

~~T. Prov. 24/120~~
T 7 M6

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 27/10/00
ENTRADA NUM. 3647

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

**ESTUDIO TERMODINÁMICO DE PROTEÍNAS
GLOBULARES DE DISEÑO Y SU INTERACCIÓN
CON INHIBIDORES**

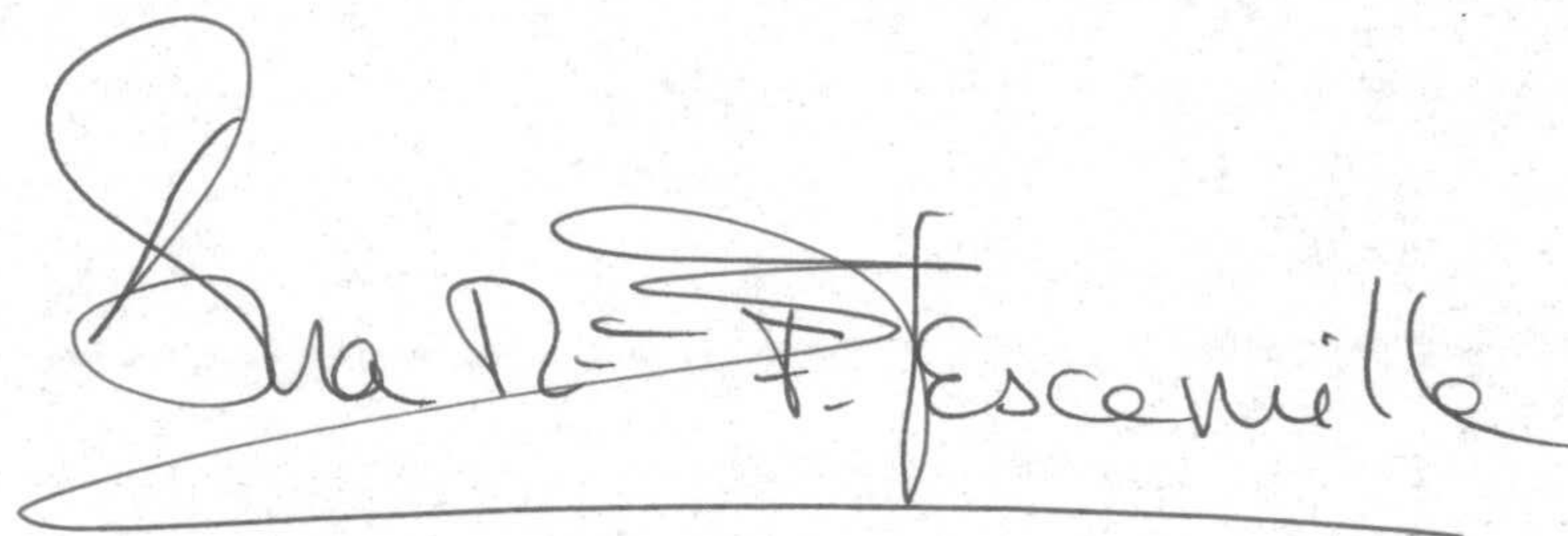
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 61377632
N.º Copia 115869702

Ana M^a Fernández Escamilla

Tesis Doctoral
GRANADA
2000

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

**Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Ciencias Químicas**

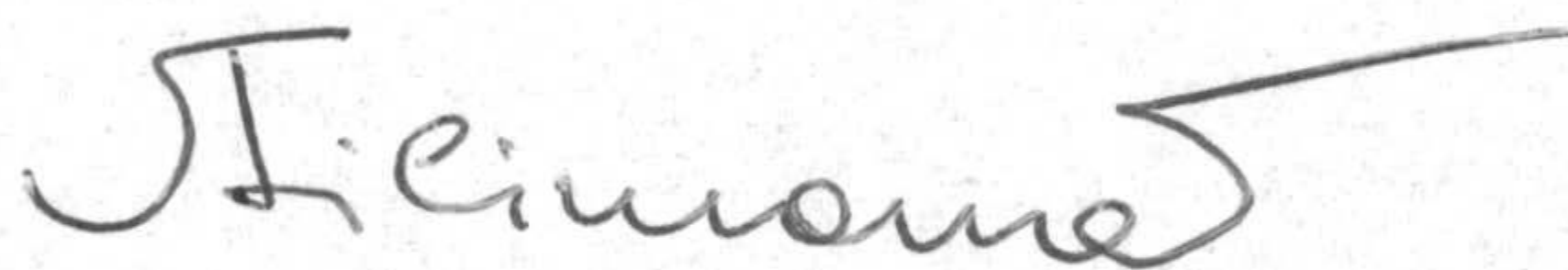


Fdo: Ana M^a Fernández Escamilla


Licenciada en Ciencias Químicas por
la Universidad de Granada

Visado en Granada, a 17 de octubre de 2000

V^oB^o
DIRECTORES DE LA TESIS



Fdo: Vladimir V. Filimonov
Profesor de investigación del
Instituto para la Investigación de
Proteínas de la Academia de
Ciencias Rusa. Profesor invitado
por la Universidad de Granada.



Fdo: Obdulio López Mayorga
Catedrático de Química Física
de la Universidad de Granada

ÍNDICE

1.- Introducción	1
2.- Materiales y métodos	9
2.1.- Materiales	11
2.1.1.- Sistemas biológicos	11
2.1.2 .- Productos	11
2.1.3 .- Instrumentación	14
2.2.- Métodos	15
2.2.1.- Preparación de las muestras	15
2.2.1.1.- Transformación, expresión y purificación de la Triosa Fosfato Isomerasa en su estado natural	15
2.2.1.2.- Purificación de Quitinasas A y B	20
2.2.1.3.- Tratamiento previo de las muestras	22
2.2.2.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	23
2.2.2.1.- Introducción	23
2.2.2.2 .- Instrumentación	24
2.2.2.3.- Realización del experimento en DSC	32
A. Preparación del experimento.	
B. Determinación de la línea base instrumental.	
C. Calibración eléctrica.	
D. Termograma de muestra.	
E. Segundo termograma de la muestra.	
2.2.2.4.- Análisis de los datos de DSC según la termodinámica de equilibrio	37
2.2.2.4.1.- Preprocesamiento de los termogramas	37
A. Resta de la línea base instrumental.	
B. Conversión de unidades.	
2.2.2.4.2.- Modelo de dos estados	40

2.2.2.4.3.- Algoritmos de ajuste de las curvas calorimétricas	45
2.2.3.- Calorimetría Isotérmica de Titulación	50
2.2.3.1.- Introducción	50
2.2.3.2.- Instrumentación	51
2.2.3.3.- Formulación y análisis del experimento de calorimetría isotérmica de titulación	57
2.2.4.- Dicroísmo Circular	63
2.2.4.1.- Introducción	63
2.2.4.2.- Instrumentación	65
2.2.4.3.- Experimento de dicroísmo circular	66
2.2.4.- Procesamiento de los experimentos realizados a temperatura constante	67
3.- Análisis Termodinámico de la estabilidad de la estructura de la proteína represora Cro del fago 434	69
3.1.- Antecedentes Bibliográficos	71
3.2.- Estudio del desplegamiento térmico de 434 Cro por medio de calorimetría diferencial de barrido	75
3.2.1.- Procedimiento experimental	75
3.2.2.- Resultados experimentales	75
3.2.2.1.- Descripción del formalismo matemático utilizado para el ajuste al modelo de dos estados	81
3.2.2.2.- Análisis de la dependencia del pH con la T_m	86
3.3.- Estudio del desplegamiento ácido de 434 Cro por medio de calorimetría isotérmica de titulación	88
3.3.1.- Procedimiento experimental	88
3.3.2.- Análisis de las curvas isotérmicas	91
3.4.- Discusión	93

3.4.1.- Comparación de las estabilidades de 434 Cro con el dominio N-terminal de la proteína represora del fago 434 (R1-69) y el represor del fago λ (λ_{6-85})	94
4.- Análisis termodinámico de los efectos del diseño de hélices en el dominio de activación de la procarboxipeptidasa A2 humana	99
4.1.- Antecedentes bibliográficos	101
4.2.- Estudio del desplegamiento térmico de ADA-2h por medio de calorimetría diferencial de barrido	108
4.2.1.- Procedimiento experimental	108
4.3.- Resultados experimentales	108
4.3.1.- Estudio a pH neutro y alcalino	108
4.3.2.- Desnaturalización a pH ácido	116
4.4.- Discusión	126
5.- Análisis termodinámico de estabilidad y unión con ligandos de TIM y Quitinasas.....	133
5.1.- Análisis termodinámico de Quitinasas A y B	137
5.1.1.- Antecedentes bibliográficos	137
5.1.2.- Estudio del desplegamiento térmico por DSC de Quitinasas A y B.....	144
5.1.2.1.- Procedimiento experimental	144
5.1.2.2.- Resultados experimentales	145
A. Quitinasa A y Quitinasa B.	
B. Fragmento tipo Fibronectina III (Fbn III) de Quitinasa A.	
5.1.3.- Proteolisis limitada	150
A. Proteolisis limitada realizada con Papaina.	
B. Proteolisis limitada realizada con Tripsina.	
5.1.4.- Discusión	154

6.- Estudio de unión del ligando PGA a Triosafosfato isomerasa y su mutante mediante calorimetría isotérmica de titulación	157
6.1.- Anecedentes bibliográficos	159
6.2.- Procedimiento experimental	165
6.3.- Análisis microcalorimétrico de la unión del ácido fosfoglicólico, PGA, a Triosafosfato isomerasa natural (TIM)	167
6.4.- Análisis microcalorimétrico de la unión del ácido fosfoglicólico, PGA, a la variante monomérica de la Triosafosfato isomerasa MSS-TIM	169
6.5.- Discusión	195
7.- Conclusiones.....	195
8.- Bibliografía	201

ABREVIATURAS

Abreviaturas por orden de aparición en el texto

DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ITC	Calorimetría isotérmica de titulación
ADA-2h	Dominio de activación de la Procarboxipeptidasa A2 humana
434 Cro	Proteína represora del fago 434
TIM	Triosafosfato isomerasa
PGA	Ácido fosfoglicólico
ADA-2h M1	Variante de ADA-2h sobre la que se han mutado restos en su hélice α 1
ADA-2h M2	Variante de ADA-2h sobre la que se han mutado restos en su hélice α 2
ADA-2h DM	Variante de ADA-2h sobre la que se han mutado restos en su hélice α 1 y α 2.
MSS-TIM	Variante monomérica de la Triosafosfato isomerasa
Chi-A	Quitinasa A
Chi-B	Quitinasa B
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
EDTA	Sal disódica del ácido etiléndiamino tetracético
Pipes	Sal dipotásica del ácido piperazina-N-N'- bis [2-etanosulfónico]
TEA	Trietanoamina
MES	Sal disódica del ácido 2-N-morfolinil etil sulfónico
U	orbitales / min
DTT	Ditio tretiol
FI	Fase insoluble
FS	Fase soluble
SN	Sobrenadante
ΔH	Incremento de entalpía
ΔS	Incremento de entropía
ΔC_p	Incremento de la capacidad calorífica a presión constante
m	Célula de muestra
r	Célula de referencia
M	muestra o macromolécula
B	Tampón
RCE	Resistencia de la coraza externa
RCI	Resistencia de la coraza interna
CI	Coraza Interna
CE	Coraza externa
Rm	Resistencia de la célula de muestra
Rr	Resistencia de la célula de referencia
A	Amplificador
VP-DSC	Calorímetro diferencial de barrido diseñado por Valery Plótnikov
$C_{p,ap}$	Capacidad calorífica aparente de la

f	proteína
k	factor de conversión
$C_{p,N}$	Constante de calibración (mV/ μ W)
$C_{p,D}$	Capacidad calorífica del estado nativo
T_m	Capacidad calorífica del estado desplegado
$\Delta C_{p,ap}$	Temperatura correspondiente al máximo de la transición calorimétrica
m_p	Incremento de la capacidad calorífica aparente
$C_{p,s}$	masa de proteína en la célula (g)
Δm_s	Capacidad calorífica parcial aparente del disolvente
V_p	Cantidad de disolvente desplazado por la proteína en la disolución
V_s	Volumen parcial de la proteína
M	Volumen parcial del disolvente
K_D	Peso molecular de la proteína
f_D	Constante de equilibrio de desplegamiento
f_N	Fracción molar de proteína en estado desnaturalizado
$[N]$	Fracción molar de proteína en el estado nativo
$[D]$	Concentración de macromolécula en estado nativo (M)
H_D	Concentración de macromolécula en el estado desplegado (M)
H_N	Entalpía del estado desnaturalizado
ΔH_D	Entalpía del estado nativo
$\Delta C_{p,D}$	Incremento de la entalpía al pasar de estado nativo a desnaturalizado
$\Delta C_{p,exc}$	Incremento de la capacidad calorífica por desplegamiento de la proteína
$\Delta C_{p,int}$	Incremento de la capacidad calorífica de exceso
$C_{p,int}$	Incremento de la capacidad calorífica interna
f_i	Capacidad calorífica interna a presión constante
ΔH_t	Fracción de proteína presente en el estado i
$\Delta H_{N,D}^{vH}$	Incremento de la entalpía total
C_P^m	Incremento de la entalpía de van't Hoff
$\Delta H_{N,D}^{cal}$	Capacidad calorífica determinada a temperatura T_m
ΔH_m o $\Delta H_{D,m}$	Incremento de entalpía calculada
ΔG_D	Incremento de la entalpía determinada a temperatura T_m
ΔS_D	Incremento de la energía de Gibbs de desplegamiento
$a_{N,r}$	Incremento de la entropía de desplegamiento
$a_{D,r}$	Ordenada en el origen para $C_{p,N}$
	Ordenada en el origen para $C_{p,D}$

$b_{N,r}$	Pendiente para $C_{p,N}$
$b_{D,r}$	Pendiente para $C_{p,D}$
Δb_m	Incremento de las pendientes de $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ determinadas a temperatura T_m
Δa_m	Incremento de las ordenadas en el origen de $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ determinadas a temperatura T_m
T_h	Temperatura a la cual la entalpía se hace igual a cero
T_s	Temperatura a la cual la entropía se hace igual a cero
$\Delta a_{D,h}$	Incremento de las ordenadas en el origen de $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ determinadas a temperatura T_h
$\Delta b_{D,h}$	Incremento de las pendientes de $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ determinadas a temperatura T_h
$W_{RX}(t)$	Potencia térmica de reacción
$W_A(t)$	Potencia térmica en la célula de muestra
${}^R W_A(t)$	Potencia térmica en la célula de referencia
M, L, B	Moléculas de biopolímero, ligando y tampón respectivamente contenidas en cualquier célula calorimétrica
ML	Complejo ligando macromolécula
T_s	Temperatura del sumidero de calor
ε	Coefficiente Seebeck
$E(t)$	Fuérza electromotriz
$W(t)$	Potencia térmica
α	Coefficiente de intercambio de calor
t_i	Tiempo inicial
t_f	Tiempo final
l.b.	Línea base
Q	Calor generado en la reacción
K	Constante microscópica aparente de equilibrio de unión
[L]	Concentración de ligandos libre
$[L]_b$ o L_b	Concentración de ligandos unido
$[M]_T$	Concentración de macromolécula total
\bar{V}	Parámetro de unión
Z	Función de partición
ΔH_b	Incremento de entalpía de unión
q_i	Calor liberado o absorbido durante la reacción de unión ligando-macromolécula
V_C	Volumen de célula
V_{in}	Volumen de inyección
N	Número de inyecciones
n	Número de sitios de unión
p	Número de moles de protones por mol de ligando unido tomados $n > 0$ o cedidos $n < 0$
ML_n	Complejo ligando-macromolécula a saturación

A	Absorbancia
ν	Frecuencia
ϵ	Coefficiente de extinción expresado en $M^{-1}.cm^{-1}$ o $mg^{-1}.mL.cm^{-1}$
l	Paso de luz (cm)
c	concentración de muestra expresada en M o mg / mL
CD	Dicroísmo circular
λ	Longitud de onda
ϵ_L	Coefficiente de extinción para la luz polarizada hacia la izquierda
ϵ_D	Coefficiente de extinción para la luz polarizada hacia la derecha
UV	Ultra violeta
$[\phi]$	Elipticidad molar por residuo ($grado.dm^{-1}.cm^2$)
n	Número de residuos
P_m	Peso molecular
MEL	Modelo de extrapolación lineal
MUD	Modelo de unión al desnaturalizante
PDB	Banco de datos de proteínas
R1-69	Dominio N-terminal del represor del fago 434
λ_{6-85}	Dominio N-terminal del represor del fago λ
ΔG_D^0	Incremento de la energía de Gibbs de desplegamiento determinada a 298 K
T_r	Temperatura de referencia
$\Delta \nu$	Número de protones intercambiados entre la proteína y el tampón
ν_N	Número de protones enlazados al estado nativo
ν_D	Número de protones enlazados al estado desnaturalizado
$\Delta h_{ion,ac}$	Entalpía de ionización del tampón acetato
$\Delta h_{ion,fosf}$	Entalpía de ionización del tampón fosfato
$\Delta h_{ion,glic}$	Entalpía de ionización del tampón glicina
x	Número de moles
ΔH_1	Calor de mezcla de dos tampones
$\Delta H_{ion,prot.}$	Calor de transferencia de p protones desde el tampón a la cadena polipeptídica
$\Delta H_{ion,fosf}$	Calor de donación a la proteína de p protones desde el tampón fosfato
$\Delta H_{ion,glic}$	Calor de donación a la proteína de p protones desde el tampón glicina
$\Delta h_{ion,prom}$	Calor promedio por ganancia o pérdida de un protón por parte de la proteína
p	Número de protones transferidos desde el tampón a la proteína
ADA-2h WT	Dominio de activación de la Procarboxipeptidasa en su estado natural
T	Giro dentro de la estructura de la proteína

S	Láminas β
H	Hélices α
3_{10}	Hélices 3_{10}
$\delta C_{p,N}$	Pendiente de $C_{p,N}$
$\delta C_{p,D}$	Pendiente de $C_{p,D}$
$\delta \Delta C_{p,D}$	Resta de las dos anteriores pendientes
$\delta^{WT} \Delta G_D^0$	Incremento de la energía de Gibbs de desplegamiento para cualquier variante con respecto a la obtenida para la proteína en su estado natural
ΔG_D^0	Incremento de energía de Gibbs determinada a 298 K
RMN	Resonancia magnética nuclear
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
RMN 1H	Espectros de resonancia magnética nuclear de protones
$\Delta C_{p,D,calc.}$	Incremento de capacidad calorífica de desnaturalización calculada
TIM	Triosafosfato isomerasa
MSS-TIM	Variante monomérica de la Triosafosfato isomerasa
NAG o GlcNAc	N-acetil- β -D-glucosamina
Fbn III	Dominio N-terminal de Quitinasa A
Chi-A	Quitinasa A
Chi-B	Quitinasa B
CAT	Dominio Catalítico
CH	Dominio de unión a quitina
NA	Nitrógeno α
CG	Carbono γ
NE	Nitrógeno ϵ
OE	Oxígeno ϵ
CE	Carbono ϵ
NZ	Nitrógeno Z
CA	Carbono α
CE	Carbono ϵ
ND	Nitrógeno Δ

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
3.1	80
3.2	96
4.1	115
4.2	123
4.3	130
5.1	149
6.1	168
6.2	176
6.3	178
6.4	179
6.5	182
6.6	184
6.7	188
6.8	192

ÍNDICE FIGURAS

Figura	Página
2.1	19
2.2	21
2.3	21
2.4	27
2.5	28
2.6	31
2.7	33
2.8	36
2.9	46
2.10	53
2.11	54
2.12	56
2.13	57
2.14	62
2.15	62
3.1	73
3.2	78
3.3	79
3.4	84
3.5	87
3.6	90
4.1	102
4.2	102
4.3	103
4.4	105
4.5	106
4.6	110
4.7	110
4.8	112
4.9	113
4.10	114
4.11	117
4.12	118
4.13	119
4.14	121
4.15	122
4.16	124
4.17	125
4.18	129
5.1	136
5.2	138
5.3	141
5.4	142
5.5	143
5.6	146
5.7	146
5.8	147
5.9	148
5.10	148

Figura	Página
5.11	149
5.12	152
5.13	154
6.1	160
6.2	161
6.3	161
6.4	162
6.5	163
6.6	165
6.7	170
6.8	171
6.9	172
6.10	173
6.11	174
6.12	176
6.13	177
6.14	178
6.15	181
6.16	182
6.17	183
6.18	184
6.19	186
6.20	188
6.21	190
6.22	191
6.23	193

1.- INTRODUCCIÓN.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

13 OCT. 2000

COMISION DE DOCTORADO

1.- Introducción.

El funcionamiento de las células vivas a nivel molecular está basado en gran medida en las interacciones y transiciones conformacionales de los biopolímeros, entre los cuales las proteínas globulares desempeñan un papel crucial. Dichas interacciones y transiciones ocurren en un ambiente acuoso con la intervención importantísima del disolvente y están dirigidas por múltiples factores físicos bastante débiles en comparación con los enlaces covalentes. Entre estos factores normalmente se incluyen las interacciones de van der Waals y electrostáticas, los enlaces de hidrógeno y los efectos hidrofóbicos e hidrofílicos, los cuales determinan la energética tanto de las uniones de las proteínas nativas a sus ligandos, sustratos u otros biopolímeros, así como el plegamiento mismo de las cadenas polipeptídicas.

La hipótesis central de la biología molecular moderna, formulada hace muchos años por Anfinsen (Anfinsen, C.B., 1973), supone que la cadena polipeptídica generalmente no necesita ningún factor externo o consumo de energía para plegarse, dando lugar a la estructura nativa. En otras palabras, la información sobre la estructura nativa tridimensional (o sobre unas estructuras relacionadas denominadas confórmeros) está escrita en la secuencia de aminoácidos de la misma proteína. Esto significa que el estado nativo se corresponde con un mínimo de la energía de Gibbs bastante profundo y que la cadena polipeptídica puede encontrarlo espontáneamente, aunque varios factores externos celulares pueden mejorar la cinética del plegamiento y ayudar a la proteína a encontrar antes este mínimo energético. Por eso el plegamiento de las proteínas puede ser analizado en términos de la termodinámica clásica de equilibrio aplicando los métodos tradicionales, tanto experimentales como teóricos, de la química física de las disoluciones. El fin sería encontrar los modelos adecuados para poder predecir la estructura tridimensional nativa a partir de la estructura primaria o, al menos, poder calcular los cambios de los parámetros termodinámicos en el proceso de plegamiento, incluyendo los cambios de energía de Gibbs como medida de la estabilidad de la estructura nativa.

Estas dos tareas quedan todavía sin resolver, pese a que los estudios termodinámicos del plegamiento de las proteínas se han desarrollado con gran intensidad durante los últimos cincuenta años. Gracias a estos estudios se conocen ya los principios generales de la energética y del mecanismo de plegamiento; además se han desarrollado algoritmos empíricos que permiten hacer estimaciones cuantitativas, aunque aún bastante rudas, sobre la estabilidad de la estructura nativa y otros parámetros termodinámicos de plegamiento. El mayor obstáculo en el camino hacia la mejora en la precisión de dichas estimaciones tiene su origen en dos factores: 1) la enorme complejidad y diversidad de las interacciones elementales que estabilizan la estructura nativa y el gran conjunto de estructuras desplegadas de las proteínas y 2) el hecho de que ciertos parámetros energéticos de estas interacciones se suman con signos opuestos, compensándose mutuamente, de tal manera que los parámetros integrales termodinámicos del plegamiento (relativamente pequeños) resultan ser la suma de términos mucho más grandes en valor absoluto. Como resultado, los errores relativamente pequeños en la estimación del valor de estos grandes términos se transforman directamente en los elevados errores absolutos con que vienen afectados los valores de los parámetros integrales, por ejemplo, los cambios de la energía de Gibbs. Esta situación ha conducido a la necesidad de acumular gran una cantidad de datos termodinámicos, con una mejora progresiva en su precisión, y a la búsqueda de los modelos y sistemas más adecuados para estos estudios. De entre todos estos modelos, las pequeñas proteínas globulares con estructuras menos complejas y cuyo proceso del plegamiento es relativamente más simple, constituyen objetos particularmente adecuados para los estudios termodinámicos.

Otro obstáculo importante para el desarrollo de métodos para el cálculo termodinámico del plegamiento radica de facto, en el conocimiento aún muy limitado de las estructuras desplegadas y de su energética, aunque las estructuras plegadas de muchas proteínas sí sean bien conocidas. Desde este punto de vista, parece mucho más fácil estimar cambios pequeños en los parámetros termodinámicos de la estructura nativa que acompañan a las mutaciones puntuales en la estructura primaria. Aunque menos general, este problema tiene hoy día, sin embargo, una gran importancia en el desarrollo de la biotecnología y en los métodos de diseño de nuevas proteínas, o para la modificación de las ya existentes haciéndolas más estables, etc.

Finalmente, hay un tercer aspecto en la termodinámica estructural que corresponde a la interacción de las proteínas con sus ligandos y efectores específicos. Este problema parece más fácil de resolver que el de plegamiento, ya que en muchas ocasiones las estructuras precisas, tanto de la apoproteína, del ligando libre y del complejo, son bien conocidas, no estando la unión acompañada por cambios conformacionales notables. No obstante, no existen todavía métodos adecuados para calcular los parámetros de unión ni siquiera para los casos más sencillos, debido sobre todo a que aún no sabemos calcular con precisión la energética de la interacción de las moléculas biológicas con el agua.

A pesar de estas enormes dificultades, nuestros conocimientos empíricos y los modelos teóricos siguen desarrollándose poco a poco en tres direcciones concretas: la termodinámica del plegamiento de las proteínas, el efecto termodinámico de las mutaciones puntuales o múltiples, y la termodinámica de la interacción o reconocimiento molecular. Nuestro grupo en el Departamento de Química Física participa en estas investigaciones biotermodinámicas desde hace mucho tiempo, usando como método experimental de referencia la microcalorimetría. En el estudio presentado en esta Tesis se ha utilizado tanto la calorimetría diferencial de barrido (DSC), como la calorimetría isotérmica de titulación (ITC), junto con otros métodos y técnicas, sobre todo espectroscópicos, para llevar a cabo los estudios termodinámicos de varias proteínas globulares en las tres direcciones mencionadas.

Ambos métodos calorimétricos se han utilizado, junto con el despegamiento producido por urea y seguido por técnicas ópticas, para investigar la termodinámica del desplegamiento de una pequeña proteína globular, el represor 434 Cro. Esta proteína ha sido elegida como un objeto adecuado por su plegamiento típico, que no posee ligandos unidos, puentes disulfuro, ni otros factores que puedan complicar los estudios termodinámicos y cinéticos. Además, la estructura de esa proteína se conoce a alta resolución, lo que permite buscar las correlaciones entre los parámetros termodinámicos y estructurales. Este trabajo es importante sobre todo para obtener datos termodinámicos completos y de alta calidad para una proteína globular típica y así comprobar la validez y precisión de los métodos de cálculo teóricos y de los métodos del tratamiento de las curvas de desplegamiento por urea.

Tanto la calorimetría como los métodos espectroscópicos (sobre todo RMN) se han utilizado también para investigar las consecuencias termodinámicas de las mutaciones múltiples introducidas en las superficies expuestas al disolvente en las hélices de otra pequeña proteína globular, el dominio de activación de la procarboxipeptidasa humana. El efecto estabilizador de dichas mutaciones fue calculado previamente de acuerdo con el algoritmo desarrollado por el Dr. Luis Serrano (EMBL) y sus colaboradores. Nuestra tarea ha sido investigar la magnitud del efecto estabilizador y comprobar la aditividad de los efectos individuales. Al llevar a cabo esta tarea hemos encontrado que en algunas condiciones dichas mutaciones son efectivamente aditivas y estabilizan el estado nativo, mientras que en otras condiciones lo que se estabiliza en un estado intermedio, más aún que el estado nativo, lo que conlleva implicaciones importantes en el diseño de dichos mutantes.

Finalmente, la calorimetría ITC se ha utilizado para medir los parámetros termodinámicos de unión de un inhibidor (ácido fosfoglicólico, PGA) con varias modificaciones de la triosafosfato isomerasa (TIM). Este estudio se ha realizado dentro de un proyecto de la Unión Europea y en colaboración con otros cuatro laboratorios europeos. En estos laboratorios se han diseñado varios mutantes de TIM natural con el fin de obtener sus formas monoméricas, que aún presentan actividad enzimática. En estos mismos laboratorios se han purificado las variantes de TIM y se han determinado las estructuras tridimensionales de estas proteínas y sus complejos con el inhibidor (PGA). Esto ha abierto la posibilidad no solo de medir los parámetros termodinámicos de unión, sino de proponer además una interpretación teórica adecuada para los mismos.

Por todo lo anterior, es evidente la importancia del conocimiento de los parámetros termodinámicos en el desarrollo de métodos de predicción de estructuras o para la estimación de los parámetros de unión de las proteínas con sus ligandos. Dicha importancia se potencia hoy día gracias a la cantidad de información sobre estructuras primarias muy abundante desde la resolución de estructuras de varios genomas, incluyendo el genoma humano, lo que ha abierto el camino desde la "genómica" a la "proteómica". Por ejemplo, actualmente solo conocemos la estructura de mil proteínas de las decenas de miles codificadas en nuestro genoma. Es posible que en el futuro próximo no se puedan resolver las estructuras de muchas proteínas naturales, bien sea por su cantidad como por la falta de métodos adecuados, como es el caso, por ejemplo, de las proteínas de membrana. Desde este punto de vista, los métodos de predicción de

estructuras tridimensionales a partir de la secuencia de la cadena polipeptídica adquieren una importancia enorme, así como los métodos que permiten seleccionar los sustratos o inhibidores potenciales para las enzimas naturales o diseñadas artificialmente. El desarrollo de estos métodos depende directamente de la cantidad y calidad de la información termodinámica acumulada e interpretada. La necesidad de disponer de dicha información justifica los estudios termodinámicos llevados a cabo en este trabajo más allá de la propia importancia de los sistemas investigados.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.- MATERIALES

2.1.1.- Sistemas Biológicos

En esta tesis se ha abordado el estudio, bajo un enfoque termodinámico, de los cuatro sistemas biológicos siguientes:

- *Dominio de Activación de la procarboxipeptidasa Humana 2h* denominada **ADA-2h** y sus mutantes M1, M2 y doble mutante (DM). Estas proteínas liofilizadas han sido cedidas por el grupo de investigación del Dr. Francesc X. Avilés (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Unidad de Ciencias e Instituto de Biología fundamental de la Universidad Autónoma de Barcelona).
- *Proteína represora Cro del fago 434* denominada **434 Cro**. Al igual que la anterior se encontraba liofilizada y fue cedida por el grupo de investigación del Dr. Manuel Rico (Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, Madrid).
- *Triosa Fosfato Isomerasa* cuyo acrónimo utilizado será **TIM**. Fue purificada en nuestro laboratorio tal y como se describe más adelante. Su mutante conocido como **MSS-TIM** fue cedido en disolución por el grupo de investigación del Dr. Anne Marie Lambeir (Laboratorio de Bioquímica Médica de Amberes, Bélgica).
- *Quitinasa A*, que *se denominará Chi- A*, fue cedida por el Dr. Constantin E. Vorgias (Departamento de Biología, Laboratorio de Bioquímica. Universidad de Atenas). *Quitinasa B*, cuyo acrónimo será **Chi- B**, se purificó en el laboratorio del Dr. Vincent G. H. Eijsink (Departamento de Ciencias Biotecnológicas. Universidad de Agricultura. Noruega).

2.1.2.- Productos

- **Boehringer Mannheim**

IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) $C_9H_{18}O_5S$ (Ref. 724815). Peso molecular 238.3 g/mol.

- **Carlo Erba**

D-[+] Glucosa anhidra (Ref. 454336,). Peso molecular 180.16 g/mol.

Ácido fosfórico 85 %, H₃PO₄ (Ref. 406002). Peso molecular 97.995 g/mol.

- **Difco**

Extracto de Levadura (Bacto) (Ref. 0127-17-9) para preparación de medio de cultivo microbiológico.

Triptona Peptona (Ref. 0123-17), digerido pancreático de caseína. Peptona microbiológica para uso de medios de cultivo.

Casamino ácidos (Ref. 0230-15-5) amino ácidos procedentes de la hidrólisis de la caseína conteniendo bajas concentraciones de cloruro sódico e hierro.

Bacto Agar (Ref. 0140-01). Agar purificado para medios de cultivo microbiológicos.

- **Fluka**

Cacodilato sódico trihidratado C₂H₆AsNaO₂.3H₂O (Ref. 20840). Peso molecular 214.03 g/mol.

- **Merk**

Cloruro Sódico, NaCl, grado de análisis (Ref. 1.06404.1000) Peso molecular 58.44 g/mol.

Hidróxido Sódico, NaOH, grado de análisis. (Ref. 1.06498).Peso molecular 40.00 g/mol.

Azida sódica, NaN₃. Peso molecular 65.01 g/mol.

Dihidrógenofosfato potásico, KH₂PO₄ , grado de análisis (Ref. 4873). Peso molecular 136.09 g/mol.

Sulfato de magnesio heptahidratado, MgO₄S.7H₂O, grado de análisis (Ref. 1.05886). Peso molecular 246.48 g/mol.

Hidrógeno fosfato disódico dihidratado, Na₂HPO₄.2H₂O, grado de análisis (Ref. 6580.0500). Peso molecular 177.99 g/mol.

Cloruro amónico, NH_4Cl , (Ref.1145) grado de análisis. Peso molecular 53.50 g/mol.

- **Panreac**

Ácido clorhídrico 35 % , HCl , químicamente puro (Ref. 211019). Peso molecular 36.46 g/mol. 1 L \approx 1.185 Kg.

- **Probus**

Cloruro cálcico, Cl_2Ca , químicamente puro (Ref. 51167). Peso molecular 110.99 g/mol.

- **Serva**

EDTA (Sal disódica del ácido etiléndiamino tetracético) $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8.\text{Na}_2.2\text{H}_2\text{O}$ (Ref. 11280). Peso Molecular 372.3 g/mol. Grado de análisis.

- **Sigma**

Pipes (Sal dipotásica del ácido Piperazina-N,N'-bis[2-etanosulfónico]) $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{K}_2$ (Ref. P-7643). Peso Molecular 378.5 g/mol. pKa 6.8 a 25 °C, rango recomendado, pH de trabajo 6.1-7.5.

Trizma Base (Trihidroximetil aminometano) $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (Ref. T-1503). Peso molecular 121.1 g/mol.

TEA (Trietanol amina) $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$. pKa 7.8 a 25 °C, rango aconsejable de pH 7.8-8.3. Peso molecular 149.2. 133 mL de TEA por 1 L de disolución corresponden a una concentración de 1 M. Higroscópico.

Ditio treitol (DL -Ditio treitol) $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ (Ref. D-0632). Peso molecular 154.2 g/mol. Higroscópico.

PGA, Sal del ácido fosfoglicólico (Trimonociclohexil-amonio) $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_6\text{P}.3\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}$ (Ref. P-4261). Peso molecular 453.6 g/mol.

Ampicilina (D -[-]- α -aminobenzil penicilina) sal sódica $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{SNa}$ (Ref. A-9518). Peso molecular 371.4 g/mol.

MES, Sal disódica del ácido 2-N-morfolinil etil sulfónico $C_6H_{13}NO_4S$ (Ref. M-8250). Peso molecular 195.2 g/mol. pKa 6.1 a 25 °C, pH de trabajo recomendado 5.5-6.7.

- *Spectrum*

Para la realización de la diálisis se utilizaron membranas SPECTRA/POR con punto de corte de 3500 Da (ref. 132720) y de entre 12000 y 14000 Da (ref. 132678). Antes de su utilización es necesario calentar las membranas hasta 70°C en agua milli-Q, repitiendo el proceso al menos tres veces. Se almacenan a 4°C en una disolución conteniendo aproximadamente un 1% de azida sódica. Previamente a su uso es necesario eliminar con agua milli-Q los posibles restos de azida.

2.1.3.- Instrumentación

Las medidas de concentración de las diferentes proteínas recogidas en esta tesis, se realizaron por medio de un espectrofotómetro de la casa comercial Jasco, modelo V- 530 de doble haz. Eventualmente se trabajó con un espectrofotómetro Beckman DU-70 de haz simple.

El agua utilizada en la preparación de cualquier disolución procede del sistema de purificación de agua Millipore modelo, MilliQ-Plus.

El pH de los diferentes tampones se ha medido con un electrodo combinado de vidrio Crison, modelo 52-03, para grandes volúmenes, (diámetro del bulbo de 10 mm) conectado a un pHmetro Crison modelo Basic 20 que incluye célula de temperatura para obtener una mayor exactitud en la medida. La calibración del pHmetro se ha realizado sistemáticamente con disoluciones tampón estándar de pH 7.02 y 4.00, también de la casa comercial Crison.

Las centrifugaciones necesarias durante la purificación se realizaron con las centrifugas, Kokusan modelo H-251 con un rotor tipo M1 (7000 rpm), ultracentrífuga Beckman modelo L5-40 con rotor R-35 (20000 rpm) y microfuga de mesa para tubos tipo eppendorf, Hettich modelo EBA 12 (14000 rpm).

La esterilización del material se llevó a cabo mediante un autoclave Selecta que permite alcanzar una temperatura máxima de 134 °C.

La termostatación durante el crecimiento de las colonias en placa se utilizó una estufa de cultivos Selecta, que permite trabajar dentro de un rango de temperaturas de 0 a 80 °C.

La lisis del cultivo se realizó por medio de una prensa French de la casa comercial Sim Aminco, la cual posee una célula de presión capaz de soportar una presión máxima de 20000 psi.

La termostatación de los cultivos se llevó a cabo mediante un baño termostatación con agitación modelo Sbd50 de la casa comercial Heto, con rango de agitación entre 20 y 100 rpm y de temperatura entre 0-105 °C, con capacidad para matraces de entre 50 mL y 2 L.

El sistema de cromatografía líquida de alta resolución pertenece a la casa comercial Pharmacia LKB y está equipado con: dos bombas modelo 2248 cuya capacidad de flujo es de hasta 10 mL/min, un mezclador de alta presión y detector UV-visible modelo VWM- 2141.

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido se realizaron mediante los calorímetros: DASM-4 (de fabricación rusa) y VP-DSC (MicroCal Incorporated).

Para los estudios por calorimetría isotérmica de titulación se utilizó un calorímetro ITC- Ω de la casa comercial MicroCal Incorporated, automatizado con un sistema de control MCS (MicroCal System).

Los experimentos de dicroísmo circular se realizaron con un espectropolarímetro J-715 de la casa comercial Jasco Corporation.

Las muestras para los experimentos por ITC fueron termostatación en un baño termostático de agua M3 Lauda.

2.2.- MÉTODOS

2.2.1.- Preparación de las muestras

2.2.1.1.- Transformación, expresión y purificación de la triosafosfato isomerasa en su estado natural.

La obtención de la triosa fosfato isomerasa natural (no mutada) se basa en el proceso de purificación desarrollado en el laboratorio del Dr. Wierenga (T. V. Borchert, 1993) al que se le han introducido ciertas modificaciones, de ahí que se describa brevemente a continuación.

A. Transformación

La transformación, se realizó sobre la cepa de células competentes BL21(DE3) de *Escherichia coli* (Studier & Moffatt, 1986) preparadas en alícuotas de 200 μ L y guardadas a -80 °C. El plásmido utilizado pET3a (Rosenberg et al., 1987) el cual contiene el inserto con el gen de la proteína que se desea expresar fue cedido por Dr. Anne Marie Lambeir (Laboratorio de Bioquímica Médica de Amberes, Bélgica).

En un tubo cónico estéril se colocan 200 μ L de células competentes BL21(DE3) y se añaden 3 μ L de plásmido pET3a. Se dejan en hielo durante 20 min y se introducen en un baño termostático a 42 °C durante 2 min. Se vuelve a introducir la mezcla en hielo durante 3 min y se adicionan 800 μ L de medio LB (Medio Luria Bertani) (Maniatis et al., 1982). Dicha mezcla se termostatiza a 37°C durante 1 h en un baño termostático con una velocidad de agitación de 160 U (orbitales / min). Estas células transformadas se plaquean sobre dos placas con agar conteniendo cada una 100 mg/mL de ampicilina. Una placa contiene 200 μ L de células transformadas y otra 800 μ L previamente centrifugadas en microfuga durante 3 min a 14000 rpm y vuelta a resuspender en 100 μ L de LB. Se colocan ambas placas en la estufa termostatizada a 37 °C durante 12 h. Se eligen las mejores colonias y se realiza un nuevo plaqueo sobre dos nuevas placas con agar conteniendo al igual que las anteriores 100 mg/mL de ampicilina. Por último se vuelven a termostatizar a 37 °C en la estufa al menos durante 14 horas.

B. Preinoculación

En un tubo cónico estéril se adicionan 40 mL de medio 2xYT (Maniatis et al., 1982), 40 μ L de ampicilina 100 mg/mL. A esta solución se añade un poco (lo que se puede coger tocando con la varilla de platino) de las colonias crecidas aisladas, pertenecientes al segundo plaqueo. Se agita hasta homogenización y se divide la mezcla en cuatro tubos cónicos poniendo en cada uno 10 mL de la misma. Se introducen en un baño termostatizado a 37 °C con una agitación de 160 U durante tres horas.

C. Inoculación

Se preparan cuatro matraces de 2 L conteniendo cada uno los siguientes reactivos estériles:

- 750 mL agua ultrapura (Milli-Q plus).
- 2 mL MgSO₄ 1M.
- 1 mL CaCl₂ 100 mM.
- 20 mL Glucosa 20% (filtrada con filtros estériles desechables de 0.22 µm de la casa comercial Millipore).
- 10 mL casamino ácidos 20%.
- 1 mL ampicilina 100 mg/mL. (no autoclavada, filtrada con filtros estériles desechables de 0.22 µm de la casa comercial Millipore).
- 200 mL de medio mínimo 5xM9 (Maniatis et al., 1982).

A cada matraz se adiciona el contenido de un tubo cónico (10 mL de preinóculo) dejándolos crecer dentro de un baño termostatzado a 37°C, con una agitación de 160 U el tiempo necesario (al menos 4 o 5 horas) hasta que la absorbancia sea la adecuada para inducir el cultivo tal y como se especifica en el siguiente punto.

D. Inducción

Se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 600 nm la absorbancia del cultivo que debe estar situada en el intervalo 0.4-0.6, se añade por matraz 1 mL de IPTG (Isopropil-β-tiogalactopiranosido) 96 mg/mL. Se introducen los matraces en un baño termostatzado a 37 °C y con una agitación de 160 U durante al menos 14 h

E. Purificación

Los tampones no estériles necesarios durante la purificación se prepararon con agua ultrapura y posteriormente se filtraron por medio de filtros desechables con un tamaño de poro de 0.45 µm de la casa comercial Millipore, tras ajustar el pH a temperatura ambiente y aforar.

Tampón A: 25 mM MES (Ácido 2-(N-Morfolinil) etilo sulfónico) , 1mM DTT (Ditio treitol), 1 mM EDTA (Sal disódica del ácido etiléndiamino tetracético), NaOH / pH 6.5.

Tampón B: 25 mM MES, 1mM DTT, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, NaOH / pH 6.5.

Tampón C: 25 mM TEA (Trietanol amina), 1mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM N_3Na , 50 mM NaCl, HCl / pH 8.0.

Tampón C Gradiente: 25 mM TEA, 1mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM N_3Na , 150 mM NaCl, HCl / pH 8.0.

Se vierte el cultivo en botes de centrifuga de 250 mL y se centrifuga a 7000 rpm durante 15 min. El precipitado obtenido se resuspende en 10 mL de tampón A por 1 L de cultivo. Tal y como se describe detalladamente la figura 2.1. Este resuspendido se lisa en prensa French y se vuelve a centrifugar obteniéndose un precipitado que se denominará fase insoluble (FI) y un sobrenadante o fase soluble (FS). La FI sufre un paso adicional con respecto a la FS ya que es resuspendida en tampón B (de alta fuerza iónica) con el fin de extraer parte de la proteína que a quedado atrapada en los cuerpos de inclusión. Posteriormente ambas fases son centrifugadas obteniéndose de cada una un precipitado y un sobrenadante. Los sobrenadantes de dichas fases son tratados con $SO_4(NH_4)_2$ al 45% que se denominarán FS 45% o FI 45% con lo cual se precipitan parte de las proteínas que no interesan y que acompañan a la triosafosfato isomerasa durante la purificación. Se vuelven a centrifugar y los sobrenadantes obtenidos se tratan de nuevo con $SO_4(NH_4)_2$ es decir la concentración de $SO_4(NH_4)_2$ incrementa desde un 45% hasta un 65% permitiendo de este modo que precipite la proteína deseada junto con alguna más que posteriormente será separada. Después de una nueva centrifugación se cogen los precipitados al 65% en $SO_4(NH_4)_2$ de ambas fases y se resuspenden en 10 mL de tampón C. Ambas muestras procedentes de la FS y FI son dializadas por separado es decir en bolsas de diálisis diferentes, frente al tampón C siguiendo el método descrito en el punto 2.2.1.3 de esta tesis.

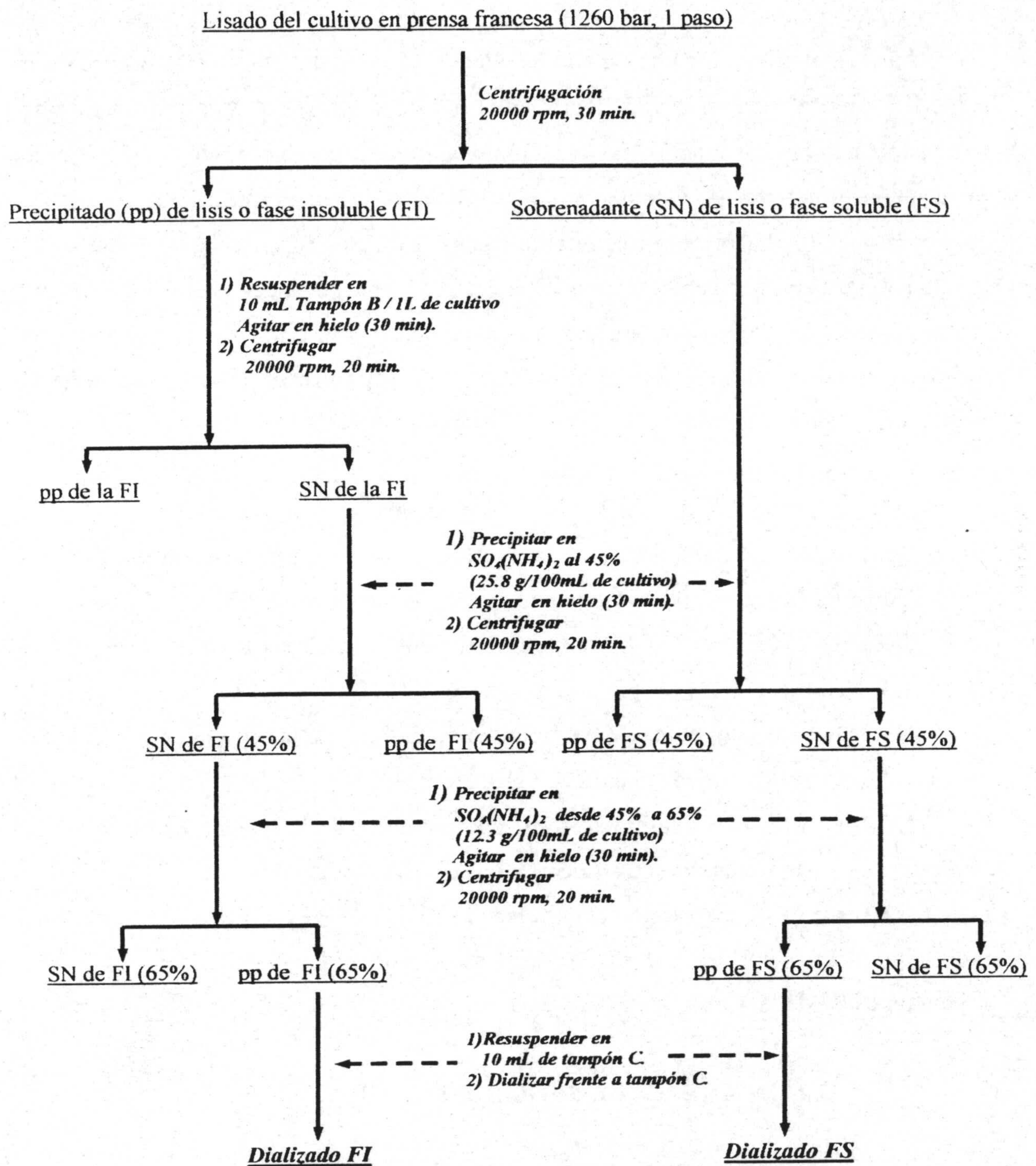


Fig. 2.1.- Diagrama de flujo en el que se describen los sucesivos pasos a seguir en la purificación de la enzima Triosafosfato isomerasa posteriormente a la lisis del cultivo.

F. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución es la última etapa en la purificación de TIM. El tipo de columna cromatográfica utilizada es SP Sefarosa de flujo rápido de la casa comercial Pharmacia. Es una columna de intercambio iónico que permite trabajar con proteínas de cualquier punto isoeléctrico. El rango de pH de trabajo se sitúa entre 4 y 13. La presión máxima de trabajo es 42 psi. Con el fin de obtener la proteína lo más pura posible se programa un gradiente de concentración desde una fuerza iónica baja, que correspondería al tampón C descrito en el apartado de purificación, hasta un valor más alto (150 mM NaCl) correspondiente al tampón C gradiente. El perfil temporal utilizado en la cromatografía es:

De 0 a 40 min, 0 % tampón C gradiente a un flujo de 3 mL/min.

De 40 a 160 min, 0-100 % tampón C gradiente a un flujo de 1 mL/min.

De 160 a 200 min, 100 % tampón C gradiente a un flujo de 1.5 mL/min.

De 200 a 210 min, 100-0 % tampón C gradiente a un flujo de 1.5 mL/min.

Cualquier muestra antes de ser introducida en la columna se dializa y se pasa a través de filtros de 0.22 μm de la casa Millipore.

La concentración de la proteína en cada momento de la cromatografía se midió mediante un detector continuo de absorbancia UV-visible a 280 nm.

Un perfil de elución típico para la fase insoluble en esta purificación es descrito en la figura 2.2 junto al que se muestra la electroforesis de diferentes fracciones cromatográficas de la purificación (Fig. 2.3).

2.2.1.2.- Purificación de Quitinasas A y B.

Durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Eijsink se purificaron las cantidades necesarias de Chi-A y Chi-B con el objetivo de realizar experimentos de proteólisis limitada con ambas proteínas y posteriormente de calorimetría diferencial de barrido con Chi-B.

El método de purificación utilizado y publicado (Brurberg, M. B. et al., (1994)) es el mismo para ambas proteínas aunque como es lógico sus plásmidos son diferentes.

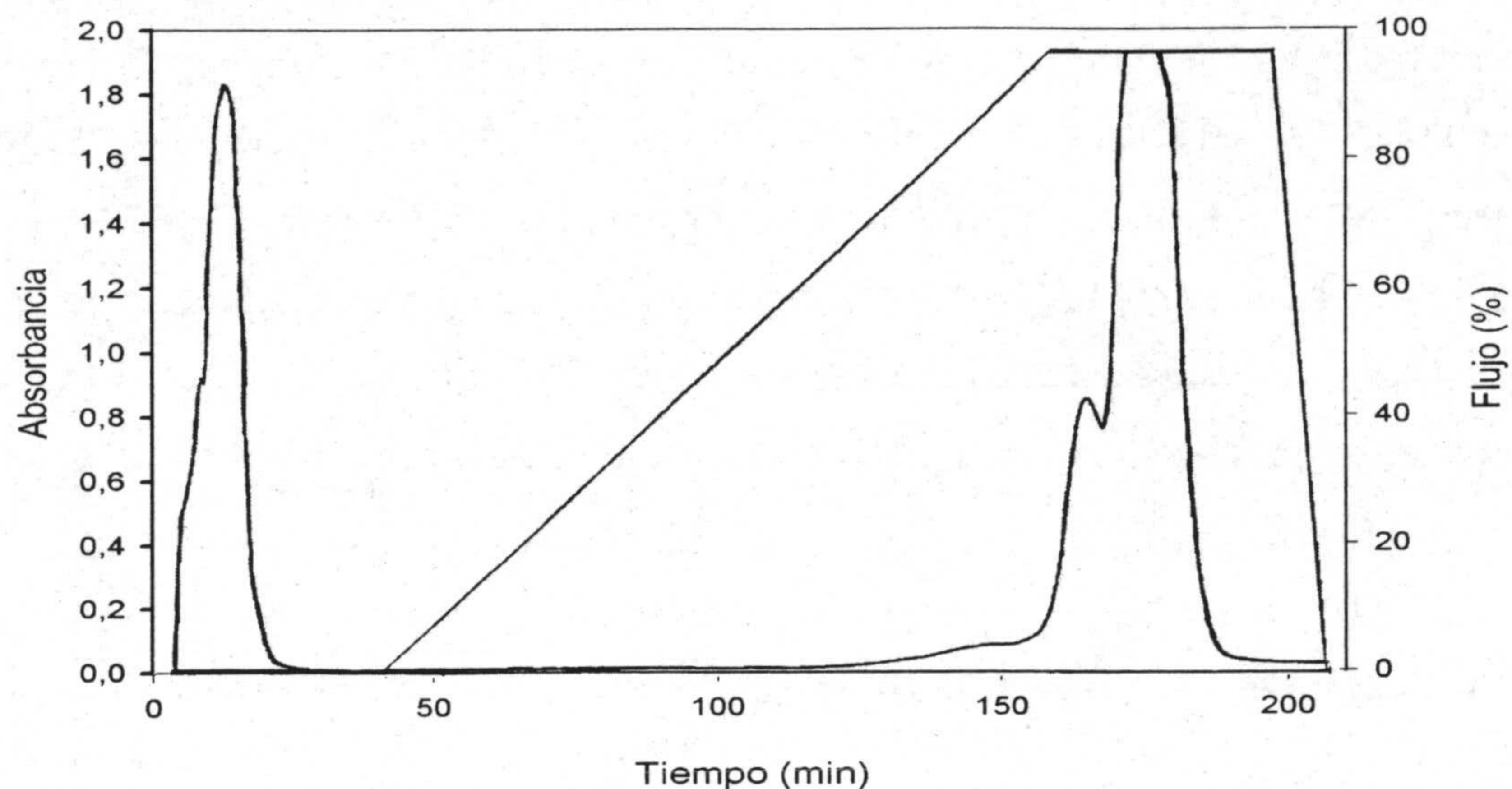


Fig. 2.2.- Perfil de elución obtenido durante la purificación de la triosafosfato isomerasa en su estado natural. El pico más a la derecha se corresponde con dicha proteína pura lo cual fue corroborado por medio de electroforesis y el de la izquierda a las impurezas que acompañan a la muestra. El gradiente utilizado se destaca por medio de una línea recta.

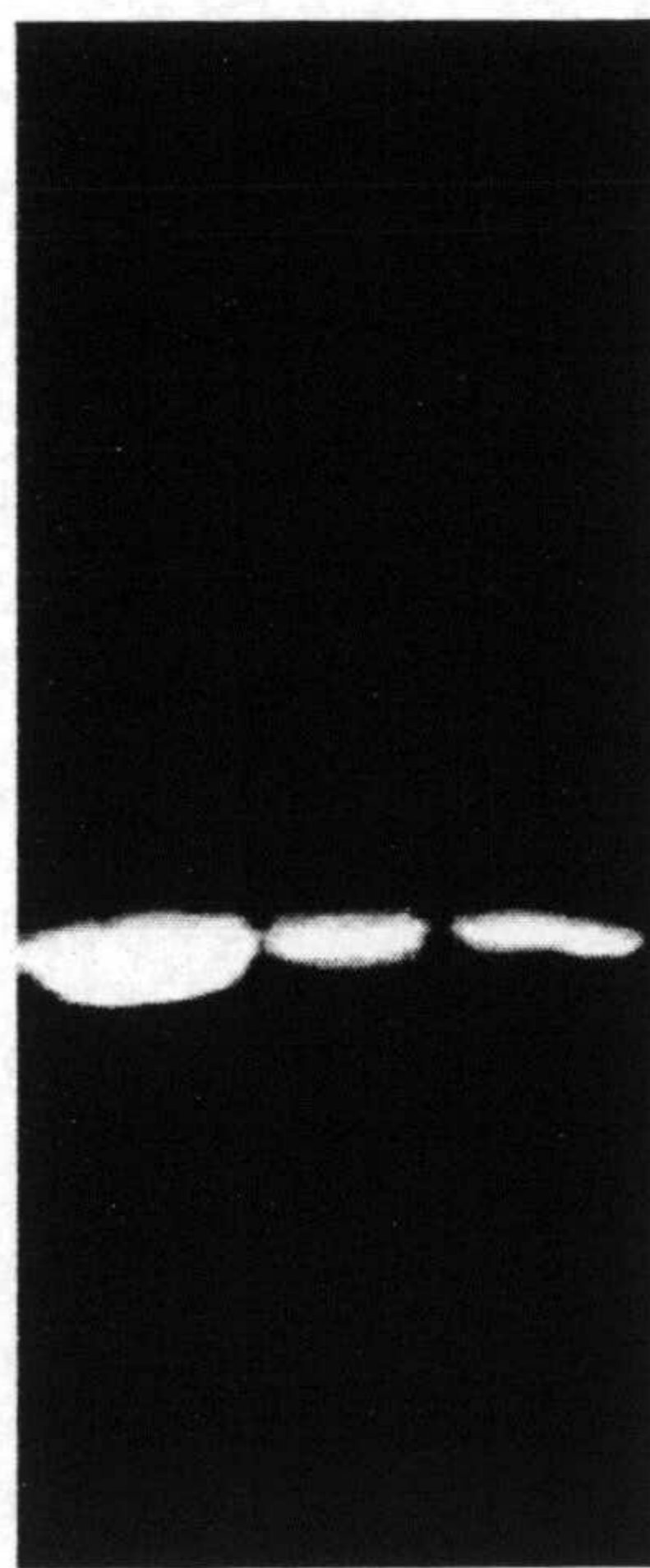


Fig. 2.3.- Negativo de la electroforesis de algunas de las fracciones cromatográficas de TIM natural correspondientes al pico y su hombro que aparecen a la derecha de la figura 2.2. De derecha a izquierda: marcador (TIM procedente de una anterior purificación), FI (1^{er} pico), FI (2^o pico).

En relación a Chi-A partimos de células hospedadoras *E. coli* conteniendo el plásmido pMAY20-1 (Brurberg, M. B. et al. (1994) FEMS Microbiology Letters, 124, 399-404). En el caso de Chi-B dichas células contienen el plásmido pMAY2-10 (Brurberg, M. B., Eijsink, V. G.H., Haandrikman, A. J., Venema, G. & Nes, I. F., (1995). Microbiology, 141, 123-131). Después de la preparación del precultivo, éste se somete a choque osmótico (Manoil, C. & Beckwith, J. (1986). Science, 233, 1403-1408) con lo cual se obtiene el extracto periplasmático cuya purificación permite la obtención de Chi-A o Chi-B.

2.2.1.3- Tratamiento previo de las muestras.

La preparación de la muestra es una fase del experimento calorimétrico crítica dado el carácter esencialmente cuantitativo de las medidas calorimétricas que requiere un alto grado de pureza de la proteína y cuya medida de concentración se debe hacer lo más exacta posible.

Antes de realizar un experimento utilizando cualquiera de las técnicas descritas en esta memoria es necesario que las muestras de proteínas estén perfectamente equilibradas en el tampón en el cual se va a realizar la experiencia, según las condiciones experimentales (pH y concentración) diseñadas. Para ello se dializa la muestra frente al tampón deseado. El procedimiento general seguido para preparar dicho tampón consiste en la disolución del sólido correspondiente al tampón que se quiere preparar, en un volumen de agua ultrapura (milli-Q, Millipore) inferior al volumen final deseado. Posteriormente se ajusta el pH añadiendo ácido o base para disminuir o aumentar el mismo respectivamente. Por medio de un matríz aforado se enrasa hasta el volumen final deseado. Por último y con ayuda de una bomba de vacío se filtra el tampón mediante filtros con 0.45 μm diámetro de poro de la casa comercial Millipore.

Los detalles acerca de los diferentes tampones utilizados, valores de pH y condiciones de trabajo en general, se encuentran recogidos en la parte del procedimiento experimental del capítulo correspondiente a cada uno de los sistemas estudiados.

Preparado el tampón se disuelve la proteína, liofilizada como es el caso de ADA-2h y sus mutantes, 434 Cro y Quitinasas, en un volumen adecuado para alcanzar la concentración deseada, se centrifuga a 14000 rpm durante 2 min o se filtra por medio de filtros de 0.22 μm de diámetro de poro de la casa Millipore y se mide la concentración frente al tampón como blanco de la medida. En el caso de que la proteína no esté liofilizada sino en disolución como es el caso de la triosafosfato isomerasa y sus

mutantes, solamente se coge el volumen necesario para alcanzar la concentración de muestra deseada el tampón preparado para posteriormente filtrarla o centrifugarla de igual modo que para la proteína liofilizada. Por medio de una micropipeta automática se introduce la disolución de proteína en la membrana de diálisis preparada anteriormente tal y como se describe en el apartado 2.1.1. Se cierra la bolsa mediante pinzas especiales de la casa comercial Spectrum Medical Industries dejando una pequeña cámara de aire. Finalmente se introduce en un recipiente que contiene un volumen de tampón 500 o 600 veces mayor al de muestra y se pone a agitar suavemente durante al menos 6 horas a 4 °C en cámara frigorífica. Transcurrido este tiempo se repone el tampón que baña la bolsa de diálisis por otro volumen fresco y de nuevo dejamos en agitación durante 6 horas o más. Se extrae la disolución dializada de proteína de la bolsa, se centrifuga a 14000 rpm durante al menos 3 min y se mide de nuevo la concentración puesto que es posible que se haya diluido si contenía algún residuo de tamaño inferior al de la proteína previamente a su diálisis.

2.2.2.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

2.2.2.1.- Introducción

La Calorimetría Diferencial de Barrido, comúnmente conocida como DSC, acrónimo del nombre inglés "Differential Scanning Calorimetry", es la técnica experimental más directa y precisa para sistemas moleculares bien definidos, cuyas estructuras están estabilizadas por numerosas fuerzas débiles y, por consiguiente, susceptibles de experimentar transiciones conformacionales y/o cambios de fase al calentar o enfriar en un intervalo de temperatura experimentalmente accesible de -20 a 130 °C. Es consecuentemente la técnica más adecuada para caracterizar termodinámicamente sistemas macromoleculares y, especialmente en sus implementaciones de alta sensibilidad, para biopolímeros y sus complejos.

La DSC mide la capacidad calorífica aparente de una disolución macromolecular como una función continua de la temperatura. A partir de esta función es posible, si el sistema macromolecular está bien definido, la determinación de los parámetros termodinámicos asociados a la transición inducida por temperatura: cambios de entalpía, ΔH , de entropía, ΔS , de energía de Gibbs ΔG y de la capacidad calorífica ΔC_p . Así la DSC es la única técnica que mide directamente la función de partición a través del observable $\Delta H(T)$; esta peculiaridad le diferencia del resto de las técnicas

experimentales adecuadas para el estudio del equilibrio conformacional de biopolímeros. El conocimiento de los valores de los parámetros termodinámicos y su dependencia de las condiciones de entorno, tales como pH, fuerza iónica, naturaleza del disolvente, presencia de ligandos, etc., unidos al conocimiento detallado de la estructura tridimensional de las macromoléculas, la posibilidad de observar los cambios introducidos por mutaciones específicas y la modelización computacional, nos permite interpretar y relacionar la energética de los procesos de plegamiento/desplegamiento de los biopolímeros en términos de los cambios estructurales asociados.

Los estudios realizados con DSC de sistemas macromoleculares de interés biológico abarcan lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e hidratos de carbono. Una excelente revisión de las aplicaciones biotecnológicas de la DSC ha sido publicada por Babur Z. Chowdhry y Steven C. Cole, en 1989.

Revisiones recientes que sobre esta técnica recopilan aspectos formales, metodológicos, de análisis y sus aplicaciones las encontramos en las siguientes referencias: Privalov, 1989; Chowdry & Cole, 1989; Freire et al., 1990, Cooper et al., 1994 a y b; Sanchez-Ruiz, 1995.

2.2.2.2.- Instrumentación

El desarrollo instrumental de esta técnica ha estado determinado por el incremento en el interés sobre macromoléculas biológicas y en concreto su caracterización termodinámica, por ello fue necesario adecuar la técnica calorimétrica a las características que presentan estos sistemas. El principal objetivo ha sido realizar el estudio de estas macromoléculas en condiciones lo más parecidas posibles a las fisiológicas, esto implica tener dicha macromolécula en disolución es decir, como un sistema macroscópico rodeado de un disolvente. El diseño del instrumento está directamente determinado por este hecho por lo que es necesario tener en cuenta las siguientes consideraciones; 1) la concentración utilizada debe ser baja (unos pocos mg/mL) con el objetivo de desprejar la interacción entre macromoléculas 2) el aislamiento y purificación de estas macromoléculas conlleva un gran esfuerzo siendo las cantidades obtenidas en la mayoría de los casos muy pequeñas 3) si la viscosidad de la muestra es considerable impide alcanzar un equilibrio térmico rápido durante el calentamiento lo cual implicaría el uso de agitación lo que es posible evitar utilizando volúmenes de muestra muy pequeños. Si se aplica todo lo anterior, los calores puestos en juego durante el proceso serán muy pequeños, a esto se une la necesidad de barrer a

velocidades muy pequeñas para así evitar posibles gradientes de temperatura. El conjunto de todas las consideraciones anteriores genera la necesidad de un aparato preciso y sensible lo cual actualmente se tiene gracias a los estudios realizados desde hace más de 30 años (Privalov, P. L., (1964); Wadsö, I., (1970); Sturtevant, J. M., (1974); Mabrey, S. & Sturtevant, J. M., (1978); Privalov, P. L.,(1980)).

Los actuales microcalorímetros (Fig.2.4) de barrido poseen las siguientes características comunes:

1. Carecen de agitación mecánica, evitándose de este modo pérdidas de calor por efecto Joule que podrían ser mayores, incluso al calor que queremos medir en el caso de un líquido con elevada viscosidad.
2. A estos microcalorímetros se les denomina diferenciales ya que lo que realmente se mide es la diferencia en la capacidad calorífica entre dos células idénticas, la de referencia donde se encuentra el líquido patrón (en el caso de proteínas, el disolvente en el que se encuentran disueltas) y la célula de muestra que contiene la disolución objeto de estudio.
3. La medida de capacidad calorífica es realizada de una manera continua calentando o enfriando la muestra a una velocidad constante dentro del intervalo de temperatura determinado, permitiendo registrar de manera continua pequeños cambios en dicha capacidad calorífica lo que genera una información más completa y la automatización del proceso de medida. La principal desventaja es la dificultad de que la muestra se encuentre totalmente en equilibrio térmico (relacionado fundamentalmente con el diseño de las células).
4. Funcionan de modo adiabático, como comprobaremos más adelante.
5. El bloque calorimétrico es fijo, lo que permite una mayor reproducibilidad en los datos.
6. Con el fin de trabajar a temperaturas iguales o superiores a la de ebullición poseen un sistema de presurización que evita la formación de burbujas que influirían de manera drástica sobre la medida.

La medida de capacidad calorífica por medio de un microcalorímetro diferencial de barrido se realiza utilizando el método de compensación. Al comenzar un barrido se suministra a las resistencias eléctricas asociadas íntimamente a la superficie de cada célula, la misma intensidad de corriente cuyo valor está fijado por la velocidad de barrido seleccionada. El método de compensación consiste en el suministro de una potencia eléctrica a la célula de menor temperatura, proporcional a la señal eléctrica recogida por las termopilas situadas en íntimo contacto con la superficie de dichas células. La señal eléctrica se derivada de un efecto térmico que tiene lugar en la célula de muestra como puede ser la desnaturalización de una proteína, la fusión de una bicapa lipídica etc., que se traduce en una diferencia de temperatura entre ambas células. Con el objetivo de mantener la temperatura entre ambas células constante se suministra dicha señal que incrementará la temperatura de una de las células mediante un sistema regulador. La diferencia de potencia que necesita ser aplicada a la célula de muestra por un mecanismo de retroalimentación para mantener el incremento de temperatura (ΔT) igual a cero es seguida continuamente como función de la temperatura y a velocidad de barrido constante. Esta potencia eléctrica diferencial (generalmente dada en $\mu W = \mu J/s$ o $\mu cal/s$) es directamente proporcional a la diferencia de capacidad calorífica entre ambas células ($\mu J/grad$ o o $\mu cal / grad$ o) constituyendo la magnitud fundamental medida en este instrumento. La adiabaticidad del sistema se consigue recubriendo ambas células por dos corazas concéntricas (coraza interna y externa) que las separan del medio exterior y cuya temperatura, siempre muy próxima a la de las células, está controlada por un sistema de retroalimentación similar al ya descrito anteriormente. Se han utilizado dos modelos comerciales de microcalorímetros para la realización de los experimentos recogidos en la memoria de esta tesis, DASM-4 y VP-DSC de reciente adquisición. Cada uno presenta características propias que los hacen más adecuados según el sistema que se esté estudiando. A continuación voy a hacer una breve descripción de las características más significativas de ambos calorímetros.

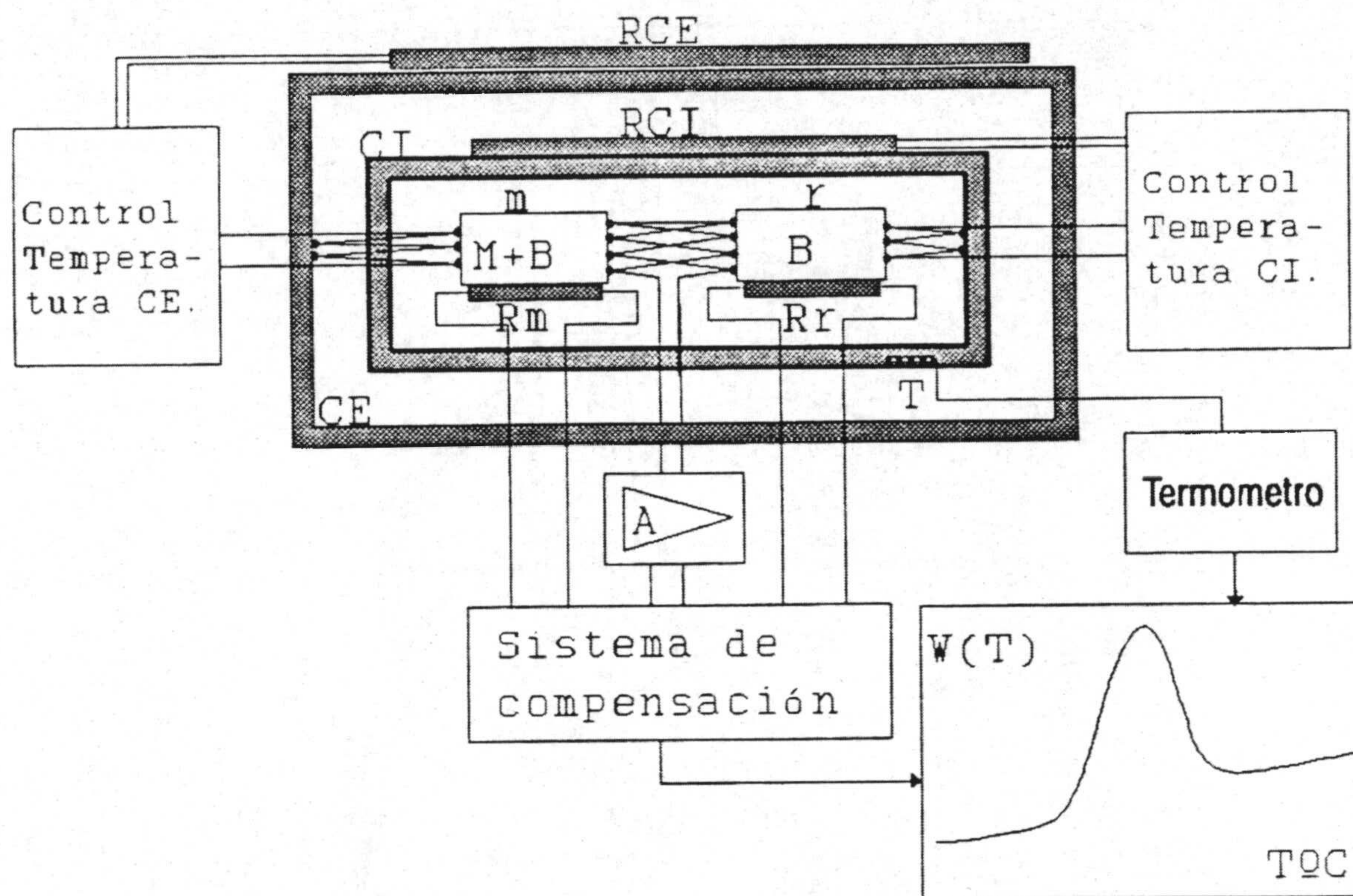


Fig. 2.4.- Esquema de los elementos que constituyen un calorímetro diferencial de barrido tipo DASM, Biopribor, Scal o VP-DSC. Célula de muestra (m), célula de referencia (r), muestra (M), tampón (B), resistencia de la coraza externa (RCE), resistencia de la coraza interna (RCI), coraza interna (CI), coraza externa (CE), resistencia de la célula de muestra (R_m), resistencia de la célula de referencia (R_r), amplificador (A).

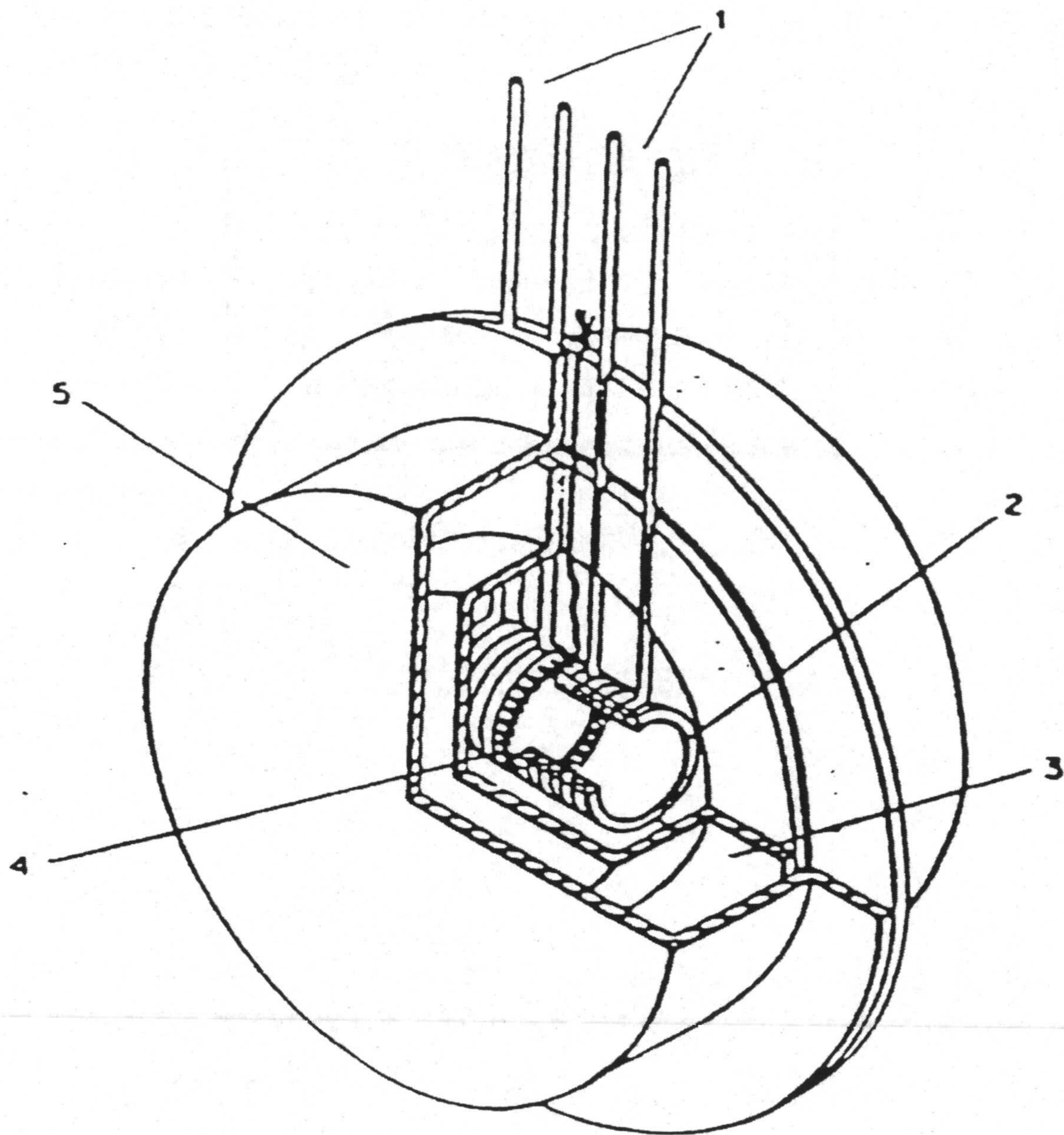


Fig.2.5.- Bloque calorimétrico correspondiente al microcalorímetro diferencial de barrido DASM-4. (1) Capilares de platino para llenado y limpiado de las células, (2) calentador de las células capilares, (3) coraza interna, (4) termopila, (5) coraza externa.

DASM-4 (Differential Adiabatic Scanning Microcalorimeter) de fabricación rusa, diseñado por el Dr. P.L. Privalov (Privalov, 1980). La característica principal de éste microcalorímetro es la geometría de sus células, las cuales son capilares de platino de 1.2 mm de diámetro interno que se encuentran formando una hélice compacta. Están situadas dentro del bloque adiabático constituido por dos corazas metálicas concéntricas como se ilustra en la Fig.2.5.

De la geometría de estas células se desprenden ciertas ventajas como son la facilidad de llenado sin formación de burbujas, no existe convección térmica en el calentamiento que es una de las principales fuentes de artefactos en este tipo de calorimetría y proveen un campo térmico más homogéneo sin apenas gradientes de temperatura en los líquidos en estudio, lo cual permite la utilización de velocidades de barrido mayores que repercute directamente en la sensibilidad del aparato. Como se observa en la figura, el llenado de las células se realiza a través de dos capilares de platino. El bloque calorimétrico es totalmente hermético lo que permite trabajar con una sobrepresión, de 1 atm de aire, que permite evitar la ebullición del líquido en las células y la posible formación de microburbujas.

El volumen de las células es de 0.5 mL, el intervalo de temperatura operacional va desde -23 a 127 °C, las velocidades de barrido se encuentran dentro del intervalo de 0.1-2.0 (°C/min), el nivel de ruido se encuentra situado en 0.2 μ W y por último el error relativo en la determinación de la capacidad calorífica se encuentra situado alrededor del 0.0005 % (datos tomados de Privalov, P. L. & Potekhin, S. A., (1986)). Éste calorímetro no trabaja de forma cíclica, es decir, es necesario para cada barrido parar e iniciar de nuevo, manualmente. La adquisición de los datos se realiza mediante un ordenador conectado directamente al calorímetro a través de un conversor analógico-digital.

El segundo tipo de calorímetro de barrido utilizado es el VP-DSC (Valery Plótnikov Differential Scanning Calorimeter) de reciente adquisición por parte de nuestro grupo (Fig.2.6). Posee importantes diferencias y ventajas sobre el anteriormente descrito. En primer lugar la geometría de las células es radicalmente diferente, en forma de moneda, conectada a los tubos de llenado de 1.5 mm de diámetro interno, como si de un chupachús se tratara, dicha geometría no presenta las ventajas ya descritas anteriormente para las células del DASM-4. Las células están hechas de una aleación de tántalo denominada comercialmente Tantaloy 61, cuyas propiedades químicas se asemejan en gran medida a las del cristal, siendo inerte a una gran cantidad de sustancias, en especial a casi todos los ácidos.

El volumen efectivo de las células es de 0.532 mL, el intervalo de temperatura en el que puede trabajar va desde $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, la velocidad de barrido puede variar desde 0 a 2 grad/min tanto en modo de incremento de temperatura o calentamiento así como de descenso de temperatura o enfriamiento, en éste último caso en forma no adiabática. Utiliza un mecanismo interno peltier, de manera que no requiere dispositivos externos de calentamiento o enfriamiento. Este calorímetro permite trabajar en modo isoterma (isoscán, temperatura constante) muy conveniente si lo que se pretende es el seguimiento de cinéticas o determinación de la estabilidad de cualquier droga o compuesto químico, solo limitado por el espacio o memoria de la que disponga el disco duro. Para trabajar a temperatura igual o superior a la de ebullición el VP-DSC ha sido diseñado con un sistema de presurización que permite el uso de presiones que oscilan desde 0 a 35 psi, evitando la ebullición de la muestra. Las principales ventajas de este calorímetro se basan en el gran avance en sensibilidad, reproducibilidad, estabilidad y mejora de la adiabaticidad (asegurada por medio de dos corazas, interna y externa de geometría cilíndrica). El ruido como la repetitividad del sistema han sido mejorados un orden de magnitud, permitiendo obtener resultados de mayor calidad incluso con $50\text{ }\mu\text{g}$ de proteína en la célula de muestra, algo impensable con las anteriores generaciones de calorímetros. Por otro lado, posee el software adecuado para ser programado, de manera que es posible recoger sucesivas líneas base sin necesidad de rellenar cada vez el calorímetro. Por último el VP-DSC es el primer calorímetro que permite la selección por parte del operador del tiempo de respuesta, entre 5 y 30 segundos. Este punto es de gran importancia ya que en transiciones anchas, bastante comunes en proteínas, y en las que se requiere una alta sensibilidad para resolver el pico, es aconsejable el uso de tiempos de respuesta mayores. Por el contrario en transiciones agudas es conveniente el uso de un tiempo de respuesta corto para no distorsionar el termograma.

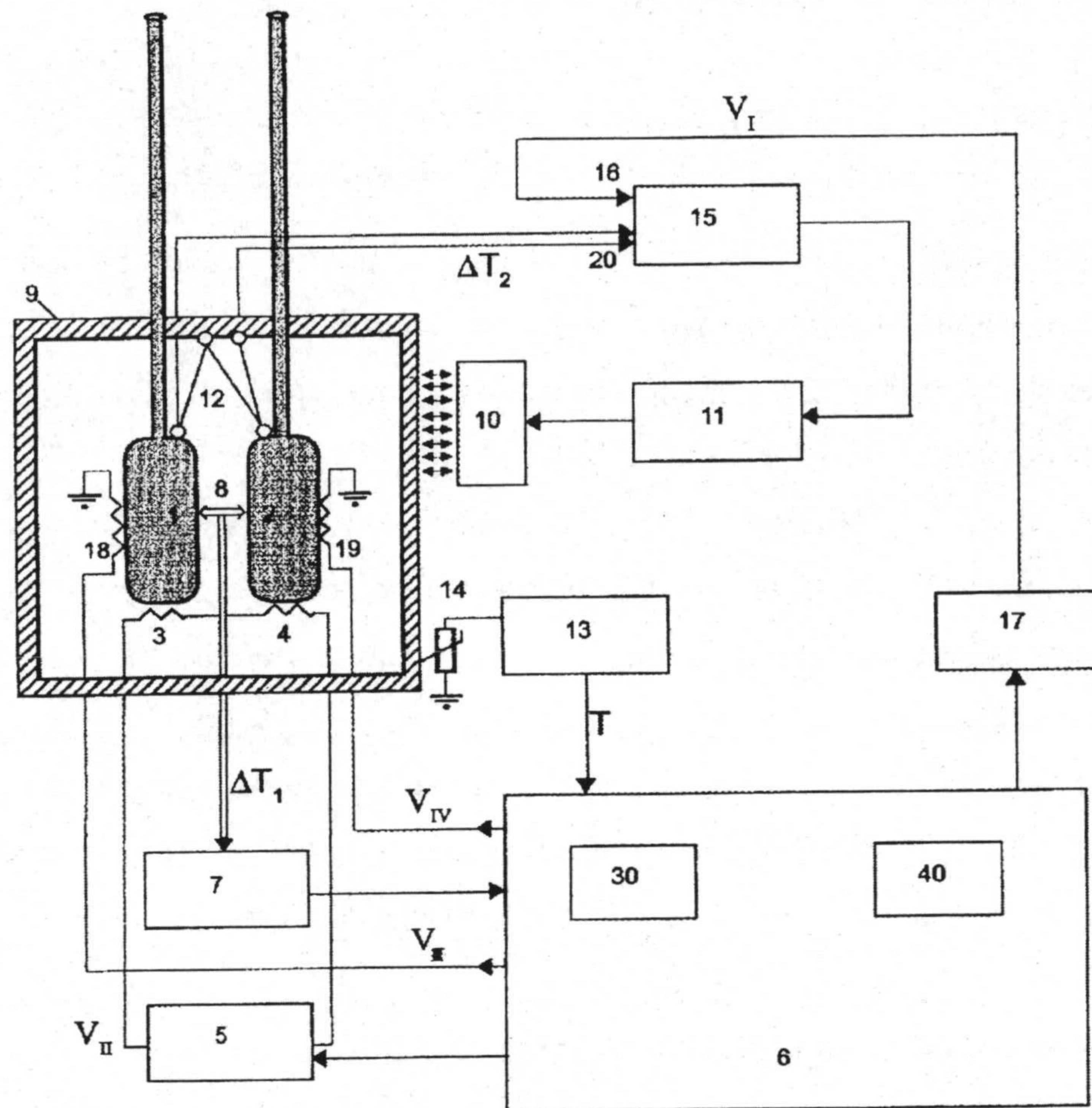


Fig.2.6.- Esquema del calorímetro diferencial de barrido VP-DSC (Plotnikov & Brandts, 1997). (1,2) Células de muestra y referencia. (3,4) Calentadores principales situados sobre las células, controlados por el voltaje V_{II} de la fuente de alimentación (5), conectada a su vez al computador (6) a través de una tarjeta conversora A/D (30). Elementos auxiliares de calentamiento (18,19), activados por medio de la tarjeta A/D (30), utilizados en la calibración y en el modo de retroalimentación. Dispositivo de medida del efecto térmico (7), sensor de cristal (8), ambos utilizados para la medida de la diferencia de temperatura entre células ΔT_1 . Coraza adiabática (9) provista de dispositivos de calentamiento y enfriamiento (10) dirigidos por un controlador (11), que responde a la señal procedente de un sistema amplificador (15), el cual recibe a su vez otra señal entrante (20) procedente del sensor (12) que mide la diferencia de temperatura entre las células y la coraza ΔT_2 . El terminal (16) recibe un voltaje V_I de la fuente de alimentación (17), a su vez controlada por el computador a través de una tarjeta A/D (30). A su vez la coraza posee un dispositivo para la medida de temperaturas absolutas (13) mediante un sensor (14) situado sobre la coraza de modo que la señal saliente de él pasa por el computador a través de la tarjeta A/D (30). El computador mediante el programa que posee, permite almacenar en su memoria (40) de modo continuo y en los intervalos dispuestos por el operador las señales calibradas de la diferencia de temperatura entre las células y la diferencia de temperatura entre éstas y la coraza ($\Delta T_1, \Delta T_2$) así como la temperatura absoluta.

2.2.2.3.- Realización del experimento en DSC.

A. Preparación del experimento.

Las muestras utilizadas en todos los experimentos realizados por medio de DSC independientemente del tipo de calorímetro, se prepararon de igual modo tal y como se describe en el apartado 2.2.1 teniendo especial cuidado en el filtrado de las mismas así como en la comprobación del pH.

Un factor determinante a la hora de realizar un experimento calorimétrico es la concentración de las muestras la cual debe ser determinada de manera precisa ya que un error mínimo repercutiría en la determinación del cambio de entalpía introduciendo una gran variación.

En general, las muestras de proteína deben prepararse de manera que se garantice la pureza e integridad de la proteína así como las condiciones experimentales con el fin de hacer lo más reproducible posible los experimentos.

B. Determinación de la línea base instrumental

Idealmente, si las dos células del calorímetro fuesen idénticas, bastaría un solo barrido para determinar la diferencia en la capacidad calorífica entre las soluciones de muestra y referencia. No obstante, en la práctica las dos células, aunque gemelas, no son exactamente iguales y por lo tanto es necesario registrar dos barridos con el objetivo de eliminar la contribución a la señal debida a aspectos instrumentales. A esto hay que añadir otro aspecto muy importante como es el diferente comportamiento de cada tampón al interaccionar con las paredes de las células.

Así pues, en primer lugar registramos la línea base instrumental para lo cual llenamos ambas células con el tampón puro (en ausencia de proteína) en el cual hemos disuelto la muestra (Fig.2.7-A). Más tarde esta línea base tampón-tampón será restada al barrido de muestra (tampón-proteína) como especificaré un poco más adelante.

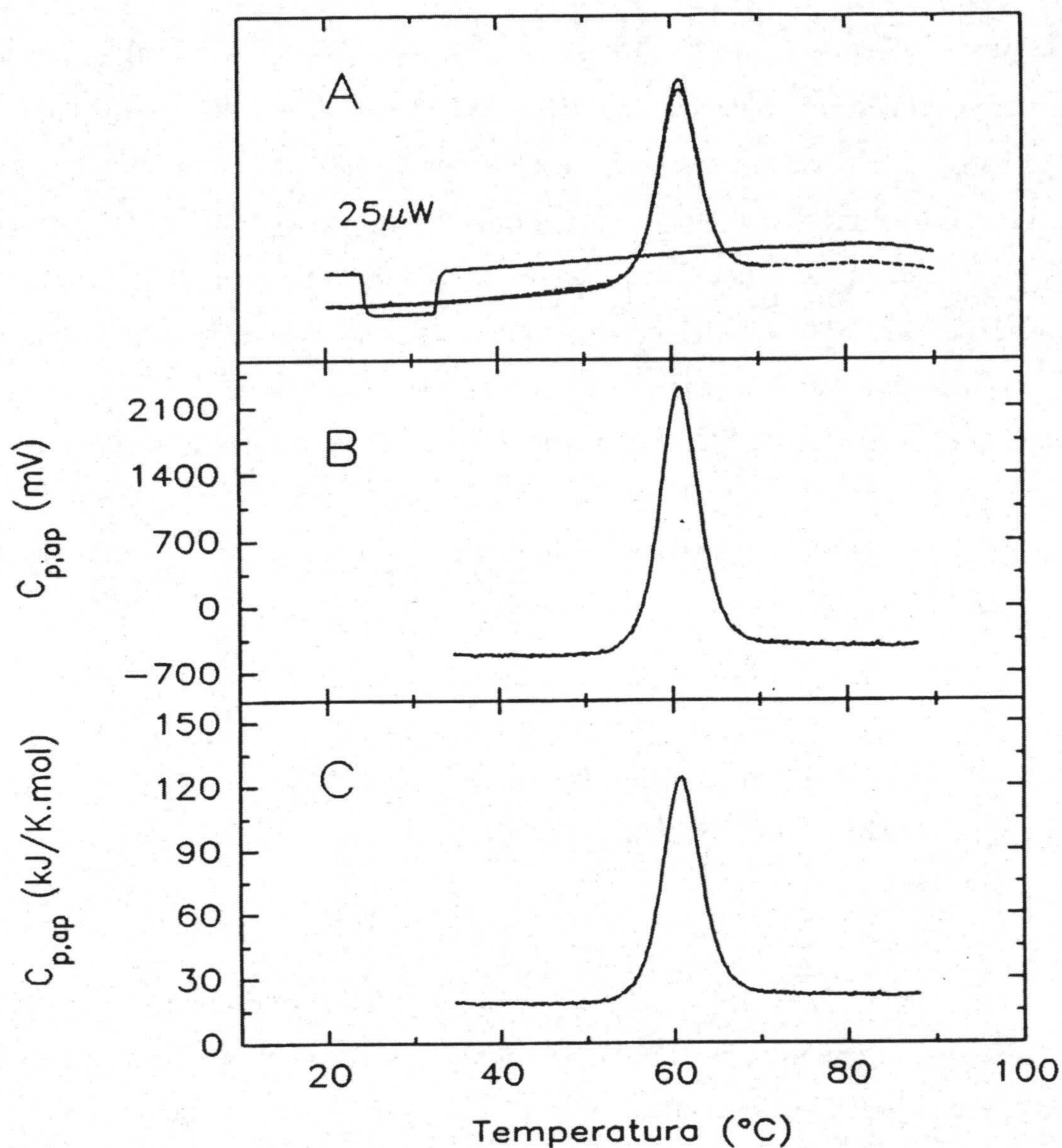


Fig. 2.7.- (A) Perfiles experimentales de capacidad calorífica frente a la temperatura, obtenidos a velocidad de barrido de 1 K / min para Barnasa y 0.5 mM de 3'CMP. En la línea base se muestra un calibrado de 25 μ W. El primer y segundo barrido son casi indistinguibles lo que indica una alta reversibilidad. (B) Resultado de la resta de la línea base instrumental del primer barrido con muestra. (C) Curva convertida a unidades de capacidad calorífica absoluta ($\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$).

C. Calibración eléctrica

La señal de salida de los calorímetros viene expresada en **mV** la cual es posible calibrar administrando una potencia conocida (μW) a una de las células mientras se realiza un barrido de línea base es decir, con las dos células llenas con el tampón de muestra y en las mismas condiciones en las que se realicen el resto de los barridos (Fig.2.7-A). De este modo conocida la potencia suministrada y el efecto sobre la señal determinamos la *constante de calibración* ($\text{mV}/\mu\text{W}$) y así podemos expresar la señal en unidades de potencia (kJ / s). Más adelante teniendo en cuenta el peso molecular y concentración de nuestra proteína así como el volumen de las células y la velocidad de barrido se deduce un *factor de conversión* que nos permite pasar directamente desde mV hasta $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, unidades características de la capacidad calorífica molar, según la siguiente expresión:

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

La asiduidad en la realización del calibrado varía de un calorímetro a otro así en los calorímetros más antiguos como el DASM-4 es necesario realizarlo para cada tanda de experimentos siendo recomendable hacerlo a diferentes potencias suministradas y a diferentes velocidades de barrido por si existiera alguna dependencia con este parámetro. En este caso obtendríamos una constante de calibración, **k** ($\text{mV}/\mu\text{W}$) diferente para cada velocidad de barrido. Por el contrario en los microcalorímetros actuales como VP-DSC, la calibración se realiza automáticamente pudiéndonos olvidar de ella durante 6 meses tal y como aparece en el manual del citado calorímetro. Igualmente en dicho manual se aconseja realizar una calibración de temperatura para lo cual se dispone de dos estándares (parafinas) fijados a unos capilares de acero y cuyos puntos de fusión son 28.2 y 75.9 °C.

D. Termograma de muestra

Antes de realizar cualquier barrido y con el fin de obtener el máximo rendimiento del aparato es necesario seguir un cierto protocolo. Es muy importante antes de empezar un experimento, que se haya establecido la historia térmica del aparato lo que se comprueba realizando sucesivos barridos, con o sin rellenar las células (primero se rellenan ambas células con agua y luego con el tampón puro) hasta obtener el máximo grado de solapamiento entre sucesivos barridos manteniendo siempre el mismo ciclo térmico (igual velocidad de barrido, igual intervalo de temperatura de barrido y el mismo tiempo de equilibración entre el final de un barrido y el comienzo de otro) entre experimentos que se quieran comparar. Así antes de comenzar el barrido de muestra es necesario registrar al menos dos líneas base sucesivas (sin rellenar) cuya separación se encuentre dentro de las especificaciones del aparato, en el caso del VP-DSC la diferencia se sitúa en $\pm 2 \mu\text{cal} / \text{grad}$. El que esto se cumpla será indicativo de que el aparato está estable y su historia térmica no se ha interrumpido.

La obtención del termograma correspondiente a la proteína o barrido de muestra, se realiza llenando la célula de muestra con la solución de proteína y la de referencia con el tampón puro (en ausencia de proteína), calentando en las mismas condiciones que las utilizadas en la obtención de línea base es decir, manteniendo el ciclo térmico.

Para comprobar la concentración de muestra, ésta es medida antes y después de realizar el barrido para así evitar posibles diluciones debidas a que la célula no está totalmente seca lo que introduciría un error en la medida de concentración y en consecuencia sobre la medida de entalpía tal y como he dicho anteriormente.

El perfil típico de DSC para una proteína que sufre una sola transición se corresponde con un solo pico atribuido a la absorción de calor asociada a la desnaturalización de la misma el cual lo podemos observar en Fig.2.7-A. En el caso de proteínas complejas las cuales pueden sufrir más de una transición el termograma obtenido no es tan simple pudiendo ser observados mas de un pico (transiciones) que a menudo solapan en mayor o menor medida. El termograma está compuesto por las capacidades caloríficas de estado nativo, $C_{p,N}$ y desnaturalizado, $C_{p,D}$ correspondientes a la zona pre y postransicional respectivamente tal y como se indica en Fig.2.8 así como los parámetros más significativos que se desprenden de una transición calorimétrica.

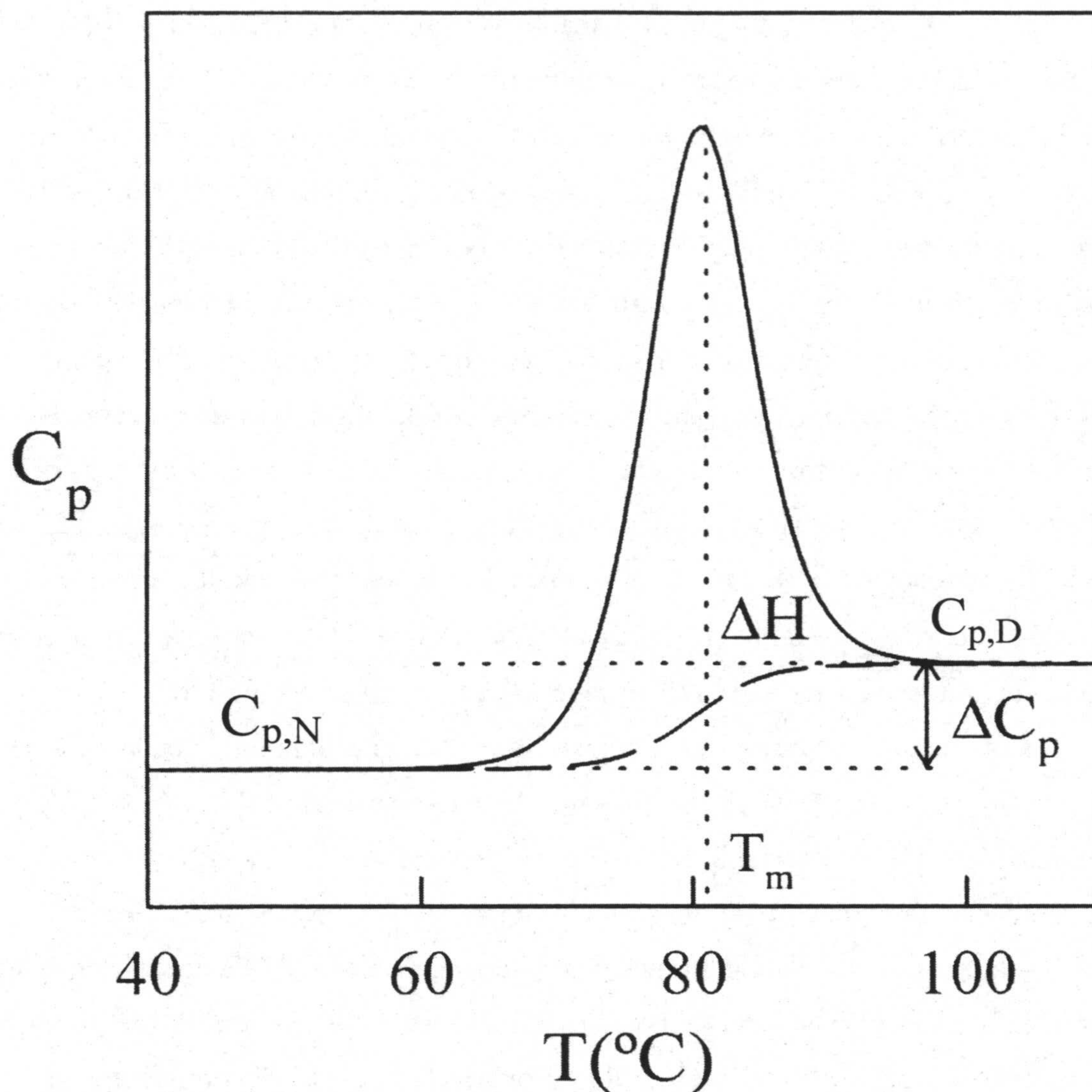


Fig.2.8.- Curva de capacidad calorífica (trazo continuo) en función de la temperatura calculada para una proteína hipotética que despliega según un modelo de dos estados. $C_{p,N}$ representa la capacidad calorífica del estado nativo y $C_{p,D}$ la del estado desplegado. Se representa además, la línea base química (trazo discontinuo). El área encerrada entre las dos curvas equivale a la entalpía de desnaturalización, ΔH . Los parámetros utilizados en la simulación son: $\Delta C_p = 7 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\Delta H = 400 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $T_m = 80^\circ\text{C}$.

E. Segundo Termograma de la muestra

Este segundo termograma se realiza en las mismas condiciones que los barridos anteriores, justo al finalizar el barrido de muestra, sin volver a rellenar las células, enfriando y volviendo a calentar con el objetivo de determinar la reversibilidad de la muestra (ver Fig. 2.7-A). La determinación de la reversibilidad del desplegamiento de la proteína tiene una gran importancia ya que es indicativo de que se está trabajando en equilibrio y por consiguiente es posible aplicar un análisis basado en la termodinámica de equilibrio lo cual no es factible si se trata de una transición irreversible y por tanto cinéticamente controlada como podría ser la agregación de la proteína. La reversibilidad de una muestra se expresa en términos de porcentaje del área recuperada bajo la curva durante el segundo barrido.

2.2.2.4.- Análisis de los datos de DSC según la termodinámica de equilibrio.

2.2.2.4.1.- Preprocesamiento de los termogramas.

El calorímetro está conectado a un computador el cual posee un programa de adquisición de datos los cuales son almacenados en ficheros permitiéndonos su posterior análisis. El programa de adquisición de datos que acompaña al calorímetro VP-DSC (denominado Origin para DSC v. 4.1) es más avanzado que el del DASM-4 (denominado SCAL v. 2.0) facilitando el procesado de los datos. Los ficheros generados por el programa de adquisición de datos contienen el valor de una señal proporcional a la variación de la capacidad calorífica de la disolución de proteína expresada en mV en función de la temperatura. Antes de obtener los parámetros termodinámicos característicos de cada traza es necesario realizar una serie de correcciones previas para eliminar aquellas contribuciones que no se corresponden con la capacidad calorífica debida exclusivamente al desplegamiento de la proteína tal y como paso a describir seguidamente.

A. Resta de la línea base instrumental.

Tal y como he descrito anteriormente es necesario restar del termograma de muestra (proteína-tampón) la línea base instrumental (tampón-tampón) con lo que estaremos eliminando las contribuciones inherentes al instrumento. La traza resultante se corresponde con la capacidad calorífica aparente expresada en mV puesto que hasta el momento no hemos realizado ninguna conversión de unidades (Fig.2.7-B). Esta sustracción va a dar lugar a la obtención de valores negativos de capacidad calorífica lo cual indica que la capacidad calorífica de la referencia (tampón) es mayor que la de muestra (proteína). Esto puede ser explicado sobre el caso de proteína disuelta en un tampón, normalmente se corresponde con una solución acuosa, ésta desplaza un volumen de agua igual al suyo con lo que el volumen de agua en la célula de referencia es mayor que en la de muestra. por otro lado es bien conocido que la capacidad calorífica del agua es superior a la de la proteína y en general a la de cualquier biopolímero conocido.

Es posible obtener la capacidad calorífica molar parcial de la proteína a partir de la diferencia de capacidad calorífica entre muestra y referencia teniendo en cuenta el volumen molar parcial de la proteína determinado por medidas densitométricas (para más detalles ver Privalov & Khechinashvili, 1974) lo cual viene descrito como:

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

donde $\Delta C_{p,ap}$ y $C_{p,s}$ son las capacidades específicas parciales aparentes de la proteína en disolución y del disolvente respectivamente, m_p son los gramos de proteína en la célula e Δm_s la cantidad de disolvente desplazado por la proteína en la disolución. Teniendo en cuenta que:

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

siendo $V_p(T)$ y $V_s(T)$ los volúmenes específicos parciales de la proteína en disolución y del disolvente obtendremos lo siguiente:

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

Podemos considerar que el volumen específico del disolvente en nuestro caso, el agua, es de 1 mL/g y su capacidad calorífica es de 1 cal . K⁻¹ . g⁻¹, de este modo la expresión anterior la podemos transformar como:

$$C_{p,ap}(T) = 4.186 \cdot 10^{-3} \cdot V_p(T) \cdot M + \Delta C_{p,ap}(T) \cdot f \text{ (kJ . K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \quad [2.5]$$

donde **M** corresponde al peso molecular de la proteína en Dalton y **f** es el factor de calibración para la conversión de unidades descrito 2.2.2.3-C.

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

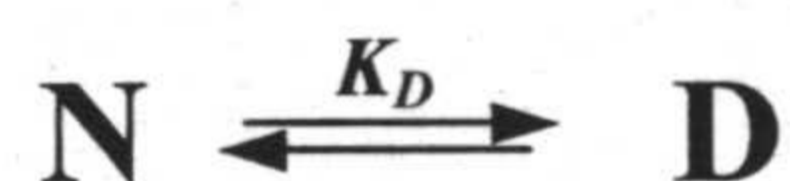
B. Conversión de unidades

Los datos de salida del calorímetro expresados en mV se transforman en unidades de capacidad calorífica (kJ . K⁻¹ . mol⁻¹) por medio del factor de conversión calculado en la sección 2.2.2.3-C, teniendo en cuenta el peso molecular de la proteína su concentración, velocidad de barrido y volumen de las células (Fig.2.7-C). Los actuales calorímetros de barrido como es el caso del VP-DSC simplifican este cálculo bastante ya que como he dicho anteriormente no es necesario realizar el calibrado en cada experimento sino que es realizado de forma automática (el ordenador hace la transformación automáticamente), además la señal de salida no viene expresada en mV sino directamente en microcalorías partido por grado (μcal / grad) en función de la temperatura con lo cual se simplifica ostensiblemente el cálculo anterior.

2.2.2.4.2.- Modelo de estados

Los métodos generales de análisis de los datos de DSC han sido desarrollados desde hace mucho tiempo (Privalov, P. L., (1979); Freire, E. & Biltonen, R. L., (1978); Filimonov, V.V. et al. (1982)(a); Privalov, P, L. et al., (1986) (a)). Estos métodos incluyen el análisis de curvas muy complejas, típicas para proteínas de gran tamaño. En este trabajo hemos analizado curvas de proteínas pequeñas (peso molecular <15000 Da) por lo que, vamos a desarrollar los métodos de análisis utilizados generalmente para proteínas de este tipo.

La característica más importante del desplegamiento de pequeñas proteínas, inducido tanto por temperatura como por sustancias desnaturizantes, es su ajuste a un modelo denominado "*modelo de dos estados*". La aplicación de este modelo a procesos de equilibrio implica la existencia de solo dos estados macroscópicos poblados a cualquier temperatura, en el caso de proteínas se corresponden con el estado nativo y desplegado. El resto de los estados accesibles para la cadena polipeptídica, por ejemplo estados de transición, están poco poblados. Este modelo se describe según la siguiente ecuación de equilibrio:



Donde. K_D es la constante de equilibrio descrita en función de las concentraciones de los estados nativo [N] y desplegado [D] según la siguiente ecuación:

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad [2.6]$$

La **fracción de proteína** correspondiente al estado desnaturizado se define como:

$$f_D = \frac{[D]}{[N] + [D]} = \frac{K_D}{1 + K_D} \quad [2.7]$$

y la fracción de las moléculas correspondiente al estado nativo:

$$f_N = \frac{[N]}{[N] + [D]} = \frac{1}{1 + K_D} \quad [2.8]$$

Siendo $f_D + f_N = 1$ con lo cual se cumple la ley de conservación de las masas.

Conocidas las fracciones o poblaciones de cada estado es posible determinar cualquier parámetro del sistema expresándolo como sigue:

$$\langle X \rangle = f_N \cdot X_N + f_D \cdot X_D \quad [2.9]$$

Para el caso concreto de la entalpía, potencial termodinámico del sistema, la ecuación anterior se transformaría en:

$$\langle H \rangle = f_N \cdot H_N + f_D \cdot H_D \quad [2.10]$$

Introduciendo el estado nativo como el estado de referencia y considerando los incrementos de los parámetros termodinámicos con respecto a este estado, la ecuación [2.10] se transformaría de nuevo en:

$$\langle \Delta H \rangle = f_D \cdot \Delta H_D = \frac{K_D}{1 + K_D} \cdot \Delta H_D \quad [2.11]$$

donde ΔH_D es el incremento de entalpía del estado desplegado sobre el nativo.

Es bien conocido que la derivada de la entalpía con respecto a la temperatura se corresponde con la capacidad calorífica. Por lo tanto la derivada del incremento de entalpía (ecuación [2.11]) nos permite obtener el incremento de capacidad calorífica tal y como se describe en la siguiente ecuación:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \left(\frac{\partial \langle \Delta H \rangle}{\partial T} \right)_p = \frac{\left(\frac{\partial K_D}{\partial T} \right)_p}{(1 + K_D)^2} \cdot \Delta H_D + \left(\frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} \right)_p \cdot \frac{K_D}{1 + K_D} \quad [2.12]$$

Teniendo en cuenta que la variación de la constante de desnaturalización con la temperatura viene descrita por la ecuación de van't Hoff como:

$$\left(\frac{\partial \ln K_D}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H_D}{R \cdot T^2} \quad [2.13]$$

junto con la ecuación de Kirchoff la cual describe la diferencia de capacidad calorífica entre el estado nativo y el desnaturalizado según:

$$\Delta C_{p,D} = \left(\frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} \right)_p \quad [2.14]$$

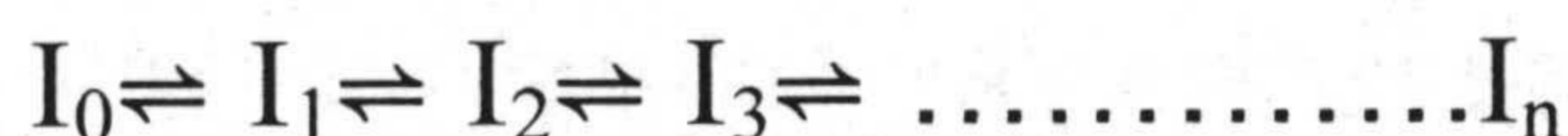
la ecuación quedaría definitivamente expresada como:

$$C_p - C_{p,N} = \langle \Delta C_p \rangle = \frac{K_D}{(1 + K_D)^2} \cdot \frac{\Delta H_D^2}{R \cdot T^2} + \Delta C_{p,D} \cdot \frac{K_D}{1 + K_D} \quad [2.15]$$

$\text{----- } \Delta C_{p,\text{exc.}} \text{-----} \quad \text{----- } \Delta C_{p,\text{int.}} \text{-----}$

$$C_p = C_{p,N} + \Delta C_{p,int.} + \Delta C_{p,exc.} = \Delta C_{p,int.} + \Delta C_{p,exc.} \quad [2.16]$$

Una vez restada la línea base instrumental el perfil resultante es suma de dos contribuciones; 1) la debida al desplegamiento de la proteína descrita por $\Delta C_{p,exc.}$ y 2) la contribución de la **capacidad calorífica intrínseca** ($C_{p,int.}$) de la mezcla de los diferentes estados de la proteína que podría ser descrito como:



donde el estado nativo es representado por $n = 0$ habiendo un total de n estados.

Tomando siempre como estado de referencia el nativo tenemos que :

$$\langle C_{p,int.} \rangle = \sum_{i=0}^n \Delta C_{p,i} \cdot f_i \quad [2.17]$$

donde $C_{p,i}$ es el incremento de capacidad calorífica del estado i respecto del nativo a una temperatura dada y f_i es la fracción presente del estado i a esa temperatura.

Los métodos tradicionales de análisis de las curvas de DSC incluyeron etapas preliminares de aproximación para $\Delta C_{p,int.}$ con el fin de determinar el $\Delta C_{p,exc.}$ y posteriormente integrarla determinando el calor de reacción o cambio de entalpía entre dos estados ΔH . Vamos a considerar el caso concreto de un sistema clásico en los estudios de desplegamiento de las proteínas globulares, la lisozima de clara de huevo de gallina. Como se ve en Fig.2.9-A la capacidad calorífica del estado plegado, $C_{p,N}$, es aproximadamente una función lineal de la temperatura. A partir de 45 ° C comienza el proceso de desplegamiento el cual produce un pico de absorción calorífica bastante alto y agudo. Al terminar dicho proceso tenemos la proteína en estado desplegado el cual también se puede aproximar a una función lineal. Los métodos clásicos de análisis para curvas de este tipo se caracterizan por utilizar aproximaciones lineales para $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ a partir de las cuales es determinada $C_{p,int.}$ (Fig.2.9-B). Actualmente se utiliza el método de Takahashi & Sturtevant (1981), en el que $C_{p,int.}$ varía entre los niveles pre y

post-transicionales de forma proporcional al calor absorbido a cada temperatura siguiendo la ecuación:

$$C_{p,int} = C_{p,N} + (C_{p,D} - C_{p,N}) \left[\frac{\Delta H}{\Delta H_t} \right] \quad [2.18]$$

donde ΔH es el calor desarrollado hasta esa temperatura e ΔH_t es el calor total de la transición.

La capacidad calorífica intrínseca, $C_{p,int}$, es la responsable de que las zonas de la curva correspondientes a la pretransición ($C_{p,N}$) y postransición ($C_{p,D}$) se encuentren a diferente altura. La resta de la contribución de $C_{p,int}$ de la curva de C_p genera $\Delta C_{p,exc}$ (Fig.2.9-C) donde la zona pretransicional y posttransicional se encuentran situadas a la misma altura ($C_p = 0$). Un termograma corregido consiste en la representación de la capacidad calorífica de exceso ($\Delta C_{p,exc}$) frente a la temperatura es decir, es la capacidad calorífica debida exclusivamente al desplegamiento de la proteína sin ninguna otra contribución. La integral $\Delta C_{p,exc}$ determina el efecto térmico de la transición es decir, el cambio de entalpía entre los dos estados, nativo y desnaturalizado (ΔH).

El $\Delta C_{p,exc}$ determinado de este modo puede ser utilizado para estimar la "entalpía de van't Hoff" aplicando la ecuación de éste último;

$$\ln K_D = -\frac{\Delta H_{N,D}^{vH}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \quad [2.19]$$

$$\Delta H_{N,D}^{vH} = 4 \cdot R \cdot T_m^2 \cdot \frac{C_p^m}{\Delta H_{N,D}^{cal}} \quad [2.20]$$

donde C_p^m es la capacidad calorífica de exceso a la $T = T_m$ medida sobre la línea base química. El cociente $\frac{C_p^m}{\Delta H_{N,D}^{cal}}$ no depende de la proteína presente en la célula de medida del calorímetro ni de su peso molecular pero sí es sensible a la anchura de la transición. Así, el valor de la entalpía de van't Hoff no está afectado por posibles errores

relacionados con la medida de concentración de la macromolécula y puede obtenerse incluso, cuando se desconozca el peso molecular de la misma.

Es posible determinar el efecto térmico o entalpía calorimétrica, ΔH_{cal} , por integración de la variación de la capacidad calorífica de exceso, ΔC_{pexc} , sin necesidad de utilizar un modelo concreto de transición, simplemente conociendo la curva calorimétrica en la que el estado nativo y desplegado están bien definidos. La entalpía de van't Hoff, ΔH^{VH} , se calcula suponiendo un modelo concreto de transición, en nuestro caso el modelo de dos estados monomolecular. Comparando ΔH_{cal} con ΔH^{VH} es posible juzgar, si el modelo de transición supuesto es verdadero o falso. Para una gran mayoría de proteínas globulares, los valores de ΔH_{cal} y ΔH^{VH} coinciden con alta precisión lo que significa que éstas se despliegan según el modelo de dos estados. Basándonos en esta observación, se pueden proponer otros métodos del análisis de las curvas calorimétricas utilizando algoritmos de ajuste no lineal junto con modernos programas computacionales que facilitan la utilización de dichos algoritmos.

2.2.2.4.3.- Algoritmos de ajuste de las curvas calorimétricas.

Es bastante fácil analizar la curva de desplegamiento de lisozima (Fig.2.9-A) por medio de los métodos tradicionales debido principalmente a dos razones: 1) La dependencia con la temperatura de las capacidades caloríficas del estado nativo y desplegado pueden ser medidas en un intervalo de temperatura bastante amplio permitiendo extrapolar estas funciones, principalmente en la región de la transición, con alta precisión 2) el pico de transición es bastante alto y por lo tanto, el valor de ΔC_{pexc} es grande y muy superior al valor de $\Delta C_{\text{p,D}}$, con lo cual, cualquier error en la determinación de C_{pint} según el método de Takahasi & Sturtevant no debe producir un gran error en el cálculo de ΔC_{pexc} . En conclusión, la aplicación del método tradicional así como la del resto de los métodos de ajuste dan resultados prácticamente iguales. Pero en el caso de proteínas de tamaño, inferior a la lisozima, las curvas de DSC son más bajas y anchas por lo que en la mayoría de las ocasiones no es posible hacer las aproximaciones correctas con respecto a $C_{\text{p,N}}$ y $C_{\text{p,D}}$ sin introducir grandes errores e incertidumbres. En estos casos, los métodos de ajuste son los únicos que permiten la obtención de los parámetros termodinámicos a partir de las curvas de DSC como veremos más adelante en los sistemas que hemos estudiado.

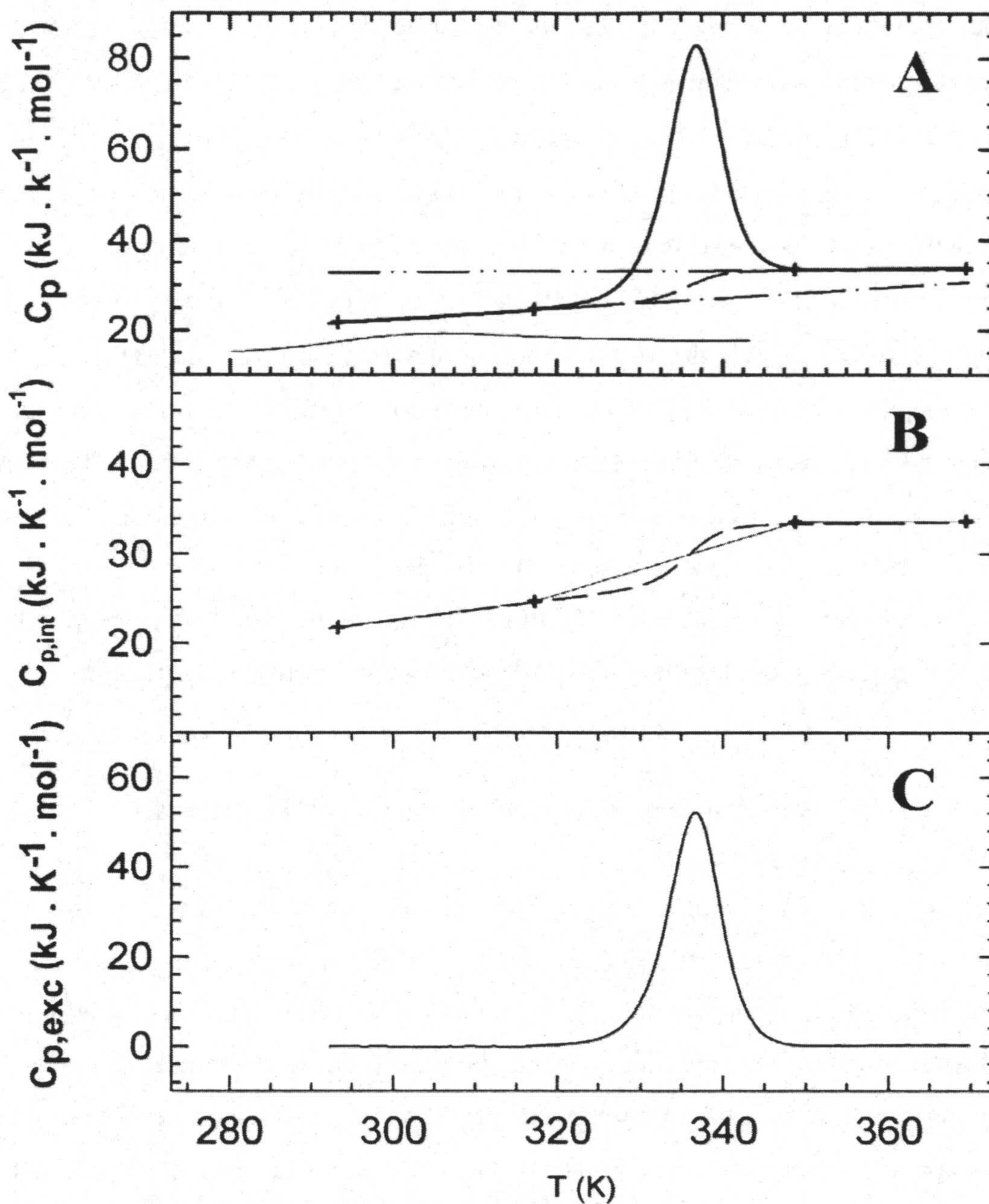


Fig. 2.9.- A) Dependencia de la capacidad calorífica con la temperatura para lisozima a pH 2.5 y 2.17 mg/mL de concentración (—). En ella también es mostrada la dependencia lineal para $C_{p,N}$ (-•-) y $C_{p,D}$ (-••-). La función de la capacidad calorífica interna, $C_{p,int}$, es representada como (- - -). En rojo se destaca la capacidad calorífica de la proteína 434 Cro a pH 3.0 la cual no presenta pico alguno por estar desplegada a estas condiciones. B) Detalle de $C_{p,int}$ (- - -) junto con la primera aproximación a una línea recta (—). C) Capacidad calorífica de exceso, $C_{p,exc}$, obtenida por diferencia entre la C_p descrita en A) y la $C_{p,int}$ B). Métodos de ajuste basados en los parámetros: ΔH_m , T_m y $\Delta C_{p,D}$.

Como se ve en las ecuaciones [2.8, 2.13] las poblaciones de los estados dependen de la constante de equilibrio y ésta de la temperatura. Cuando la temperatura se corresponde con la temperatura de transición, T_m , que se define como aquella para la cual $K_D = 1$, $f_N = f_D = 0.5$ y $\Delta G_D(T_m) = 0$ y teniendo en cuenta que:

$$\Delta G_D = R \cdot T \cdot \ln K_D = \Delta H_D - T \cdot \Delta S_D \quad [2.21]$$

se deduce que la variación de la entropía se determina de modo más simple como:

$$\Delta S_{D,m} = \frac{\Delta H_{D,m}}{T_m} \quad [2.22]$$

En conclusión a partir de ΔH_m , $\Delta G_D(T_m)$, T_m y $\Delta C_{p,D}$ se pueden expresar el resto de los parámetros termodinámicos incluyendo K_D , f_N y f_D .

Es posible determinar estos parámetros termodinámicos a cualquier temperatura por medio de ciertas relaciones como la de Kirchorff para la obtención de la capacidad calorífica, $\Delta C_{p,D}$, a cualquier temperatura

$$\Delta C_p = \frac{d\Delta H}{dT} \quad [2.23]$$

y la variación de entropía a cualquier temperatura se define como:

$$\frac{d\Delta S}{dT} = \frac{\Delta C_p}{T} \quad [2.24]$$

A partir de la determinación de ambos parámetros (ΔC_p y ΔS) suponiendo $\Delta C_{p,D}$ constante con la temperatura podemos obtener la energía libre de Gibbs y por consiguiente la estabilidad de la proteína:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad [2.25]$$

Observando de nuevo la Fig.2.9-A correspondiente a la lisozima se deduce que las capacidades caloríficas del estado nativo y desnaturalizado presentan pendientes diferentes, así mientras que $C_{p,N}$ aumenta con la temperatura, $C_{p,D}$ permanece casi constante. Esto indica que $\Delta C_{p,D}$ no es constante y como primera aproximación se puede ajustar a una función lineal de la temperatura. Aproximando las capacidades caloríficas a las funciones lineales éstas quedarían definidas como:

$$C_{p,N} = a_{N,r} + b_{N,r} (T - T_r) \quad [2.26]$$

$$C_{p,D} = a_{D,r} + b_{D,r} (T - T_r) \quad [2.27]$$

$$\Delta C_{p,D} = \Delta a_{D,r} + \Delta b_{D,r} (T - T_r) \quad [2.28]$$

Donde $a_{N,r}$ y $a_{D,r}$ son la ordenada en el origen para $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$, $b_{N,r}$ y $b_{D,r}$ representan las pendientes que nos indican su crecimiento lineal con respecto a la temperatura. Ambos tipos de parámetros (a y b) son considerados constantes durante el ajuste.

Al aproximar ΔC_p a una función lineal el resto de los parámetros quedan definidos según las siguientes expresiones:

$$\Delta H_D(T) = \Delta H_{D,m} + \Delta a_{D,m} (T - T_m) + \left(\frac{1}{2} \right) \Delta b_{D,m} (T - T_m)^2 \quad [2.29]$$

$$\Delta S_D(T) = \frac{\Delta H_{D,m}}{T_m} + \Delta a_{D,m} \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) + \Delta b_{D,m} (T - T_m) \quad [2.30]$$

$$K_D(T) = \exp \left[\frac{\Delta S_D(T)}{R} - \frac{\Delta H_D(T)}{RT} \right] \quad [2.31]$$

$$C_p(T) = C_{p,N} + \frac{\Delta C_{p,D} K_D}{(1 + K_D)} + \left(\frac{K_D}{R} \right) \left[\frac{\Delta H_D}{T(1 + K_D)} \right]^2 \quad [2.32]$$

Los algoritmos de ajuste de las curvas individuales funcionan ajustando la curva experimental de capacidad calorífica molar a la ecuación [2.32] por medio de programas comerciales tales como Origin (microCal USA) o Sigma Plot (Jandel USA). El operador elige un conjunto de parámetros ajustables normalmente $\Delta H_{D,m}$ y T_m junto con los parámetros de las funciones $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$, el programa cambiando estos parámetros encuentra el mejor ajuste fácilmente.

El caso hasta ahora descrito correspondiente a la lisozima se puede considerar como modelo gracias a su simplicidad, lo cual no es lo habitual. Nos encontramos con casos más complejos, como el de la proteína represora Cro del fago 434 (capítulo 3), donde no es posible realizar la aproximación lineal con respecto a $C_{p,D}$ ya que se ajusta a una función lineal hasta una temperatura determinada (40°C) donde el ajuste más adecuado debe ser realizado sobre una función cuadrática (Privalov et al., (1989)) es decir ΔC_p deja de ser una función lineal o lo que es lo mismo su variación con respecto a la temperatura deja de ser constante. Por otro lado los parámetros $\Delta H_{D,m}$ y T_m son fáciles de interpretar, incluidos en un sistema de ecuaciones tal y como hemos descrito, relativamente simple. Por ello, los métodos de ajuste basados en estos parámetros son más populares que cualquier otro. No obstante, existen condiciones experimentales para las cuales el parámetro T_m pierde su validez. Bajo ciertas condiciones algunas soluciones proteicas presentan una población de estado nativo, f_N , la cual nunca alcanza el 50% es decir la proteína está más desplegada que plegada. Esto significa que $\Delta G_D < 0$ lo cual implica la búsqueda de otro método de cálculo para determinar los cambios de los parámetros termodinámicos. Con el fin de simplificar las ecuaciones finales, se pueden elegir como parámetros de referencia, dos valores de temperatura, T_h y T_s para los que ΔH_D y ΔS_D son iguales a 0. De hecho, T_s se corresponde con la temperatura de máxima estabilidad de la estructura nativa y por lo que tiene un significado bastante interesante. Basándonos en T_h y T_s las ecuaciones anteriormente descritas se transforman en:

$$\Delta C_{p,D} = \Delta a_{D,r} + \Delta b_{D,r} (T - T_h) \quad [2.33]$$

$$\Delta H_D(T) = \Delta a_{D,h} (T - T_h) + \left(\frac{1}{2} \right) \Delta b_{D,h} (T - T_h)^2 \quad [2.34]$$

$$\Delta S_D(T) = (\Delta a_{D,h} - \Delta b_{D,h} T_h) \ln \left(\frac{T}{T_s} \right) + \Delta b_{D,h} (T - T_s) \quad [2.35]$$

Este modelo es utilizado para la proteína represora Cro del fago 434 la cual se despliega al disminuir el pH (para más detalles ver capítulo 3).

En el caso de pequeñas proteínas, cuando las entalpías de desplegamiento son también bastante bajas y por consiguiente las curvas de desplegamiento son anchas, el análisis individual de éstas puede generar malos resultados. En tal caso se hace necesario la utilización del ajuste múltiple es decir, ajustar al modelo de dos estados

varias curvas al mismo tiempo basándose en las mismas dependencias de temperatura, cambio de entalpía, entropía así como de ΔC_p tal y como podemos ver en los capítulos 3 y 4 de esta tesis correspondientes a los estudios realizados sobre las proteínas ADA-2h y 434 Cro. El ajuste múltiple permite el uso de la información conocida sobre las “líneas base” de algunas curvas para utilizarla sobre otras y de este modo disminuir el número de parámetros ajustables ya que las dependencias de $\Delta H_D(T)$ y $\Delta C_{p,D}(T)$ deben ser iguales para todas las curvas siempre y cuando la estabilidad de la estructura nativa, expresada en cambio de T_m o T_s , varíe sin efectos entálpicos que influyan sobre ΔC_p .

2.2.3.- Calorimetría Isotérmica de Titulación (ITC).

2.2.3.1.- Introducción.

La calorimetría Isotérmica de Titulación es una técnica analítica ampliamente usada en áreas de investigación muy diferentes: química y bioquímica, física y biofísica, biotecnología, biomedicina, farmacología; así como en las industrias de cosméticos y alimentación, procesos de control, etc. Básicamente esta técnica mide directamente el calor liberado o absorbido en una reacción que pone en juego interacciones intermoleculares e intramoleculares; las asociaciones proteína-ligando, proteína-proteína, proteína-ADN/ARN son ejemplos de indudable interés biológico (Ladbury, J. E., 1996) . Si el efecto térmico neto de la interacción es suficientemente grande, la estequiometría, la entalpía de formación y la constante de unión de estos complejos puede determinarse sin ambigüedad. Consecuentemente, la energía de Gibbs de formación del complejo puede calcularse. $\Delta G = -RT \ln K$, y subsiguientemente la entropía del proceso, $\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$. Repitiendo los experimentos de titulación calorimétrica a diferentes temperaturas será posible además determinar el cambio de capacidad calorífica; el valor de este parámetro nos permite estimar los efectos de deshidratación de grupos polares y apolares que acompaña a la formación del complejo.

El éxito de esta técnica se debe a varios hechos relevantes. En principio cualquier interacción libera o absorbe calor. Este calor se mide directamente a presión constante, es decir se mide directamente la verdadera entalpía de la reacción subyacente; esta peculiaridad contrasta con las medidas de una entalpía aparente, deducida de la dependencia de la constante de asociación con la temperatura (ecuación de van 't Hoff), obtenidas con técnicas tales como diálisis en equilibrio, ultrafiltración o

cromatografía de exclusión. Existe una base metodológica y teórica bien establecida para analizar los datos experimentales, incluso de relativamente complejos sistemas (Christensen, J. J. Et al., 1972; Wiseman, T et al., 1989; Freire, E., López-Mayorga, O. y Straume, M., 1990) . Como consecuencia, es posible en muchos casos obtener una caracterización completa de una interacción intermolecular, siendo la única técnica que proporciona simultáneamente la estequiometría y los parámetros termodinámicos.

No obstante, la inespecificidad intrínseca en la detección del efecto térmico y consecuentemente la incapacidad de la titulación calorimétrica para identificar la interacción que origina el calor, se precisa de la ayuda de otras técnicas específicas para interpretar los valores de los parámetros termodinámicos en términos moleculares.

2.2.3.2. - Instrumentación.

Adoptando como criterio de clasificación el principio de funcionamiento, los Calorímetros Isotérmicos de Titulación de elevada sensibilidad utilizados durante las dos últimas décadas en los estudios de interacción de biopolímeros, se engloban en dos categorías o tipos; por un lado aquellos que utilizando un bloque de elevada capacidad calorífica, a temperatura constante, se basan en la conducción de calor a través de los sensores que detectan el efecto térmico producido por la interacción (McKinnon et al., 1984; E. Freire et al., 1990; García-Fuentes et al., 1998; Velázquez-Campoy et al., 2000). Por otro lado, aquellos que podemos llamar adiabáticos porque utilizan el mismo principio que el calorímetro de barrido, previamente descrito, es decir son calorímetros que funcionan por compensación del efecto térmico en un entorno adiabático (Wiseman, T. Et al., 1989).

El primer tipo de calorímetro ITC responde en general a la configuración esquematizada en la figura 2.10 En este diseño se utiliza siempre la configuración diferencial, conocida entre los especialistas de microcalorimetría como principio "Twin" o de células gemelas, en la cual una de las células actúa como vaso de reacción y la otra como referencia. Los efectos térmicos que se producen en cada una de las células se detectan por el correspondiente sensor o termopila; ambos sensores se conectan en oposición, así los efectos comunes accidentales o no deseados que se produzcan con la misma amplitud y velocidad en ambas células, se cancelan en gran parte. En el caso de máxima simetría el experimento se realiza usando dos jeringas idénticas, que contienen uno de los reactivos, frecuentemente el ligando, **L**, disuelto en tampón **B** (normalmente el tampón de la última diálisis de preparación de la disolución

del biopolímero), manteniendo la agitación permanentemente e inyectando simultáneamente en ambas células. La célula de reacción contiene la disolución del otro reactivo, frecuentemente el biopolímero, **M**, mientras que la célula de referencia contiene solo tampón. No obstante algunos de los microcalorímetros de este tipo no incluye ni la inyección bilateral ni la agitación simultánea de ambas células, haciéndose un uso pasivo de la célula de referencia que se suele llenar con agua o el tampón. En estos casos se precisa de un experimento en blanco para determinar los efectos térmicos asociados principalmente a la agitación. En todo caso la medida tiene su fundamento en la ley de Newton del enfriamiento, que establece una sencilla relación de proporcionalidad entre el flujo de calor y la diferencia de temperaturas, como se indica en la figura 2.11, y que se cumple bien para valores pequeños de la diferencia de temperaturas.

Por otro lado las termopilas de semiconductor que se utilizan en estos microcalorímetros son elementos Peltier que cumplen la ecuación de Seebeck y por consiguiente generan una fuerza electromotriz proporcional a la diferencia de temperaturas de sus superficies opuestas. El resultado final, como indica la figura 2.11, es una señal eléctrica proporcional al flujo de calor o potencia térmica neta. La configuración diferencial introduce dos efectos térmicos simultáneos:

$W_{RX}(t) + W_A(t)$ en la célula de medida y ${}^R W_A(t)$ en la célula de referencia, siendo $W_{RX}(t)$ la potencia térmica de reacción y $W_A(t)$ (o ${}^R W_A(t)$ en la referencia) las potencia de efectos accidentales (fluctuaciones de T_s , fricciones, diluciones, etc.). En un sistema diferencial perfecto o sistema "Twin" ideal se cumple que $W_A(t) = {}^R W_A(t)$ y el efecto térmico neto medido sería el correspondiente a la reacción, $W_{RX}(t)$.

Este tipo de microcalorímetros alcanza sus mejores características cuando se implementa un procedimiento de medida por compensación de potencia con elementos Peltier adicionales (Velázquez_Campoy et al., 2000).

El microcalorímetro descrito por Wiseman et al., 1989, figura 2.12, representa una serie de instrumentos comercializados por MicroCal, Inc. y ampliamente distribuidos entre la comunidad científica especializada en estudios tales como interacciones proteína-pequeños ligandos, enzima-inhibidor, proteína-proteína, hormona-receptor, DNA-proteína, lípido-proteína, cinéticas enzimáticas y plegamiento de proteínas.

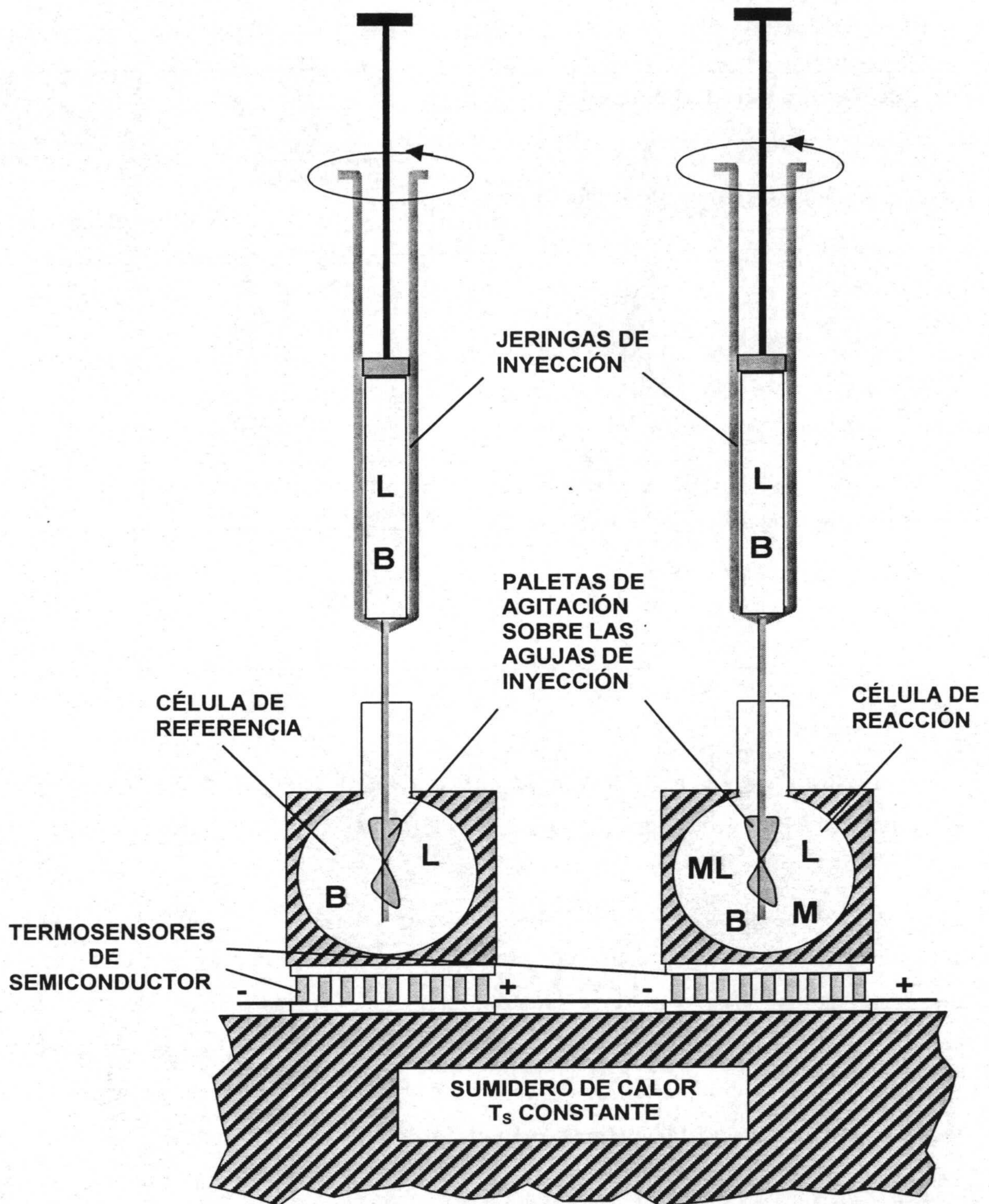


Figura 2.10. - Esquema general de un calorímetro isotérmico de titulación basado en el principio de conducción del calor a través de sensores de baja impedancia térmica. M, L y B representan moléculas de biopolímero, ligando y el Tampón, respectivamente.

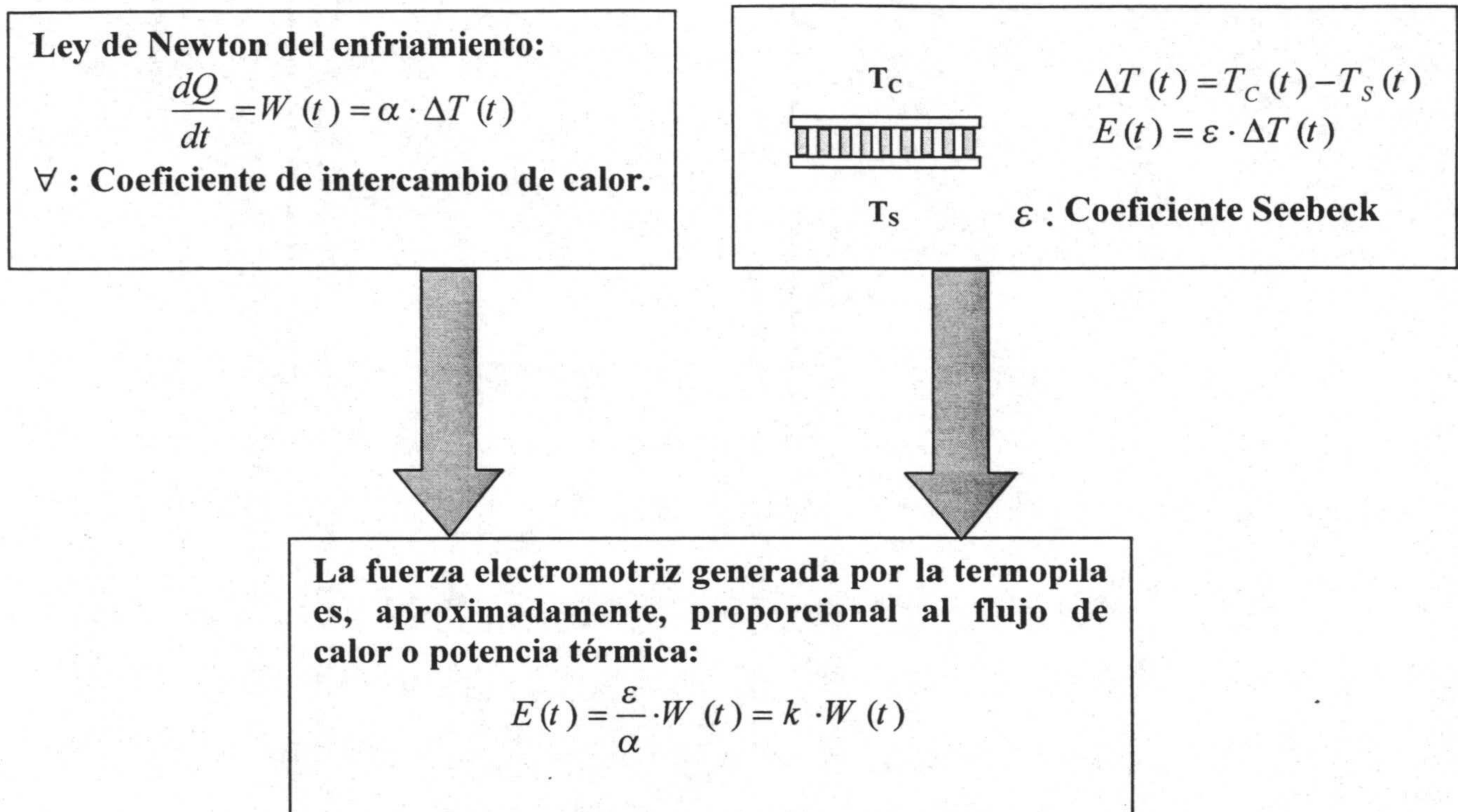


Figura 2.11. - Ley de Newton del enfriamiento y ecuación de Seebeck para un elemento Peltier. Señal eléctrica proporcional a la potencia térmica en cada instante.

Como hemos dicho anteriormente se trata de un calorímetro que funcionan por compensación del efecto térmico en un entorno adiabático. Es un calorímetro diferencial que hace un uso pasivo de la célula de referencia. Ambas células calorimétricas, construidas con la aleación "hastelloy C", tienen forma de cilindros planos (elevada relación base / altura del cilindro) sobre cuyas caras externas se extienden finas termoláminas y cuyas caras internas están en íntimo contacto térmico con un elemento Peltier de 264 uniones PN de cristales de telurio de bismuto. Durante un experimento una pequeña potencia constante, inferior a un milivatio, se disipa en la termolámina de la célula de referencia y se activa el sistema de compensación que iguala las temperaturas de ambas células y produce la línea base experimental. Un efecto exotérmico o endotérmico aparta transitoriamente la potencia de compensación del valor estacionario y se produce un pico característico sobre la línea base de cuya integración extraemos el calor implicado en el proceso. Las células están suspendidas solamente mediante largos tubos de acceso en el interior de un cilindro; con objeto de crear para las células un entorno adiabático la temperatura de este cilindro se controla de

forma que esté en todo momento tan próxima a la temperatura de las células como sea posible; para ello una termopila formada por 20 uniones bimetal mide continuamente la diferencia de temperatura células-cilindro y un sistema de control en lazo cerrado actúa sobre una termolámina distribuida uniformemente por la superficie del cilindro. Agua, circulando desde un baño termostático externo, actúa de foco térmico en el sistema de control de temperatura. Para acentuar la adiabaticidad y eliminar la condensación del vapor de agua (tanto más importante cuanto menor la temperatura de trabajo) se realiza vacío en el interior del cilindro.

El subsistema de inyección / agitación es una de las partes más críticas del instrumento porque de su correcto funcionamiento depende la fiabilidad de los volúmenes de inyección, de 2 a 5 :L en un experimento estándar, la eficacia de la homogeneización de la mezcla reaccionante y un bajo nivel de ruido compatible con la alta sensibilidad requerida para detectar efectos térmicos que típicamente suelen ser de pocas decenas de microcalorías. Las jeringas de inyección son de precisión de vidrio, con volúmenes entre 25 :L provistas de largas agujas de acero inoxidable que tienen en su extremo terminal una pequeña paleta para agitar, figura 2.12.

La jeringa se fija firmemente sobre un dispositivo de rodamiento de muy baja fricción que incluye una rueda estroboscópica usada para mantener constante, mediante un dispositivo electrónico de regulación, la velocidad del motor de agitación y monitorizar la velocidad de rotación. El émbolo de la jeringa está acoplado a un motor a pasos digital de alta precisión, 6400 pasos por pulgada. Todas las variables experimentales dependientes del instrumento, temperatura, número de inyecciones, volumen por inyección, velocidad de rotación del agitador, tiempo entre inyecciones, etc. se programan desde el soporte software que incluye el instrumento y el experimento se realiza de forma completamente automática.

En ambos tipos de microcalorímetros isotérmicos de titulación la señal asociada al efecto térmico transitorio de una reacción no demasiado lenta, tras la inyección de un determinado volumen de uno de los reactivos (generalmente el ligando) sobre el otro reactivo que llena la célula de reacción (generalmente la macromolécula), presenta un pico con la forma característica de la respuesta de un sistema de segundo orden a un pulso de potencia de corta duración (García Fuentes et al., 1998), figura 2.13. El calor correspondiente se obtiene del área delimitada por el pico y la línea base interpolada entre la señal estacionaria previa y posterior a la inyección.

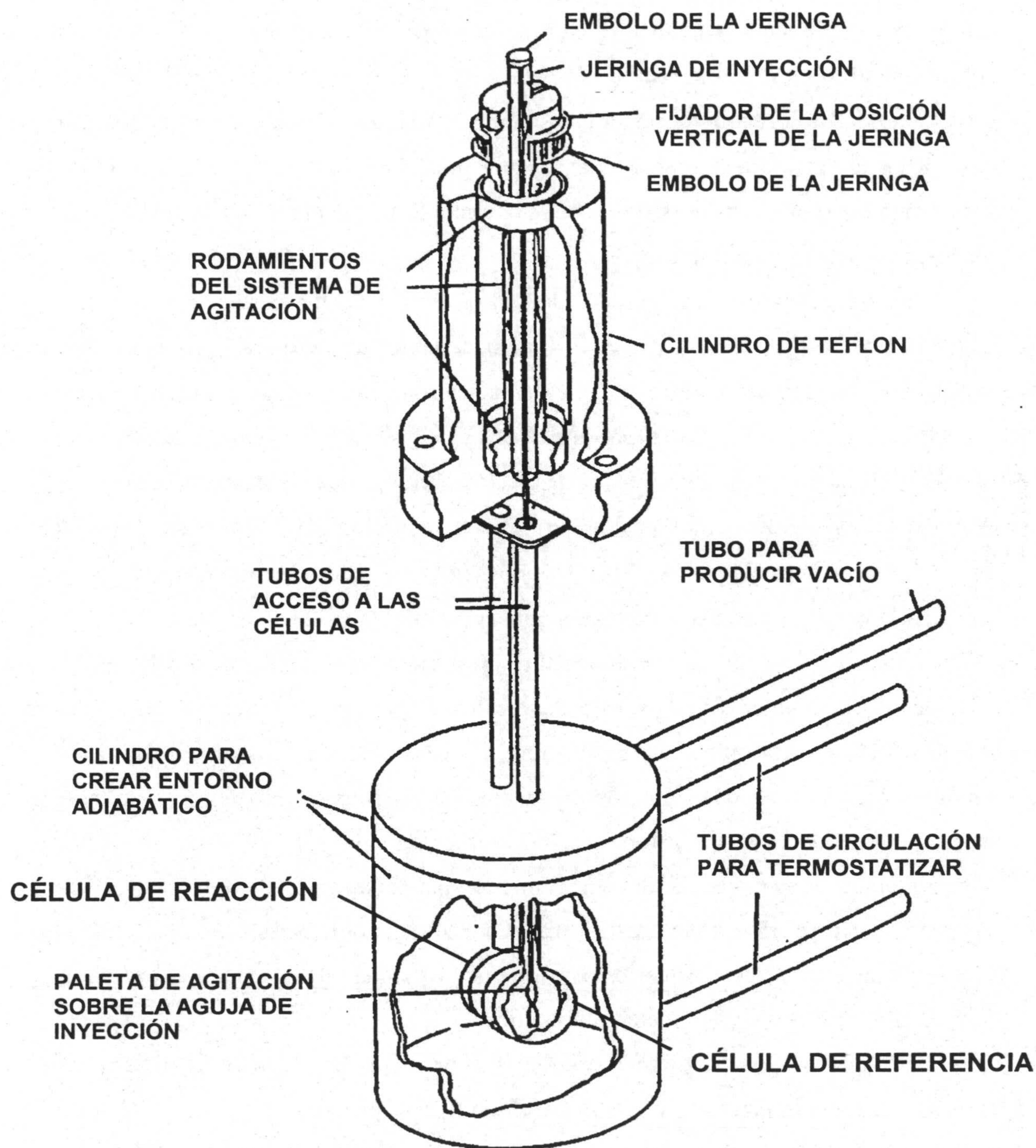


Figura 2.12. - Esquema de las células calorimétricas, cilindro adiabático y el conjunto agitador / inyector de un calorímetro de titulación basado en el principio de medida por compensación del efecto térmico, en un entorno adiabático.

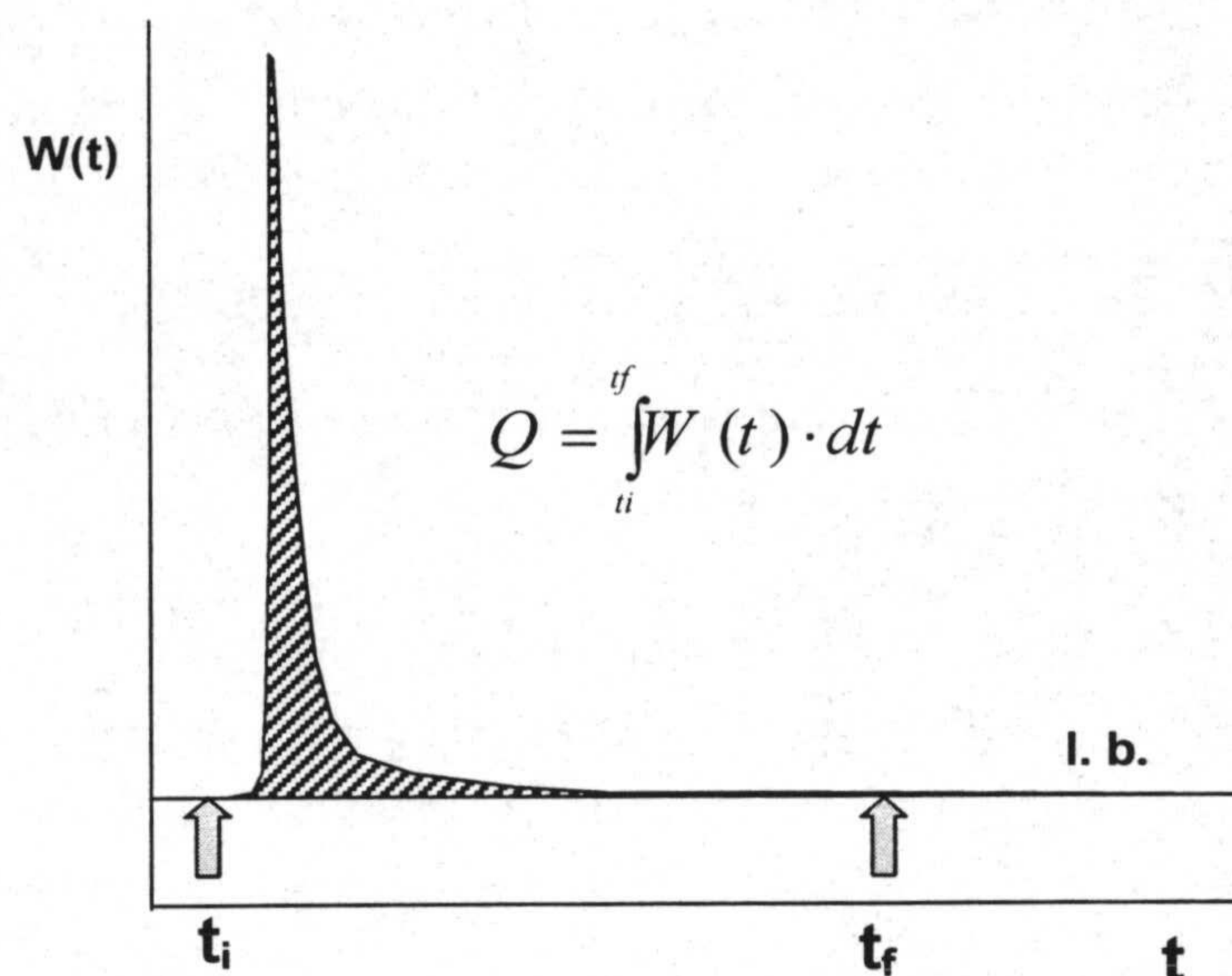


Figura 2.13.- Pico característico de respuesta a una inyección de un reactivo (ligando) sobre otro que llena la célula calorimétrica (proteína). El calor generado en la reacción se obtiene integrando la función $W(t)$ sobre la línea base, l. b.

2.2.3.3.- Formulación y análisis del experimento en ITC.

El diseño de un experimento de interacción macromolécula-ligando, previo a su realización, y el análisis de datos posterior se hacen sobre la base de un modelo de la interacción. En aquellos casos de interacción proteína-ligando que no muestran un efecto cooperativo, positivo o negativo, ni la proteína presenta diferentes clases de sitios de unión para el ligando, el comportamiento del sistema interaccionante se describe adecuadamente a través del modelo de **unión de un ligando a una macromolécula con n sitios idénticos e independientes**. El término “*idénticos*” implica la misma constante de unión microscópica a cualquiera de los n sitios y el término “*independientes*” que la unión a un sitio cualquiera no modifica la afinidad de los restantes. El análisis termodinámico estadístico de un proceso de unión con estas características nos demuestra que la función de partición de unión, que describe las poblaciones de los diferentes estados moleculares accesibles del sistema, es (“Binding and Linkage”, Wyman, J. y Gill, S.J; Gill, S.J et al., 1990).

$$Z = (1 + k [L])^n \quad [2.36]$$

donde k es la constante microscópica aparente del equilibrio de unión, $[L]$ la concentración de ligando libre y n es el número de sitios de unión de la macromolécula para el ligando.

La razón de la concentración de ligando unido, $[L]_b$, a la concentración de macromolécula total, $[M]_T$, conocida como *parámetro de unión*, está relacionada con la función de partición de unión por:

$$\bar{v} = \frac{[L]_b}{[M]_T} = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln [L]} \quad [2.37]$$

$[L]$ representa la concentración de ligando libre en equilibrio con las otras especies moleculares presentes en el sistema interaccionante (M , ML , ML_2 , ..., ML_n). Por consiguiente la concentración de ligando unido por mol de macromolécula para un sistema representado por el modelo de n sitios idénticos e independientes será:

$$\bar{v} = \frac{nk [L]}{1 + k [L]} \quad [2.38]$$

Un experimento convencional en ITC consiste en una serie de inyecciones de un determinado volumen de disolución del ligando, constante o variable, separada cada una por un intervalo de tiempo suficiente para asegurar que se ha alcanzado el equilibrio y se ha transferido o compensado todo el calor liberado o absorbido; la disolución de macromolécula llena completamente la célula de reacción y se agita permanentemente el contenido de ésta (o de ambas células) a velocidad constante. Suponiendo en principio que no existen otros procesos concomitantes, tales como ionización del tampón, en una inyección cualquiera de la serie el calor liberado o absorbido será:

$$q_i = \Delta H_b \left(\frac{\text{kcal}}{\text{mol } L_b} \right) \cdot \Delta(\text{moles } L_b) \quad [2.39]$$

donde L_b representa el ligando unido y ΔH_b es el cambio de entalpía por mol de ligando unido. Si V_C representa el volumen de la célula que coincide con el volumen inicial de la muestra, la ecuación anterior puede expresarse más explícitamente como:

$$q_i = \Delta H_b V_C ([L]_{b,i} - [L]_{b,i-1}) = \Delta H_b V_C (\bar{v}_i [M]_i - \bar{v}_{i-1} [M]_{i-1}) \quad [2.40]$$

Consideramos, en una razonable aproximación, que el volumen efectivo que interviene en la reacción es aquel que llena la célula y por consiguiente las concentraciones de macromolécula y ligando actuales en la célula han de corregirse por las pequeñas cantidades de estos componentes contenidas en el volumen desplazado fuera de la célula; así la concentración actual de M en la célula ($[M]_i = [M] + [ML] + [ML_2] + \dots$) será:

$$[M]_i = [M]_{i-1} \cdot \frac{V_C - V_{in}}{V_C}$$

y la concentración total del ligando en la célula de reacción:

$$[L]_{T,i} = \frac{(V_C - V_{in}) [L]_{T,i-1} + V_{in} [L]_0}{V_C}$$

donde V_{in} y $[L]_0$ son el volumen de inyección y la concentración en jeringa del ligando. El calor total acumulado después de N inyecciones:

$$Q = \sum_{i=1}^N q_i = V_C \cdot [M]_N \cdot \Delta H_b \cdot \bar{v}_N = V_C \cdot [M]_N \cdot \Delta H_b \cdot \frac{nk[L]}{1+k[L]} \quad [2.41]$$

En ITC el valor de la variable $[L]$ no es conocida por lo que operativamente conviene expresarla en función de las variables experimentales $[L]_T$ y Q :

$$[L] = [L]_T - [L]_b = [L]_T - \frac{Q}{V_C \Delta H_b} \quad [2.42]$$

Sustituyendo $[L]$ en la ecuación [2.41] por la expresión [2.42] se obtiene una ecuación de segundo grado en Q cuya solución es:

$$Q = \frac{V_C \Delta H_b}{2k} \cdot \left[1 + k [L]_T + nk [M]_T - \sqrt{(1 + k [L]_T + nk [M]_T)^2 - 4nk^2 [M]_T [L]_T} \right] \quad [2.43]$$

Esta ecuación relaciona el calor total acumulado después de N inyecciones con las variables experimentales V_C , $[L]_T$ y $[M]_T$ y los parámetros n , k y ΔH_b a determinar en el análisis de los datos de un experimento de ITC convencional. Por otro lado la ecuación [2.42] puede describirse como:

$$[L] = [L]_f - [L]_b = [L]_f - [M]_f \cdot \frac{nk[L]}{1+k[L]}$$

y despejando $[L]$ podemos expresar ésta concentración libre de ligando en términos de n , k , $[L]_T$ y $[M]_T$:

$$[L] = \frac{1}{2k} \cdot \left[-(1 + nk[M]_f - k[L]_f) + \sqrt{(1 + nk[M]_f - k[L]_f)^2 + 4k[L]_f} \right] \quad [2.44]$$

Derivando la ecuación [2.43] respecto a $[L]_T$ obtendremos una expresión para el calor por mol de ligando añadido asociado a cada inyección:

$$\frac{1}{V_C} \cdot \frac{dQ}{d[L]_f} \approx \frac{1}{V_C} \cdot \frac{\Delta Q}{\Delta[L]_f} = \frac{\Delta H_b}{2} \left[1 - \frac{1 + k[M]_f\theta - nk[M]_f}{\sqrt{(1 + k[M]_f\theta - nk[M]_f)^2 - 4nk^2[M]_f^2\theta}} \right] \quad [2.45]$$

$$\text{donde } \theta = \frac{[L]_f}{[M]_f}$$

Las figuras 2.14 y 2.15 corresponden a la simulación de un experimento convencional de ITC consistente en 20 inyecciones de 5 μL de una disolución de ligando 5 mM sobre un volumen $V_C = 1.35$ mL de una disolución de macromolécula, inicialmente 1.8×10^{-4} M con un sol sitio de unión para el ligando, $n = 1$. Se consideran cuatro posibles valores de la constante de unión, 2.5×10^6 , 2.5×10^5 , 2.5×10^4 y 2.5×10^3 , que abarcan un intervalo desde una relativa alta afinidad hasta una baja afinidad.

Las ecuaciones anteriores se utilizan para diseñar experimentos, utilizando cualquier parámetro ya medido (estequiometría, afinidad, etc.) o algorítmicamente predicho en base a la estructura, o simplemente valores esperados por analogía con sistemas similares. Siempre que sea posible se seleccionará un valor para $[M]_T$ que

optimice la forma de la isoterma esperada (Wiseman et al.,1989). Así mismo, estas ecuaciones se utilizan como modelo para la determinación de los parámetros termodinámicos n , k y ΔH_b mediante procesamiento por regresión no lineal de los datos experimentales. De las dos posibles formas de tratar los calores experimentales que hemos mencionado, la del calor por mol de ligando añadido asociado a cada inyección tiene la ventaja de evitar la propagación de errores experimentales que se produce en el caso de calores acumulados, por lo que es la forma mas adecuada para el análisis de la isoterma experimental.

Con frecuencia hay intercambio de H^+ entre el tampón y el complejo ML_n durante su formación. La protonación o desprotonación del tampón representa una contribución energética que puede ser mayor que la propia energía de la interacción M-L. Una forma de evitar esta superposición de efectos térmicos, que enmascararían el verdadero valor del cambio de entalpía de la unión, consiste en utilizar un tampón de muy bajo calor de ionización, tales como el Cacodilato y el Glicerol-2-fosfato; pero esto no siempre es factible porque estos tampones pueden interferir compitiendo con el ligando por la unión a la macromolécula, o simplemente el experimento ha de hacerse a un pH fuera del intervalo de tamponamiento eficaz de estos tampones. Otra alternativa para solventar el problema es repetir las valoraciones calorimétricas en tres o más tampones de diferente entalpía de ionización y, o bien extrapolar linealmente las entalpías aparentes obtenidas a entalpía de ionización del tampón nula, o bien incluir en la función de regresión no lineal explícitamente la contribución de la protonación o desprotonación del tampón, de acuerdo con las ecuaciones que planteamos a continuación

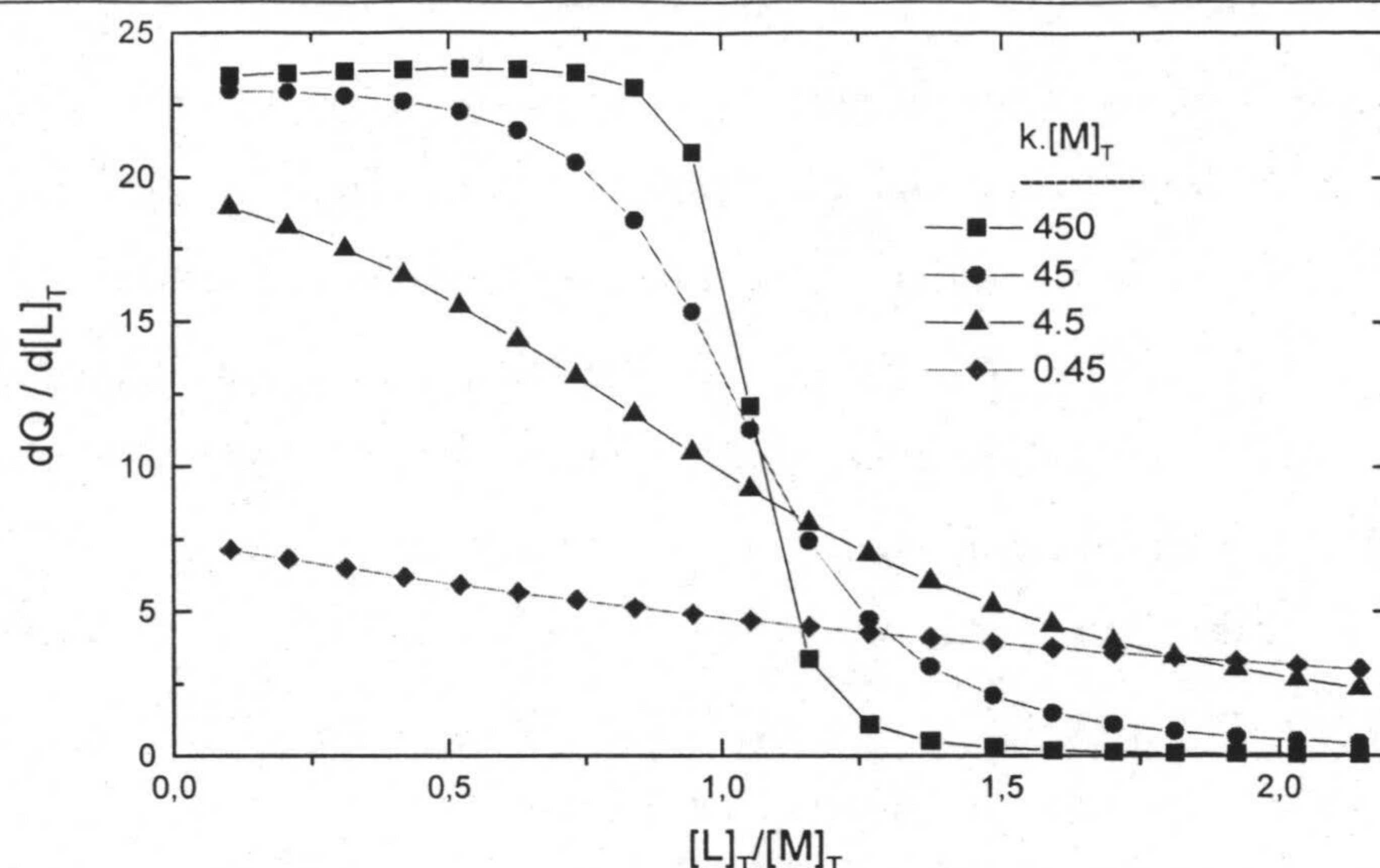


Figura 2.14.- Simulación del calor acumulado para un experimento ITC con los siguientes parámetros experimentales: $V_C = 1.35 \text{ mL}$; $[M]$ inicial en célula = $1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$; 20 inyecciones de $5 \mu\text{L}$; $[L]$ en la jeringa de inyección = 5 mM ; un sol sitio de unión para el ligando, $n = 1$ y cuatro posibles valores de la constante de unión, 2.5×10^6 , 2.5×10^5 , 2.5×10^4 y $2.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

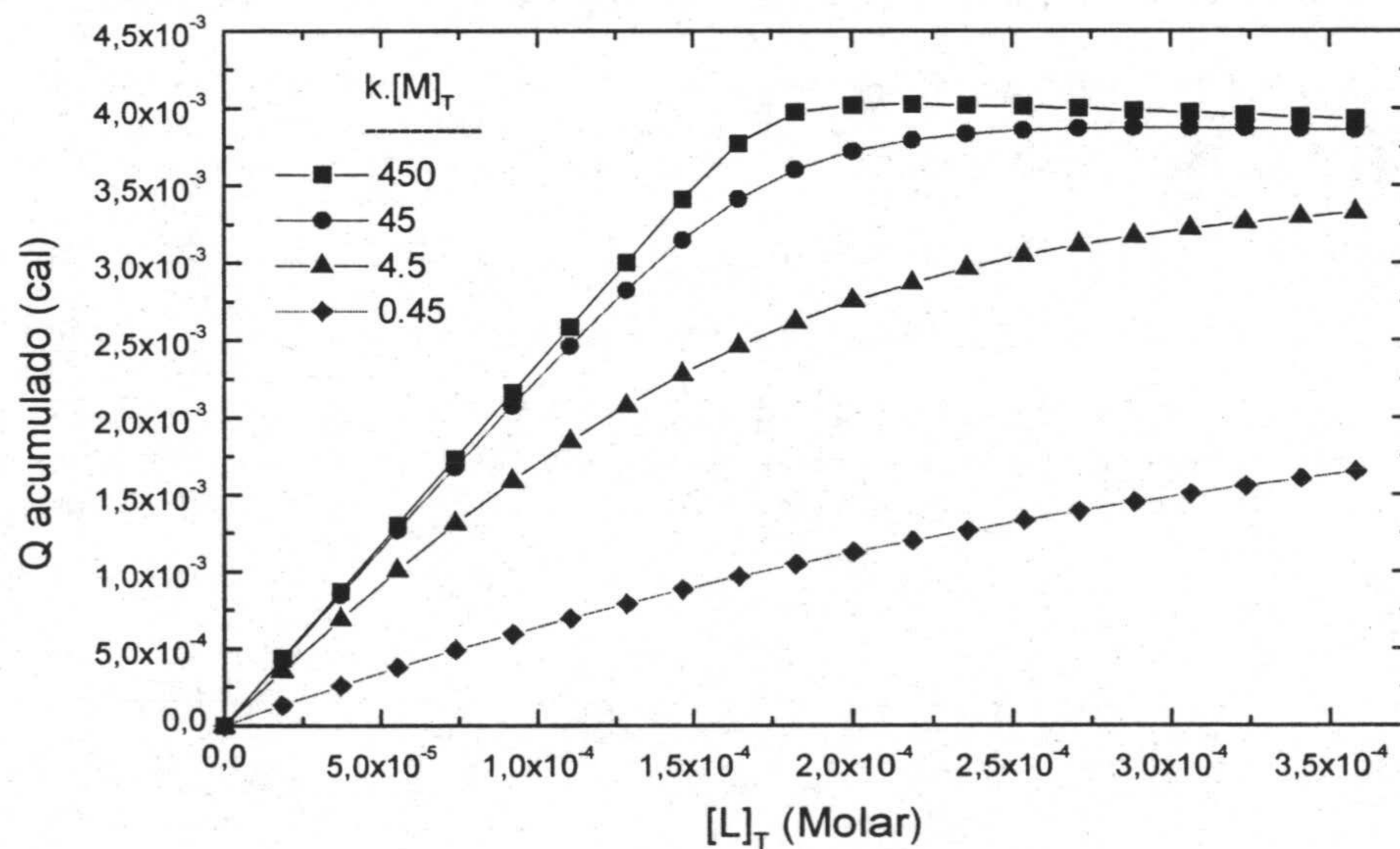


Figura 2.15.- Simulación del calor por mol de ligando añadido asociado a cada inyección para un experimento ITC con los siguientes parámetros experimentales: $V_C = 1.35 \text{ mL}$; $[M]$ inicial en célula = $1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$; 20 inyecciones de $5 \mu\text{L}$; $[L]$ en la jeringa de inyección = 5 mM ; un sol sitio de unión para el ligando, $n = 1$ y cuatro posibles valores de la constante de unión, 2.5×10^6 , 2.5×10^5 , 2.5×10^4 y $2.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

El cambio de entalpía global por mol de ligando unido será:

$$\Delta H = \Delta H_b + p \cdot \Delta H_i \quad [2.46]$$

donde ΔH_b es la entalpía de unión por mol de ligando unido, p el número de moles de protones por mol de ligando unido tomados ($n > 0$) o cedidos ($n < 0$) por el complejo ML_n a saturación.

El calor liberado o absorbido en cada inyección será ahora:

$$q_i = V_C (\Delta H_b + p \cdot \Delta H_i) (\bar{v}_i [M]_i - \bar{v}_{i-1} [M]_{i-1}) \quad [2.47]$$

El calor acumulado después de N inyecciones:

$$Q = \sum_{i=1}^N q_i = V_C \cdot [M]_N (\Delta H_b + p \cdot \Delta H_i) \cdot \frac{nk[L]}{1+k[L]} \quad [2.48]$$

Y finalmente el calor por mol de ligando añadido asociado a cada inyección:

$$\frac{1}{V_C} \cdot \frac{\Delta Q}{\Delta [L]_T} = \frac{(\Delta H_b + p \cdot \Delta H_i)}{2} \left[1 - \frac{1 + k[M]_T \theta - nk[M]_T}{\sqrt{(1 + k[M]_T \theta - nk[M]_T)^2 - 4nk^2 [M]_T^2 \theta}} \right] \quad [2.49]$$

2.2.4.- Dicroísmo circular.

2.2.4.1.- Introducción

CD (Circular Dichroism) es una técnica espectroscópica con importantes aplicaciones sobre moléculas biológicas. Está basada en la propiedad denominada actividad óptica, dicha propiedad la presentan aquellas moléculas asimétricas. Una molécula que contenga un simple carbono asimétrico es ópticamente activa y exhibe el fenómeno de rotación óptica. Es bien conocido que los biopolímeros son asimétricos por lo tanto presentan actividad óptica. La propiedad de asimetría es universal en sistemas biológicos tales como proteínas, polinucleótidos y polisacáridos cuyas unidades que los componen son aminoácidos (generalmente en conformación L),

nucleótidos (conteniendo azúcar, D-ribosa y D-desoxiribosa) y carbohidratos (conformación D y L). Dado que las unidades básicas son asimétricas, las macromoléculas derivadas de ellas son también asimétricas y por tanto éstas poseen actividad óptica. Si la actividad óptica está relacionada con la rotación óptica de la luz polarizada y la diferencia en el índice de refracción para los dos tipos de luz polarizada circularmente se denomina dispersión óptica rotatoria, por el contrario si se relaciona con la diferencia de absorción para los dos tipos de luz circularmente polarizada se denomina dicroísmo circular (Van Holde, K. E., Curtis, W. & Shing, P.. Principals of Physical Biochemistry, 1998).

Tanto la luz polarizada circularmente hacia la derecha, como la polarizada circularmente hacia la izquierda están determinadas por la ley de Beer.

$$A(\nu) = \varepsilon(\nu).l.c \quad [2.50]$$

Donde A, absorbancia a una frecuencia determinada (ν), ε , coeficiente de extinción molar ($M^{-1}.cm^{-1}$ o $mg^{-1}.mL.cm^{-1}$), l, paso de luz (cm), c, concentración de la muestra (M o mg/mL).

El CD es definido, como la diferencia en los coeficientes de extinción correspondientes a la luz polarizada hacia la derecha como la polarizada hacia la izquierda.

$$\Delta A(\lambda) = A_I(\lambda) - A_D(\lambda) = [\varepsilon_I(\lambda) - \varepsilon_D(\lambda)].l.c = \Delta\varepsilon.l.c \quad [2.51]$$

Los subíndices indican; I, luz circularmente polarizada hacia la izquierda, D, luz circularmente polarizada a la derecha, λ longitud de onda dada (nm).

Históricamente debido a razones puramente comerciales, la medida relativa a la dispersión óptica en los espectropolarímetros se da como elipticidad (ϕ). Cuando la elipticidad se expresa en grados está referida a la diferencia de absorbancia $\Delta A = \phi/32.98$. La expresión correspondiente al incremento en el coeficiente de extinción molar se expresa como grados.dL/mol.dm, $[\phi] = 3298 \Delta\varepsilon$, que incluye un factor arbitrario de 100.

Esta técnica es de gran utilidad ya que permite la obtención de información acerca de la estructura de macromoléculas es decir contenido en estructura secundaria (UV-lejano) y terciaria (UV-cercano), transiciones estructurales, como por ejemplo, procesos de replegamiento y desplegado de estructuras desnaturalizadas y nativas, respectivamente, cambios conformacionales inducidos por la unión de pequeñas moléculas, como substratos, coenzimas, etc. No se debe nunca olvidar que el análisis de los espectros de CD raramente proporciona información absoluta sobre la estructura de proteínas debido a que el cromóforo está asimétricamente perturbado por los grupos vecinos, hecho agravado porque el componente principal del espectro de CD, el enlace peptídico, se presenta en una gran cantidad de conformaciones, dependiendo de su localización en la proteína. El espectro que se obtiene es pues, un resultado promedio de parámetros de cada conformación, por ello es necesario realizar comparaciones con las estructuras determinadas por difracción de rayos X. No obstante el CD es extraordinariamente sensible a los cambios de conformación originado por diferentes factores como temperatura, pH, cosolvente etc., que se traduce en una clara variación en el espectro.

2.2.4.2.- Instrumentación

El aparato utilizado para la realización de los experimentos de dicroísmo circular ha sido un espectropolarímetro J-715 de la casa comercial JASCO Corporation. Las especificaciones de dicho aparato son:

- Fuente de luz, lámpara de xenón de 150 W, refrigerada por nitrógeno.
- Intervalo de medida del monocromador 165-900 nm.
- Exactitud en la longitud de onda
 - ± 0.2 nm de 165 a 180 nm.
 - ± 0.1 nm de 180 a 250 nm.
 - ± 0.3 nm de 250 a 500 nm.
 - ± 0.8 nm de 500 a 800 nm.
- Estabilidad de la línea base 0.2 mgrad/hr (condiciones de medida: ancho de banda 1 nm, respuesta 16 s, fuente de luz encendida 30 min antes de la medida).
- Selección ancho de banda 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 nm.

- Velocidad de barrido 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 nm/min.
- Atmósfera de nitrógeno en monocromador y compartimento de muestra, con el fin de desplazar el agua que interferiría en la medida además de generar una posible oxidación en el compartimento de la célula.
- Dimensiones del compartimento de muestra; 140 mm de ancho, 280 mm de profundidad y 130 mm de largo, con un paso de luz máximo de 10 mm.

La temperatura en el compartimento de célula está controlada por un novedoso sistema, modelo PTC-348WI basado en el efecto peltier. El sensor de temperatura para el soporte de célula está compuesto por una resistencia de platino. El sistema de refrigeración se realiza por agua. Por último este soporte posee un agitador magnético, con una velocidad de barrido programable que permite la homogenización de la muestra y evita los posibles gradientes de temperatura.

2.2.4.3.- Experimento de Dicroísmo Circular

La preparación de la muestra se realiza de igual modo a la preparación de las muestras para calorimetría descritas en el apartado 2.2.1.3 con la única diferencia que la concentración de muestra utilizada en CD es al menos dos veces inferior que en calorimetría.

La secuencia en la realización de un experimento a temperatura constante es la siguiente: lo primero se debe realizar un barrido con el tampón de muestra en el que está diluida nuestra proteína, éste servirá de blanco, en segundo lugar se hace lo mismo con la muestra. Antes de comenzar cualquier barrido se deja la cubeta conteniendo la muestra dentro del soporte de célula un mínimo de 5 min para estabilizar la temperatura. De igual modo se hacen los experimentos tanto en el UV-cercano como en el lejano.

En el caso de barridos de temperatura se realiza previamente un barrido en el UV-lejano (estructura secundaria) de igual forma a lo ya descrito, a la temperatura de inicio del barrido y justo después del barrido, a la temperatura de finalización del experimento, con el fin de comprobar el estado de la proteína al inicio y finalización del experimento.

Antes de iniciar el experimento se programan los parámetros a los que vamos a realizarlo, el espectropolarímetro está equipado con un ordenador IBM 300-GL para la

adquisición de los datos por medio de un programa que suministra la misma casa comercial. Los parámetros a programar son: anchura de banda espectral (nm), sensibilidad (mgrad), tiempo de respuesta (s), intervalo de longitud de onda (nm), resolución (nm), velocidad de barrido (nm/min), acumulaciones o repeticiones del espectro permite la obtención de un espectro promedio final que será menos ruidoso, más preciso y de mayor sensibilidad. Debemos tener en cuenta la temperatura a la que estamos trabajando para programar el número de experimentos a acumular es decir, si el barrido se realiza a muy baja temperatura donde podemos tener problemas de congelación de la muestra o a alta temperatura donde nos encontraremos con efectos de evaporación, no es aconsejable hacer más de dos barridos o como máximo tres y de este modo no aumentar el tiempo de exposición de la muestra a estas temperaturas. En condiciones normales es aconsejable hacer al menos cuatro acumulaciones. En el caso de un barrido de temperatura los parámetros que hay que programar son: longitud de onda (nm) a la que se desea realizar el experimento, temperatura de inicio y de finalización del barrido (°C), intervalo adquisición de datos (°C), tiempo de espera previo al comienzo del experimento (s), velocidad de barrido (°C/min o °C/h), respuesta (s), ancho de banda (nm), sensibilidad (mgrad).

2.2.4.4.- Procesamiento de espectros realizados a temperatura constante

En el caso de experimentos a temperatura constante, tenemos dos tipos de espectros, el correspondiente al tampón (blanco) y el de muestra. Lo primero que se debe hacer es restar el blanco al espectro de muestra.

Los datos recogidos por el ordenador son expresados en milésimas de grado, así que será necesario expresarlos en las unidades comunes de elipticidad molar ($[\phi]$) grado.dm⁻¹.cm², para lo cual se utiliza la siguiente ecuación (Bayley, P. M., 1980).

$$[\phi] = \frac{\phi}{\frac{C}{P_m} \cdot l \cdot 10 \cdot n} \quad [2.52]$$

En la cual, C es la concentración de proteína (g/L), l es la longitud del camino recorrido (cm), P_m es el peso molecular g/mol y por último n es el número de residuos en la proteína.

**3.- ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LA ESTABILIDAD
DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA REPRESORA
CRO DEL FAGO 434.**

3.- ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LA ESTABILIDAD DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA REPRESORA CRO DEL FAGO 434

3.1.- Antecedentes Bibliográficos

El control de la expresión génica en procariotas es crítico para el desarrollo de los procesos celulares. La actividad génica se regula a nivel de la transcripción. En las bacterias, muchos genes están agrupados en unidades denominadas operones. La transcripción coordinada de los genes de un operón se bloquea por *proteínas represoras* y se activa por *proteínas activadoras*. Un virus después de infectar a una bacteria se denomina *bacteriófago*, su ciclo vital estará determinado por estos represores o activadores de la transcripción, los cuales le permiten optar entre dos vías de desarrollo: destruir al hospedador (*vía lítica*) o bien llegar a formar parte del mismo uniéndose covalentemente al DNA bacteriano (*vía lisogénica*), a lo cual se le denomina virus atenuado o temprano. La regulación del fago λ , es decir, el paso de la fase lisogénica a la lítica o viceversa está determinado por dos tipos de proteínas represoras, la codificada por el gen cI denominada *represor λ* y la codificada por el gen Cro conocida como *represor Cro*, gracias a la distinta afinidad que presentan por los operadores que contiene dicho *fago λ* . En general, estas proteínas represoras de unión a DNA poseen características estructurales comunes y su estudio ha avanzado tras el descubrimiento de la estructura tridimensional de la proteína Cro del *fago λ* en el laboratorio del Dr. Matthews (Anderson, W.F., 1981), lo que sugirió inmediatamente el funcionamiento de estas macromoléculas. Las características comunes de las proteínas que engloban esta familia se pueden resumir en las siguientes: 1) poseen un alto contenido en hélices α , 2) su unión a DNA la realizan al menos en forma de dímero, 3) se unen a DNA de tipo B sobre su surco mayor y esta unión está mediada por hélices que rotan una sobre otra, 4) presentan un motivo estructural de unión común, *hélice-giro-hélice*, característico de proteínas de unión a DNA, sobre el que se producen dos tipos de interacciones: una entre las superficies apolares de ambas hélices y otra sobre la superficie externa de la hélice en contacto con el DNA, que forma puentes de hidrógeno con las bases del surco principal. Estas interacciones son muy importantes ya que si se altera la superficie externa de la hélice de reconocimiento de un represor, puede cambiar su especificidad (Waldburger, C.D., 1995).

Nuestro estudio se ha centrado sobre una de las proteínas represoras que forman parte de esta familia, la proteína Cro del fago 434, que denominaremos por simplicidad *434 Cro*. Esta proteína consta de 71 aminoácidos que componen una estructura tridimensional formada por 5 hélices α (Padmanabhan S., 1997) mostrada en la Fig. 3.1. Su peso molecular es 8060 Da. El motivo estructural hélice-giro-hélice está situado entre sus hélices dos y tres. Además, posee un puente salino formado entre la Arg 12 (hélice 1) y la Glu 37 (hélice 3) que juega un papel destacado en la estabilidad de su estructura, lo cual será discutido más adelante. En disolución acuosa es monomérica pero cuando actúa como proteína represora uniéndose al DNA de tipo B en su surco mayor, lo hace en forma de homodímero (Wolberger C., 1988).

Nuestro interés sobre *434 Cro* se justifica por ser un modelo con un solo dominio α -helicoidal de pequeño tamaño, alta solubilidad y naturaleza monomérica en soluciones acuosas. No posee grupos prostéticos ni disulfuros, lo que la convierte en un modelo adecuado para estudios físicos y estructurales de estabilidad térmica, que permitirían determinar la relación existente entre estabilidad y estructura así como de unión a DNA. Con el fin de alcanzar un mayor entendimiento de las interacciones físicas que caracterizan la estructura, plegamiento y función de la proteína se requiere una descripción termodinámica completa de su estabilidad conformacional. Esto implica un análisis cuantitativo de su plegamiento-desplegamiento, térmica o químicamente inducido, utilizando técnicas calorimétricas y espectroscópicas, seguido por la extrapolación de los datos obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales como temperatura, pH etc.. Para realizar una extrapolación fiable de los datos en el caso concreto de desnaturalización térmica es necesario conocer la variación de la capacidad calorífica de desplegamiento ($\Delta C_{p,D}$) y su dependencia con la temperatura. El modo más adecuado de determinarla es por medio de la calorimetría, aunque también se han desarrollado otros métodos. La extrapolación de los datos obtenidos por desnaturalización química usando urea o guanidina, está basada en el modelo de extrapolación lineal (MEL) válido para un gran número de proteínas (Schellman, J. A., 1987), o en el modelo de unión del desnaturalizante (MUD) (Tanford, C., 1970).

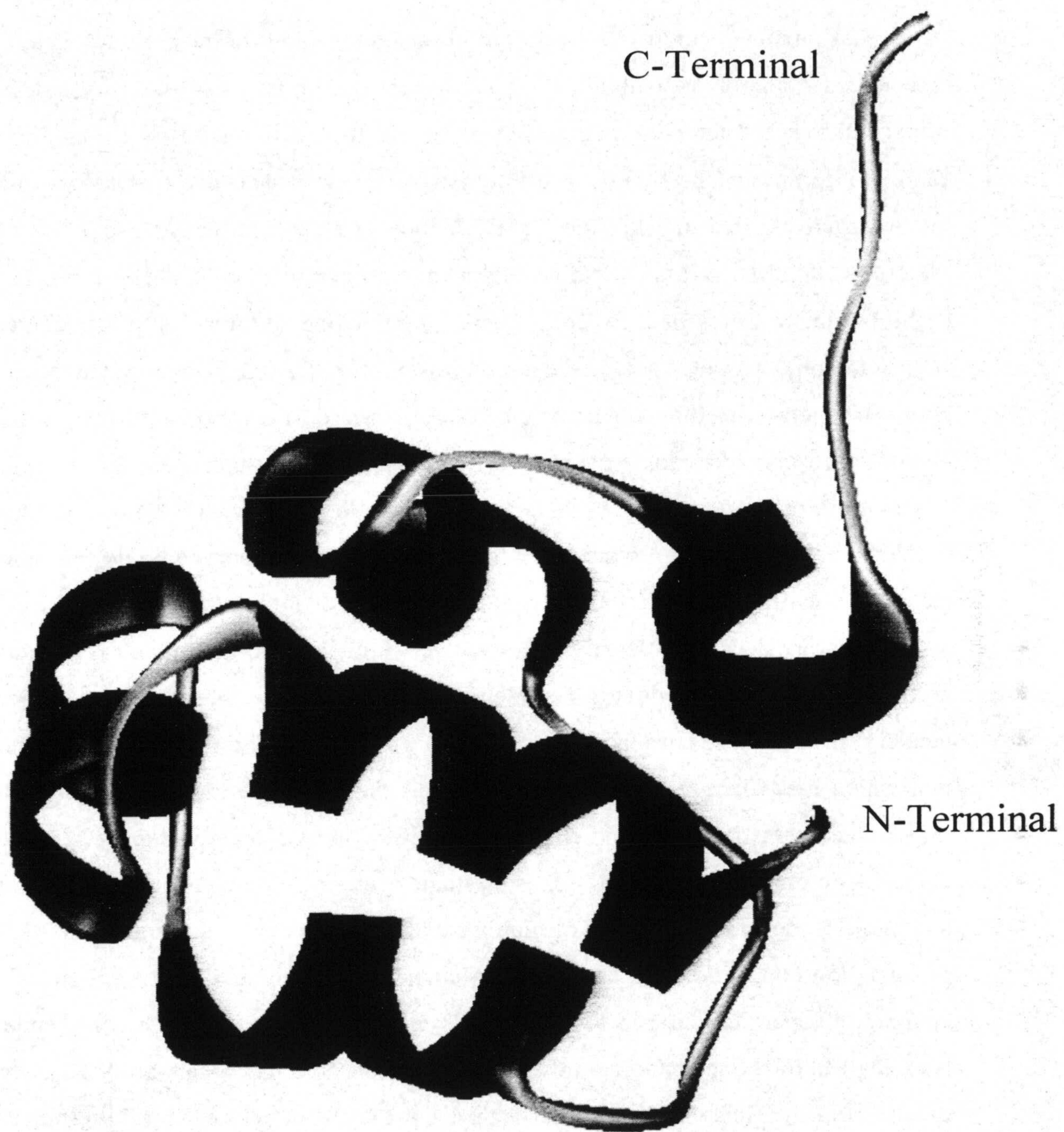


Fig. 3.1. Representación de la estructura tridimensional de la proteína represora Cro del fago 434 (restos 1-71), obtenida por rayos X (Mondragón, A. et al., 1989). Está localizada en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) con el código 1ZUG.

Los análisis comparativos de la desnaturalización térmica y químicamente inducida, así como la posibilidad de la determinación de estados desnaturalizados equivalentes por diferentes métodos, permiten realizar un estudio más exhaustivo y completo de nuestro sistema. Con este objetivo hemos aunado nuestros esfuerzos con los del grupo de investigación de Dr. D. Manuel Rico (Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, Madrid), quien ha llevado a cabo el seguimiento de la desnaturalización de la proteína en presencia de diferentes concentraciones de urea tanto a temperatura constante como variable por medio de dicróismo circular (CD), determinando así los parámetros termodinámicos que caracterizan el proceso. Independientemente, nosotros hemos determinado los parámetros termodinámicos correspondientes a la desnaturalización térmica de 434 Cro utilizando DSC, así como los de su desplegamiento inducido por ácido y a temperatura constante por medio de calorimetría isotérmica de titulación (ITC), tal y como se detalla posteriormente.

Lo más destacado de este estudio se deriva de la comparación de los resultados, o lo que es lo mismo, de los parámetros termodinámicos obtenidos por diferentes técnicas, los cuales se correlacionan muy bien y a la vez se complementan permitiendo una visión más clara y fiable de la estabilidad estructural de la proteína, punto muy importante en la determinación de su estabilidad intracelular así como de su función dentro del ciclo celular. Por último, este estudio puede ser complementado gracias a la comparación de la estabilidad y plegamiento de 434 Cro con la de otras proteínas que guardan con ella homología tanto en su secuencia como en su estructura. Este es, por ejemplo, el caso del dominio N-terminal del represor del fago 434 que comprende los residuos 1 al 69 y que denominamos R1-69 (Harrison, S. C. & Aggarwal, A. K., 1990) y que ha sido estudiado en nuestro laboratorio, así como el del dominio N-terminal del represor del fago λ que comprende los residuos 6 al 85 y que denominaremos λ_{6-85} (Huang, G. S. & Oas, T. G., 1995 a ; Huang, G. S. & Oas, T. G., 1995).

3.2.- ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO TÉRMICO DE 434 CRO POR MEDIO DE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

3.2.1.- Procedimiento experimental

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la proteína 434 Cro se llevaron a cabo en un calorímetro VP-DSC a velocidades de barrido de 60 y 90 °C/h hasta una temperatura máxima final de calentamiento de 102 °C. El volumen de las muestras fue de 0.52 mL con una concentración de proteína para los diferentes barridos de 100 a 200 μM determinada espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción molar a longitud de onda de 280 nm, $\epsilon_{280} = 6370 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Padmanabhan, P. et al., 1997). Las muestras de proteína se saturaron con nitrógeno para minimizar la posible oxidación del único resto de cisteína que contiene. Los experimentos se realizaron a diferentes valores de pH: 2.0, 2.65, 3.0, 3.75, 4.0, 4.5, 5.0 y 6.0. Los tampones utilizados según el pH deseado poseían en todos los casos 100 mM de KCl. Se utilizó el tampón 20 mM glicina para valores de pH comprendidos entre 2.0 y 3.0, 25 mM acetato sódico para valores de pH entre 3.75 y 5.0, y por último 25 mM fosfato potásico para pH 6.0.

Para realizar el análisis termodinámico de los datos se sustrajo la línea base química en cada traza y se transformaron las mismas en términos de capacidad calorífica molar parcial utilizando un volumen específico parcial para la proteína de 0.753 mL/g, calculado en base a su contenido en aminoácidos (Padmanabhan, S. et al., 1997.). Para obtener información más detallada sobre el tratamiento de las curvas ver sección 2.2.1.3 de Materiales y Métodos. Todas las trazas fueron analizadas siguiendo el modelo de dos estados.

3.2.2.- Resultados experimentales

El estudio consistió en la determinación de los parámetros termodinámicos que caracterizan el desplegamiento de 434 Cro por medio de DSC. Se utilizó un rango amplio de pH de 2.0 a 6.0. En la Fig. 3.2 A se muestran las diferentes curvas obtenidas en el intervalo de pH comprendido entre 2.0 y 5.0. Se comprobó que todas ellas, a los valores de pH estudiados, eran reversibles exceptuando pH 6.0 (datos no mostrados), donde la proteína presentaba un comportamiento irreversible a una concentración

alrededor de 100 μM . En un principio se pensó que la causa de la irreversibilidad podía deberse a la formación de un puente disulfuro por oxidación de la única cisteína que contiene la proteína. Posteriormente se realizó un experimento a este pH a concentración muy inferior a las usadas en anteriores experimentos (18 μM) observándose que la reversibilidad de la curva aumentaba débilmente (datos no mostrados), lo cual indicaba la posible existencia de otros factores adicionales que favorecerían la irreversibilidad.

La reversibilidad del proceso de desplegamiento de todas las trazas se determinó por medio de un segundo barrido de temperatura en las mismas condiciones que el primero, realizado justo al terminar éste, tal y como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. La importancia en la comprobación de la reversibilidad es fundamental si lo que se pretende es realizar un análisis basado en la termodinámica de equilibrio ya que éste no es aplicable en el caso de que la proteína presente una transición irreversible y en consecuencia cinéticamente controlada, como es el caso de un proceso de agregación. En la Fig. 3.3 podemos observar la reversibilidad sobre una de las curvas de este estudio. Este segundo barrido puso de manifiesto que la reversibilidad de las curvas en el rango de pH situado entre 2.0 y 5.0, aumenta conforme disminuye el pH, donde la macromolécula está cargada positivamente es decir, protonada.

De las trazas mostradas en Fig. 3.2 A se desprende que la disminución del pH conlleva un ensanchamiento de las curvas y una disminución en la T_m o, lo que es lo mismo, la proteína se desestabiliza por debajo de pH 5.0. Todas las trazas presentan un solo pico debido a la absorbancia de calor cuando la proteína se despliega exceptuando pH 2.0 donde desaparece, indicando que la proteína está ya desplegada. Esto se confirmó por los datos obtenidos mediante CD donde la señal de elipticidad molar determinada a 222 nm y 25°C desaparecía a pH 2.0 corroborando la desnaturalización de la proteína, mientras que a pH 6.0 y 4.0 dicha señal se mantenía, siendo un poco menor a pH 3.0. Además es posible calcular la capacidad calorífica del estado desplegado, $C_{p,D}$, a partir del contenido aminoacídico a cinco temperaturas concretas (Makhatadze, G. Y. & Privalov, P. L., 1990). Este cálculo demostró que la $C_{p,D}$ determinada calorimétricamente a pH 2.0 se aproxima bastante a la determinada a partir de su secuencia, corroborándose de nuevo el desplegamiento de la proteína, aunque hay que tener en cuenta que el valor determinado a partir de la secuencia es un 10% superior al calorimétrico debido a que este modelo asume que la proteína está totalmente

desplegada o, lo que es lo mismo, todos sus aminoácidos están perfectamente hidratados y no poseen interacciones debidas a grupos vecinos lo que describe un estado ideal no real.

En la Fig. 3.2 B se muestra la dependencia lineal creciente de $C_{p,N}$, con respecto a la temperatura. Este hecho está en total concordancia con lo determinado para otras proteínas globulares (Privalov, P. L., 1979; Filimonov et al., 1982; Privalov & Potekhin, 1986). Sin embargo, la capacidad calorífica del estado desnaturalizado, $C_{p,D}$ mantiene dicha dependencia lineal con la temperatura por encima de 40 °C, pero por debajo de ésta la dependencia lineal se transforma en cuadrática, lo cual ha sido atribuido a la exposición de los grupos hidrofóbicos al agua. Esto fue demostrado por Privalov et al. (1989) a partir de medidas de capacidad calorífica de compuestos modelo formados por cada uno de los 20 aminoácidos que pueden formar parte de la cadena polipeptídica (Privalov & Makhatadze, 1990). Todo lo expuesto es fundamental para la realización del ajuste de las trazas al modelo de dos estados. Podemos realizar, no obstante, un análisis simplificado aproximando ambas capacidades caloríficas, $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$, a una función lineal con respecto a la temperatura Fig. 3.2 B. Ambas capacidades caloríficas presentan diferente pendiente, por lo tanto $\Delta C_{p,D}$ varía con el aumento de temperatura. Este análisis será válido en todas aquellas proteínas cuya T_m esté por encima de 40 °C, punto no cumplido para todas nuestras curvas; en concreto, por debajo de pH 3.75 donde han sufrido un fuerte ensanchamiento situándose su T_m por debajo de 40 °C, lo que hace más adecuado la aplicación de una dependencia cuadrática. Existen dos tipos de ajuste al modelo de dos estados, el individual a cada traza por separado o el multiajuste realizado conjuntamente sobre todas las trazas a la vez. Aquellas curvas a bajo pH que han sufrido un fuerte ensanchamiento, tales como las correspondientes a pH 2.65 y 3.00, no pueden ajustarse individualmente ya que la población del estado nativo, bajo estas condiciones, es inferior a la mitad a cualquier temperatura, es decir, la proteína está parcialmente desplegada antes de comenzar el experimento, con lo cual no es posible conocer $C_{p,N}$ por falta de información sobre dicho estado nativo. Con el objetivo de comparar cómo afecta al resultado del ajuste la utilización de una u otra aproximación, dependencia lineal o dependencia cuadrática, decidimos realizar el análisis tanto individual como múltiple suponiendo ambas aproximaciones. En la Tabla 3.1 podemos comprobar que la introducción de la dependencia cuadrática afecta al ajuste muy poco lo cual sugiere que la desviación de la linealidad no es grande.

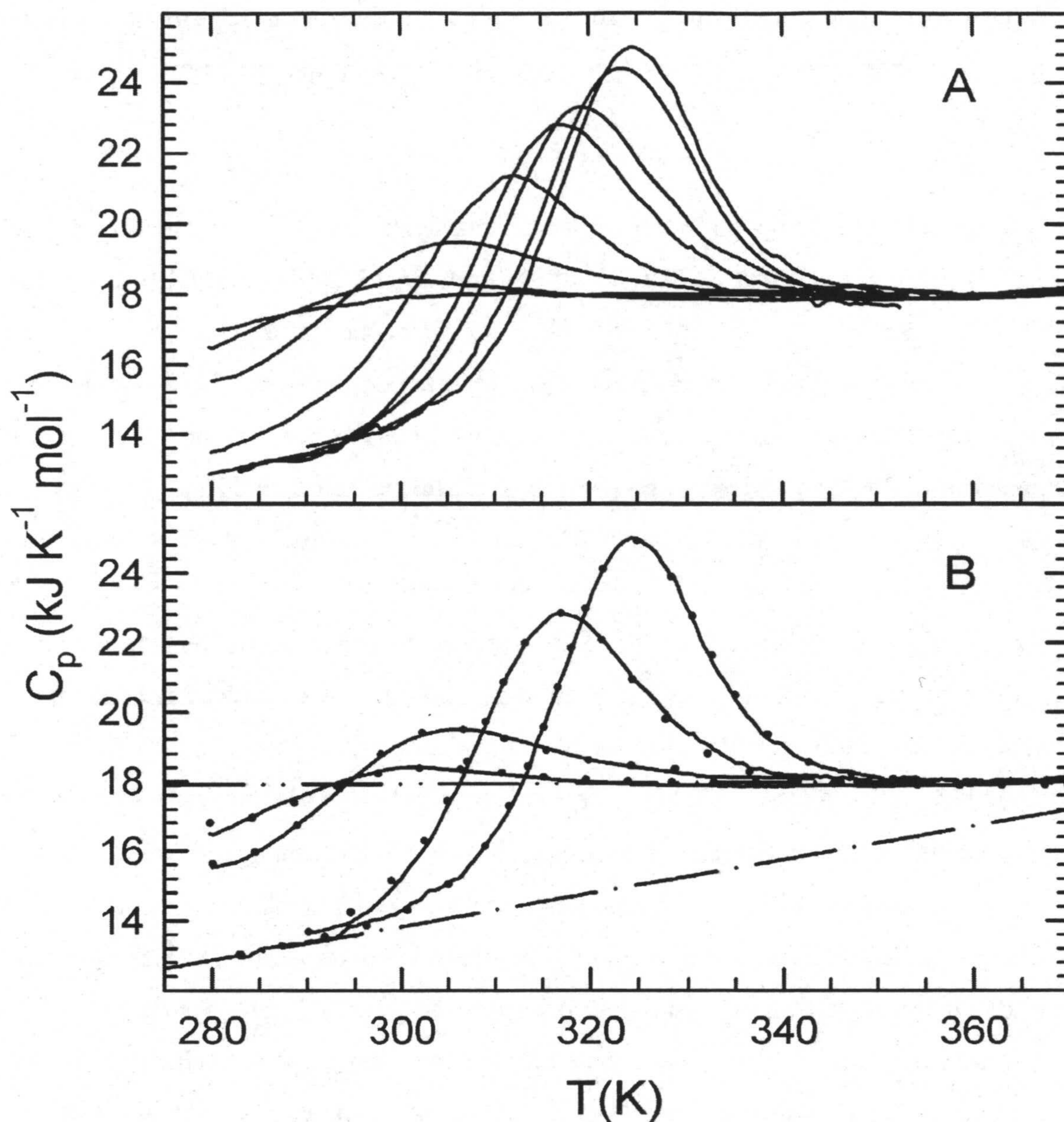


Fig. 3.2. Termogramas pertenecientes a 434 Cro obtenidos a diferentes valores de pH utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC). A) Dependencia de la capacidad calorífica molar parcial con la temperatura, T (K) a valores de pH: 2.0, 2.65, 3.0, 3.5, 3.75, 4.0, 4.5 y 5.0 (representados de izquierda a derecha). B) (—) Representación de las anteriores curvas a valores de pH de 2.65, 3.0, 3.75 y 5.0 así como el resultado al aplicar ajuste múltiple (•) utilizando aproximación lineal para $C_{p,N}$ (—•—) y $C_{p,D}$ (—••—) ambos comunes a todas las curvas y descritos por las ecuaciones empíricas $C_{p,N} = 12.54 + 0.048.T(K)$ y $C_{p,D} = 17.59 + 0.001.T(K)$, expresadas en $\text{kcal. K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$.

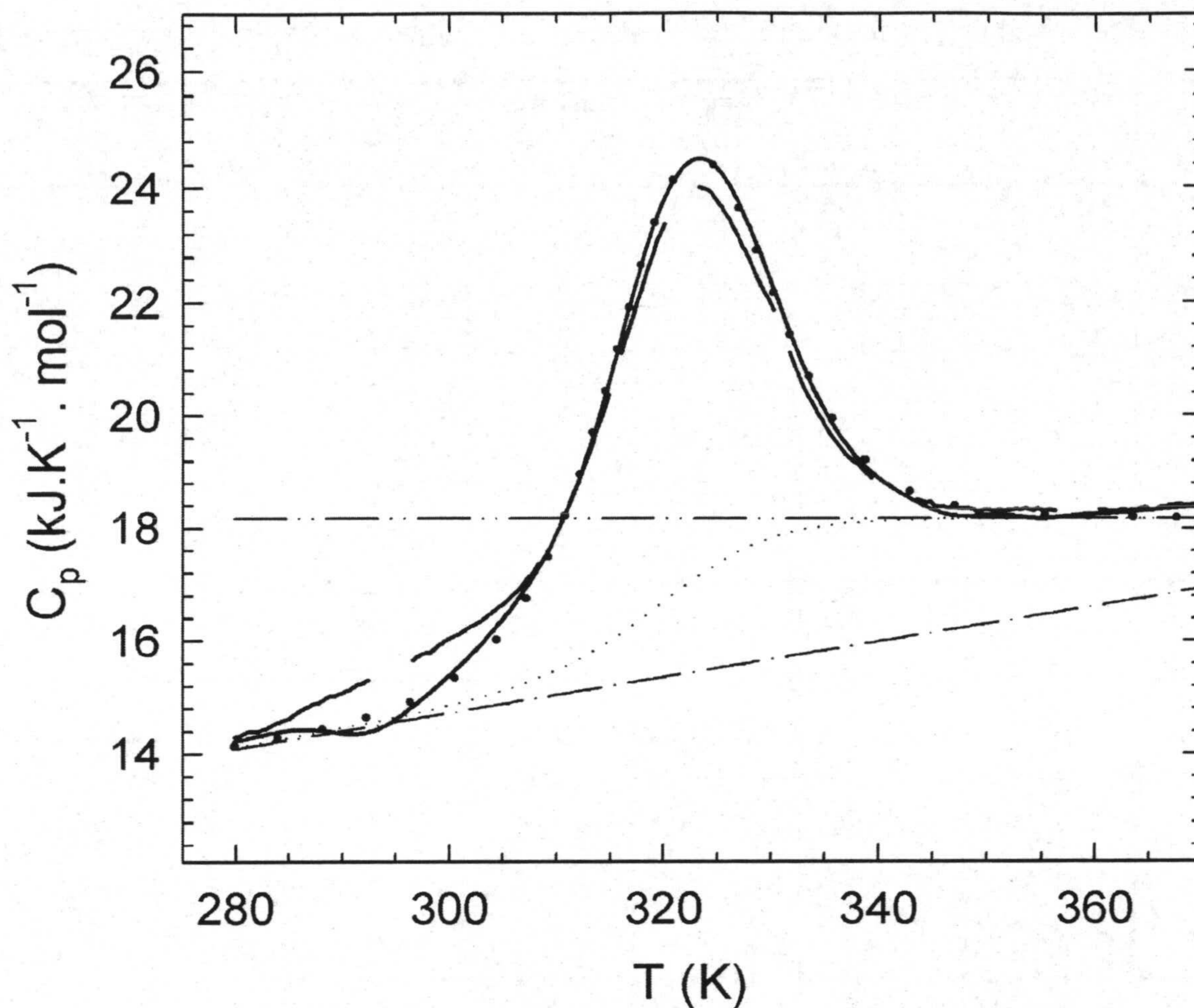


Fig.3.3. Curva de desplegamiento de 434 Cro registrada en el calorímetro VP-DSC utilizando una concentración de proteína 95 μM , pH 4.5 y velocidad de barrido de 90 K/h. La línea continua corresponde al primer barrido (—), y la discontinua al segundo barrido (— —). También se representan la capacidad calorífica del estado nativo, $C_{p,N}$ (— • —), la capacidad calorífica del estado desnaturalizado, $C_{p,D}$ (— • • —) y la capacidad calorífica interna, $C_{p,int}$ (.....).

Análisis de los datos obtenidos por DSC de la proteína 434 Cro a diferentes valores de pH.

pH	A		B		C		
	T_m	ΔH_m	T_m	ΔH_m	T_s	$\Delta G_{D,max}$	ΔG_D^0
	K	kJ/mol	K	kJ/mol	K	kJ/mol	kJ/mol
2.65 ^a	-	-	-	-	280.14±0.2	-3.00±0.2	-5.68±0.2
3.00 ^a	-	-	-	-	280.75±0.1	0.08±0.2	2.38±0.2
3.50	305.75±2.0	114.95±3.0	306.05±2.0	113.70±3.0	281.63±0.05	4.51±0.1	2.30±0.1
3.75	312.65±1.0	135.43±2.4	313.65±1.0	137.52±2.4	282.23±0.05	7.40±0.1	5.39±0.1
4.00	315.05±1.0	135.85±2.4	315.85±1.0	136.27±2.4	282.40±0.05	8.48±0.1	6.48±0.1
4.50	320.55±0.5	157.17±2.4	320.25±0.5	151.73±2.4	282.83±0.05	10.41±0.1	8.48±0.1
5.00	322.15±0.5	166.78±2.4	322.25±0.5	164.27±2.4	282.97±0.05	11.08±0.1	9.20±0.1
6.0	330.35±0.5 ^b	190.19±4.0 ^c	-	-	283.83±0.1	15.30±0.2	13.50±0.2

Tabla 3.1. Datos obtenidos del ajuste individual suponiendo: A) dependencia lineal y B) dependencia cuadrática para $C_{p,D}$.

C) Ajuste múltiple suponiendo dependencia lineal para $C_{p,D}$, utilizando las ecuaciones 3.4-3.11 en función de T_h y T_s donde $\Delta G_{D,max} = \Delta G_D (T_s)$; $\Delta G_D^0 = \Delta G_D (298.15 K)$. La T_h obtenida fue 280.73 K.

- a) El ajuste de los datos de DSC a pH 2.65 y 3.0 utilizando las ecuaciones en función de ΔH_m y T_m no es posible debido a que la población del estado nativo en estas condiciones es menor que 0.5 a cualquier temperatura.**
- b) T_m fue determinada de la curva irreversible a pH 6.0.**
- c) Valor extrapolado utilizando la ecuación 3.16 (ajuste múltiple asumiendo dependencia lineal para $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$).**

3.2.2.1 Descripción del formalismo matemático utilizado para el ajuste al modelo de dos estados.

Los parámetros que caracterizan el estudio termodinámico son: variación de la entalpía durante el proceso de desplegamiento (ΔH), variación de la entropía (ΔS), variación de la capacidad calorífica a presión constante (ΔC_p) y variación de la energía de Gibbs (ΔG_D). Para determinarlos en base al modelo de dos estados es necesario calcular en primer lugar ΔH a cualquier temperatura por medio de la ecuación de Kirchhoff

$$\Delta C_p = \frac{d\Delta H}{dT} \quad [3.1]$$

y en segundo lugar calcular la variación de entropía a cualquier temperatura por medio de la siguiente ecuación:

$$\frac{d\Delta S}{dT} = \frac{\Delta C_p}{T} \quad [3.2]$$

A partir de la determinación de estos parámetros podemos obtener la energía de Gibbs y por consiguiente la estabilidad de nuestra proteína:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad [3.3]$$

Teniendo en cuenta estas ecuaciones podemos comenzar describiendo el formalismo termodinámico en el caso del análisis más simplificado, suponiendo dependencia lineal con respecto a $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$

$$C_{p,N} = a_{N,r} + b_{N,r} (T - T_r) \quad [3.4]$$

$$C_{p,D} = a_{D,r} + b_{D,r} (T - T_r) \quad [3.5]$$

$$\Delta C_{p,D} = \Delta a_{D,r} + \Delta b_{D,r} (T - T_r) \quad [3.6]$$

Donde $a_{N,r}$ y $a_{D,r}$ son la ordenada en el origen para $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$, $b_{N,r}$ y $b_{D,r}$ representan las pendientes que nos indican su crecimiento lineal con respecto a la

temperatura. Ambos tipos de parámetros (a y b) son considerados constantes durante el ajuste. El formalismo termodinámico para el ajuste se plantea en base a una temperatura de referencia T_r normalmente representada por T_m (temperatura en el máximo de la curva), temperatura a la cual $\Delta G_D(T_m) = 0$ y las poblaciones del estado nativo (f_N) y del estado desnaturalizado (f_D) se igualan, es decir, $f_N = f_D = 0.5$. En el caso que nos ocupa no es posible referir nuestras ecuaciones a T_m debido a que en aquellas curvas que sufren un ensanchamiento, concretamente a valores de $\text{pH} < 3.75$, la población del estado desnaturalizado crece sobre la del estado nativo, es decir $f_N < 0.5$, con lo que partimos de una proteína que está parcialmente desplegada. En estos casos la $C_{p,N}$ inicial está por encima de la del resto de las trazas no permitiendo el ajuste individual tal y como he explicado anteriormente. Sí es posible realizar aquí el ajuste múltiple ya que la falta de información sobre la $C_{p,N}$ se compensa por las trazas en la que está bien determinada, ya que ésta, en el caso de no existir cambios estructurales, debe ser la misma para la proteína bajo diferentes condiciones experimentales. A consecuencia de todo ello la T_m no se corresponde con el punto máximo de la transición sino que está desplazada con respecto al mismo, con lo cual no se cumple que $\Delta G_D(T_m) = 0$ en el máximo de la transición. Esto hace necesario considerar una temperatura de referencia que pueda determinarse bien por medio del ajuste, como es el caso de T_h donde $\Delta H(T_h) = 0$ o T_s para la que $\Delta S(T_s) = 0$.

Las ecuaciones correspondientes, considerando T_h y T_s como temperaturas de referencia, serían las siguientes:

$$\Delta C_{p,D} = \Delta a_{D,r} + \Delta b_{D,r}(T - T_h) \quad [3.7]$$

$$\Delta H_D(T) = \Delta a_{D,h}(T - T_h) + \left(\frac{1}{2}\right)\Delta b_{D,h}(T - T_h)^2 \quad [3.8]$$

$$\Delta S_D(T) = (\Delta a_{D,h} - \Delta b_{D,h}T_h) \ln\left(\frac{T}{T_s}\right) + \Delta b_{D,h}(T - T_s) \quad [3.9]$$

$$K_D(T) = \exp\left[\frac{\Delta S_D(T)}{R} - \frac{\Delta H_D(T)}{RT}\right] \quad [3.10]$$

$$C_p(T) = C_{p,N} + \frac{\Delta C_{p,D}K_D}{(1 + K_D)} + \left(\frac{K_D}{R}\right) \left[\frac{\Delta H_D}{T(1 + K_D)}\right]^2 \quad [3.11]$$

El tipo de ajuste más utilizado, siempre y cuando sea posible, es aquél que introduce como temperatura de referencia T_m , lo cual es más intuitivo ya que permitiría su observación directa sobre la gráfica en el punto correspondiente al máximo de la transición. Con respecto a este tipo de análisis, nos encontramos con seis parámetros ajustables por curva, ΔH_m , T_m , $\Delta a_{D,m}$, $\Delta b_{D,m}$, a_N y b_N , mientras que con el nuevo ajuste utilizando T_h y T_s tenemos otros seis parámetros ajustables T_h , T_s , $\Delta a_{D,h}$, $\Delta b_{D,h}$, $a_{N,h}$, $b_{N,h}$. El formalismo en función de T_h y T_s fue aplicado a los ajustes múltiples de las curvas de calentamiento promedio medidas a pH 2.65, 3.0, 3.5, 3.75, 4.0, 4.5 y 5.0 asumiendo que b_n , $\Delta C_{p,D}$ y T_h eran los mismos para todas ellas mientras que T_s y $a_{N,h}$ fueron ajustados. Este último parámetro, $a_{N,h}$, permite que las curvas adopten su posición más adecuada con respecto al eje de abscisas o lo que es lo mismo, respecto a $C_{p,N}$. De este modo para las siete curvas tendremos dos parámetros ajustables por curva más los tres que suponemos comunes a todas ellas, con lo que hemos reducido ostensiblemente el número de parámetros ajustables al conjunto de las curvas y por consiguiente hemos simplificado el análisis.

Para el caso concreto de las curvas correspondientes a $\text{pH} < 3.5$ en las que $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ presentan dependencia cuadrática con respecto a la temperatura, las ecuaciones que las describen y a partir de las cuales se derivan las demás, se formularían como sigue:

$$C_{p,N}(T) = a_{N,h} + b_{N,h}(T-T_h) + c_N(T-T_h)^2 \quad [3.12]$$

$$C_{p,D}(T) = a_{D,h} + b_{D,h}(T-T_h) + c_N(T-T_h)^2 \quad [3.13]$$

Por simplicidad suponemos que el término cuadrático c_N es el mismo tanto para $C_{p,N}(T)$ como $C_{p,D}(T)$.

Los resultados de los ajustes realizados se recogen en la Tabla 3.1, de los que se deduce, tal y como ya hemos citado anteriormente, que la introducción de líneas bases no lineales para la determinación de $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ conlleva pequeños cambios en el ajuste individual de las trazas indicando que las desviaciones de la linealidad en relación a las líneas bases utilizadas no es grande. Por tanto ΔH_m , en este caso concreto, se convierte en el parámetro más importante en la determinación de la forma y altura de cualquier pico correspondiente a una C_p determinada.

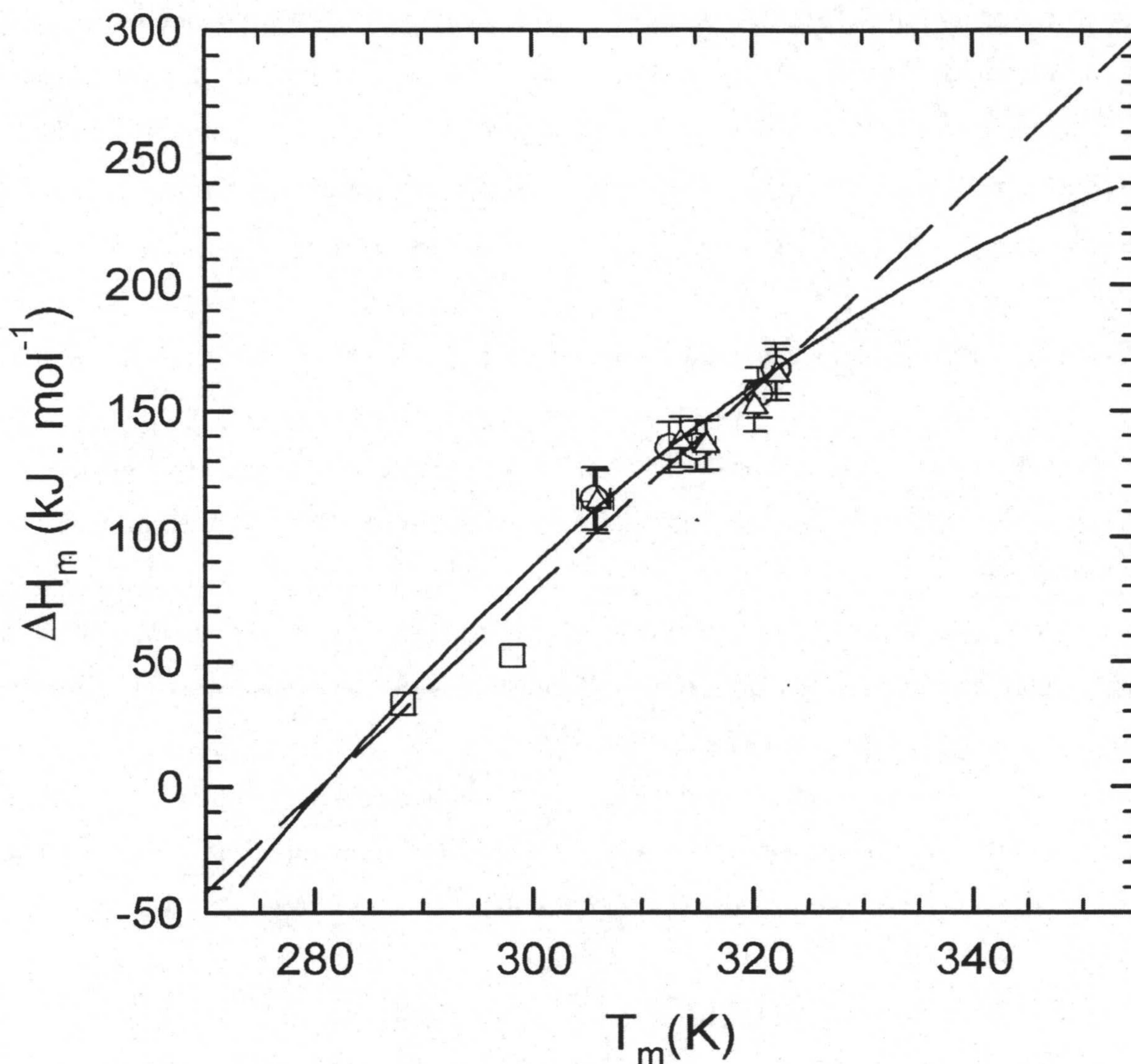


Fig. 3.4. Dependencia del efecto calorífico, ΔH_m , con respecto a T_m . Los valores representados obtenidos mediante DSC proceden de la Tabla 3.1. Los valores correspondientes a la dependencia lineal se representan por \circ y los entalpías de desplegamiento a 15 y 25 °C determinadas mediante ITC (\square). El valor de correspondientes a dependencia cuadrática por \triangle . También se muestran las temperatura, T_h , a la cual ΔH_D se anula, $\Delta H_D(T_h) = 0$, se representa por \bullet y se ha determinado a partir del ajuste múltiple. La línea discontinua representa la regresión lineal a través de todos los puntos y la continua la regresión según la ecuación 3.16 obtenida en base al multiajuste suponiendo dependencia lineal para $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ con respecto a la temperatura.

En la Fig. 3.4 se representa la dependencia del efecto calorífico, ΔH_m , con respecto a la temperatura, T_m , para diferentes valores de pH. Los valores representados en dicha gráfica obtenidos mediante DSC se recogen en la Tabla 3.1. También se representan las entalpías de desplegamiento a baja temperatura obtenidas mediante ITC así como el valor de temperatura, T_h , a la cual ΔH_D se anula, $\Delta H_D (T_h) = 0$. La representación conjunta de estos valores se realizó con el objetivo de mejorar el ajuste a través de todos los puntos. El ajuste lineal está descrito por la siguiente ecuación:

$$\Delta H_D (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}) = -1121.69 + 4.00.T(\text{K}) \quad [3.14]$$

cuya pendiente se corresponde con un $\Delta C_{p,D}$ de $4.00 \pm 0.13 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$. Además se ha representado el ajuste a través de todos los puntos asumiendo aproximación lineal para las capacidades caloríficas, $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ según multiajuste. Las ecuaciones anteriormente descritas [3.7] y [3.8] para el multiajuste quedan aquí determinadas como:

$$\Delta C_{p,D} (\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) = 5.05 - 0.047 (T - 280.73) \quad [3.15]$$

$$\Delta H_D (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}) = 5.05 (T - T_h) - 0.0235 (T - T_h)^2 \quad [3.16]$$

En base a la ecuación 3.15, $\Delta C_{p,D}$ puede variar desde 5.40 hasta $0.70 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ dentro del rango de temperaturas de 0 a $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

Basándonos en los experimentos de desnaturalización química en presencia de urea a pH 6.0 medido mediante CD en UV-lejano se decidió realizar el experimento correspondiente a este pH y en ausencia de desnaturalizante por medio de DSC con el objetivo de corroborar estos datos al igual que se hizo con el resto de los resultados. Del experimento se deduce que la transición es irreversible por lo cual no es posible determinar los parámetros termodinámicos que caracterizan el desplegamiento a partir del análisis basado en la termodinámica de equilibrio. Sin embargo es posible a partir del punto máximo de la curva estimar su T_m cuyo valor es 330.35 K que sustituido en la ecuación 3.16 obtenemos un valor de $\Delta H_m = 192.72 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y en el caso de la ecuación 3.14 un $\Delta H_m = 199.71 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

De la Figura 3.2 se deduce un fuerte decrecimiento de la estabilidad con la disminución del pH especialmente a pH ácido. Este decrecimiento tiene un origen típicamente entrópico (electrostático) ya que las entalpías de ionización de los grupos ácidos son pequeñas. Además, estos pequeños efectos están compensados por las

entalpías semejantes de ionización del tampón. Como resultado los efectos entálpicos observados se corresponden con los verdaderos calores de desplegamiento y $\Delta C_{p,U}$ se puede estimar según la ecuación de Kirchhoff como la pendiente a la recta de regresión a través de todos los puntos de la representación de la dependencia de ΔH_m con T_m (Fig.3.4) (Privalov P. L., 1979 ; Privalov P.L., 1986).

Por otro lado, el pequeño tamaño de la proteína está relacionado directamente con la altura de los picos y por consiguiente con la entalpía molar de la proteína lo que, aplicado al caso concreto de 434 Cro que posee un tamaño pequeño, explica el bajo valor de ΔH_m es decir una relativa baja estabilidad, que permitirá solamente una determinación fiable del ΔH_m en un estrecho rango de temperaturas. El decrecimiento en la calidad de la regresión y como consecuencia el aumento en las magnitudes de error, repercuten sobre el valor de ΔC_p y ΔG_D . Con el fin de solventar este problema, los efectos calóricos debidos al desplegamiento a bajas temperaturas se determinaron por medio del desplegamiento de 434 Cro inducido por ácido utilizando la calorimetría isotérmica de titulación tal y como detallamos en un apartado posterior.

3.2.2.2. Análisis de la dependencia del pH con la T_m

A partir del análisis de la dependencia del pH con la T_m (Fig. 3.5) es posible hacer una estimación del número de protones intercambiados entre la proteína y el tampón durante el desplegamiento (Becktel, W.J. & Schellman, J. A., 1987; Privalov, P.L., 1979) según la ecuación:

$$\Delta v = v_D - v_N = \left(\frac{\Delta H_m}{2.303RT_m^2} \right) \left(\frac{dT_m}{dpH} \right) \quad [3.17]$$

donde v_D y v_N representan el número de protones enlazados al estado desnaturalizado y nativo respectivamente. Δv se estima a partir del ajuste de todos los puntos, representados en la Fig. 3.5, a un polinomio de mínimo orden (ver pie de Fig. 3.5), cuya derivada se corresponde con el valor de la pendiente en cada punto y que sustituida en la ecuación 3.17 permite determinar el número de protones intercambiados entre el tampón y la proteína.

En conclusión, no hay intercambio de protones alrededor de pH 5.0 donde la pendiente es casi igual a cero. El número de protones intercambiados a pH 4 es alrededor de 1 y a pH 3.25, donde se observa la mayor pendiente, es de alrededor de 1.5. Dicha pendiente parece aumentar sobre pH 5.0, pero no se poseen datos calorimétricos concluyentes por lo que no es posible determinar la existencia o no de un intercambio neto de protones.

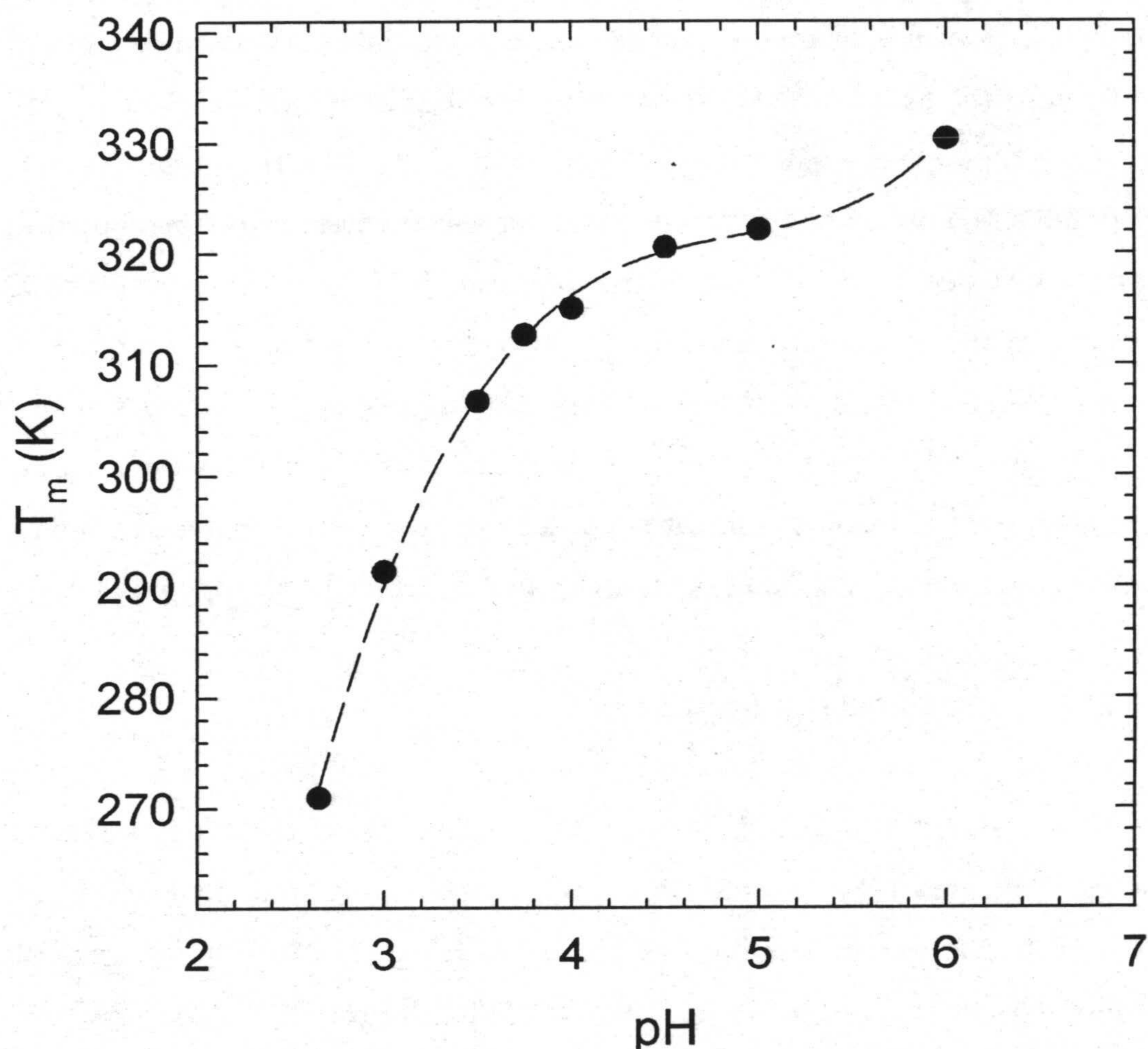


Fig. 3.5. Representación de la dependencia de T_m con el pH. Valores tomados de la Tabla 3.1. A pH 3.0 T_h y T_s coinciden siendo en este caso igual a T_m . El polinomio ilustrativo de mínimo orden utilizado para el ajuste de todos los puntos es:

$$T_m = -366 + 421.8 (\text{pH}) - 86.4 (\text{pH})^2 + 5.9 (\text{pH})^3$$

La derivada de este polinomio nos da la pendiente en cada punto que nos permitirá en la ecuación 3.17 determinar el número de protones intercambiados.

3.3.- ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO ÁCIDO DE 434 CRO POR MEDIO DE CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN

La determinación de los efectos térmicos debidos al desplegamiento inducido por ácido a baja temperatura, fue inspirada sobre los espectros de CD medidos en el UV-lejano (realizados por el grupo del Dr. Rico) en los que se demostraba que la proteína a 25 °C en tampón 20 mM glicina sódica pH 2.0 estaba totalmente desplegada o casi desplegada, lo cual fue posteriormente confirmado por medio de los experimentos de DSC descritos en el apartado anterior. En concreto, la traza calorimétrica obtenida a pH 2.0 representaba un estado típicamente desplegado o casi desplegado donde su población a temperatura ambiente era superior al 95%. Por el contrario, a pH 5.0 y temperatura ambiente, la población del estado nativo era casi del 100 % . La idea inicial fue cambiar el pH de la solución protéica desde pH 5.0 hasta pH 2.0 observando los efectos térmicos que se derivan de esta transferencia. En base a los datos obtenidos mediante DSC nos encontramos con un problema técnico adicional importante, el bajo calor de desplegamiento de la proteína a temperatura ambiente (50 kJ/mol). Con el fin de subsanar este problema se utilizaron concentraciones de proteína relativamente altas del orden de 3 a 3.5 mg/mL con lo cual los calores obtenidos eran superiores.

3.3.1.- Procedimiento Experimental

Los experimentos se llevaron a cabo por medio de un calorímetro isotérmico de titulación denominado ITC Ω de la casa comercial MicroCal Inc. La adquisición de los datos se realizó a las temperaturas constantes de 15°C y 25°C. Los tampones utilizados fueron 5 mM acetato potásico/HCl pH 5.0, 20 mM fosfato sódico/HCl pH 2.0 y 20 mM glicina/HCl pH 2.0. Se realizaron dos experimentos a cada temperatura. El procedimiento experimental para los mismos consistió en la adición de tres inyecciones de volumen 30 μ L cada una de 434 Cro en tampón 5 mM acetato potásico pH 5.0 sobre el tampón 20 mM fosfato sódico pH 2.0, contenido en la célula de muestra para el primer experimento, y sobre tampón 20 mM glicina pH 2.0 también contenido en la célula de muestra, para el segundo experimento. El calor total puesto en juego en cada experimentos es denominado *calor de reacción total*. En la célula de medida o muestra es el lugar en el cual se llevará a cabo la reacción, de ahí que sea también denominada *célula de reacción*.

La muestra de 434 Cro en 5 mM acetato potásico pH 5.0, antes de iniciar la reacción, tenía una concentración 0.427 mM. La medida de concentración se determinó espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción molar a una longitud de onda de 280 nm, $\epsilon_{280}=6370 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ al igual que en los experimentos realizados mediante DSC anteriormente descritos. La concentración de proteína después del experimento fue de 27 μM . Los valores de pH finales alcanzados después de la mezcla, fueron de 2.0 para el experimento sobre fosfato sódico y 2.2 en el caso de tampón glicina.

Antes de la realización del experimento incluyendo proteína se hicieron varios *experimentos control* consistentes en tres inyecciones de 30 μl cada una en las cuales se inyectó en primer lugar tampón acetato potásico pH 5.0 contenido en el inyector sobre sí mismo contenido en la célula de muestra, con el fin de determinar su *calor de dilución* y en segundo lugar se añadió acetato potásico pH 5.0 sobre tampón fosfato sódico pH 2.0 contenido en la célula, en un experimento o tampón glicina también contenido en la célula, para otro experimento, con ello se determinan los *calores de mezcla* de los diferentes tampones que entran en juego dentro de cada experimento. El calor de mezcla obtenido en el caso del acetato potásico sobre fosfato sódico fue de $-160 \mu\text{cal}$ y $300 \mu\text{cal}$ en el caso de acetato potásico sobre glicina. Al *calor de reacción total* obtenido para ambos experimentos, es decir tanto para el caso de fosfato potásico como para el de glicina, le serán restados el *calor de dilución* del acetato potásico de $1.7 \mu\text{cal}$ así como los *calores de mezcla* correspondientes, para posteriormente corregir el resultado con respecto a los *calores de ionización* de los distintos tampones y obtener así la entalpía de desplegamiento (Izzat. R.M., et al., 1968) sin ningún otro efecto que el debido al desplegamiento.

En la Fig. 3.6 se representan las curvas de la dependencia de ΔH ($\mu\text{cal/s}$) con respecto al tiempo (s) para el experimento de desplegamiento de 434 Cro contenida en tampón 5 mM acetato potásico, al ser transferida sobre el tampón 20 mM fosfato potásico pH 2.0, a temperatura constante de 25 °C. En la gráfica superior se engloban las tres curvas en las que se representan los diferentes tipos de calores presentes en este experimento. En la gráfica inferior son representadas de nuevo las anteriores trazas de modo individual para hacer una apreciación mas detallada donde: A representa el *calor de dilución*, B el *calor de mezcla* y C el *calor de reacción total*.

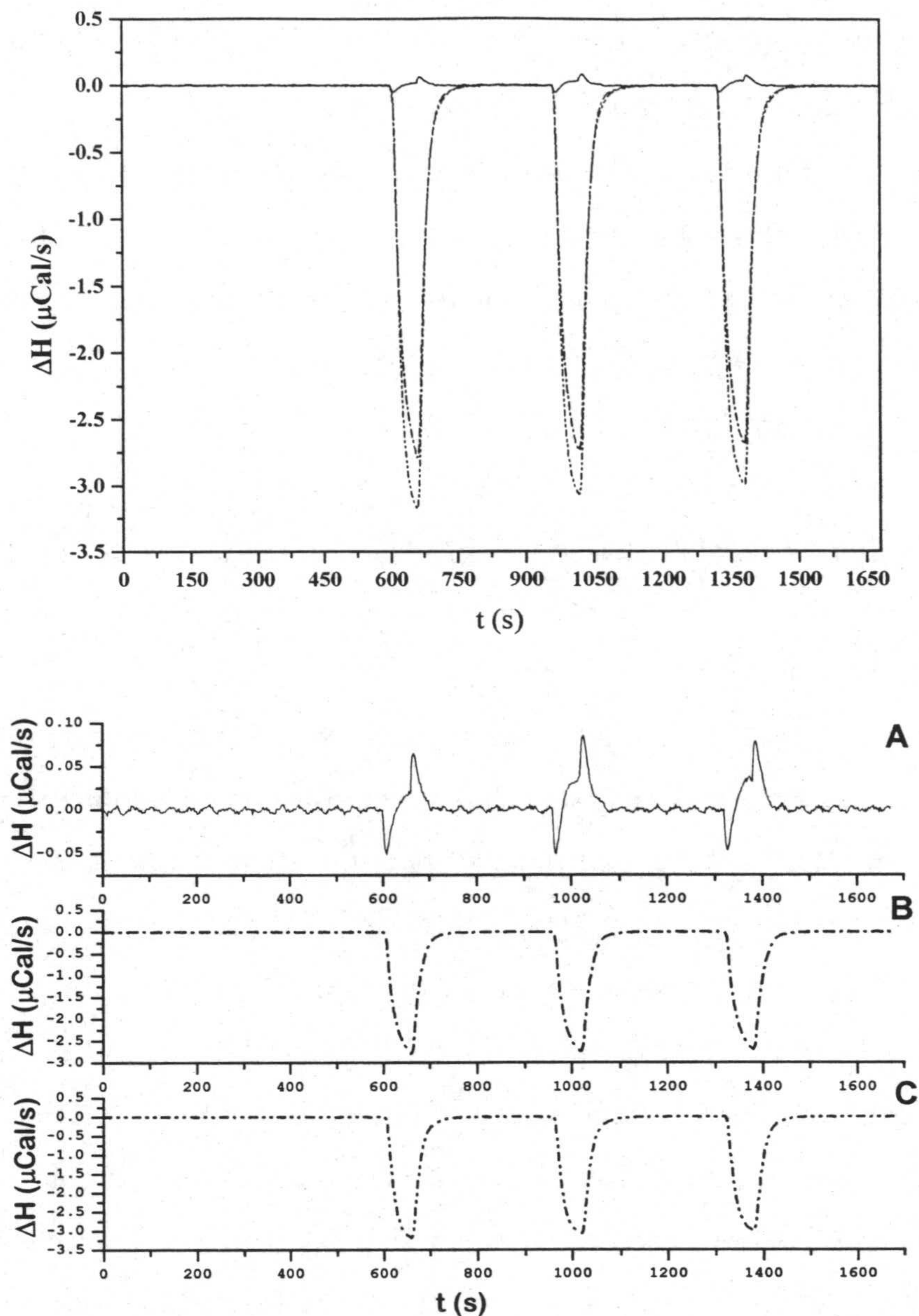
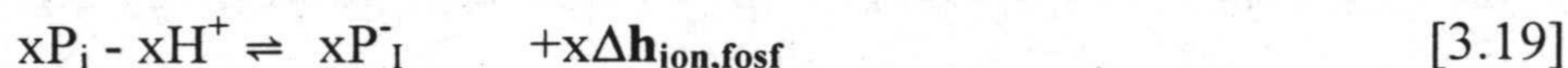


Fig. 3.6. Representación de la dependencia de ΔH ($\mu\text{cal/s}$) con respecto al tiempo (s) para el experimento de desplegamiento de 434 Cro, 0.427 mM de concentración, en tampón 5 mM acetato potásico, pH 5.0, al ser transferido a tampón 20 mM fosfato potásico, pH 2.0, a 25 °C. El pH final de mezcla es 2.0. En la gráfica superior se engloban las tres curvas correspondientes a los diferentes tipos de calores presentes en este experimento; (—) calor de dilución del acetato potásico, (— • —) calor de mezcla del acetato potásico y el fosfato potásico y (— • • —) calor de reacción total. Las tres gráficas inferiores, representadas individualmente, son las mismas que en la gráfica superior. A, corresponde al calor de dilución, B, calor de mezcla y C, calor de reacción total.

3.3.2.- Análisis de las curvas isotérmicas

El análisis de los datos obtenidos por calorimetría isotérmica de titulación se realizó después de restar a las curvas experimentales las correspondientes a los experimentos control. A la curva diferencia obtenida se le resta a su vez la línea base instrumental tal y como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos. Por último, se halla el área bajo la curva, lo que determina la entalpía total del proceso, que posteriormente será corregida respecto a los calores de ionización de los diferentes tampones para obtener el incremento de entalpía de desplegamiento.

Para realizar el análisis de los datos obtenidos es necesario considerar en primer lugar las reacciones que tendrán lugar por la transferencia de la proteína desde pH 5.0 hasta pH 2.0.



donde $\Delta h_{\text{ion,ac}}$ e $\Delta h_{\text{ion,fosf}}$ corresponden a las entalpías de ionización de los grupos ácidos de los tampones acetato y fosfato que poseen valores de pK bajos y x representa el número de moles.

La suma de ambas entalpías se podría englobar en la siguiente ecuación:

$$\Delta H_1 = x \Delta h_{\text{ion,fosf}} - x \Delta h_{\text{ion,ac}} \quad [3.20]$$

Este ΔH_1 corresponde al *calor de mezcla* de ambos tampones, determinado por medio del experimento control en ausencia de proteína, que se realizó añadiendo el tampón acetato sobre el de fosfato. Este calor debe ser considerado posteriormente, a la hora de calcular el calor total del proceso $\Delta H_{\text{tot,cal}}$, debido a la transferencia de la proteína desde pH 5.0 hasta pH 2.0.

En el caso concreto de los tampones fosfato y glicina, las ecuaciones que describen el calor puesto en juego durante el proceso serían:

$$\Delta H_{\text{tot, fosf}} = \Delta H_D + \Delta H_{\text{ion, prot}} + \Delta H_{\text{ion, fosf}} = \Delta H_2 + \Delta H_{\text{i, fosf}} \quad [3.21]$$

$$\Delta H_{\text{tot, glic}} = \Delta H_D + \Delta H_{\text{ion, prot}} + \Delta H_{\text{ion, glic}} = \Delta H_2 + \Delta H_{\text{i, glic}} \quad [3.22]$$

por sustracción de las ecuaciones [3.21] y [3.22] anteriores obtenemos:

$$\Delta \Delta H_{\text{tot}} = (\Delta H_{\text{ion, fosf}} - \Delta H_{\text{ion, glic}}) = p \cdot (\Delta h_{\text{ion, fosf}} - \Delta h_{\text{ion, glic}}) \quad [3.23]$$

donde ΔH_D en las ecuaciones [3.21] y [3.22] es el calor debido al desplegamiento de la proteína, $\Delta H_{\text{ion, prot}}$ es el calor de transferencia de p protones desde el tampón pH 2.0 hasta la cadena polipeptídica, $\Delta H_{\text{ion, gli}}$ e $\Delta H_{\text{ion, fosf}}$ son los calores de donación de p protones transferidos a la proteína desde el tampón a pH 2.0 (fosfato o glicina). De esta ecuación obtenemos un valor de p igual a 5.22 que indica la transferencia a la proteína de 5.22 protones, a 25°C de temperatura. Este valor es muy razonable si tenemos en cuenta que los grupos ácidos en la proteína son: cuatro Glu, un Asp y el grupo carboxilo terminal, en total seis grupos ácidos. El resultado experimental de 5.22 protones transferidos es un poco menor, lo cual puede deberse a que no todos los grupos están perfectamente protonados a pH 2.0. Conocido el valor de protones transferidos es posible calcular ΔH_2 a cualquier temperatura, que en nuestro caso fue de $9.4 \pm 0.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a 25 °C. Es posible hacer una estimación de $\Delta H_{\text{ion, pr}}$ a partir del calor promedio por ganancia o pérdida de un protón por parte de la proteína, ya que son perfectamente conocidos los grupos aceptores de protones dentro de la proteína. Dicho calor viene determinado por la siguiente ecuación:

$$\Delta h_{\text{ion, prom}} = \frac{(m_{\text{asp}} \cdot \Delta h_{\text{asp}} + m_{\text{glu}} \cdot \Delta h_{\text{glu}} + \Delta h_{\text{c-term}})}{(m_{\text{asp}} + m_{\text{glu}} + 1)} \approx 0.57 \text{ Kcal.mol}^{-1} \quad [3.24]$$

Es decir el efecto medio por cada protón cedido por la proteína, es de 0.57 kcal.mol⁻¹ o -0.57 kcal.mol⁻¹, por cada protón adquirido por la proteína.

A partir del resultado anterior podemos estimar el valor de $\Delta H_{\text{ion, prot}}$ multiplicando el número de protones adquiridos por la 434 Cro ($p = 5.22$) por $\Delta h_{\text{ion, prom}}$. (-0.57 kcal.mol⁻¹), obteniendo un valor a 25 °C de $\Delta H_{\text{ion, prot}}$ igual a -3 kcal.mol⁻¹.

Teniendo en cuenta los valores de ΔH_2 así como $\Delta H_{\text{ion,prot}}$ podemos obtener el valor de la entalpía de desplegamiento del proceso, ΔH_D , según la ecuación:

$$\Delta H_2 = \Delta H_D + \Delta H_{\text{ion,prot}} \quad [3.25]$$

El valor de (ΔH_D) a 25°C fue $12.4 \pm 0.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ que equivale a 57 kJ.mol^{-1} y 33 kJ.mol^{-1} a 15°C. Los valores de ΔH_D a 25 °C y 15 °C se incluyeron en la Fig. 3.4 mostrándose de este modo la dependencia de ΔH_m con la T_m y su buena correlación con los datos obtenidos por medio de DSC.

3.4.- Discusión

434 Cro presenta un desplegamiento termodinámico típico en un gran número de proteínas globulares pequeñas tal y como está descrito en la literatura (Pace, C.N. & Laurents, D.V., 1989; Kuhlman, B. & Rleigh, D.P., 1998; Ruiz-Sanz, J. et al., 1999).

La estabilidad térmica de 434 Cro y en particular sus valores de T_m obtenidos a diferentes condiciones experimentales, coinciden tanto si han sido determinados por medio de CD (UV-lejano) o por DSC, mientras que el resultado de estabilidad caracterizado por el valor de ΔG_D (25°C) obtenido por CD (UV-lejano) a pH 6.0 y en ausencia de urea aplicando el modelo MUD es mayor que el valor obtenido aplicando el modelo MEL. Este mismo valor, determinado desde el multiajuste de los datos obtenidos por DSC, se sitúa entre los valores obtenidos por los dos modelos anteriores.

Desde el punto de vista de las curvas obtenidas por DSC la estabilidad de la proteína disminuye con el decrecimiento del pH, lo cual debe corresponderse con la existencia de grupos con valores de pK anómalos en su estado nativo. Esta disminución de la estabilidad con el pH viene acompañada por un intercambio neto de uno o dos protones a $\text{pH} < 4.0$. Es por tanto lógico pensar que este intercambio de protones se deba a uno o dos grupos cargados, que en su estado nativo están protegidos del solvente y por consiguiente de la protonación, compensando su carga bien por medio de un entorno electrostático adecuado en contacto con otros restos o bien formando un puente salino, lo que generará un pK inferior anómalo de los grupos formadores de dicho puente en estado nativo con respecto al desplegado.

Al desplegarse la proteína, estos grupos que en su estado nativo estaban protegidos del solvente entran en contacto con él cogiendo protones del mismo a un pH muy próximo a ese pK anómalo, y con el fin de compensar esas cargas al ser destruido el puente salino (Becktel, W.J. & Shellman, J.A., 1987). Los restos más favorables para presentar un comportamiento de este tipo son cuatro Glu y un Asp cuyos valores de pK, según compuestos modelo, son para un Glu en un entorno similar al descrito alrededor de 4.5 y para un Asp de 4.0 (Creighton, T.E., 1993). A su vez, dentro de estos restos el candidato más adecuado es el Glu 37, que forma un puente salino enterrado en el corazón hidrofóbico con Arg 12; ambos restos poseen una baja accesibilidad al solvente y, por el contrario, el resto de los residuos ácidos de la proteína están claramente expuestos al solvente (Mondragón, A. et al., 1989; Padmanabhan, S. et al., 1997). El bajo pK del Glu 37 podría ser la consecuencia del completo desplegamiento de la proteína a pH 2.0.

3.4.1.- Comparación de las estabilidades de 434 Cro con el dominio N-terminal de la proteína represora del fago 434 (R1-69) y el represor del fago λ (λ_{6-85}).

Es interesante comparar la estabilidad de 434 Cro con la de otras proteínas que presentan cierta similitud en su topología e incluso homología dentro de su secuencia. Este es el caso del dominio N-terminal del represor del fago 434 compuesto por los residuos del 1 al 69 que se denomina por sencillez R1-69, y el del represor del fago λ , formado por los residuos del 6 al 85 que es denominado λ_{6-85} . Tanto 434 Cro así como estos dos represores poseen una gran similitud estructural, en concreto 434 Cro y R1-69 poseen una identidad en la secuencia de casi el 50 %. En la Tabla 3.2 representamos los parámetros que describen la estabilidad termodinámica de estas tres proteínas, obtenidos por desnaturalización química y térmica. Los datos listados para R1-69 fueron obtenidos calorimétricamente por nuestro grupo (Ruiz-Sanz, J. et al., 1999) y los correspondientes a λ_{6-85} fueron obtenidos por desnaturalización química (Huang G. S. & Oas, T. G., 1996). Se observa que los valores de $\Delta C_{p,D}$ para 434 Cro y R1-69 son muy parecidos lo cual no es sorprendente ya que poseen como se ha dicho anteriormente una gran similitud estructural, siendo bien conocida la correlación existente entre $\Delta C_{p,D}$ y estructura (Gómez, J. & Freire, E. 1995; Myers, J. K., 1995; Spolar, R. S., 1992; Murphy, K. P. & Freire, E. 1992).

Las cinco hélices presentes en la estructura en el caso de 434 Cro y R1-69 tienen la misma longitud, estando sus regiones bien estructuradas y pudiendo ser casi superponibles en ambas proteínas. En cambio, en el caso de λ_{6-85} su $\Delta C_{p,D}$ es mayor que para 434 Cro y R1-69, ya que su secuencia es más larga y por consiguiente la longitud de sus hélices, existiendo además variaciones estructurales mayores con respecto a las otras dos proteínas. La T_m para R1-69 es considerablemente mayor que para 434 Cro y λ_{6-85} aunque el ΔH_m para λ_{6-85} es mayor al de R1-69 y éste último, a su vez mayor que el de 434 Cro.

Se ha observado que en el caso de pequeñas proteínas el que la T_m posea un valor alto no implica una estabilidad especialmente alta o, lo que es lo mismo, altos valores de ΔG_D . Una consecuencia termodinámica con respecto a estas proteínas es el pequeño valor de ΔC_p e ΔH_m (Scholtz, J.M. et al., 1995). Las estabilidades termodinámicas de 434 Cro, R1-69 y λ_{6-85} están dentro del rango observado para un gran número de pequeñas proteínas globulares. El valor de ΔG_D más bajo estimado asumiendo $\Delta C_{p,D}$ constante, corresponde a 434 Cro y el más alto a R1-69 con una diferencia de 2 kcal.mol⁻¹. En el caso de λ_{6-85} este valor se determinó en D₂O cuyo exceso con respecto a H₂O es -0.5 kcal.mol⁻¹ a 37 °C (Huang, G. S. et al. & Oas, T. G., 1996). Todos estos datos confirman una gran similitud entre 434 Cro y R1-69.

Se han realizado también estudios de sustitución de ciertos restos con el fin de aumentar la estabilidad intrínseca de las hélices α en estas proteínas. En el caso concreto de λ_{6-85} la estabilidad ha aumentado (Burton, R. E., et al., 1997) al contrario que para 434 Cro y R1-69 (Padmanabhan, S., et al., 1999), lo cual indica que ésta no es aquí una buena base para obtener un aumento de estabilidad. Por el contrario, existen estudios como es el caso del llevado a cabo por Sauer y colaboradores (Waldburger, C. D., 1995), sobre la proteína represora dimérica Arc, dentro de la familia de proteínas de unión a DNA que poseen un motivo común hélice-giro-hélice, en la cual la sustitución de ciertos restos, que formaban puentes salinos enterrados por restos apolares compatibles con los requerimientos estructurales de la proteína, aumentaban su estabilidad, lo cual nos sugiere que el puente salino enterrado al solvente en el caso de 434 Cro entre Glu 37 y Arg 12 determina la baja estabilidad de esta proteína al disminuir el pH. Este puente salino no está presente en λ_{6-85} (Mondragon, A., et al., 1989) o en sus variantes (Padmanabhan, S., et al., 1999) pero sí se encuentra en R1-69.

Parámetros termodinámicos de 434 Cro en comparación con R1-69 y λ_{6-85}			
Parámetros	434 Cro	R1-69 ^a	λ_{6-85} ^b
T_m (°C)	<u>57.0 ± 0.1</u> ^c <u>57.2 ± 1.0</u> ^c	70.7 ± 0.5	57.2 ± 0.1
ΔH_m (kcal mol ⁻¹)	<u>46.6 ± 0.05</u> ^d <u>47.2 ± 3.0</u> ^e <u>45.5 ± 20</u> ^f	58.6 ± 2.4	68 ± 1
ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)	0.98 ± 0.05 ^d 0.95 ± 0.03 ^e (1.28-0.0114 t) ^f	0.80 ± 0.02	1.44 ± 0.03
m (kcal M ⁻¹ mol ⁻¹)	0.99 ± 0.10	n.d	1.13 ± 0.02
ΔG (25°C) ^e (kcal mol ⁻¹)	<u>3.05 ± 0.49</u> ^d <u>3.07 ± 0.3</u> ^e <u>3.23 ± 0.2</u> ^f	5.20 ± 0.40	4.30 ± 0.20
ΔG (max a $T=T_s$) ^e (kcal mol ⁻¹)	<u>3.20</u> ^d <u>3.39</u> ^e <u>3.66</u> ^f	5.8	4.6
$T_s=T_{max}$ (°C)	<u>12.8</u> ^d <u>11.0</u> ^e <u>10.6</u> ^f	4.7	13.2

Tabla 3.2. Los datos subrayados pertenecen a la desnaturalización térmica y química para 434 Cro a pH 6.0, 100 mM KCl, 25 mM KH₂PO₄, 1 mM DTT.

^a Datos calorimétricos obtenidos por DSC para R1-69 a pH 7.0, 200 mM NaCl, 20 mM Pipes (Ruíz-Sanz, J., et al., 1999). Parámetros calculados considerando ΔC_p independiente de la temperatura.

^b Parámetros obtenidos por desnaturalización química (Huang, G. S., et al., 1996) para λ_{6-85} a pH 8.0, 100 mM KCl, 25 mM KH₂PO₄, 99% D₂O.

^c T_m medida por medio de DSC.

^{c'} T_m medida por medio de CD de la desnaturalización térmica en ausencia de urea.

^d Parámetros obtenidos por desnaturalización química y medidos por CD.

^e Parámetros determinados por extrapolación lineal de los datos obtenidos por DSC en la gráfica ΔH_m frente T_m .

^f Parámetros obtenidos por multiajuste de las trazas de DSC utilizando T_h y T_s .

n.d (no disponible).

Con el fin de obtener una mejor interpretación de estos datos es necesario tener en cuenta lo siguientes puntos: 1) 434 Cro, R1-69 y λ_{6-85} son monoméricas incluso a altas concentraciones como las utilizadas en estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía. 2) 434 Cro es una proteína completa a diferencia de R1-69 y λ_{6-85} que constituyen un solo dominio (N-terminal) dentro de la proteína completa dimérica de tamaño muy superior. Así, la estabilidad del dominio dentro del contexto de la proteína completa puede presentar una estabilidad diferente a la de su estado aislado debido al efecto de cooperatividad con el resto de la proteína. 3) Tanto R1-69 como λ_{6-85} pueden obtenerse de la proteína completa por medio de proteólisis limitada utilizando papaína (Mondragon, A., et al., 1989; Sauer, R.T., et al. 1990) lo cual indica que forman unidades independientes dentro de la proteína intacta. 4) El represor λ intacto posee dos transiciones térmicas, una de ellas perteneciente al dominio N-terminal, indica que ésta constituye una unidad plegada independiente con una estabilidad muy parecida tanto si forma parte de la proteína intacta, como si se encuentra aislada (Sauer, R.T., et al. 1990). 5) Por último, añadir que la baja estabilidad de 434 Cro con respecto a R1-69 así como a λ_{6-85} debe constituir un punto importante dentro de la regulación de su concentración intracelular, lo cual parece decisivo en la regulación del ciclo del fago 434 λ para determinar el paso de la fase lisogénica a lítica.

**4.- ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LOS EFECTOS
DEL DISEÑO DE HÉLICES EN EL DOMINIO DE
ACTIVACIÓN DE LA PROCARBOXIPEPTIDASA A2
HUMANA.**

4.- ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LOS EFECTOS DEL DISEÑO DE HÉLICES EN EL DOMINIO DE ACTIVACIÓN DE LA PROCARBOXIPEPTIDASA A2 HUMANA

4.1.- Antecedentes Bibliográficos

La carboxipeptidasa A2 es una enzima digestiva pancreática. Existe un gran número de enzimas pancreáticas bien conocidas tales como la tripsina, quimotripsina y elastasa. Las enzimas pancreáticas, como su nombre indica, se sintetizan en el páncreas, secretadas a través del conducto pancreático incluido en el duodeno del intestino delgado, en respuesta a la señal hormonal generada cuando los alimentos pasan a través del estómago. Una de ellas es la carboxipeptidasa, cuya función es hidrolizar el enlace peptídico carboxilo-terminal de las cadenas polipeptídicas. La hidrólisis se produce más fácilmente cuando el citado residuo carboxilo-terminal posee una cadena lateral voluminosa. Un ejemplo de esta reacción por medio de la carboxipeptidasa A se recoge en la Fig. 4.1.

Sin embargo, las enzimas digestivas no adquieren su forma activa en el páncreas debido a que un gran número de potentes proteasas libres en él podrían dar como resultado la digestión del propio tejido pancreático. Por esto, las proteasas están sintetizadas en su forma inactiva denominándose *zimógenos* o proenzimas. En el caso de la carboxipeptidasa su zimógeno se conoce con el nombre de *procarboxipeptidasa*. La activación de los *zimógenos* en enzimas pancreáticas se realiza dentro del intestino por medio de la hidrólisis de enlaces peptídicos específicos conocidos como *segmentos de activación*. En la siguiente ilustración, Fig. 4.2, podemos ver el mecanismo de activación de los distintos zimógenos. La cadena de activación empieza con la acción de la enteropeptidasa sobre el tripsinógeno, zimógeno de la tripsina, convirtiéndolo en tripsina activa. A su vez la tripsina activa otros zimógenos como es el caso de la procarboxipeptidasa en la cual ataca el resto específico positivo de Lys 88 dentro del segmento de activación. El corte en la cadena polipeptídica da como resultado la separación de la enzima activa (carboxipeptidasa) y un dominio plegado denominado *dominio de activación* (Fig. 4.3). Este dominio, que cubre el centro activo de la enzima puede expresarse individualmente en su forma plegada por medio de *E. coli*, lo cual se ha realizado en este trabajo para poder investigar la termodinámica de su plegamiento.

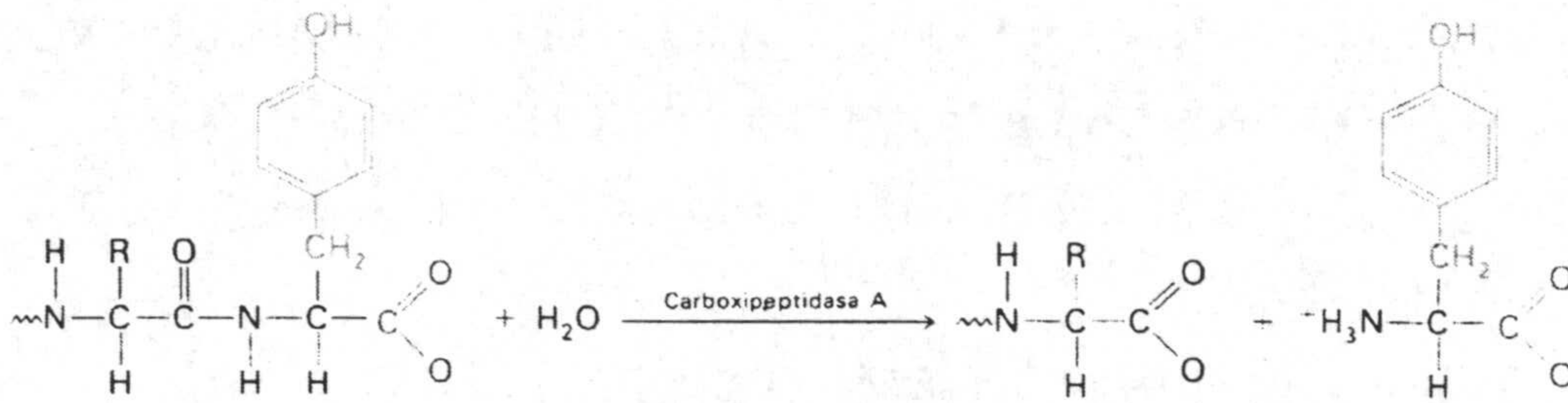


Fig. 4.1. Reacción catalizada por la carboxipeptidasa A.

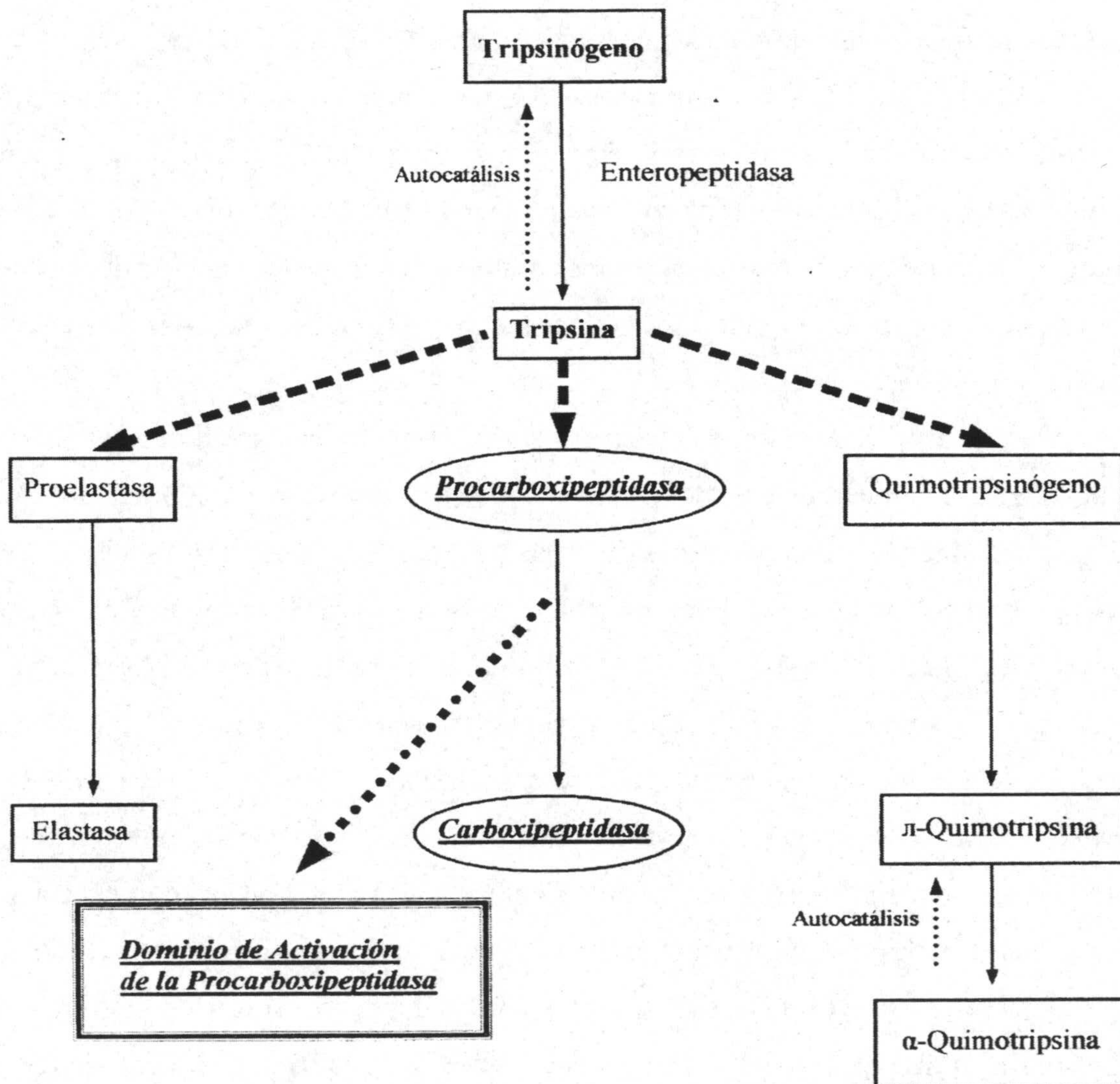


Fig. 4.2. Sistema de activación de zimógenos pancreáticos, moléculas que se activan catalíticamente al ser cortadas.



Fig. 4.3. Estructura de la Procarboxipeptidasa A2 humana obtenida por difracción de rayos X (I. García-Sáez et al. 1997) y reconocida en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) con el código 1 AYE. Se destaca el residuo Lys 88 perteneciente al segmento de activación sobre el que la tripsina actúa, generando por separado la Carboxipeptidasa A2 (enzima activa) y el “dominio de activación de la procarboxipeptidasa A2” tal y como se describe en el texto.

En concreto, hemos estudiado el dominio de activación de la *procarboxipeptidasa A2 humana* que denominaremos por simplicidad **ADA-2h WT**, así como diversos mutantes.

El dominio de activación de la procarboxipeptidasa A2 está formado por 81 aminoácidos que configuran una estructura globular formada por dos hélices α y cuatro láminas β (Fig.4.4) con un peso molecular de 9.2 kDa. Su estructura tridimensional ha sido determinada por medio de difracción de rayos X, incluida en la estructura completa de la proenzima (procarboxipeptidasa) (Catasús et al., 1995; García-Sáez et al., 1997) así como por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) del dominio aislado (Jiménez et al., 1999). El estudio de esta proteína es de gran interés ya que presenta una estructura intermedia entre una totalmente helicoidal, como es el caso de la 434 Cro descrita en un capítulo de esta tesis, y una tipo sándwich β como la SH3 de espectrina estudiada también por nuestro grupo.

El objetivo de nuestro trabajo ha estado dirigido en la obtención de un mayor entendimiento de la estabilidad proteica, punto fundamental en los estudios sobre plegamiento de proteínas, por su importancia dentro de la ingeniería de proteínas en sus aplicaciones tanto industriales como farmacológicas y también por la reciente relación descrita entre la estabilidad de proteínas y el desarrollo de enfermedades fatales (Hurle et al., 1994; Wood et al., 1995; Booth et al., 1997; Prusiner, 1997) incluido el cáncer (Hupp, 1999). El análisis de estructuras conocidas de extremófilos (Vieille et al., 1996; Jaenicke & Bohm, 1998) y enzimas psicofílicas (Feller & Gerday, 1997) no ha aportado reglas generales acerca de los factores determinantes de la termoestabilidad proteica. A pesar de que no se conoce una interacción particular, responsable universal de la termoestabilidad de proteínas, existe no obstante una buena correlación cualitativa entre la estabilidad total de las hélices, estimada por el algoritmo semiempírico denominado AGADIR (Muñoz V. & Serrano L., 1995; Lacroix et al., 1998) y la resistencia de la proteína a ser desnaturizada térmicamente (Pethukov et al., 1997).



Fig. 4.4. Modelos estructurales tridimensionales para los mutantes del dominio de activación de la procarboxipeptidasa humana, ADA-2h denominados: M1 (figura superior) y M2 (figura inferior). Se han resaltado los aminoácidos mutados en las superficies, en contacto con el disolvente, de la hélice $\alpha 1$, para el caso del mutante M1 y de la hélice $\alpha 2$, en el caso del mutante M2. Estos modelos se han obtenido a partir de la estructura de la procarboxipeptidasa A2 determinada por rayos X (García-Sáez, D. et al., 1997), la cual puede localizarse en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) con el código 1AYE.

Estudios previos sobre ADA-2h WT han demostrado que su desplegamiento, inducido por temperatura o por desnaturizante, se ajusta a una transición de dos estados a pH neutro (^aVillegas et al., 1995) y su estabilidad puede ser aumentada significativamente por medio de mejoras en interacciones locales, diseñadas previamente sobre sus hélices α (Villegas et al., 1995; Viguera et al., 1996). Las mutaciones se realizaron sobre residuos localizados en la superficie de *hélice* α 1 y *hélice* α 2, expuestos al disolvente. Los tres mutantes diseñados se denominaron: **M1**, mutaciones realizadas sobre la *hélice* 1 (N25K, Q28E, Q32K, E33K), **M2**, mutaciones realizadas sobre *hélice* 2 (Q60E, V64A, S68A, Q69H) y **DM**, *doble mutante*, que contiene las mutaciones realizadas sobre ambas hélices. En la Fig. 4.5 se ilustra la secuencia del dominio en su estado salvaje (WT), así como las secuencias correspondientes a los mutantes (M1 y M2), destacando aquellos restos que se han mutado.

Sec.	TT SSSS	THHHHHHHHHTT	333	SSSS	TTTT SSSS	333HHHHHHHHHTT	SSSSST
WT	MRSLET	FVGDQVLEIVPSN	EEQIKNLLQLEA	QHLQLDFWKSPTTP	GETAHVRVPFVNVQ	AVKVFLESQGIAYS	SIMIEDVQ
M1	MRSLET	FVGDQVLEIVPSN	EEQIK <u>KLLE</u> LEA <u>KK</u> HLQLDFWKSPTTP	GETAHVRVPFVNVQ	AVKVFLESQGIAYS	SIMIEDVQ	
M2	MRSLET	FVGDQVLEIVPSN	EEQIKNLLQLEA	QHLQLDFWKSPTTP	GETAHVRVPFVNV <u>E</u> AVK <u>A</u> FLE <u>AH</u> GIAYS	SIMIEDVQ	

Fig.4.5. Secuencia aminoacídica (Sec.) de ADA-2h WT y sus mutantes M1, M2 y DM (suma de mutaciones realizadas sobre M1 más las realizadas sobre M2). Los restos mutados están subrayados y destacados en color rojo. Se denotan con "T" los giros, "S" las láminas β , "H" las hélices α y con "3" las hélices 3_{10} .

En general, se puede esperar que el aumento de la estabilidad de alguno de los elementos de la estructura secundaria repercute de manera proporcional sobre la estabilidad de la proteína completa, siempre y cuando ésta presente un desplegamiento cooperativo. Sin embargo, si la proteína está parcialmente desplegada o posee conformaciones alternativas o estados intermedios significativamente poblados en su desplegamiento, el efecto de estabilización local anteriormente descrito podría ser repartido de manera no homogénea, entre los diferentes conformeros.

A pesar de todo ello, ni la aditividad de los efectos de las mutaciones, ni la cooperatividad del desplegamiento de las estructuras mutadas se han comprobado en estudios previos sobre estos sistemas debido a varias razones. Primero, la estructura del mutante doble (DM) es tan estable a pH neutro que no ha sido posible su desplegamiento incluso a altas concentraciones de urea. Segundo, en dichos estudios previos los parámetros termodinámicos fueron determinados aplicando a las curvas de desplegamiento por urea el modelo de extrapolación lineal (MEL), lo que supone la total cooperatividad de las transiciones. Aunque, según los datos de DSC el desplegamiento de ADA-2h WT a pH neutro se ajusta al modelo de dos estados, esto no ha sido comprobado para el resto de los mutantes bajo diferentes condiciones experimentales.

Tal y como se ha indicado en el capítulo de Materiales y Métodos, DSC destaca de entre otros métodos termodinámicos tanto por su capacidad para la comprobación de la cooperatividad del desplegamiento, como por su posibilidad de obtener la capacidad calorífica hasta 130 °C. Por todo ello, la caracterización termodinámica y conformacional de ADA-2h WT, así como la de sus tres mutantes, ha sido llevada a cabo aquí por medio de la utilización de la calorimetría diferencial de barrido en combinación con dicroísmo circular (CD) y resonancia magnética nuclear (RMN) como técnicas complementarias, con el fin de determinar e interpretar los parámetros termodinámicos del desplegamiento de las proteínas, inducido tanto térmica como químicamente bajo diferentes condiciones de pH. Las medidas de CD se hicieron en el grupo del Dr. Francesc X. Avilés (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona) y las de RMN en nuestro propio grupo por el Dr. Nico A. J. van Nuland y el Dr. Francisco Conejero Lara, como más adelante se detallará.

Todos los resultados obtenidos se discutirán a continuación en base a la naturaleza de las mutaciones introducidas y a los cambios estructurales que las acompañan.

4.2.- ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO TÉRMICO DE ADA-2h POR MEDIO DE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

4.2.1.- Procedimiento experimental

Se han utilizado dos tipos de calorímetros diferenciales de barrido para llevar a cabo los experimentos: calorímetro diferencial de barrido DASM-4M (Biopribor, Rusia) y calorímetro diferencial de barrido VP-DSC (MicroCAL, USA) cuyas características están recogidas en el capítulo de Materiales y Métodos. Las concentraciones de las muestras de ADA-2h utilizadas en el caso de DASM-4M fueron de alrededor de 2 mg/mL y de dos a tres veces inferiores para el VP-DSC. La determinación de las concentraciones se realizó espectrofotométricamente a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción, $\epsilon_{280} = 0.78 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Villegas V. et al, 1995) tanto para la muestra en su estado natural como para sus mutantes. Se utilizó un peso molecular, para todas las variantes de 9.2 kDa y un volumen específico parcial igual a 0.73 mL/g. Las velocidades de barrido fueron de 2 K/min para DASM-4M y 1.5 K/min en VP-DSC. El estudio se llevó a cabo bajo diferentes condiciones de pH siendo los tampones utilizados: 20 mM fosfato sódico para pH 7.0 y 50 mM glicina para pHs 2.0, 2.5, 3.0, 10.5 y 11.6.

Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular se realizaron sobre una columna conteniendo Shephadex G-50. La concentración de DM introducida fue de 0.12 mM.

4.3.- Resultados experimentales

4.3.1.- Estudio a pH neutro y alcalino

La primera parte del estudio consistió en la determinación de la estabilidad de las proteínas a pH neutro, utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los resultados de los experimentos realizados a pH 7.0 se muestran en la Fig. 4.6, de la que se puede deducir que la temperatura de desplegamiento, T_m , del dominio aumenta con la estabilización de sus hélices α según la secuencia WT < M1 \cong M2 < DM. El desplegamiento térmico de la proteína así como el sus mutantes a pH 7.0 es reversible y altamente reproducible durante el segundo barrido, tal y como se observa por ejemplo en

la Fig. 4.7 para el caso concreto del DM a este pH. No se ha observado dependencia alguna por parte de las curvas calorimétricas obtenidas con respecto a la concentración de proteína, ni con la velocidad de barrido, siempre y cuando la proteína no haya sido expuesta a altas temperaturas durante un largo periodo de tiempo.

Como es de esperar, los espectros de RMN a pH 7.0 se corresponden con los de proteínas bien estructuradas para todas las variantes. Por otro lado, el orden de protección en contra del intercambio hidrógeno / deuterio (H/D) también se correlaciona con el orden de estabilidad determinado por DSC.

Los estudios previos realizados a este pH por medio de CD o fluorescencia corroboran los resultados obtenidos por DSC para todas las proteínas exceptuando el caso del DM, ya que es muy estable y no se despliega por completo hasta casi 95 °C, temperatura máxima accesible en los experimentos ópticos. No obstante, en el calorímetro se pueden calentar las muestras hasta 130 °C lo que permite registrar la transición completa para todas las variantes de ADA-2h. De la curva de desplegamiento para el DM se desprende que éste es muy estable, presentando una T_m alrededor de 93 °C, y cuyo proceso de desplegamiento finalizó a 120°C, como se muestra en la Fig. 4.7. En la figura 4.6 también se observa que las capacidades caloríficas de estado nativo, $C_{p,N}$, son prácticamente iguales para todas las especies y corresponden a la ecuación lineal empírica :

$$C_{p,N}(T) = 15.2 (\pm 1.5) + 0.07 T \quad \text{kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \quad [4.1]$$

es decir, la capacidad calorífica del estado nativo aumenta linealmente con la temperatura, las capacidades caloríficas del estado desplegado, $C_{p,D}$, se sitúan alrededor de $21.7 \pm 2 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ a 120 °C sin casi depender de la temperatura. Por lo tanto, el incremento de la capacidad calorífica, $\Delta C_{p,D}$, no es constante con respecto a la temperatura, disminuyendo con el crecimiento de ésta tal y como se ve en la Fig. 4.8. Es bien conocido el hecho de que no es fácil determinar $\Delta C_{p,D}$, en el caso de proteínas pequeñas, directamente de las curvas de calentamiento por la dificultad en la extrapolación de $C_{p,N}$ y $C_{p,D}$ (Filimonov, V.V. et al., 1999). Como resultado, el error promedio en la determinación de $\Delta C_{p,D}$ podría alcanzar valores superiores al 20%. Sin embargo, existe otra opción para estimar un valor de $\Delta C_{p,D}$ con alta precisión a partir de la dependencia del efecto calorífico (ΔH_m) con la temperatura, T_m , tal y como describimos en el capítulo de Materiales y Métodos.

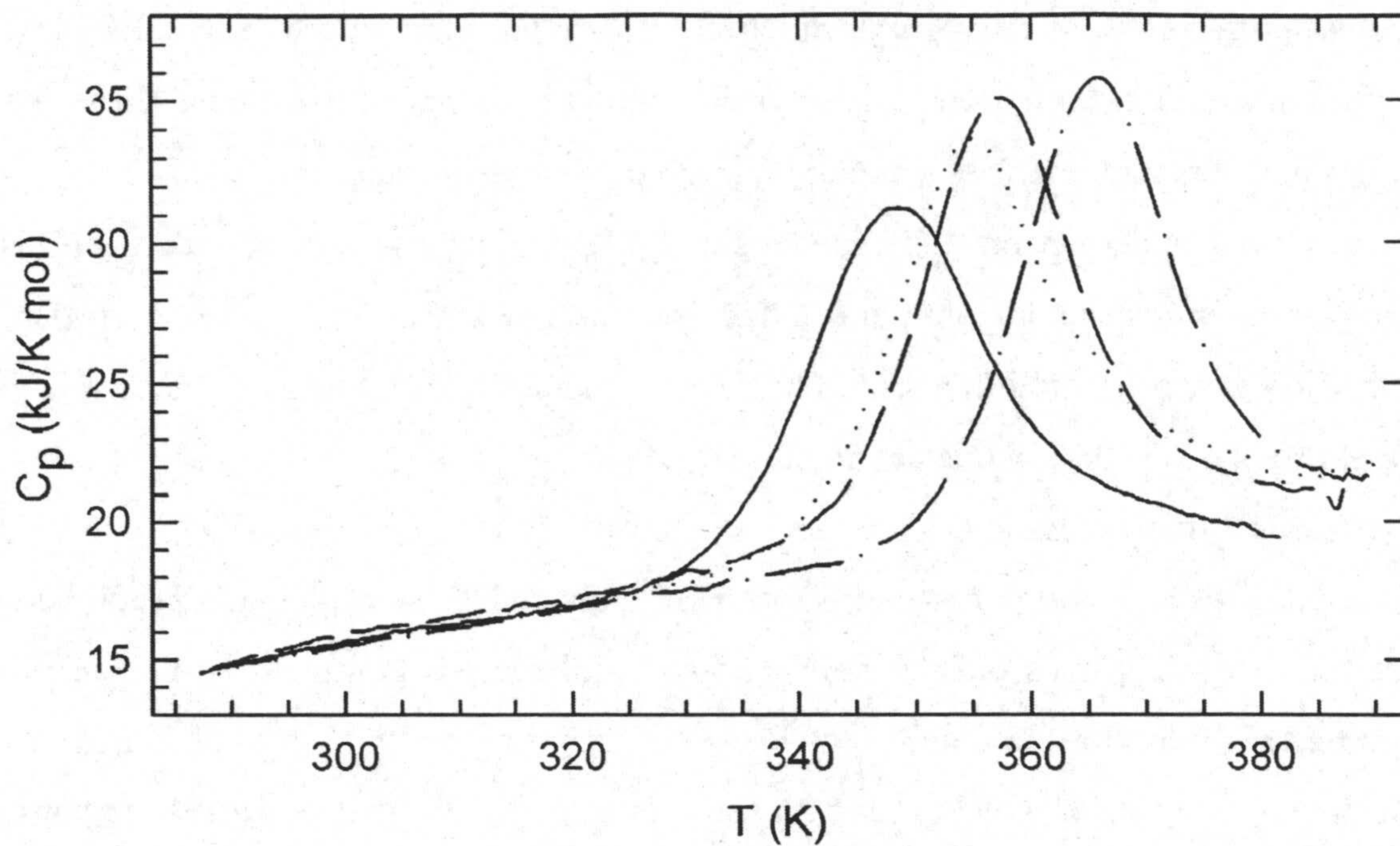


Fig. 4.6. Dependencia de la capacidad calorífica molar con la temperatura para ADA-2h WT (—), M1 (• • •), M2 (— — —) y DM (— • —) a pH 7.0.

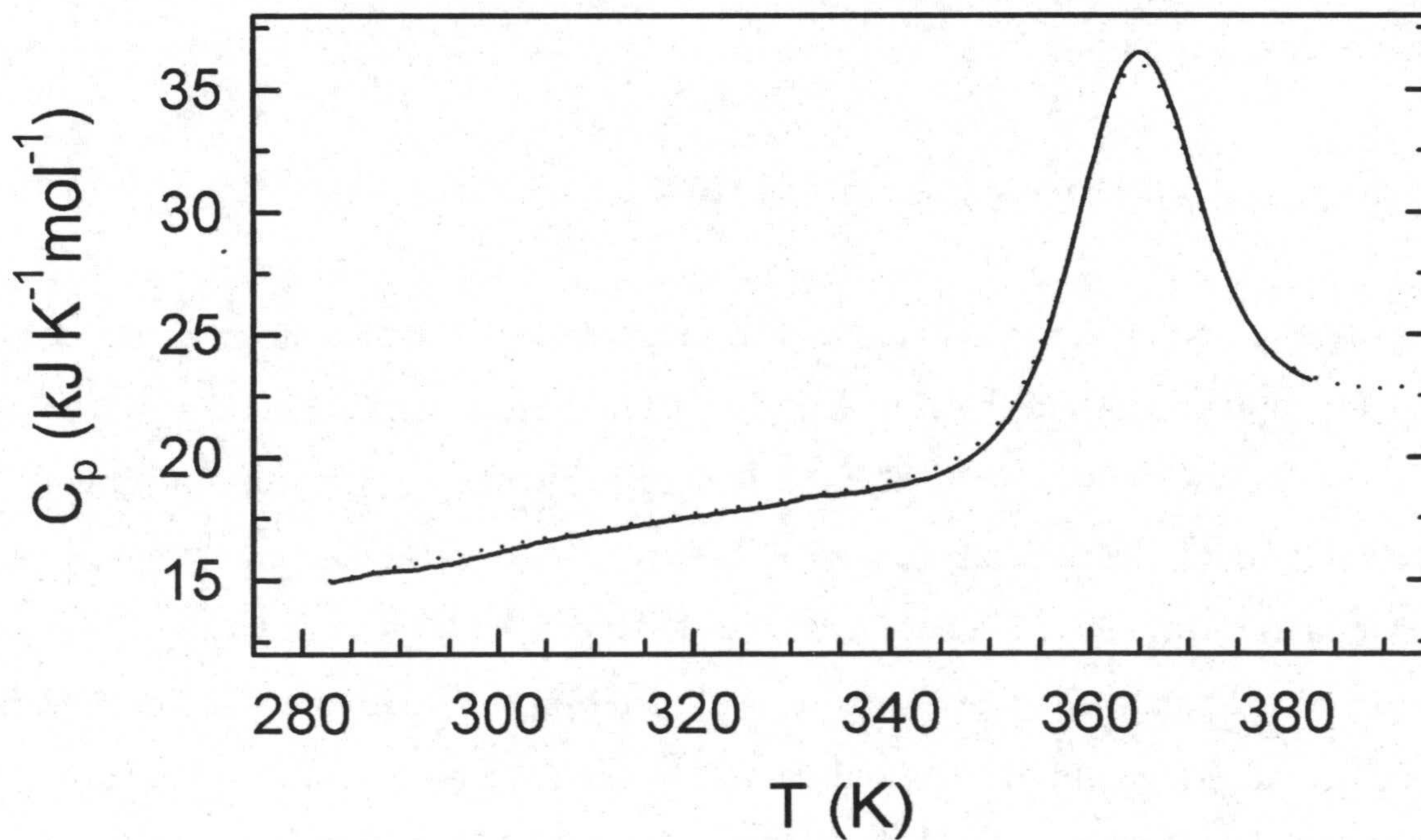


Fig. 4.7. Demostración de la reversibilidad del desplegamiento para el DM a pH 7.0 por medio de VP-DSC a una velocidad de barrido de 90 K/h y concentración de 2.55 mg/mL. La línea continua corresponde al primer barrido y la punteada al segundo.

En nuestro análisis de las curvas de desplegamiento obtenidas por medio de DSC hemos utilizado el modelo de dos estados (para más detalles ver capítulo de Materiales y Métodos), suponiendo una dependencia lineal de $\Delta C_{p,D}$ con la temperatura. El resultado de este análisis para M2 a pH 7.0 se presenta en la Fig. 4.8.

El estudio calorimétrico también se realizó a valores de pH superiores a 10 con el objetivo de disminuir la estabilidad de las proteínas y obtener así una dependencia del valor de ΔH_m con la temperatura, T_m , en un rango más amplio de temperatura con el fin de poder averiguar si las mutaciones inducen algún efecto entálpico y estimar $\Delta C_{p,D}$. La región alcalina ha sido elegida en vez de la región ácida porque, como podremos ver más adelante, las proteínas sufren un cambio conformacional importante en esta última región por debajo de su punto isoeléctrico (...). Los tampones más adecuados utilizados en esta región se caracterizan en general por poseer una entalpía de ionización alta. Para evitar los efectos de ionización del tampón sobre las medidas de entalpía de desplegamiento hemos elegido como tampón la glicina, cuya entalpía de ionización es similar a la de desprotonación de las lisinas de la proteína, fenómeno que se produce al trabajar a pH alto. De este modo hemos compensado ambos fenómenos evitando que repercutan sobre la medida de la entalpía de desplegamiento. De los experimentos realizados a pH alcalino se desprende que el decrecimiento en la estabilidad de las proteínas no es grande en comparación con el obtenido a pH neutro. Además, a pH alcalino se mantiene la secuencia de estabilidad anteriormente descrita a pH 7.0, $WT < M1 \cong M2 < DM$.

En la Fig. 4.9 se muestran las correlaciones entre la entalpía de desplegamiento, ΔH_m , y la temperatura de transición, T_m , para todos los variantes de ADA-2h a pH neutro y alcalino. Como puede observarse, todos los puntos pertenecen a la misma regresión lineal, lo cual indica que los efectos entálpicos introducidos por las mutaciones son inferiores a los errores en la determinación de ΔH_m . El valor de la pendiente de dicha regresión es $3.1 \pm 0.2 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ y se corresponde con el valor promedio de ΔC_p obtenido de las curvas individuales para todos los mutantes. A partir de este valor se ha calculado posteriormente ΔG_D como viene representado en la Fig. 4.10 para los cuatro sistemas.

El conjunto de los parámetros termodinámicos obtenidos a pH neutro y alcalino están representados en la Tabla 4.1, junto con los datos ya publicados (Viguera et al., 1996).

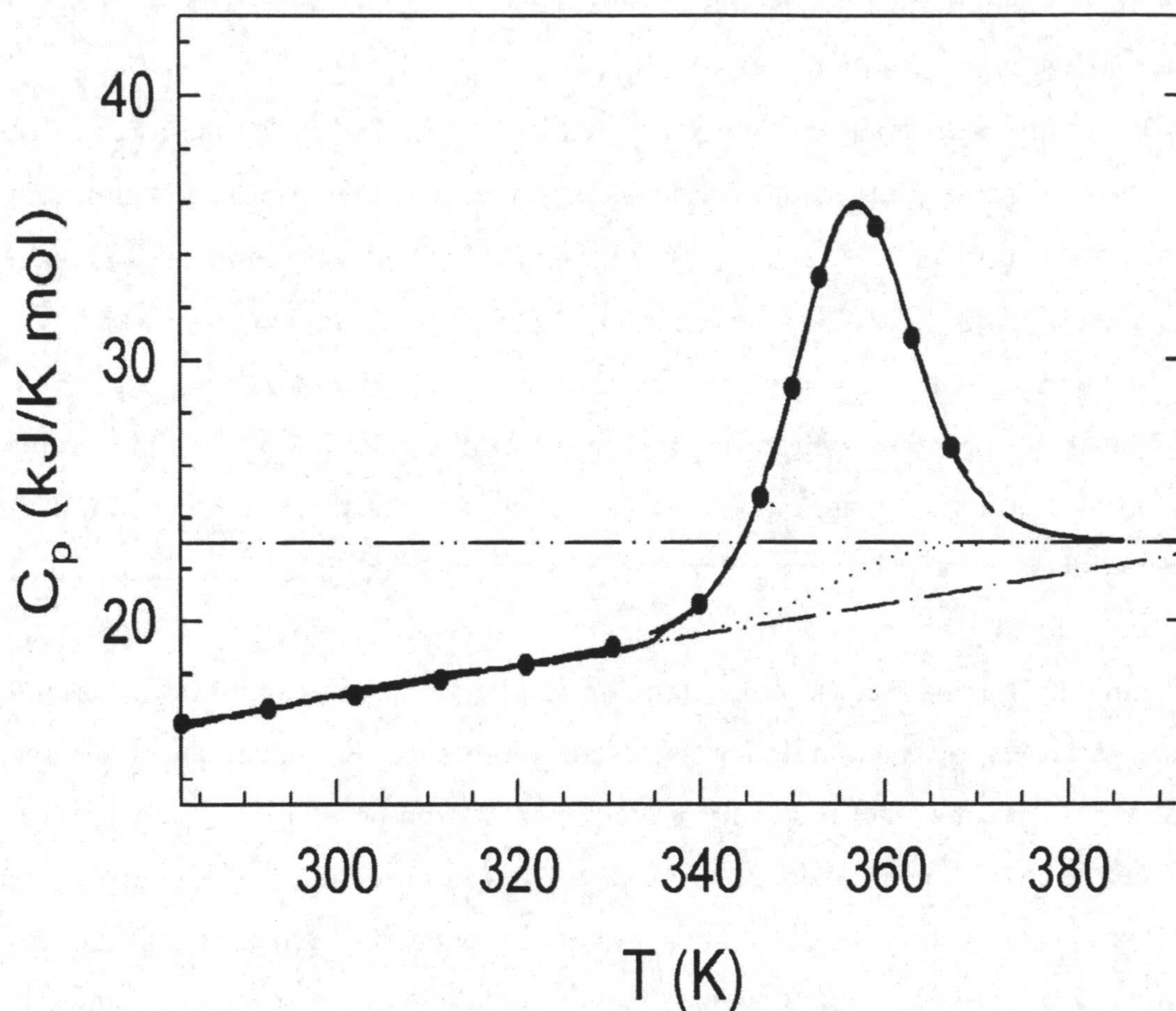


Fig. 4.8 Representación de la variación de la capacidad calorífica molar, C_p (kJ/K.mol), en función de la temperatura, T (K), para el mutante M2 a pH 7.0 (—), sobre ella se muestra el mejor ajuste a un modelo de dos estados (•••). Se ha supuesto una dependencia lineal con la temperatura para $C_{p,N}$ (-•-) y $C_{p,D}$ (-••-). La capacidad calorífica interna, $C_{p,int}$ se representa por (.....). Los parámetros obtenidos en el ajuste son: $C_{p,N}(293) = 16.1 \text{ kJ.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$, $\delta C_{p,N} = 0.071 \text{ kJ.K}^{-2}.\text{mol}^{-1}$, $T_m = 356 \text{ K}$, $\Delta H_D(T_m) = 252.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta C_{p,D}(T_m) = 1.7 \text{ kJ.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$, $\delta \Delta C_{p,D} = \delta C_{p,D} - \delta C_{p,N} = -0.09 \text{ kJ.K}^{-2}.\text{mol}^{-1}$.

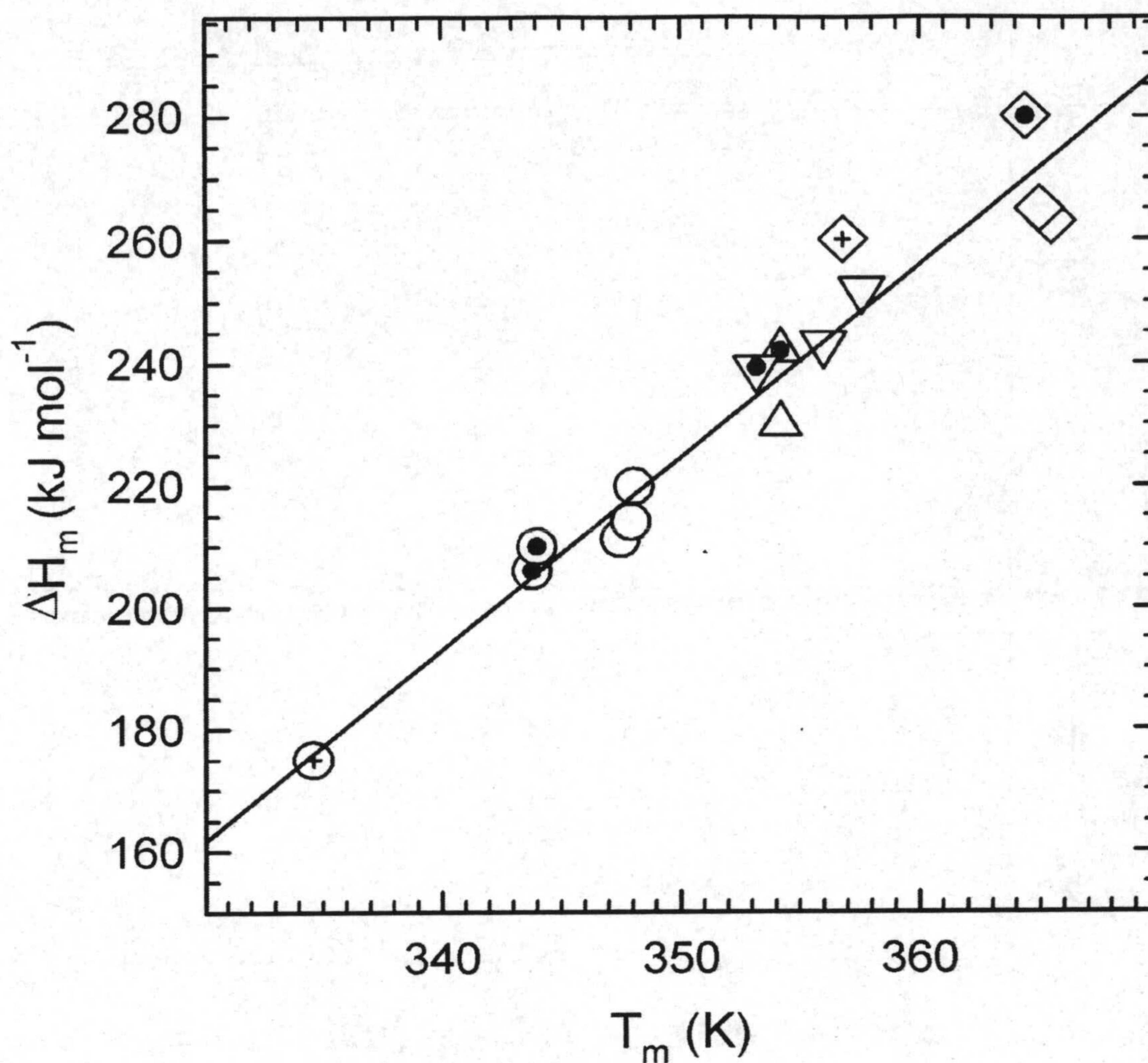


Fig. 4.9. Dependencia de la variación de entalpía, ΔH_m , con la temperatura de desplegamiento, T_m , para la proteína ADA-2h WT (círculos) y sus mutantes; M1 (triángulos), M2 (triángulos invertidos) y DM (rombos). Los símbolos vacíos corresponden a pH 7.0, los símbolos con punto central a pH 10.5 y los símbolos con cruz interior a pH 11.6. Se muestra también la regresión lineal a través de todos los puntos, cuya pendiente corresponde al incremento de capacidad calorífica de desplegamiento, $\Delta C_{p,D} = 3.1 \pm 0.2 \text{ kJ.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$.

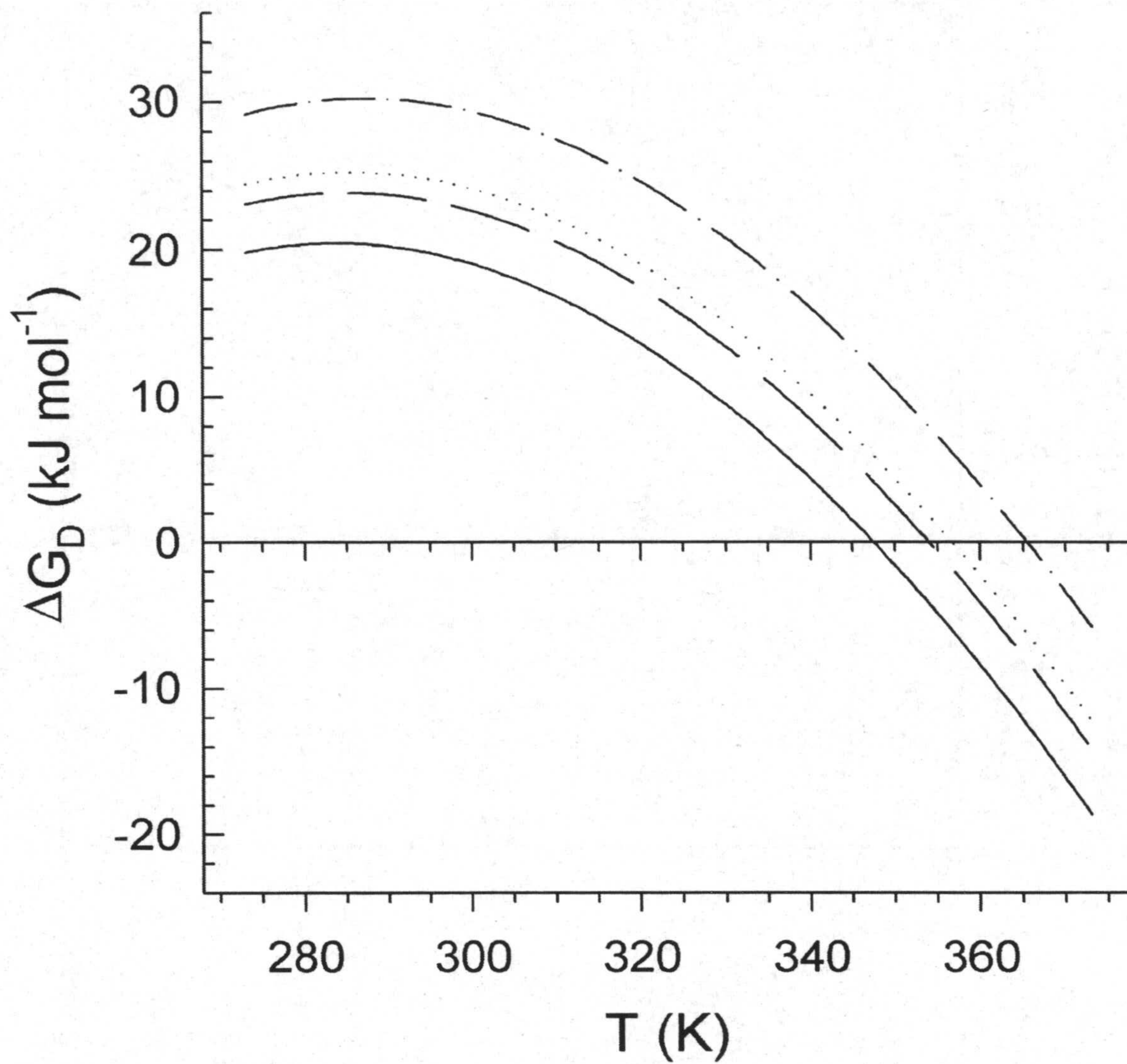
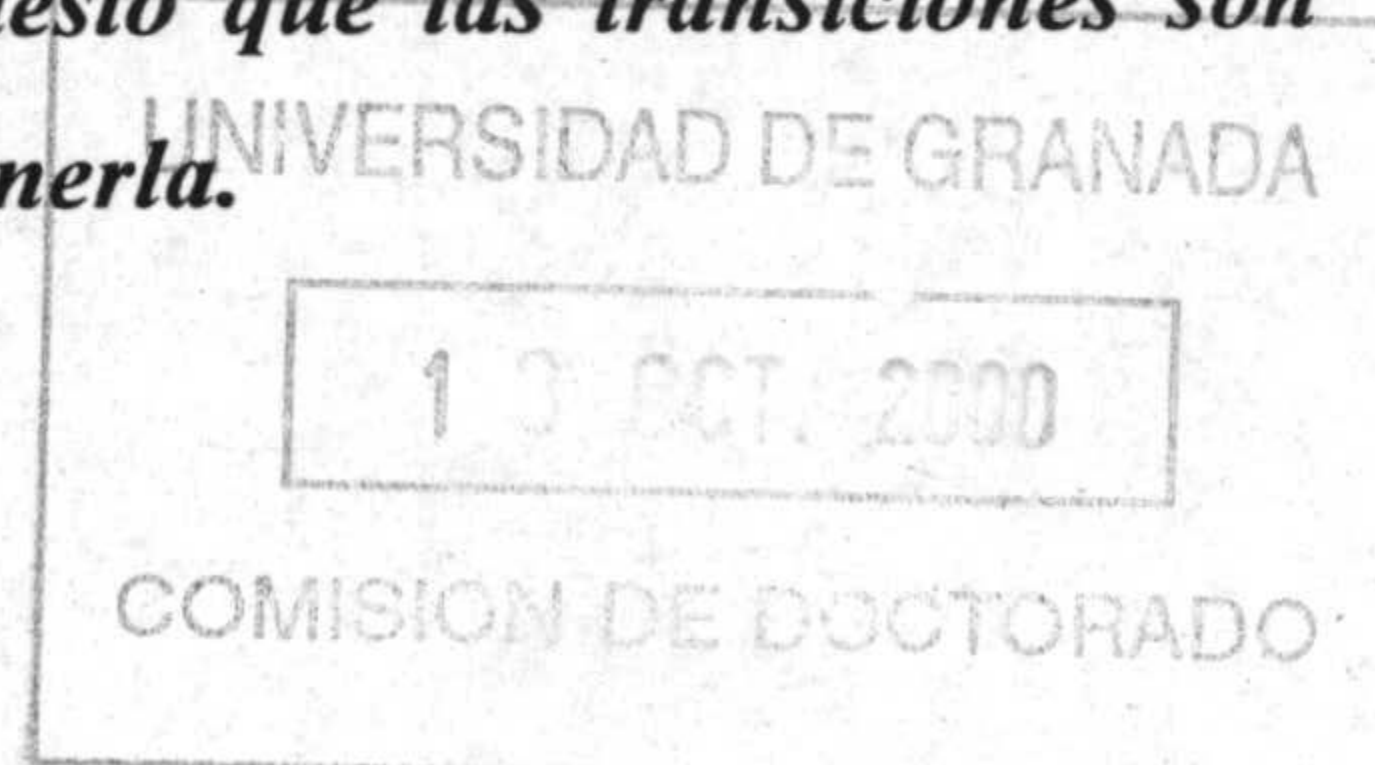


Fig. 4.10. Dependencia del incremento de la energía de Gibbs, ΔG_D de desplegamiento, con la temperatura, T (K) a pH 7.0 para la proteína WT ADA-2h (—) y sus mutantes: M1 (- -), M2 (...) y DM (- • -). La secuencia de estabilidad es $WT < M1 \cong M2 < DM$.

Muestra	pH	DSC				CD ¹	Despleg. por urea ²	
		T _m , K	ΔH _m , kJ mol ⁻¹	ΔG _U ⁰ , kJ mol ⁻¹	δ ^{WT} ΔG _U ⁰ , kJ mol ⁻¹		T _m , K	ΔG _U ⁰ , kJ mol ⁻¹
WT	7.0	347.8±0.5	216 ± 10 (217)	19.3±1.5	-	350	17.4± 0.5	-
	10.5	343.9±0.5	206± 15 (205)	17.3±1.5	-	-	-	-
M1	7.0	354.0±0.5	235 ± 10 (236)	22.8±1.7	3.5±1.7	357	22.2± 0.5	4.8±0.5
	10.5	354.2±0.5	242± 15 (236)	22.9±1.7	5.6±1.7	-	-	-
M2	7.0	356.7±0.5	245 ± 10 (244)	24.3±1.7	5.0±1.7	357	23.8±0.5	6.4±0.5
	10.5	353.3±0.5	239± 15 (233)	22.3±1.7	5.0±1.7	-	-	-
DM	7.0	365.5±0.5	270 ± 10 (271)	29.5±2.0	10.2±2.0	-	29.3±0.8	11.9±0.8
	10.5	364.4±0.5	280± 15 (268)	28.8±2.0	11.5±2.0	-	-	-

Tábla 4.1. Parámetros termodinámicos del desplegamiento de ADA-2h WT y sus mutantes a pH 7.0 y pH 10.5. La variación de la entalpía, ΔH_m, determinada a la temperatura, T_m, se calcula a partir de los datos obtenidos por DSC suponiendo ΔC_{p,D} = 3.1 kJ · K⁻¹ · mol⁻¹. Los valores entre paréntesis se han determinado según la ecuación ΔH_m = 218 + 3.1 (T_m - T_{m,prom}) kJ · mol⁻¹, donde T_{m,prom} = 348.2 K se obtiene promediando todas las T_m representadas en la Fig. 4.9; estos datos fueron posteriormente utilizados para la determinación de la energía de Gibbs standard, ΔG_D⁰. Los datos no obtenidos por medio de DSC se tomaron de la bibliografía, ¹Villegas et al, 1995 y ²Viguera et al., 1996. Los valores de T_m para los mutantes determinados por CD son una estimación grosera puesto que las transiciones son incompletas; en concreto, para DM no fue posible obtenerla.



4.3.2.- Desnaturalización a pH ácido

Los estudios realizados a pH ácido por medio de DSC dieron unos resultados inesperados. La curva de calentamiento a pH 3.0 correspondiente a ADA-2h WT no muestra ningún pico de los observados a pH neutro y alcalino, y debidos a la absorción de calor inducida por aumento de temperatura (Fig. 4.11). Además a baja temperatura la capacidad calorífica inicial es superior a la correspondiente a pH 7.0 y va incrementándose con la temperatura hasta alcanzar el valor de $C_{p,D}$. Esto podría indicar en principio que la proteína a pH 3.0 está ya desplegada o casi desplegada a baja temperatura.

Como hemos citado en capítulos anteriores, es posible estimar el valor teórico de $C_{p,D}$ a partir del contenido aminoacídico de la proteína (Makhatadze, G. Y. & Privalov, P. L., 1990). Como se observa en la Fig. 4.11, la $C_{p,D}$ así calculada se aproxima bastante a la capacidad calorífica determinada calorimétricamente a pH 3.0, lo que confirma que ADA-2h WT no está plegada bajo estas condiciones, aunque hay que tener en cuenta que el valor estimado es usualmente un 10% superior al determinado por medio de DSC.

A raíz de estos resultados sería lógico esperar que a pH 3.0 los mutantes estuvieran también desplegados, ya que los efectos de estabilización introducidos por las mutaciones en M1 y M2 a pH 7.0 no son muy grandes en términos absolutos, tan solo 4 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para M1 y 5 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para M2. Sin embargo, el comportamiento de los mutantes a pH 3.0 es muy diferente al de ADA-2h WT (Fig. 4.12). Así, M1 muestra un pico de absorción calorífica, pero despliega de forma irreversible presentando una fuerte tendencia a agregarse incluso a pH 2.0 donde la proteína tiene una alta carga positiva.

Al contrario, tal y como muestra la Fig. 4.12, las curvas de calentamiento obtenidas por DSC para M2 y DM a pH ácido son muy simétricas, reversibles y se ajustan perfectamente a un modelo de dos estados. Además, según los datos de cromatografía de exclusión molecular, DM es monomérico a las concentraciones utilizadas en los experimentos de DSC ($\cong 1 \text{ mg/mL}$), incluso después de haber sido calentada dos veces hasta 120 °C, tal y como se muestra en la (Fig. 4.13).

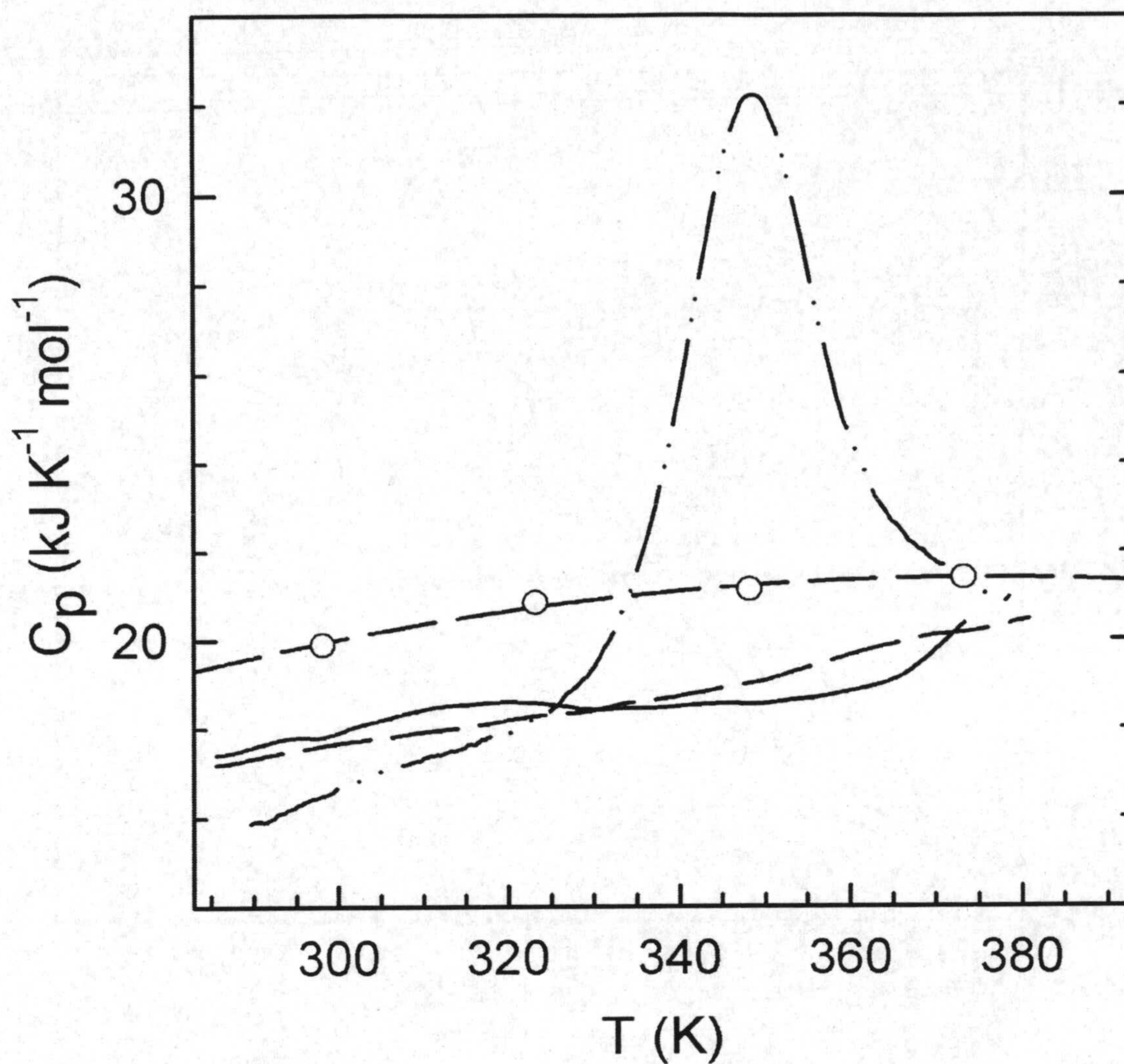


Fig. 4.11. Termogramas de ADA-2h WT correspondientes al primer barrido, pH 7.0 (- • • -). Primer (—) y segundo barrido (- -), pH 3.0.

Cálculo de $C_{p,D}$ a partir de su contenido aminoacídico (—○—).

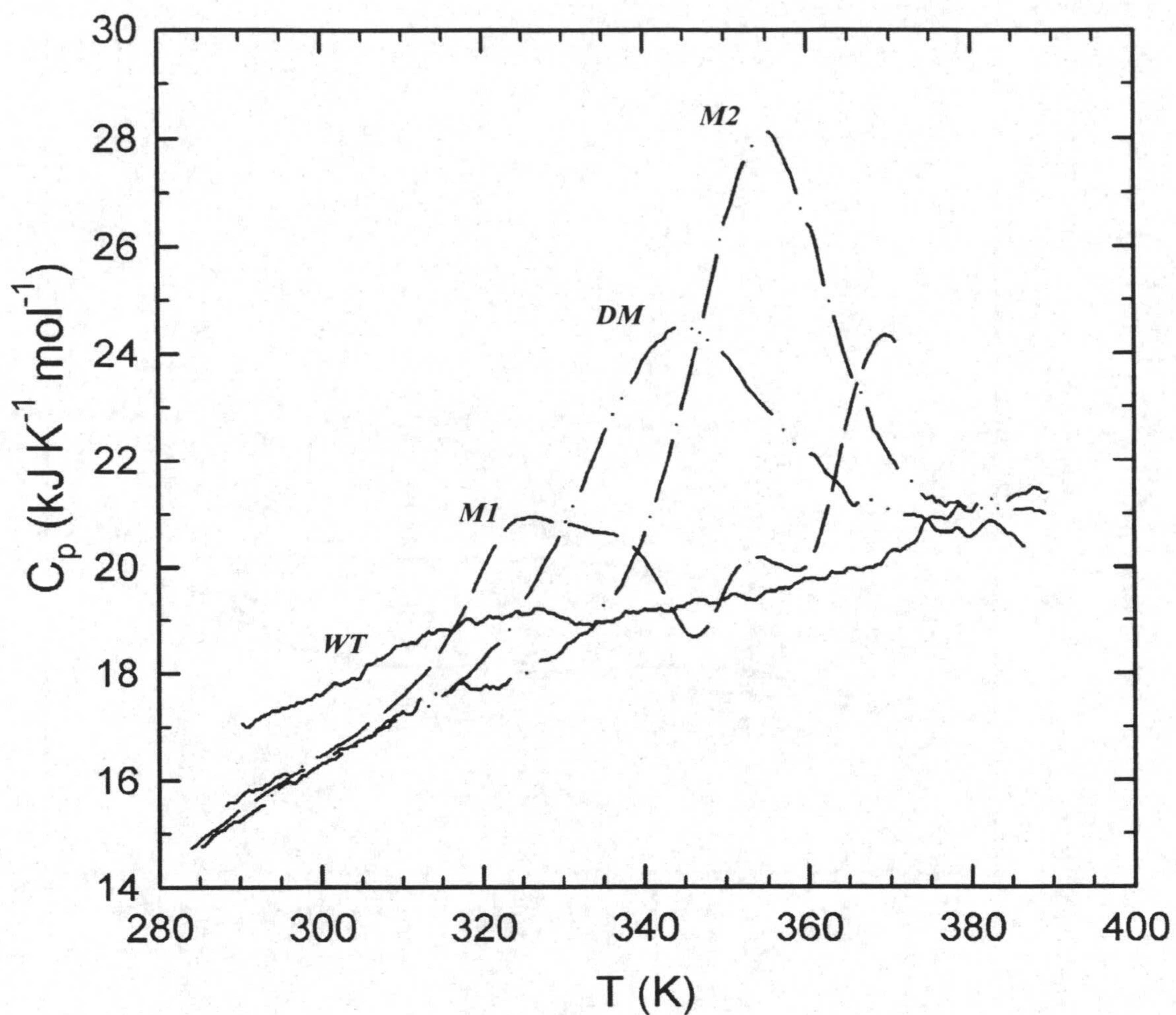


Fig. 4.12. Dependencia de la capacidad calorífica molar, C_p ($\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), con la temperatura, T (K), para ADA-2h WT y sus mutantes a pH 3.0. Bajo condiciones de pH ácido la secuencia de estabilidad varía (mutantes subrayados) con respecto a pH neutro siendo: $WT < M1 < \underline{DM} < \underline{M2}$.

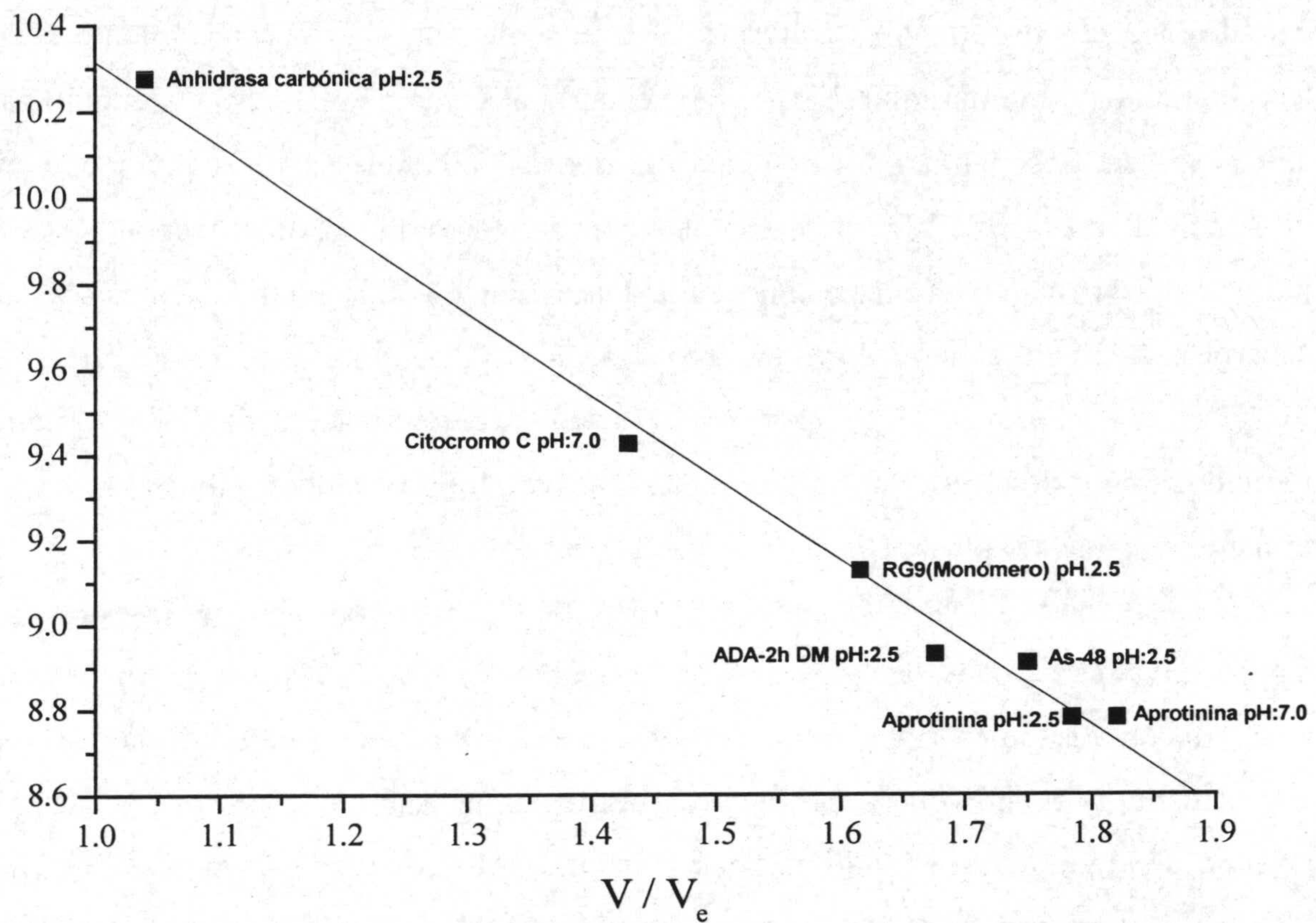
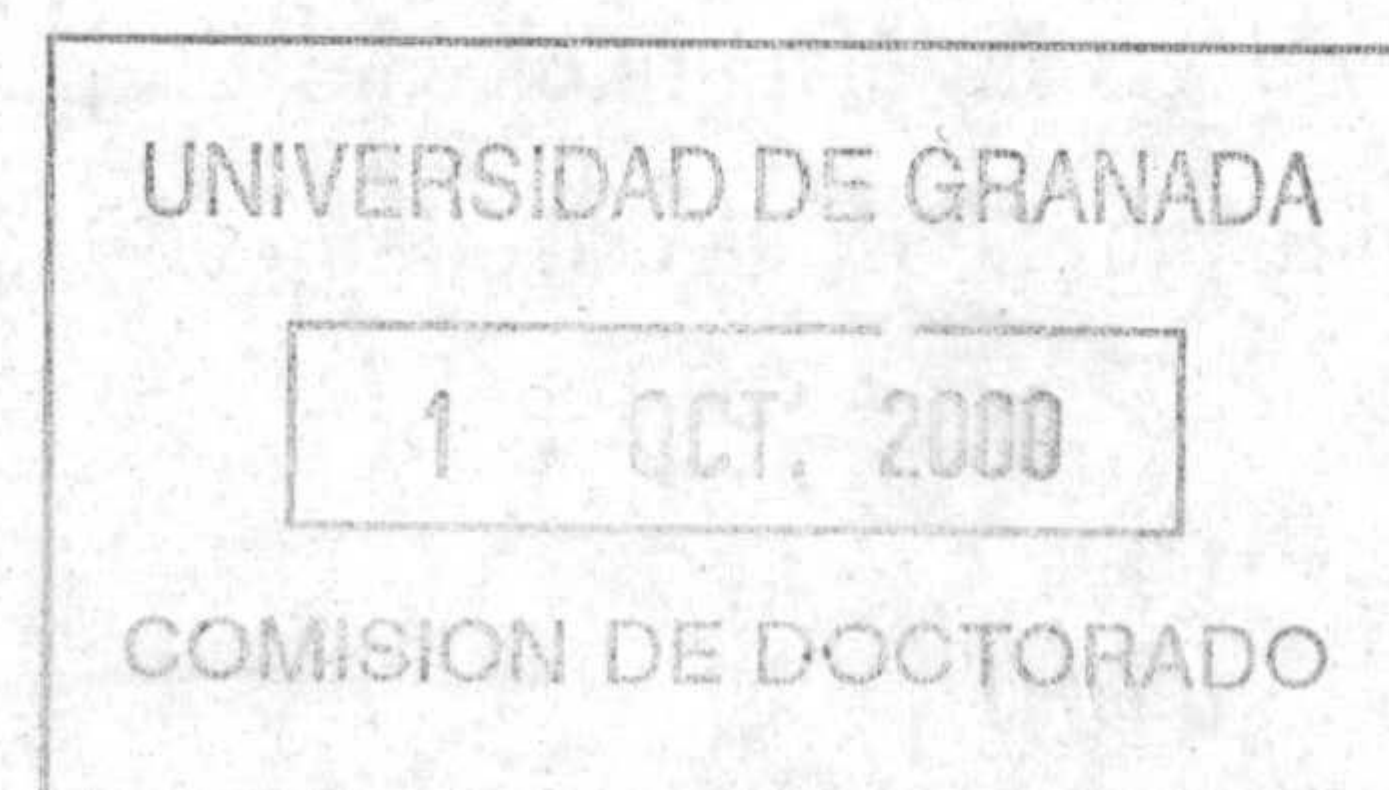


Fig. 4.13 Recta de calibración obtenida por medio de cromatografía de exclusión molecular. Las proteínas utilizadas para la calibración así como sus pesos moleculares son:

Anhidrasa Carbónica (29000 Da), Citocromo C (12400Da) y Aprotinina (6500Da) obtenidas comercialmente de la casa Sigma. Dominio N-terminal del represor del fago 434, R69 (7550Da) cedido por el Dr. Javier Ruiz perteneciente a nuestro grupo. Bacteriocina As-48 (7400Da) cedido por el grupo de la Dra. Mercedes Maqueda (Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada).

La concentración introducida de DM fue 0.12 mM.



Hay ciertos detalles a destacar de los resultados obtenidos en los experimentos a pH ácido. Primero, la secuencia de estabilidad descrita a pH neutro y alcalino ha variado, M2 es ahora más estable que DM, teniendo lugar su desplegamiento a una temperatura bastante más alta (Fig. 4.14). Segundo, las entalpías de desplegamiento para ambos mutantes son mucho más pequeñas que las obtenidas a pH neutro, con una diferencia de más de $50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ entre las rectas de regresión lineal, tal y como se ve en la Fig. 4.15, la cual excede los errores en la determinación de la entalpía (Tabla 4.2). De acuerdo con el bajo efecto calorífico, las curvas de DSC son más anchas y las alturas de los picos son menores, lo que hace más difícil la determinación de los parámetros termodinámicos de transición, sobre todo $\Delta C_{p,D}$. Estas observaciones indican que ambos mutantes a pH ácido pueden estar menos estructurados que a pH neutro.

Los experimentos realizados por medio de CD muestran un cambio estructural significativo para todas las proteínas al cambiar el pH de 7.0 a 3.0 (Fig. 4.16), de acuerdo con los datos obtenidos por DSC. Se observa que a bajo pH la señal en UV-cercano es menor que a pH neutro sugiriendo un cambio conformacional en el entorno de algunos residuos aromáticos. Por otra parte, los espectros registrados en el UV-lejano son dependientes de la concentración de ADA-2h WT y a concentraciones iguales o superiores a $200 \mu\text{M}$ se convierten en espectros típicos de láminas β de agregación. Las concentraciones utilizadas en los experimentos de DSC son ligeramente superiores a $200 \mu\text{M}$, lo cual significa que ADA-2h WT podría estar agregada antes de empezar su calentamiento en el DSC, aunque todos los cambios en los espectros de CD son reversibles cuando el pH aumenta hasta 7.0, indicando que los agregados no son demasiado grandes ni se forman de manera irreversible.

Con el objetivo de entender mejor la naturaleza de los cambios conformacionales sugeridos por los datos obtenidos por DSC y CD, así como la ausencia de un pico de transición en las curvas calorimétricas de ADA-2h WT a pH 3.0, se realizaron experimentos utilizando RMN. Los espectros de RMN de ADA-2h WT y sus mutantes a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y concentración inferior a $100 \mu\text{M}$ indican una significativa aunque incompleta pérdida en la dispersión del desplazamiento químico. (Fig. 4.17). Esto confirma la pérdida parcial de la estructura a pH 3.0 de acuerdo con los datos de calorimetría y CD.

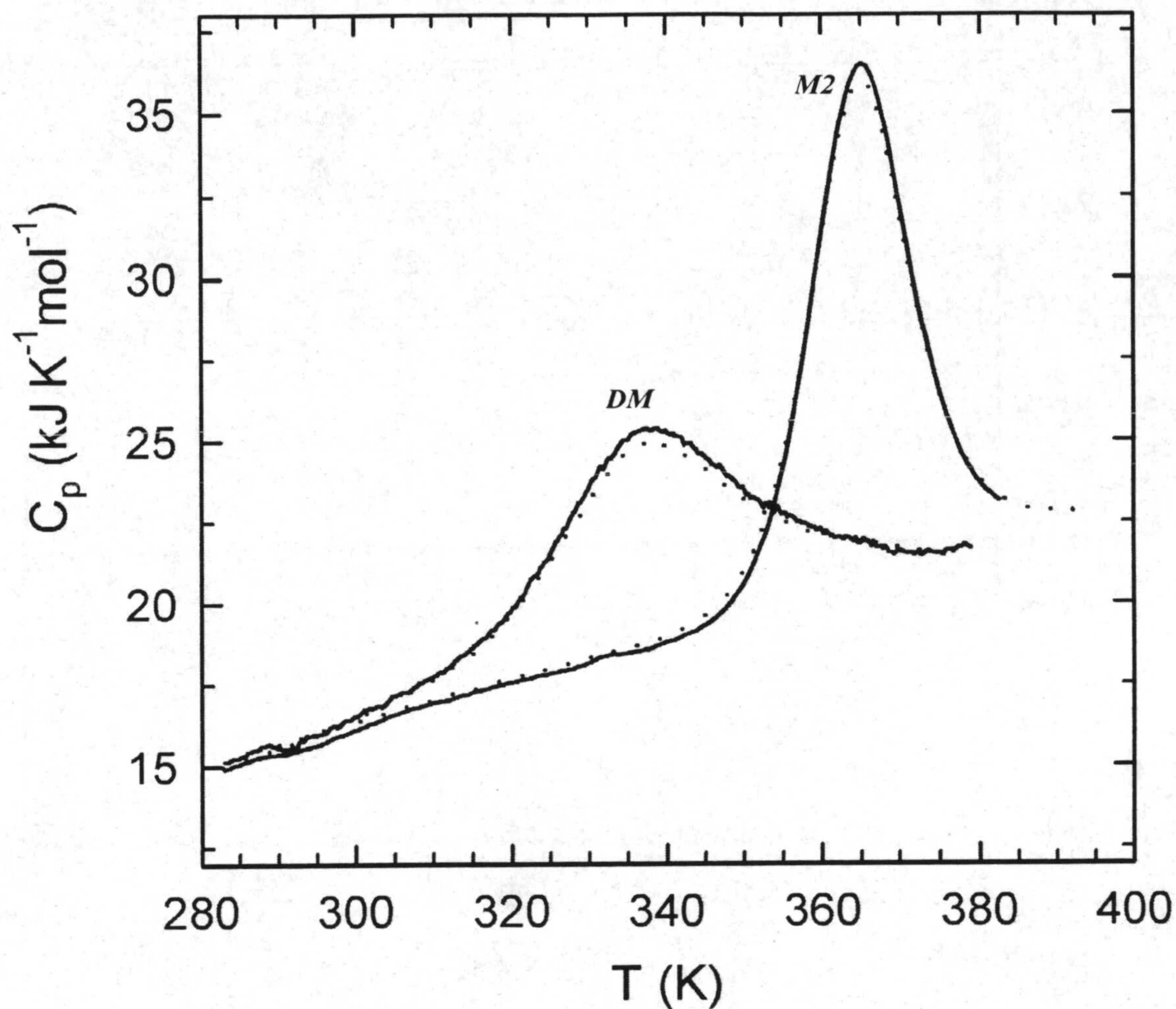


Fig. 4.14. Termogramas correspondientes a los mutantes M2 (2.23 mg/mL, velocidad de barrido 60 K/h, DASM-4) y DM (1.11 mg/mL, 90 K/h, VP-DSC) a pH 2.5. Se representa por medio de puntos el segundo barrido para ambas curvas indicando la reversibilidad del proceso de desplegamiento.

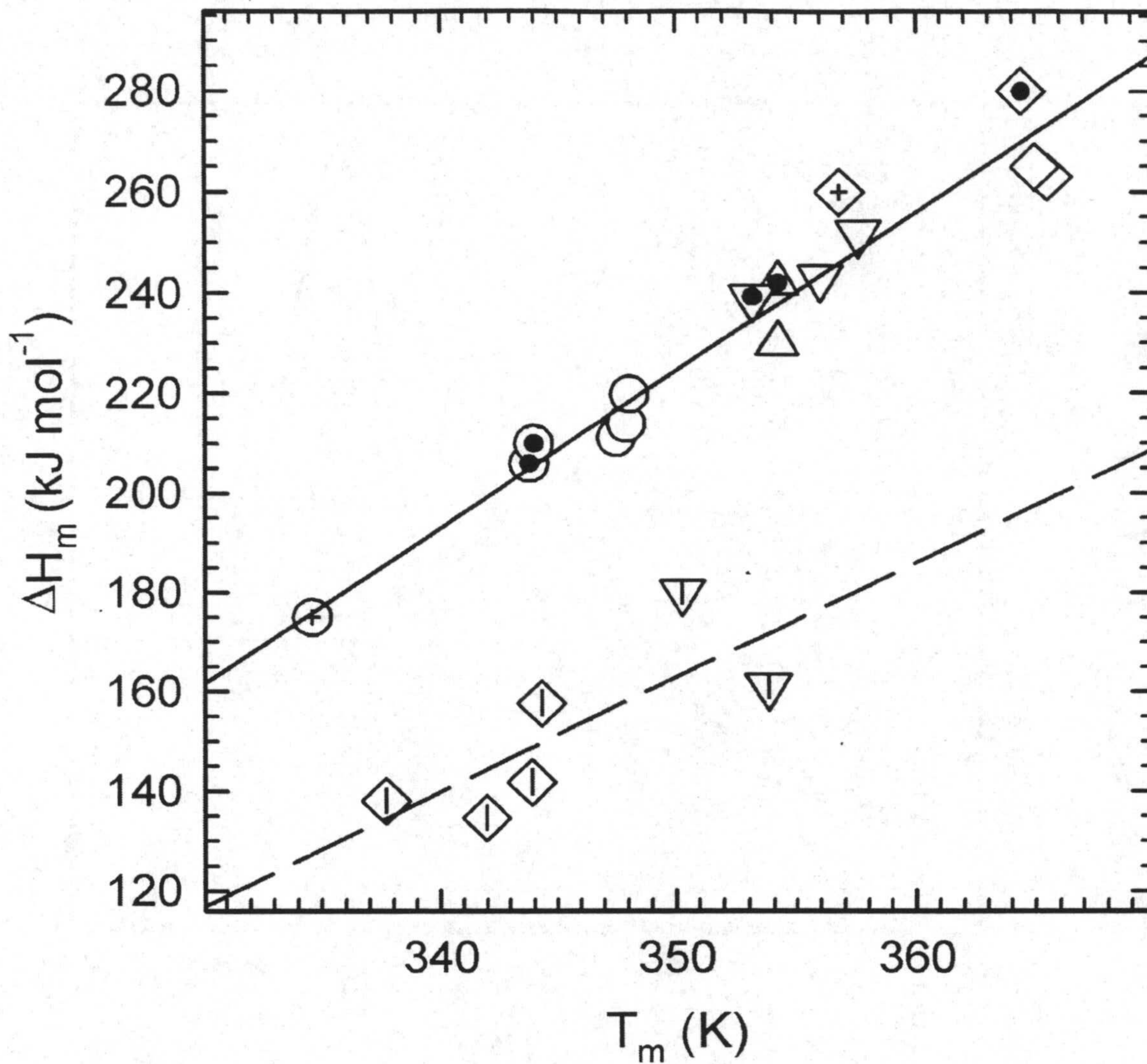


Fig. 4.15. Dependencia del efecto calorífico, ΔH_m , con respecto a la temperatura, T_m , a diferentes valores de pH para ADA-2h WT y sus mutantes. ADA-2h WT (círculos), M1 (triángulos), M2 (triángulos invertidos) y DM (rombos); pH 7.0 (símbolos vacíos), pH 10.5 (símbolos con un punto interior), pH 11.6 (símbolos con cruz interna), pH 3.0 y 2.0 (símbolos con barra interna). Las líneas de regresión lineal son dibujadas independientemente para pH neutro-básico y para pH ácido.

Tabla 4.2. Parámetros termodinámicos del desplegamiento de los mutantes M2 y DM a pH 3.0.

Mutante	DSC			CD	Desplegamiento por Urea	
	T_m , K	ΔH_m , kJ mol ⁻¹	ΔG_U^0 , kJ mol ⁻¹	T_m , K	ΔG_U^0 , kJ mol ⁻¹	$\delta^{WT} \Delta G_U^0$, kJ mol ⁻¹
M2	354.2±1.0	165 ± 15 (172)	15.6±2.0	357	20.9±2.1	9.2
DM	344.3±1.0	158 ± 15 (148)	11.7±2.0	345	12.8±4.1	1.1

Las entalpías obtenidas a partir de los experimentos de DSC, ΔH_m , a la temperatura del máximo de la transición, T_m , así como las energías de Gibbs standard, ΔG_D^0 , se calcularon suponiendo $\Delta C_{p,D}(\text{pH}3.0) = 2.5 \pm 0.3 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $\Delta H_m = 158 + 2.5 \cdot (T_m - 348.2) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. A partir de ésta última ecuación se determinaron, posteriormente al ajuste, los datos reseñados entre paréntesis que fueron utilizados para el cálculo de las energías de Gibbs standard. No fue posible obtener valores calorimétricos fiables para la proteína en su estado WT bajo estas condiciones, mientras que para M1 fue posible hacer solo una estimación de su T_m . Todos los datos no obtenidos por DSC son estimaciones groseras dado que las transiciones son bastante inusuales.

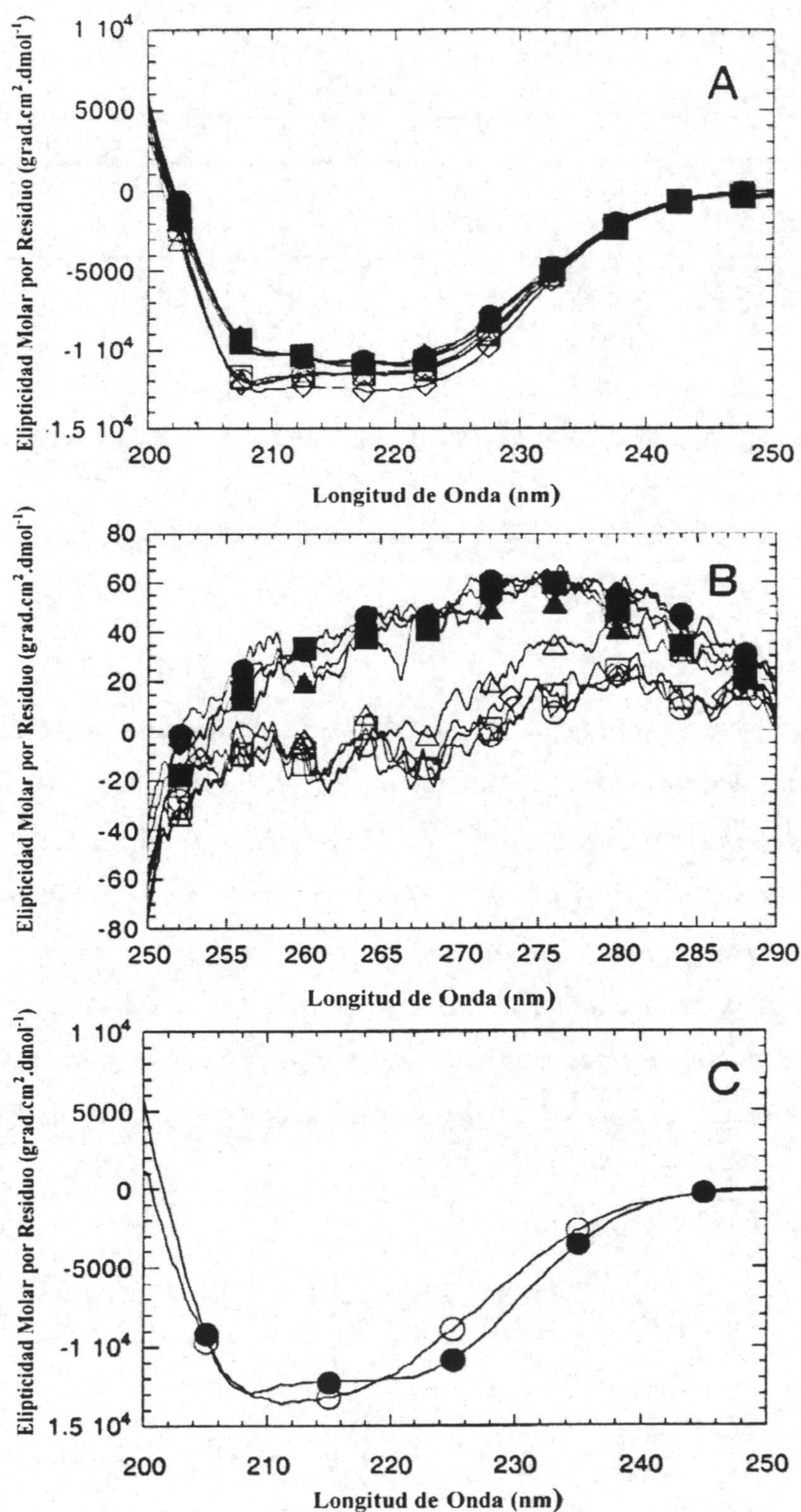


Fig. 4.16. Espectros de CD para ADA-2h WT y sus mutantes a pH 7.0 y 3.0 (A) UV-lejano, (B) UV-cercano: símbolos vacíos, pH 3.0; símbolos rellenos, pH 7.0. Círculos, WT; cuadrados, M1; rombos, M2; triángulos, DM. (C) espectro en UV-lejano para WT a pH 3.0 y diferentes concentraciones: círculos vacíos, 200 μ M; círculos rellenos, 20 μ M.

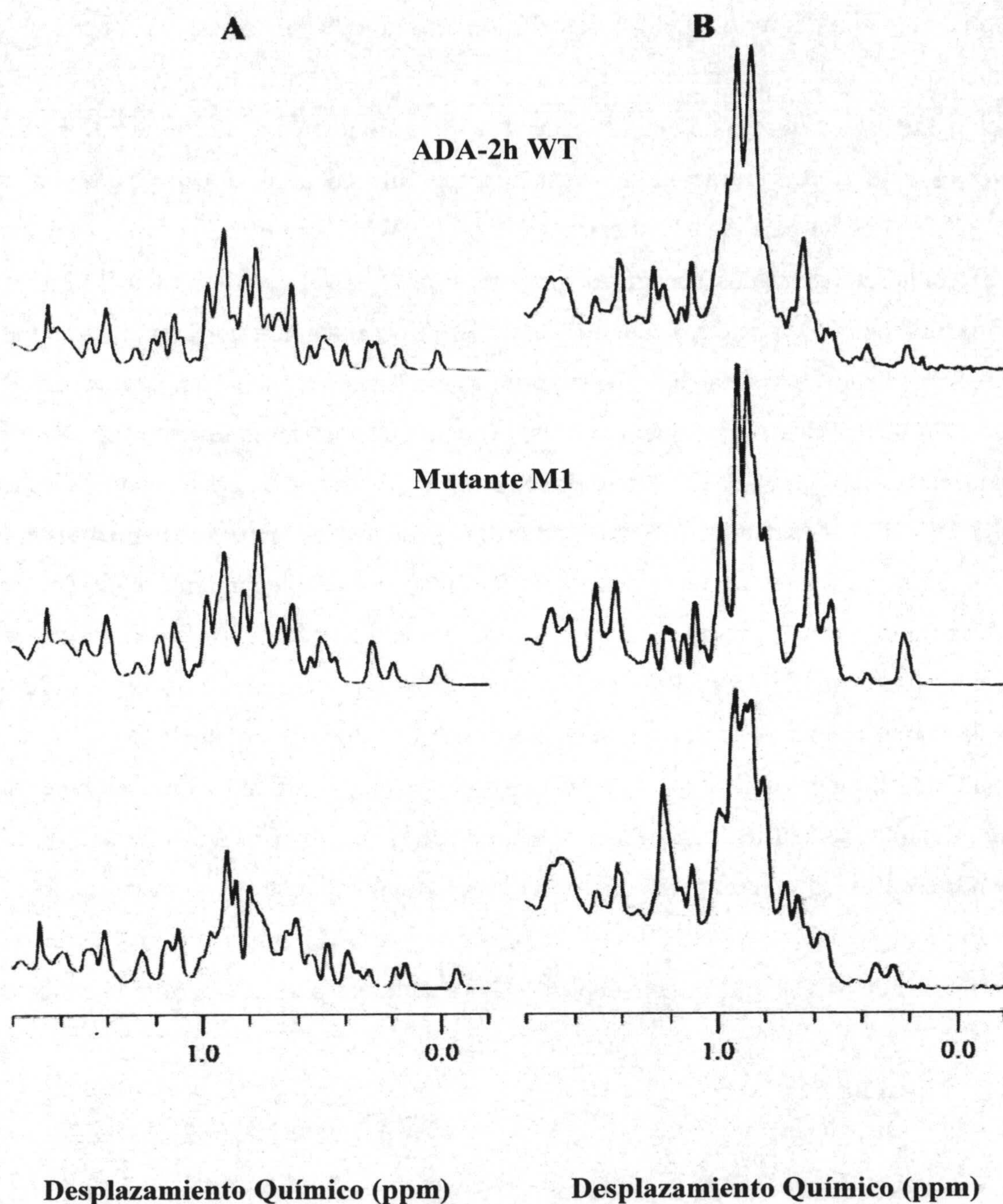


Fig. 4.17 Regiones de alto campo pertenecientes a los espectros de RMN ^1H unidimensionales (500 MHz) para ADA-2h WT y sus variantes a 25 °C a diferentes valores de pH. De arriba a bajo: ADA-2h WT, M1 y M2. (A) Espectros registrados a pH 7.0 y concentración 1 mM. (B) Espectros registrados a pH 3.0 y concentración 0.1 mM para WT y M1, y 0.5 mM para M2.

La nueva conformación menos estructurada aún protege ciertos hidrógenos del intercambio con deuterio. Dicha protección es más grande para M2 que para M1, lo cual indica que la estructura de M2 es más estable. A 25 °C y antes de calentar las muestras no hay huellas de agregación en los espectros de los mutantes ni en los de ADA-2h WT, mientras que la concentración sea bastante baja. Sin embargo, el espectro registrado a 25 °C después de calentar la muestra de ADA-2h WT hasta 60 °C indica la formación irreversible de agregados con mayor peso molecular, de acuerdo con los experimentos realizados por CD a este pH, aunque la solución permanece transparente sin aumentar apreciablemente la viscosidad. Por su parte M2 es más soluble a temperatura ambiente que ADA-2h WT. No obstante, después de calentar la muestra hasta 85 °C, a concentración 0.5 mM el espectro de M2 tiene las mismas características que el espectro de ADA-2h WT calentada, lo que indica la presencia de agregados mientras que la solución se convierte en un gel. La reversibilidad del desplegamiento endotérmico de M2 causado por un proceso relativamente rápido de calentamiento / enfriamiento a una velocidad de barrido de 90 K/h en DSC y a menor concentración de proteína (200 μM), muestra que en estas condiciones los agregados no se forman con tanta facilidad. Como resultado, la tendencia a la formación de agregados depende directamente de la estabilidad de la estructura plegada a pH 3.0, siendo mayor para ADA-2h WT al poseer menor estabilidad en comparación con el resto de las variantes. Por otra parte, la mayor estabilidad de M2 con respecto a M1, e incluso a DM, indica que la conformación alternativa de M2 es más estable debido a las mutaciones realizadas sobre la hélice α 2.

4.4.- Discusión

Estudios previos de los mutantes de ADA-2h basados en la desnaturalización en presencia de urea (Villegas, V. et al., 1995; Viguera, A. R. et al., 1996) no pudieron completar los parámetros termodinámicos del desplegamiento, en concreto los del DM. Con el fin de solucionar estos problemas se ha utilizado DSC, ampliando las condiciones experimentales y comprobando si el efecto de éstas sobre la estabilidad de las proteínas se mantiene igual al observado a pH neutro o si por el contrario a otros pHs dicho comportamiento varía.

Los resultados obtenidos por DSC a pH neutro y alcalino demuestran que los cuatro variantes de ADA-2h despliegan reversiblemente según el modelo de dos estados. Los efectos caloríficos, ΔH_m , para el desplegamiento de la estructura nativa de

todas las variantes pertenecen a la misma dependencia de temperatura indicando que las contribuciones entálpicas debidas a las mutaciones son inferiores a los errores de determinación de la entalpía y despreciables en comparación con las contribuciones entrópicas. El hecho de que las entalpías de desplegamiento pertenezcan a la misma dependencia con la temperatura implicaría que el coste energético de la estructura residual a alta temperatura es muy pequeño (Pfeil, W. & Privalov, P. L., 1976). Los cambios en ΔG_D^0 a 25 °C son un poco mayores que los determinados en los experimentos de desplegamiento en presencia de urea (Villegas, V. et al., 1995; Viguera, A. R. et al., 1996). Los efectos de las mutaciones sobre la estabilidad en términos de ΔG_D^0 son aproximadamente aditivos, de ahí que el efecto para DM se aproxime a la suma de los efectos producidos en M1 y M2 (Fig 4.18).

Se podría pensar también que la mayoría de los aumentos de estabilidad procedentes de un decrecimiento en la energía de Gibbs del estado nativo estuvieran favorecidos por factores entrópicos. Sin embargo en un artículo reciente (Luo, P. & Baldwin, R. L., 1999) basado en el análisis del efecto de la temperatura sobre la tendencia intrínseca de Ala, Ile, Val y Leu a la formación de hélices α en presencia o ausencia de trifluoroetanol (TFE), se ha sugerido, que una de las mayores contribuciones a la tendencia α -helicoidal tiene un origen entálpico. Nuestros resultados contradicen estas conclusiones y las fuentes de esta discrepancia pueden encontrarse en la interpretación del efecto de TFE sobre la estabilidad de hélices α y/o sobre los errores del ajuste en las anchas curvas de desplegamiento.

A pesar de que los valores de energía de Gibbs de desplegamiento son bastante normales para proteínas de este tamaño, el efecto calorífico y el cambio de capacidad calorífica calculada por aminoácido no lo son. De acuerdo con el análisis estadístico realizado por Myers (Myers, J. K. et al., 1995) el incremento promedio de la capacidad calorífica de desplegamiento, $\Delta C_{p,D}$, para una proteína de unos 81 aminoácidos estaría situado alrededor de 4.2 kJ. K⁻¹. mol⁻¹ tal y como detallamos a continuación:

$$\Delta ASA_{tot} (\text{\AA}^2) = -907 + 93 \cdot n^{\circ}restos = 6626.$$

$$\Delta C_{p,D,calc} = -251 + 0.19 \cdot \Delta ASA_{tot} (4.18 \cdot 10^{-3}) \text{ J/cal} = 4.213 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

Esta estimación es 1.3 veces mayor que el valor promedio obtenido por DSC, 3.1 kJ. K⁻¹. mol⁻¹. No obstante, un análisis más detallado basado en ciertas correlaciones ya publicadas (Myers, J. K. et al. 1995; Spolar, R. S., 1992; Gómez, J. & Freire,

E., 1995) entre $\Delta C_{p,D}$ y las superficies polares y apolares protegidas al disolvente en el estado nativo, dan estimaciones más realistas, cuyos valores para el caso de ADA-2h WT se muestra en la Tabla 4.3.

Si comparamos los valores de ΔASA_{npol} y ΔASA_{pol} correspondientes a una proteína globular típica de 76 aminoácidos como es la ubiquitina (4538 Å² y 1537 Å² respectivamente) con los correspondientes a ADA-2h WT se observa que ésta última posee un ΔASA_{npol} inferior, lo cual es coherente con su bajo valor de $\Delta C_{p,D}$. Probablemente esta característica estructural esté relacionada con el papel funcional de la ADA-2h, ya que ésta no es una proteína globular aislada, sino que forma parte de otra mayor (proenzima) a la que está unida fuertemente antes de la proteólisis. Por lo tanto, el dominio de activación aislado plegado tiene un número mayor de grupos apolares expuestos al disolvente que cuando forma parte de la proenzima, ya que la zona de contacto con la enzima que cubre el centro activo es mayoritariamente apolar. De ahí, que el valor de ΔASA_{np} para dicho dominio sea menor que el que sería de esperar para una proteína globular de estas dimensiones.

El comportamiento tanto de la WT como de los mutantes cambia de forma radical a pH ácido. A este pH los experimentos realizados por CD así como por RMN muestran un cambio conformacional para todos ellos, justificando los leves efectos caloríficos del desplegamiento. Los experimentos realizados por medio de RMN con el mutante M2 dan alguna luz sobre las razones estructurales de esos efectos. Comparando los espectros obtenidos a pH 7.0 y 3.0 se observa que la estructura de las láminas β 1 y 4 se mantiene intacta; sin embargo, ciertos contactos existentes en la estructura nativa entre residuos pertenecientes a la segunda y tercera láminas β , así como a la hélice α 1 se pierden a pH 3.0. Estas observaciones sugieren que el cambio conformacional inducido por el cambio de pH es restrictivo concretamente para la segunda y tercera láminas β .

Igual que a pH neutro, las curvas de DSC a pH ácido para M2 y DM poseen un solo pico de absorción calorífica, son reversibles y se ajustan a un modelo de dos estados. Sin embargo, al contrario que a pH neutro, a pH ácido la estructura de M2 llega a ser más estable que la correspondiente a DM ya que la introducción de las mutaciones en la hélice α 1 puede tener un efecto desestabilizante a bajo pH. Hay que tener en cuenta que las mutaciones fueron diseñadas sobre la estructura nativa tridimensional con el fin de aumentar su estabilidad a pH neutro, pero algunas de éstas pueden ser desfavorables para la estructura original a pH ácido.

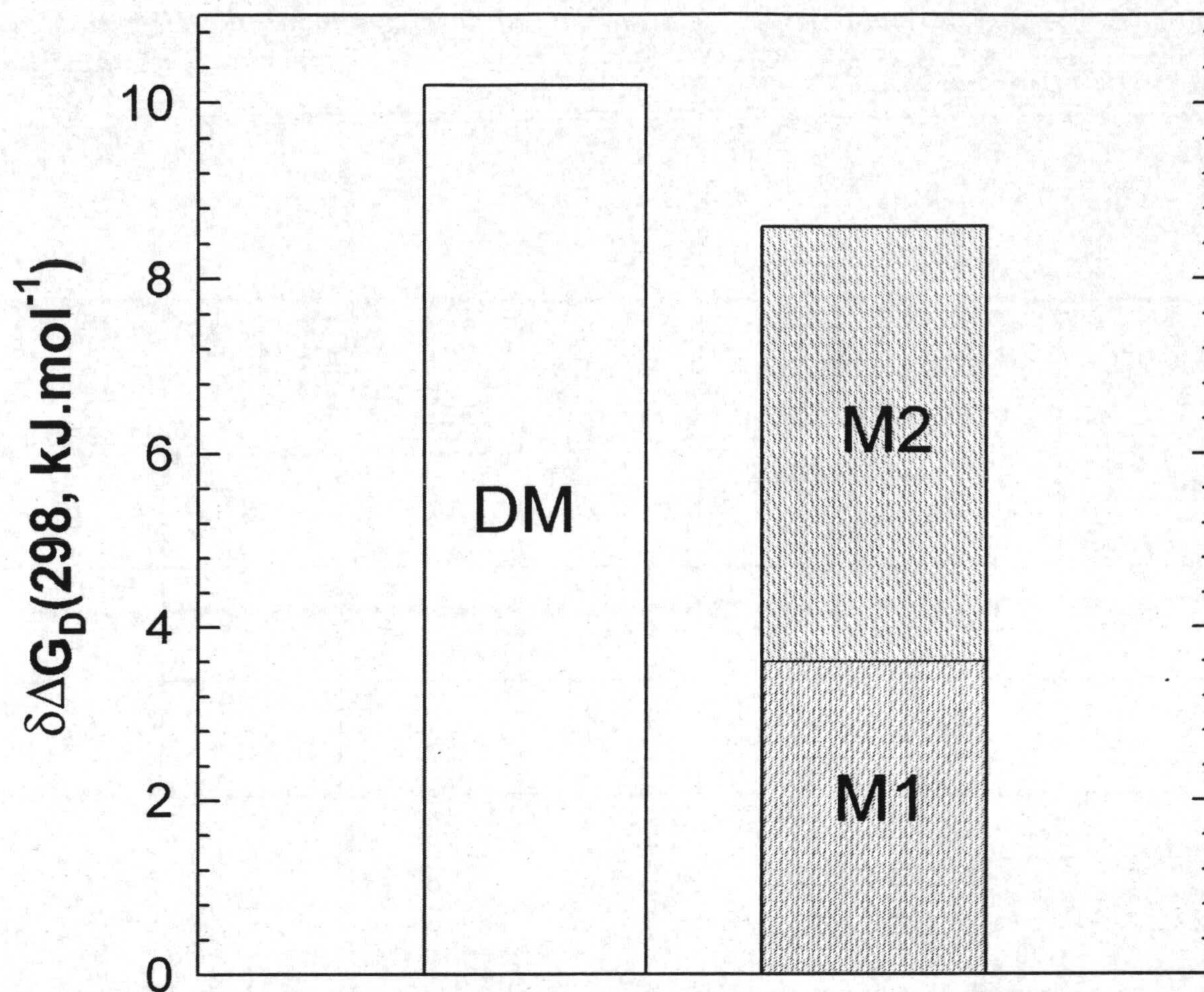


Fig. 4.18. Representación de la ganancia de energía de Gibbs standard de desnaturalización ($\delta\Delta G_D$) para cada uno de los mutantes de ADA-2h en comparación con la obtenida para ADA-2h WT a pH 7.0. ($\delta\Delta G_D = \Delta G_{D, \text{mutante}} - \Delta G_{D, \text{ADA-2h WT}}$).

Tabla 4.3. Cambios en la superficie total accesible al disolvente (ΔASA_{tot}), polar (ΔASA_{pol}) y no polar (ΔASA_{npol}) durante el desplegamiento de ADA-2h según las estructuras determinadas por rayos X y RMN.

Método	ΔASA_{tot} Å^2	ΔASA_{npol} Å^2	ΔASA_{pol} Å^2	$\Delta C_{p,D,calc}$ $\text{kJ.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$		
				<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
RMN	5619	3439	2180	3.33	3.20	2.96
X-ray	6210	3796	2414	3.67	3.54	3.27

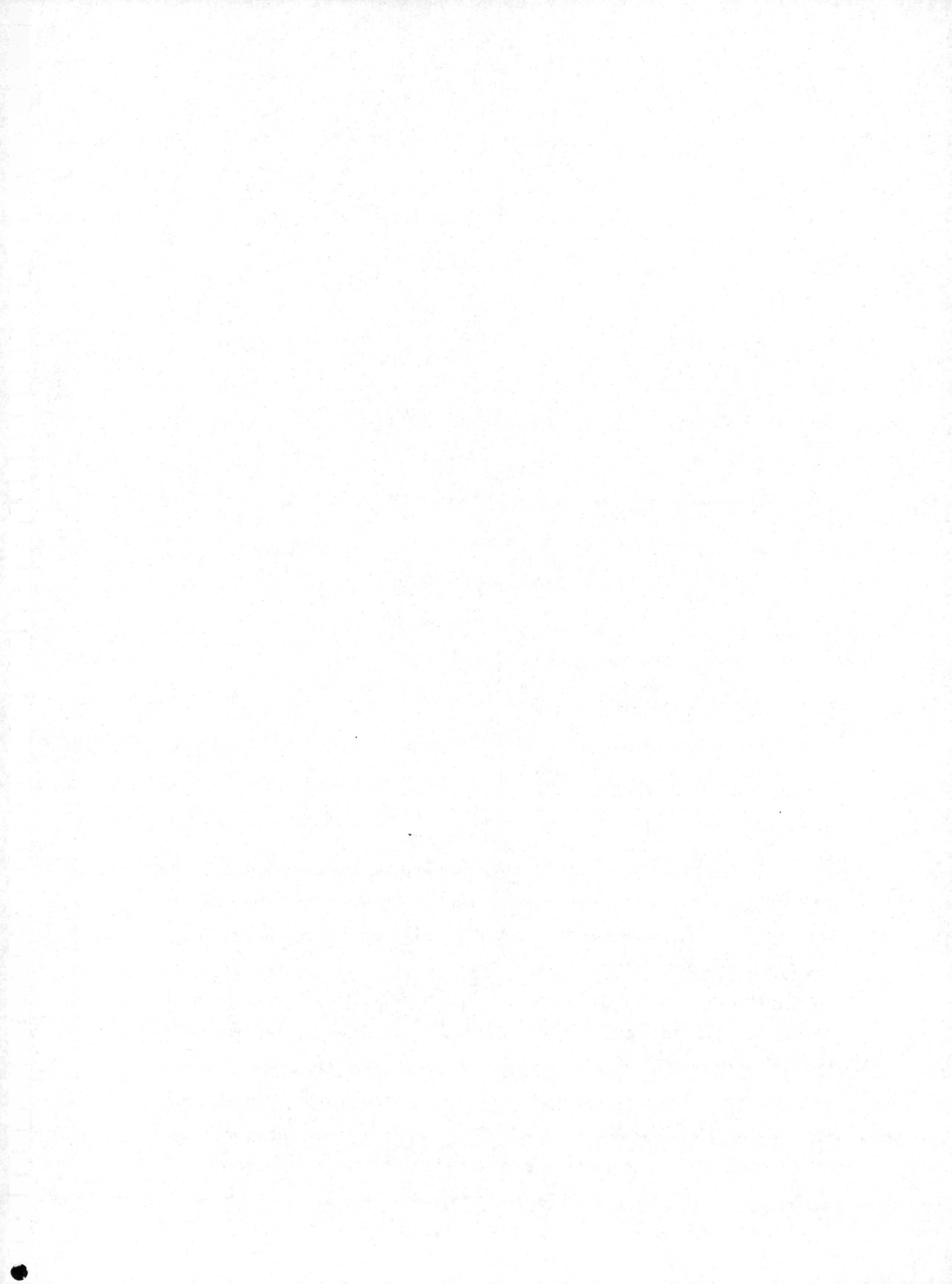
A corresponde a la ecuación: $\Delta C_{p,D,calc} = 0.32 \Delta ASA_{npol} - 0.14 \Delta ASA_{pol}$, deducida por Spolar et al., (1992).

B corresponde a la ecuación: $\Delta C_{p,D,calc} = 0.28 \Delta ASA_{npol} - 0.09 \Delta ASA_{pol}$, deducida por Myers et al., (1995).

C corresponde a la ecuación:

$\Delta C_{p,D,calc} = 0.36 \Delta ASA_{npol} - 0.14 \Delta ASA_{pol} - 0.04 \Delta ASA_{tot}$, deducida a partir de las ecuaciones 6 y 7 de Gómez & Freire (1995) para $T = T_{m,prom} = 348.2 \text{ K}$ obtenida como se explica en el pie de la Tabla 4.1. Los incrementos de las capacidades caloríficas determinados a partir de las anteriores ecuaciones vienen expresados en $\text{cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ y posteriormente transformados en $\text{kJ.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ tal y como se observa en la tabla.

Finalmente, el fenómeno de agregación observado a pH ácido, donde la proteína debería estar cargada positivamente con un aumento de las fuerzas repulsivas, tiene las características de un proceso de polimerización. Nuestras observaciones indican que la pérdida estructural en la conformación de ADA-2h y sus mutantes facilita la formación de agregados- β , en función de la temperatura y de la estabilidad particular de cada variante. A su vez, la estabilización de la conformación plegada reduce la tendencia a la agregación, cualquiera que sea el mecanismo de ese proceso. El efecto del aumento de la estabilidad podría actuar reduciendo la población de conformaciones alternativas que servirían como precursores de agregados o por aumento de la barrera energética del proceso que conduce a estos precursores.



**5.- ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE ESTABILIDAD Y
UNIÓN CON LIGANDOS DE TIM Y QUITINASAS.**

5.- ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE ESTABILIDAD Y UNIÓN CON LIGANDOS DE TIM Y QUITINASAS

Este estudio está englobado dentro del proyecto europeo de investigación titulado “Estudio sobre el diseño de dos proteínas tipo barril TIM: buscando nuevos centros activos en quitinasas y triosafosfato isomerasa monomérica (monoTIM)”.

Las enzimas objeto de nuestro estudio son; triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma brucei* y sus mutantes, quitinasas A (Chi-A) y B (Chi-B) procedentes de *Serratia marcescens*. Estas enzimas pertenecen a la familia con un motivo estructural común denominado barril $\alpha\beta$ o TIM-barril compuesto por 8 α -hélices y 8 láminas β (Fig. 5.1). Dicho motivo estructural es el más usado por la naturaleza para formar distintos tipos de enzimas. El dominio que contiene el barril $\alpha\beta$ se sitúa usualmente en el centro catalítico que en ocasiones está unido a otros dominios estructurales como por ejemplo en las quitinasas o formando un homodímero como en el caso de TIM.

Los objetivos de este proyecto se centran en el estudio de los determinantes estructurales de la actividad enzimática y en la especificidad sobre diferentes sustratos.

Con respecto a TIM se pretende modificar su sitio activo no solo para obtener una mayor especificidad por el sustrato sino también para modificarla desde triosafosfato isomerasa, la cual cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato en D-gliceraldehido-3-fosfato, a xilosa isomerasa que cataliza la conversión de xilosa en xilulosa. De este modo dicha enzima podrá catalizar una u otra reacción dependiendo del sustrato sobre el que actúe.

En relación a las quitinasas y al igual que para TIM, el objetivo es hacerlas más activas y estables por medio de un diseño racional sobre la especificidad del sustrato.

Las tareas concretas de nuestro grupo dentro del proyecto de investigación fueron:

1. Determinar los parámetros termodinámicos de unión de TIM y sus mutantes monoméricos a diferentes inhibidores análogos al sustrato.
2. Buscar correlaciones entre los parámetros termodinámicos y parámetros estructurales.
3. Estudiar la interacción entre dominios estructurales y funcionales en quitinasas por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y proteólisis limitada.

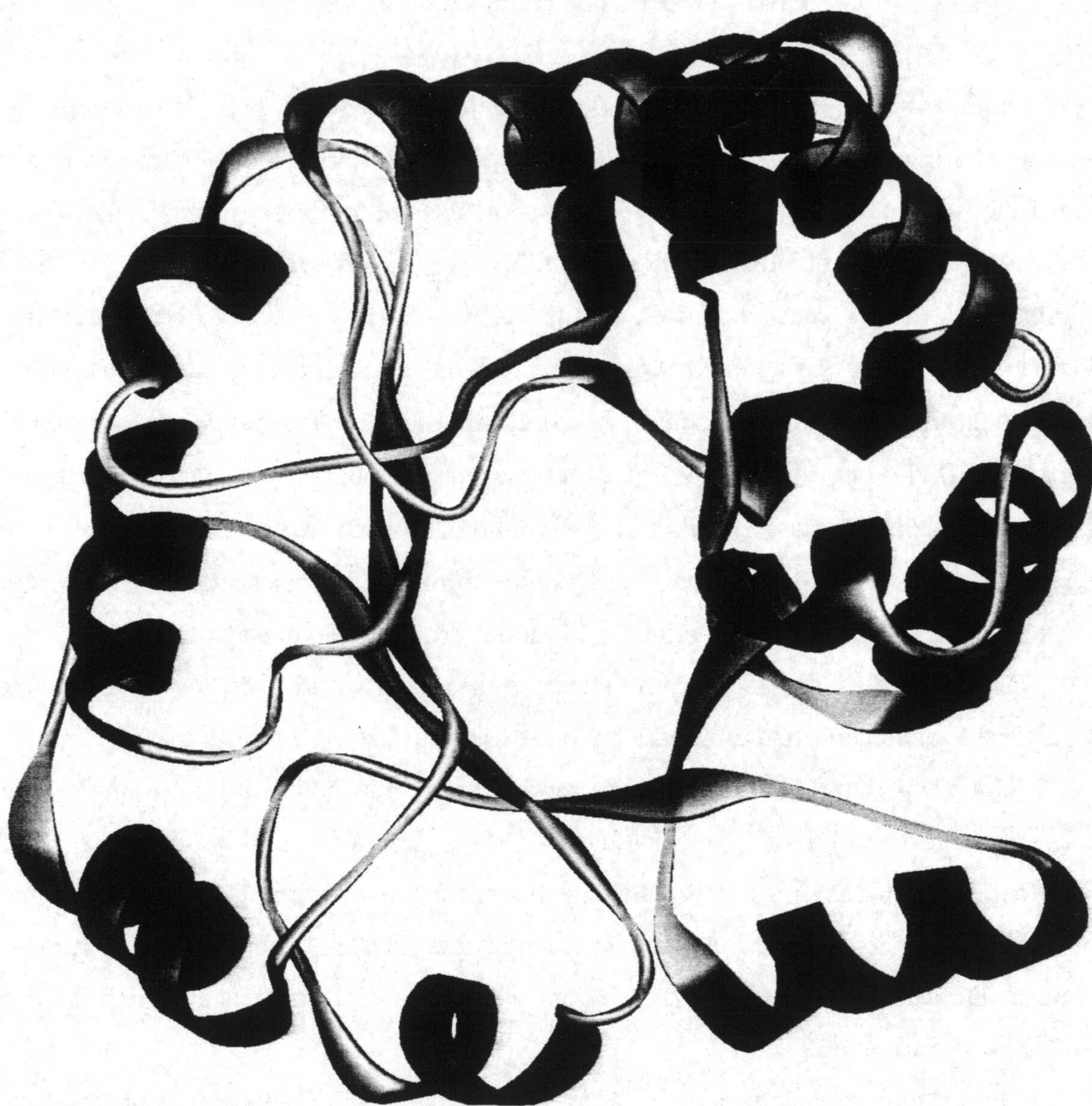


Fig.5.1. Motivo estructural barril $\alpha\beta$ correspondiente al mutante monomérico de TIM denominado MonoSS-TIM sobre el que se han mutado los restos: F45S, V46S. Modelo estructural obtenido por medio de difracción de rayos X (Borchert, T. V. et al. , 1995) cuyo código dentro del Banco de Datos de Proteínas (PDB) es 1TTJ.

5.1. – Análisis termodinámico de Quitinasas A y B

5.1.1.- Antecedentes Bibliográficos.

Diferentes bacterias y hongos son capaces de degradar enzimáticamente la quitina (polisacárido estructural) de modo autocatalítico, morfogenético o con propósitos nutricionales (Gooday, G. W., 1990) actuando sus productos como fuente de energía. Los polisacáridos están implicados en una amplia variedad de funciones en organismos vivos. Tales como el almidón y el glicógeno son utilizados principalmente para almacenar azúcares en animales y plantas. Otros como la celulosa y la quitina son materiales estructurales análogos a las proteínas estructurales. Los polisacáridos de este tipo, como constituyentes de la pared celular, actúan dentro del reconocimiento de señales específicas en la célula realizando un papel informativo. Dichos polisacáridos poseen una estructura simple como si de una secuencia primaria de proteína se tratara, los cuales como la celulosa pueden estar formados por un solo tipo de residuo monomérico (β -D-glucosa, en el caso de la celulosa) denominándose en este caso homopolisacáridos. Las plantas no sintetizan o utilizan proteínas estructurales como queratina o colágenos en su lugar sintetizan polisacáridos. Por el contrario los animales sintetizan y utilizan ambos materiales. El polímero más abundante en la biosfera es la celulosa que podemos encontrar principalmente en la madera. Es un polímero lineal de D-glucosa cuyos residuos están unidos por medio de un enlace glicosídico β (1 \rightarrow 4). Un homopolímero con estructura muy similar a la celulosa es la quitina (Fig. 5.2) compuesta por un solo tipo de monosacárido, N-acetil- β -D-glucosamina (NAG o GlcNAc) unidos entre sí al igual que la celulosa, por medio de enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4) formando largas cadenas rectas que sirven de armazón estructural. La quitina resulta igual que la celulosa salvo que en el carbono dos (C-2) tiene un grupo amino acetilado en vez de un hidroxilo. La quitina es el constituyente mayoritario en las paredes celulares de los hongos aunque puede ser encontrada como constituyente minoritario en algunas algas y durante la división en células de levadura pero su papel más conocido es como material estructural y constituyente mayoritario del exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insectos. Por último, la quitina también actúa como sustrato de la lisozima cuya función es bien conocida desde hace tiempo la cual consiste en disolver determinadas bacterias al romper los polisacáridos de sus paredes celulares que proporcionan el soporte rígido a la bacteria.

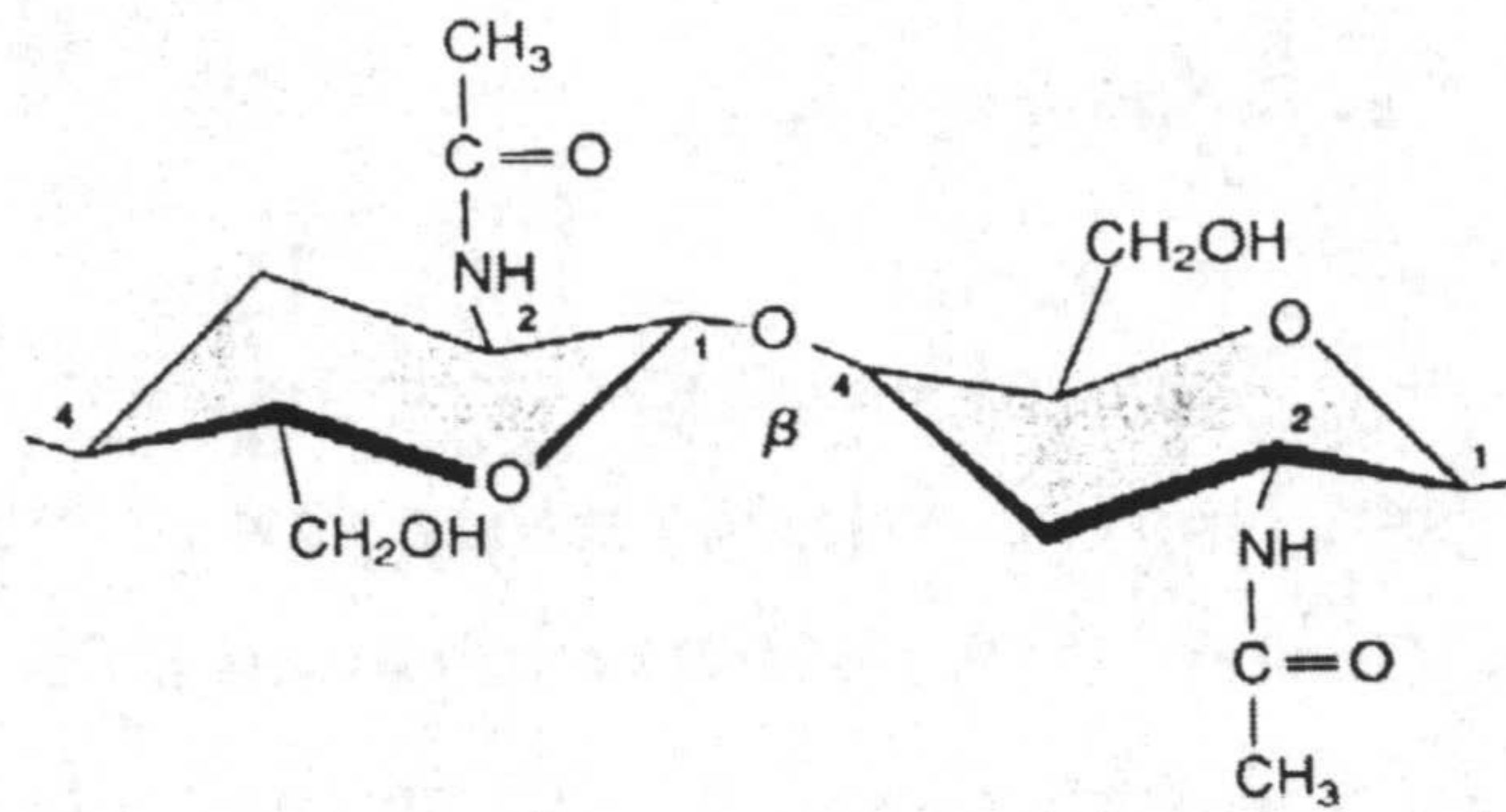


Fig. 5.2. Quitina (*Biochemistry. Mathews van Holde. Ed. Benjamin / Cummings Publishing Company*).

Desde que se descubrió la quitina como constituyente mayoritario de las paredes celulares de los hongos, se pensó en las enzimas quitinolíticas denominadas quitinasas como agentes anti-hongos naturales cobrando una gran importancia biotecnológica (Shapira et al., 1989; Schickler et al., 1993). Dichas quitinasas están ampliamente extendidas en la naturaleza y pueden ser encontradas en bacterias, hongos, plantas, invertebrados (principalmente insectos y crustáceos) y en toda clase de vertebrados. El papel de las quitinasas dentro de estos organismos son diversas y constituyen tema de intensa investigación. En vertebrados, las quitinasas usualmente están formando parte del tracto digestivo (Jeuniaux, C., 1993). En insectos y crustáceos están asociadas con la necesidad de la degradación parcial de la vieja cutícula y su secreción es controlada por un complejo mecanismo hormonal (Spindler-Barth, M., 1993). En plantas, la mayor parte de la respuesta defensiva contra exógenos patogénicos es la secreción de inhibidores de proteasas, glucanantes y quitinasas (Lamb, C. J. et al., 1989; Legrand, M. et al., 1987; Collinge, D. B et al., 1993). Las quitinasas en hongos cumplen un papel autolítico, nutricional y morfogenético (Adams, D. J. et al., 1993; Cabib, E. et al., 1992).

Las quitinasas actúan sobre la quitina de dos modos posibles:

1) degradando el enlace glicosídico a lo largo de la cadena de quitina por lo que se denominan endoquitinasas, produciendo eventualmente oligómeros cortos de GlcNAc (Monreal & Reese, 1969; Robbins et al., 1988; Roberts & Selitrennikoff, 1988; De la Cruz et al., 1992).

2) generando como producto principal diacetilquitobiosa (GlcNAc)₂ e incluso monómeros libres de GlcNAc, cuando los valores de concentración enzima / substrato son mayores, a partir del extremo no reducido de la cadena del polisacárido denominándose en este caso exoquitinasa o quitobiosidasa (Davis & Eveleigh, 1984; Robbins et al., 1988; Tronsmo & Harman, 1993).

Las condiciones óptimas para el proceso enzimático se encuentran situadas en un estrecho intervalo de pH comprendido entre pH 5.0 y pH 6.0. Las actividades máximas medidas a pH 6.1 ocurren a temperatura comprendida entre 50 y 60 °C concretamente 54 °C para Chi-A y 58°C para Chi-B (Brurberg, M. B. et al., 1996).

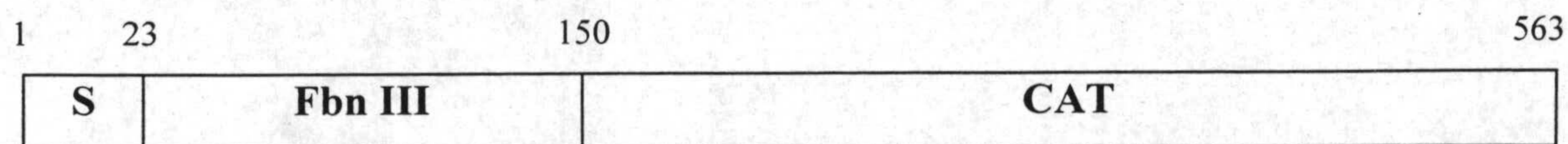
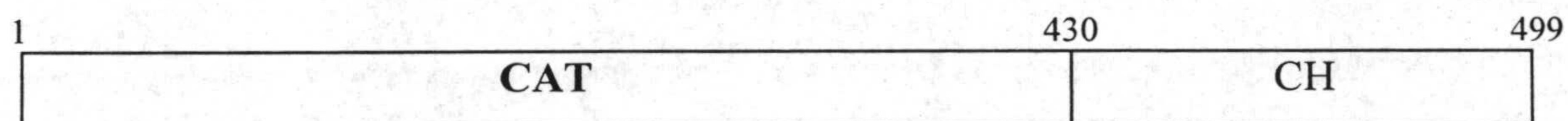
Los experimentos de inactivación térmica realizados indican que ambas enzimas son bastante estables a pH 6.1 aunque a temperaturas superiores a los 50°C la estabilidad empieza a decrecer considerablemente. Chi-A es la más estable de las dos enzimas siendo su tiempo de vida media de 5 a 10 veces mayor que para Chi-B a temperaturas comprendidas entre 48 y 54°C.

Las enzimas quitinolíticas aquí estudiadas, Chi-A y Chi-B proceden de la bacteria *Serratia marcescens*. Esta bacteria es una de las más eficientes en la degradación de quitina siendo sugerido que este organismo es capaz de producir más de cinco enzimas quitinolíticas entre ellas Chi-A y Chi-B (Fuchs et al., 1986) las cuales son de gran interés biotecnológico como agentes naturales antifúngicos. Ambas quitinasas se clonaron, secuenciaron y superexpresaron en *E. coli* a partir de los genes de *Serratia marcescens* B JL200 que las codifican. A partir del extracto periplasmático de las cadenas recombinantes se purificaron ambas quitinasas tal y como indico más detalladamente en el apartado de Materiales y Métodos de esta tesis.

La enzima Chi-A está constituida por 563 amino ácidos que configuran tres dominios (Fig. 5.3 (a)): dominio catalítico (CAT) compuesto por los restos del 150 al 563 (numeración seguida en base al producto primario del gen), secuencia señal (S) desde el resto 1 al 23 (está secuencia no se encuentra en la proteína purificada) y el dominio tipo fibronectina III (Fbn III) también conocido por dominio N-terminal del residuo 23 al 150. En el caso de Chi-B (Fig. 5.3 (a)) solo la constituyen dos dominios; dominio CAT del residuo 1 al 430 y dominio de unión a quitina (CH) del 430 al 499. Para Chi-A la secuencia de unión a quitina se encuentra incluida dentro del dominio CAT. Tanto Chi-A como Chi-B poseen el citado motivo estructural, barril $\alpha\beta$, incluido en sus respectivos dominios CAT.

La estructura cristalográfica de la Chi-A (Perrakis, A. et al. 1994) se conocía antes de realizar los experimentos calorimétricos y de proteólisis limitada a diferencia de Chi-B cuya estructura se ha determinado hace relativamente poco tiempo (van Aalten, D. M. F. et al., 2000). En la figura 5.4. se distingue el dominio N-terminal (residuos 24-137) compuesto exclusivamente por láminas β coincidiendo con la estructura del dominio de fibronectina III (Fbn III). El citado dominio N-terminal está conectado al dominio principal barril $\alpha\beta$ (residuos 159-442 y 517-563) por medio de una región bisagra compuesta de 21 residuos (del 138-158) de los cuales 4 son Pro, 5 lys, 4 Leu, 1 Tyr y 1 Ser. Dicha región bisagra es probablemente móvil permitiendo de este modo al dominio N-terminal tener posiciones relativas diferentes en disolución acuosa. El dominio barril $\alpha\beta$ posee un plegamiento similar al de TIM o piruvato quinasa y coincide con el dominio CAT. Por último, el tercer dominio que se corresponde con un plegamiento $\alpha+\beta$ (residuos 443-516) insertado dentro del citado dominio $\alpha-\beta$ barril entre la 7ª lámina β y la 7ª hélice α , está compuesto por 5 láminas β una de las cuales está interrumpida. A diferencia de esta estructura la correspondiente a Chi-B (Fig. 5.5.) consta de un dominio catalítico (CAT) con un plegamiento tipo barril $\alpha\beta$ y un dominio de unión a la quitina compuesto por 49 residuos del extremo C-terminal. En base a lo descrito sobre la estructura de Chi-A se pensó sobre la posibilidad de la separación de los distintos dominios que componen la enzima en concreto el N-terminal por poseer una mayor movilidad con respecto al resto de los dominios. Con este fin se realizaron experimentos de proteólisis limitada sobre Chi-A y Chi-B tal y como describiré posteriormente en este capítulo. Además, dada la importancia biotecnológica de ambas quitinasas es necesario recavar más información a cerca de la termoestabilidad de las mismas por medio de DSC cuyas características están ampliamente descritas en el apartado de Materiales y Métodos.

(a)

Chi A (*S. marcescens*)Chi B (*S. marcescens*)

(b)

Chi A (*S. marcescens*) 409 APAWKPDYAYTTVNGVNALLA 429Chi B (*S. marcescens*) 453 APAYVPGTTYAQQGALVSYQGY 473

Fig. 5.3. (a) Dominios constitutivos de Chi A y Chi B donde S es la secuencia señal, Fbn III, dominio tipo fibronectina III, CAT, dominio catalítico, CH, dominio de unión a la quitina (Brurberg, M. B. et al., 1996). La numeración de los residuos se corresponde con el producto primario del gen antes de ser exportado al periplasma de ahí que incluya la secuencia señal. Chi B no posee secuencia señal ya que no procesa el dominio N-terminal. (b) Secuencias de unión a quitina para ambas enzimas.



Fig. 5.4. Estructura tridimensional obtenida por difracción de rayos X (Perrakis, A. et al., 1994) perteneciente a Chi-A de *Serratia marcescens* y expresada en *E. coli*. Su código de reconocimiento dentro del Banco de Datos de Proteínas (PDB) es 1CTN. En ella se indica el dominio catalítico cuyo plegamiento (barril $\alpha\beta$) es característico de la familia de proteínas tipo barril TIM.

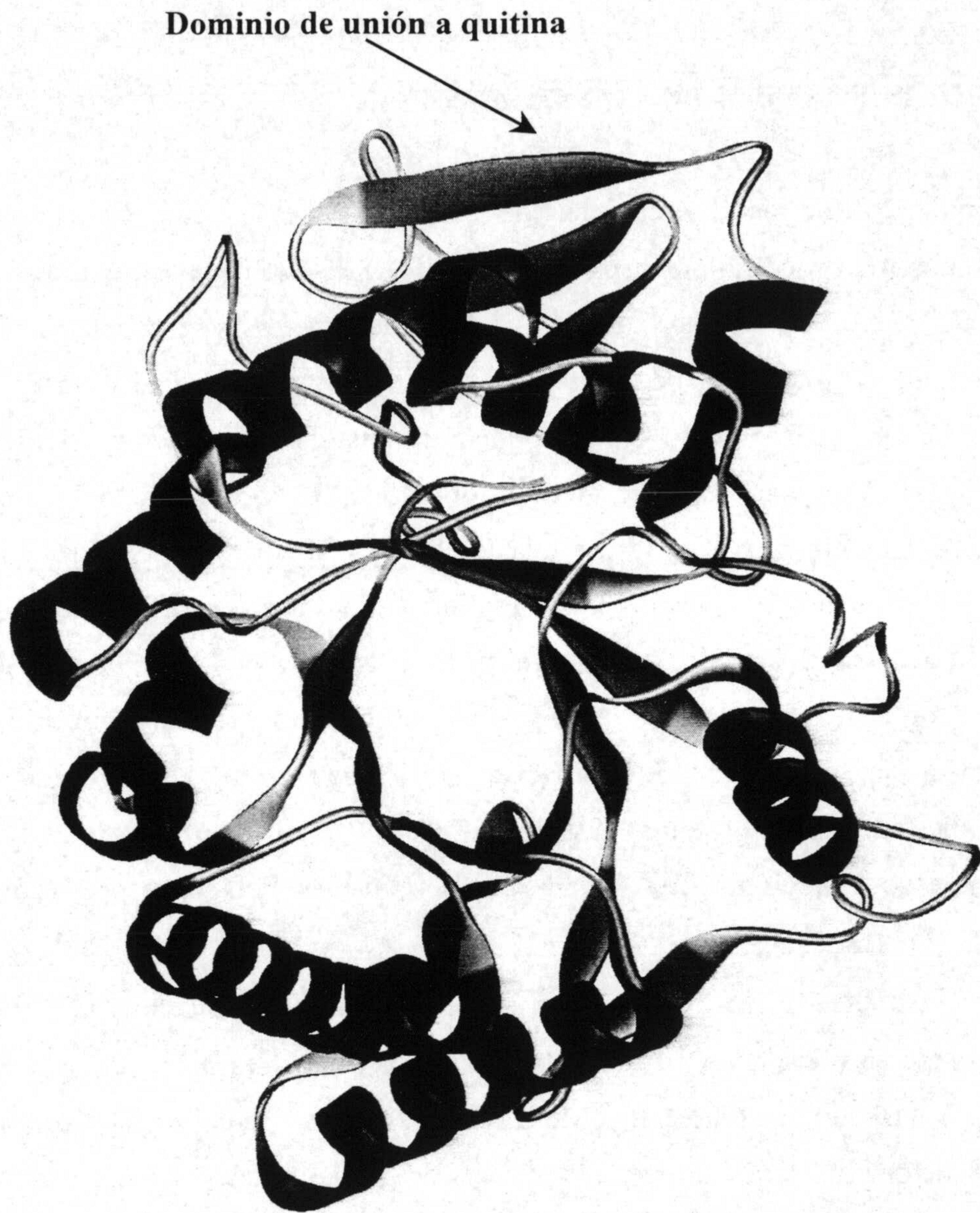


Fig. 5.5. Modelo estructural correspondiente a la proteína Chi-B cedidos por el Dr. Vincent Eijsink (datos actualmente depositados en el Banco de Datos de Proteínas, PDB con el código 1E15).

5.1.2.- Estudio del desplegamiento térmico por DSC de Quitinasas A y B.

5.1.2.1.- Procedimiento experimental.

Los calorímetros diferenciales de barrido utilizados para llevar a cabo los experimentos fueron como en casos anteriores, DASM-4 (Biopribor, Rusia) y VP-DSC (MicroCal, USA). Las características de ambos calorímetros se recogen en el apartado de Materiales y Métodos de esta tesis. Las muestras de Chi-A así como las correspondientes al fragmento clonado de la misma, Fbn III, fueron enviadas por el grupo del Dr. Vorgias (Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Atenas). Chi-B se purificó y liofilizó durante mi estancia en el grupo del Dr. Vincent Eijsink (Laboratorio de Tecnología Genética Microbiológica, Universidad de Agricultura de Noruega). La determinación de la concentración de las muestras se realizó espectroscópicamente a 280 nm utilizando los coeficientes de extinción determinados teóricamente en base a la secuencia aminoacídica de cada proteína (Stanley, C. G. & von Hippel, P.H., 1989). Los coeficientes de extinción teóricos para Chi-A, Chi-B y Fbn III respectivamente son: $\epsilon_{280, \text{Teor.}} = 1.83 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280, \text{Teor.}} = 2.02 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280, \text{Teor.}} = 2.17 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$. Las concentraciones utilizadas de Chi-B, Chi-A y Fbn III, se sitúan entre 0.23 y 1.66 mg/mL. El peso molecular para Chi-A es 58514 Da, para Chi-B, 55469 Da (Brurberg, M. B. et al., 1996) y para Fbn III, 11608 Da, éste último se determinó teóricamente a partir de los pesos moleculares correspondientes a cada uno de sus restos. La velocidad de barrido de temperatura en todos los experimentos realizados por DSC fue de 1 °C / min. Los diferentes tampones utilizados según el pH diseñado fueron: 50 mM acetato sódico para valores de pH 4.0, 4.5, 50 mM Glicina sódica para valores de pH 2.75, 3.0, 10.0, 10.5 y 20 mM fosfato sódico para valores de pH 6.5, 7.0.

5.1.2.2. Resultados experimentales

A.- Quitinasa A y Quitinasa B

El estudio termodinámico de las quitinasas se inició con los experimentos de desplegamiento térmico de Chi-A a pH neutro y posteriormente a pH ácido (4.0 y 3.0) mediante DSC con el fin de encontrar las condiciones experimentales adecuadas para el desplegamiento reversible de cada uno de los dominios que componen las enzimas. Los resultados de dichos experimentos no fueron los esperados. A pH neutro se obtuvo un solo pico irreversible con una temperatura en el punto máximo de la traza de 62.5 °C correspondiente a la desnaturalización térmica irreversible de Chi-A. A pH 4.0 (Fig. 5.6.) el resultado obtenido fue el mismo que a pH neutro pero el valor de temperatura máxima de la traza se desplazó hasta 48.2 °C. A diferencia de los anteriores resultados a pH 3.0 (Fig. 5.7.) el termograma muestra dos picos, el primero irreversible con una temperatura máxima de 36.7 °C y el segundo reversible con una temperatura máxima de 77.9 °C, lo cual indica el desplegamiento de dos unidades cooperativas con estabilidades muy diferentes. El calor absorbido en el segundo pico, del mismo orden al calor esperado para una proteína con un peso molecular similar al de Chi-A, así como su alta reversibilidad incitaba a pensar que esta transición se correspondía con el desplegamiento del dominio Fbn III de forma independiente al resto de Chi-A. Durante la resuspensión de Chi-B liofilizada en el tampón de muestra deseado nos encontramos con un problema adicional, la disminución de la solubilidad cuanto más pequeño era el pH. Se determinó que el valor de pH correspondiente a la máxima solubilidad se situaba a pH alrededor de 10. Los experimentos de DSC realizados con Chi-B en las mismas condiciones que los descritos para Chi-A utilizando aquí un rango más amplio de pH (6.5-10.5) dieron como resultado termogramas con una sola transición correspondiente a su desplegamiento irreversible, no siendo posible encontrar las condiciones en las que se podía detectar una transición adicional como en el caso de Chi-A (Fig. 5.8.).

B.- Fragmento tipo Fibronectina III (FbnIII) de Chi-A

Como se mostrará en el apartado dentro de este mismo capítulo referente a la proteólisis limitada, ésta no pudo ser finalizada con éxito de ahí que el grupo del Dr. Vorgias decidiera clonar y expresar en *E. coli* los diferentes dominios por separado.

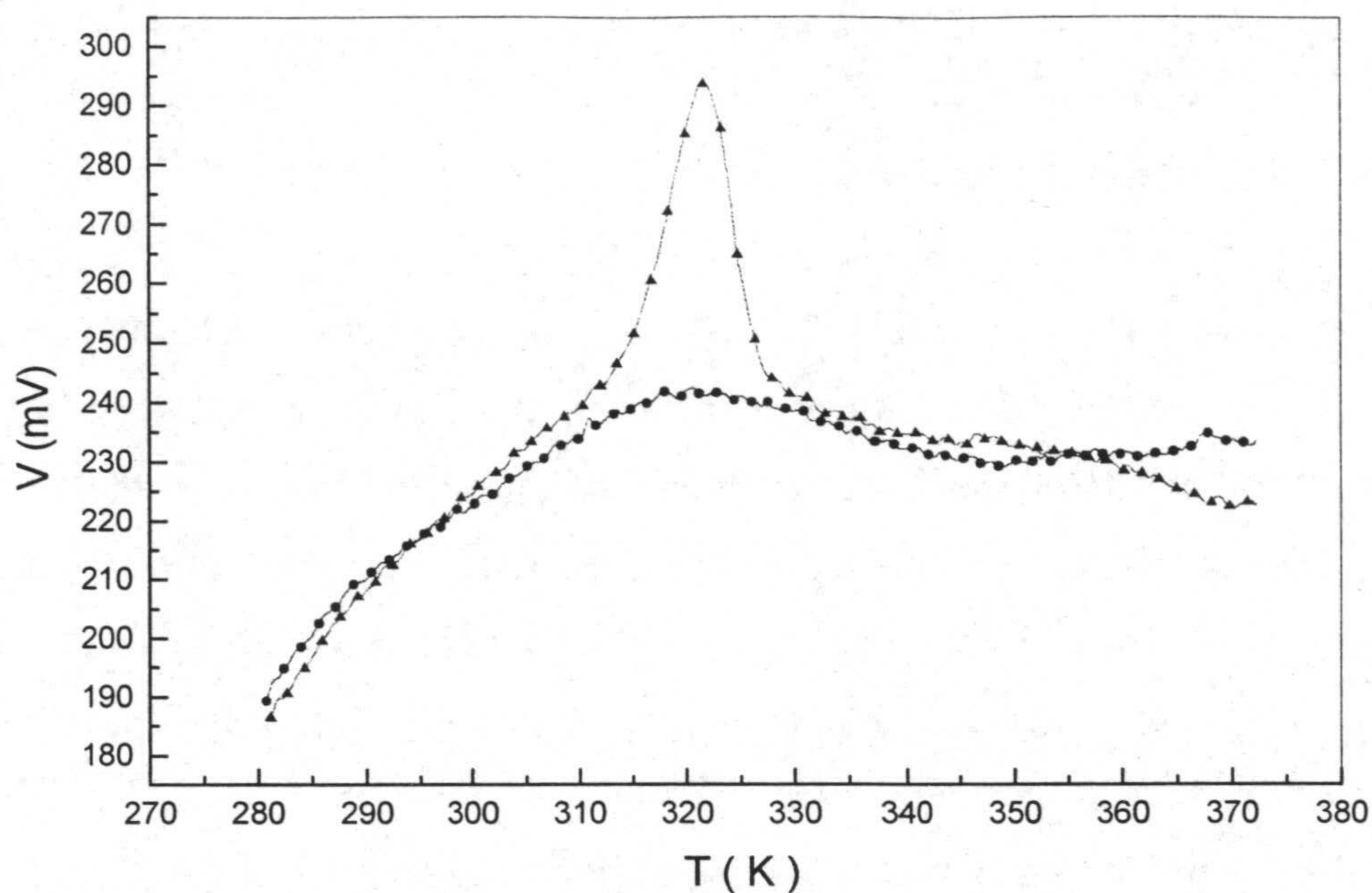


Fig. 5.6. Representación de los datos obtenidos directamente del calorímetro DASM-4 sin análisis previo alguno (no restada la línea base instrumental) correspondientes al 1^{er} (azul) y 2^o (rojo) barrido de temperatura para Chi-A con una concentración 1.66 mg/mL y disuelta en tampón 50 mM acetato sódico pH 4.0. Termogramas registrados a una velocidad de barrido de temperatura de 1 K/min.

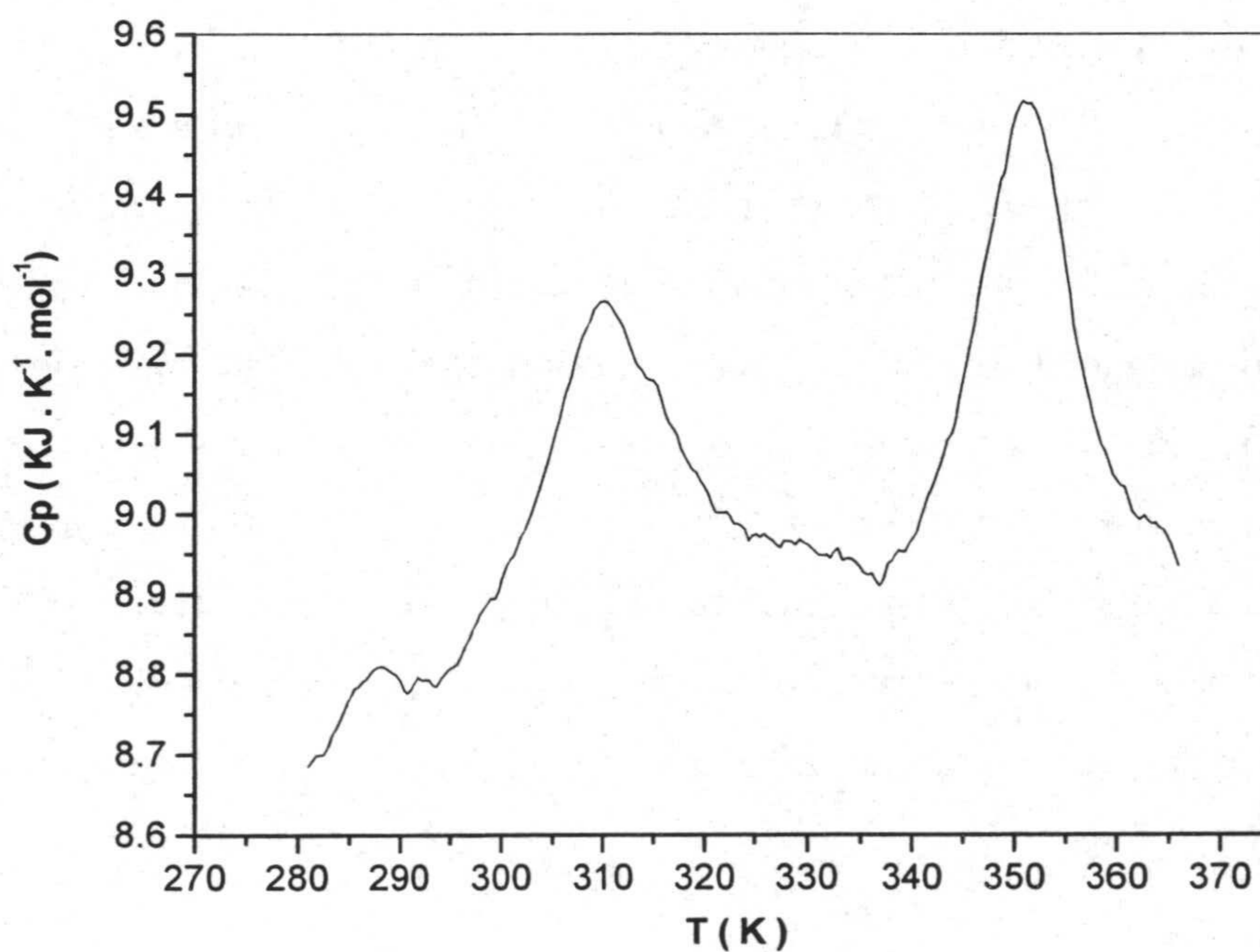


Fig. 5.7. Termograma perteneciente a Chi-A de concentración igual a 1.23 mg/mL disuelta en tampón 50 mM glicina sódica pH 3.0. De izquierda a derecha, 1^{er} pico irreversible con una temperatura en su máximo de 309.85 K y 2^o pico, reversible con una temperatura máxima 351.05 K.

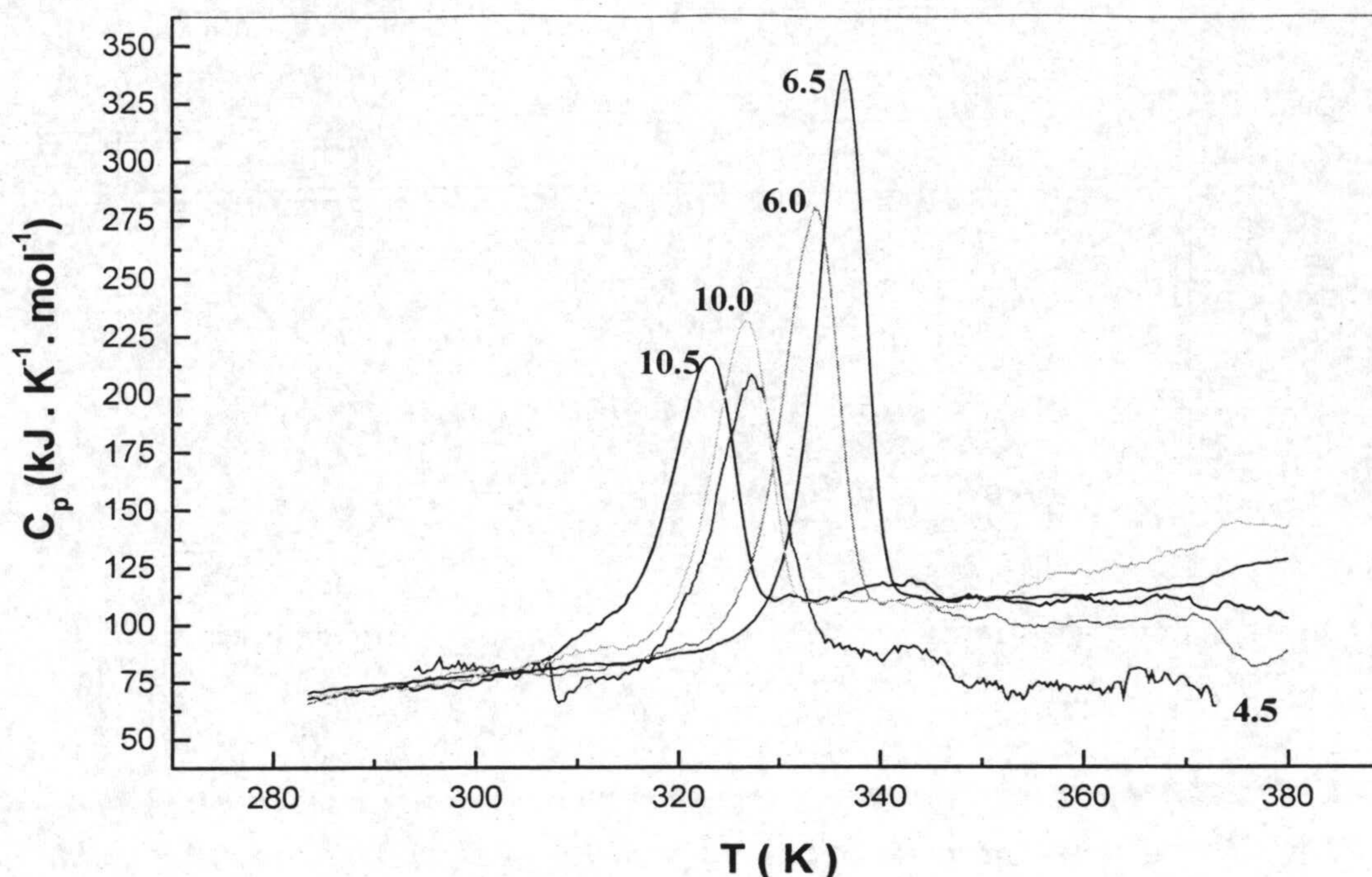


Fig. 5.8. Termogramas obtenidos en el calorímetro DASM-4 para Chi-B bajo diferentes valores de pH (indicados en cada traza). En todos los casos se obtiene un solo pico asimétrico irreversible.

Uno de los dominios clonado y purificado fue el Fbn III perteneciente a Chi-A. Sobre este dominio Fbn III se realizó el estudio de desplegamiento térmico por medio de DSC al igual que se hizo anteriormente con Chi-A y Chi-B, bajo diferentes valores de pH (4.0, 3.0 y 2.75). Fbn III presentaba una solubilidad cada vez menor con la disminución del pH tal y como se describió para Chi-B. Los experimentos de desplegamiento generaron en todos los casos, un solo pico siendo todas las transiciones reversibles. El segundo barrido de temperatura se superpone casi totalmente al primero o lo que es lo mismo la reversibilidad es casi total lo que nos permite la realización de un análisis basado en la termodinámica de equilibrio tal y como se ha destacado anteriormente en esta tesis (Fig. 5.9.). Las transiciones correspondientes a Fbn III se ajustan al modelo de dos estados de cuyo análisis se desprenden los parámetros termodinámicos que las caracterizan. En la (Fig. 5.10.) se muestra el ajuste individual de cada traza. Los parámetros termodinámicos obtenidos del análisis de dichas trazas se muestran en la Tabla 5.1. La regresión lineal sobre todos los valores correspondientes a la dependencia del efecto calorífico, ΔH_m , con respecto a T_m es representada en la Figura. 5.11 de cuya pendiente obtenemos un ΔC_p igual a $3.65 \pm 0.2 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$.

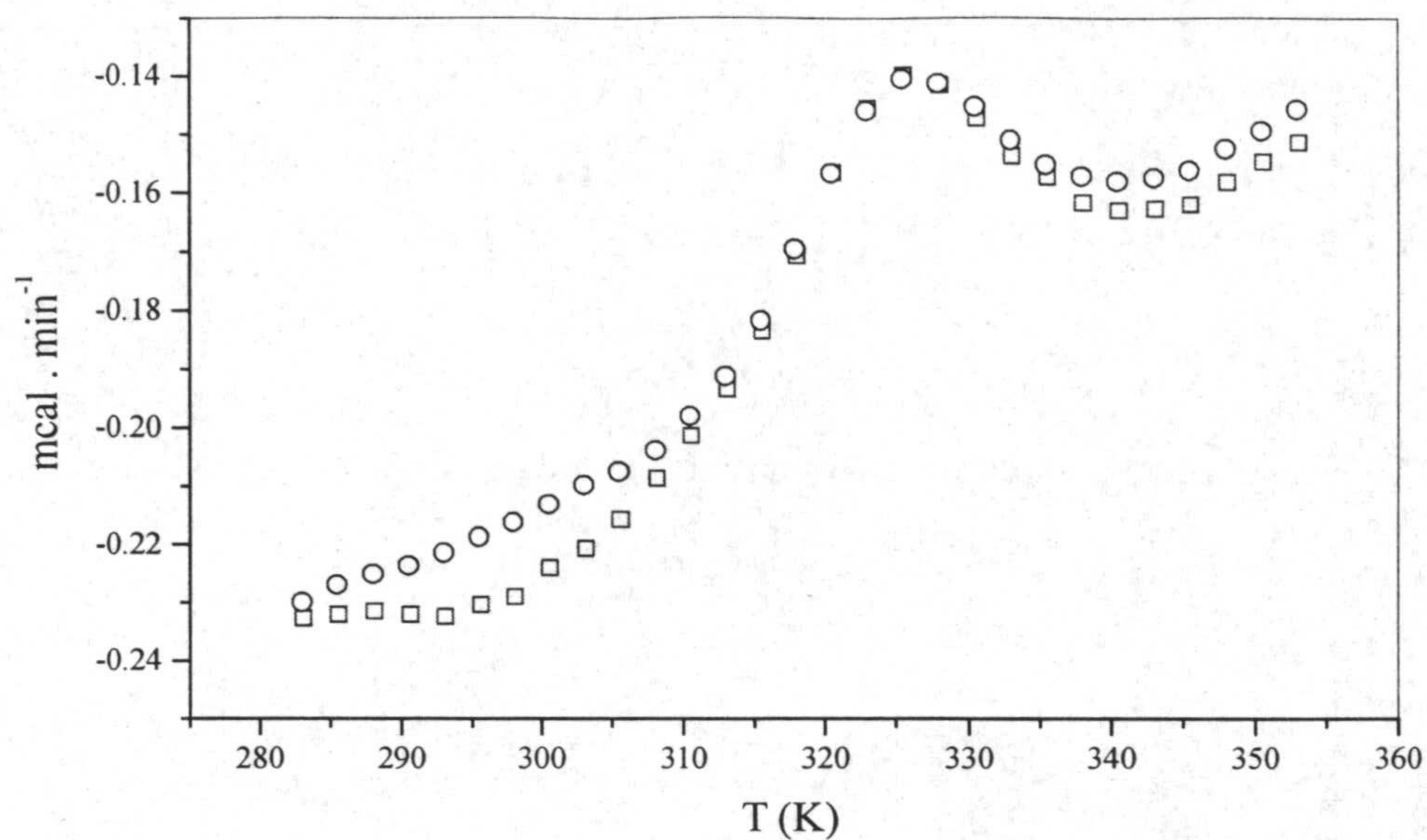


Fig. 5.9. Curvas calorimétricas tal y como son registradas en el calorímetro VP-DSC sin tratamiento previo alguno correspondientes al 1^{er} (rojo) y 2^o (azul) barrido de temperatura de Fbn III a una velocidad de 1 °C / min y concentración de proteína de 0.55 mg/mL en tampón 50 mM glicina sódica pH 3.0.

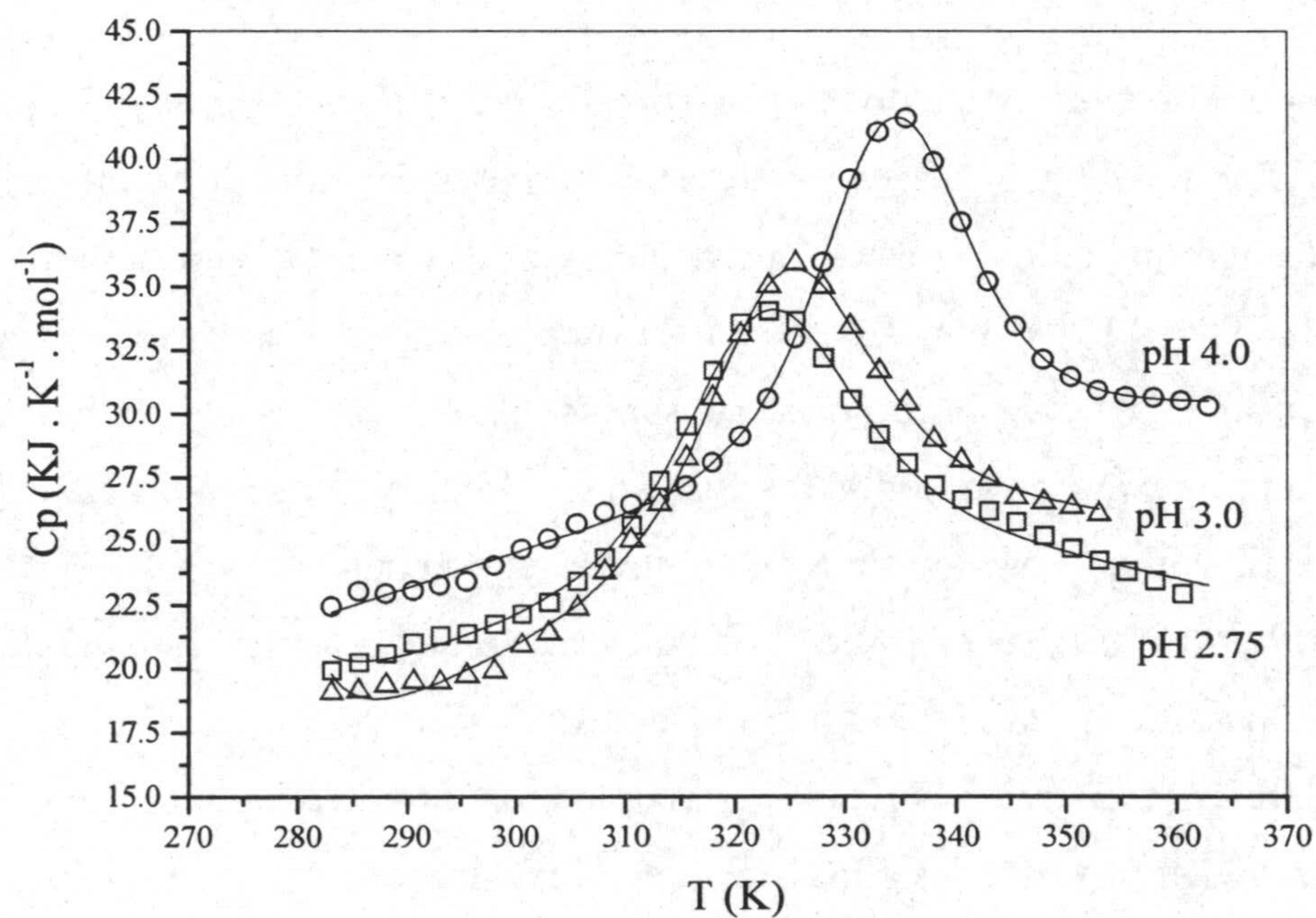


Fig. 5.10. Ajustes al modelo de dos estados para las trazas obtenidas por medio de DSC correspondientes a Fbn III bajo diferentes valores de pH indicados en cada curva.

	ΔH_m (kJ . mol ⁻¹)	T_m (K)
<i>50 mM Glicina Sódica pH 2.75</i>	165.08	322.06
<i>50 mM Glicina Sódica pH 3.00</i>	174.82	323.91
<i>50 mM Acetato Sódico pH 4.00</i>	210.95	334.30

Tabla. 5.1. Valores de entalpía obtenidos por medio del ajuste al modelo de dos estados para Fbn III.

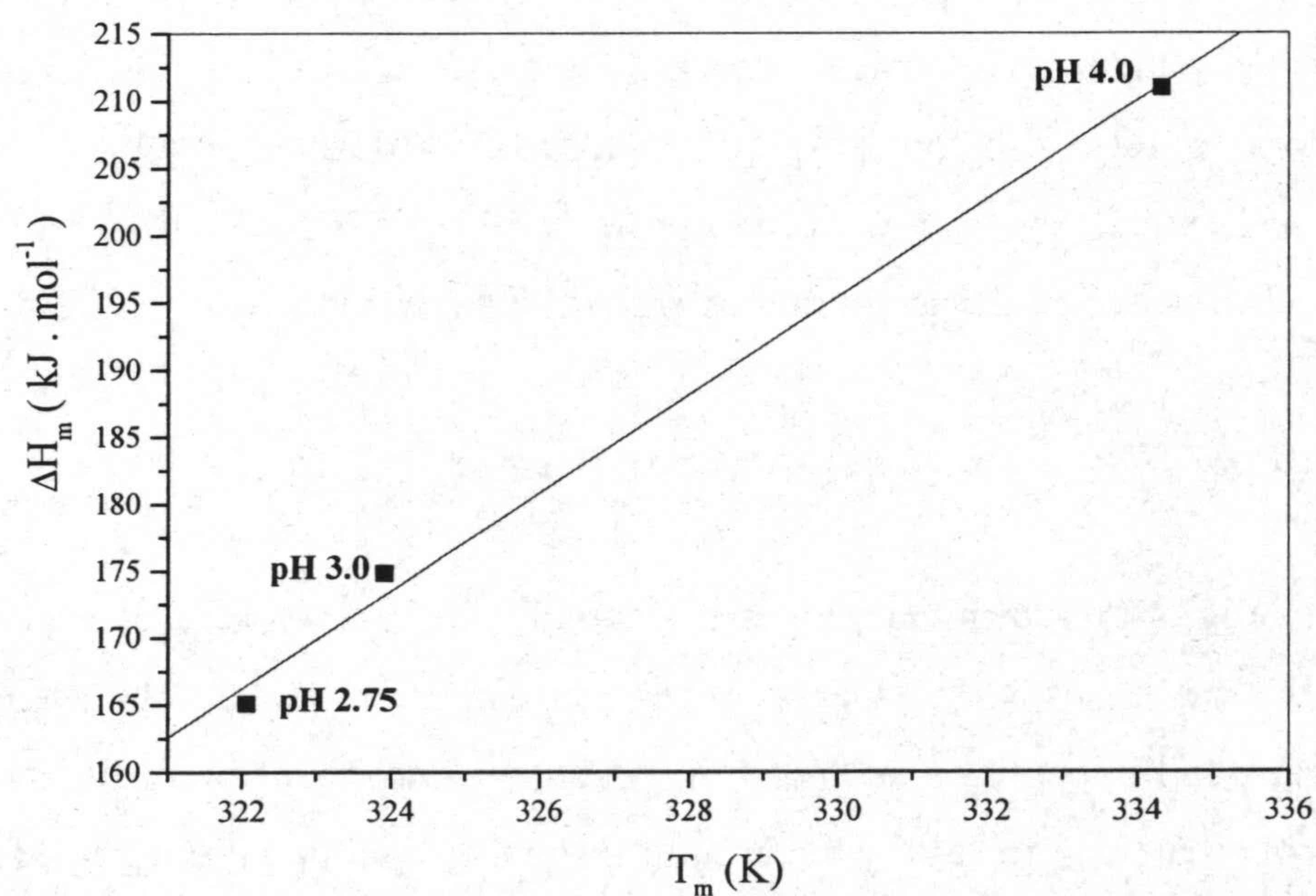


Fig. 5.11. Dependencia de la variación de la entalpía, ΔH_m , con la temperatura, T_m , de Fbn III. Es también mostrada en color rojo la regresión lineal a través de todos los puntos, cuya pendiente se corresponde con un incremento de la capacidad calorífica de desplegamiento, $\Delta C_{p,D} = 3.65 \pm 0.2 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$.

5.1.3. Proteolisis limitada.

Con el objetivo de separar los dominios individuales que componen ambas enzimas así como averiguar las funciones de los dominios no catalíticos y su relación con aquellos tipo barril $\alpha\beta$ se realizó la proteolisis limitada. Dicha proteolisis estuvo marcada por dos hechos 1) los experimentos realizados mediante DSC con Chi-A y Chi-B mostraron que el desplegamiento para ésta última enzima era más cooperativo que para Chi-A es decir, sus dominios interactúan con mayor fuerza formando una sola unidad cooperativa a todos los valores de pH estudiados 2) la estructura tridimensional de Chi-B determinada por cristalografía de rayos X se determinó posteriormente a estos experimentos por lo cual no se conocían ni las fronteras determinantes de los dominios ni la energía de interacción entre ellos. En principio, la obtención de los dominios individuales nos permitiría obtener su desplegamiento térmico con una mayor probabilidad de ser reversible ya que el tamaño de los dominios individuales en comparación con el de la proteína completa es inferior no favoreciéndose la irreversibilidad del proceso tal y como ocurre con Chi-A y Chi-B. Como consecuencia no es posible realizar un análisis basado en la termodinámica de equilibrio para obtener los parámetros termodinámicos que caracterizan el desplegamiento. La proteolisis limitada se llevó a cabo al mismo tiempo para Chi-A y Chi-B utilizando las mismas condiciones experimentales (temperatura y tiempo de reacción).

A. Proteolisis limitada realizada con Papaina

Se eligió una primera proteasa en concreto una endopeptidasa denominada papaina la cual no es muy específica con respecto al punto de ataque aunque tiene preferencia por los péptidos anclados al extremo C-terminal por medio de una Arg o Lys. La papaina tiene un intervalo óptimo de reacción situado entre pH 6.0 y pH 7.0 (Cleveland, D. W. et al., 1997).

El procedimiento experimental para todas las muestras tanto de Chi-A como de Chi-B fue el mismo. Dichas muestras liofilizadas eran diluidas en el tampón deseado y termostatizadas a la temperatura de realización del experimento. Las concentraciones de cada una de las muestras estaban dentro del intervalo 0.01-1.4 mg/mL. La concentración inicial de papaina en el dial comercial era 10 mg/ml la cual fue diluida en el tampón de reacción al igual que las quitinasas. Dicha papaina, estable a 4°C, se mantuvo en todo momento en hielo antes de ser añadida a las muestras para evitar su inactivación.

Las condiciones experimentales utilizadas se eligieron en base a lo ya publicado (Tomme, P., van Tilbeurgh et al., 1988). El resultado de cada proteólisis fue observada por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS (sodio dodecil sulfato) es decir bajo condiciones desnaturalizantes. Los patrones de peso molecular utilizados fueron:

fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina sérica (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa).

Los experimentos se realizaron a temperatura de 37°C y 23°C ésta última coincidía con la temperatura del laboratorio. Inicialmente se utilizó tampón 50 mM acetato amónico pH 6.5 para posteriormente cambiar a tampón 50 mM carbonato amónico pH 8.0 con el objetivo de evitar la posible de formación de agregados en la disolución de proteína por disminución del pH ya que ésta es estable alrededor de pH 8.0. Las concentraciones para ambas quitinasas se redujeron en los sucesivos experimentos desde 0.04 mg/mL hasta 0.01 mg/mL así como la proporción en peso proteína / enzima desde 1/1000 a 1/5000 con el fin de suavizar las condiciones experimentales. Los tiempos de reacción fueron 0, 15, 30, 60 y 90 min en los experimentos en condiciones más fuertes y 0, 5, 10, 20 y 30 min y 24 h en condiciones más débiles de reacción. La enzima era inactivada calentando las muestras durante 2 min a 85°C. Los resultados obtenidos según las bandas observadas en los geles de poliacrilamida al 15% indicaban bien que las condiciones de reacción habían sido excesivas con lo cual no aparecía ninguna banda ya que se podría suponer que la proteína había sido cortada en trozos con un peso molecular demasiado pequeño para ser observadas en este tipo de gel o bien que las condiciones habían sido demasiado suaves con lo que no se había producido proteólisis ya que las bandas recogidas a diferentes tiempos de reacción aparecen a la misma altura que la banda correspondiente a la proteína antes de sufrir proteólisis es decir, a tiempo 0 min de reacción. Solo en el caso en el que se utilizó una proporción proteína / enzima 1/1000 se observó que las bandas recogidas a diferentes tiempos de reacción aparecían por debajo de los patrones de peso molecular en el caso de Chi-A y en el caso de Chi-B a una altura igual a la del patrón de peso molecular correspondiente a la lisozima (14.4 kDa) tal y como se observa en la Fig. 5.12.

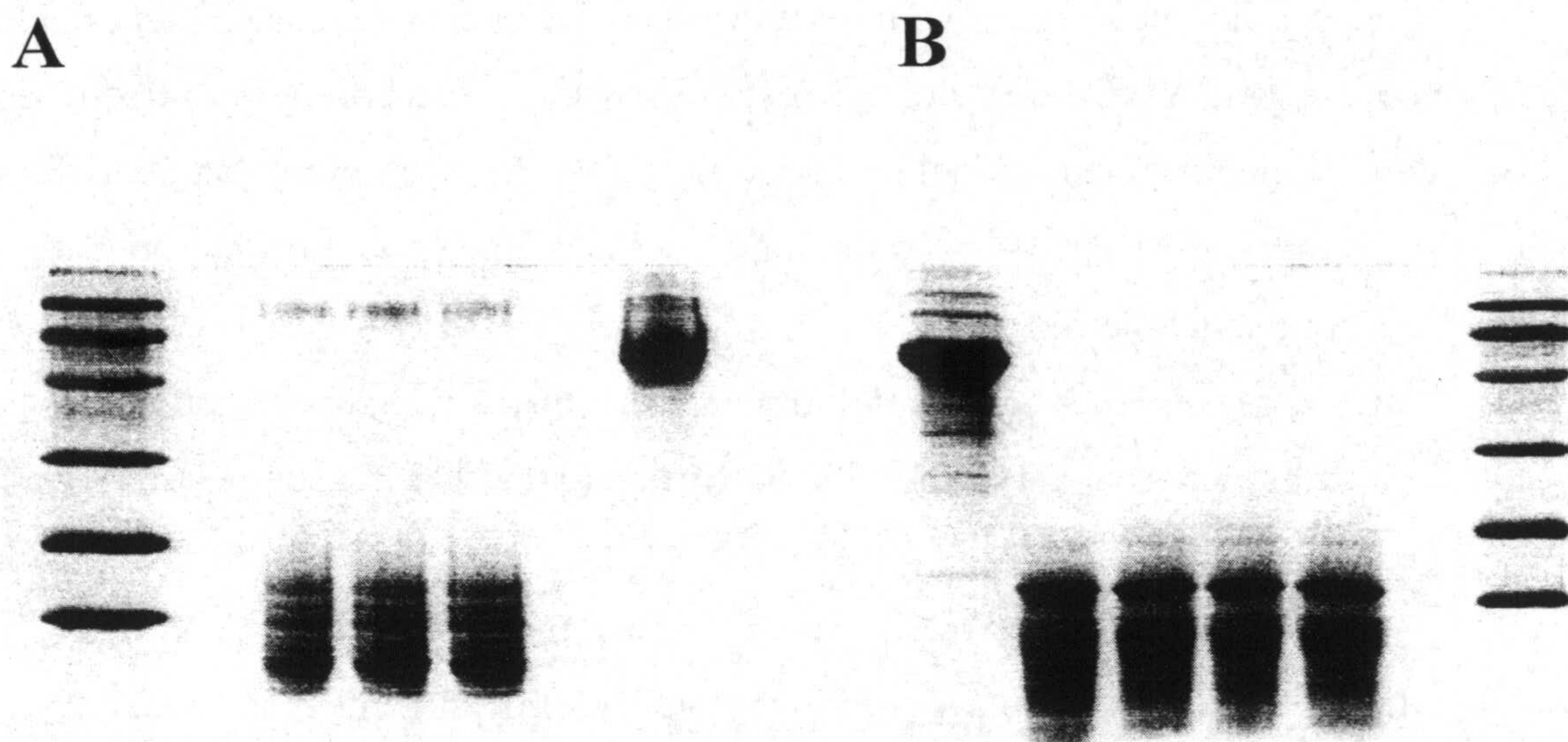


Fig. 5.12. Geles de electroforesis al 15% en presencia de SDS después de realizar proteólisis limitada con papaina en proporciones peso proteína / enzima, 1/1000 y 23 °C. A) Gel correspondiente a Chi-A. De izquierda a derecha patrones de electroforesis y muestras tomadas al cabo de 60, 45, 35, y 0 min después de añadir la enzima proteolítica. B) Gel perteneciente a Chi-B. De izquierda a derecha muestras tomadas al cabo de 0, 15, 30, 45 y 60 min y por último patrones de electroforesis.

B. Proteólisis limitada realizada con Tripsina

En base a los resultados obtenidos en la proteólisis realizada con papaina y teniendo en cuenta los problemas de agregación aparecidos optamos por el uso de una proteasa más específica como la tripsina cuyo pH de reacción (8.5-8.8) es prácticamente el mismo que el pH de máxima estabilidad de las quitinasas. La tripsina al igual que la papaina pertenece a la familia de las endopeptidasas cuyo punto de corte se sitúa en los péptidos unidos al extremo C-terminal de la proteína por medio de una Lys o Arg. La tripsina se reconstituyó en una solución 0.01% en volumen de trifluoroacético (TFA) manteniéndola en hielo durante todo el proceso ya que ésta es estable a 4°C. El tampón más adecuado en el que deben estar disueltas las muestras a digerir es 100 mM Tris pH 8.5 /HCl. Las concentraciones para Chi-A y Chi-B se situaron en el intervalo de 0.2-1.81 mg/mL y las de tripsina entre 0.5-0.125 mg/mL. La propia casa comercial

recomienda la dilución de tripsina en proporción proteína / enzima 1:20 y 1:100 así como un tiempo de incubación entre 2 y 18 h a 37°C dependiendo de la concentración de enzima utilizada. Para evitar autólisis no se recomienda sobrepasar los 37°C de temperatura. En base a todas estas indicaciones y a las condiciones experimentales previamente publicadas (Arnold, U. et al., 1996) fueron preparadas las muestras tanto de la proteasa como las de las quitinasas, manteniendo para ambas, las mismas condiciones de reacción que en los experimentos anteriores en presencia de papaina.

Los diferentes experimentos de proteólisis limitada utilizando tripsina se efectuaron en base a las condiciones de reacción indicadas. Las muestras tanto de Chi-A como de Chi-B estaban contenidas en tampón 100 mM Tris pH 8.5 y fueron termostalizadas a 23 °C, 37 °C y 65 °C según cada tipo de experimento. La proporción en peso proteína / enzima fue de 1/50 para el experimento realizado a 23 °C y 37 °C, 1/30 en los experimentos realizados en presencia de concentraciones crecientes de urea (0.5, 1, 1.5 M) y por último 1/1000 en el experimento realizado a 65 °C. Tanto este último experimento como el realizado en presencia de urea se cometieron con el mismo objetivo el de intensificar las condiciones de reacción. Los tiempos de reacción fueron de 2, 4, 6 y 23 h para los experimentos en presencia y ausencia de urea a 23 y 37 °C así como 0, 10, 15, 20, 30 y 40 min en el caso del experimento realizado a 65 °C. La reacción se detuvo por calentamiento durante 2 min a 80-85 °C excepto en el caso del experimento realizado a 65°C para el que se utilizó 5 µL de PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) disuelto en 2-propanol. Los resultados de todos los experimentos observados en geles de poliacrilamida al 15% revelaban que la proteólisis no tuvo lugar ya que todas las bandas de las muestras que han sido sometidas a proteólisis estaban a la misma altura que la banda de la muestra que no había sufrido proteólisis es decir a tiempo 0 min (Fig. 5.13.). A pesar de extremar las condiciones de reacción, la proteólisis no tuvo lugar probablemente porque la enzima utilizada con este fin no era la adecuada o bien porque las condiciones de reacción no eran las idóneas.

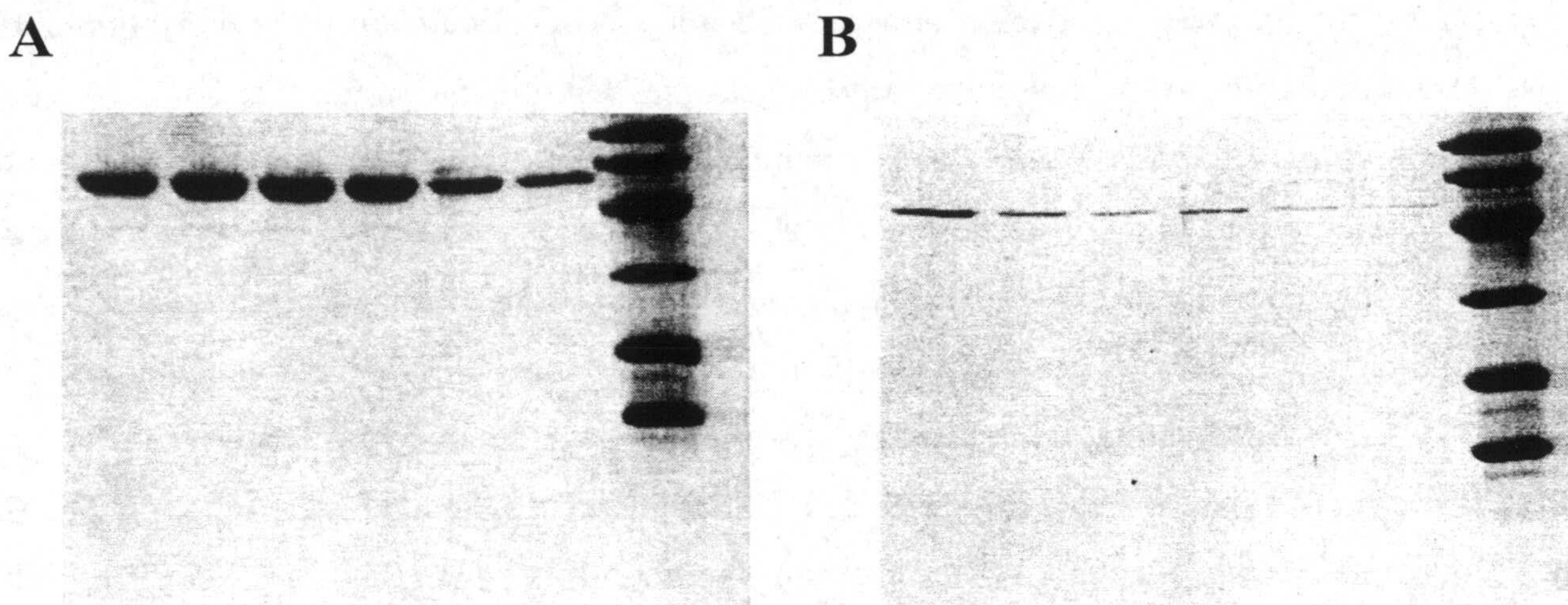


Fig. 5.13. Geles de electroforesis al 15% en presencia de SDS después de realizar proteólisis limitada con tripsina a 65 °C y una proporción en peso proteína / enzima, n 1/1000. A) Gel correspondiente a Chi-A. De derecha a izquierda patrones de electroforesis y muestras tomadas al cabo de 40, 30, 20, 15, 10 y 0 min después de añadir la enzima proteolítica. B) Gel perteneciente a Chi-B. De derecha a izquierda patrones de peso molecular y muestras tomadas a tiempos iguales a los del gel A.

5.1.4. Discusión

Es bien conocido que las proteínas de gran tamaño como es el caso de las que nos ocupan, Chi-A y Chi-B, al ser desplegadas tienen una probabilidad mayor de sufrir procesos irreversibles que les impiden volver a su estado plegado inicial. Hemos observado en las curvas de desplegamiento por temperatura, que las quitinasas sufren dicho desplegamiento de modo irreversible. Cuando una proteína posee más de un dominio cabe la posibilidad de que se desplieguen individualmente es decir, que tengan la suficiente independencia para desplegarse uno sin necesidad del otro. Cuando esto ocurre podemos esperar más de un pico en la traza que describe el desplegamiento de la proteína. Antes de la realización de los experimentos calorimétricos se observó detenidamente la estructura de Chi-A y se pudo determinar que uno de los dominios concretamente Fbn III presentaba una

interacción bastante débil con el resto de los dominios. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de separar los dominios e incluso encontrar más de una transición en la curva de desplegamiento. A pesar de todo ello y en la mayoría de las condiciones experimentales Chi-A se despliega de modo irreversible generando un solo pico en su curva de desplegamiento exceptuando a pH 3.0 donde se pudo observar dos picos uno irreversible y otro reversible probablemente perteneciente al citado dominio N-terminal ya que su ΔH está muy próximo al que se obtendría para una proteína con un peso molecular igual al de este dominio. Por el contrario Chi-B no posee dicho dominio N-terminal lo que la hace más compacta en comparación a la Chi-A. Este punto ha sido confirmado gracias a la determinación de su estructura por rayos X (van Aalten et al., 2000) y posteriormente en nuestros experimentos de calorimetría donde solo fue posible la obtención de un solo pico, irreversible. Todo lo referido hasta ahora se ha corroborado con lo obtenido por medio de proteólisis limitada tanto en presencia de papaina como de tripsina para las cuales dicha proteólisis y según las condiciones experimentales funcionaba en exceso es decir rompía en pequeños fragmentos las proteínas o no las cortaba excepto en el experimento en presencia de papaina a una temperatura de 23 °C y proporción proteína / enzima, 1/1000, donde se obtuvo para Chi-A la misma banda a diferentes tiempos de reacción por debajo del patrón molecular de 14.4 kDa lo que podría indicar que esta banda se corresponde con el dominio Fbn III aunque el peso molecular de la banda según su altura en el gel está por debajo del peso correspondiente a este dominio. Además la banda que se correspondería con el dominio catalítico no aparece posiblemente por una digestión excesiva. El mismo experimento pero para Chi-B demuestra una sola banda a la altura del patrón de peso molecular 14.4 kDa cuyo valor es muy superior al del dominio de unión a quitina o muy inferior al dominio catalítico que componen esta proteína. En conclusión no ha sido posible separar los dominios que componen ambas quitinasas. Cabe la posibilidad de no haber encontrado las condiciones de reacción adecuadas para la separación ya que en el caso de Chi-A se obtuvieron dos picos a pH 3.0 donde las enzimas proteolíticas utilizadas no son activas lo que hace imposible utilizar estas condiciones extremas, a esto hay que añadir que la solubilidad de ambas quitinasas disminuye con la disminución del pH.

Estos malos resultados en los experimentos obtenidos por medio de DSC impiden el ajuste de los datos a un modelo termodinámico conocido y en consecuencia no es posible la determinación de los parámetros termodinámicos que

caracterizan el proceso. En contraposición la clonación de uno de los dominios por separado, Fbn III, hizo posible la caracterización de parte del sistema completo. Dicho dominio generó curvas correspondientes a su desplegamiento térmico con un solo pico, reversibles permitiendo su ajuste a un modelo de dos estados y en consecuencia la determinación de sus parámetros termodinámicos. El valor obtenido de $\Delta C_{p,D}$ para Fbn III es de $3.65 \pm 0.2 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ típico de proteínas de bajo peso molecular (11.6 kDa) y comparable con el descrito en esta tesis para ADA-2h cuyo peso molecular es 9.2 kDa y su $\Delta C_{p,D}$ es $3.1 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ en condiciones de pH neutro y básico. Como se puede determinar el $\Delta C_{p,D}$ para ADA-2h en comparación con Fbn III es un débilmente inferior así como su peso molecular.

**6.- ESTUDIO DE UNIÓN DEL LIGANDO PGA A
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA Y SU MUTANTE
MEDIANTE CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE
TITULACIÓN.**

6.- ESTUDIO DE UNIÓN DEL LIGANDO PGA A TRIOSAFOSFATO ISOMERASA Y SU MUTANTE MEDIANTE CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN

6.1.- Antecedentes bibliográficos

Una de las vías metabólicas más importantes en seres vivos para la obtención de energía es la **glucólisis**. Ésta consiste en una secuencia de reacciones que convierten la glucosa en piruvato con la producción concomitante de ATP (Fig. 6.1). La importancia de dicha vía, como preámbulo al ciclo del ácido cítrico y a la cadena de transporte electrónico, se centra en los organismos aeróbicos, los cuales recolectan la mayor parte de la energía de la glucosa. Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato entra en la mitocondria donde es completamente oxidado hasta CO_2 y H_2O . Si el suministro de oxígeno es insuficiente, como ocurre en la contracción del músculo, el piruvato se convierte en lactato. En algunos organismos anaeróbicos por ejemplo levaduras, el piruvato se convierte en etanol. Tanto la formación de etanol como la de lactato a partir de glucosa son ejemplos de fermentaciones. La enzima triosafosfato isomerasa (TIM) cataliza, dentro del ciclo de la **glucólisis**, la interconversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en gliceraldehido 3-fosfato (G3P o GAP) utilizando para ello un intermediario endiol según la reacción que se detalla en el esquema de la figura 6.2. La reacción puede escribirse a la inversa es decir, utilizando DHAP como sustrato. La TIM es una enzima esencial dentro de este ciclo (Knowles JR., 1991) cuya deficiencia produce una importante enfermedad denominada anemia hemolítica consistente en una enzimopatía que afecta a todas las células de la sangre (hematíes, leucocitos y plaquetas). La acumulación de dihidroxiacetona fosfato potencialmente toxica conlleva un aumento de la sensibilidad a las infecciones y complicaciones cardiacas que producen la muerte súbita de los pacientes con edades comprendidas entre 6 meses y dos años (Enciclopedia Iberoamericana de Hematología, 1992 ; Blood. Principles & Practice of Hematology, 1995). La enzima glucolítica activa es un dímero estable compuesto por dos subunidades idénticas de 250 aminoácidos cada una (Borchert et al., 1994) con una interfaz de contacto entre ambas formada por los lazos del 1 al 4 (Fig. 6.3). Cada subunidad posee un plegamiento denominado barril $\alpha\beta$ con un centro que contiene 8 láminas β cubiertas externamente por 8 α -hélices.

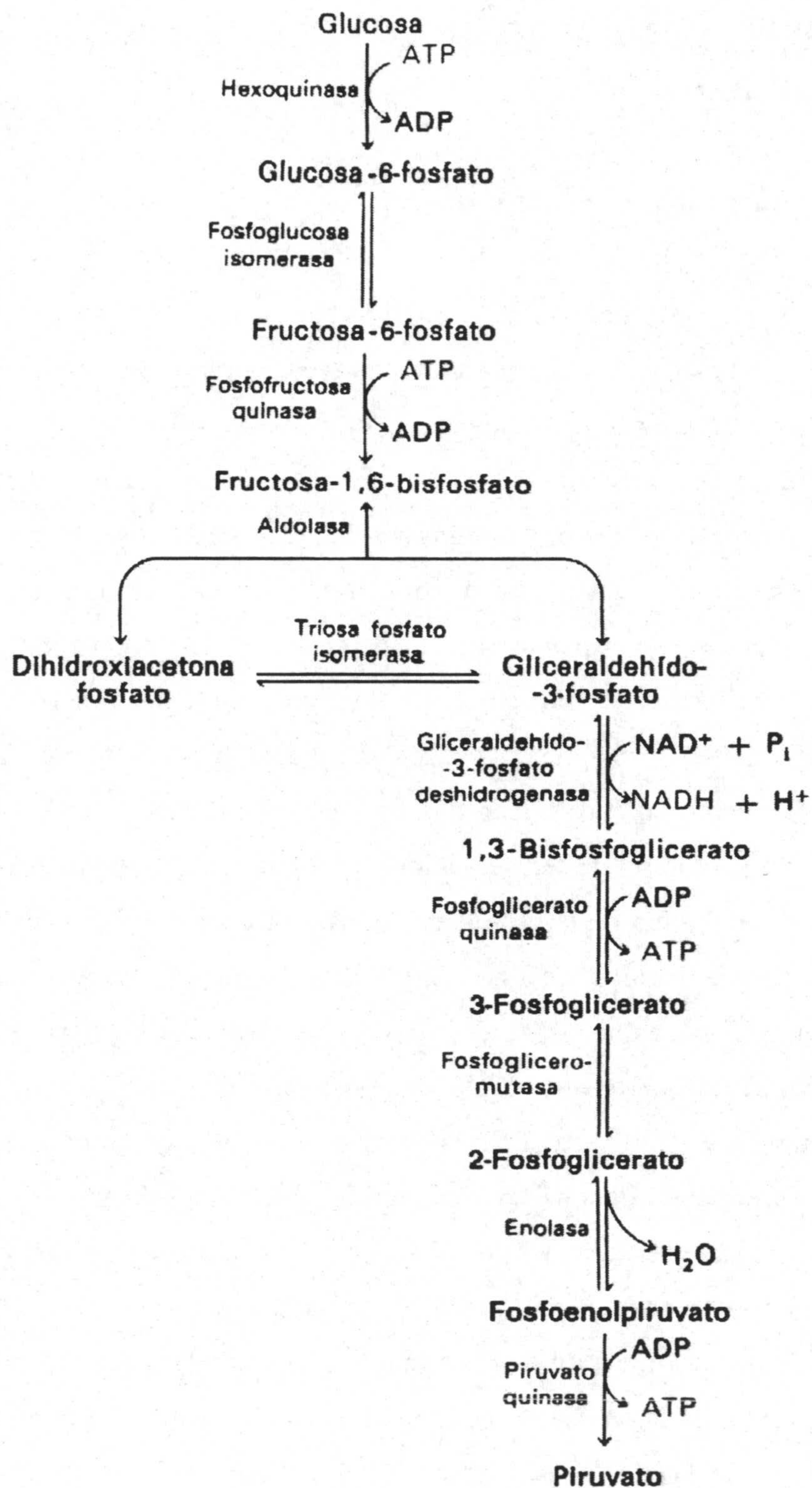


Fig. 6.1.- Esquema de la vía glucolítica en el que se enumeran las distintas enzimas que actúan, incluyendo la Triosa fosfato isomerasa objeto de nuestro estudio.

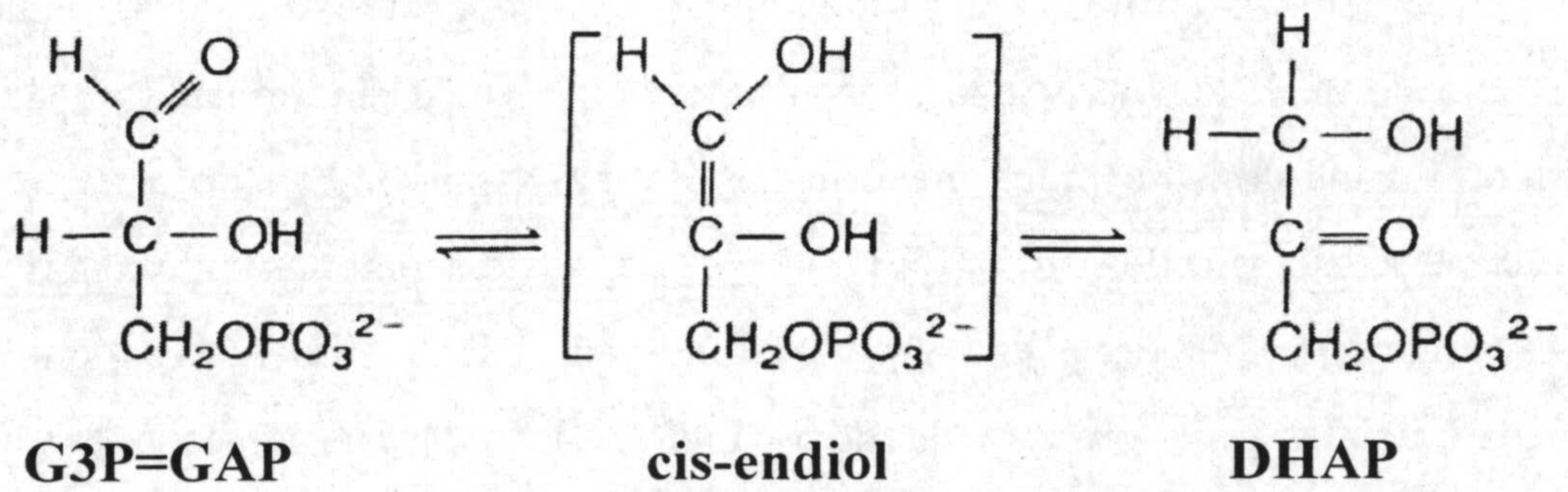


Fig. 6.2.- Conversi3n de G3P en DHAP a trav3s del intermedio cis-endiol, reacci3n catalizada por la enzima Triosafosfato isomerasa.

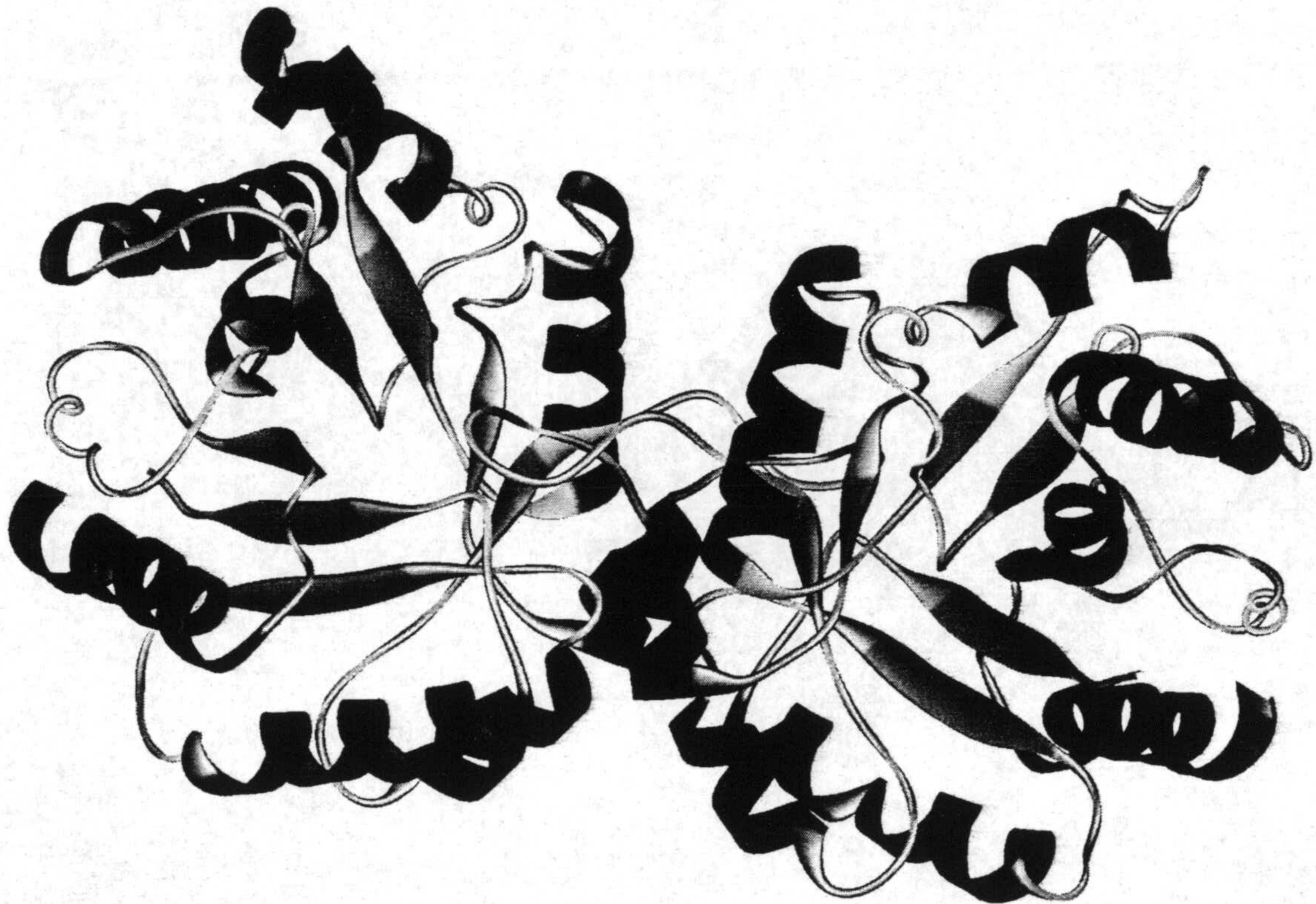


Fig. 6.3.- Estructura tridimensional obtenida por difracci3n de rayos X (M.E.M. Noble et al., 1992) correspondiente al d3mero de la Triosafosfato isomerasa (TIM) expresada en E. coli. Su c3digo de reconocimiento dentro del Banco de Datos de Prote3nas (PDB, "Brookhaven National Laboratory") es 1TRE.

El extremo C-terminal de cada lámina β está conectado a la subsiguiente hélice por medio de un lazo. Estos lazos, cuya numeración viene determinada por la lámina anterior, son los constituyentes mayoritarios del sitio activo. El sitio activo descansa sobre la parte superior del barril (Fig. 6.4) y es capaz de acomodar tanto a G3P como a DHAP gracias a que tiene una gran profundidad. Dicho sitio activo contiene tres residuos cruciales en el proceso catalítico, Lys 13 (lazo 1), His 95 (lazo 4) y Glu 165 (lazo 6), siendo este último esencial para la función de la enzima ya que es el encargado de cerrar el centro activo después de la unión al sustrato (Joseph, D. et al., 1995.).

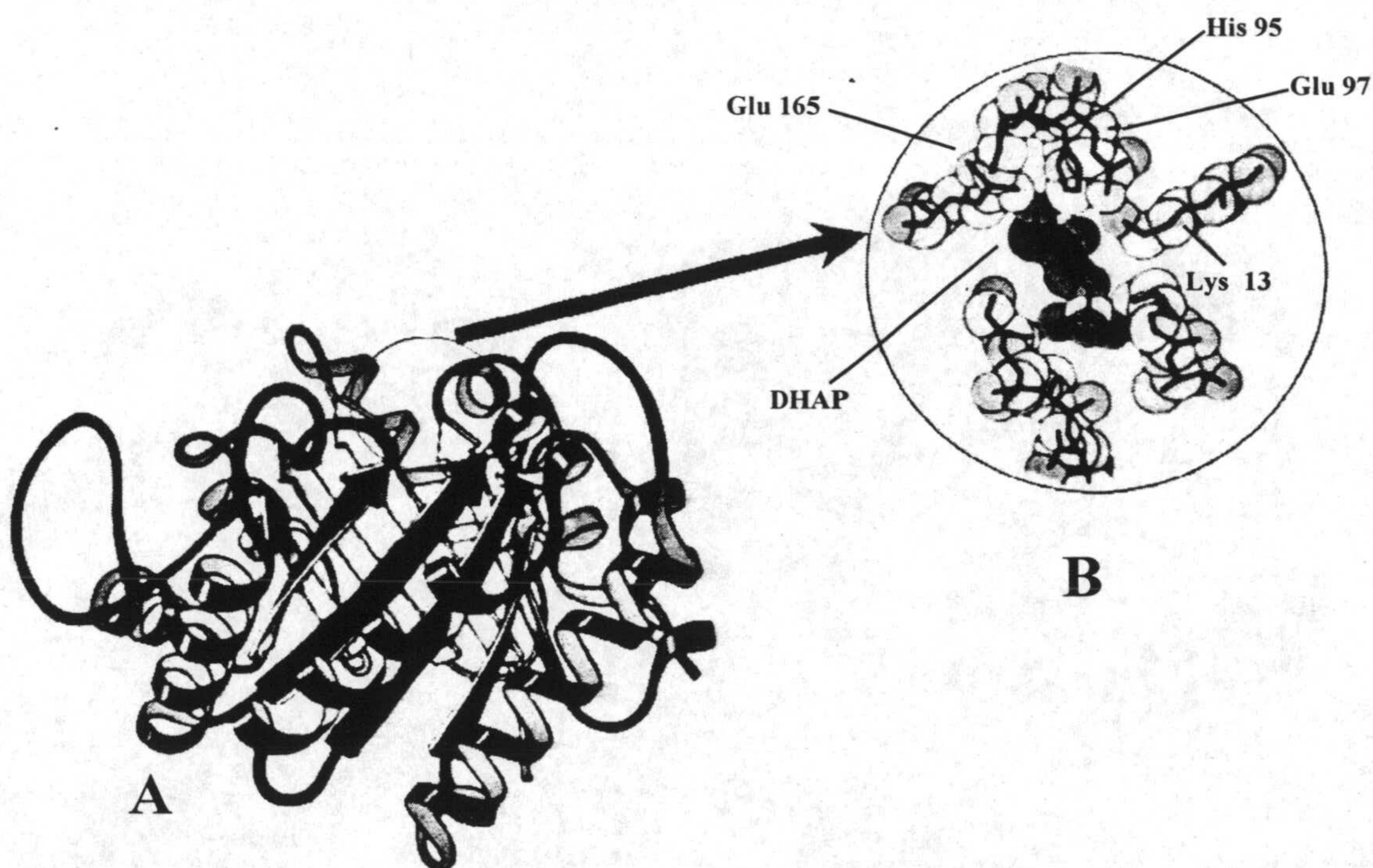


Fig. 6.4.- A) Estructura de una de las subunidades que componen el homodímero, enzimáticamente activo, de la Triosa fosfato Isomerasa. El sitio activo es indicado por medio de un círculo. B) Detalle del sitio activo de la enzima unido a DHAP. Los tres residuos críticos en la reacción son Glu 165, His 95 y Lys 13.

En la figura 6.5 se muestra esquemáticamente un mecanismo simplificado para dicha reacción. Como conocemos, Glu 165 es un resto cargado negativamente a pH fisiológico, lo que le permite extraer el protón del carbono 2 en el caso del G3P tal y como se observa en la siguiente figura (Fig. 6.5). Al mismo tiempo un grupo ácido perteneciente a la enzima dona un protón al grupo carbonilo del sustrato, con lo que se genera el endiol que es estabilizado por medio de los residuos Lys 13 y His 95 que favorecen el intercambio de protones esencial para la formación del intermediario. Por último, el protón tomado por Glu 165 se transfiere al carbono 1 del sustrato y el protón del $-OH$ del carbono 2 se transfiere al grupo ácido de la enzima, generando DHAP. Solamente la enzima intacta es totalmente activa (Waley, S. G., 1973; Zabori, S. et al., 1980).

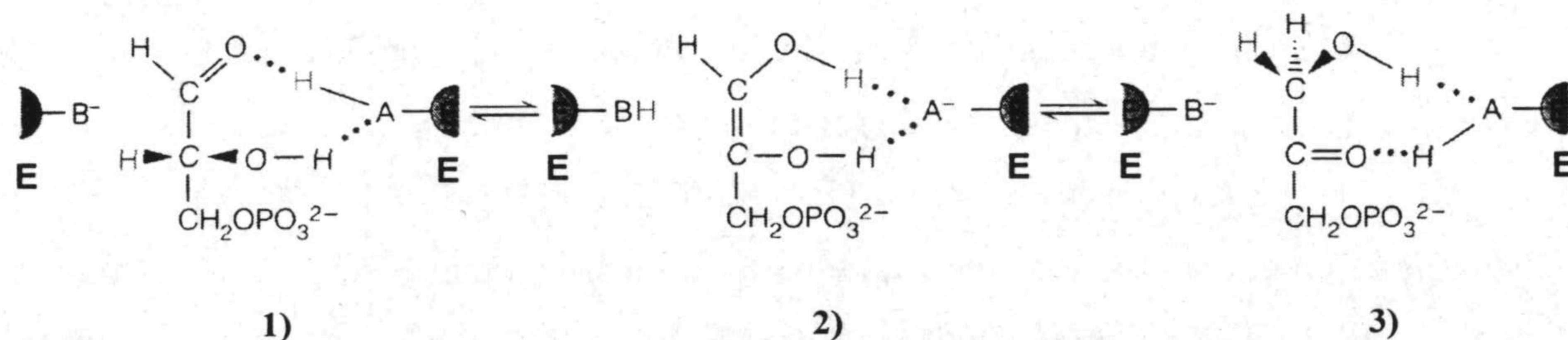


Fig. 6.5.- Mecanismo de reacción de la unión de G3P al sitio activo de TIM.
 1) G3P se enlaza al sitio activo. 2) Se forma el intermediario endiol: B⁻ (Glu 165) una temporalmente el protón del C-2; un grupo ácido A-H de la enzima transfiere un protón al grupo carbonilo del sustrato formando un grupo $-OH$. 3) El protón B-H es devuelto al C-1 del sustrato; A⁻ acepta un protón del OH- situado sobre el C-2 generando DHAP.

Los restos implicados en la unión al sustrato y que intervienen en la catálisis pertenecen a la misma subunidad con lo cual habrá dos sitios de unión en total. Inhibidores eficaces para el dímero TIM en su estado natural sin mutación alguna (TIM-WT) son PGH (hidroxamato de fosfoglicol) y PGA (ácido fosfoglicólico) (Wolfwunden, R., 1969; Collins, K. D., 1974.). Con objeto de evaluar la importancia de la dimerización sobre la estabilidad y actividad catalítica de la enzima se incluyó dentro del proyecto la obtención de variantes monoméricas de TIM. En general los monómeros se caracterizan por ser menos estables que la TIM-WT (Jaenicke, R., 1987.; Jaenicke, R., 1996.) ya que el dímero posee fuertes interacciones estabilizantes entre ambas

subunidades. Dichos monómeros permanecen como tales a baja concentración y su actividad catalítica es muy inferior a la TIM-WT con una constante catalítica (K_{cat}) alrededor de 1000 veces. Dos de los monómeros inicialmente obtenidos fueron: H47N-TIM y RE-TIM (Fig. 6.6) ambas variantes se diseñaron sobre la secuencia original de la TIM-WT en la que se realizaron las mutaciones, His 47 Asn en la primera, Thr 75 Arg y Gly 76 Glu en la segunda. Todos los restos mutados están situados en la zona de contacto entre las dos subunidades que componen el homodímero, concretamente en los lazos 2 y 3. Dicha zona de contacto, que en el monómero está expuesta al disolvente, adquiere una mayor movilidad, especialmente el lazo 3 dada su elevada longitud. Así cualquier mutación introducida en estos dos lazos que modifique la movilidad y la polaridad de la cadena lateral debe producir cambios en la estabilidad y solubilidad de la especie. La nueva variante RE-TIM es activa aunque tanto su actividad como su estabilidad son notablemente menores que la especie dimérica TIM-WT así, la temperatura de transición obtenida del análisis de la curva de calentamiento registrada mediante dicroísmo circular (Schliebs, W. et al., 1997) resulta ser inferior (52°C) con respecto a TIM (57°C). Con el fin de aumentar tanto la estabilidad como la actividad del monómero se acortó dicho lazo 3 en 7 restos y se sustituyeron 7 restos más (Ile68Gly, Gly76Asn, Glu77Ala, Val78Asp, Ser79Ala, Pro81Ala, Ile82Ser) con el objetivo de reducir la movilidad del lazo 3. Este nuevo mutante fue denominado Mono-TIM con el que se consiguió aumentar la actividad catalítica aunque su constante, K_{cat} , era 1000 veces inferior a la de TIM-WT. Sobre la secuencia de Mono-TIM se realizaron las mutaciones, F45S y V46S con lo cual se obtuvo un nuevo mutante denominado Mono-SS cuyas propiedades son muy similares a las de Mono-TIM (Borchert, T. V. et al., 1995.; Schliebs, W. et al., 1996.) aunque se ha aumentado la superficie hidrofílica por sustitución de dos residuos hidrofóbicos apolares y por consiguiente, la solubilidad con el fin de obtener mejores cristales dirigidos a su posterior estudio estructural. A partir de la secuencia de Mono-TIM se obtuvieron otros variantes como Mono-L1, Mono-L6, Mono-L8, Mono-L8A10Y, todos ellos encaminados a la modificación del centro activo para aumentar la actividad del monómero y modificar el centro de unión con lo cual se podrían unir otros sustratos.

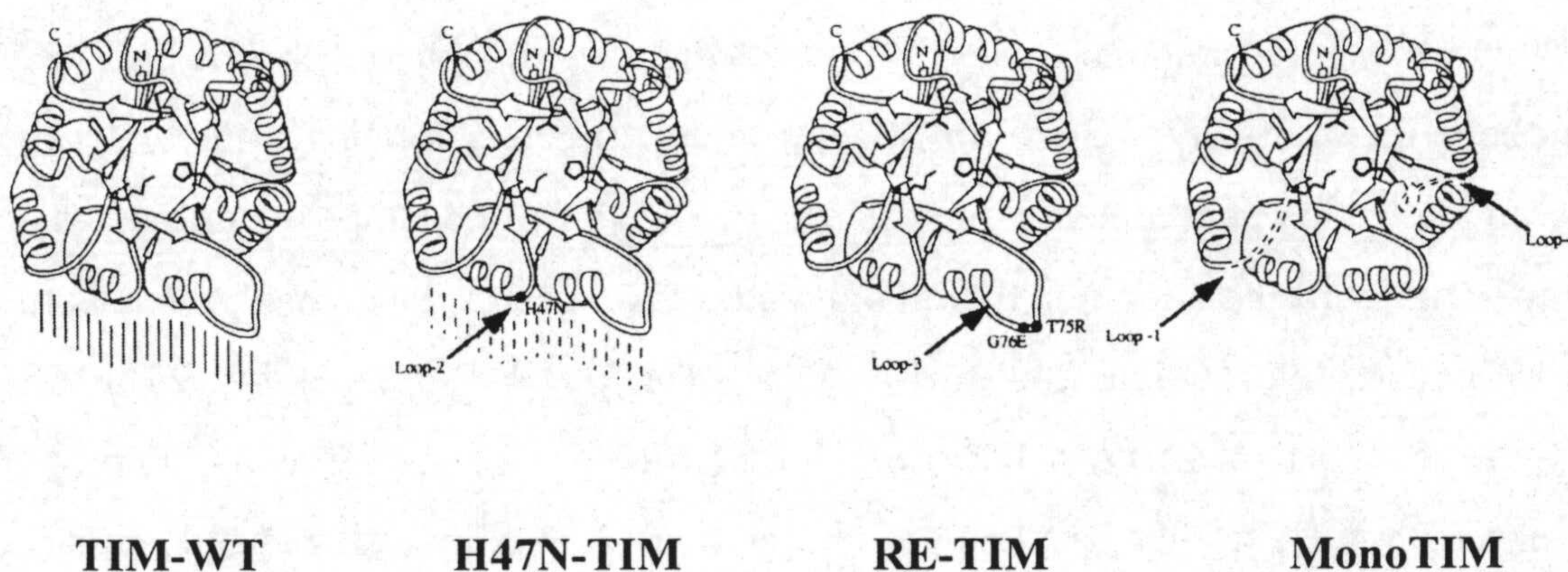


Fig. 6.6.- Variantes monoméricas correspondientes a la enzima TIM. Se destacan las posiciones de los residuos catalíticos, Lys 13 (lazo 1), His 95 (lazo 4) y Glu 167 (lazo 6). Los extremos C-terminal y N-terminal están indicados con C y N respectivamente. También se muestran las mutaciones realizadas en H47N-TIM sobre el lazo 2 y en RE-TIM sobre el lazo 3. La posición aproximada de la interfaz de contacto entre las dos subunidades que componen el dímero se indican por rayas continuas en TIM-WT y discontinuas en el monómero H47N-TIM. Además, se destaca en Mono-TIM, los lazos 1 y 4 para indicar la flexibilidad conformacional de la misma.

Nuestro estudio ha tenido como meta la caracterización de la unión, mediante calorimetría isotérmica de titulación (ITC), de la enzima TIM-WT a uno de sus inhibidores (PGA) así como la unión a una de las variantes monoméricas de esta proteína, Mono-SS, elegido por su mayor solubilidad lo cual facilita la realización del experimento de titulación calorimétrica. De este modo se posibilita la comparación de la unión del inhibidor a las especies dimérica y monomérica verificando la estequiometría y determinando sus parámetros termodinámicos de unión, aún no publicados, y que pueden aportar información útil para caracterizar posteriormente otros variantes de TIM y así conocer mejor los mecanismos de acción de la enzima.

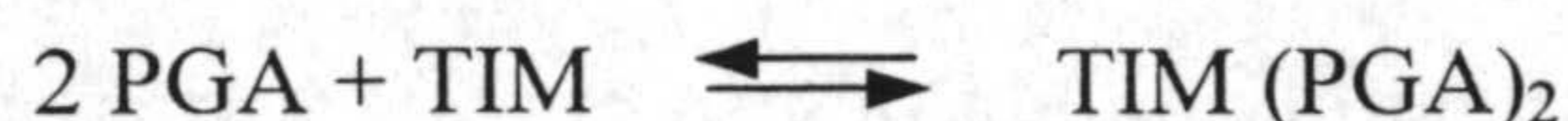
6.2.- Procedimiento experimental.

Los distintos experimentos de calorimetría isotérmica de titulación se realizaron mediante un calorímetro ITC- Ω de la casa comercial MicroCal Inc. (USA) cuyas características han sido detalladas en el apartado de Materiales y Métodos de esta tesis. Las muestras de TIM-WT fueron purificadas en nuestro laboratorio disueltas en tampón

25 mM TEA (Trietanol amina), 1mM DTT, 1 mM EDTA, 1mM N_3Na , 50 mM NaCl, HCl / pH 8.0. El mutante MSS-TIM fue cedido en disolución por Dr. Anne Marie Lambeir (Laboratorio de Bioquímica Médica de Amberes, Bélgica). Los experimentos fueron realizados para ambas proteínas a 15, 25 y 35°C. Los tampones utilizados a cada temperatura y frente a los que fueron dializadas las muestras de dichas proteínas fueron: 25 mM cacodilato sódico, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA HCl / pH 7.0; 25 mM pipes, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA HCl / pH 7.0; 25 mM Tris (Trizma Base), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA HCl / pH 7.0. Las concentraciones de enzima utilizadas se sitúan entre 2.3 – 3.0 mg/mL para TIM-WT y 2.4 - 2.6 mg/mL para MSS-TIM. La determinación de la concentración se realizó espectroscópicamente a 280 nm utilizando los coeficientes de extinción determinados por el método de Stanley, C. G. & von Hippel, P. H., 1989. El coeficiente de extinción para TIM-WT (dimérica) a 280 nm es $\epsilon_{280} = 1.454 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y para MSS-TIM que posee el mismo número de Trp, Cys y Tyr por subunidad que TIM-WT es $\epsilon_{280} = 1.500 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. El peso molecular de TIM-WT es 53614 Da y el de MSS-TIM 25973 Da. El inhibidor PGA fue disuelto en los mismos tampones que se utilizaron para ambas proteínas. Su concentración, dado que no es posible determinarlo espectroscópicamente, se determinó por pesada teniendo en cuenta que su peso molecular es de 453.6 g/mol. Las concentraciones de PGA según el diseño del experimento osciló entre 15 y 25 mM tanto en los experimentos realizados con TIM-WT como con su variante monomérico MSS-TIM. El volumen de muestra contenido en la célula de reacción del calorímetro es de 1.3477 μL según el manual del aparato. Los volúmenes inyectados de inhibidor sobre la célula de reacción conteniendo bien, el tampón de muestra en el caso de la determinación del calor de dilución del inhibidor o bien conteniendo la proteína si se trata de la determinación del calor de unión inhibidor-enzima fue en todos los casos variable según el perfil de volúmenes diseñado entre 1 y 20 μL repartidos en 16 inyecciones en el caso de TIM-WT y 15 inyecciones en el caso de MSS-TIM.

6.3.- Análisis microcalorimétrico de la unión del ácido fosfoglicólico, PGA, a Triosafosfato Isomerasa natural (TIM).

El objeto del análisis que se describe a continuación es la caracterización termodinámica completa del proceso de interacción entre el inhibidor PGA y la especie natural de la enzima dimérica TIM:



La caracterización se ha realizado mediante experimentos de titulación calorimétrica de alta sensibilidad en un microcalorímetro ITC Omega de MicroCal Inc., descrito en Materiales y Métodos de esta memoria.

Realizados algunos experimentos preliminares, que nos informaron sobre el orden de magnitud de la afinidad de esta reacción y del cambio de entalpía correspondiente, se utilizó un programa de simulación, implementado en MATHCAD 8 y desarrollado por el Dr. López Mayorga, con objeto de optimizar las condiciones experimentales y distribuir homogéneamente los puntos de la curva de unión. La variable independiente utilizada para la optimización es el volumen de inyección correspondiente a cada punto. El diseño convencional de un experimento de titulación microcalorimétrica selecciona y fija, entre otros importantes parámetros, un número de inyecciones con idéntico volumen de la disolución de ligando sobre la disolución de macromolécula. Como hemos mostrado en Materiales y Métodos, figura 2.15, cuando el producto $K.[M]_T$ es adecuado es fácil obtener una curva de valoración calorimétrica sigmoideal y el ajuste por regresión no lineal correspondiente nos proporciona parámetros con un error estándar aceptable. Cuando el producto $K.[M]_T$ no es tan favorable, no es fácil obtener una curva completa de unión manteniendo constante el volumen de cada inyección; el ajuste de curvas de unión incompletas o sesgadas proporciona parámetros afectados de un elevado error y dependencia mutua. El sistema PGA-TIM, dada la pequeña solubilidad y el valor no muy grande de la constante de asociación, no es fácil de valorar calorimétricamente pudiendo decirse que le caracteriza un valor $K.[M]_T$ algo desfavorable. Por esta razón se ha prestado especial atención al diseño del experimento utilizándose un perfil óptimo de volúmenes de inyección; es decir se usan diferentes volúmenes para cada punto de la valoración, siendo en general menores en las primeras inyecciones y aumentando progresivamente de forma no lineal. Otro beneficio al usar el perfil óptimo de volúmenes de inyección es la mejora de la relación señal / ruido en la parte final de la curva, donde los calores son muy pequeños;

puesto que en la región próxima a la saturación completa de la macromolécula la derivada de la curva de unión, y por consiguiente el incremento de moles de ligando unidos para un incremento dado de la concentración total de ligando, es pequeña, conviene aumentar los volúmenes de las inyecciones. Este efecto, no obstante puede ser contraindicado si el calor de dilución del ligando o el artefacto de inyección es muy grande. Con objeto de resolver la interferencia de la ionización del tampón e incluir como parámetro a determinar el número de protones tomados o cedidos por el complejo ML_n en su formación, se ha procedido a titular la TIM con PGA en tres tampones de muy diferente calor de ionización, Cacodilato ($\Delta H_i = 0.20$ kcal/mol), Pipes ($\Delta H_i = 2.74$ kcal/mol) y Tris ($\Delta H_i = 11.45$ kcal/mol). Para cada tampón los experimentos de titulación se han repetido a tres temperaturas, 15, 25 y 35 °C, suficientemente pequeñas para no inducir cambios conformacionales detectables, pero que nos permiten evaluar el cambio de capacidad calorífica que acompaña a la formación del complejo TIM-PGA. Las condiciones experimentales se detallan en la tabla 6.1, donde se especifica la temperatura de trabajo, la composición del tampón, la concentración inicial de la proteína en la célula microcalorimétrica y las concentración del ligando en la jeringa de inyección.

Tabla 6.1.- Condiciones experimentales para las titulaciones TIM +PGA.

[M]: Concentración inicial de TIM; [L]: Concentración de PGA.

T (°C)	Tampón	[M] (M)	[L] (mM)
15,0	Cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$4,46 \cdot 10^{-5}$	10,1
15,0	Pipes 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$4,50 \cdot 10^{-5}$	10,1
15,0	Tris 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$4,60 \cdot 10^{-5}$	10,0 ₅
25,0	Cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$4,60 \cdot 10^{-5}$	10,0
25,0	Pipes 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$4,43 \cdot 10^{-5}$	10,0
25,0	Tris 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7,0	$4,6 \cdot 10^{-5}$	10,0
35,0	Cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$4,00 \cdot 10^{-5}$	25,0
35,0	Pipes 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$4,82 \cdot 10^{-5}$	25,0
35,0	Tris 25mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$4,80 \cdot 10^{-5}$	25,0

En el diagrama de flujo de la figura 6.7 se muestra el método usado en la titulación y obtención subsiguiente de los parámetros termodinámicos de la interacción PGA-TIM, para el caso particular del tampón Tris. El mismo procedimiento se ha utilizado con los otros tampones. Las disoluciones de TIM se dializan a 4 °C frente a los tampones indicados en la tabla 6.1. Cada tampón de diálisis se utiliza como disolvente para el PGA, de forma que en los experimentos de titulación los disolventes sean lo más idénticos posible. En un experimento completo se deben obtener normalmente dos termogramas; el principal corresponde a la titulación de la proteína con el ligando y un segundo de titulación del ligando con el tampón de la diálisis, tal como se indica en el diagrama de la figura 6.7. Este último, que representa los calores de la fuerte dilución del ligando y los artefactos de inyección, debe sustraerse del termograma principal para obtener los efectos térmicos netos de la interacción macromolécula-ligando. Además es aconsejable obtener un tercer termograma correspondiente a la titulación de la proteína con el tampón de la diálisis, que representaría los calores de dilución de la proteína; aunque normalmente, dado el pequeño valor del volumen de inyección, pocos μL , frente al volumen de la célula, aproximadamente 1 mL, no suelen ser detectables. No obstante, conviene verificar al menos en un experimento puntual que no se producen efectos inesperados y que realmente no existen calores detectables.

En la figura 6.8 se muestran los termogramas de la interacción PGA-TIM y de la dilución del PGA en el tampón cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, a pH =7.0 y a la temperatura de 15 °C. Se ha corregido interactivamente la línea base en cada caso utilizando 100 puntos para definirla. El termograma de dilución del PGA se ha desplazado en el eje vertical + 0.5 $\mu\text{cal/s}$ en aras de la claridad en la representación gráfica, y se observa una buena sincronización de las señales, así como una velocidad del proceso de dilución mayor que la de consecución del equilibrio de formación del complejo ML_n . El perfil de volúmenes de inyección optimizado en el programa de simulación consiste en una secuencia de 16 inyecciones separadas 9 minutos y con los valores de 1.2, 1.5, 1.8, 2.2, 2.7, 3.3, 4.1, 5.1, 6.2, 7.6, 9.2, 11.1, 13.1, 15.4, 17.8 y 20.3 μL . El termograma de dilución de la proteína (no mostrada en la figura) solo contenía los artefactos de inyección esperados sin detectarse efectos térmicos de dilución la proteína. En la gráfica C de esta figura se muestra el termograma neto obtenido al sustraer el termograma B del A.

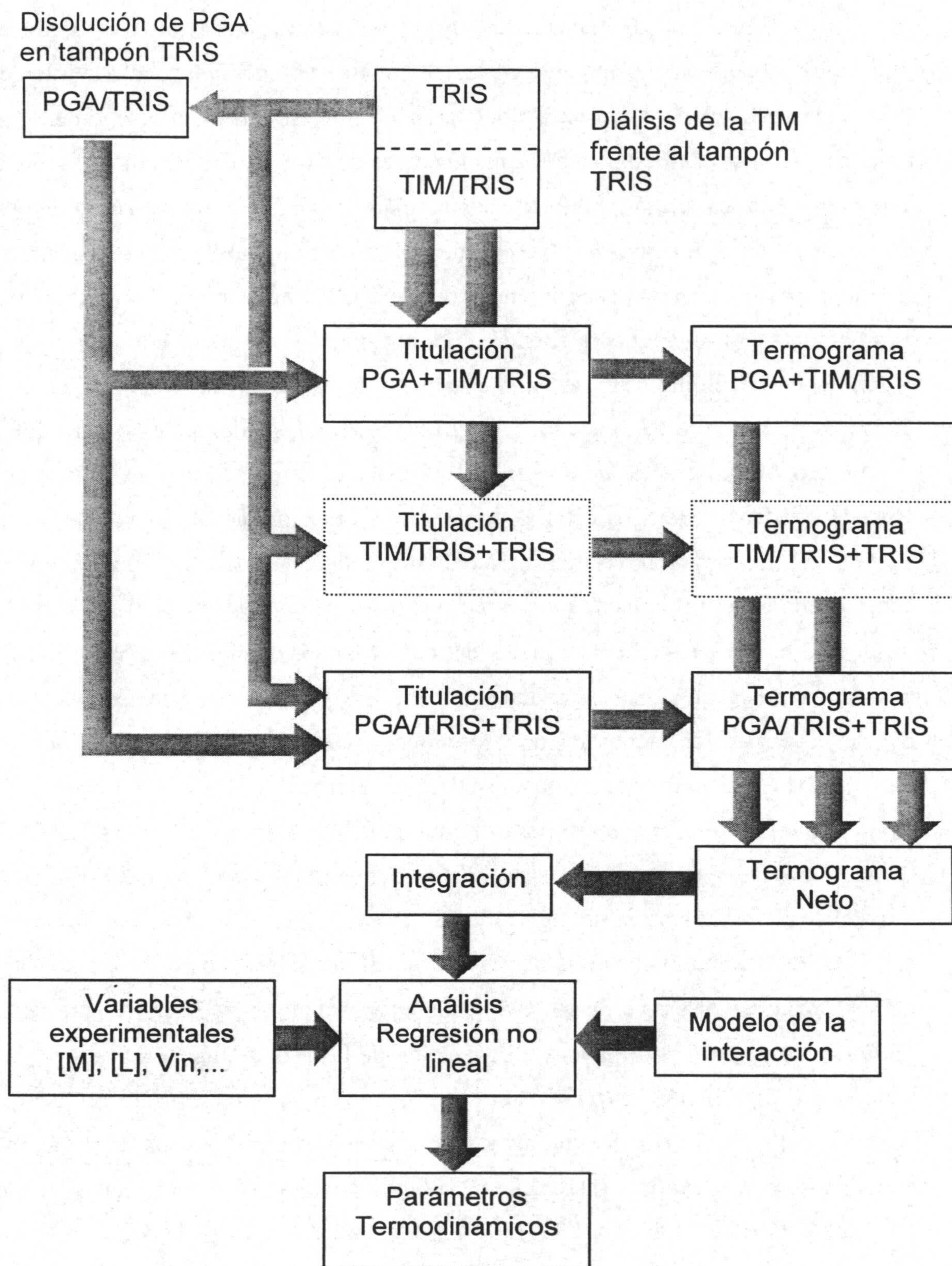


Figura 6.7.- Diagrama del proceso utilizado para caracterizar termodinámicamente, mediante ITC, la interacción PGA-TIM. Caso particular del tampón TRIS.

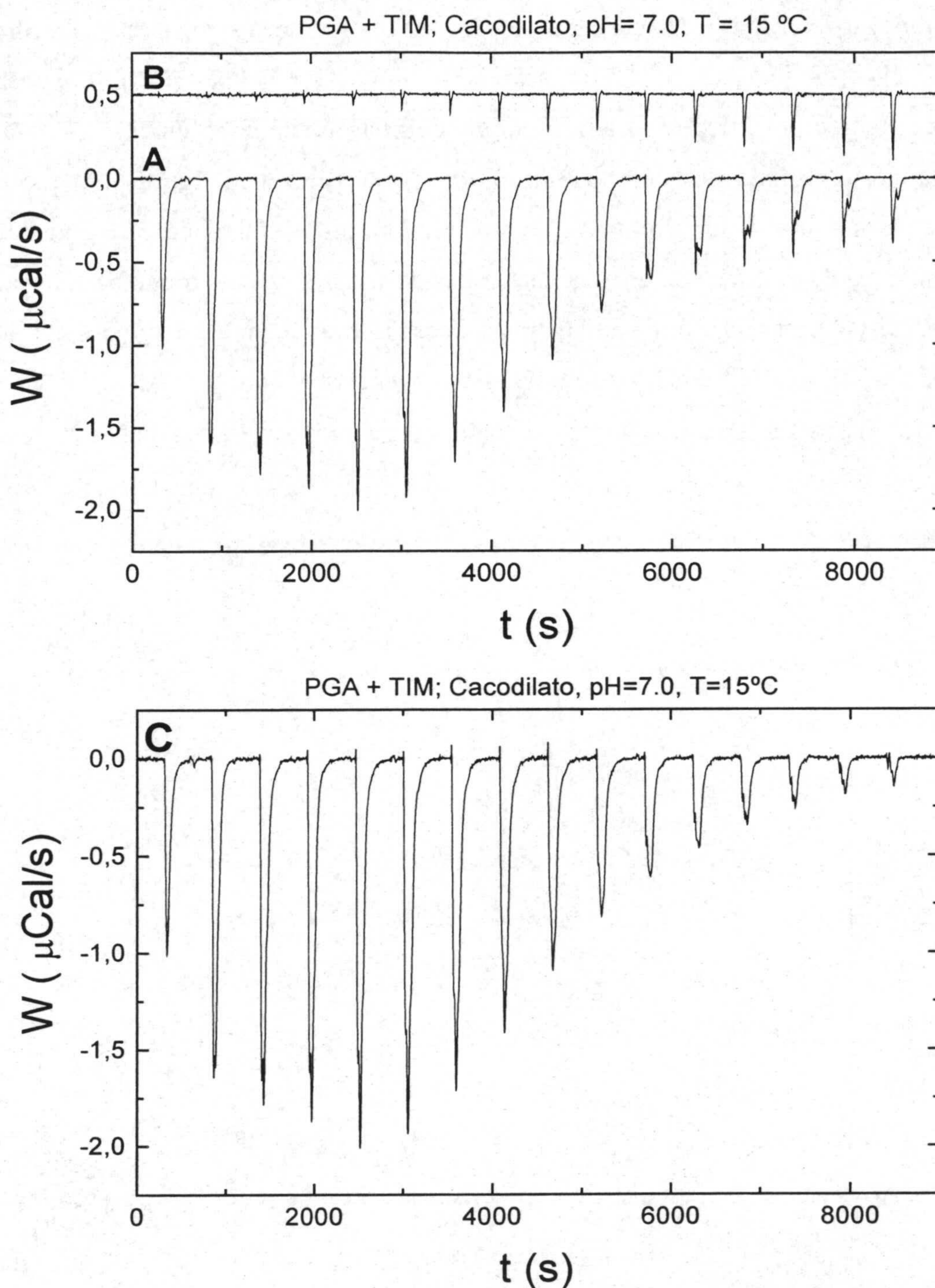


Figura 6.8.- A: Termograma de la interacción PGA-TIM (una vez sustraída la línea base) en un tampón cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, a pH = 7.0 y a la temperatura de 15 °C. Los volúmenes de inyección son 1.2, 1.5, 1.8, 2.2, 2.7, 3.3, 4.1, 5.1, 6.2, 7.6, 9.2, 11.1, 13.1, 15.4, 17.8 y 20.3 μL . **B:** Termograma de dilución del PGA con el tampón cacodilato (una vez sustraída la línea base y desplazado + 0.5 $\mu\text{cal/s}$). **C:** Termograma neto sustrayendo el termograma B del A.

El termograma neto se integra para obtener los calores correspondientes. La integración puede realizarse para cada pico individualmente, estableciendo los límites de integración en la línea base que precede y sigue al pico particular; no obstante nosotros optamos por integrar el termograma completo obteniendo un calor acumulado como función continua del tiempo, tal como se muestra en la figura 6.9, que es el resultado de integrar el termograma C. Esta función, si las líneas base se han trazado correctamente, debe consistir en una secuencia de escalones con tramos horizontales; cualquier desviación sistemática de las líneas bases introduce un error importante que se manifiesta en inclinaciones de los tramos entre inyecciones consecutivas. Promediando (≈ 100 puntos) estos tramos obtenemos el calor acumulado Q después de N inyecciones; los calores asociados a cada inyección particular, ΔQ , se obtienen por la diferencia $Q_{i+1} - Q_i$.

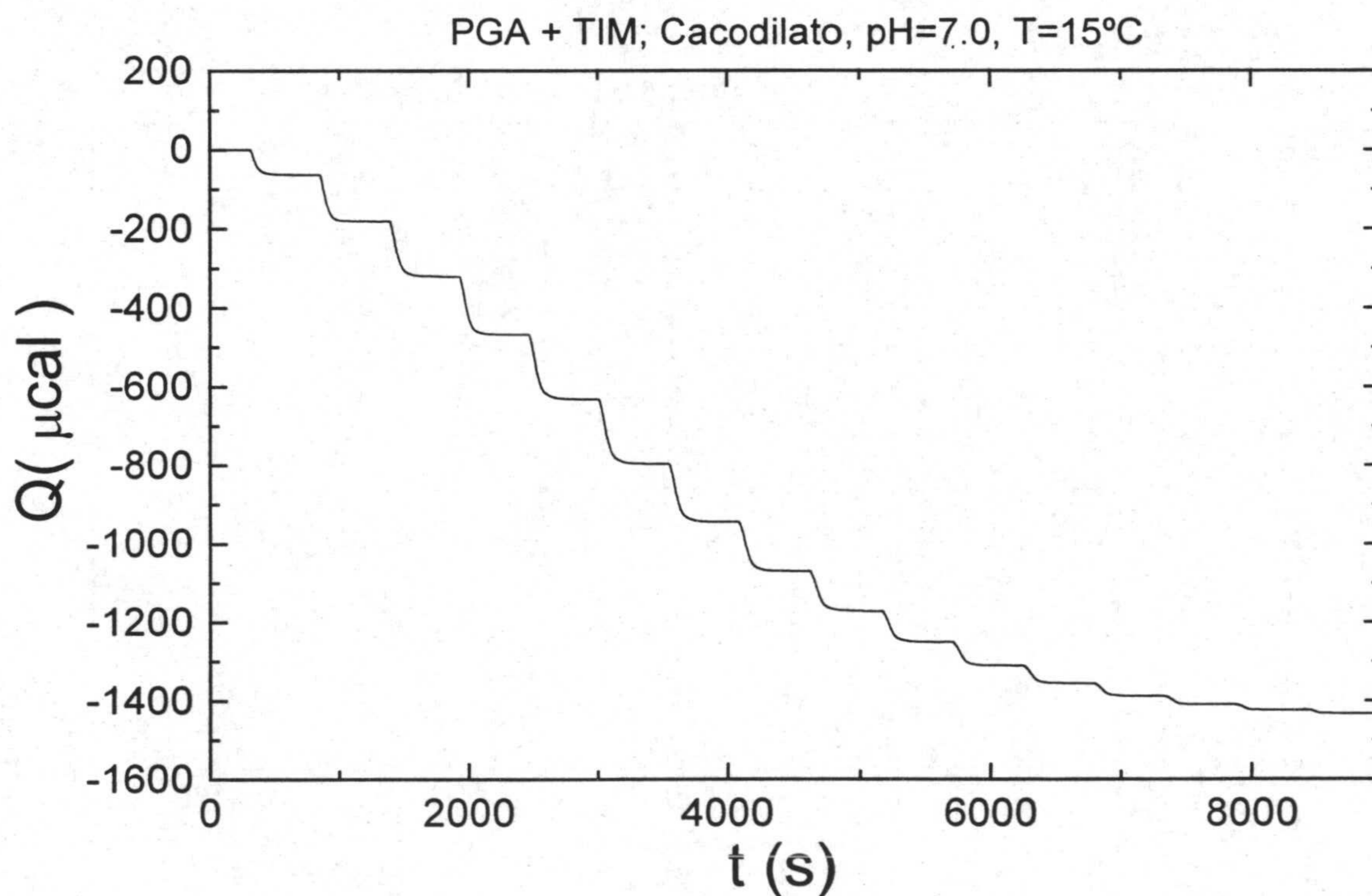


Figura 6.9.- Función integral del termograma neto de la interacción PGA-TIM en tampón cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, a pH = 7.0 y a la temperatura de 15 °C.

Las ecuaciones 2.43 y 2.45 del modelo de unión a sitios idénticos e independientes pueden utilizarse como funciones para la regresión no lineal y, si el ajuste es convergente y no refleja una desviación sistemática de los *residuos* (diferencias entre los valores experimentales y los predichos por el modelo), obtenemos los parámetros n , K y ΔH de la interacción. Las figuras 6.10 y 6.11 muestran los resultados de la regresión no lineal, para el experimento mostrado en la figura 6.8, de los calores acumulados y los calores por mol de ligando añadido en cada inyección, respectivamente.

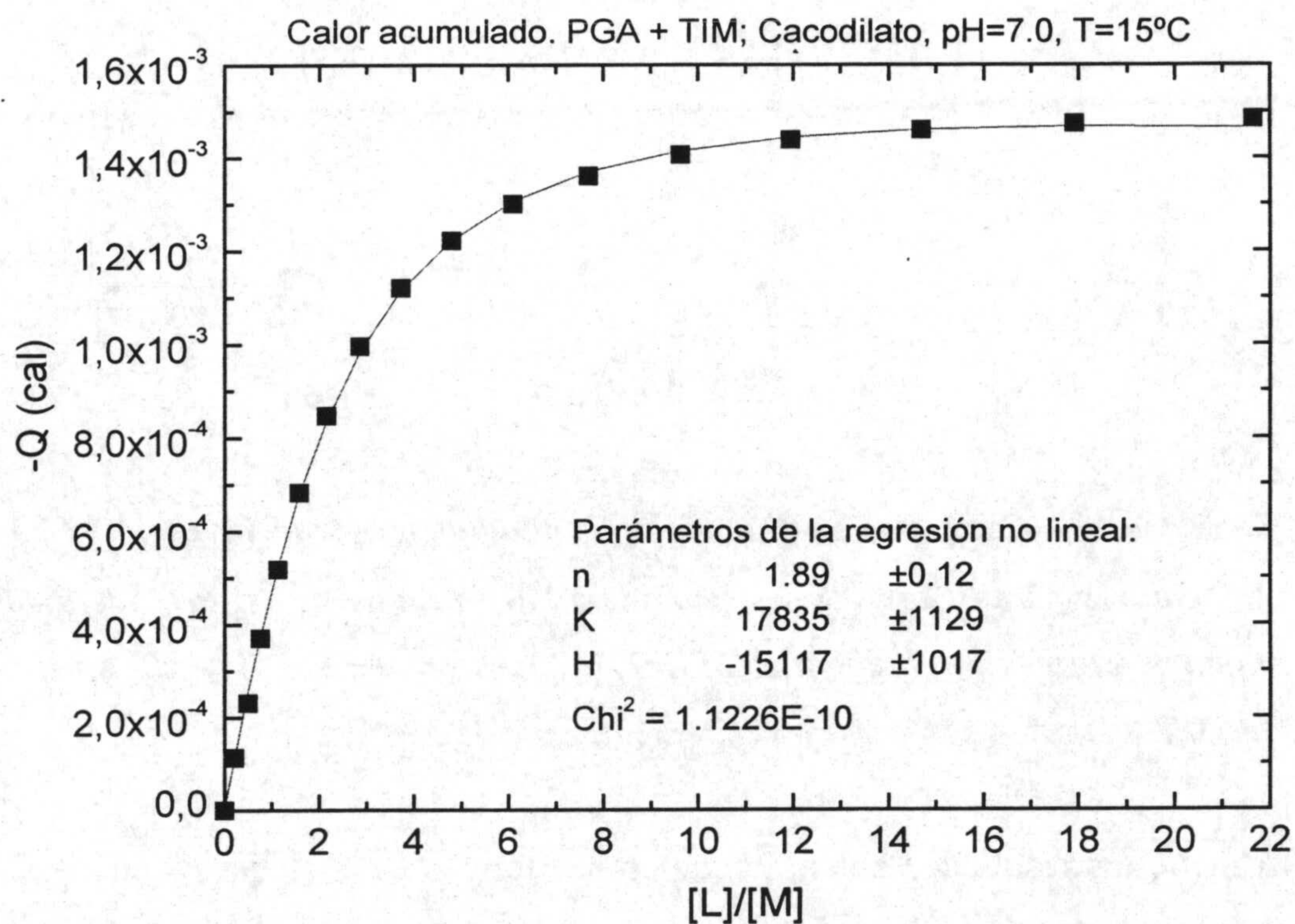


Figura 6.10.- Calores acumulados experimentales (\square) y la curva de calores predichos por el modelo de unión de sitios idénticos e independientes, para la interacción PGA-TIM a en tampón cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, a pH = 7.0 y a la temperatura de 15 °C.

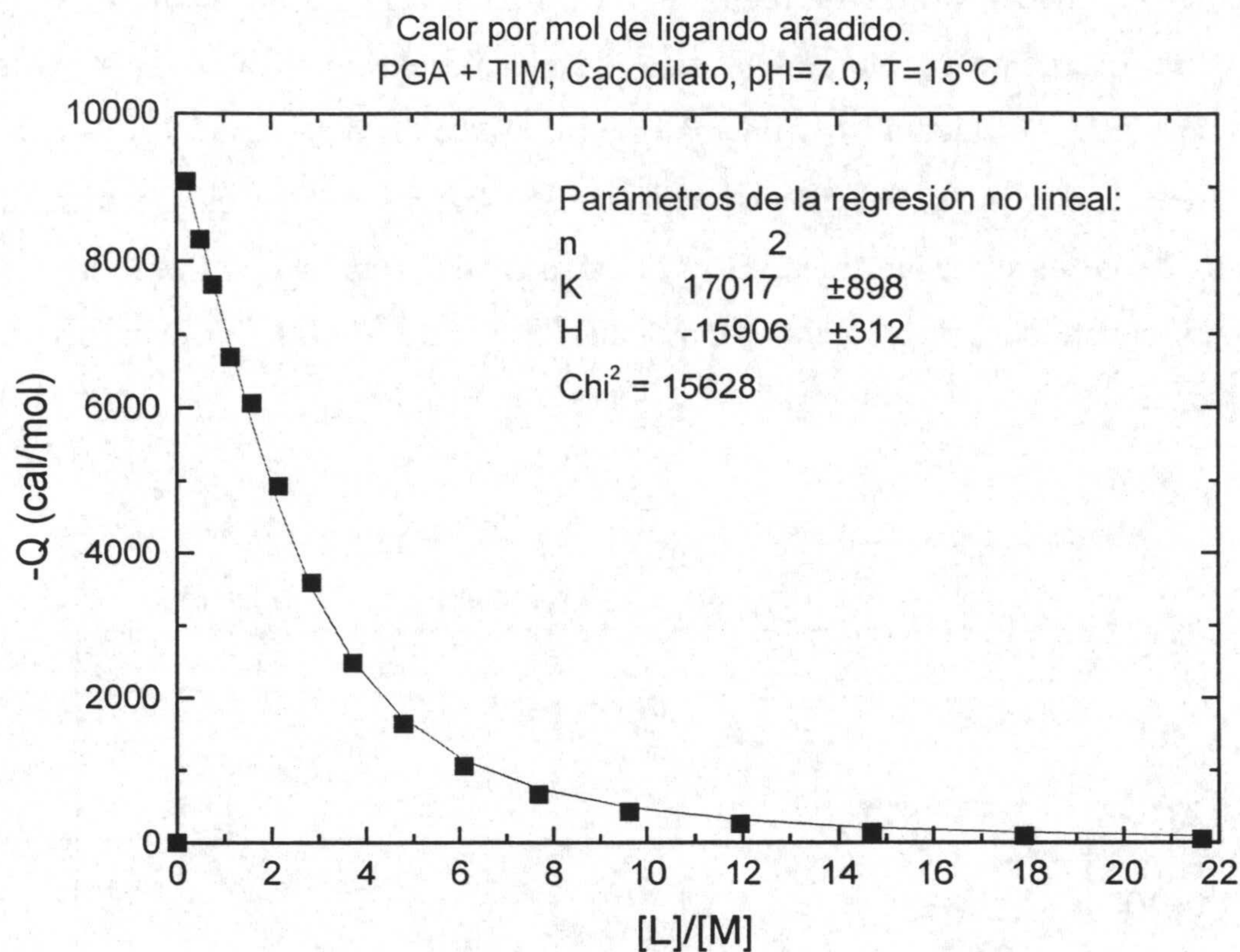


Figura 6.11.- Calor por mol de ligando añadido en cada inyección (∞) y la curva de calores predichos por el modelo de unión de sitios idénticos e independientes, para la interacción PGA-TIM a en tampón cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, a pH = 7.0 y a la temperatura de 15 °C.

Aunque los resultados obtenidos con ambas formas de analizar los termogramas son en general concordantes, nosotros optamos por utilizar la segunda forma, es decir el de calor por mol añadido en cada inyección, porque los calores en la primera forma se propagan acumulativamente y un error accidental importante en uno cualquiera de los puntos impediría el análisis, mientras que en la segunda forma se puede prescindir si fuera necesario de cualquiera de los puntos.

Se dispone de tres juegos de datos para cada temperatura, cada uno obtenido en un tampón diferente. Dos análisis alternativos de los datos son: 1º) Ajustar por regresión no lineal los juegos individuales de datos con la ecuación 2.45, con lo que obtendríamos el valor particular de los parámetros n, K y un cambio de entalpía aparente, ΔH_{ap} , y obtener la verdadera entalpía de la interacción de la ordenada en el origen de la regresión lineal de los valores de ΔH_{ap} frente a la entalpía de ionización del tampón correspondiente, es decir extrapolando linealmente a calor de ionización del tampón

nulo; 2º) Ajuste simultáneo o múltiple de los tres juegos de datos a cada temperatura, utilizando la ecuación 2.49 cuyos parámetros de ajuste son la estequiometría, n , la constante de unión, K , el número de moles de protones por mol de ligando unido tomados o cedidos por el complejo ML_n , p , y la entalpía de unión por mol de ligando unido, ΔH_b . Nosotros hemos optado por esta segunda alternativa.

El mejor ajuste simultáneo se ha obtenido estableciendo n , p y ΔH_b como parámetros compartidos entre los tres juegos de datos, mientras que la constante de unión K se establece como particular. Así en la figura 6.12 se muestra el resultado del ajuste simultáneo del juego de datos a la temperatura de 15 °C, habiéndose fijado como constante el número de sitios de unión para el ligando $n = 2$ confirmado por los ajustes individuales y coherente con el estado dimérico que, bajo las condiciones experimentales usadas, caracteriza a la TIM natural.

En la tabla 6.2 resumimos los resultados del proceso de optimización de los parámetros de la interacción que estamos estudiando. Como hemos mencionado anteriormente para cada temperatura los mejores ajustes se han obtenido dejando variar la constante K independientemente para cada tampón; así en la mencionada tabla aparecen tres valores de este parámetro que no muestran una tendencia definida y cuya dispersión es consecuencia, principalmente, del desfavorable valor del producto $K \cdot [M]_T$ impuesto por la baja solubilidad de la proteína. Adoptamos para cada temperatura el valor medio como valor final del parámetro K , indicado en la tabla como $\langle K \rangle$. Tanto el ajuste individual como el ajuste global dan un resultado anormalmente elevado para K en el experimento a 35 °C en TRIS. La muestra correspondiente extraída de la célula calorimétrica mostraba una muy tenue turbidez indicando la existencia de agregación que puede ser la causa del valor anómalo de K . Por ello se ha descartado este juego de datos y el ajuste simultáneo a 35 °C solo incluye los dos experimentos en los tampones Cacodilato y PIPES.

En la figura 6.13 se muestra una representación tridimensional del conjunto completo de datos y los ajustes correspondientes.

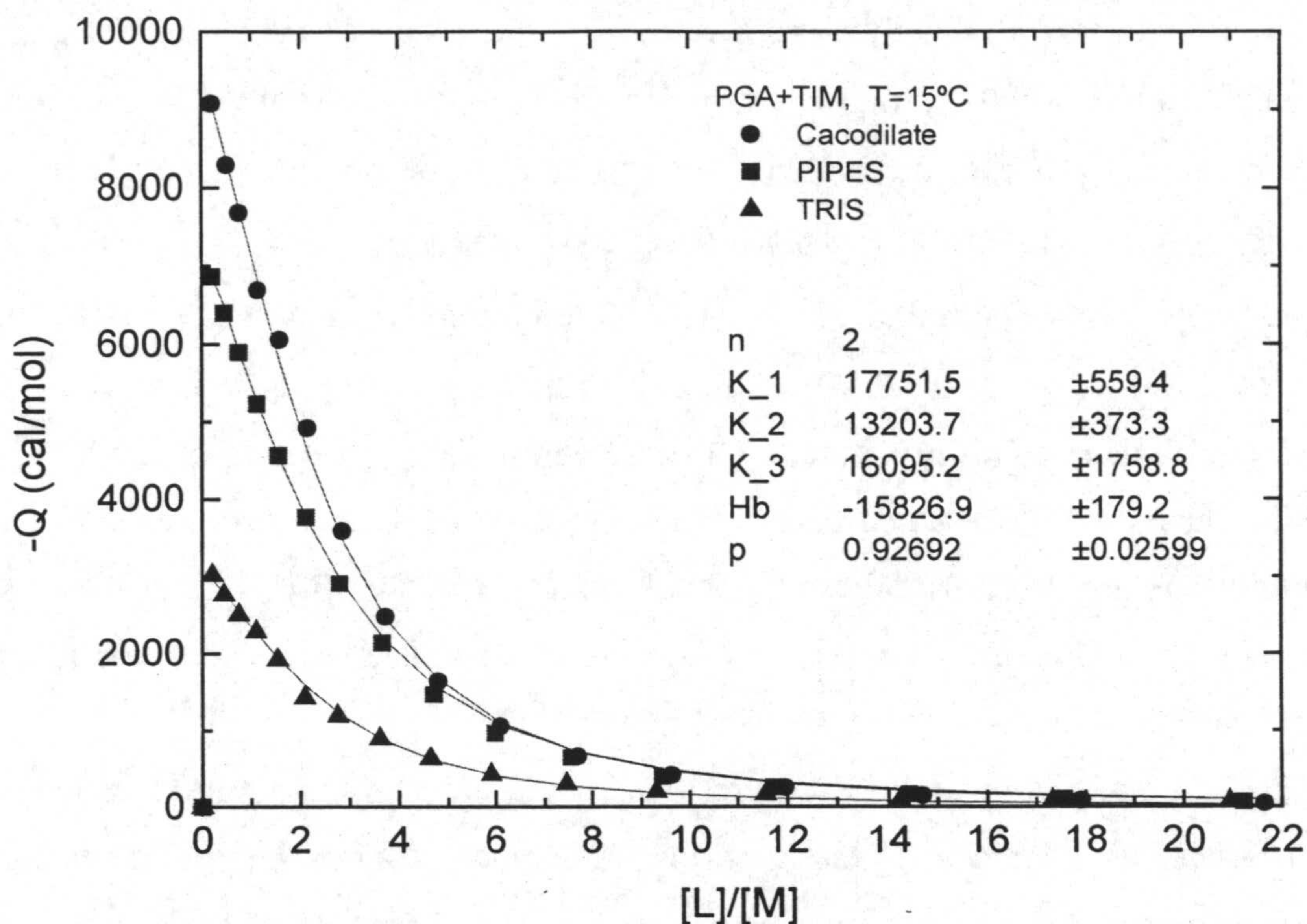


Figura 6.12.- Ajuste simultáneo de los tres juegos de calores por mol de ligando añadido en cada inyección, para la interacción PGA-TIM, obtenidos en los tampones especificados en el texto de la gráfica. En el proceso de regresión no lineal múltiple se ha fijado el valor del parámetro $n = 2$ y se declaran compartidos los parámetros p y ΔH_b , mientras que se dejan variar independientemente la constante K para cada juego de datos.

Tabla 6.2.- Parámetros del ajuste por regresión no lineal simultánea de los tres juegos de datos, a cada temperatura, obtenidos en los tampones Cacodilato (1), Pipes (2) y Tris (3). El número de sitios de unión para el ligando se ha fijado como una constante $n = 2$.

T (°C)	K ₁ (M ⁻¹)	K ₂ (M ⁻¹)	K ₃ (M ⁻¹)	<K> (M ⁻¹)	p	ΔH _b (cal.mol ⁻¹)
15	17752 ±559	13204±373	16095±1759	15684±628	0.93±0.02	-15827±179
25	7784±347	8968±398	6322±1038	7691±388	0.78±0.05	-13461±289
35	5290±184	4437±180	-----	4863±129	0.87±0.03	-12534±236

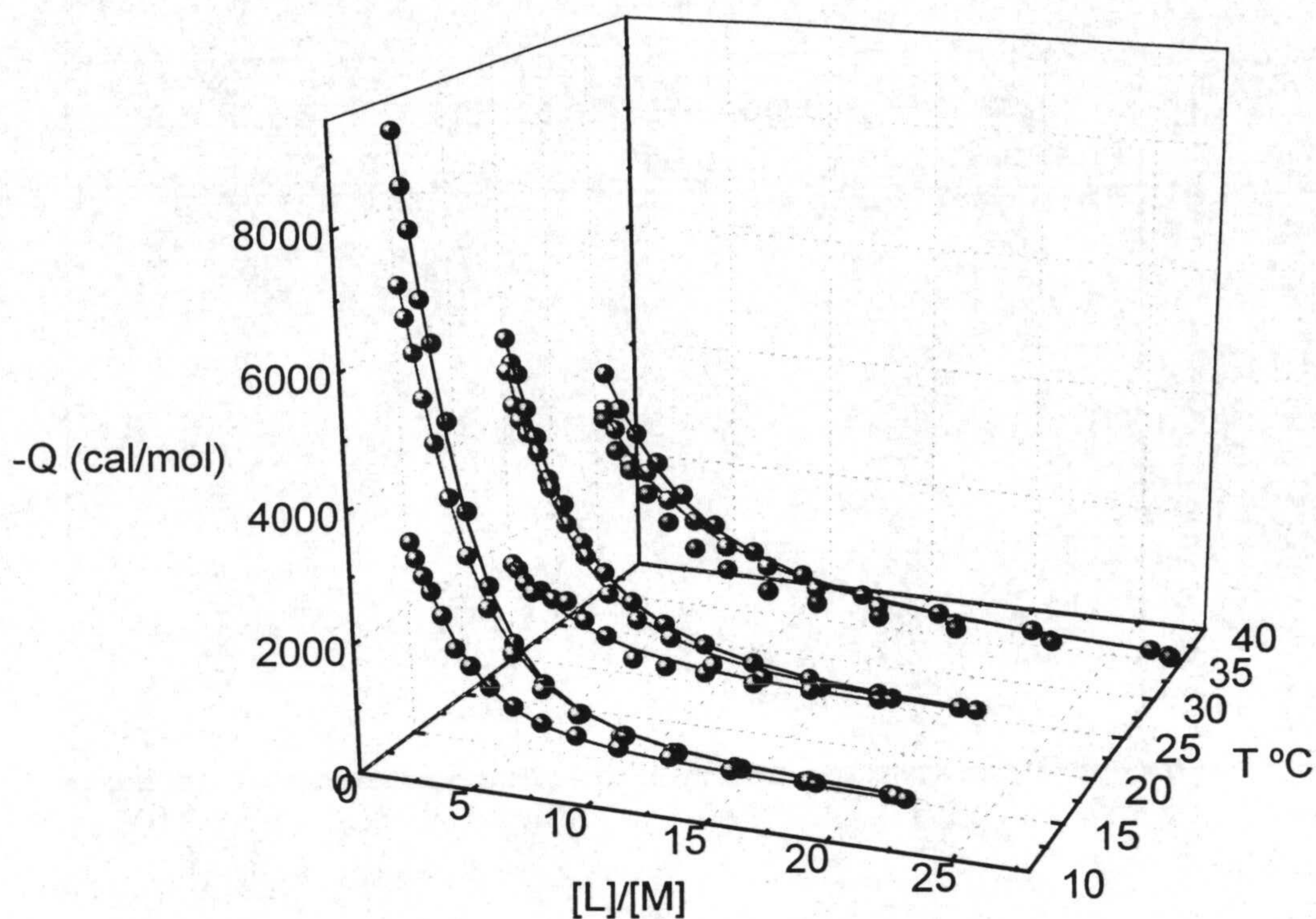


Figura 6.13.- Conjunto completo de los datos experimentales para la interacción PGA-TIM y ajuste simultáneo, a las temperaturas 15, 25 y 35 °C, de los tres juegos de calores por mol de ligando añadido en cada inyección, obtenidos en los tampones Cacodilato (color negro), PIPES (color rojo) y TRIS (color azul).

La entalpía de la interacción presenta una dependencia pequeña con la temperatura lo que nos permite estimar un cambio de capacidad calorífica a presión constante asociado a la unión del PGA a la TIM. En la figura 6.14 se muestra la regresión lineal de los valores de entalpía frente a T, obteniéndose de la pendiente el valor $\Delta C_p = 165 \pm 41 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. En la tabla 6.3 se completa el conjunto de parámetros termodinámicos que se obtienen a partir de los datos de la tabla 6.2 haciendo uso de las ecuaciones fundamentales $\Delta G^0 = -RT \ln K$ y $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$.

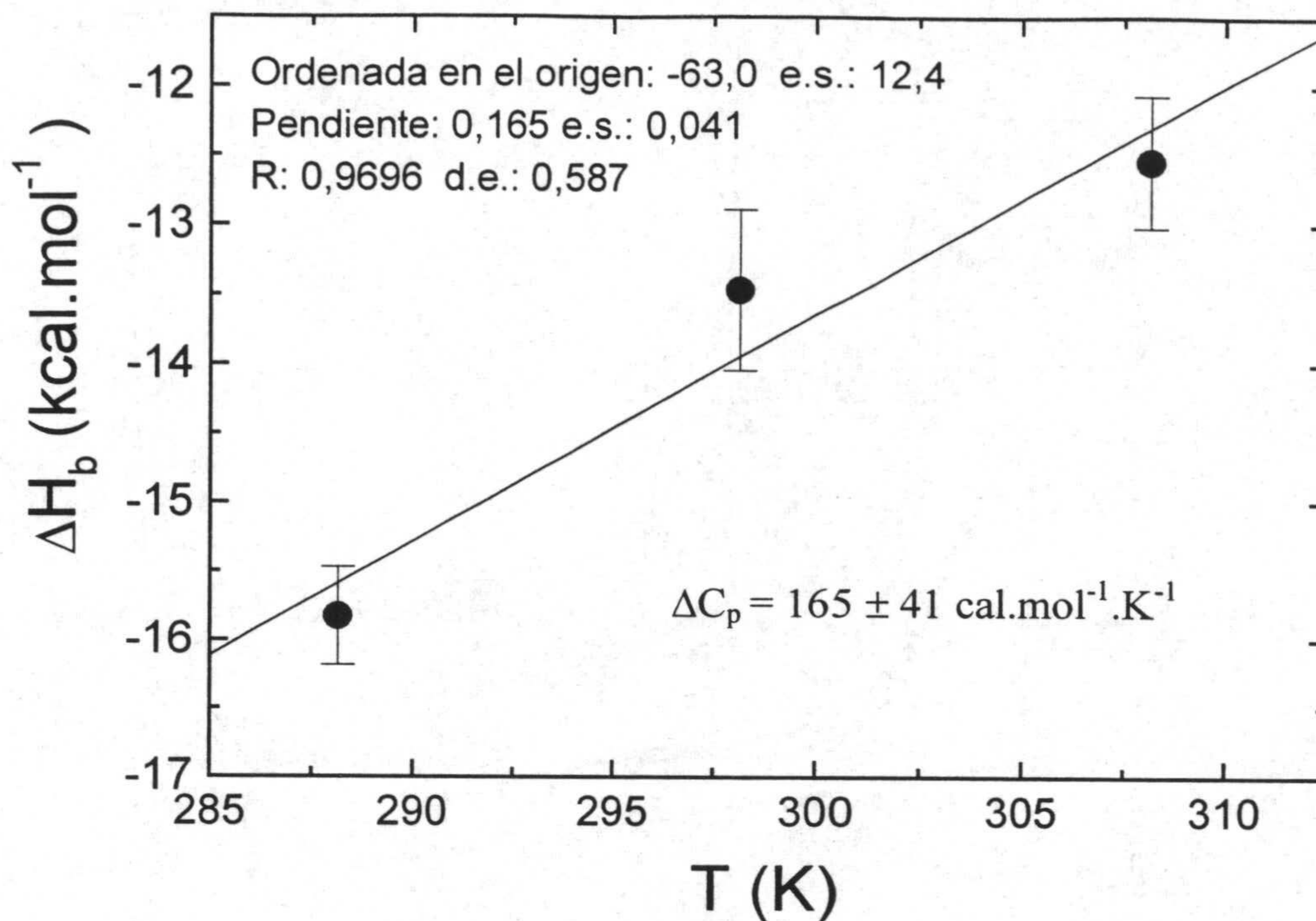


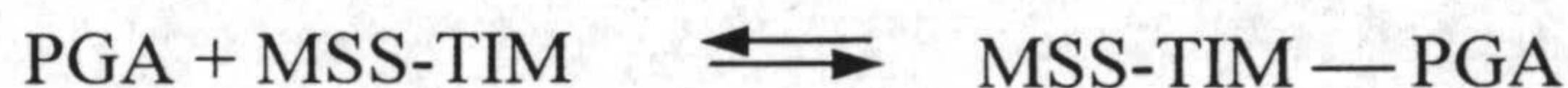
Figura 6.14.- Dependencia con la temperatura del cambio de entalpía asociado a la unión del PGA a la TIM. La amplitud de las barras de error de los puntos corresponden al doble del error estándar con que se obtienen las entalpías indicado en la tabla 6.2. De la pendiente se obtiene el valor $\Delta C_p = 165 \pm 41 \text{ cal} . \text{mol}^{-1} . \text{K}^{-1}$.

Tabla 6.3.- Parámetros termodinámicos aparentes de la interacción PGA-TIM a pH = 7.0.

Parámetros termodinámicos	15 °C	25 °C	35 °C
$k_b \cdot 10^{-3} (\text{M}^{-1})$	$15,7 \pm 0,6$	$7,7 \pm 0,4$	$4,9 \pm 0,1$
$\Delta H_b (\text{kcal.mol}^{-1})$	$-15,83 \pm 0,18$	$-13,46 \pm 0,29$	$-12,53 \pm 0,24$
$\Delta G^0 (\text{kcal.mol}^{-1})$	$-5,53 \pm 0,02$	$-5,30 \pm 0,03$	$-5,20 \pm 0,01$
$\Delta S^0 (\text{cal.K}^{-1}\text{mol}^{-1})$	$-35,74 \pm 0,62$	$-27,37 \pm 0,97$	$-23,80 \pm 0,78$
$\Delta C_p = 165 \pm 41 (\text{cal} . \text{K}^{-1} . \text{mol}^{-1})$			

6.4.- Análisis microcalorimétrico de la unión del ácido fosfoglicólico, PGA, a la variante monomérica de la Triosafosfato Isomerasa MSS-TIM.

Como en el análisis realizado en el apartado anterior el objetivo es la caracterización termodinámica completa del proceso de interacción entre el inhibidor PGA y en el caso que ahora abordamos una especie mutada monomérica de la TIM, MSS-TIM:



El procedimiento analítico seguido es idéntico al caso anterior, por lo que nos limitamos a resumir las diferencias en las condiciones experimentales y los resultados del procesamiento global.

Las condiciones experimentales se detallan en la tabla 6.3, donde como en el caso anterior se especifica la temperatura de trabajo, la composición del tampón, la concentración inicial de la proteína en la célula microcalorimétrica y las concentración del ligando en la jeringa de inyección.

Tabla 6.3.-Condiciones experimentales para las titulaciones MSS-TIM + PGA.
[M]: Concentración inicial de MSS-TIM; [L]: Concentración de PGA.

T °C	Tampón	[M] (M)	[L] (mM)
15,0	Cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$9,80 \cdot 10^{-5}$	14,99
15,0	Pipes 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$1,00 \cdot 10^{-4}$	15,08
15,0	Tris 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$1,00 \cdot 10^{-4}$	15,08
25,0	Cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$9,74 \cdot 10^{-5}$	15,0
25,0	Pipes 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$1,00 \cdot 10^{-4}$	15,0
25,0	Tris 25 mM NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$9,62 \cdot 10^{-5}$	15,0
35,0	Cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$9,09 \cdot 10^{-5}$	15,0
35,0	Pipes 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$1,05 \cdot 10^{-4}$	15,0
35,0	Tris 25mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, pH=7.0	$1,05 \cdot 10^{-4}$	15,0

En la figura 6.15 se muestran los termogramas de la interacción PGA + MSS-TIM y de la dilución del PGA en el tampón cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, a pH = 7.0 y a la temperatura de 15 °C. El procesamiento de los datos se ha realizado tal y como se ha explicado para el caso precedente; la única diferencia está en el perfil de volúmenes de inyección optimizado por el programa de simulación que consiste ahora en una secuencia de 15 inyecciones separadas 9 minutos y con los valores de 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 12.0 μL . Como en el caso anterior la gráfica C de esta figura corresponde al termograma neto obtenido al sustraer el termograma B del A.

Aquí también hemos optado por el ajuste simultáneo o múltiple de los tres juegos de datos a cada temperatura, utilizando la ecuación 2.49. Y análogamente el mejor ajuste simultáneo se ha obtenido estableciendo n , p y ΔH_b como parámetros compartidos entre los tres juegos de datos, mientras que la constante de unión K se establece como específica de cada juego de datos. Así en la figura 6.16 se muestra el resultado del ajuste simultáneo del juego de datos a la temperatura de 15 °C, habiéndose fijado como constante el número de sitios de unión para el ligando $n = 1$ confirmado por los ajustes individuales y coherente con el estado monomérico de la variante MSS-TIM.

En la tabla 6.4. resumimos los resultados del proceso de optimización de los parámetros de la interacción que estamos estudiando, y aquí también adoptamos para cada temperatura el valor medio como valor final del parámetro K , indicado en la tabla como $\langle K \rangle$.

Con el experimento a 35 °C en el tampón TRIS se ha observado un comportamiento similar al caso de la WT-TIM, siendo mayor la turbidez observada en la muestra extraída de la célula calorimétrica, indicando mas claramente la existencia de agregación. Por ello también se descarta este juego de datos y el ajuste simultáneo a 35 °C solo incluye los dos experimentos en los tampones Cacodilato y PIPES.

En la figura 6.17 se muestra una representación tridimensional análoga a la figura 6.13 del conjunto completo de datos y los ajustes correspondientes.

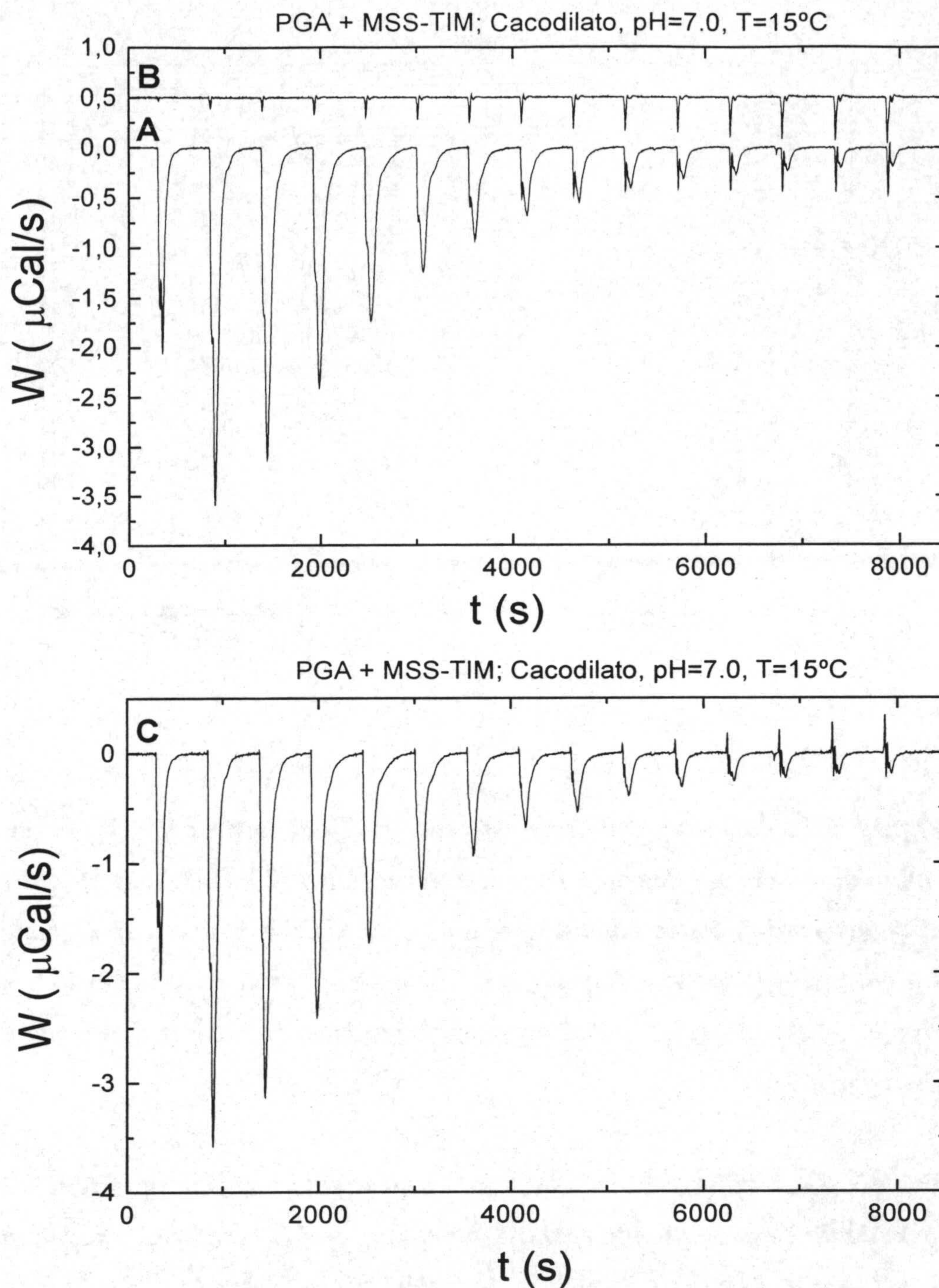


Figura 6.15.- A: Termograma de la interacción PGA + MSS-TIM (una vez sustraída la línea base) en un tampón cacodilato 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, a pH = 7.0 y a la temperatura de 15 °C. Los volúmenes de inyección son 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 12.0 µL.. **B:** Termograma de dilución del PGA con el tampón cacodilato (una vez sustraída la línea base y desplazado + 0.5 µcal/s). **C:** Termograma neto sustrayendo el termograma B del A.

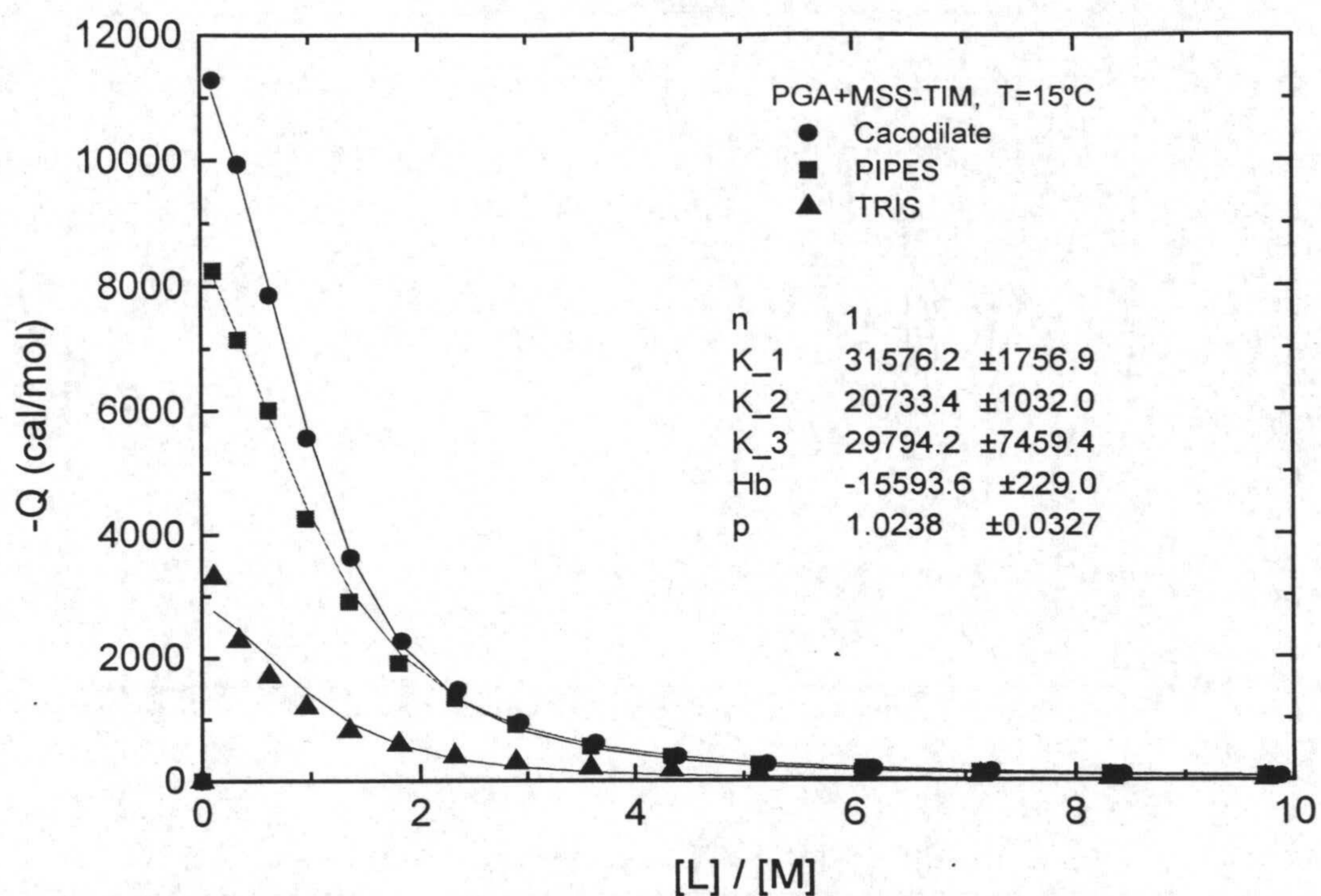


Figura 6.16.- Ajuste simultáneo de los tres juegos de calores por mol de ligando añadido en cada inyección, para la interacción PGA + MSS-TIM, obtenidos en los tampones especificados en el texto de la gráfica. En el proceso de regresión no lineal múltiple se ha fijado el valor del parámetro $n = 1$ y se declaran compartidos los parámetros p y ΔH_b , mientras que se dejan variar independientemente la constante K para cada juego de datos.

Tabla 6.4.- Parámetros del ajuste por regresión no lineal simultánea de los tres juegos de datos, a cada temperatura, obtenidos en los tampones Cacodilato (1), Pipes (2) y Tris (3). El número de sitios de unión para el ligando se ha fijado como una constante $n = 1$.

T (°C)	K_1 (M^{-1})	K_2 (M^{-1})	K_3 (M^{-1})	$\langle K \rangle$ (M^{-1})	p	ΔH_b (cal.mol ⁻¹)
15	31576 ±1757	20733±1032	29794±7459	27368±2577	1.02±0.03	-15594±229
25	11138±532	9971±265	15034±3204	12048±1086	0.89±0.04	-13745±265
35	7328±613	5996±511	-----	6662±399	0.20±0.28	-12465±551

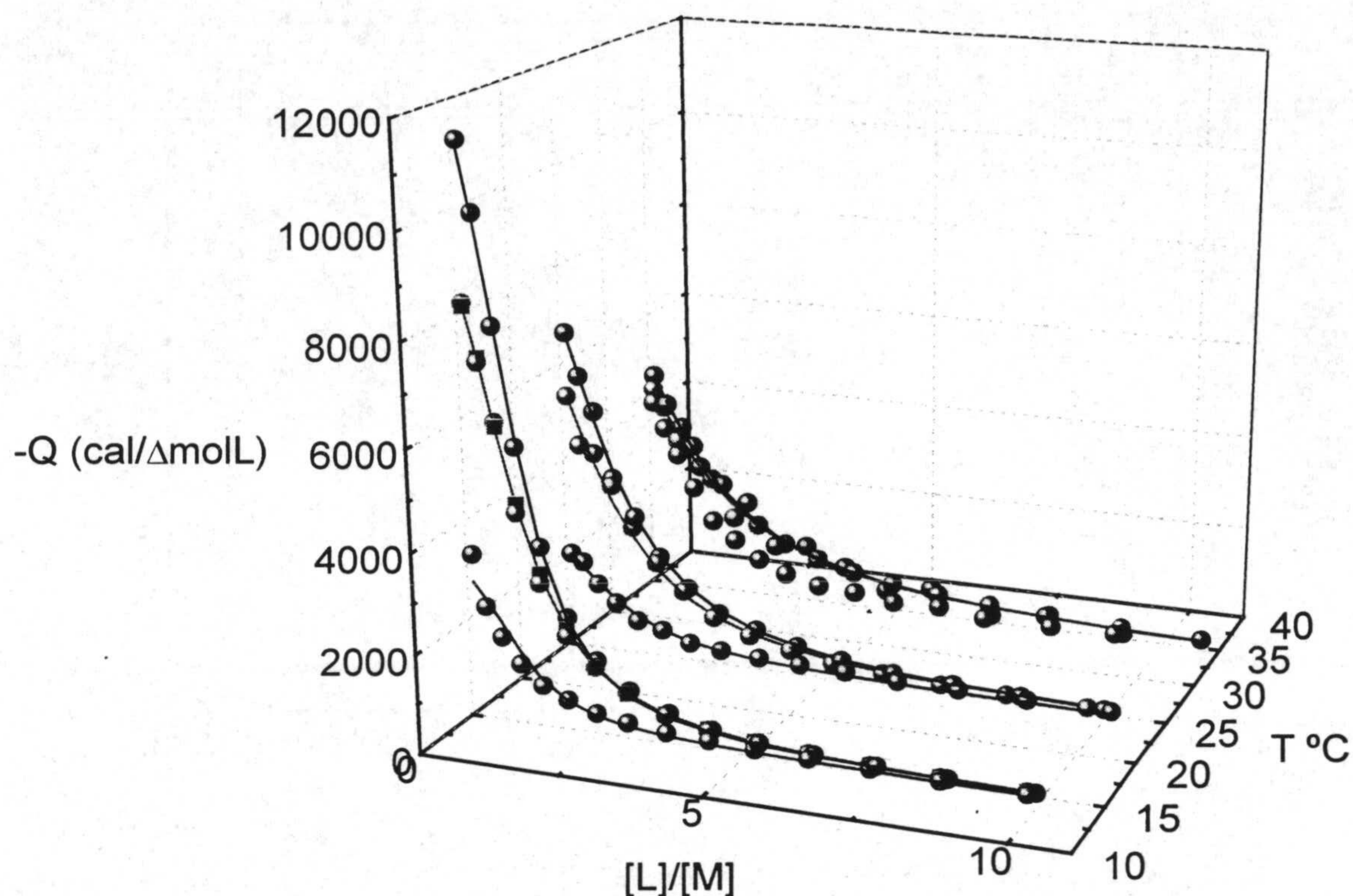


Figura 6.17.- Conjunto completo de los datos experimentales para la interacción PGA + MSS-TIM y ajuste simultáneo, a las temperaturas 15, 25 y 35 °C, de los tres juegos de calores por mol de ligando añadido en cada inyección, obtenidos en los tampones Cacodilato (color negro), PIPES (color rojo) y TRIS (color azul).

Los valores de la entalpía de la interacción PGA + MSS-TIM, así como la dependencia con la temperatura, son muy parecidos a los obtenidos en la interacción PGA + TIM. En la figura 6.18 se muestra la regresión lineal de los valores de entalpía frente a T, obteniéndose de la pendiente el valor $\Delta C_p = 156 \pm 16 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. En la tabla 6.5 se completa el conjunto de parámetros termodinámicos que se obtienen a partir de los datos de la tabla 6.4 haciendo uso de las ecuaciones fundamentales $\Delta G^0 = -RT \ln K$ y $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

18 OCT. 2000

COMISION DE DOCTORADO

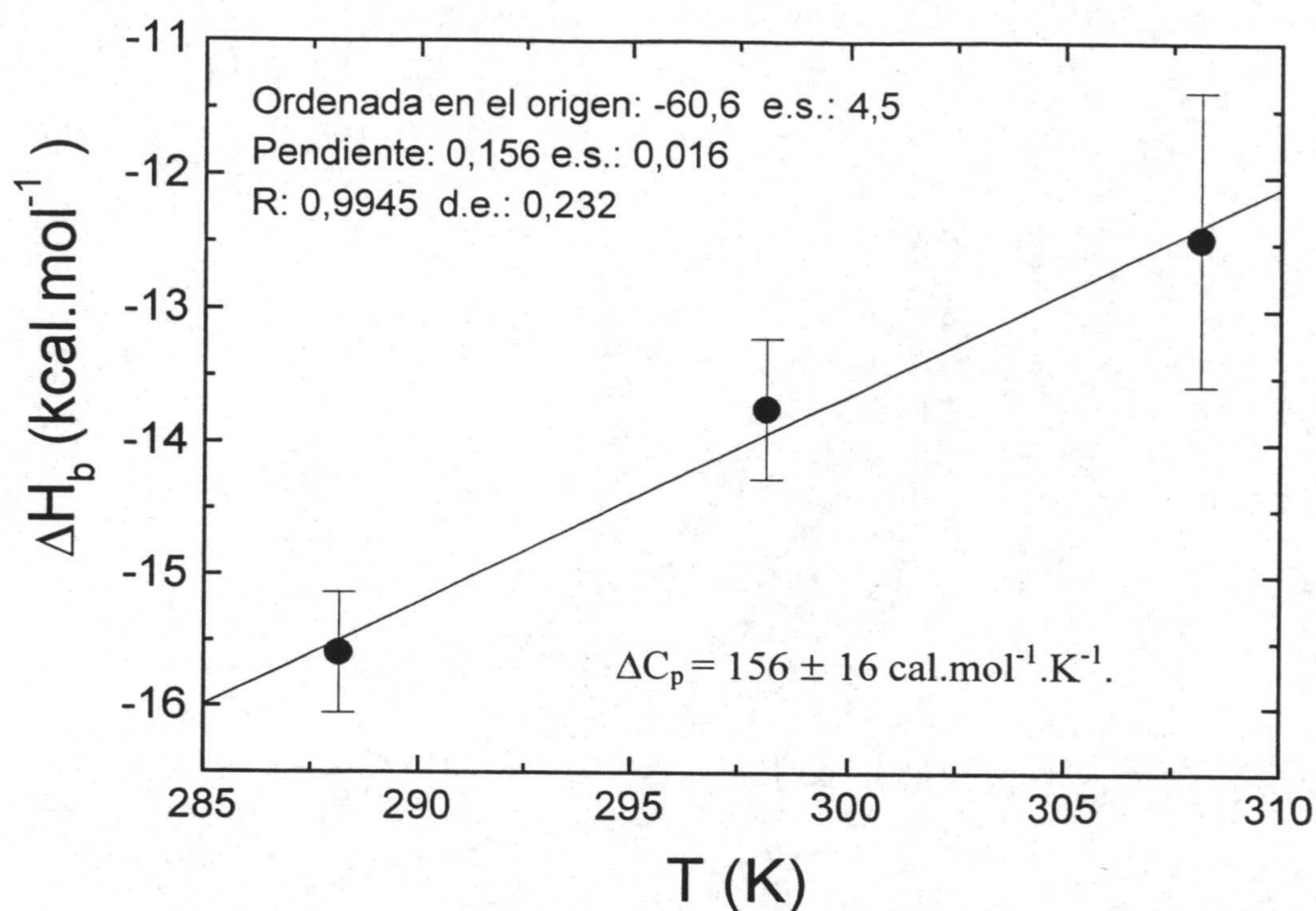


Figura 6.18.- Dependencia con la temperatura del cambio de entalpía asociado a la unión del PGA a la MSS-TIM. La amplitud de las barras de error de los puntos corresponden al doble del error estándar con que se obtienen las entalpías indicado en la tabla 6.2. De la pendiente se obtiene el valor $\Delta C_p = 156 \pm 16 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.

Tabla 6.5.- Parámetros termodinámicos aparentes de la interacción PGA+ MSS-TIM a pH = 7.0.

Parámetros termodinámicos	15 °C	25 °C	35 °C
$K_b \cdot 10^{-3} (\text{M}^{-1})$	$27,4 \pm 2,6$	$12,0 \pm 1,1$	$6,7 \pm 0,4$
$\Delta H_b (\text{kcal.mol}^{-1})$	$-15,59 \pm 0,23$	$-13,75 \pm 0,26$	$-12,50 \pm 0,60$
$\Delta G^0 (\text{kcal.mol}^{-1})$	$-5,85 \pm 0,05$	$-5,56 \pm 0,05$	$-5,39 \pm 0,04$
$\Delta S^0 (\text{cal.K}^{-1}\text{mol}^{-1})$	$-33,80 \pm 0,82$	$-27,47 \pm 0,89$	$-23,07 \pm 1,95$
$\Delta C_p = 156 \pm 16 (\text{cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$			

6.5.- Discusión

Martin E. M. Noble y colaboradores han resuelto y refinado las estructuras cristalinas TIM de pollo, de levadura ("*Saccharomyces Cerevisiae*") y de tripanosoma ("*Trypanosoma Brucei*"), demostrándose la existencia de dos conformaciones conocidas como *abierta* y *cerrada*. La primera, estructura resuelta en los tres casos, es adoptada por la molécula cuando está libre de ligandos, y resultan esencialmente idénticas entre sí. La segunda, estructura solo resuelta para levadura y tripanosoma, es adoptada por la macromolécula cuando está formando complejo con el sustrato o sus análogos; estas dos conformaciones cerradas también son esencialmente idénticas (Noble, M. E. M. et al., 1992 y 1993). La diferencia estructural más relevante entre estas dos conformaciones consiste en un desplazamiento principal del lazo 6 hasta de 7 Å y desplazamientos menores, de 1 Å en los lazos adyacentes 5 y 7. Las secuencias de estas tres TIMs presentan una analogía del 50 % mientras que los restos que configuran el sitio activo se conservan un 100%.

Un mecanismo sencillo de la reacción catalizada por TIM fue propuesto inicialmente por Knowles y colaboradores en 1976; posteriormente se han desarrollado mecanismos alternativos, entre los que destaca el propuesto por Albert S. Mildvan en 1997, más complejo pero que explica mejor los datos de intercambio protón-deuterio estudiado por ^1H RMN de protones (referencia de Albert S. Mildvan).

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización termodinámica completa de la reacción de unión de ácido fosfoglicólico (PGA), un análogo del sustrato, a TIM, tanto a la especie natural dimérica como al mutante monomérico MSS-TIM, ya mencionado en los antecedentes bibliográficos. Este estudio aporta información sobre la energética de la interacción que podría contribuir al desarrollo de un mecanismo definitivo para la catálisis controlada por esta enzima. Se ha escogido este análogo del sustrato por ser uno de los más solubles en agua y estable, condiciones necesarias para realizar los experimentos de ITC.

La interpretación de los resultados obtenidos en el análisis anteriormente descrito, ha de basarse en los datos estructurales disponibles. Desafortunadamente en la base de datos de estructuras de proteínas PDB no se incluye la estructura del complejo PGA-TIM de tripanosoma. No obstante, la desviación cuadrática media de las coordenadas de los átomos del esqueleto polipeptídico entre las formas cerradas de las especies de levadura y tripanosoma para los complejos con otros análogos como PGH es muy pequeña, especialmente en el sitio activo conservado un 100%. Vamos a

aprovechar esta identidad estructural para realizar parte de la siguiente discusión usando la estructura del complejo PGA-TIM para la enzima de levadura, código PDB 2YPI, representada en la figura 6.19.

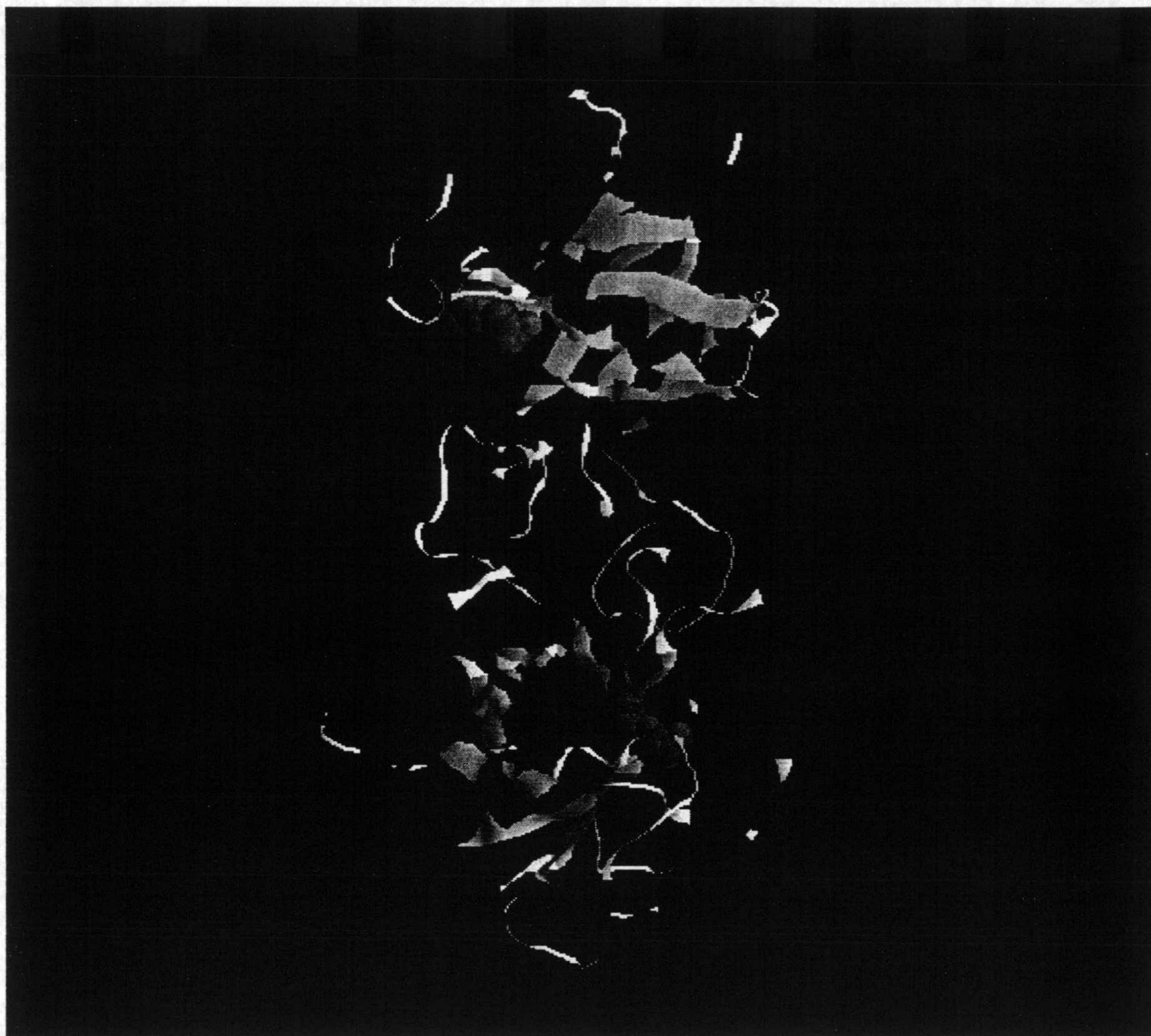


Figura 6.19.- Modelo de cintas para el complejo ácido fosfoglicólico (PGA)-triosafosfato isomerasa (TIM) de levadura (“Saccharomyces Cerevisiae”). El complejo consiste en un homodímero con un sitio de unión por monomero para el PGA (representado por las esferas de van der Waals en color verde).

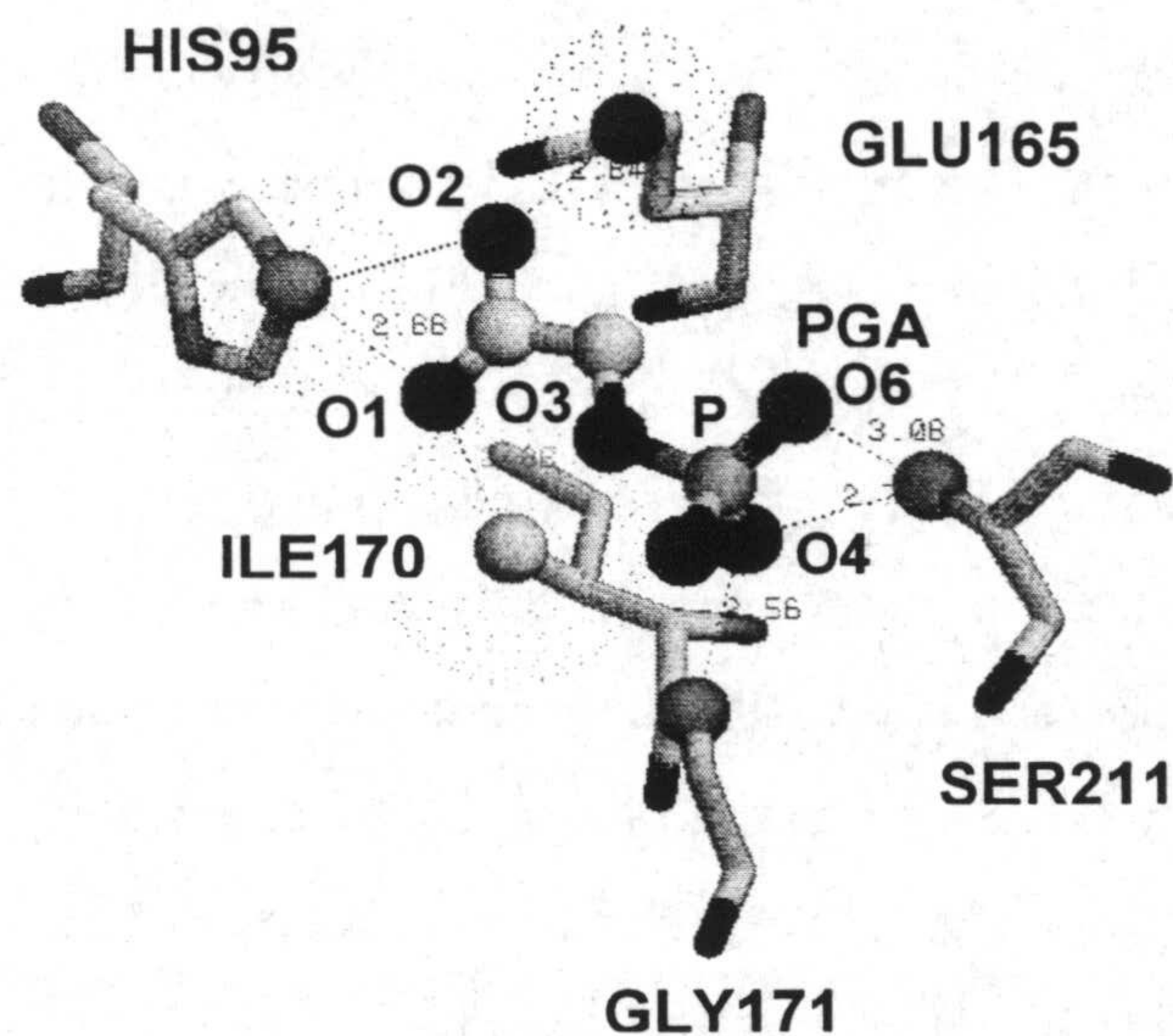
A las tres temperaturas estudiadas $\Delta H_b < 0$ y $\Delta S^0 < 0$; por consiguiente el proceso de unión está favorecido entálpicamente pero no entrópicamente. Los valores negativos del cambio de entalpía podrían indicarnos interacciones por fuerzas de van der Waals y/o formación de enlaces de hidrógeno. Dado el tamaño relativamente pequeño del PGA y consecuentemente una reducida superficie molecular, la contribución de las interacciones de van der Waals no debe ser muy significativa. Por el contrario la formación de puentes de hidrógeno (la más energética de las interacción no covalentes) en la cavidad que forma el sitio de unión, de la que se expulsa prácticamente todas las moléculas de agua, podría justificar el valor y el signo negativo del cambio de entalpía de la unión. Con objeto de comprobar esta posibilidad hemos buscado los posibles enlaces de hidrógeno entre el PGA y la TIM adoptando los siguientes criterios:

- a) La distancia donador-aceptor debe caer en el intervalo de 2,5 a 3,3 Å.
- b) El donador y el aceptor deben ser electronegativos.
- c) El aceptor debe tener un par de electrones libres.
- d) El donador o el aceptor pueden formar un enlace de hidrógeno sencillo o bifurcado.
- e) Cuando un átomo pueda formar enlace de hidrógeno con más de dos átomos vecinos se selecciona los dos de menor distancia.
- f) Se descartan aquellos átomos del esqueleto polipeptídico implicados en puentes de hidrógeno de hélices y láminas beta.

En la figura 6.20 se muestra un modelo del conjunto de los grupos moleculares que contienen átomos que caen en el intervalo de 2,5 a 3,3 Å de distancia a otro átomo del ligando PGA, indicando las distancias con líneas de trazo discontinuo, y en la tabla 6.19 se resume el resultado de la búsqueda especificando las distancias interatómicas, los átomos implicados y la selección de los posibles enlaces de hidrógeno.

De los pares de átomos contenidos en la tabla 6.4.1 solamente los 7 pares marcados como SI cumplen los criterios anteriormente establecidos; consecuentemente, predecimos la posible formación de 7 enlaces de hidrógeno. Por otro lado el sitio de unión es una cavidad profunda en la que se ajusta el ligando y que, con el cambio conformacional concomitante con la unión del ligando, se cierra parcialmente por los 4 restos ILE172, GLY173, THR174, GLY175 que se mueven con cierta rigidez. Las moléculas de agua son expulsadas del sitio de unión y el acceso del disolvente al ligando impedido en esta conformación cerrada; ver la figura 6.21 .

A



B

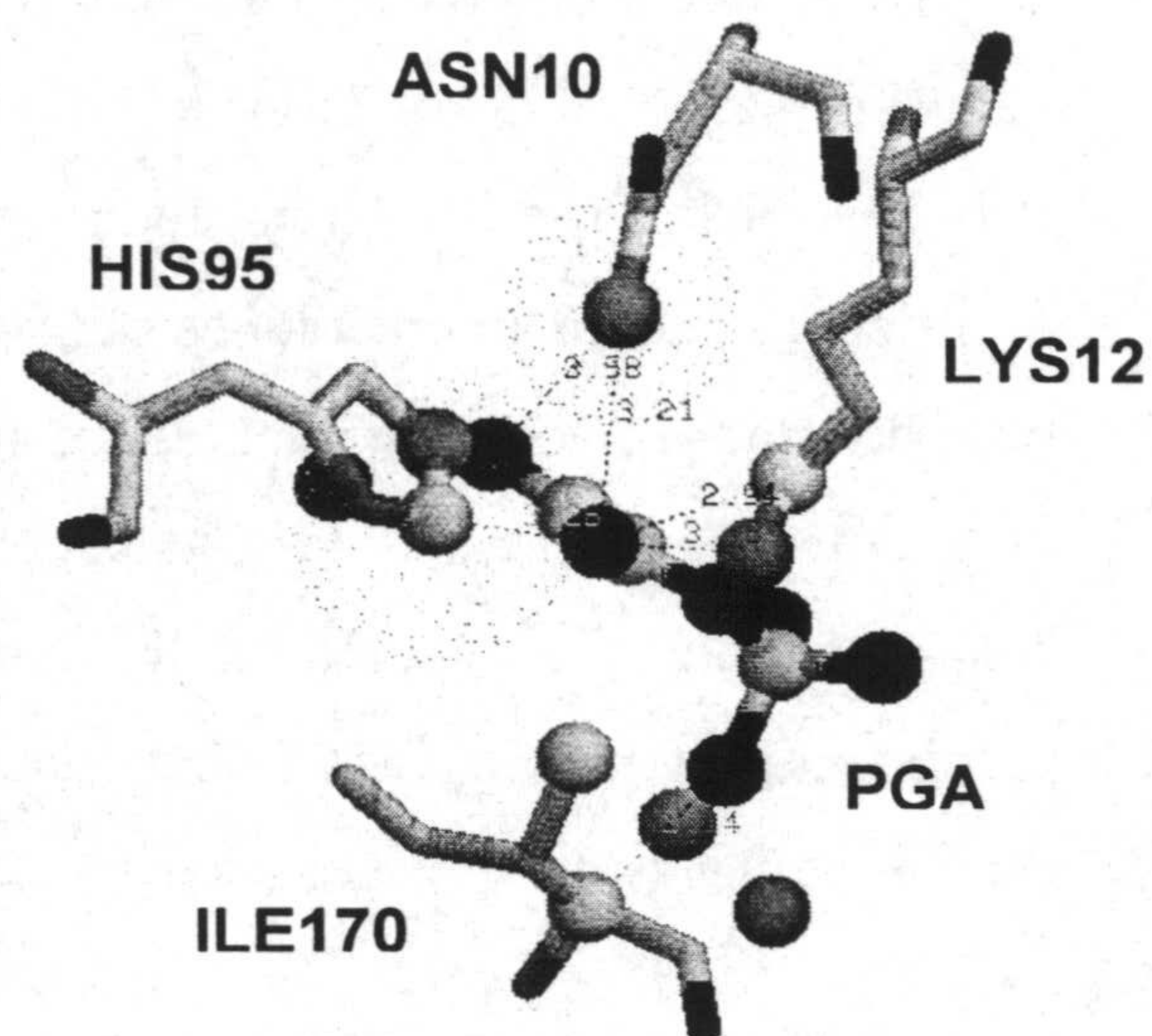


Figura 6.20. - Grupos moleculares del complejo PGA-TIM, archivo PDB código 2YPI que contienen átomos que caen en el intervalo de 2,5 a 3,3 Å de distancia a otro átomo del ligando PGA. A y B son dos subconjuntos de tales grupos distribuidos arbitrariamente para mayor claridad del dibujo.

Tabla 6.6.- Átomos de TIM localizados en un intervalo de 2,5 a 3,3 Å de distancias a otro átomo del ligando PGA. La búsqueda se realizó recorriendo el intervalo de distancias en incrementos de 0,1 Å.

Átomo de la proteína			Átomo del PGA		Distancia interatómica (Å)	Posible enlace de H
Notación	Número en PDB	Resto	Notación	Número en PDB		
NA	1314	GLY171	O4	1886	2,56	SI
NA	1605	SER211	O4	1886	2,73	SI
NA	1605	SER211	O6	1888	3,08	SI
CG2	1312	ILE170	O1	1892	2,88	NO
NE2	714	HIS 95	O1	1892	2,88	SI
NE2	714	HIS 95	O2	1893	3,06	SI
OE2	1272	GLU165	O2	1893	2,84	SI
CE	87	LYS12	O1	1892	2,94	NO
NZ	88	LYS12	O1	1892	3,18	SI
CA	1307	ILE170	O4	1886	3,14	NO
CE1	713	HIS95	O1	1892	3,26	NO
ND2	68	ASN10	O1	1892	3,21	NO

Por todo ello es razonable suponer que los enlaces de hidrógeno se forman en ausencia de agua. I. M. Klotz y J. S. Frauenfeld estudiando el grado de dimerización de la N-metilacetamida como función de la concentración en diferentes disolventes, obtienen un cambio de entalpía de dimerización en Cl_4C , a 25°C , de $17 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Klotz, I. M. & Frauenfeld, J. S., 1962) El proceso transcurre con la formación de dos puentes de hidrógeno idénticos, por lo que podemos asignar a la formación de un puente de hidrógeno en ausencia total de agua el valor de $\Delta H^0 = -8,5 \text{ kJ} \cdot (\text{mol de enlaces de hidrógeno})^{-1}$. Si consideramos la formación de 7 enlaces de hidrógeno en la unión del PGA a TIM, una estimación aproximada de la contribución de tales enlaces a la entalpía de unión sería:

$7 \times [-8,5 \text{ kJ} \cdot (\text{mol de enlaces de hidrógeno})^{-1}] = -68 \text{ kJ} \cdot (\text{mol de ligando unido})^{-1}$, es decir $\Delta H_b^0 = -14,2 \text{ kcal} \cdot (\text{mol de ligando unido})^{-1}$. Este valor es muy parecido al obtenido en el análisis de los termogramas de ITC a 25°C , $-13,5 \text{ kcal} \cdot (\text{mol de ligando unido})^{-1}$. No obstante, en esta estimación hay una cierta sobrevaloración de la energía de los enlaces de hidrógeno, especialmente de aquellos en los que los átomos de oxígeno O4 y O6 del grupo fosfato actúan de aceptores, dado que estos átomos, situados en la parte más externa de la cavidad, están parcialmente expuestos a algunas moléculas de agua que competirán por la formación de enlaces de hidrógeno. En todo caso esta estimación parece indicar que la formación de los enlaces de hidrógeno son la causa principal del cambio entálpico y que las fuerzas de van der Waals añaden solo una pequeña contribución.

Una estimación análoga se ha hecho sobre el mutante monomérico MonoTIM, utilizando para ello el archivo PDB de código 1TTI que corresponde al complejo PGA + MonoTIM, en este caso de tripanosoma. Las mutaciones introducidas en esta variante (I68G, A69N, K70A, S71D, P81A y los restos 73-79 cortados) no coinciden exactamente con la MSS-TIM expresada y utilizada en nuestros experimentos. No obstante todas las diferencias en las mutaciones recaen sobre restos que forman la interfase del dímero, y no afectan significativamente las características estructurales del sitio catalítico. El resultado de la estimación nos predice la formación de 8 posibles enlaces de hidrógeno lo que implica un $\Delta H_b^0 = -16,3 \text{ kcal} \cdot (\text{mol de ligando unido})^{-1}$ frente a $-13,7 \text{ kcal} \cdot (\text{mol de ligando unido})^{-1}$ obtenido del análisis de los termogramas. En este caso la sobrevaloración de la energía de los enlaces de hidrógeno puede ser aún mayor que en el caso anterior pues la cavidad es algo mayor y la hidratación parcial del grupo fosfato parece más probable, ver figura 6.23.

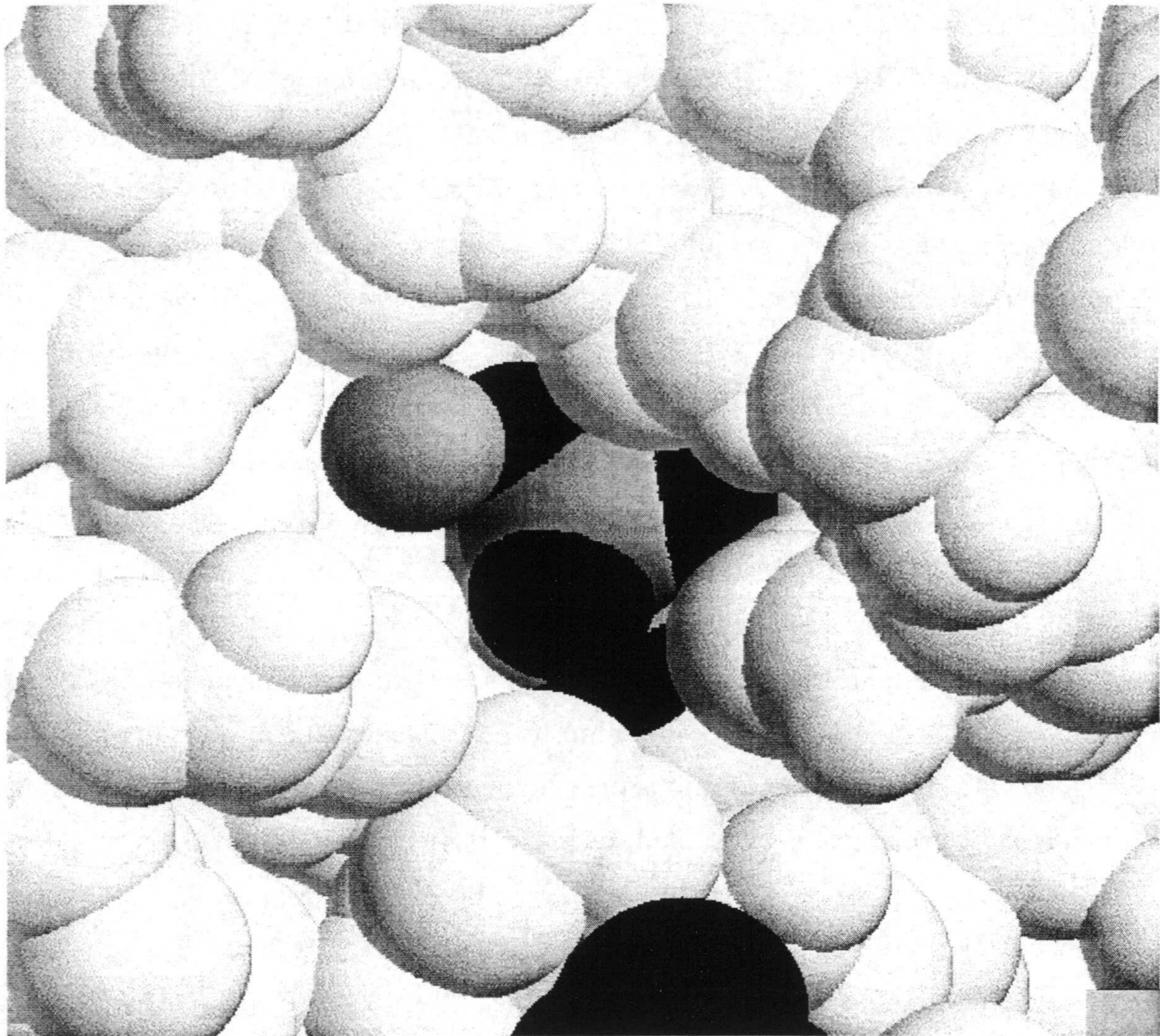


Figura 6.21.- Representación mediante esferas de van der Waals del sitio activo de la enzima TIM de levadura en el complejo PGA-TIM. Los átomos de la proteína de la cadena A del dímero están representados en color gris, los átomos de oxígeno del PGA en color rojo y el átomo de fósforo del PGA en color naranja. La esfera de color celeste representa una molécula de agua que aparece en la entrada a la cavidad y las esferas azules en la parte inferior corresponden a átomos de la cadena B del dímero.

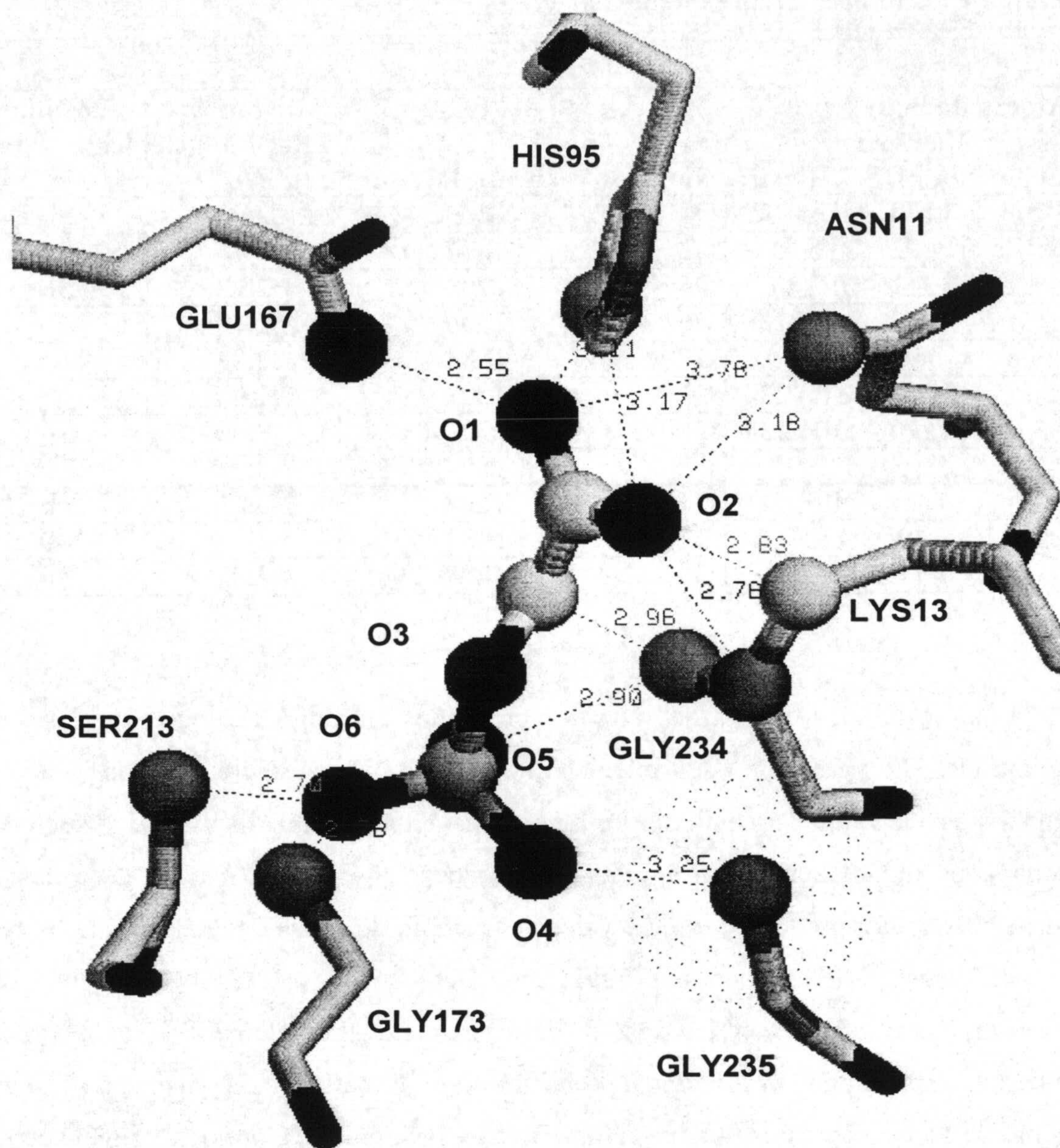


Figura 6.22. ,- Grupos moleculares del complejo PGA-MSS-TIM, archivo PDB código 1TTI, que contienen átomos que caen en el intervalo de 2,5 a 3,3 Å de distancia a otro átomo del ligando PGA.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
19 OCT. 2000
COMISION DE DOCTORADO

Tabla 6.7.- Átomos de MSS-TIM localizados en un intervalo de 2,5 a 3,3 Å de distancias a otro átomo del ligando PGA. La búsqueda se realizó recorriendo el intervalo de distancias en incrementos de 0,1 Å.

Átomo de la proteína			Átomo del PGA		Distancia interatómica (Å)	Posible enlace de H
Notación	Número en PDB	Resto	Notación	Número en PDB		
OE2	1170	GLU167	O1	1803	2,55	SI
NZ	92	LYS13	O2	1804	2,76	SI
NA	1212	GLY173	O6	1799	2,78	SI
NA	1503	SER213	O6	1799	2,70	SI
CE	91	LYS13	O2	1804	2,83	NO
NA	1670	GLY234	C2	1801	2,96	NO
NA	1670	GLY234	O5	1798	2,90	SI
NE2	616	HIS95	O2	1804	3,17	SI
NE2	616	HIS95	O1	1803	3,11	SI
ND2	69	ASN11	O2	1804	3,18	NO
NA	1674	GLY235	O4	1797	3,25	SI

Los resultados muestran un descenso de entropía análogo en las tres temperaturas. La creación de interacciones hidrofóbicas entre grupos apolares hidratados produce un aumento importante de la entropía del disolvente y suelen ir acompañados de un aumento importante de la capacidad calorífica. El descenso de entropía observado, unido al pequeño valor del cambio de capacidad calorífica obtenida en ambos casos, indica que no se producen interacciones hidrofóbicas importantes que compensen o contrarresten el descenso de entropía que conlleva la pérdida de los grados de libertad traslacional y rotacional del inhibidor al unirse a la enzima. El ligero aumento de capacidad calorífica observada para ambas formas, algo menor en el caso de MSS-TIM, puede deberse al efecto combinado de la hidratación de grupos moleculares no polares y un cambio de exposición de cargas electrostáticas al disolvente, como consecuencia del movimiento del lazo 6 y los desplazamientos menores de los lazos contiguos, 5 y 7, que se produce en el cambio de conformación abierta a cerrada.

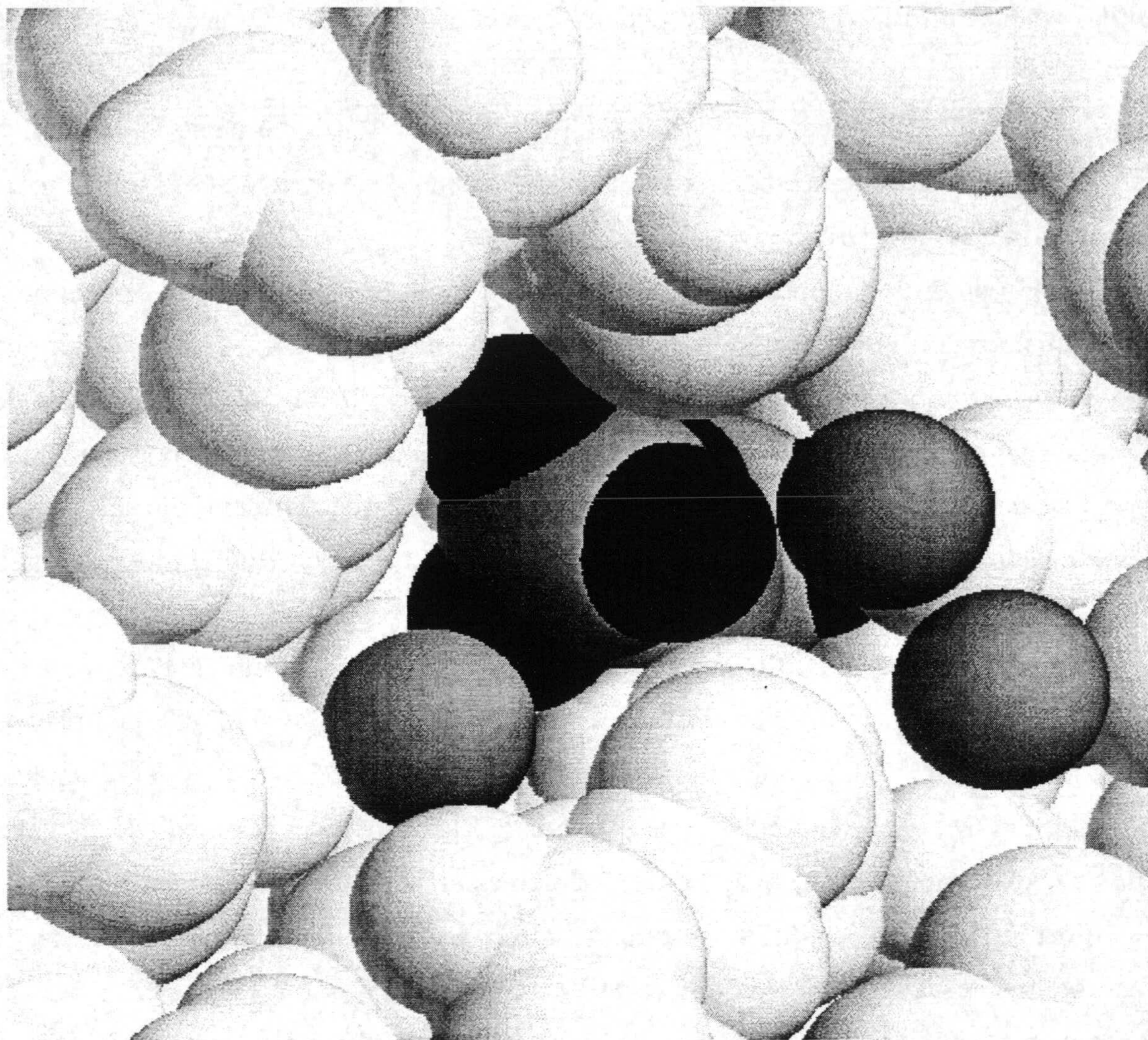


Figura 6.23.- Representación mediante esferas de van der Waals del sitio activo de la enzima MonoTIM de levadura en el complejo PGA-MonoTIM. Los átomos de la proteína están representados en color gris, los átomos de oxígeno del PGA en color rojo y el átomo de fósforo del PGA en color naranja. Las esferas de color celeste representan moléculas de agua que aparece en la entrada a la cavidad.

Respecto a las afinidades es evidente la tendencia que la constante de unión K_b presenta a disminuir con la temperatura, tanto en la forma dimérica como en la monomérica. Esta disminución es la consecuencia inmediata del carácter exotérmico del proceso de unión, de acuerdo con el principio de Le Chatelier. Lo más destacable es la similitud en la afinidad de las dos formas de la TIM por el PGA y que las constantes de unión obtenidas en nuestro estudio son del mismo orden de magnitud que las

inversas de las K_I obtenidas por R. Wierenga y colaboradores (Schliebs, W., et al., 1996.) quienes informan también de esta semejanza de afinidades. De acuerdo con estos autores, nuestros datos indican que el inhibidor PGA interacciona de forma semejante con los restos catalíticos tanto en la TIM-WT como en la especie monomérica MSS-TIM, de lo cual se puede inferir que el mecanismo de la reacción es el mismo para ambas formas moleculares.

El número de moles de protones, p , intercambiados con el tampón, concomitantes con la unión del inhibidor resulta en todos los casos >0 , lo que significa que se toman protones para formar el complejo enzima-inhibidor. La absorción de protones por el complejo es consecuencia de que uno o más grupos ionizables aumentan su pK como consecuencia de un cambio en la micropolaridad de su entorno. El cambio más drástico de la polaridad del entorno se produce generalmente en el sitio de unión del ligando por lo que lo más probable es que el grupo o los grupos ionizables que se protonan pertenezcan al sitio activo. Por otra parte no se detecta una tendencia a cambiar con la temperatura y los valores medios obtenidos son de 0,86 y 0,95 moles de protones por mol de ligando unido, para el complejo PGA-TIM y el complejo PGA-MSS-TIM, respectivamente (en el segundo caso no se ha promediado el valor anómalo que aparece para 35 °C). Estos valores están próximos a la unidad, lo podría significar, entre otras posibilidades, que un solo resto sufre un cambio desde un estado casi totalmente desprotonado a totalmente protonado. Puesto que los experimentos se han realizado a pH 7,0 e inicialmente el sitio de unión en la forma abierta es accesible al agua la histidina 95, con un pK de la cadena lateral cercano a 6, podría ser el grupo responsable de la absorción de protones.

7.- CONCLUSIONES.

1. Los parámetros termodinámicos del desplegamiento reversible de la proteína 434 Cro se han determinado tanto por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y calorimetría isotérmica de titulación (ITC) como por análisis de las curvas de titulación en presencia de urea o ácido obtenidas mediante métodos ópticos. Dichos parámetros incluyen los cambios de entalpía (ΔH), entropía (ΔS), energía de Gibbs (ΔG_D) y capacidad calorífica de desplegamiento inducido por temperatura ($\Delta C_{p,D}$), en función de la dependencia con el pH, la temperatura y la concentración de desnaturizante.
2. Existe una buena correlación 434 Cro entre los parámetros termodinámicos estándar del desplegamiento inducido por temperatura, por pH o por urea, los cuales son típicos para una proteína globular pequeña. Los parámetros m , del modelo de extrapolación lineal (Linear Extrapolation Model, LEM) para el tratamiento de las curvas de titulación en presencia de urea y $\Delta C_{p,D}$ son coherentes con los calculados a partir de las superficies hidrofóbicas e hidrofílicas que se exponen al disolvente durante la desnaturalización.
3. El valor correspondiente al cambio de energía de Gibbs para 434 Cro es menor que los valores de algunos de sus homólogos estructurales, sobre todo a pH bajo, donde la estructura de 434 Cro se despliega. El efecto desestabilizador a estas condiciones extremas se atribuye aquí al único puente salino Arg12 - Glu37 que se encuentra protegido del disolvente en la estructura nativa.
4. Los efectos termodinámicos de las múltiples mutaciones introducidas en dos de las hélices presentes en la estructura nativa del dominio de activación de ADA-2h se han determinado por medio de DSC. Dichas mutaciones se diseñaron con el propósito de aumentar la estabilidad total de la estructura nativa a partir del aumento de las estabilidades de dichas hélices, lo cual se calculó previamente utilizando el algoritmo semiempírico AGADIR. Hemos encontrado así a pH neutro que la estabilidad de las estructuras nativas de los mutantes ha aumentado de manera aditiva, lo cual está cualitativamente en concordancia con las predicciones teóricas, aunque los valores experimentales de ΔG_D son inferiores a los calculados.

5. Se ha demostrado que la estructura nativa de ADA-2h natural es inestable y se despliega por debajo de pH 4.0, incluso a bajas temperaturas, con una gran tendencia a formar amiloides. Bajo estas condiciones dichas mutaciones, en especial las realizadas sobre la hélice 2, aumentan más la estabilidad de una conformación parcialmente plegada que la conformación nativa, lo cual ha sido sugerido por los datos calorimétricos y comprobado directamente a partir del análisis de los espectros de RMN.
6. Los datos de dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear (RMN) para ADA-2h indican que en dicha conformación alternativa se conserva gran parte de la estructura nativa quedando restringido el cambio conformacional a los residuos pertenecientes a la segunda y tercera laminas β así como a los de la hélice α 1.
7. Esta estructura alternativa es más estable para el mutante M2 que para el resto de los mutantes estudiados. Cuando la cadena polipeptídica adquiere esta conformación, la tendencia a formar amiloides a pH bajo disminuye considerablemente.
8. Con el objetivo de buscar correlaciones entre los parámetros termodinámicos y estructurales, así como estudiar la interacción entre los dominios estructurales que componen la quitinasa A (Chi-A) y la quitinasa B (Chi-B), se realizaron experimentos por medio de DSC y proteólisis limitada. Los primeros, correspondientes a DSC para Chi-A y Chi-B, presentan un desplegamiento irreversible, mostrando una sola transición a cualquiera de las condiciones experimentales utilizadas, salvo a pH 3.0 donde el termograma del desplegamiento de Chi-A muestra dos picos, uno reversible y otro irreversible. Los parámetros termodinámicos del desplegamiento correspondientes al primer pico son muy similares a los obtenidos para el dominio clonado Fbn III de Chi-A, el cual se despliega reversiblemente según el modelo de dos estados.

9. Los resultados obtenidos de la proteólisis limitada sobre ambas quitinasas en presencia de papaina o tripsina, bajo diferentes condiciones experimentales de temperatura y proporción proteína / enzima, confirman los obtenidos mediante DSC, ya que los dominios que componen ambas proteínas se mantuvieron unidos debido a la fuerte interacción existente entre ellos, lo que impide su separación así como su desplegamiento individual inducido por la temperatura.
10. El estudio calorimétrico (ITC) de la interacción del inhibidor fosfoglicolato, PGA, con la Triosafosfato Isomerasa natural, TIM-WT, y con la variante monomérica MSS-TIM indica que, en ambos casos, el proceso de unión responde bien a un modelo de n sitios iguales e independientes, siendo $n = 2$ para TIM-WT y $n=1$ para MSS-TIM, de acuerdo con sus estados dimérico y monomérico respectivamente.
11. Los resultados del análisis de los termogramas de ITC anteriores ponen de manifiesto que la interacción está entálpicamente dirigida y no favorecida entrópicamente. Así mismo, la formación de enlaces de hidrógeno en el sitio activo parece ser la contribución principal a los cambios de entalpía observados, siendo de menor importancia los cambios en las interacciones hidrofóbicas y salinas.
12. Estos resultados indican que el mecanismo de la reacción debe ser el mismo para la especie dimérica y la monomérica, porque las constantes de afinidad del PGA a TIM-WT y a MSS-TIM son similares, confirmando resultados previamente publicados por R. Wierenga y colaboradores. La diferencia de velocidad de catálisis debe tener su origen en la diferencia del entorno de los restos catalíticos debido a la diferencia de tamaño de la cavidad del sitio activo (mayor en la especie monomérica), lo que trae como consecuencia una mayor hidratación y mayor desorden en las cadenas laterales de dichos restos.
13. La formación del complejo enzima-inhibidor va acompañada de la absorción de casi 1 mol de protones por mol de ligando unido. Parece ser que esta absorción de protones es consecuencia de la protonación completa de la His 95 del sitio activo.

8.- BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, D. J. et al. & Dada, J., (1993). Chitin Enzimology. (Muzzarelli, R. A. A., ed), pp 15-25, European Chitin Society, Italy.
- Anderson, W. F., (1981). *Nature* 290, 754-758.
- Anfinsen, C.B. (1973). *Science* **181**, 223-230.
- Arnold, V., Rücknagel, K. P., Schierhornob, A., Ulbrich-Hofmann, R., (1996). *Eur. J. Biochem.*, 237, 862-869.
- Bayley, P. M., (1980). "In an introduction to Spectroscopy for Biochemists". Brown, S. B. Ed., page 148, Academic Press, London.
- Becketl, W. J. & Schellman, J. A., (1987). *Biopolymers*, 26, 1859-1877.
- Biochemistry. Mathews van Holde. Ed. Benjamin / Cummings Publishing Company
- Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinston, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C. F. & Pepsys, M. B., (1997). *Nature*, 385, 787-793.
- Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R., Wierenga, R. K., (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1515-1518.
- Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J. P., Callens, M., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. M., Wierenga, R. K., (1993). *Eur. J. Biochem.*, 211, 703-710.
- Borchert, T. V., Radha Kishan, K. V., Zeelen, J. Ph., Schliebs, W., Thanki, N., Abagyan, R., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K., (1995). *Structure*, 3, 669-679.
- Brurberg, M. B., Eijsink, V. G. H. & Nes, I. F., (1994). *FEMS Microbiology Letters*, 124, 399-404.
- Brurberg, M. B., Eijsink, V. G. H., Haandrikman, A. J., Venema, G. & Nes, I. F., (1995). *Microbiology*, 141, 123-131.
- Brurberg, M. B., Nes, I. F. & Eijsink, V. G. H., (1996). *Microbiology*, 142, 1581-1589.
- Burton, R. E., Huang, G. S., Daugherty, M. A., Calderone, T. L. & Oas, T. G., (1997). *Nat. Struct. Biol.* 4, 305-310.
- Cabib, E., Silverman, S. J. & Shaw, J. A., (1992). *J. Gen. Microbiol.*, 138, 97-102.
- Catasús, L., Vendrell, J., Avilés, F.X., Carreira, S., Puigserver, A. & Billeter, M., (1995). *J. Biol. Chem.*, 270, 6651-6657.
- Christensen, J. J., Gardner, J. W., Eatough, D. J., Izatt, R. M., Watts, P. J. & Hart, R. M., (1973). *Rev. Sci. Instrum.* 44, 481.

- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W. & Laemmli, U.K., (1997). *J. Biol. Chem.*, 252, 1102.
- Collinge, D. B. et al. & Vad, K., (1993). *Plant J.*, 3, 31-40.
- Collins, K. D., 1974. *J. Biol. Chem.*, 249, 136-142.
- Creighton, T. E., (1993). *Proteins*. W. H. Freeman & Co., New York.
- Davis, B. & Eveleigh, D. E., (1984). In *Chitin, Chitosan and related enzymes*, 161-179. Ed. by J. P. Zikakis. Academic Press, London.
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benitez, T., Pintor-Toro, J. & Llobell, A., (1992). *Eur. J. Biochem.*, 206, 859-867.
- Feller, G. & Gerday, C. (1997). *Cell. Mol. Life Sci.*, 53, 830-841.
- Filimonov, V. V., Azuaga, A. I., Viguera, A. R., Serrano, L. & Mateo, P. L., (1999). *Biophys. Chem.*, 77, 195-208.
- Filimonov, V. V., Matveyev, S. V., Potekhin, S. A. & Privalov, P. L., (1982). *J. Mol. Biol.*, 16, 551-562.
- Filimonov, V. V., Potekhin, S. A., Matveyev, S. V. & Privalov, P. L., (1982) (a). *J. Mol. Biol. (USSR)*, 16, 435.
- Freire, E. & Biltonen, R. L., (1978). *Biopolymers*, 17, 463.
- Fuchs, R. L., McPherson, S. A. & Drahos, D. J., (1986). *Appl. Environ Microbiol.*, 51, 504-509.
- García-Sáez, I., Reverter, D., Vendrell, J., Avilés, F. X. & Coll, M., (1997). *EMBO J.*, 16, 6906-6913.
- Gómez, J. K. & Freire, E., (1995). *J. Mol. Biol.* 252, 337-350.
- Gooday, G. W., (1990). *Biodegradation* 1, 177-190.
- Harrison, S. C. & Aggarwal, A. K., (1990). *Annu. Rev. Biochem.* 59, 933-969.
- Huang, G. S. & Oas, T. G., (1995 a). *Biochem.* 34, 3884-3892.
- Huang, G. S. & Oas, T. G., (1995 b). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 6878-6882.
- Huang, G. S. & Oas, T. G., (1996). *Biochem.* 35, 6173-6180.
- Hupp, T. R., (1999). *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 88-95.
- Hurle, M.R., Helms, L.R., Li, L., Chan, W. & Wetzel, R., (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 5446-5450.
- Izzat, R. M. et al., (1968). *Handbook of Biochem.*, Rubber Co., Cleveland, OH.
- Jaenicke, R. & Bohm, G., (1998). *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 738-748.
- Jaenicke, R., (1987). *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 49, 117- 237.

- Jaenicke, R., (1996). *Curr. Top. Cell. Regul.*, 34, 209-314.
- Jeuniaux, C., (1993). *Chitin Enzimology*. (Muzzarelli, R. A. A., ed), pp 233-244, European Chitin Society, Italy.
- Jimenez, M. A., Santoro, J., Villegas, V., Serrano, L., Avilés, F. X. & Rico, M., (1999). Resumen congreso de RMN en Granada. España. Datos no publicados.
- Joseph, D., Petsko, G. A., Karplus, M., (1990). *Science*, 249, 1425-1428; Williams, J. C., McDermott, A. E., 1995. *Biochem.*, 34, 8309-8319.
- Klotz, I. M. & Frauenfeld, J. S., (1962). *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 3461-3466.
- Knowles JR., (1991). *Nature*, 350, 121-124.
- Kuhlman, B. & Riehl, D. P., (1998). *Protein Sci.* 7, 2405-2412.
- Lacroix, E., Viguera, A. R. & Serrano, L., (1998). *J. Mol. Biol.*, 284, 173-191.
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M. & Dixon, R. A., (1989). *Cell* 56, 215-224.
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geffroy, P. & Fritig, B., (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6750-6754.
- Luo, P. & Baldwin, R. L., (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4930-4935.
- Mabrey, S. & Sturtevant, J. M., (1978). *Methods Membr. Biol.* 9, 237.
- Makhatadze, G. Y. & Privalov, P. L., (1990). *J. Mol. Biol.*, 213, 375-384.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J., (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Manoil, C. & Beckwith, J., (1986). *Science*, 233, 1403-1408.
- Mondragon, A., Wolberger, C., Harrison, S.C., (1989). *J. Mol. Biol.*, 205, 179-180.
- Monreal, J. & Reese, E., (1969). *Can. J. Microbiol.*, 15, 689-696.
- Muñoz, V. & Serrano, L., (1995). *J. Mol. Biol.*, 245, 275-296.
- Murphy, K. P. & Freire, E., (1992). *Adv. Protein Chem.* 43, 313-361.
- Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M., (1995). *Protein Sci.* 4, 2138-2148.
- Noble, M. E. M. et al., (1993). *Structure, Function, and Genetics*, 16, 311-326.
- Pace, C. N. & Laurents, D. V., (1989). *Biochem.* 28, 2520-2525.
- Padmanabhan, S., Jiménez, M. A. & Rico, M., (1999). *Protein Sci.* 8, 1675-1688.
- Padmanabhan, S., Jiménez, M. A., González, C., Sanz, J. M., Jiménez-Gallego, G. & Rico, M., (1997). *Biochem.* 36, 6424-6436.
- Pennington, S. N., (1976). *Anal. Biochem.* 72, 230.

- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, I., Wilson, K. S. & Vorgias, C. E., (1994). *Structure*, vol. 2, No. 12, 1169-1178.
- Petukhov, M., Kil, Y., Kuramitsu, S. & Lanzov, V., (1997). *Proteins* 3, 309-320.
- Pfeil W, Privalov P. L., (1976). *Biophys. Chem.*, 4, 41-50.
- Plotnikov, V. V., Brandts, J. M., Lin, L. N. & Brandts, J. F., (1997). *Analytical Biochem.*, 250, 237-244.
- Privalov, P. L. & Makhatadze, G. Y., (1990). *J. Mol. Biol.*, 213, 385-391.
- Privalov, P. L. & Potekhin, S. A. (1986) (a). *Meth. Enzimol.*, 114, 4.
- Privalov, P. L. & Potekhin, S. A., (1986). *Methods in Enzimolgy* 131, 4-51.
- Privalov, P. L., (1979). *Adv. Prot. Chem.* 33, 167-239.
- Privalov, P. L., (1980). *Pure Appl. Chem.* 52, 479-497.
- Privalov, P. L., (1986). *Biochem. Mol. Biol.* 25, 281-305.
- Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov, S. Yu., Griko, Yu. V., Makhatadeze, G. Y. & Khechinashvili, N. N., (1989). *J. Mol. Biol.*, 205, 737-750.
- Prusiner, S. B., (1997). *Science*, 278, 245-251.
- Robbins, P. W., Albright, C. & Benfield, B., (1988). *J. Biol. Chem.*, 263, 443-447.
- Roberts, W. K. & Selitrennikoff, C. P., (1988). *J. Gen Microbiol.*, 134, 169.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J. & Studier, F. W., (1987). *Vectors for delective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase*, *Gen (Amst.)* 56, 125-135.
- Ruiz-Sanz, J., Simonscits, A., Törö, I., Pongor, S., Mateo, P. L. & Filimonov, V. V., (1999). *Eur. J. Biochem.* 263, 246-253.
- Sauer, R. T., Jordan, S. R. & Pabo, C. O., (1990). *Adv. Protein Chem.* 40, 1-61.
- Schellman, J. A., (1987). *Annu. Rev. Biophys Chem.* 16, 115-137.
- Schickler, H., Haran, S., Oppenheim, A. B. & Chet, I., (1993). *Chitin Enzimology*, 375-382. Ed. R. Muzzarelli. Ancona, Italy: European Chitin Society.
- Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R. & Wierenga, R., 1996. *Protein Science*, 5, 220-239.
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., Wierenga, R. K., (1997). *Biochem.*, 36, 9655-9662.

- Scholtz, J. M., (1995). *Protein Sci.* 4, 35-43.
- Scholtz, J. M., Barrick, D., York, E. J., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L., (1995). *Proc. Natl. Acade. Sci. U.S.A.* 92, 185-189.
- Shapira, R., Ordentlich, A., Chet, I. & Oppenheim, A. B., (1989). *Phitopathology*, 79, 1246-1249.
- Spindler-Barth, M., (1993). *Chitin Enzimology*. (Muzzarelli, R. A. A., ed), pp 75-82, European Chitin Society, Italy.
- Spolar, R. S., Livingstone, J. K. & Record, M. T., Jr., (1992). *Biochem.* 31, 3947-3955.
- Stanley, C. G. & von Hippel, P. H., (1989). *Analitical Biochemistry*, 182, 319-326.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A., (1986). *J. Mol. Biol.*, 189, 113-130.
- Sturtevant, J. M., (1974). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 3, 35.
- Takahashi, K. & Sturtevant, J. M., (1981). *Biochem.*, 20, 6185-6190.
- Tanford, C., (1970). *Adv. Protein Chem.* 21, 1-65.
- Tomme, P., van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T. & Claeysens, M., (1988). *Eur. J. Biochem* 575-581.
- Tronsmo, A. & Harman, G. E., (1993). *Anal. Biochem.*, 208, 74-79.
- van Aalten, D. M. F., Synstand, B., Bruberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. H. & Wierenga, R. K., (2000). *PNNAS*, 97, 5842-5847.
- van Holde, K. E., Curtis, W., Shing, P., (1998). *Principles of Physical Biochemistry*.
- van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R. & Pettersson, G., (1986). *FEBS Lett.*, 204, 223-227.
- Vieille, C., Burdette, D. S. & Zeikus, J. G., (1996). *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2, 1-83.
- Viguera, A. R., Martínez, J. C., Filimonov, V. V., Mateo, P. L. & Serrano, L., (1994). *Biochem.*, 33, 2142-2150.
- Viguera, A. R., Villegas, V., Avilés, F. X. & Serrano, L., (1996). *Fold & Des.*, 2, 23-33.
- Villegas, V., Azuaga, A. I., Catasús, Ll., Reverter, D., Mateo, P. L., Avilés, F. X. & Serrano, L., (1995). *Biochem.*, 34, 15105-15110. ^a
- Villegas, V., Viguera, A. R., Avilés, F. X. & Serrano, L., (1995). *Fold & Des.*, 1, 29-34.

- Wadsö, I., (1970). *Q. Rev. Biophys.* 3, 383.
- Waldburger, C. D., Schildbach, J. F., Sauer, R. T., (1995). *Nature Struc. Biol.* 2, 122-128.
- Waley, S. G., (1973). *Biochem. J.*, 135, 165-172.
- Wierenga, R. K., Borchert, T. V., Noble MEM, (1992). *FEBS Lett.*, 307, 34-49.
- Wolberger, C., Dong, Y., Ptashne, M. & Harrison, S. C., (1988). *Nature* 335, 789-795.
- Wolfwunden, R., (1969). *Nature* 223, 704-705.
- Wood, S. J., Wetzel, R., Martin, J. D. & Hurle, M. R., (1995). *Biochem.*, 34, 724-730.
- Zabori, S., Rudolph, R., Jaenicke, R., (1980). *Z. Naturforsch.* 35 C, 99-1004.