ser un proceso complicado cuando la desnaturalización ocurre a bajas temperaturas, simplemente a causa de la incertidumbre en la extrapolación de $C_{p,N}$ en todo el intervalo de desnaturalización. Pero, por el contrario, nos permite evitar el tener que hacer cualquier aproximación de la función de capacidad calorífica del estado

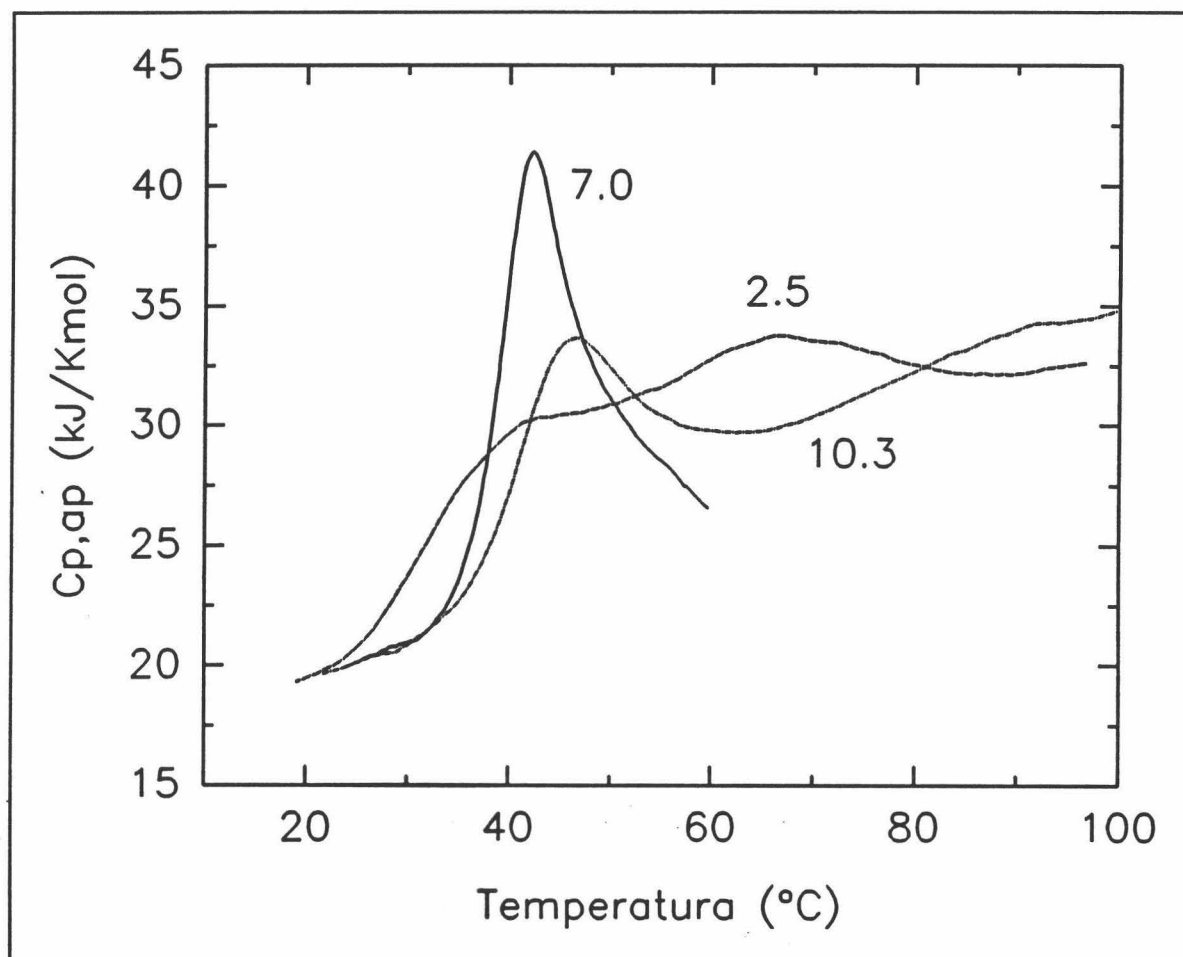


FIGURA 6-6: Dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica molar parcial de CheY a pH 7.0 (—), pH 2.5 (- -) y pH 10.3 (-·-·-·). La capacidad calorífica del estado nativo se aproximó por la ecuación $C_{p,N}(T) = 20 + 0.12(T-298)$ kJ/K·mol. Los valores de pH están puestos al lado de cada curva.

desnaturalizado que fue generalmente desconocida puesto que el final de la transición ocupa un intervalo de temperaturas bastante amplio.

En la Figura 6-6 tenemos una selección de experimentos de CDB a tres valores de pH: 2.5, 7.0 y 10.3. Estos registros fueron en general, independientes de la velocidad de barrido utilizada. A pH ácido y básico vemos dos transiciones endotérmicas bien definidas, muy reversibles en un segundo barrido de temperatura. A pH neutro, en cambio, sólo obtenemos un pico asimétrico que es reversible siempre y cuando el primer barrido se detenga, como mucho, justo en

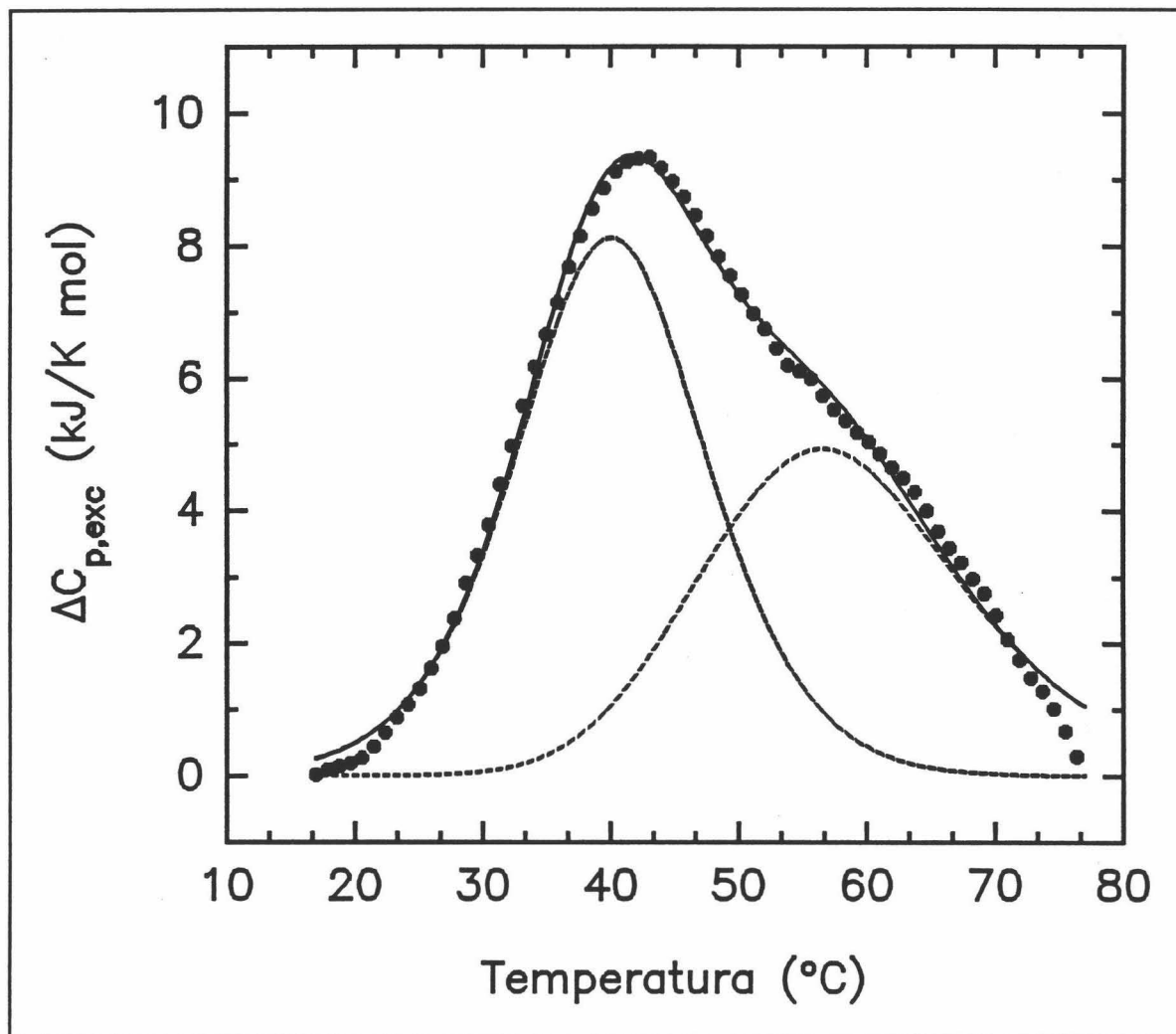


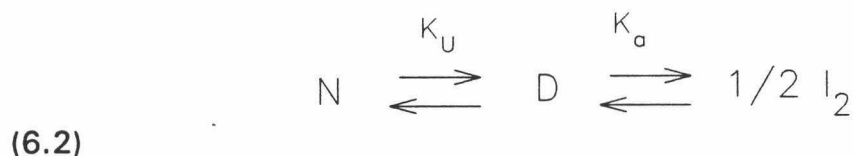
FIGURA 6-7: Intento de deconvolución de los datos experimentales de $\Delta C_{p,exc}(T)$ para CheY a pH 2.5 según el modelo de tres estados $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons D$. El valor de entalpía total resultó ser 290 kJ/mol y para cada pico deconvolucionado $\Delta H_{N,D,1} = 160$ kJ/mol ($T_{U,1} = 40.5^\circ\text{C}$) y $\Delta H_{N,D,2} = 130$ kJ/mol ($T_{U,2} = 57.6^\circ\text{C}$).

el momento de finalizar la transición (a unos 60°C). En la citada figura sólo hemos recogido la parte reversible de dicho barrido. También conviene destacar que los efectos caloríficos que resultan del proceso de desnaturalización son bastante pequeños, por lo que la evaluación de los parámetros termodinámicos conlleva bastante error, incluso cuando nos encontremos en condiciones de total equilibrio. Es por esto que hemos tenido que trabajar a concentraciones de proteína entre 4-6 mg/mL pues por debajo de estos valores los errores experimentales son bastante

considerables. Tampoco es aconsejable trabajar con concentraciones mayores porque la reversibilidad del proceso decrece bastante.

Observando la forma de las curvas de la Figura 6-6, parece bastante evidente que la proteína no sigue un tipo de desnaturalización de dos estados. El modelo más sencillo que podríamos considerar se correspondería con un proceso monomolecular de tres estados en equilibrio termodinámico. En la Figura 6-7 tenemos un ejemplo del ajuste matemático de una curva de CDB a pH 2.5 a este modelo pero, sin embargo, es imposible considerar este u otros modelos monomoleculares para el ajuste porque el análisis preliminar de los datos calorimétricos (ver Materiales & Métodos) nos dice que la entalpía de van't Hoff del primer pico del termograma, tanto a pH neutro como a pH básico (a pH ácido es complicado hacer tal evaluación ya que ambas transiciones están parcialmente solapadas) es aproximadamente tres veces mayor que la estimada a partir del área bajo la curva (entalpía calorimétrica), lo que nos indica la existencia de procesos de asociación-disociación durante la desnaturalización. Además, el valor de ésta última es extremadamente bajo (100-140 kJ/mol) mientras que la entalpía de van't Hoff presenta unos valores más razonables (300-380 kJ/mol) para una proteína de este tamaño.

El modelo más sencillo que solventa todos estos problemas consistiría en un proceso de tres estados que incluye un estado dimérico de la proteína:



Nosotros hemos encontrado que, efectivamente, las curvas calorimétricas obtenidas en las diferentes condiciones experimentales (y en condiciones de equilibrio) se ajustan aceptablemente a este esquema.

En el modelo propuesto, N se correspondería con el estado nativo, D sería el estado desnaturalizado y I_2 un dímero con conformación diferente a la de N y D.

Consecuentemente, K_U sería la constante de equilibrio para el proceso de desnaturalización y K_a la del proceso bimolecular de asociación, cuyas expresiones serán:

$$K_U = \frac{[D]}{[N]} = \frac{f_D}{f_N} \quad (6.3)$$

$$K_a^2 = \frac{[I_2]}{[D]^2} = \frac{f_I}{2 \cdot [P]_T \cdot f_D^2} \quad (6.4)$$

donde f_N , f_D y f_I son las poblaciones de las moléculas de proteína en cada estado y $[P]_T$ es la concentración total de proteína en disolución.

La distribución de poblaciones se puede calcular si tenemos en cuenta que:

$$f_N = \frac{[N]}{[P]_T} ; \quad f_D = \frac{[D]}{[P]_T} ; \quad f_I = \frac{2 \cdot [I_2]}{[P]_T} \quad (6.5)$$

$$f_N + f_D + f_I = 1 \quad (6.6)$$

Podemos definir una función de partición para el proceso de desnaturalización como $q = 1 + K_U$ y ahora resolvemos:

$$f_N = \frac{2}{q + \sqrt{q^2 + 8 \cdot [P]_T \cdot K_a^2 \cdot K_U^2}} \quad (6.7)$$

$$f_D = K_U \cdot f_N \quad (6.8)$$

$$f_I = 1 - q \cdot f_N \quad (6.9)$$

Si tenemos en cuenta las consideraciones de Freire & Biltonen (1978), la función entalpía de exceso tiene la siguiente expresión:

$$(6.10)$$

$$\langle \Delta H_N(T) \rangle = \Delta H_{N,D} \cdot f_D + (\Delta H_{N,D} + \Delta H_a) \cdot f_I = \Delta H_{N,D} \cdot (1 - f_N) + \Delta H_a \cdot f_I$$

La derivada de esta función de exceso nos daría por fin la función de capacidad calorífica de exceso, $\langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle$, cuyas componentes (ecuación (6.1)) se pueden expresar como:

$$\Delta C_{p,exc}(T) = \Delta H_a \frac{df_I}{dT} - \Delta H_{N,D} \frac{df_N}{dT} \quad (6.11)$$

$$\Delta C_{p,int}(T) = \Delta C_{p,N,D} \cdot (1 - f_N) + \Delta C_{p,a} \cdot f_I \quad (6.12)$$

Para no complicar más aún el modelo, ya de por sí bastante complejo, la variación de las funciones termodinámicas con la temperatura se calculó con la suposición de un $\Delta C_{p,N,D}$ constante y un $\Delta C_{p,a} = 0$, con lo que:

$$\Delta H_{N,D}(T) = \Delta H_{N,D}(T_U) + \Delta C_{p,N,D} \cdot (T - T_U) \quad (6.13)$$

$$\Delta H_a(T) = \Delta H_a(T_a) + \Delta C_{p,a} \cdot (T - T_a) \quad (6.14)$$

$$\Delta S_{N,D}(T) = \frac{\Delta H_{N,D}(T_U)}{T_U} + \Delta C_{p,N,D} \cdot \ln \frac{T}{T_U} \quad (6.15)$$

$$\Delta S_a(T) = \frac{\Delta H_a(T_a)}{T_a} + \Delta C_{p,a} \cdot \ln \frac{T}{T_a} \quad (6.16)$$

$$K_U(T) = \exp [(-\Delta H_{N,D}/T + \Delta S_{N,D}) / R] \quad (6.17)$$

$$K_a(T) = \left(\frac{1}{[P]_T} \right) \cdot \exp [(-\Delta H_a/T + \Delta S_a) / R] \quad (6.18)$$

En la ecuación (6.18) hemos tenido en cuenta que la constante de asociación aparente depende de la concentración total de proteína, $[P]_T$, pues T_a sería la temperatura a la que $K_a = 1/[P]_T$, mientras que en la ecuación (6.17) T_U es

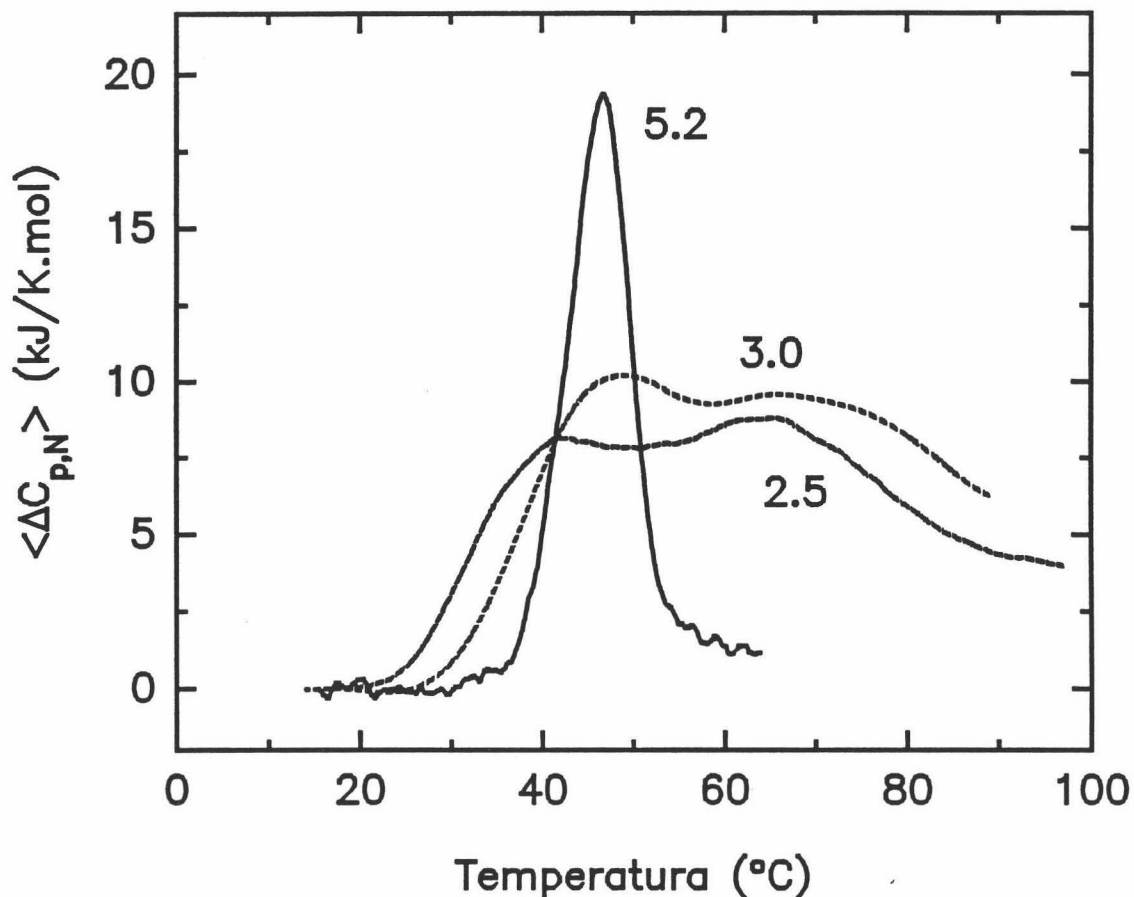


FIGURA 6-8: Curvas de CDB para CheY a pH ácido. Los valores de pH están puestos al lado de cada curva y el resultado de su deconvolución se recoge en la tabla 6-1 del texto.

la temperatura a la que $K_D = 1$.

Para reducir el número de variables, el ajuste de los datos experimentales se hizo bajo la suposición de que $\Delta C_{p,a} = 0$. Esta suposición se basa en la observación de que ΔH_a no parece depender de T_a entre los límites de error, aún cuando $\Delta C_{p,a}$ no fue considerado cero.

6.2.1.- EXPERIMENTOS A pH ACIDO

Se hicieron experimentos de calorimetría diferencial de barrido a varios valores de pH: 2.5, 3.0, 4.0 y 5.2. Para las dos primeras condiciones se utilizó

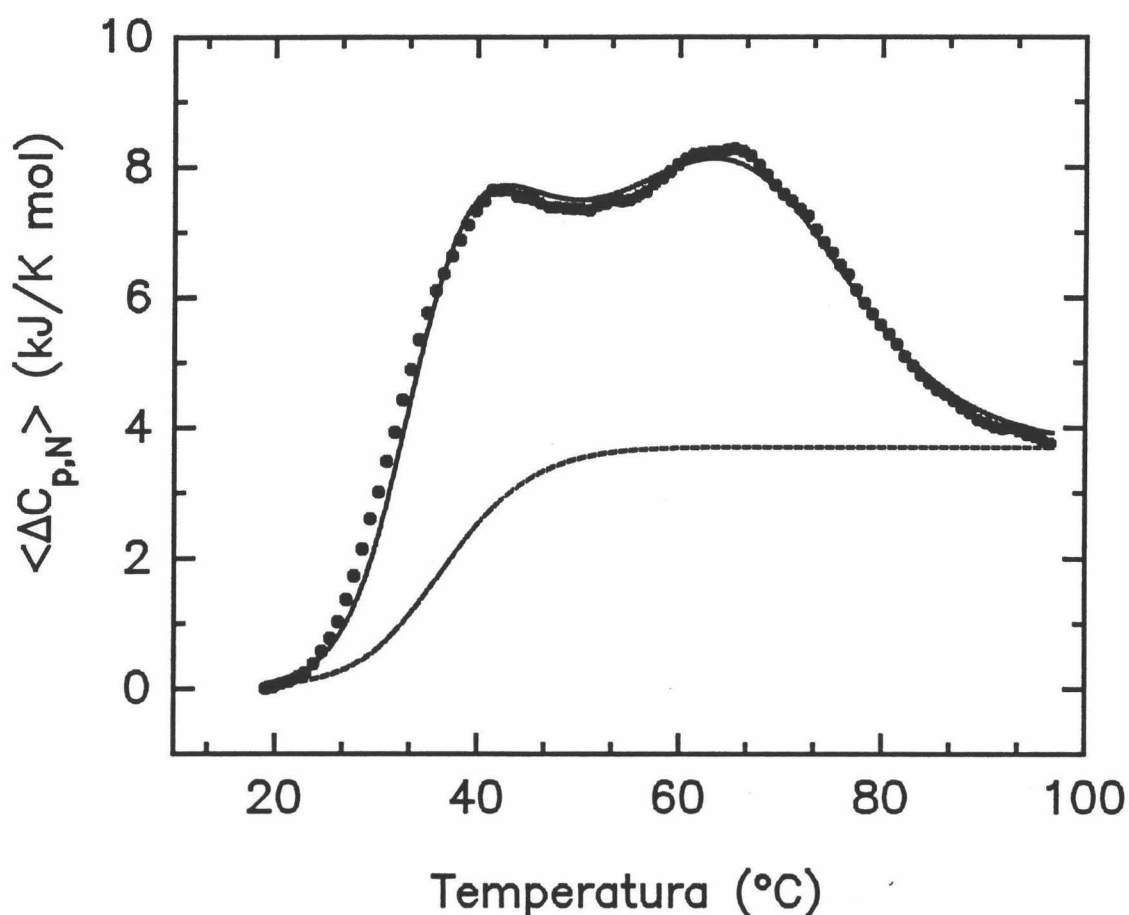


FIGURA 6-9: Análisis de datos a pH 2.5 (los parámetros del ajuste están en la tabla 6-1). Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua el mejor ajuste según el modelo $N \rightleftharpoons 1/2 I_2 \rightleftharpoons D$. Con línea a trazos hemos representado la componente $\Delta C_{p,int}(T)$ calculada a partir del modelo suponiendo un $\Delta C_{p,a} = 0$.

Glicina/HCl 10mM como medio tamponante, mientras que para las otras dos se usó un tampón de Acético/Acetato sódico 10mM.

Como podemos ver en la Figura 6-8, los datos calorimétricos a pH 2.5 y 3.0 son bastante parecidos con dos transiciones bien diferenciadas aunque bastante solapadas. En estas condiciones las curvas son perfectamente reversibles lo que indica condiciones de equilibrio. A pH 4.0 y 5.2 la situación cambia completamente y tenemos una sola transición con un máximo que coincide aproximadamente con el primer máximo de las otras curvas. En ambas condiciones el proceso de

desnaturalización es completamente irreversible, debido principalmente a la agregación de la proteína. Esto no es de extrañar si tenemos en cuenta la proximidad del punto isoeléctrico de la proteína, en torno a 5. Sin embargo, los estudios de fluorescencia realizados por Serrano et al. (Filimonov et al., 1993) indican que es a estas condiciones de pH donde la proteína presenta una mayor estabilidad, disminuyendo drásticamente por debajo de pH 3.7.

En las Figuras 6-9 y 6-10 tenemos el resultado del ajuste de las curvas experimentales a pH 2.5 y 3.0 al modelo de equilibrio propuesto. Los parámetros obtenidos del ajuste los hemos recogido en la tabla 6-I y podemos ver que son bastante razonables para una proteína de 14 kDa con una estructura definida y al menos un corazón hidrofóbico de tamaño normal. Los datos a pH 5.2 fueron analizados por evaluación directa del máximo de la transición (T_U) y del área bajo la curva ($\Delta H_{N,D}$), sin suponer a priori ningún comportamiento de desnaturalización (para más detalles sobre este modo de análisis ver Materiales & Métodos).

TABLA 6-I
PARAMETROS TERMODINAMICOS A pH ACIDO PARA CheY

pH	T_U (°C)	$\Delta H_{N,D}$ (kJ/mol)	$\Delta C_{p,N,D}$ (kJ/K·mol)	T_a (°C)	ΔH_a (kJ/mol)	T_m (°C)
2.5	45 ± 1	245 ± 20	3.7 ± 1	62 ± 2	155 ± 20	39
3.0	48 ± 1	255 ± 20	5.6 ± 2	65 ± 2	150 ± 20	47
5.2		165 ± 10	2.6 ± 1			47

El modelo aplicado, descrito por la ecuación (6.2) describe algunos aspectos estructurales bastante interesantes que suceden durante la desnaturalización ya que podemos interpretar la presencia de ambas transiciones. Así, la primera transición y sus parámetros describen la desnaturalización de la proteína mientras que la segunda se debería a la presencia del equilibrio de asociación-disociación entre la cadena polipeptídica desnaturalizada y el intermediario dimérico. La secuencia real de estos acontecimientos la tenemos en la Figura 6-11(A) donde

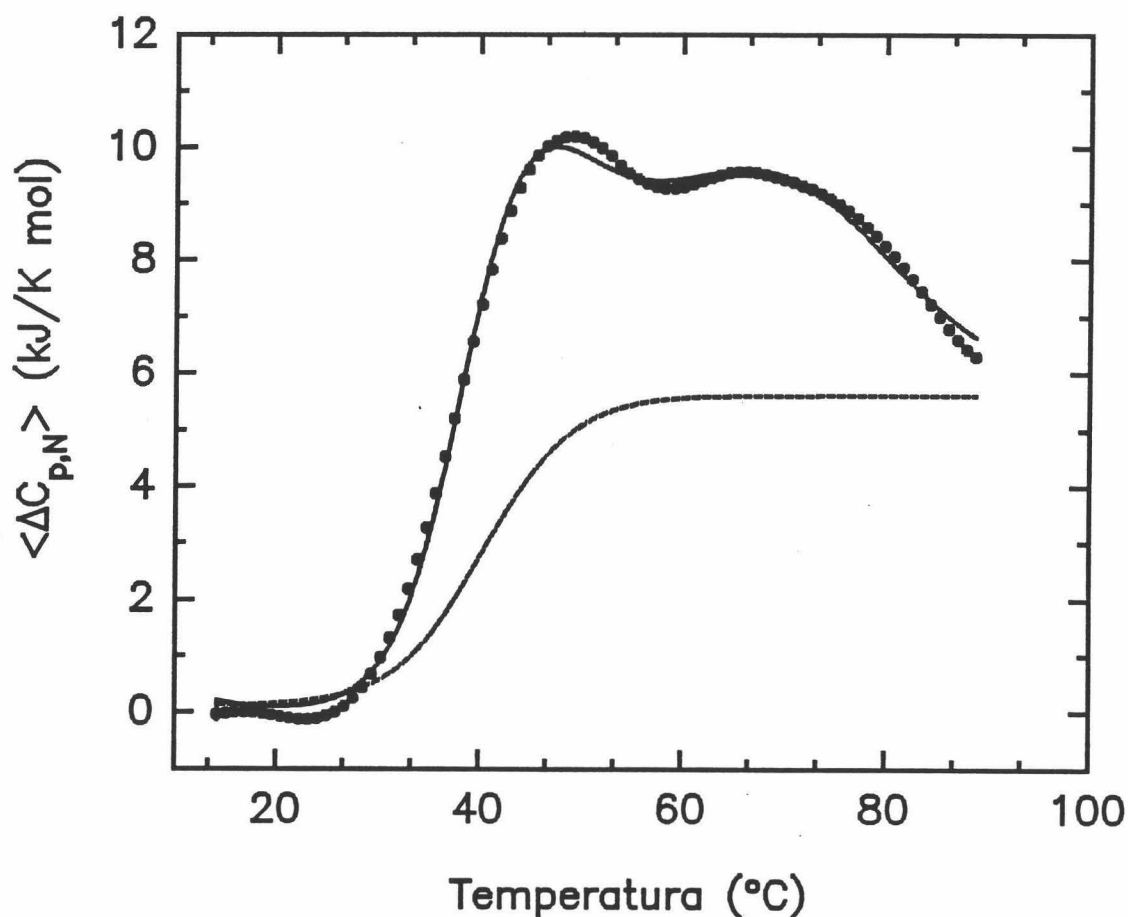
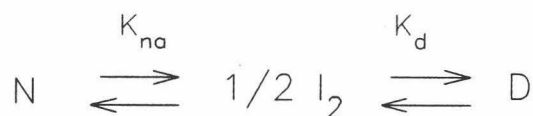


FIGURA 6-10: Análisis de CDB a pH 3.0 (los parámetros del ajuste están en la tabla 6-1). Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua el mejor ajuste según el modelo $N \rightleftharpoons 1/2 I_2 \rightleftharpoons D$. Con línea a trazos hemos representado la componente $\Delta C_{p,int}(T)$ calculada a partir del modelo suponiendo un $\Delta C_{p,s} = 0$.

hemos representado la distribución de poblaciones calculada a partir de los parámetros termodinámicos descritos en la tabla 6-1 a pH 2.5 y haciendo uso de las ecuaciones (6.7), (6.8) y (6.9). Como vemos, inicialmente sólo tenemos estado nativo pero cuando aumenta la temperatura éste es sustituido por el dímero (constituiría el 10-20% de la población a 25°C y pH 2.5) que puede alcanzar el 80% en torno a 50°C. Finalmente, el estado I_2 evolucionaría hasta una estructura más desordenada (estado desnaturalizado) a unos 90°C. Según esto el esquema presentado en (6.2) podría ser sustituido por el siguiente más ordenado:



(6.19)

en el que los tres mismos estados se han dispuesto en el orden creciente de entalpía y, por tanto, en el orden de aparición en el calentamiento. Sin embargo, es más conveniente la disposición dada en (6.2) porque siendo termodinámicamente equivalente nos proporciona una explicación fenomenológica más clara para los procesos de equilibrio que ocurren. Así, en la ecuación (6.19) el segundo equilibrio (K_d) refleja la disociación del dímero y la desnaturalización del intermediario, mientras que el primero (K_{na}) se correspondería con un proceso aún más complejo en el que ocurre un cambio conformacional acompañado por una dimerización. Por tanto, los parámetros termodinámicos no poseen en este caso una interpretación estructural clara.

El modelo explica también la discrepancia existente entre la pequeña área del pico y los valores de entalpía obtenidos que, como ya hemos apuntado, son normales. En la Figura 6-11(B) hemos simulado la curva obtenida del ajuste a pH 2.5 (con los parámetros de la tabla 6-1) así como una descomposición de la misma en los dos términos que contribuyen a ella: el término de desnaturalización y el del proceso de asociación-disociación. A la vista de las curvas obtenidas, lo que parece ocurrir es que el proceso endotérmico de desnaturalización es compensado por el proceso de dimerización de carácter exotérmico. La explicación de este fenómeno es muy clara: las moléculas que desnaturalizan inmediatamente se dimerizan. Después, a mayores temperaturas, los dímeros se disocian con un efecto calorífico positivo (endotérmico), dando lugar a la segunda transición en la curva de capacidad calorífica. De esta manera, los procesos de desnaturalización y asociación se encuentran fuertemente acoplados y la elevada tendencia a dimerizar que existe a relativamente bajas temperaturas facilita la desnaturalización de la proteína. Este efecto desestabilizante se puede ver claramente si comparamos el pico de desnaturalización obtenido con el que obtendríamos si el proceso fuese dos

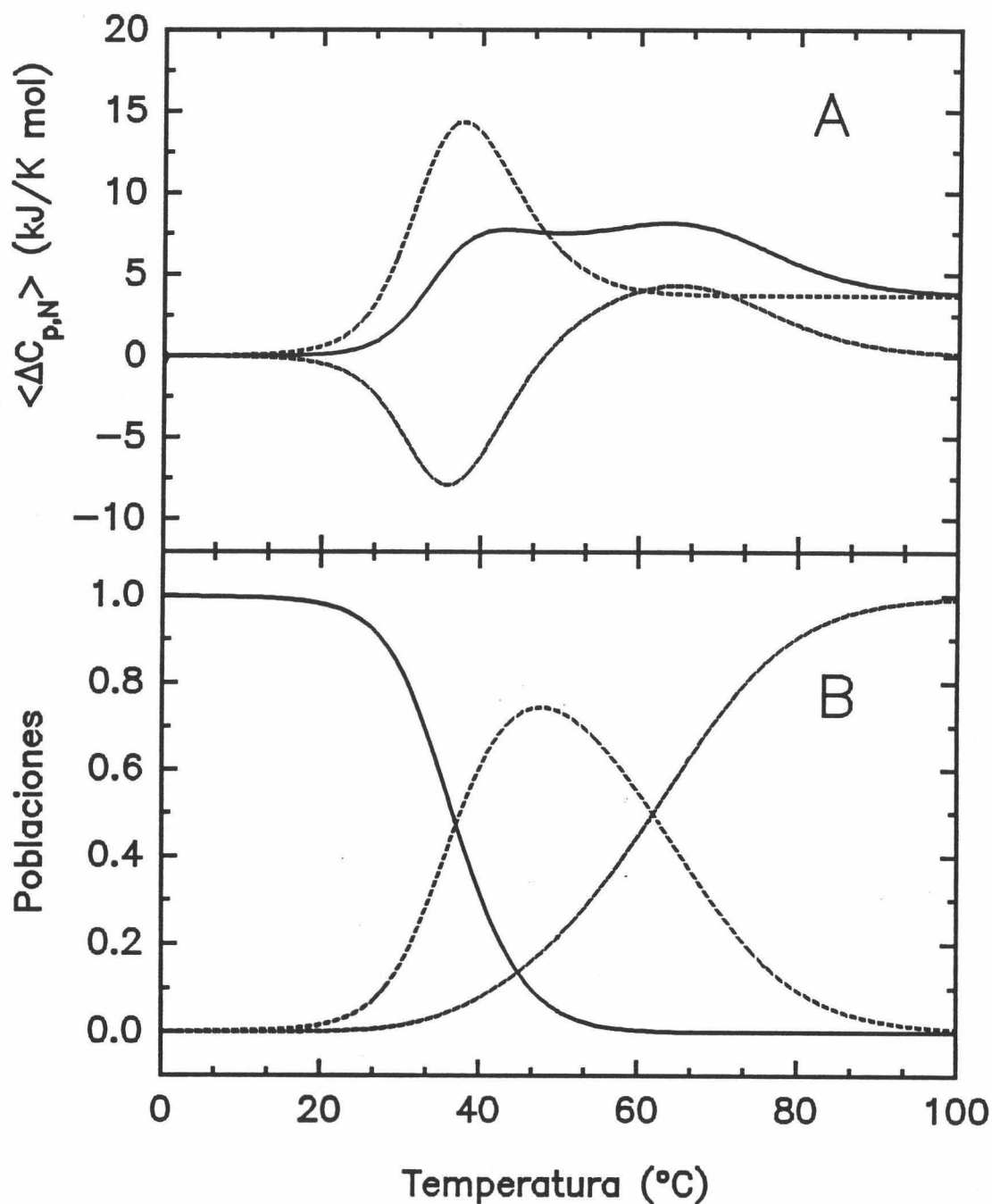


FIGURA 6-11: (A) Simulación del mejor ajuste de la función de $\Delta C_{p,N}(T)$ a pH 2.5 (—) representada junto con el término de desnaturalización (·····) y el de asociación-disociación (- - -). (B) Distribución de poblaciones de los estados N (—), I₂ (·····) y D (- - -) encontrada a partir del ajuste al modelo $N \rightleftharpoons 1/2 I_2 \rightleftharpoons D$.

estados, simulado a partir de los parámetros de desnaturalización obtenidos del ajuste. Este pico de dos estados vemos que es mayor que el otro y su máximo se desplaza unos 6°C (valor de T_U en tabla 6-I) con respecto al máximo experimental (T_m en tabla 6-I). Estas diferencias son aún mayores a pH neutro y alcalino como veremos a continuación.

Nótese que de acuerdo con nuestros datos calorimétricos, a pH 2.5 y 25°C tenemos en disolución un 10-20% de moléculas desnaturalizadas formando dímeros. Parece claro que en estos dímeros el carácter estructural de las cadenas polipeptídicas debe de ser diferente de las que tenemos desnaturalizadas a mayor temperatura ya que presentan una característica diferencial importante, que es su tendencia a la dimerización. En el laboratorio del Dr. Luis Serrano se realizó un análisis por dicroísmo circular a pH 2.5 y 42°C, que son las condiciones donde tenemos una mayor población de la especie I_2 , en el que se ha encontrado que se mantiene un contenido helicoidal en CheY (medido en el UV lejano) bastante considerable, mientras que han desaparecido totalmente las estructuras terciarias puesto que en el UV cercano tenemos un espectro similar al encontrado en 6M de urea (Filimonov et al., 1993). Nos encontraríamos, por consiguiente, frente a un intermediario termodinámico de desplegamiento, denominado generalmente en bibliografía como "molten globule" (ver Introducción; Denton et al., 1982; Ohgusi & Wada, 1983; Dolgikh et al., 1984; Brazhnikov et al., 1985; Kuwajima, 1986; States et al., 1987; Baker et al., 1992; Gottfried & Haas, 1992; Bismuto et al., 1992; Eder et al., 1993).

En esta situación parece claro que los dímeros podrían tener una elevada afinidad por el ANS (ácido 8-anilinaftalén-1-sulfónico) que es un marcador de fluorescencia que se une con gran afinidad a lugares no polares de proteínas en el estado nativo así como a conformaciones tipo molten globule, mientras que apenas si interacciona con estados muy desnaturalizados (Semisotnov et al., 1991). La posible unión se siguió por medidas de emisión de fluorescencia a 495nm y se observó que, efectivamente, a 25°C el ANS se une a la proteína con gran afinidad puesto que desplaza el equilibrio monómero-dímero hacia este último y, además,

la emisión de fluorescencia disminuye conforme se añade urea a la disolución.

Aparte, los experimentos de "cross-linking" realizados con formaldehído (Serrano & Avila, 1985) que permiten detectar cualitativamente estados de asociación por electroforesis, demuestran la presencia de estos dímeros a las temperaturas preconizadas en CDB (Filimonov et al., 1993).

Podríamos concluir, por consiguiente, que los dímeros que se forman después de la desnaturalización parecen tener alguna organización estructural que se desnaturaliza con un efecto calorífico razonablemente elevado y cooperativo.

6.2.2.- EXPERIMENTOS A pH NEUTRO

La desnaturalización térmica de la CheY a pH 7.0 con una fuerza iónica de 50mM de fosfato resultó en una desnaturalización irreversible. Además, la forma de la transición es bastante extraña como vemos en la Figura 6-12. Cuando reducimos la fuerza iónica hasta 5mM de tampón (fosfato o PIPES) obtenemos unas condiciones de parcial reversibilidad para el proceso de desnaturalización, siempre y cuando la disolución no se caliente más de 65°C (justo después de finalizar la transición), pues de lo contrario se produce una agregación de la proteína con turbidez visible en disolución. El uso de fosfato o PIPES es totalmente equivalente, no encontrándose ninguna diferencia apreciable entre los registros de CDB en ambas condiciones. Además, se utilizó EDTA-Na₂ en concentración 1mM para evitar contaminación por la presencia de cationes divalentes que pueden interaccionar con la proteína.

Como podemos ver en la Figura 6-13 las curvas de desnaturalización a pH 7.0 a diferentes velocidades de barrido tienen una forma similar y, lo que es más importante, el mismo máximo (dentro del error) en la escala de temperatura. En la Figura 6-14 hemos simulado la distribución de poblaciones y de $\langle \Delta C_{p,N}(T) \rangle$, donde vemos que la componente de disociación de los dímeros ha desaparecido, pues los datos del ajuste indican que ésta tiene su máximo a más de 100°C (ver tabla 6-II). Por consiguiente, a partir de estas observaciones podemos esperar que

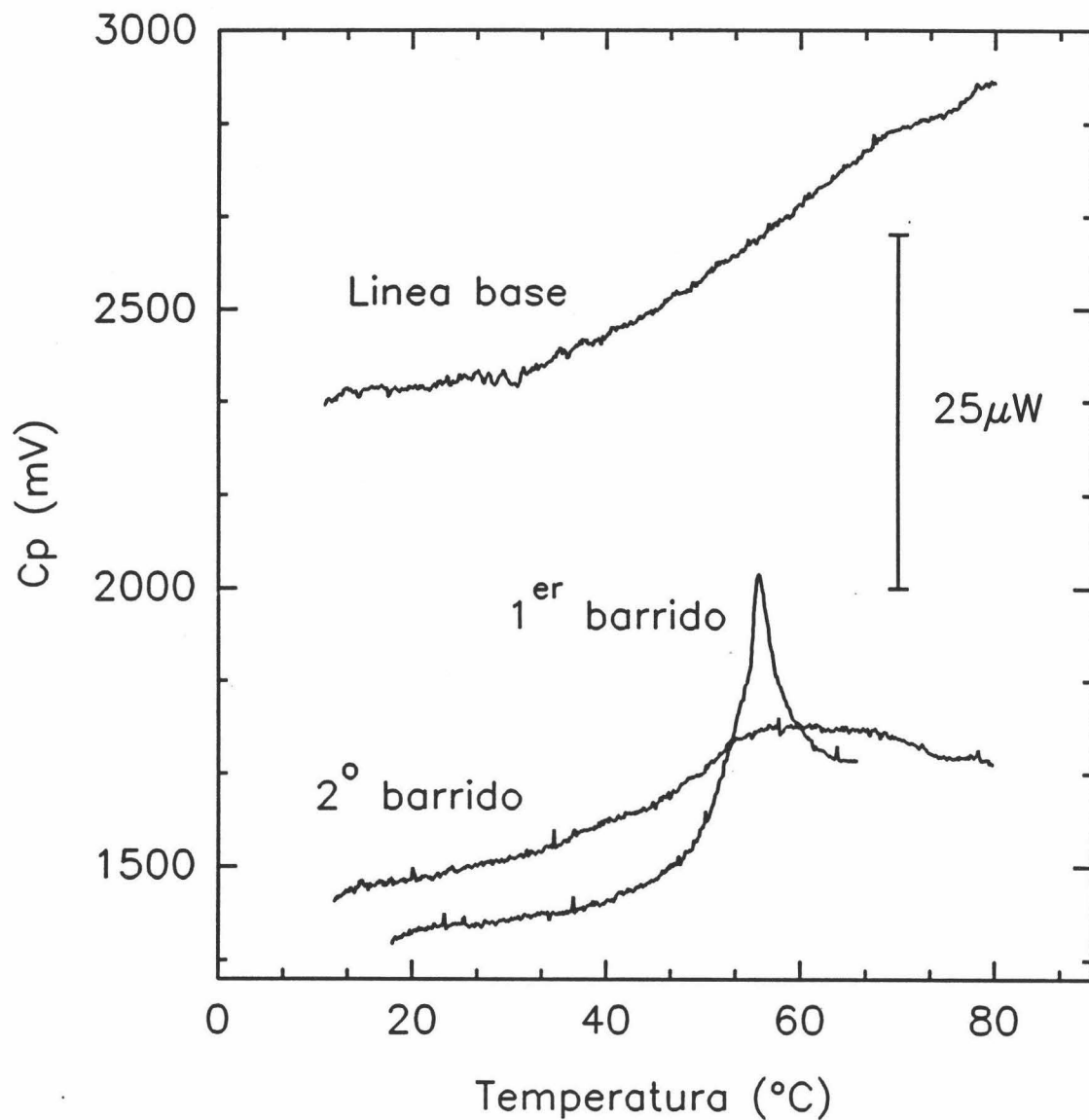


FIGURA 6-12: Datos experimentales de CDB para CheY a pH 7.0 en tampón fosfato 50mM. En la misma gráfica hemos recogido un registro de línea base y los dos barridos con la muestra, donde vemos que la desnaturalización es un proceso irreversible.

el proceso de disociación en estas condiciones se encuentre suprimido debido a que antes ocurre una mayor agregación de carácter irreversible. En consecuencia, al esquema de equilibrio descrito en (6.2) deberíamos de añadir una etapa final irreversible con lo que quedaría para este caso de la siguiente manera:

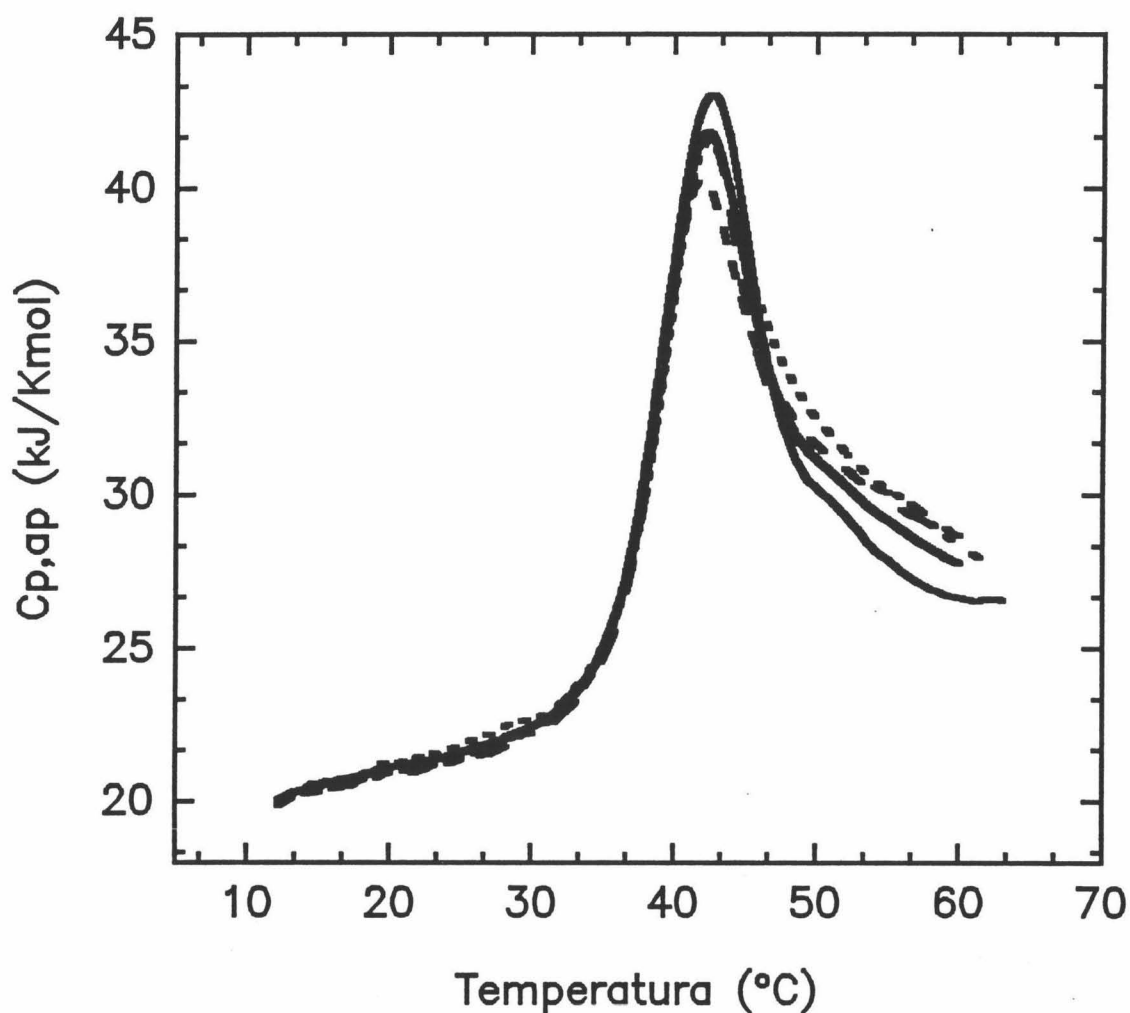
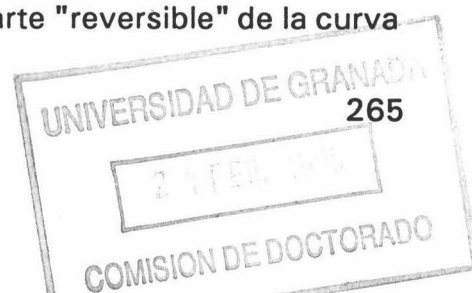


FIGURA 6-13: Dependencia con la temperatura para la capacidad calorífica molar parcial de CheY a pH 7.0 a diferentes concentraciones y velocidades de barrido. Las curvas se alinearon a 12°C para mostrar la variación real de los datos después del desplegamiento.

$$N \approx 1/2 I_2 \approx D \rightarrow \text{Agregados} \quad (6.20)$$

Esta última etapa irreversible iría acompañada por un efecto calorífico pequeño y negativo. En las curvas de CDB (Figura 6-13) se observa, de hecho, que la agregación hace disminuir la capacidad calorífica aparente del estado desnaturalizado, con lo que el $\Delta C_{p,N,D}$ observado sería bastante pequeño e incierto.

En cualquier caso, el resultado del ajuste de la parte "reversible" de la curva



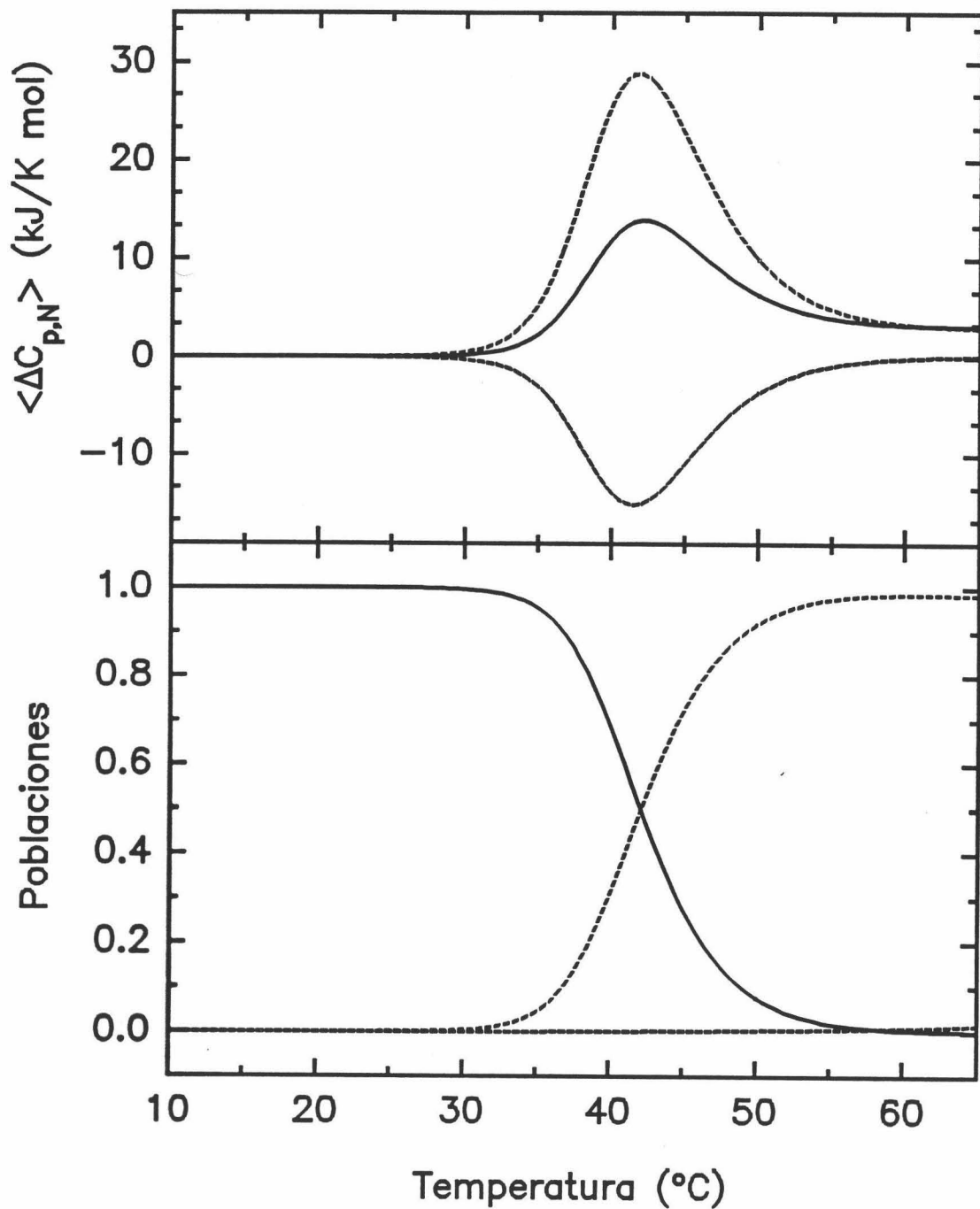


FIGURA 6-14: (A) Simulación del mejor ajuste de la función $\Delta C_{p,N}(T)$ a pH 7.0 (—) representada junto con el término de desnaturalización (····) y el de asociación-disociación (- - -). (B) Distribución de poblaciones de los estados N (—), I₂ (····) y D (- - -) encontrada a partir del ajuste al modelo $N \rightleftharpoons 1/2 I_2 \rightleftharpoons D$.

es bastante aceptable y los parámetros termodinámicos que se obtienen son comparables dentro del error con los que tenemos a otras condiciones experimentales (tabla 6-II).

TABLA 6-II
PARAMETROS TERMODINAMICOS A pH 7.0 PARA CheY

CONDICIONES pH 7.0	T_U (°C)	$\Delta H_{N,D}$ (kJ/mol)	$\Delta C_{p,N,D}$ (kJ/K·mol)	T_a (°C)	ΔH_a (kJ/mol)	T_m (°C)
Fosfato 5mM, EDTA 1mM	58 ± 3	350 ± 30	2.9 ± 1.5	116 ± 5	165 ± 30	45
Fosf. 50mM, Urea 2M	43 ± 3	280 ± 20	2.5 ± 1.5	49 ± 5	155 ± 30	40
Fosf. 50mM, GuHCl 0.5M	47 ± 3	260 ± 20	2.0 ± 1	85 ± 5	65 ± 30	42

En la misma tabla 6-II hemos recogido también los datos termodinámicos obtenidos de aplicar el modelo (6.2) a las curvas de CDB en presencia de GuHCl y urea. La adición de estos agentes nos permite incrementar el intervalo de temperaturas de calentamiento hasta 80°C y la fuerza iónica hasta 50mM y obtener un 90% de reversibilidad en el segundo barrido. El análisis cualitativo de los datos presentados en la Figura 6-15 es un poco complicado debido al error experimental pero parece suceder que el pico principal desplaza su máximo a menores temperaturas y decrece el valor de la entalpía de desnaturalización. A 1M de GuHCl esta disminución ya es bastante acusada, obteniéndose un estado totalmente desnaturalizado a 1.5M de GuHCl. Un hecho interesante es que a 2M de urea, la proteína no se encuentra desnaturalizada, muy al contrario, a la vista de la tabla 6-II y de la Figura 6-16 parece estar bastante más "nativa" que en 0.5M de GuHCl. Esta discrepancia se debe a la diferente manera de interacción de ambos agentes con la proteína (Makhatadze & Privalov, 1992).

A la vista de los resultados, parece razonable asumir que durante el proceso de dimerización la proteína puede perder algunas moléculas de agente desnaturalizante y si éste es el caso, entonces tendríamos que a concentraciones

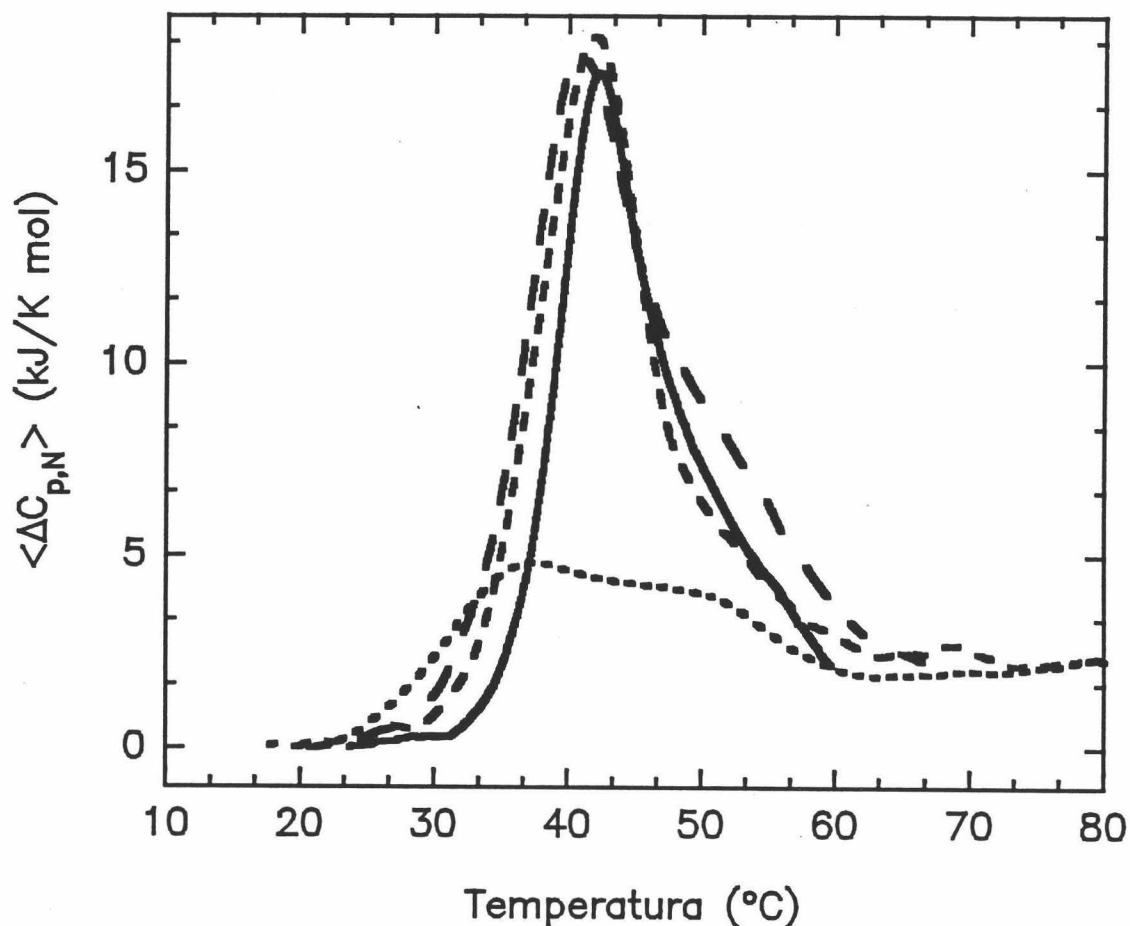


FIGURA 6-15: Datos experimentales de $\Delta C_{p,N}(T)$ para CheY a pH 7.0 a varias concentraciones de agente desnaturalizante. La línea sólida es para PIPES 5mM, la de trazo largo para urea 2M, el trazo corto para GuHCl 0.5M y la punteada para GuHCl 1M.

crecientes del mismo el equilibrio se desplazaría hacia la disociación, aumentando por tanto la amplitud del pico principal y disminuyendo el otro que además se desplazaría hacia menores temperaturas (ver tabla 6-II).

Hay que destacar que en presencia de urea 2M sí que existe una formación específica de dímeros ya que el proceso de agregación se ha eliminado por la presencia de este agente. Esto se comprobó en el laboratorio del Dr. Luis Serrano donde se equilibró una columna de filtración HiLoad 16/60 Superdex 75 a varias temperaturas y observaron que a unos 45-50°C la molécula presenta un peso

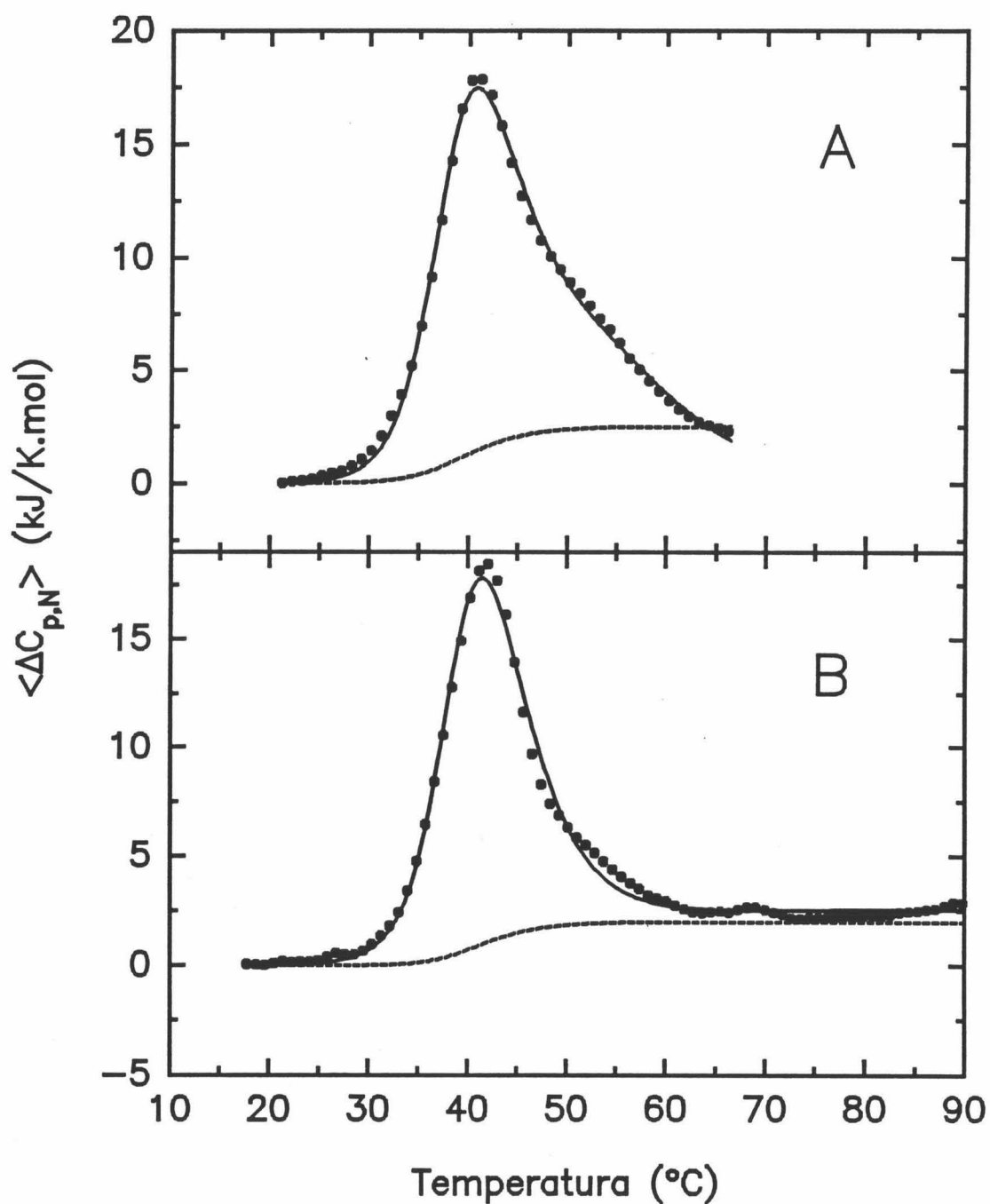


FIGURA 6-16: Análisis de datos a pH 7.0 para CheY (los parámetros del ajuste están en la tabla 6-II). Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua el mejor ajuste según el modelo $N \rightleftharpoons 1/2 I_2 \rightleftharpoons D$. Con línea a trazos hemos representado la componente $\Delta C_{p,int}(T)$ calculada a partir del modelo suponiendo un $\Delta C_{p,a} = 0$. (A) urea 2M. (B) GuHCl 0.5M.

molecular doble del monómero, los que nos confirma también el modelo calorimétrico (Filimonov et al., 1993).

6.2.3.- EXPERIMENTOS A pH BASICO

Aunque la zona de pH ácido es la más deseable desde un punto de vista experimental para CDB porque los tampones ácidos tienen calores de ionización muy pequeños, se intentó hacer experimentos a pH básico con el fin de intentar desestabilizar la proteína y simultáneamente suprimir los efectos de agregación encontrados a pH neutro. En esta situación, el intervalo de pH alcalino puede ser útil a pesar de que los calores de ionización sean muy elevados para los tampones.

Se utilizó CAPS 20mM a pH 9.5, 10.0 y 10.3 (ver Figura 6-17) y el primer hecho que observamos fue la elevada reversibilidad de la desnaturalización en estas condiciones (casi un 100%). A pH 9.5 la situación es muy similar a la encontrada a pH 7.0 si bien el proceso es mucho más reversible pero si aumentamos el pH efectivamente ocurre una desestabilización del proceso de desplegamiento (a nivel de T_U principalmente) así como del de disociación que ocurre cada vez a menores temperaturas (T_a). Estos resultados se han recogido en la tabla 6-III.

TABLA 6-III
PARAMETROS TERMODINAMICOS A pH ALCALINO PARA CheY

CONDICIONES DE pH	T_U (°C)	$\Delta H_{N,D}$ (kJ/mol)	$\Delta C_{p,N,D}$ (kJ/K·mol)	T_a (°C)	ΔH_a (kJ/mol)	T_m (°C)
CAPS 20mM pH 9.5	58 ± 1	290 ± 20	2.9 ± 1	130 ± 6	120 ± 30	43
CAPS 20mM pH 10.0	54 ± 1	290 ± 20	4.0 ± 1	90 ± 3	125 ± 20	44
CAPS 20mM pH 10.3	55 ± 1	280 ± 20	3.5 ± 1	87 ± 3	135 ± 20	47

Respecto a pH 2.5 comprobamos que las transiciones que aparecen se encuentran más claramente diferenciadas entre sí y, por consiguiente, en

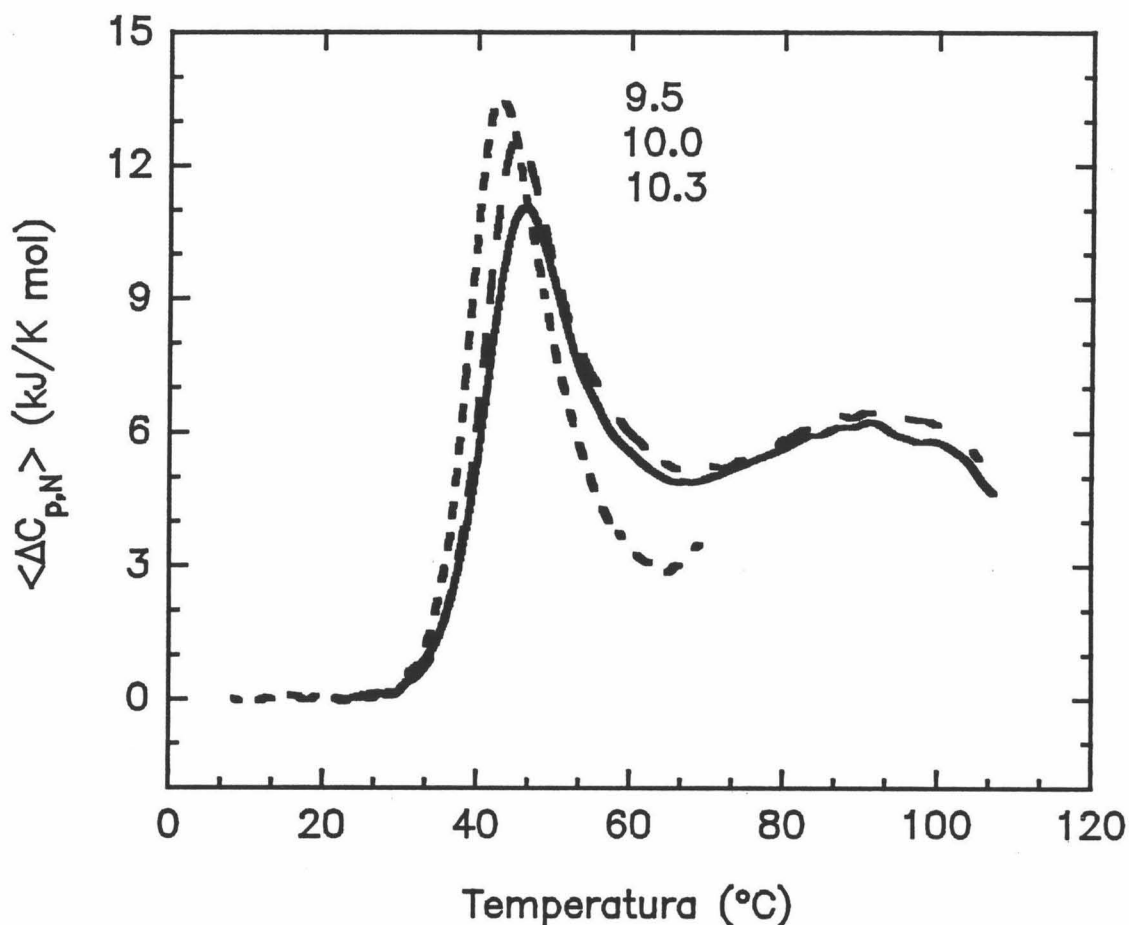


FIGURA 6-17: Curvas de CDB para CheY a pH alcalino. Los valores de pH están puestos al lado de cada curva y serían: pH 9.5 (.....), pH 10.0 (- - -) y pH 10.3 (—————).

condiciones alcalinas tenemos una mayor estabilidad para la especie I_2 que a valores de pH por encima de 10 podemos encontrarla hasta en un 90% poblada a temperaturas en torno a 60°C (Figura 6-18). Un hecho al menos curioso es el aparente incremento en estabilidad conforme aumenta el pH que apreciamos en la Figura 6-17. Este hecho sería bastante cuestionable en una proteína que posee un punto isoeléctrico en torno a pH 5. Sin embargo, aunque el valor de T_m aumenta con el pH, la deconvolución de los datos de acuerdo con el modelo (ver Figura 6-19) nos presenta una situación totalmente contraria, con una disminución de la T_u con el pH (ver tabla 6-III).

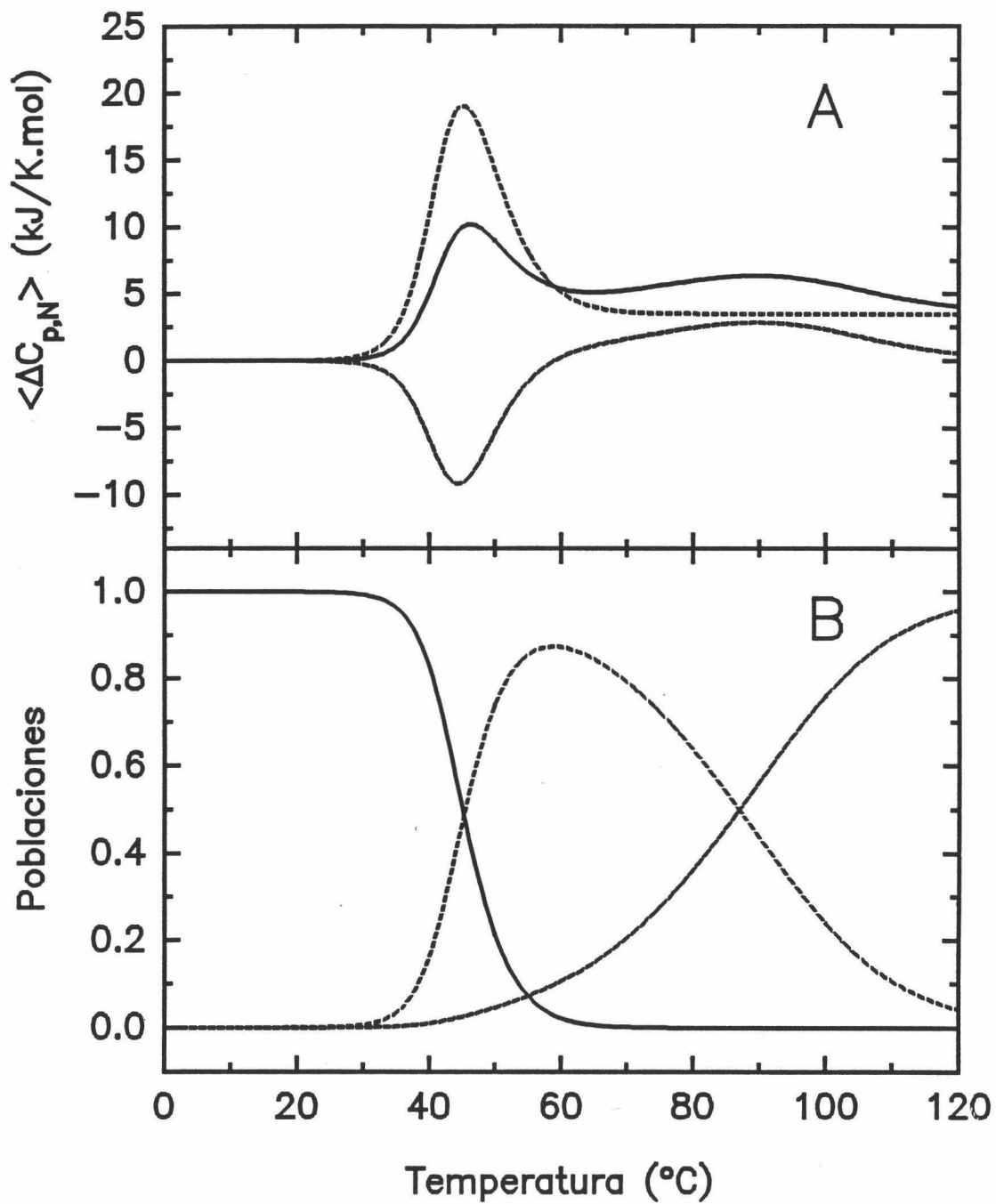


FIGURA 6-18: (A) Simulación del mejor ajuste de la función de $\Delta C_{p,N}(T)$ a pH 10.3 (—) representada junto con el término de desnaturalización (·····) y el de asociación-disociación (- - -). (B) Distribución de poblaciones de los estados N (—), I₂ (·····) y D (- - -) encontrada a partir del ajuste al modelo $N \rightleftharpoons 1/2 I_2 \rightleftharpoons D$.

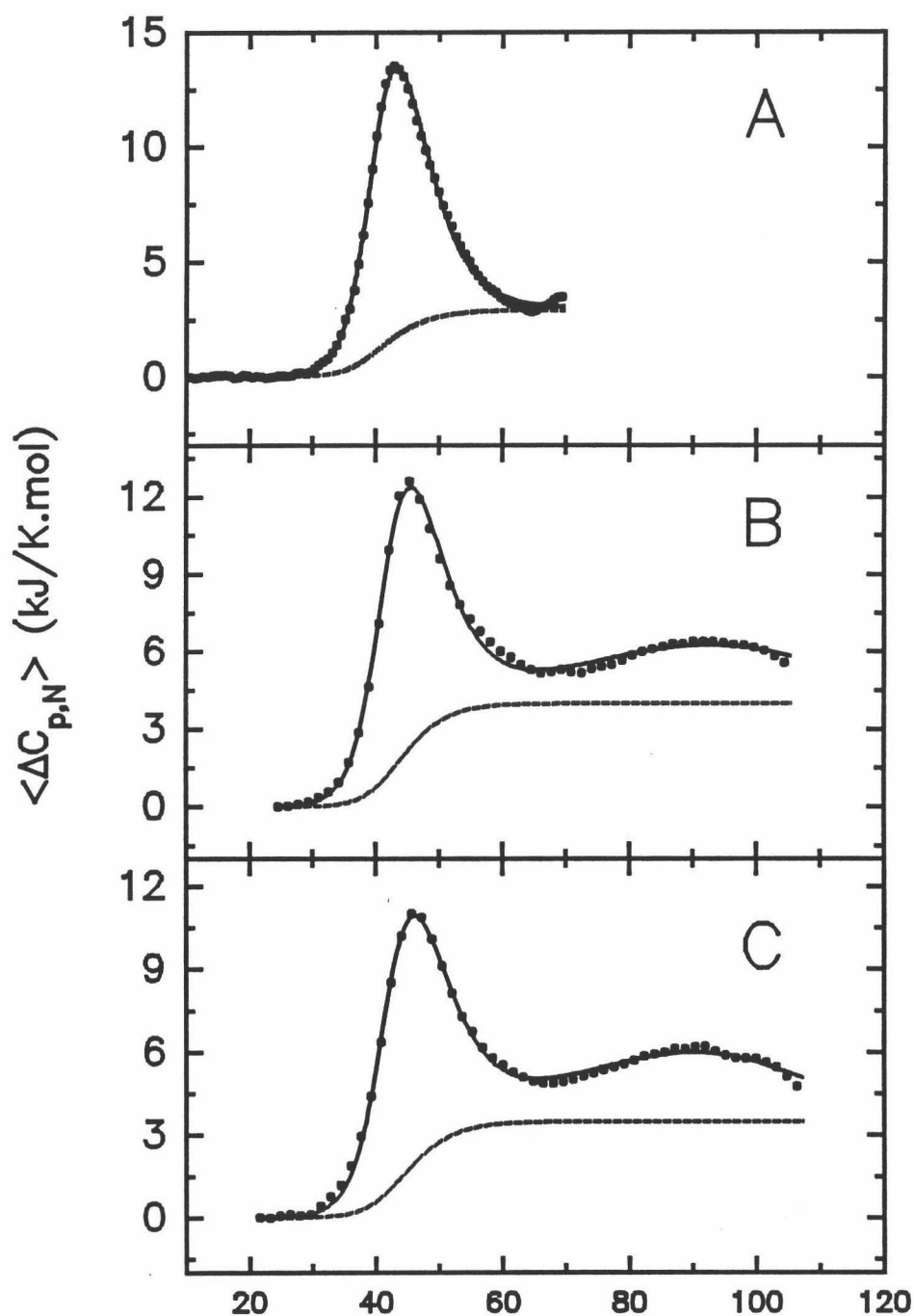


FIGURA 6-19: Análisis de datos a pH alcalino: (A) pH 9.5, (B) pH 10.0 y (C) pH 10.3 (los parámetros del ajuste están en la tabla 6-III). Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua el mejor ajuste según el modelo $N \rightleftharpoons 1/2 I_2 \rightleftharpoons D$. Con línea a trazos hemos representado la componente $\Delta C_{p,int}(T)$ calculada a partir del modelo suponiendo un $\Delta C_{p,a} = 0$.

6.3.- DISCUSION DE RESULTADOS

La CheY es una proteína perteneciente a la denominada clase α/β paralelas. Es un buen modelo para este tipo de plegamiento debido principalmente a la regularidad en la distribución de estructuras secundarias y a su pequeño tamaño. Nuestro propósito ha sido la caracterización termodinámica detallada de la desnaturalización de CheY de *E. coli*. Este trabajo se realizó en conjunto con el grupo del Dr. Luis Serrano (EMBL Heidelberg-Alemania) que se encargó de la purificación de las muestras y de completar el estudio haciendo uso de técnicas como dicroísmo circular, fluorescencia, cross-linking, etc. Aparte, también se realizó un estudio por $^1\text{H-RMN}$ en el Instituto de Estructura de la Materia (CSIC-Madrid). El conjunto de los datos se recogió en una publicación en *Biochemistry* (Filimonov et al., 1993).

Como ya comentamos, el máximo de estabilidad para CheY se encuentra en torno a pH 5.1. Esta proteína no posee ninguna His en su secuencia por lo que los únicos grupos que se pueden valorar a ese pH son los tres Asp del sitio activo. Estos restos se encuentran muy cercanos entre sí (ver Antecedentes Bibliográficos, Sección 1.4) por lo que existe un exceso de carga negativa en un espacio muy reducido, lo que puede elevar el pKa de al menos uno de los tres restos. Por debajo de pH 5.1 la proteína pierde estabilidad dramáticamente puesto que puede tener una gran carga positiva y los valores de pK de los grupos carboxilo en el estado nativo serían menores que en el estado desnaturalizado, con lo que la proteína desplegada podría unir protones con más afinidad que el estado nativo (Nozaki & Tanford, 1967).

Los espectros de dicroísmo circular a 25°C de CheY a pH 2.5 y 7.0 indican que la proteína se encuentra esencialmente en un estado nativo con un elevado contenido de estructuras secundarias y terciarias, aunque parecen existir algunos "arreglos" conformacionales detectados en el UV cercano. Las curvas de desnaturalización térmica a pH 2.5 seguidas por fluorescencia indican, igual que las de CDB, la presencia de dos transiciones conformacionales y cooperativas que coinciden en temperatura dentro del error. A pH 7.0 se observa una sola transición

que coincide con la primera a pH 2.5. Además, el análisis calorimétrico nos dice que a pH 2.5 tenemos un 10-20% de la proteína en un estado conformacional diferente al nativo (ver Figura 6-11).

El análisis termodinámico de la desnaturalización térmica reversible de la CheY es bastante complicado debido a la dependencia con la temperatura del proceso de formación de dímeros durante la desnaturalización (confirmado por los experimentos de cross-linking y de cromatografía de filtración comentados en Resultados). A pH ácido y alcalino esta dimerización es un proceso esencialmente reversible lo que permite hacer un análisis de equilibrio pero a pH 7.0 y baja fuerza iónica el proceso térmico es reversible siempre y cuando no calentemos por encima de 65°C, es decir, antes de la formación de agregados irreversibles. La formación de dímeros es un proceso exotérmico que se suma negativamente al proceso de desnaturalización térmica.

La ruta de desplegamiento partiría de un monómero nativo que antes de desnaturalizar pasaría por un intermediario de carácter dimérico. El análisis sólo presenta un estado intermedio significativamente poblado. En el intervalo entre 35-45°C el estado intermedio se estabiliza y es separado tanto del estado nativo como del desnaturalizado por un cambio de entalpía en torno a 150 kJ/mol. Es por este motivo por el que podemos ver dos transiciones claramente diferenciadas en los termogramas, siendo posible además realizar experimentos de cross-linking en este intervalo de temperaturas. La presencia de agentes desnaturalizantes como urea o GuHCl en disolución hace que la temperatura de asociación disminuya drásticamente, si bien sólo la GuHCl parece disminuir la entalpía de asociación del dímero.

En la tabla 6-IV hemos recogido los datos termodinámicos de temperatura del máximo de las transiciones a pH 2.5 y 7.0 medidos por diferentes técnicas. Hay que puntualizar que el segundo pico de los termogramas se corresponde con la disociación de los dímeros y sólo la CDB y fluorescencia poseen la suficiente sensibilidad para su detección. Su presencia en la curva analizada es necesaria para justificar los parámetros de asociación-disociación obtenidos del ajuste al modelo

TABLA 6-IV
COMPARACION DE LAS TEMPERATURAS DE DENATURALIZACION Y DE ASOCIACION OBTENIDAS POR DIFERENTES TECNICAS PARA CheY

METODO	T_m (°C) (pH 2.5)	T_a (°C) (pH 2.5)	T_m (°C) (pH 7.0- urea 2M)	T_a (°C) (pH 7.0- urea 2M)
CDB	39	62 ± 2	40	50 ± 5
Gel gradiente de urea	44 ± 4			
fluorescencia		61 ± 3		57 ± 5
CD	33 ± 4		38 ± 4	
cross-linking	45 ± 5		45 ± 5	

propuesto. A pH 7.0 los parámetros fueron calculados con bastante incertidumbre debido a la pérdida de la segunda transición. También hemos de puntualizar que la primera transición presenta una temperatura máxima experimental (T_m) que, en general, no coincide con T_U y dependiendo de las condiciones experimentales y de la magnitud de la constante de asociación se puede desplazar a temperaturas menores en varios grados.

Un aspecto muy interesante que se desprende del experimental realizado sería averiguar cuál es la naturaleza estructural del dímero. Generalmente, como hemos podido comprobar a lo largo de esta Memoria, los estudios de desnaturalización realizados con proteínas de 10-15 kDa o menores nos dicen que éstas se suelen comportar como sistemas de dos estados donde sólo se encuentran pobladas significativamente las conformaciones nativa y desnaturalizada. Sin embargo, en algunos casos se puede detectar, a condiciones concretas de pH, fuerza iónica, disolventes orgánicos, etc algún intermediario de equilibrio. Estos intermediarios también se pueden conseguir por modificación química de algunos grupos como las Cys (Ewbank & Creighton, 1991), eliminando algún grupo protético o un ligando (Denton et al., 1982; Ohgusi & Wada, 1983; Dolgikh et al.,

1984; 1985; Brahznikov et al., 1985; States et al., 1987; Kuwajima, 1986; Baker et al., 1992; Bismuto et al., 1992; Gottfried & Haas, 1992; Eder et al., 1993; Carra et al., 1994a; 1994b; 1994c; etc.). También suelen tener en común una serie de propiedades (Kuwajima, 1986) que en el caso del dímero formado en CheY a pH 2.5 serían las siguientes:

- 1) El espectro de fluorescencia del complejo medido a 45°C es muy similar al de la proteína nativa. La principal diferencia consiste en un desplazamiento de 2nm hacia el azul que indica que el Trp está menos expuesto al medio en este estado.
- 2) El análisis por CD en las mismas condiciones muestra que existe un alto contenido de estructuras secundarias pero casi nada de estructuras terciarias.
- 3) Los estudios de ¹H-RMN indican que la estructura del dímero tiene características intermedias entre el estado nativo y el desnaturalizado, ya que se observa una pérdida apreciable en la dispersión de picos en las regiones de resonancia de protones amida y metílicos, pero no tan fuerte como en urea 6M.
- 4) El ANS se une principalmente al estado dimérico, prueba evidente de que posee una conformación en "molten globule" (Semisotnov et al., 1991).

Los datos calorimétricos no son suficientes para elucidar la naturaleza estructural de estos dímeros y, por tanto, no podemos excluir la posibilidad de que no exista un cambio conformacional en la asociación-disociación de los dímeros a partir de un intermediario hipotético entre el estado plegado y el desplegado. En este caso, el efecto calorífico se debería únicamente a la formación del área de contacto a partir de los elementos ya existentes de estructura. Sin embargo, debemos destacar que las estructuras que participan en el contacto desnaturalizan cooperativamente a una temperatura relativamente alta con una entalpía que se corresponde con aproximadamente la mitad de la entalpía total de desplegamiento de la Ribonucleasa A a 45°C (Privalov & Khechinashvili, 1974). El valor de entalpía es bastante elevado, si tenemos en cuenta que la Ribonucleasa A tiene un peso molecular similar a la CheY y además una de las mayores entalpías específicas de

desnaturalización. Por consiguiente, juzgando únicamente a partir de los datos de calorimetría, parece ser que las dos transiciones observadas deben ir acompañadas de cambios conformacionales apreciables.

Aunque la mayoría de las pruebas estructurales se hicieron a pH ácido, a pH neutro la desnaturalización térmica de la CheY también parece pasar a través de la formación reversible del complejo I₂, que a este pH daría lugar a una formación irreversible de agregados si continuamos el calentamiento. En consecuencia, una vez que finaliza la transición principal la proteína pierde su estructura nativa pero aún mantiene un elevado contenido de estructuras secundarias (analizadas por CD). A pH alcalino la situación aparece bastante similar cualitativamente hablando a la de pH ácido, pero los dímeros son más estables. Por consiguiente, es razonable asumir que la naturaleza del estado I₂, formado por monómeros parcialmente desnaturalizados, puede ser muy similar en todo el intervalo de pH investigado y se correspondería con un dímero en estado de "molten globule". Esto estaría de acuerdo con la tendencia general de este estado a sufrir procesos de asociación (Kuwajima, 1986; Martínez et al., 1995).

La última cuestión que quedaría por discutir es si el intermediario detectado en la desnaturalización térmica es un paso obligatorio en la ruta de desplegamiento en CheY. El análisis cinético de su renaturalización (Muñoz et al., 1994) indica que existe un intermediario cinético de plegamiento debido a la isomerización *cis-trans* del resto de Pro110 aunque las constantes de velocidad son independientes de la concentración de proteína, indicando que la posible formación del dímero no limita la velocidad de reacción. Además, el análisis estructural de la proteína desnaturalizada con sus tres Pro en conformación nativa (dos en *trans* y una en *cis*) revela la existencia de un intermediario muy estable en la ruta de desnaturalización (Muñoz et al., 1994).

RESUMEN &
CONCLUSIONES



El Dominio SH3 de α -espectrina es una estructura compuesta únicamente por cadenas β y desnaturaliza a pH ácido según el modelo de dos estados. El proceso ocurre en todo momento en equilibrio, siendo completamente reversible a $\text{pH} < 4$. La energía de Gibbs de desplegamiento, $\Delta G_{N,D}$ a $\text{pH} 3.5$ y a 25°C es de 14 ± 2 kJ/mol, un valor relativamente bajo para una proteína, aunque no hay que olvidar que se trata en este caso de un dominio estructural.

Los valores de entalpía e incremento de capacidad calorífica específicos son normales para su tamaño y se correlacionan bastante bien con los de otras proteínas globulares pequeñas. Sin embargo, el análisis de datos ha sido complicado por el escaso valor absoluto del $\Delta H_{N,D}$, lo que se traduce en transiciones de desnaturalización anchas y pequeñas pues el desplegamiento ocurre en un amplio intervalo de temperatura. Se aplicó un método de ajuste considerando una variación no lineal con la temperatura para $\Delta C_{p,N,D}$.

No se ha detectado la aparición de ningún intermedio de desplegamiento en su desnaturalización bajo nuestras condiciones experimentales (pH ácido y baja fuerza iónica), donde en los otros casos descritos en esta Memoria aparecen especies de este tipo. En general, es una de las pocas proteínas conocidas que no presenta estados intermedios en su desplegamiento, conjuntamente con otras de pesos moleculares parecidos. Tanto esta conclusión como las referentes a las de otras proteínas estudiadas en esta Memoria, indican que el tamaño de la proteína está asociado a la aparición de dichos estados intermedios.

En el caso de Barnasa hemos caracterizado su estabilidad térmica en un amplio intervalo de pH (2.0-10.5). La desnaturalización es reversible a $\text{pH} \leq 5.0$ y $\text{pH} \geq 10.0$, produciéndose fenómenos de agregación en el resto de condiciones durante la desnaturalización. Se comprobó la ausencia de efectos de concentración, y la coincidencia de los valores de las entalpías calorimétrica y de van't Hoff nos llevó a la aplicación de un modelo de dos estados a las trazas calorimétricas. Los valores de $\Delta G_{N,D}$ y $\Delta C_{p,N,D}$ obtenidos se correlacionan bastante bien con los de otras proteínas globulares, mientras que $\Delta H_{N,D}$ y $\Delta S_{N,D}$ son sorprendentemente grandes.

También hemos descubierto que estos parámetros no siguen la tendencia general del resto de pequeñas proteínas globulares ni tampoco sus valores específicos, principalmente $\Delta H_{N,D,r}$. Estas discrepancias se han intentado explicar en base a datos estructurales.

La interacción Barnasa-3'GMP se ha estudiado por CDB aplicando formulismos teóricos ya descritos y otros originales en esta Memoria. En concreto, hemos descrito tres aproximaciones que sirven para describir estas interacciones sencillas. En este caso hemos obtenido unos valores para los parámetros de unión parecidos a los de otras interacciones proteína-nucleótido.

Para estudiar la desnaturalización térmica de Barstar ha sido necesario previamente la construcción y expresión de mutantes de sus restos Cys (en posiciones 40 y 82) por Ala y del de Pro48 por Ala y Leu. La desnaturalización de la especie salvaje es compleja e irreproducible. Estas complicaciones se han solucionado con los mutantes C40A, C82A y C40/82A. La desnaturalización térmica de los mutantes sigue un mecanismo básicamente de dos estados a pH neutro y básico, con unos parámetros termodinámicos de desplegamiento ligeramente menores a los de las correlaciones experimentales. Esto parece estar asociado con una excusa rigidez estructural de la proteína.

También hemos visto que a pH 2.5, donde la Barstar parece presentar una conformación tipo "molten globule", la proteína tiene una capacidad calorífica molar parcial intermedia entre los valores para los estados nativo y desnaturalizado. Además, hemos obtenido que este estado tiene una clara tendencia a la agregación. Su calor de formación a partir del estado nativo se ha estimado por cambio de pH en -145 ± 10 kJ/mol y parece ser un proceso totalmente reversible.

La Barstar es un inhibidor natural de Barnasa y forma con ella un fuerte complejo 1:1. Su pequeño tamaño nos ha permitido hacer su descripción por CDB a pH neutro y básico, haciendo uso de la metodología descrita en el caso del

sistema Barnasa-3'GMP para calcular los parámetros termodinámicos de la interacción. Las constantes de unión así obtenidas son similares a las encontradas por técnicas cinéticas. También hemos completado la descripción por CIT para ampliar el intervalo de temperatura de trabajo y definir mejor los valores de algunos parámetros como ΔH_d y $\Delta C_{p,d}$. Los resultados indican que existe una contribución entálpica favorable a la unión que es cuatro veces mayor que la entrópica a 25°C, lo que pone de manifiesto la importancia de las interacciones no hidrofóbicas en este caso concreto.

La CheY es una proteína representativa de estructuras α/β paralelas. Su caracterización termodinámica en un amplio intervalo de pH (2.5-10.3) no puede hacerse a partir del modelo de dos estados pues, aunque es un proceso netamente reversible, transcurre a través de un estado intermedio. Este estado está mayoritariamente poblado en un corto intervalo de temperatura y tiende, al menos, a dimerizar, presentando las características propias de un "molten globule". La entalpía de formación de este estado se ha estimado en -150 ± 20 kJ/mol y es comparable con el valor calculado para Barstar por cambio de pH a 25°C.





BIBLIOGRAFIA



- Alber, T., Dao-Pin, S., Wilson, K., Wozniak, J.A., Cook, S.P. & Matthews, B. (1987) *Nature* **330**, 41-46.
- Alexander, P., Fahnestock, S., Lee, T., Orban, J. & Bryan, P. (1992a) *Biochemistry* **31**, 3597.
- Alexander, P., Orban, J. & Bryan, P. (1992b) *Biochemistry* **31**, 7243.
- Ames, P., Chen, J., Wolff, C. & Parkinson, J.S. (1988) *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.* **53**, 59-65.
- Anfisen, C.B. & Scheraga, H.A. (1975) *Adv. Prot. Chem.* **29**, 205-300.
- Aphanasenko, G.A., Dudkin, S.M., Kaminiv, L.B., Leshchiukaya, I.B. & Severin, E.S. (1980) *FEBS Lett.* **97**, 77-80.
- Argos, P. (1988) *Protein Engng.* **2**, 101-103.
- Azuaga, A.I., Galisteo, M.L., Mayorga, O.L., Cortijo, M. & Mateo, P.L. (1992) *FEBS Lett.* **309**, 258-260.
- Baker, D., Sohl, J.L. & Agard, D.A. (1992) *Nature* **356**, 263.
- BAR-SAGI, D., ROTIN, D., BATZER, A., MANDIYAN, A. & SCHLESSINGER, J. (1993) *Cell* **74**, 83-91.
- Barlow, D.J. & Thornton, J.M. (1983) *J. Mol. Biol.* **168**, 867-885.
- Bartlett, P.A. & Marlowe, C.K. (1987) *Science* **235**, 569-571.
- Barón, C., González, J.F., Mateo, P.L. & Cortijo, M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12872-12878.
- Baudet, S. & Janin, J. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 123-132.
- Bismuto, E., Sirangelo, I. & Irace, G. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 624.
- BOOKER, G.W., GOUT, I., DOWNING, A.K., DRISCOLL, P.C., BOYD, J., WATERFIELD, M.D. & CAMPBELL, I.D. (1993) *Cell* **73**, 813-822.
- Borkovich, K.A., Kaplan, N., Hess, J.F. & Simon, M.I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1208-1212.
- Bourret, R.B., Drake, S.K., Chervitz, S.A., Simon, M.I. & Falke, J.J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13089-13096.
- Bourret, R.B., Hess, J.F. & Simon, M.I. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 41-45.
- Brandts, J.F. & Lin, L.N. (1990) *Biochemistry* **29**, 6927-6940.
- Brazhnikov, E.V., Chigadze, D.A., Dolgikh, D.A. & Ptitsyn, O.B. (1985) *Biopolymers* **24**, 1899.

- Briggs, M. & Roder, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2017.
- Buckle, A.M., Henrick, K. & Fersht, A.R. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 847-860.
- Buckle, A.M. & Fersht, A.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 1644-1653.
- Buckle, A.M., Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 8878-8889.
- BUDAY, L. & DOWNWARD, J. (1993) *Cell* **73**, 611-620.
- Bycroft, M., Sheppard, R.N., Lau, F.T.K. & Fersht, A.R. (1990) *Biochemistry* **29**, 7425-7432.
- Bycroft, M., Ludvigsen, S., Fersht, A.R. & Poulsen, F.M. (1991) *Biochemistry* **30**, 8697-8701.
- CANTLEY, L.C., AUGER, K.R., CARPENTER, C., DUCKWORTH, B., GRAZINI, A., KAPLER, R. & SOLTOFF, S. (1991) *Cell* **64**, 281-302.
- Carlisle, H.C., Palmer, R.A., Mazmudar, K.S., Gorinsky, B.A. & Yeates, D.G.R. (1974) *J. Mol. Biol.* **85**, 1-18.
- Carra, J.H., Anderson, E.A. & Privalov, P.L. (1994a) *Biochemistry* **33**, 10842-10850.
- Carra, J.H., Anderson, E.A. & Privalov, P.L. (1994b) *Prot. Sci.* **3**, 944-951.
- Carra, J.H., Anderson, E.A. & Privalov, P.L. (1994c) *Prot. Sci.* **3**, 952-959.
- Carter, P.J., Winter, G., Wilkinson, A.J. & Fersht, A.R. (1984) *Cell* **38**, 835-840.
- Chaffotte, A.F., Guillou, Y. & Goldberg, M.E. (1992) *Biochemistry* **31**, 9694-9702.
- CHARDIN, P., CAMONIS, J., GALE, W.L., VAN AELST, L., SCHLESSINGER, J., WIGLER, M.H. & BAR-SAGI, D. (1993) *Science* **260**, 1338-1343.
- CHANT, J., CORRADO, K., PRINGLE, J.R. & HERSKOWITZ, I. (1991) *Cell* **65**, 1213-1224.
- Chen, Y.W., Fersht, A.R. & Henrick, K. (1993) *Biochemistry* **234**, 1158-1170.
- CHENEVERT, J., CORRADO, K., BENDER, A., PRINGLE, J. & HERSKOWITZ, I. (1992) *Nature* **356**, 77-79.
- Chotia, C. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 537-572.
- Chotia, C. & Finkelstein, A.V. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 1007-1039.
- Christensen, H. & Pain, R.H. (1991) *Eur. Biophys. J.* **19**, 221-229.
- CICHETTI, P., MAYER, B.J., THIEL, G. & BALTIMORE, D. (1992) *Science* **257**, 803-806.
- CLARK, S.G., STERN, M.J. & HORVITZ, H.R. (1992) *Nature* **356**, 340-344.

- Clarke, J. & Fersht, A.R. (1993) *Biochemistry* **32**, 4322-4329.
- Conejero-Lara, F., Sánchez-Ruiz, J.M., Mateo, P.L., Burgos, F.J., Vendrell, J. & Avilés, F.X. (1991) *Eur. J. Biochem.* **200**, 663-670.
- COOPER, J.A. & HOWEL, B. (1993) *Cell* **73**, 1051-1054.
- COUGHLIN, S.R., ESCOBEDO, J.A. & WILLIAMS, L.T. (1989) *Science* **243**, 1191.
- Creighton, T.E. & Pain, R.H. (1980) *J. Mol. Biol.* **137**, 431-436.
- Damaschun, G., Germet, Ch., Damaschun, H., Bychkova, V.E. Ptitsyn, O.B. (1986) *Int. J. Biol. Macromol.* **8**, 226-230.
- Day, A.G., Parsonge, D., Ebel, S., Brown, T. & Fersht, A.R. (1992) *Biochemistry* **31**, 6390.
- DeCLUE, J., SADOWSKI, I., MARTIN, G.S. & PAWSON, T. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9064.
- Denton, J.B., Konishi, Y. & Scheraga, H. (1982) *Biochemistry* **21**, 5155.
- Dill, K.A. (1990) *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
- Dobson, C.M. (1991) *Curr. Op. Struct. Biol.* **1**, 22-27.
- Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Semisotnov, G.V., Venyaminov, S.Y. & Ptitsyn, O.B. (1981) *FEBS Lett.* **165**, 88-92.
- Dolgikh, D.A., Abaturon, L.V., Bolotina, I.A., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Bushuev, V.N., Gilmanshin, R.I., Lebedev, Y.O., Semisotnov, G.V., Tiktopulo, E.I. & Ptitsyn, O.B. (1984) *Eur. J. Biophys.* **13**, 109.
- Dolgikh, D.A., Kolomiets, A.P., Bolotina, I.A. & Ptitsyn, O.B. (1985) *FEBS Lett.* **165**, 88.
- Drake, S.K., Bourret, R.B., Luck, L.A., Simon, M.I. & Falke, J.J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13081-13088.
- DRUBIN, D.G., MILLER, K.G. & BOTSTEIN, D. (1988) *J. Cell. Biol.* **107**, 2551-2561.
- DRUBIN, D.G., MULHOLLAND, D., ZHU, Z. & BOTSTEIN, D. (1990) *Nature* **343**, 288-290.
- Dyson, H.J., Merutka, G., Waltho, J.P., Lerner, R.A. & Wright, P.E. (1992a) *J. Mol. Biol.* **226**, 795-817.
- Dyson, H.J., Sayre, J.R., Merutka, G., Shin, H.C., Lerner, R.A. & Wright, P.E. (1992b) *J. Mol. Biol.* **226**, 819-835.
- Dyson, H.J., Sayre, J.R., Merutka, G., Shin, H.C., Lerner, R.A. & Wright, P.E.

- Eder, J., Rheineker, M. & Fersht, A.R. (1993) *Biochemistry* **32**, 18.
- EGAN, S.E., GIDDINGS, B.W., BROOKS, M.W., BUDAY, L., SIZELAND, A.M. & WEINBERG, R.A. (1993) *Nature* **363**, 45-51.
- El Harrous, M. (1994) *Tesis Doctoral*. Granada.
- Elöve, G.A., Chaffotte, A.F., Roder, H. & Goldberg, M.E. (1992) *Biochemistry* **31**, 6876-6883.
- Eriksson, A.E., Baase, W.A., Zhang, X.J., Heinz, D.W., Blaber, M., Baldwin, E.P. & Matthews, B.W. (1992) *Science* **255**, 178-183.
- Evans, P.A., Kautz, R.A., Fox, R.O. & Dobson, C.M. (1989) *Biochemistry* **28**, 362-370.
- Ewbank, J.J. & Creighton, T.E. (1991) *Nature* **350**, 518-520.
- Fahnestock, S.R., Alexander, P., Nagle, J. & Filpula, D. (1986) *J. Bacteriol.* **167**, 870.
- Fersht, A.R. (1972) *J. Mol. Biol.* **64**, 497-509.
- Fersht, A.R., Schindler, J.S. & Tsui, W.C. (1980) *Biochemistry* **19**, 5520-5524.
- Fersht, A.R., Shi, J.P., Knill-Jones, J., Lowe, D.M., Wilkinson, A.J., Blow, D.M., Brick, P., Carter, P., Waye, M.M.Y. & Winter, G. (1985) *Nature* **314**, 235-238.
- Fersht, A.R. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 301-304.
- Fersht, A.R., Leatherbarrow, R.J. & Wells, T.N.C. (1987) *Biochemistry* **26**, 6030-6038.
- Fersht, A.R. (1988) *Biochemistry* **27**, 1577-1580.
- Fersht, A.R., Matouschek, A. & Serrano, L. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 771-782.
- Filimonov, V.V., Potekhin, S.A., Matveyev, S.V. & Privalov, P.L. (1982) *Mol. Biol. (USSR)* **16**, 435.
- Filimonov, V.V., Prieto, J., Martínez, J.C., Bruix, M., Mateo, P.L. & Serrano, L. (1993) *Biochemistry* **32**, 12906-12921.
- Flogel, M., Albert, A. & Biltonen, R.L. (1975) *Biochemistry* **14**, 2616-2621.
- Freire, E. & Biltonen, R.L. (1978) *Biopolymers* **17**, 463-479.
- Freire, E. (1994) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* ?????? IRENE.
- Freire, E. & Xie, D. (1994) IRENE (parametrización del MG).??
- FRY, M.J. (1992) *Curr. Biol.* **2**, 78-80.
- García-Fuentes, L. (1994) Tesis Doctoral. Dpto. Química Física. Almería.
- Gast, K., Zirwer, D., Welfle, H., Bychkova, V.E. & Ptitsyn, O.B. (1986) *Int. J.*

Biol. Macromol. **8**, 231-236.

- Go, M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1964-1968.
- Go, M. (1983) *Nature* **291**, 90-92.
- Gordon Beresford, R.M.H., Coulombeau, C. & Wodak, S.J. (1991) *J. Chim. Phys.* **88**, 2653-2658.
- Goto, Y., Takahashi, N. & Fink, A.L. (1990) *Biochemistry* **29**, 3480-3488.
- Gottfried, D.S. & Haas, E. (1992) *Biochemistry* **31**, 12353.
- Gray, T.E. & Fersht, A.R. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 1197-1207.
- Gray, T.E., Eder, J., Bycroft, M., Day, A.G. & Fersht, A.R. (1993) *EMBO J.* **12**, 4145-4150.
- Green, S.M., Meeker, A.K. & Shortle, D. (1992) *Biochemistry* **31**, 5717-5728.
- Griko, Y.V., Makhatadze, G.I., Privalov, P.L. & Hartley, R.W. (1994) *Protein Sci.* **3**, 669-676.
- Griko, Y.V., Privalov, P.L., Venyaminov, S.Y. & Kutysenko, V.P. (1988) *J. Mol. Biol.* **202**, 127.
- Gronenborn, A.M., Filpula, D.R., Essig, N.Z., Acahri, A., Whitlow, M., Wingfield, P.T. & Clore, G.M. (1991) *Science* **253**, 657.
- Guillet, V., Laphorn, A. & Mauguen, Y. (1993a) *FEBS Lett.* **330**, 137-140.
- Guillet, V., Laphorn, A., Hartley, R.W. & Mauguen, Y. (1993b) *Structure* **1**, 165.
- Guillet, V., Laphorn, A., Hartley, R.W. & Mauguen, Y. (1993c) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 165-177.
- Hartley, R.W. (1968) *Biochemistry* **7**, 2401-2408.
- Hartley, R.W. (1969) *Biochemistry* **8**, 2929-2932.
- Hartley, R.W. & Barker, E.A. (1972) *Nature New Biol.* **235**, 15-16.
- Hartley, R.W., Rogerson, D.L. & Smeaton, J.R. (1972) *Prep. Biochem.* **2**, 243-250.
- Hartley, R.W. & Smeaton, J.R. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 5624-5626.
- Hartley, R.W. (1975) *Biochemistry* **14**, 2367-2370.
- Hartley, R.W. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 3252-3254.
- Hartley, R.W. (1980) *J. Molec. Evol.* **15**, 355-358.
- Hartley, R.W. (1988) *J. Mol. Biol.* **202**, 913.
- Hartley, R.W. & Fitzgerald, P.C. (1988) *Proceedings of the First International Meeting on Structure and Chemistry of Ribonucleases*, Moscow 28 Nov.- 2 Dec.

1988, Karpeisky, M. & Saenger, W. Eds.

- Hartley, R.W. (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14**, 450-454.
- Hartley, R.W. (1993) *Biochemistry* **32**, 5978-5984.
- HASLAM, R.J., KOLDE, H.B. & HEMMING, B.A. (1993) *Nature* **363**, 309-310.
- Hayne, D.T. & Freire, E. (1993) *Proteins* **16**, 115-140.
- Hazelbauer, G.L., Park, C. & Nowlin, D.M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1448-1452.
- Herschlag, D. & Jencks, W.P. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1942-1950.
- Hess, J.F., Bourret, R.B. & Simon, M.I. (1988) *Nature* **336**, 139-143.
- Hess, J.F., Oosawa, K., Kaplan, N. & Simon, M.I. (1988) *Cell* **53**, 79-87.
- Hess, J.F., Bourret, R.B., Oosawa, K., Matsumura, P. & Simon, M.I. (1989) *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.* **53**, 41-48.
- Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, Tischenko, G., Polyakov, K. & Pavlovsky, S. (1983) *Trends Biochem. Sci.* **8**, 364-369.
- HIRAI, H. & VARMUS, H.E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8592.
- Horovitz, A. & Fersht, A.R. (1990) *J. Mol. Biol.* **214**, 613-617.
- Horovitz, A., Serrano, L., Avron, B., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1990) *J. Mol. Biol.* **216**, 1031-1044.
- Horovitz, A., Serrano, L. & Fersht, A.R. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 5-9.
- Horovitz, A., Matthews, J.M. & Fersht, A.R. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 560.
- Hu, C.Q., Sturtevant, J.M., Thompson, J.A., Erickson, R.E. & Pace, C.N. (1992) *Biochemistry* **31**, 4876-4882.
- Ikeguchi, M., Kuwajima, K., Mitani, M. & Sugai, S. (1988) *Biochemistry* **25**, 6956.
- Ikura, T., Go, N., Kohda, D., Inagaki, F., Yanagawa, H., Kawabata, M., Kawabata, S., Iwanaga, S., Noguti, T. & Go, M. (1993) *Proteins* **16**, 341-356.
- Jackson, S.E. & Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 10443.
- Jones, D.N.M., Bycroft, M., Lubienski, M.J. & Fersht, A.R. (1993) *FEBS Lett.* **331**, 165-172.
- KANNER, S.B., REYNOLDS, A.B., WANG, C.R., VINES, R.R. & PARSONS, J.T. (1991) *EMBO J.* **10**, 1689-1698.
- Kar, L., Matsumura, P. & Johnson, M.E. (1992a) *Biochem. J.* **287**, 521-531.

- Kar, L., de Croos, P.Z., Roman, S.J., Matsumura, P. & Johnson, M.E. (1992b) *Biochem. J.* **287**, 533-543.
- Kauzmann, W. (1959) *Adv. Prot. Chem.* **14**, 1-63.
- KAZLAUSKAS, A., ELLIS, C., PAWSON, T. & COOPER, J.A. (1990) *Science* **247**, 1578.
- KAZLAUSKAS, A. & COOPER, J.A. (1989) *Cell* **58**, 1121.
- Kellis, J.T.Jr., Nyberg, K., Sali, D. & Fersht, A.R. (1988) *Nature* **333**, 784-786.
- Kellis, J.T.Jr., Nyberg, K. & Fersht, A.R. (1989) *Biochemistry* **28**, 4914-4922.
- Khorazanizadeh, S., Peters, I.D., Butt, T.R. & Roder, H. (1993) *Biochemistry* **32**, 7054-7063.
- Khurana, R. & Udgaonkar, J.B. (1994) *Biochemistry* **33**, 106-115.
- Kim, P.S. & Baldwin, R.L. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 631-660.
- Kippen, A.D., Sancho, J. & Fersht, A.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 3778-3786.
- Klibanov, A.M. & Ahern, T.J. (1987) *Protein Engineering* (Oxender, D.L. & Fox, C.F., Eds.), pp. 213-218, Alan R. Liss, New York.
- KOCH, C.A., ANDERSON, D., MORAN, M.F., ELLIS, C. & PAWSON, T. (1991) *Science* **252**, 668-674.
- KOCH, C.A., MORAN, M., SADOWSKI, I. & PAWSON, T. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4131.
- KOHDA, D., HATANAKA, H., ODAKA, M. MANDIYAN, V., ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J. & INAGAKI, F. (1993) *Cell* **72**, 953-960.
- Koshland, D.E.Jr. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2286-2292.
- Koshland, D.E.Jr. (1988) *Biochemistry* **27**, 5829-5832.
- KOYAMA, S., YU, H., DALGARN, D.C., SHIN, T.B., ZYDOWSKY, L.D. & SCHREIBER, S.L. (1993a) *Cell* **72**, 945-952.
- KOYAMA, S., YU, H., DALGARN, D.C., SHIN, T.B., ZYDOWSKY, L.D. & SCHREIBER, S.L. (1993b) *FEBS Lett.* **324**, 93-98.
- KURIYAN, J. & COWBURN, D. (1993) *Curr. Op. Struct. Biol.* **3**, 828-837.
- Kuwajima, K. (1986) *Proteins* **6**, 87.
- Kuwajima, K., Sakuraoka, A., Fueki, S., Yoneyama, M. & Sugai, S. (1988) *Biochemistry* **27**, 7419.
- Lawrence, M.L. & Colman, P.M. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 946-950.
- Lee, F.S., Shapiro, R. & Vallee, B.L. (1989) *Biochemistry* **28**, 225-230.

- Lees, C.W. & Hartley, R.W. (1966) *Biochemistry* **9**, 3951.
- Lepock, J.R., Ritchie, K.P., Rodahl, A.M., Heinz, K.A. & Kruuv, J. (1992) *Biochemistry* **31**, 12706-12712.
- Levinthal, C. (1968) *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45.
- Lian, L.Y., Yang, J.C., Derrick, J.P., Sutcliffe, M.J., Roberts, G.C.K., Murphy, J.P., Goward, C.R. & Atkinson, T. (1991) *Biochemistry* **30**, 5335.
- LIU, X., MARENGERF, L.E.M., KOCH, C.A. & PAWSON, T. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5225-5232.
- Loewenthal, R., Sancho, J. & Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 6775-6779.
- Loewenthal, R., Sancho, J. & Fersht, A.R. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 759.
- LOWENSTEIN, E.J., DALY, R.J., BATZER, A.G., LI, W., MARGOLIS, B., LAMMERS, R., ULLRICH, A. & SCHLESSINGER, J. (1992) *Cell* **70**, 431-442.
- Lu, J. & Dahlquist, F.W. (1992) *Biochemistry* **31**, 4749.
- Lubienski, M.J., Bycroft, M., Jones, D.N.M. & Fersht, A.R. (1993) *FEBS Lett.* **332**, 81-87.
- Lubienski, M.J., Bycroft, M., Freund, S.M.V. & Fersht, A.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 8866-8877.
- Lukat, G.S., Stock, A.M. & Stock, J.B. (1990) *Biochemistry* **29**, 5436-5442.
- Lukat, G.S., Lee, B.H., Mottonen, J.M., Stock, A.M. & Stock, J.B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 8348-8354.
- Lupas, A.N. & Stock, J.B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17337-17342.
- Macnab, R.M. en *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* Vol.1 (ed. Neidhart, F.C. et al.) 732-759 (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, 1987).
- Makarov, A., Protasevish, I., Kuznetsova, N., Fedorov, B., Korolev, S., Struminskaya, N., Leshchinskaya, I., Yakovlev, G. & Esipova, N. (1992) en *Stability and Stabilization of Enzymes* (van den Tweel, W.J.J., Harder, A. & Buitelaar, R.M. Eds.), pp 377-382, Elsevier, The Netherlands.
- Makhatadze, G.I. & Privalov, P.L. (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 375-384.
- Makhatadze, G.I., Medvedkin, V.N. & Privalov, P.L. (1990) *Biopolymers* **30**, 1001-1010.
- Makhatadze, G.I. & Privalov, P.L. (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 491.
- Makhatadze, G.I. & Privalov, P.L. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 639-659.
- Mann, C.J. & Matthews, C.R. (1993) *Biochemistry* **32**, 5282.

- Marchesi, V.T. (1985) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1**, 531-561.
- Mariani, C., Gossele, V., De Beuckeleer, M., De Block, M., Goldberg, R.B., De Greef, W. & Leemans, J. (1992) *Nature* **357**, 384-387.
- MARGOLIS, B. et al., (1989) *Cell* **57**, 1101.
- Martensson, L.G., Jonsson, B.H., Andersson, M., Kihlgren, A., Bergenhem, N. & Carlsson, U. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1118**, 179-186.
- Martínez, J.C., El Harrou, M., Filimonov, V.V., Mateo, P.L. & Fersht, A.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 3919-3926.
- Mateo, P.L., González, J.F., Barón, C., Mayorga, O.L. & Cortijo, M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 17067-17072.
- Matouschek, A., Kellis, J.T.Jr., Serrano, L. & Fersht, A.R. (1989) *Nature* **340**, 122-126.
- Matouschek, A., Kellis, J.T.Jr., Serrano, L., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1990) *Nature* **346**, 440-445.
- Matouschek, A., Serrano, L. & Fersht, A.R. (1992a) *J. Mol. Biol.* **224**, 819-835.
- Matouschek, A., Serrano, L., Meiering, E.M., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1992b) *J. Mol. Biol.* **224**, 837-845.
- MATSUDA, M., MAYER, B.J., FUKUI, Y. & HANAFUSA, H. (1990) *Science* **248**, 1537-1539.
- Matsumura, M., Becktel, W.J. & Matthews, B.W. (1988) *Nature* **334**, 406-410.
- Mauguen, Y., Hartley, R.W., Dodson, E.J., Dodson, G.C., Bricogne, G., Chotia, C. & Jack, A. (1982) *Nature* **297**, 162-164.
- MAYER, B.J., REN, R., CLARK, K.L. & BALTIMORE, D. (1993) *Cell* **73**, 629-630.
- McPhalen, C.A. & James, M.N.G. (1987) *Biochemistry* **26**, 261.
- Meiering, E.M., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 11348-11356.
- Meiering, E.M., Serrano, L. & Fersht, A.R. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 585-589.
- Meiering, E.M., Bycroft, M., Lubienski, M.J. & Fersht, A.R. (1993) *Biochemistry* **32**, 10975-10987.
- Mitchinson, C. & Pain, R.H. (1985) *J. Mol. Biol.* **184**, 331-342.
- Mossakowska, D.E., Nyberg, K. & Fersht, A.R. (1989) *Biochemistry* **28**, 3843.
- MULCAHY, L.S., SMITH, R.M. & STACY, D.W. (1985) *Nature* **313**, 241-243.
- Muñoz, V., López, E.M., Jager, M. & Serrano, L. (1994) *Biochemistry* **33**, 5858-

5866.

- Murphy, K.P., Privalov, P.L. & Gill, S.J. (1990) *Science* **247**, 559-561.
- Murphy, K.P. & Freire, E. (1992) *Adv. Protein Chem.* **43**, 313-361.
- Murphy, K.P., Bhakuni, V., Xie, D. & Freire, E. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 293-306.
- Murphy, K.P., Xie, D., García, K.C., Amzel, L.M. & Freire, E. (1993) *Proteins* **15**, 113-120.
- MURPHY, S.M., BERGMAN, M. & MORGAN, D.O. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5290-5300.
- MUSACCHIO, A., GIBSON, T., LEHTO, V.P. & SARASTE, M. (1992a) *FEBS Lett.* **307**, 55-61.
- Musacchio, A., Noble, M.E.M., Pautit, R., Wierenga, R. & Saraste, M. (1992b) *Nature* **359**, 851.
- MUSACHIO, A., GIBSON, T., RICE, P., THOMPSON, J. & SARASTE, M. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 343-348.
- Nakai, K., Kidera, A. & Kanehisa, M. (1988) *Protein Eng.* **2**, 93-100.
- Nishimura, S. & Nomura, M. (1958) *Biochem. Biophys. Acta* **30**, 430.
- Noble, M.E.M., Musacchio, A., Saraste, M., Courtneidge, S. & Wierenga, R.K. (1993) *EMBO J.* **12**, 2617-2624.
- Noguti, T., Sakakibara, H. & Go, M. (1993) *Proteins* **16**, 357-363.
- Nozaki, Y. & Tanford, C. (1967) *Methods Enzymol.* **11**, 715.
- Ohgusi, M. & Wada, A. (1983) *FEBS Lett.* **164**, 21.
- Olieverg, M., Vuilleumier, S. & Fersht, A.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 8826-8832.
- Orban, J., Alexander, P. & Bryan, P. (1992) *Biochemistry* **31**, 3604.
- OVERDUIN, M., RIOS, C.B., MAYER, B.J. BALTIMORE, D. & COWBURN, D. (1992) *Cell* **70**, 697-704.
- Pace, C.N., Laurents, D.V. & Thompson, J.A. (1990) *Biochemistry* **29**, 2564.
- Pace, C.N., Laurents, D.V. & Erickson, R.E. (1992) *Biochemistry* **31**, 2728-2734.
- Paddon, C.J. & Hartley, R.W. (1987) *Gene* **53**, 11-19.
- Parkinson, J.S. (1993) *Cell* **73**, 857-871.
- Pavlovsky, A.G., Borisova, S.N., Strokopytov, B.V., Sanishvili, R.G., Vagin, A.A. & Chepurina, N.K. (1988) en "*Metabolism and Enzymology of Nucleic Acids Including Gene Manipulations*", pp.217-221, Plenum Press, New York.

- PAWSON, T. & BERNSTEIN, A. (1990) *Trends Genet.* **6**, 350-356.
- PAWSON, T. (1992) *Curr. Op. Struc. Biol.* **2**, 432-437.
- PAWSON, T. (1988) *Oncogene* **3**, 491.
- Pfeil, W. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **911**, 114-116.
- Privalov, P.L. & Khechinashvili, N.N. (1974) *J. Mol. Biol.* **86**, 665.
- Privalov, P.L. (1979) *Adv. Protein Chem.* **33**, 167-241.
- Privalov, P.L. & Potekhin, S.A. (1986) in *Methods in Enzymology* **131**, 4-51.
- Privalov, P.L. (1989) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 47-69.
- Privalov, P.L., Tiktopoulo, E.I., Venyaminov, S.I., Griko, Y.V., Makhatadze, G.I. & Khechinashvili, N.N. (1989) *J. Mol. Biol.* **205**, 737-750.
- Privalov, P.L. & Makhatadze, G.I. (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 385-391.
- Privalov, P.L. & Gill, S.J. (1988) *Adv. Protein Chem.* **39**, 191.
- Privalov, P.L. & Makhatadze, G.I. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 660-679.
- Ptitsyn, O.B. (1987) *J. Protein Chem.* **6**, 273-293.
- Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zerovnik, E. & Razgulyaev, D.I. (1990) *FEBS Lett.* **262**, 20-24.
- Radford, S.E., Dobson, C.M. & Evans, P.A. (1992) *Nature* **358**, 302-307.
- REN, R., MAYER, B.J., CICHETTI, P. & BALTIMORE, D. (1993) *Science* **259**, 1157-1161.
- Richards, F.M. & Wychoff, H.W. (1971) *Enzymes*, 647-806.
- Richardson, J. (1981) *Adv. Prot. Chem.* **34**, 167-339).
- Robert, C.H., Gill, S.J. & Wyman, J. (1988) *Biochemistry* **27**, 6829-6835.
- Robson, B. & Pain, R.H. (1976) *Biochem. J.* **155**, 331-344.
- RODAWAY, A.R., STERNBERG, M.J. & BENTLEY, D.L. (1989) *Nature* **342**, 624.
- Rose, G.D., Geselowitz, A.R., Lesser, G.J., Lee, R.H. & Zehfus, M. (1985) *Science* **229**, 834-838.
- Rushizky, G.W., Greco, A.E., Hartley, R.W. & Sober, H. (1963) *Biochemistry* **2**, 787-793.
- SADOWSKI, I., STONE, J.C. & PAWSON, T. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4396.
- SAHR, K.E., LAURILA, P., KOTULA, L., SCARPA, A.L., COUPAL, E., LETO, T.L., LINNENBACH, A.J., WINKELMANN, J.C., SPEICHER, D.W., MARCHESI, V.T., CURTIS, P.J. & FORGET, B.G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4434-4443.
- Sali, D., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1988a) *Nature* **335**, 563-567.

- Sali, D., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1988b) *Nature* **335**, 496-500.
- Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M. & Mateo, P.L (1988) *Biochemistry* **27**, 1648-1652.
- Sánchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.* **61**, 921-935.
- Sancho, J. & Fersht, A.R. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 741-747.
- Sancho, J., Meiering, E.M. & Fersht, A.R. (1991) *J. Mol. Biol.* **221**, 1007-1014.
- Sancho, J., Serrano, L. & Fersht, A.R. (1992a) *Biochemistry* **31**, 2253.
- Sancho, J., Neira, J.L. & Fersht, A.R. (1992b) *J. Mol. Biol.* **224**, 749-758.
- Sandberg, W.S. & Terwilliger, T.C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1706-1710.
- Sanders, D.A., Gillece-Castro, B.L., Stock, A.M., Burlingame, A.L. & Koshland, D.E.Jr. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 21770-21778.
- Sanz, J.M. & Fersht, A.R. (1993) *Biochemistry* **32**, 13584-13592.
- Sanz, J.M., Johnson, C.M. & Fersht, A.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 11189-11199.
- Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1993a) *Biochemistry* **32**, 5145-5150.
- Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1993b) *Biochemistry* **32**, 11195-11203.
- Schreiber, G., Buckle, A.M. & Fersht, A.R. (1994) *Structure* **2**, 945-951.
- SEIDEL-DUGAN, C., MEYER, B.E., THOMAS, S.M. & BRUGGE, J.S. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1835-1845.
- Segawa, S., Fukuno, T., Fujiwara, K. & Noda, Y. (1991) *Biopolymers* **31**, 497-509.
- Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F. & Gilmanshin, R.I. (1991) *Biopolymers* **31**, 119.
- Serrano, L. & Avila, J. (1985) *Biochem. J.* **230**, 551.
- Serrano, L. & Fersht, A.R. (1989) *Nature* **342**, 296-299.
- Serrano, L., Horovitz, A., Avron, B., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1990) *Biochemistry* **29**, 9343-9352.
- Serrano, L., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1991) *J. Mol. Biol.* **218**, 465-475.
- Serrano, L., Sancho, J., Hirshberg, M. & Fersht, A.R. (1992a) *J. Mol. Biol.* **227**, 544.
- Serrano, L., Neira, J.L., Sancho, J. & Fersht, A.R. (1992b) *Nature* **356**, 453-455.
- Serrano, L., Kellis, J.T.Jr., Cann, P., Matouschek, A. & Fersht, A.R. (1992c) *J.*

Mol. Biol. **224**, 783-804.

- Serrano, L., Matouschek, A. & Fersht, A.R. (1992d) *J. Mol. Biol.* **224**, 805-818.
- Serrano, L., Matouschek, A. & Fersht, A.R. (1992e) *J. Mol. Biol.* **224**, 847-859.
- Sevcik, J., Sanishvili, R.G., Pavlovsky, A.G. & Polyakov, K.M. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 158-162.
- Sevcick, J., Dodson, E.J. & Dodson, G.G. (1991) *Acta Crystallogr. B* **47**, 24-253.
- Shastry, M.C.R., Agashe, V.R. & Ugdanekar, J.B. (1994) *Protein Sci.* **3**, 1409-1417.
- Shimada, I. & Inagaki, F. (1990) *Biochemistry* **29**, 757-764.
- Shirley, B.A., Stanssens, P., Hahn, U. & Pace, C.N. (1992) *Biochemistry* **31**, 725-732.
- Shortle, D. & Meeker, A.K. (1986) *Proteins* **1**, 81-89.
- Shortle, D., Stites, W. & Meeker, A.K. (1990) *Biochemistry* **29**, 8033-8041.
- Shrake, A. & Ross, P.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5055-5059.
- Shrake, A. & Ross, P.D. (1992) *Biopolymers* **32**, 925-940.
- Simms, S.A., Keane, M.G. & Stock, J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10161-10168.
- Smeaton, J.R. & Elliot, W.H. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 547-560.
- SMITH, M.R., DeGUDICIBUS, S.J. & STACEY, D. (1986) *Nature* **320**, 540-543.
- Speicher, D.W. (1986) *J. Cell. Biochem.* **30**, 245-258.
- Spolar, R.S., Livingstone, J.R. & Record, M.T.Jr. (1992) *Biochemistry* **31**, 3947-3955.
- Springer, M.S., Goy, M.F. & Adler, J. (1979) *Nature* **280**, 279-284.
- STAHL, M.L., FERENZ, C.R., KELLEHER, K.L., KRIZ, R.W. & KNOPF, J.L. (1988) *Nature* **332**, 269.
- States, D.J., Dobson, C.M., Karplus, M. & Creighton, E. (1987) *J. Mol. Biol.* **195**, 731.
- Stewart, R.C. & Dahlquist, F.W. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 5728-5738.
- Stewart, D.E., Sarkar, A. & Wampler, J.E. (1990) *J. Mol. Biol.* **214**, 253-260.
- Stock, A.M., Koshland, D.E.Jr. & Stock, J.B. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7989-7993.
- Stock, J. & Stock, A. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 371-375.
- Stock, A., Mottonen, J., Chen, T. & Stock, J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 535-

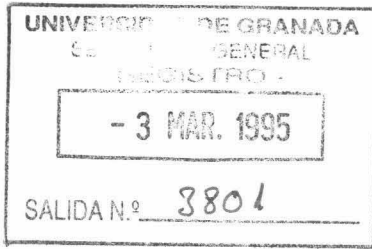
537.

- Stock, A.M., Mottonen, J.M., Stock, J.B. & Schutt, C.E. (1989) *Nature* **337**, 745-749.
- Stock, A.M. et al. (1988) *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.* **53**, 49-57.
- Stock, A.M., Martínez-Hackett, E., Rasmussen, B.F., West, A.H., Stock, J.B., Ringe, D. & Petsko, G.A. (1993) *Biochemistry* **32**, 13375-13380.
- Stock, J.B., Stock, A.M. & Mottonen, J.M. (1990) *Nature* **344**, 395-400.
- Stock, J.B., Surette, M.G., McCleary, W.R. & Stock, A.M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19753-19756.
- Straume, M. & Freire, E. (1992) *Anal. Biochem.* **203**, 259-268.
- Straus, D. & Gilbert, W. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3497-3506.
- Street, I.P., Armstrong, C.R. & Withers, S.G. (1986) *Biochemistry* **25**, 6021-6027.
- Sturtevant, J.M. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2236-2240.
- SUH, P.G., RYN, S.H., MOON, K.H., SUH, H.W. & RHEE, S.G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5419.
- Takahashi, K. (1976) *J. Biochem. Tokyo* **80**, 1267-1275.
- Takahashi, K. & Sturtevant, J.M. (1981) *Biochemistry* **20**, 6185-6190.
- Thomas, R.M., Feeney, J., Nicholson, R.B., Pain, R.H. & Roberts, G.C.K. (1983) *Biochem. J.* **215**, 525-529.
- Thompson, K., Vinson, C. & Freire, E. (1993) *Biochemistry* **32**, 5491-5496.
- Thunnissen, M.M.G.M., Franken, P.A., de Haas, G.H., Drenth, J., Kalk, K.H., Verheij, H.M. & Dijkstra, B.W. (1992) *Protein Eng.* **5**, 597-603.
- TRAHEY, M. et al. (1988) *Science* **242**, 1967.
- ULLRICH, A. & SCHLESSINGER, J. (1990) *J. Cell* **61**, 203-212.
- Udgaonkar, J.B. & Baldwin, R.L. (1988) *Nature* **335**, 694.
- Varley, P., Gronenborn, A.M., Christense, H., Wingfield, P.T., Pain, R.H. & Clore, G.M. (1992) *Science* **260**, 1110.
- Venkatachalam, C.M. (1968) *Biopolymers* **6**, 1425-1436.
- Viguera, A.R., Martínez, J.C., Filimónov, V.V., Mateo, P.L. & Serrano, L. (1994) *Biochemistry* **33**, 2142-2150.
- VOGEL et al. (1988) *Nature* **335**, 90.
- Voltz, K. & Matusumura, P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15511-15519.

- Voltz, K. (1993) *Biochemistry* **32**, 11741-11753.
- Vuilleumier, S., Sancho, J., Loewenthal, R. & Fersht, A.R. (1993) *Biochemistry* **32**, 10303-10313.
- WAKSMAN, G., KOMINOS, D., ROBERTSON, S.C., PALIN, N., BALTIMORE, D., BIRGE, R.B., COWBURN, D., HANAFUSA, H., MAYER, B.J., OVERDUIN, M., RESH, M.D., RIOS, C.B., SILVERMAN, L. & KURIYAN, J. (1992) *Nature* **358**, 646-653.
- WANG, C.R. & PARSONS, J.T. (1989) *J. Virol.* **63**, 291.
- WASENIUS, V.M., SARASTE, M., SALVEN, P., ERÄMAA, M., HOLM, L. & LEHTO, V.P. (1989) *J. Cell. Biol.* **108**, 79-93.
- Wells, T.N.C. & Fersht, A.R. (1986) *Biochemistry* **25**, 1881-1886.
- Wiesinger, H. & Hinz, H.J. (1986) in *Thermodynamic data for Biochemistry and Biotechnology* (Hinz, H.J. Ed) pp. 221-226, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Wilmot, C.M. & Thornton, J.M. (1988) *J. Mol. Biol.* **203**, 221-232.
- Winter, G., Fersht, A.R., Wilkinson, A.J., Zoller, M. & Smith, M. (1982) *Nature* **299**, 756-758.
- Wolfe, A.J., Conley, M.P., Kramer, T.J. & Berg, H.C. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 1878-1885.
- Wood, R.H. & Thompson, P.T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 946-949.
- Wright, P.E., Dyson, H.J. & Lerner, R.A. (1988) *Biochemistry* **27**, 7167-7175.
- WU, H. & PARSONS, J.T. (1993) *J. Cell. Biol.* **120**, 1417-1426.
- Xie, D., Bhakuni, V. & Freire, E. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 5-8.
- Yoshida, N., Sasaki, A., Rashid, M.A. & Otsuka, M. (1976) *FEBS Lett.* **64**, 122-125.
- Yu, H., Rosen, M.K., Shin, T.B., Seidel-Dugan, C., Brugge, J.S. & Schreiber, S.L. (1992) *Science* **258**, 1665-1668.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. & Schreiber, S.L. (1994) *Cell* **76**, 933-945.
- Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T. & Sugino, Y. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4441.



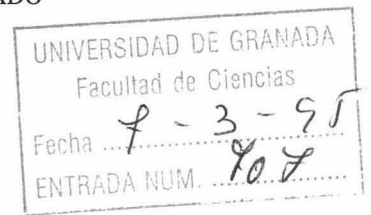
UNIVERSIDAD DE GRANADA



Fecha: veinticuatro de Febrero de 1995
Su Ref^a.
Nuestra Ref^a.
Fecha de Salida:
Unidad de Origen: COMISIÓN DE DOCTORADO

Destinatario:

Ilmo. Sr. Decano
FACULTAD DE CIENCIAS
GRANADA



En cumplimiento del artículo 32 de las Normas Regulatoras de los estudios de Tercer Ciclo de esta Universidad, adjunto se remite un ejemplar de la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando D. JOSE CRISTOBAL MARTINEZ HERRERIAS titulada ESTUDIO DE LA DESNATURALIZACION TERMICA E INTERACCION CON LIGANDOS DE PROTEINAS DE BAJO PESO MOLECULAR y dirigida por el Profeso/es Dr/es PEDRO L. MATEO ALARCON Y VLADIMIR V. FILIMONOV con objeto de mantenerla depositada desde el día veinticuatro de Febrero de 1995 hasta el día uno de Abril de 1995 para que pueda ser examinada por cualquier Doctor que así lo desee.

Granada a veinticuatro de Febrero de 1995.

EL PRESIDENTE DE LA COMISION
DE DOCTORADO,



[Handwritten signature]



JUAN CAMPOS FERNANDEZ
Vicerrector de Enseñanzas Propias
y Postgrado