



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

TESIS

*DESARROLLO DE UN MODELO ENERGÉTICO ESTRUCTURAL
PARA ESTIMAR EL VALOR DEL ΔG_p EN EL RECONOCIMIENTO
PROTEÍNA-CARBOHIDRATO*

que para obtener el grado de doctor en ciencias presenta:
QBP Eneas Alejandro Chavelas Adame

Tutor:
Dr. Enrique García Hernández
Instituto de Química, UNAM





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas y entidades académicas, que directamente han mostrado interés en mi desarrollo personal y en mi bienestar o han sido parte estructural en mi formación como profesional. Entre ellas:

A mi familia, a cada uno de sus integrantes, que muestran incondicionalmente su apoyo cada vez que lo he requerido. A mis padres por haberme inculcado la libertad de elección y por apoyarme en las decisiones que he tomado. A mis hermanos, que muestran su apoyo en cada momento, sin ustedes estaría vencido. A mis sobrinos, la nueva generación, les deseo mucho éxito desde ahora.

A mi tutor, Enrique, muchas gracias por el apoyo en todas y cada una de sus variantes, te lo agradezco de corazón. Gracias también por tu paciencia ante mi inexperiencia en mis intentos de jugar al investigador y por tu dirección para llevar a buen término este trabajo.

A mi comité tutorial, al Dr. Alejandro Fernández Velasco y al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, por su propuesta siempre crítica y propositiva ante mi proyecto de investigación. Muy recomendables como jurado.

A mis amigos, muchas personas, muchos momentos, toda una vida y una sola hoja. Pero a todos y a cada uno de ellos.

A mis compañeros de laboratorio, por compartir el mismo interés de la investigación, la mistad y el compañerismo en un mismo espacio.

Finalmente, pero no en menos medida a la educación pública y gratuita de México, a la Universidad Autónoma de Guerrero y a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme desarrollarme en el ámbito académico y brindarme el espacio y los recursos necesarios para aprender.

Este trabajo fue financiado en parte por CONACYT (Proyecto No. 47097) y por el programa de PAPIIT (UNAM) (Proyecto No. IN217106-3). Adicionalmente agradezco el apoyo económico recibido por el CONACyT a través de la beca para estudios de posgrado con registro No. 177944.

Tabla de contenido.

1. Introducción.	01
2. Antecedentes.	05
2.1. Relaciones termodinámicas básicas.	05
2.2. Modelos energético-estructurales basados en cambios de áreas accesibles al solvente.	09
2.3. Caracterización termodinámica experimental de la formación de complejos proteína-carbohidrato .	11
2.3.1. La calorimetría de titulación isotérmica.	11
2.3.2. Modelo de unión de sitios idénticos e independientes para complejos con estequiometría de 1:η	14
2.3.3. La calorimetría de titulación multitérmica.	17
2.4. Proteínas.	21
2.5. Lectinas, proteínas reconocedoras de carbohidratos.	22
2.5.1. Sistema de estudio experimental: Concanavalina A.	24
2.5.2. Sistema de estudio experimental: lisozima de huevo de gallina	25
2.6. Modelos de aditividad simple para el ΔH y el ΔS de unión de complejos proteína-carbohidrato	28
2.6.1. Modelo del cambio de entalpía	29
2.6.2. Modelo del cambio de entropía	31
2.6.3. Cálculo del cambio de la energía libre de Gibbs	31
2.6.4. Capacidad calorífica	33
3. Objetivos	35
3.1. Objetivo general	35
3.2. Objetivos particulares	35
4. Material y metodología	36
4.1. Proteínas y ligandos	36
4.2. Caracterización termodinámica de la formación de complejos proteína-carbohidrato	37
4.3. Cálculo del ΔC_p de solvatación de carbohidratos	37
4.4. Cálculo de áreas superficiales accesibles al solvente	38
4.5. Estructuras moleculares	39
5. Resultados y discusión	40
5.1. Caracterización termodinámica de complejos P-C mediante calorimetría de titulación isotérmica	40
5.1.1. Complejos de lisozima	40
5.1.2. Complejos de la concanavalina A	44
5.2. Caracterización termodinámica de complejos	

proteína-carbohidrato mediante calorimetría de titulación multitérmica.	47
5.3. Desarrollo de un modelo energético-estructural de complejos proteína-carbohidrato para estimar los valores del ΔC_p de unión	50
5.3.1. Modelo inicial del ΔC_p de unión	50
5.3.2. Refinamiento del modelo del ΔC_p de unión, mediante un modelo extendido basado en cambios de áreas.	57
5.3.3. Desarrollo y predicciones del modelo de $\Delta C_p C$.	58
5.3.4. Desarrollo y comparación del modelo de $\Delta C_p P$.	63
6. Conclusiones	69
7. Anexo 1	72
8. Anexo 2	73
9. Anexo 3	74
10. Referencias	75

Abreviaturas.

- ΔA = Cambio en la accesibilidad de áreas superficiales
- ΔC_{pC} = Cambio de capacidad calorífica del carbohidrato
- $\Delta C_{p_{disol}}$ = Cambio de capacidad calorífica de disolución de carbohidratos
- ΔC_{pP} = Cambio de capacidad calorífica de la parte proteica
- $\Delta C_{p_{transf}}$ = Cambio de capacidad calorífica de transferencia de un estado puro a un medio acuoso en alcoholes y polioles
- ΔC_{pU} = Cambio de capacidad calorífica de unión
- $\Delta c_{p_{cal}}$ = Cambio de capacidad calorífica de los átomos de carbono de grupos alifáticos presentes en proteínas
- $\Delta c_{p_{car}}$ = Cambio de capacidad calorífica de los átomos de carbono de grupos aromáticos presentes en proteínas
- $\Delta c_{p_{cga}}$ = Cambio de capacidad calorífica de los grupos polares con carga presentes en proteínas
- $\Delta c_{p_{neu}}$ = Cambio de capacidad calorífica de los grupos polares neutros en proteínas
- ΔG_u = Cambio de energía libre de unión
- ΔH_u = Cambio de entalpía de unión
- ΔS_u = Cambio de entropía de unión
- η = Estequiometría de reacción
- 3D = Tridimensional
- Arg = Arginina
- Asn = Asparagina
- Asp = Ácido aspártico
- CTI = Calorimetría de titulación isotérmica
- CTM = Calorimetría de titulación multitérmica
- Cys = Cisteína
- Gln = Glutamina
- Glu = Ácido glutámico
- HEPES = Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfónico
- His = Histidina
- K_u = Constante de unión o asociación
- L-C = Complejos Lectina-Carbohidrato
- Lys = Lisina
- MF = Modelo propuesto por Murphy y Freire
- MP = Modelo propuesto por Makhatadze y Privalov
- MPS = Modelo propuesto por Myers, Pace y Scholtz
- NCO = Grupo N-acetilo
- Npol = No polar
- P-C = Complejos Proteína-Carbohidrato
- PDB = Banco de datos de proteínas

- P-L = Complejos Proteína-Ligando
- Pol = Polar
- P-P = Complejos Proteína-Proteína
- RMN = Resonancia magnética nuclear
- Ser = Serina
- SR = Modelo propuesto por Spolar y Record
- Thr = Treonina
- Trp = Triptofano
- Tyr = Tirosina

Proteínas

- CBDXil = Dominio de unión a carbohidrato de la Xilanasa
- CBM4 = cuarto módulo de unión a carbohidrato de la Xilanasa
- CBM9 = noveno módulo de unión a carbohidratos de la Xilanasa
- ConA = Concanavalina A
- CVIIL = Lectina CVIIL de la bacteria *Chromobacterium violaceum*
- DGL = Lectina de *Dioclea grandiflora*
- Hev = Heveina
- Lisoz = Lisozima

Azúcares

- Ara = Arabinosa
- dGlc = deoxi-Glucosa
- Fru = Fructosa
- Gal = Galactosa
- Glc = Glucosa
- Maltet = Maltotetraosa
- Maltri = Maltotriosa
- Man = Manosa
- MeFuc = Metil fucosa
- MeGlc = Metil glucosa
- MeMan = Metil manosa
- Q₁ = NAcGlc = N-acetilglucosamina
- Q₂ = Quitobiosa
- Q₃ = Quitotriosa
- Rib = Ribosa
- Sac = Sacarosa
- Xil = Xilosa

Introducción

Sin lugar a dudas, las proteínas son las moléculas biológicas con la mayor diversidad funcional que podemos encontrar en los seres vivos. La diversidad en las funciones de las proteínas, se ha documentado y corroborado en: el soporte estructural de la células y, por ende, de órganos y tejidos de organismos pluricelulares, el transporte de metabolitos, la síntesis o degradación de los mismos mediante reacciones enzimáticas, la asistencia en la propagación del mensaje genético y su control de calidad asociado, su función como hormonas, anticuerpos, la regulación de la señalización celular, etc.

Para ejercer su función las proteínas necesitan satisfacer estructuralmente dos eventos secuenciales importantes. El primero de ellos implica la adquisición de una estructura tridimensional adecuada (plegamiento de la proteína), el cual se lleva a cabo durante o posteriormente a la síntesis de la cadena polipeptídica. El segundo, implica la interacción con al menos otra molécula (comúnmente denominada **ligando**) dando como resultado un complejo proteico.

La adquisición de ambas formas estructuradas de las proteínas (plegada y acomplejada) se logra primordialmente mediante la formación de interacciones de tipo no covalente. El uso de estas *interacciones débiles*, como también se les conoce, adicionalmente hace posible que la estabilidad estructural de ambos estados sea marginal aportando con ello un carácter reversible para ambos eventos. Afortunadamente la estabilidad y reversibilidad estructural de los eventos proteicos, hacen posible su estudio como sistemas termodinámicos aislados de sus ambientes celulares, es decir, pueden ser estudiados *in vitro* bajo condiciones controladas.

La descripción termodinámica de los eventos de plegamiento o la formación de complejos proteína-ligando (P-L), nos permite establecer comparaciones cuantitativas entre diferentes sistemas y al mismo tiempo reconocer coincidencias y/o generalizaciones en un determinado grupo (familia estructural) de estructuras

proteicas y, finalmente, en determinados casos lograr pronosticar su comportamiento energético.

En el caso particular del estudio de la formación de complejos proteicos, es preciso discernir entre dos propiedades intrínsecas de la asociación: **la especificidad y la afinidad**. La especificidad proteica se puede definir como la capacidad que tienen dichas biomoléculas de satisfacer lo mejor posible la complementariedad estereoquímica del ligando en la interacción. Por su parte, la afinidad es una propiedad cuantitativa representada por la constante de asociación, la cual, se relaciona directamente con el valor de la energía libre de Gibbs de unión (ΔG_u). El valor del ΔG_u a su vez funciona como indicador de la estabilidad estructural y espontaneidad de las reacciones químicas, en este caso la formación de complejos.

La interpretación del ΔG_u en términos moleculares es en la actualidad uno de los grandes desafíos de las ciencias biológicas y un requerimiento indispensable para entender la correlación entre la energética de las moléculas participantes con sus propiedades estructurales particulares. Dicha interpretación, no sólo debe proporcionarnos una explicación adecuada y coherente de dicha relación, sino también sentar las bases energético-estructurales con las cuales sea posible generar valoraciones cuantitativas con suficiente precisión para el diseño de fármacos o la predicción de estructuras proteicas con funciones novedosas.

Durante la última década, ha sido mostrado que los parámetros termodinámicos de la formación de complejos de proteína, pueden ser expresados en función de los cambios energéticos asociados a la accesibilidad de áreas superficiales (ΔA) [Luque y Freire, 1998; Murphy y Freire, 1992; Baker BM y Murphy, 1998], de acuerdo con las siguientes particiones fenomenológicas:

$$\Delta H = \Delta h_{pol}\Delta A_{pol} + \Delta h_{np}\Delta A_{np}, \quad (1)$$

$$\Delta S = \Delta s_{pol}\Delta A_{pol} + \Delta s_{np}\Delta A_{np} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{r-tr}, \quad (2)$$

$$\Delta C_p = \Delta c_{p, pol}\Delta A_{pol} + \Delta c_{p, np}\Delta A_{np}, \quad (3)$$

en donde, el ΔH y el ΔC_p son separados en contribuciones específicas polares (Δh_p , Δc_{p_p}) y no polares (Δh_{np} , $\Delta c_{p_{np}}$), las cuales a su vez son ponderadas con respecto al cambio en la accesibilidad de áreas superficiales (ΔA) de tipo polar (pol) y no polar (np), respectivamente. Como puede constatarse de la ecuación 2, en el caso de la entropía además de las contribuciones determinadas por la hidratación por tipo de superficie ($\Delta s_{pol}\Delta A_{pol}$ y $\Delta s_{np}\Delta A_{np}$), la partición incluye dos términos que no dependen del ΔA , los cuales corresponden a la entropía conformacional (ΔS_{conf}), que está relacionada con el cambio en el estado rotacional de enlaces covalentes simples, y la entropía ligada al cambio en los grados de libertad molecular (ΔS_{r-t}), contribución entrópica ligada a los cambios de rotación y translación de las moléculas después del acomplejamiento.

Tomando en consideración estas relaciones simples anteriormente descritas y, que han sido exhaustivamente validadas en diversos complejos proteicos, nuestro grupo de investigación ha venido desarrollando modelos energético-estructurales basados en las particiones expresadas en las ecuaciones 1-3, particularmente para la formación de complejos Proteína-Carbohidrato (P-C), intentando esclarecer las bases energético-estructurales subyacentes, particulares de este tipo de sistemas [García-Hernández *et al.*, 1997; García-Hernández y Hernández-Arana, 1999; García-Hernández *et al.*, 2000].

El proyecto de investigación presentado en esta tesis doctoral, está enmarcado en la ampliación de estos estudios energético-estructurales de complejos P-C, y se enfoca, primordialmente, en el desarrollo de un modelo basado en los ΔA para estimar el valor del ΔC_p de unión (ΔC_{p_u}) y su posible interpretación molecular.

Adicionalmente, debido a la escasez inicial de datos experimentales de ΔC_{p_u} de complejos P-C, decidimos llevar a cabo caracterizaciones termodinámicas experimentales con varias proteínas que reconocen carbohidratos, para ello hemos utilizado la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (CTI) una técnica

especializada que permite medir directamente los calores de formación de los complejos. Adicionalmente, hemos logrado hacer una adaptación experimental de dicha técnica calorimétrica, para acrecentar la obtención experimental del ΔC_{p_u} de complejos P-C.

Antecedentes

RELACIONES TERMODINÁMICAS BÁSICAS.

Una de las manifestaciones más fundamentales de la naturaleza es la energía que acompaña a todos los cambios y transformaciones de la materia. Así, fenómenos tan diversos como: la degradación de alimentos por los seres vivos, la elaboración de productos en la industria o el consumo de combustibles como la gasolina o la electricidad por las sociedades, todos comprenden algún tipo de absorción, emisión o redistribución de la energía (ΔE). Una de las formas más comunes en la que la energía fluye de un sistema a su entorno y hacia la cual tienden las demás, es el calor (q). El calor, que a menudo detectamos a partir del cambio de temperatura en el sistema de estudio, es tan sólo una de las dos aportaciones globales al cambio en la energía total en un sistema. Para sistemas donde puede haber trabajo involucrado (w), la primera ley de la termodinámica establece que:

$$\Delta E = q + w \quad (4)$$

Para la inmensa mayoría de reacciones bioquímicas, los procesos ocurren a presión constante, por lo que el trabajo puede calcularse a partir de:

$$w = \int_{V_i}^{V_f} P dV \quad (5)$$

donde V representa el volumen y los subíndices f e i , corresponden a los estados final e inicial del sistema respectivamente. La forma integrada de la ecuación 5, se escribe de la siguiente manera:

$$w = P (V_f - V_i) \quad (6)$$

En sistemas sólidos y líquidos (estados parecidos de los sistemas proteicos), donde la presión se mantiene constante y los cambios de volumen son ínfimos, el trabajo en el sistema es aproximadamente cero. De lo cual, se deduce que el cambio de energía dentro de este tipo de sistemas a presión y volumen constante es equivalente a la transferencia de calor (considerando la ecuación 4) entre el sistema y sus alrededores.

De manera análoga, los cambios térmicos a presión constante se pueden expresar adecuadamente mediante la función de la entalpía (H). Esta función se define por la relación:

$$H = E + PV \quad (7)$$

donde P y V corresponden a la presión y el volumen del sistema. Debido a que la entalpía es una función de estado, el cambio de entalpía puede escribirse como:

$$\Delta H = H_f - H_i \quad (8)$$

y substituyendo la ecuación 7 en 8, tenemos que:

$$\Delta H = \Delta E + (P_f V_f - P_i V_i) \quad (9)$$

Considerado a la presión y volumen constantes, el rearrreglo de la ecuación 9 queda como:

$$\Delta H \simeq \Delta E \quad (10)$$

por lo que en los sistemas que involucran fases líquidas o sólidas de la materia en donde la experimentación se lleva a cabo a presión atmosférica, el producto de la integración de PV es igual a cero, concluyendo que bajo estas condiciones, las ecuaciones 4 y 10 pueden ser equivalentes:

$$\Delta E \simeq \Delta H = q \quad (11)$$

Esta implicación representa una enorme ventaja en el estudio de los sistemas biológicos, pues actualmente contamos con equipos de alta precisión que trabajan bajo condiciones “constantes” o, por lo menos, equivalentes de presión y volumen en las cuales se efectúan las reacciones de asociación, por lo que, la medición de calor equivale a determinar directamente la entalpía de formación.

Finalmente, el efectuar una caracterización termodinámica completa del proceso de asociación P-L, implica conocer los valores termodinámicos de los cambios en la energía libre de Gibbs (ΔG), la entalpía (ΔH), la entropía (ΔS) y la capacidad calorífica (ΔC_p) del sistema.

Como es bien sabido, la estabilidad y espontaneidad de cualquier reacción química o molecular (incluido el plegamiento y reconocimiento proteico) está dada por el signo y magnitud en el valor del ΔG_u . Para la interacción proteína-ligando, la magnitud del ΔG_u puede ser calculada a partir de la constante de unión o asociación (K_u) de acuerdo a la siguiente función de estado:

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u \quad (12)$$

donde K_u es la constante de equilibrio que describe el balance entre las moléculas libres y las que formaron el complejo, T es la temperatura absoluta y R es la constante de los gases ideales.

Adicionalmente, el valor de ΔG_u puede ser calculado a partir de las contribuciones entálpicas y entrópicas, de acuerdo con la ecuación de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G_u = \Delta H_u - T\Delta S_u \quad (13)$$

Por ello, quizás el primer paso encaminado a la disección de los componentes del valor de ΔG_u en sus contribuciones más elementales este orientado a determinar los valores del ΔH_u y el ΔS_u . En el caso de reacciones de reconocimiento molecular que toman lugar en un solvente acuoso, el ΔH_u es aproximadamente igual al cambio en la energía interna del sistema, el cual resulta directamente del reordenamiento en las interacciones no covalentes entre el solvente y las moléculas interactuantes. En contraste, el ΔS_u es el resultado de los cambios en los grados de libertad de los solutos más los del solvente y puede calcularse a partir de los valores del ΔH_u y el ΔG_u , de acuerdo con la ecuación 13.

Finalmente, la dependencia térmica de ΔH_u y ΔS_u (ecuación 14) nos permite calcular el valor del cambio de la capacidad calorífica de unión ($\Delta C_{p,u}$). En el estudio del plegamiento de proteínas, este valor ha sido relacionado molecularmente a los cambios que se observan en la hidratación de superficies de las especies químicas involucradas, contribuyendo con cerca del 95% de su valor global [Gómez *et al.*, 1995].

$$\Delta C_{p,u} = \frac{\Delta H}{\Delta T} = \frac{\Delta S}{\Delta \ln T} \quad (14)$$

MODELOS ENERGÉTICO-ESTRUCTURALES BASADOS EN CAMBIOS DE ÁREAS ACCESIBLES AL SOLVENTE

Como fue mencionado anteriormente, los parámetros termodinámicos de la formación de complejos de proteína (ΔG_u , ΔH_u , ΔS_u , ΔC_{p_u}), pueden ser expresados en función de los cambios en la accesibilidad de áreas superficiales (ΔA). De acuerdo con los modelos descritos en las ecuaciones 1 al 3, los parámetros termodinámicos del proceso de unión, pueden ser calculados mediante el uso de coeficientes específicos ponderados por unidad de área de tipo polar y de tipo no polar. Las particiones expresadas en las ecuaciones 1-3 implican que los grupos de átomos con la misma polaridad contribuyen de forma equivalente al parámetro termodinámico con el cual se le está relacionando, independientemente del ambiente químico en el que se encuentren cada uno de estos grupos de átomos, es decir; en tales modelos se considera que las contribuciones polares y no polares poseen un carácter aditivo en el proceso de acomplejamiento. La obtención de los coeficientes específicos se logra resolviendo la ecuación paramétrica de cada modelo energético-estructural de la unión, y finalmente, utilizar los coeficientes para hacer estimaciones de los valores de formación de complejos estructuralmente semejantes.

A pesar de su simpleza, tales esquemas de aditividad han sido útiles en la estimación de algunos parámetros termodinámicos para la hidratación (p.ej., cambios volumétricos, capacidades caloríficas, calores de formación de compuestos, y cambios de la energía libre de Gibbs) de un grupo variado de moléculas pequeñas [Graziano y Barone, 1996; Hedwig y Hinz, 2003; Spolar *et al.*, 1992]. De la misma manera, se ha observado que los coeficientes específicos obtenidos para correlaciones energético-estructurales en moléculas pequeñas, han sido útiles para predecir los parámetros termodinámicos de eventos asociados a macromoléculas de naturaleza biológica, principalmente en el plegamiento [Sturtevant, 1977; D'Aquino, *et al.*, 1996] y la formación de complejos proteína-proteína (P-P) [Baker y Murphy, 1998]. Actualmente, los avances que se han logrado en esta área son bastante promisorios y han llegado al punto en el que las predicciones de los valores termodinámicos se acercan con

precisión a los valores experimentales [Freire, 1993]. Por ejemplo, recientemente se midió la interacción de un potente inhibidor de la proteasa del VIH-1, (un estudio realizado por Lafont y cols [Lafont, 2007]), mediante CTI, el valor del ΔH de unión resultante fue de 8.2 kcal/mol. En el mismo trabajo, se reporta la predicción del ΔH_u a partir de un modelo basado en áreas, la cual resultó con un valor de 8.0 kcal/mol.

En esta tesis de doctorado, como objetivo particular nos hemos enfocado a desarrollar un modelo energético-estructural basado en el esquema de aditividad simple, con el cual logramos reproducir y en su caso predecir los cambios de capacidad calorífica en la formación de complejos P-C. El desarrollo de dichos modelos energético-estructurales, requiere del conocimiento de un valor confiable del parámetro termodinámico a relacionar y de las coordenadas tridimensionales de la estructura de la molécula con un elevado grado de resolución (por debajo de 2.5 Å). En la actualidad, estos dos requerimientos son cubiertos primero, mediante el uso de técnicas calorimétricas para efectuar las caracterizaciones termodinámicas de la formación de complejos y segundo, utilizando la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear (RMN), para resolver la estructura tridimensional (3D).

Además de cubrir estos dos requisitos indispensables, el modelo de ΔC_{p_u} desarrollado para complejos P-C, incluyó la conjunción de datos con características estructurales semejantes, por lo cual también se deduce que una vez desarrollado el modelo, este solo es aplicable a moléculas o complejos proteicos que cumplan con las siguientes propiedades estructurales: incluimos únicamente proteínas que presentaran una asociación del tipo cuerpo rígido, similar al que presentan las lectinas, limitamos nuestra búsqueda a aquellos complejos a los cuales los valores termodinámicos hubieran sido resueltos mediante calorimetría de titulación isotérmica (CTI) y que incluyeran complejos que unieran monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos.

CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA EXPERIMENTAL DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE PROTEÍNA.

La Calorimetría de Titulación Isotérmica.

La absorción o liberación de calor es una propiedad intrínseca de los eventos de reconocimiento molecular. La CTI es una técnica experimental que permite medir directamente la cantidad de calor intercambiada en una reacción química. En la unión proteína-ligando a presión constante, el calor intercambiado entre el sistema y sus alrededores, equivale al ΔH_u (ver ecuación 11). Si se observa una absorción de calor de los alrededores hacia dentro del sistema, se dice que el evento es de tipo endotérmico, en cambio, una liberación de calor del sistema a los alrededores es característica de una reacción exotérmica. Dado que el calor intercambiado es proporcional al número de complejos formados, la ejecución de un protocolo convencional de saturación (titulación) del sitio de reconocimiento permite determinar a su vez la constante de unión (K_u).

En la Figura 1 se presenta un diagrama esquemático del núcleo operativo de un microcalorímetro VP-ITC (VP-Isothermal Titration Calorimeter), uno de los equipos comerciales más precisos y de mayor uso en la actualidad, para la caracterización termodinámica de sistemas proteicos [Wiseman, 1989]. El instrumento consiste de dos celdas idénticas de una aleación de níquel altamente conductora y resistente a la corrosión, rodeadas de una chaqueta adiabática. Las dos celdas se encuentran conectadas por medio de un circuito termopar cuya función es detectar pequeñas diferencias de temperatura entre las celdas. De igual forma este sistema regula la diferencia térmica entre las celdas y la pared adiabática. La celda de reacción se llena con la solución de macromolécula a estudiar que contiene el sitio de reconocimiento, a menudo a esta molécula se le denomina como receptor. Una jeringa exterior que se conecta a dicha celda inyecta alícuotas de ligando de manera automatizada. Antes de que ocurra la primera inyección se aplica una pequeña potencia constante a la celda de referencia, activándose la alimentación a la celda de muestreo para mantenerla bajo un régimen de microcalentamiento. Dicha señal constituye la línea base. Una vez

estabilizada la línea base, la inyección de una alícuota del reactante en la celda de reacción, inducirá el equilibrio químico dentro de la celda de reacción.

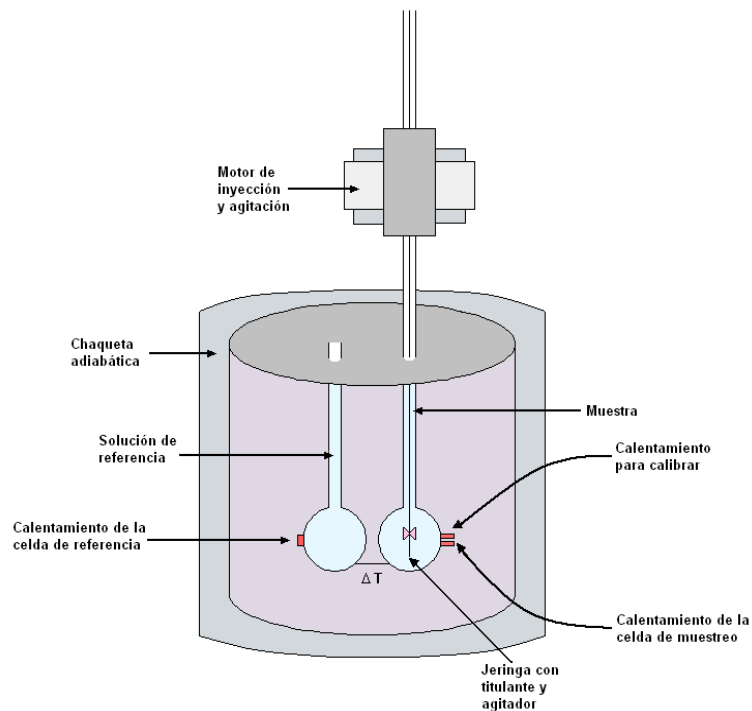


Figura 1. Diagrama esquemático de un calorímetro de titulación isotérmica (tipo VP-ITC, MicroCal Inc.). El equipo cuenta con un sistema de agitación que le permite mezclar de manera eficiente la proteína y el ligando, lo cual permite homogeneizar en forma eficiente el sistema de estudio.

En una reacción exotérmica, la temperatura de la celda donde se lleva a cabo la reacción (celda de la muestra) aumenta, induciendo una disminución de la potencia alimentada a través de las resistencias termopar, para mantener el equilibrio térmico entre las dos celdas del equipo, por el contrario, en el caso de una reacción endotérmica, la potencia administrada por el equipo se incrementa, de tal manera que ambas celdas (de referencia y de reacción) se equilibren a una sola temperatura nuevamente. El valor observable en un experimento de CTI como el descrito, corresponde a la diferencia de potencia medida en cada segundo (Figura 2, panel A). La integración de esta diferencia de potencia con respecto al tiempo nos permite determinar los calores intercambiados en cada inyección de ligando (Figura 2, panel B).

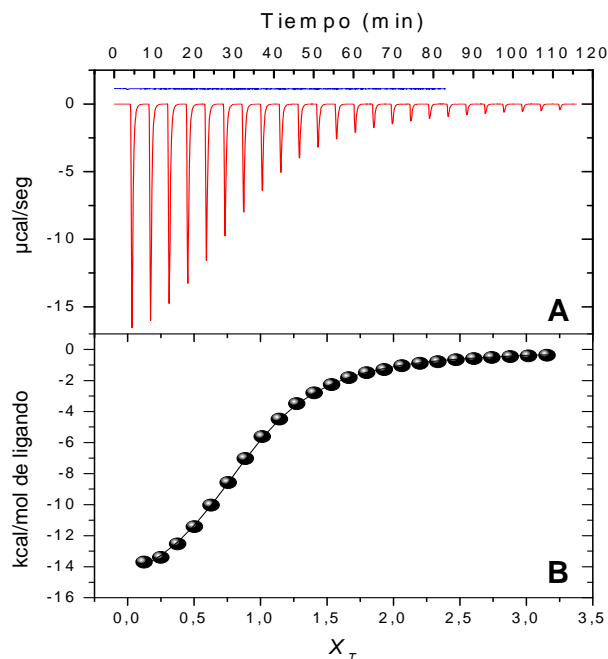


Figura 2. Perfil calorimétrico de la titulación de lisozima (0.22 mM) con quitotriosa (6.63 mM) a 15 °C, en buffer de acetatos 0.1M, pH 4.7. **A)** Trazos calorimétricos crudos del experimento de titulación: calores de titulación (rojo) y calores de dilución del ligando (azul). **B)** Curva de unión, donde se observa la saturación progresiva del sitio de reconocimiento. La línea continua corresponde al mejor ajuste de los datos experimentales a un modelo de unión simple, con estequiometría de 1:1. Los valores termodinámicos resultantes fueron: $K_u = 226,500 \pm 3,000 \text{ M}^{-1}$, $\Delta H_u = -12.89 \pm 0.07 \text{ kcal/mol}$, $\eta = 0.974 \pm 0.004$ (Chavelas, 2002).

En un experimento típico de CTI, la celda de reacción del calorímetro (de volumen fijo) contiene a la molécula receptora en solución (a una concentración conocida), la cual es titulada con la solución de ligando de nuestro interés y para el cual la molécula receptora (proteína) ha mostrado tener afinidad. La adición del ligando se efectúa mediante diversas adiciones secuenciales de pequeños volúmenes, con la finalidad de saturar progresivamente los sitios de unión presentes en la proteína. La interacción del ligando con la proteína se caracteriza por un incremento o disminución (liberación o absorción) de calor en el sistema debido a la reacción. El calor de reacción a presión constante es equivalente al cambio de entalpía de asociación entre la proteína y el ligando, su magnitud en cada inyección es también proporcional al número de complejos formados, con lo cual es posible determinar la estequiometría de la reacción y a su vez permite determinar directamente la K_u , de tal manera, que, a partir del uso de las ecuaciones 12 y 13 es posible determinar los valores de ΔG_u y el ΔS_u , a una temperatura dada.

En el caso más simple, la formación de un complejo P-L involucra un mecanismo de unión con estequiometría de 1, es decir; una molécula de proteína interactúa con una de ligando. Sin embargo, existen numerosos mecanismos de interacción en la formación de los complejos proteicos. El modelo de ajuste en un mecanismo de unión de sitios idénticos e independientes para la descripción termodinámica de la formación de complejos proteicos a partir de medidas calorimétricas directas fue previamente descrito por Wiseman *et al.* en 1989.

Modelo de unión de sitios idénticos e independientes para complejos con estequiometría de 1:η.

En la teoría del equilibrio químico, la interacción entre una proteína y un ligando determinado, puede ser descrito como:



donde η es el número de sitios de unión disponibles en la proteína (P) para un ligando determinado (L), es decir, la estequiometría. En el caso de que los sitios de unión del receptor sean idénticos e independientes, la constante de afinidad resultante es:

$$K_a = \frac{[PL_{\eta}]}{[P][L]_{\eta}} \quad (16)$$

Donde las especies moleculares resultantes de la reacción de equilibrio (expresadas en concentraciones molares) están delimitadas por corchetes.

Sabemos que la concentración total de sitios de unión ($[S_T]$) en la molécula receptora de ligandos, depende exclusivamente de la cantidad de moléculas de ligando que puede asociar, de tal manera que podemos calcular $[S_T]$ a partir de la concentración total de la molécula receptora $[P_T]$ y la relación estequiométrica que mantiene con el ligando:

$$[S_T] = \eta[P_T] \quad (17)$$

A su vez, podemos describir la concentración total de los sitios de unión y del ligando ($[L_T]$) a partir de los siguientes balances de materia:

$$[S_T] = [S] + [SL]; \quad [L_T] = [L] + [SL] \quad (18)$$

donde $[S]$ y $[L]$ son las concentraciones de los sitios de unión y de moléculas de ligando libres, respectivamente y $[SL]$ corresponde a la concentración de complejo formado. Así, la constante de equilibrio expresada exclusivamente en función de la concentración de los sitios de unión del receptor y de la concentración de ligando puede ser escrita como:

$$K_S = \frac{[SL]}{[S][L]} \quad (19)$$

La ecuación 18 a su vez puede ser escrita en términos de la fracción de sitios ocupados (Θ) y la fracción de sitios libres ($1 - \Theta$) como:

$$1 = \Theta + \frac{[S]}{[S_T]} \quad (20)$$

$$[L_T] = [L] + [P_T]\Theta \quad (21)$$

De tal manera que podemos reescribir el equilibrio de K_S , en términos de las fracciones de sitios ocupados y sitios libres:

$$K_S = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[L]} \quad (22)$$

Si sustituimos la ecuación 21 en 22 y reordenamos, tenemos que:

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{[L_T]}{[P_T]} + \frac{1}{k_S[P_T]} \right] + \frac{[L_T]}{[P_T]} = 0 \quad (23)$$

La ecuación 23 implica que el calor absorbido o liberado (q) es proporcional a la concentración de complejo recién formado dentro de la celda de reacción (de volumen fijo, V_0) luego de una inyección, de tal manera que la entalpía molar involucrada puede conocerse a partir de:

$$q = V_0 \Delta H [P_T] \Theta \quad (24)$$

Resolviendo la ecuación cuadrática (23) para Θ y substituyendo el resultado en la ecuación (24), tenemos que:

$$q = \frac{V_0 \Delta H [P_T]}{2} \left[1 + \frac{[L_T]}{[P_T]} + \frac{1}{k_S [P_T]} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L_T]}{[P_T]} + \frac{1}{k_S [P_T]} \right)^2 - 4 \frac{[L_T]}{[P_T]}} \right] \quad (25)$$

La ecuación 25, nos permite determinar el calor intercambiado en el proceso de unión, a partir de las concentraciones totales de receptor y de ligando, teniendo a la estequiometría, a la entalpía y la constante de unión como parámetros de ajuste para las curvas de titulación calorimétrica (Figura 2).

Recientemente, hemos publicado un capítulo en el libro “Advances in Protein Physical Chemistry”, en el que se describen puntualmente la derivación de este y otros modelos de ajuste de datos experimentales, y se hace una recopilación de las múltiples y novedosas aplicaciones de la CTI en el estudio de las interacciones proteicas [Pulido *et al.*, 2008] (anexo 1).

Finalmente, los valores del ΔH_u y la K_u obtenidos directamente de los datos experimentales, permiten a través de las ecuaciones 12 y 13 determinar directamente los valores del ΔG_u y el ΔS_u , disminuyendo con ello la incertidumbre asociada con los

valores termodinámicos obtenidos mediante la experimentación con técnicas espectroscópicas [Harding y Chowdhry, 2001]. Para la descripción termodinámica completa de los eventos de reconocimiento molecular, se requiere del conocimiento del valor en el cambio de la capacidad calorífica de la unión (ΔC_{p_u}). Esto se logra determinando la dependencia térmica de ΔH_u , de acuerdo con la ecuación 14 (Figura 3).

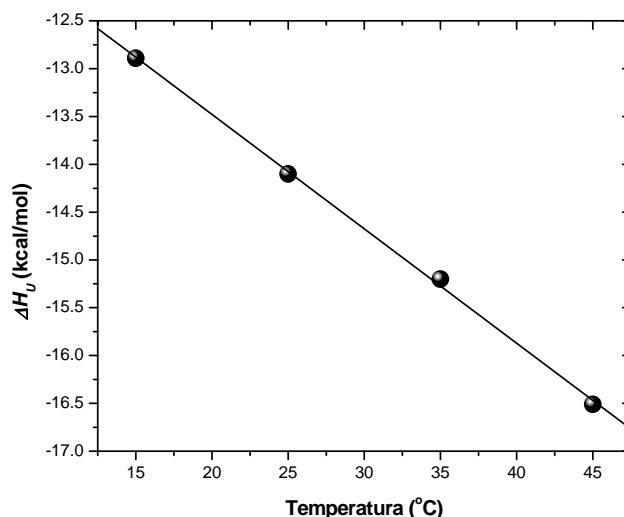


Figura. 3. Determinación calorimétrica del ΔC_{p_u} del complejo lisozima-quitotriosa a partir de cuatro valores de ΔH_u obtenidos mediante CTI a 15, 25, 35 y 45 °C. Como puede ser observado el ajuste lineal entre los puntos arroja una pendiente negativa, siendo esta el valor del ΔC_{p_u} .

La Calorimetría de Titulación Multitérmica.

Como puede deducirse de la Figura 3, el enfoque reciente para obtener el valor del ΔC_{p_u} usando como técnica experimental la CTI, es evaluando la dependencia del valor del ΔH_u a diferentes temperaturas, para ello se requiere contar con isotermas de unión a diversas temperaturas, y obtener los valores respectivos del ΔH_u . A pesar de que la obtención de los valores del ΔC_{p_u} mediante el análisis de los datos obtenidos de técnicas calorimétricas se logra directamente y esto representa una enorme ventaja en relación a las técnicas no calorimétricas (donde el ΔC_{p_u} es calculado como la segunda derivada de la constante de equilibrio), a la fecha el número de publicaciones donde reportan caracterizaciones termodinámicas de la formación de complejos proteicos, en los cuales incluyan la determinación experimental del valor de ΔC_{p_u} sigue siendo pequeño (cerca del 10% de los artículos publicados en los últimos 5 años).

Posiblemente, una de las principales razones de la escasez de los datos de ΔC_{p_u} experimentales está relacionada a limitaciones en la disponibilidad de la muestra biológica. Por ejemplo, para efectuar experimentos de CTI en complejos de baja afinidad ($K_a \leq 1 \times 10^4$), se requiere de concentraciones de varios miligramos de reactantes, para obtener parámetros termodinámicos confiables. Recientemente, se ha reportado que bajo ciertas condiciones experimentales, se pueden obtener los parámetros termodinámicos de la unión de los complejos con baja afinidad, si se satisface como mínimo el 90% de la saturación de los sitios de reconocimiento, mientras que para complejos proteicos de alta afinidad ($K_a > 1 \times 10^8$) y de afinidad moderada ($K_a > 1 \times 10^4$ y $\leq 1 \times 10^8$) el mínimo requerido es del 80% de los sitios de interacción ocupados [Turnbull y Daranas, 2003].

En otras ocasiones el costo de la expresión y purificación de proteínas a partir de cultivos celulares o directamente a partir de sus fuentes naturales imposibilita la experimentación calorimétrica de la formación de complejos. Finalmente, aunque la CTI es una técnica no destructiva (al final del experimento las moléculas siguen siendo funcionales), muchos receptores y ligandos no pueden ser reciclados convenientemente, (sobre todo en sistemas de alta afinidad) por lo cual se precisa de nuevas muestras para monitorizar los parámetros a una diferente temperatura.

Con la finalidad de atenuar esta carencia de datos de ΔC_{p_u} , en el transcurso del doctorado desarrollamos y publicamos un nuevo protocolo de calorimetría de titulación (anexo 2), el cual representa una mejora significativa en cuanto a reducción del tiempo de experimentación, al poderse determinar el ΔC_{p_u} con un solo evento de titulación. Este nuevo protocolo de experimentación el cual hemos denominado Calorimetría de Titulación Multitérmica (CTM) [Chavelas, *et al.*, 2006], consiste en ejecutar un experimento convencional de titulación escalonando la adquisición de datos a diversas temperaturas y con ellos construir una multitérma de interacción (Figura 4) a partir de la cual se pueda obtener como parámetro de ajuste el valor del ΔC_{p_u} .

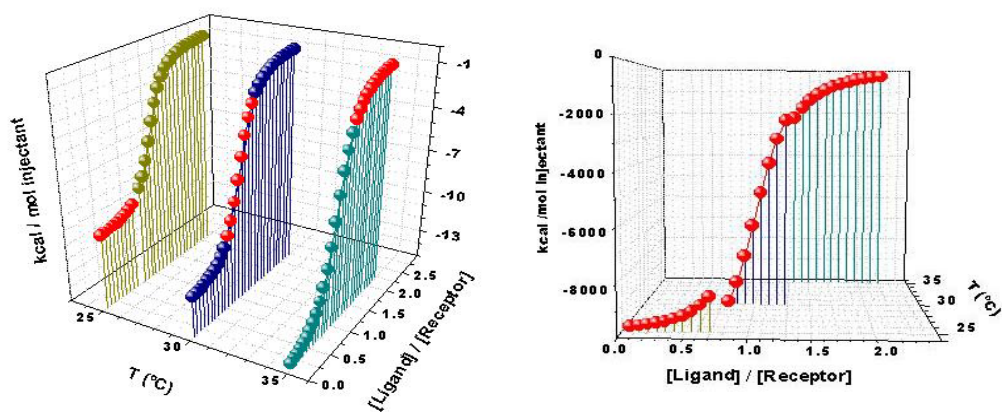


Figura 4. A) Isotérmicas de unión simuladas a tres temperaturas distintas para una interacción biomolecular con estequiometría 1:1 de afinidad moderada ($K_u(25^\circ\text{C}) = 10^5\text{M}$, $\Delta H_u(25^\circ\text{C}) = -10\text{ kcal/mol}$ y $\Delta Cp_u = -500\text{ cal/molK}$. **B)** Multiterma de unión construida como la suma de los segmentos parciales (esferas en rojo) de las tres isotérmicas de unión simuladas, presentadas en el panel A.

En los experimentos de CTM se lleva a cabo una titulación parcial de la muestra proteica contenida en la celda de reacción, con la finalidad de obtener la entalpía molar de la interacción a una temperatura determinada. Posteriormente, el experimento de titulación se detiene, a fin de cambiar la temperatura del calorímetro y reiniciar el proceso de titulación para muestrear la entalpía molar de la interacción a una nueva temperatura. La cantidad de etapas intermedias del protocolo de titulación depende en gran medida de la constante de afinidad del complejo estudiado y del volumen de ligando añadido a cada temperatura muestreada (tratando de evitar la rápida saturación de la proteína).

Finalmente, para obtener el valor del ΔCp_u a partir de un experimento de CTM, se requiere compilar los calores medidos (de todas las etapas) a diferentes temperaturas, construir la multiterma de unión (Figura 4) y ajustar los datos de ΔH_u , K_u y ΔCp_u al modelo de unión correspondiente. La dependencia térmica de los valores de ΔH_u y K_u , se puede obtener analíticamente a partir de las ecuaciones integradas de van't Hoff y de Kirchoff (ecuaciones 26 y 27, respectivamente) y substituir dichas ecuaciones integradas en los modelos de ajuste particulares, en donde TR corresponde a una temperatura de referencia con valores de ΔH_u y K_u conocidos. Los valores de ΔH_u

(T_R) y la $K_u(T_R)$ presentes en las ecuaciones 26 y 27 son obtenidos mediante un experimento convencional de CTI.

$$K_u(T) = K_u(T_R) \exp \left\{ \frac{\left([\Delta H_u(T_R) - T_R \Delta C_{p_u}] \left[\frac{1}{T_R} - \frac{1}{T} \right] + \Delta C_{p_u} \ln \frac{T}{T_R} \right)}{R} \right\} \quad (26)$$

$$\Delta H_u(T) = \Delta H_u(T_R) + \Delta C_{p_u}(T - T_R) \quad (27)$$

Así, por ejemplo para un complejo P-C en el cual la proteína (molécula receptora del ligando) tiene un solo sitio de interacción, se substituirán las ecuaciones 26 y 27 en los valores correspondientes de ΔH_u y K_u de la ecuación 25 (página 16).

PROTEÍNAS

Como se mencionó en la introducción, las proteínas son biomoléculas con una amplia funcionalidad y plasticidad molecular de los seres vivos. La síntesis de las proteínas se logra mediante la unión covalente de aminoácidos (enlace peptídico), formando cadenas lineales de estos. Con base en la cantidad de estructuración (o grado de plegamiento) de esta cadena polipeptídica naciente, se han propuesto cuatro niveles de organización estructural: **estructura primaria**: que corresponde a la cadena polipeptídica lineal, **estructura secundaria**: al valor de los ángulos dihedro (ϕ y ψ) de las secuencias de aminoácidos. A su vez, la estructura secundaria se clasifica en repetitiva y no repetitiva. Las secuencias o grupos de aminoácidos que forman estructuras con ángulos dihedro semejantes a lo largo de una corta secuencia de aminoácidos o grupos de secuencias, se denomina, estructura secundaria repetitiva. Los intervalos permitidos en la semejanza de los ángulos dihedro, fue inicialmente propuesta y establecida de acuerdo con los gráficos de Ramachandran [Ramakrishnan y Ramachandran, 1965]. Los ejemplos más comunes de estructura secundaria repetitiva son sin duda las hélices α y las hebras β . La **estructura terciaria** corresponde a su vez al empaquetamiento de los elementos de estructura secundaria en un arreglo tridimensional más compacto, proceso conocido como plegamiento proteico. Finalmente la **estructura cuaternaria**, corresponde a la interacción de una cadena polipeptídica ya plegada con alguna otra molécula de naturaleza proteica, dando como resultado la formación de oligómeros proteicos funcionales.

A nivel molecular, una característica fundamental que comparten el estado plegado de las proteínas y los complejos proteicos, son las **interacciones no covalentes** que proporcionan la estabilidad conformacional de sus estructuras. Estas fuerzas son el resultado de atracciones electrostáticas de diversa índole que identificamos como: puentes salinos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas.

Debido a que el estudio reportado en la presente tesis se centra específicamente en la formación de complejos P-L, dejaremos en este punto la discusión de las fuerzas y mecanismos que describen al plegamiento, centrándonos únicamente en la formación de complejos proteicos.

LECTINAS, PROTEÍNAS RECONOCEDORAS DE CARBOHIDRATOS.

Recientemente, se ha propuesto que los carbohidratos pueden funcionar como un sistema codificado del flujo de la información biológica similar a los códigos genómico y proteómico [Gabiús, 2000]. Esta propiedad nace del hecho de que los carbohidratos poseen una elevada capacidad de codificación estereoquímica (superior a la presentada por los nucleótidos o aminoácidos), razón por lo cual se cree han sido ampliamente utilizados en la naturaleza como etiquetas de identidad celular (como los grupos sanguíneos, los determinantes de histocompatibilidad, etc). El fundamento de esta alta capacidad de codificación estereoquímica, proviene de dos características primordiales de los azúcares. La primera es que poseen múltiples centros quirales, lo que permite disponer de una variedad de monosacáridos estereoquímicamente diferenciables a partir de un número fijo de átomos. La segunda es su capacidad de anomerización y la posibilidad de entrecruzamiento covalente en múltiples puntos de unión, que confieren a estas moléculas una elevada diversidad combinatoria estructural, por lo que a partir de un modesto número de monosacáridos es posible producir una cantidad enorme de diferentes oligosacáridos [Laine, 1997].

La lectura del llamado **código dulce** está básicamente asignada a las proteínas, macromoléculas que por su “plasticidad” molecular son capaces de generar superficies complementarias a la configuración espacial de cualquier isómero estructural. Uno de los grupos de proteínas unidoras de carbohidratos especializadas en descifrar el código azucarado, es el de las lectinas [Nilsson, 2003], cuya función principal es la de reconocer con alta especificidad las estructuras glicosídicas presentes en las superficies celulares, característica clave que las ubica como mediadoras del reconocimiento celular [Rini, 1995]. Dentro del grupo de las lectinas se encuentran proteínas o dominios proteicos que se encuentran o no glicosilados, los cuales adicionalmente

poseen sitios independientes de reconocimiento a carbohidratos. Estas proteínas no tienen actividad enzimática, ni son resultado de un evento de respuesta inmune y, quizás la única característica en común en este heterogéneo grupo de proteínas es que, para aquellas en las que se ha resuelto su estructura tridimensional, su interacción con carbohidratos es de tipo cuerpo rígido, es decir; tienen sitios de unión preformados y complementarios estereoquímicamente al ligando para el cual son específicas. La asociación de tipo cuerpo rígido puede ser identificada al comparar los valores de la desviación estándar promedio (Root Mean Square, RMS) entre las estructuras libres o asociadas, los cuales deben mantenerse dentro de la incertidumbre experimental de la resolución cristalográfica, es decir, sin cambios estructurales significativos.

Por otra parte, se ha reportado que la conformación estructural de los carbohidratos en solución es muy aproximada a la representada por el estado global de mínima energía. Adicionalmente se ha encontrado que las lectinas reconocen al carbohidrato en su conformación preferida en solución, sin generar distorsiones importantes en el ligando, como es el caso de muchas de las enzimas glicohidrolíticas [Homans y Rutherford, 1993; Pérez et al., 1994].

En la parte experimental de este trabajo, presentamos la caracterización termodinámica mediante calorimetría de titulación isotérmica (CTI) de la lectina *Concanavalina A* con uno de sus ligandos naturales, el disacárido de la manosa, α -1,2-*manobiosa*. También efectuamos la caracterización termodinámica mediante calorimetría de titulación multitérmica (CTM) de la enzima glicohidrolítica (lisozima) con su inhibidor natural de mayor afinidad, el trisacárido de la N-acetilglucosamina (NAcGlc). Dicha enzima fue previamente caracterizada mediante CTI en nuestro grupo de investigación con sus tres inhibidores naturales producto de la degradación enzimática de la quitina, el monosacárido, el disacárido y el trisacárido de la NAcGlc (también conocidos como N-acetilglucosamina, quitobiosa y quitotriosa). Finalmente, para fines de comparación y discusión incluimos en esta tesis doctoral la caracterización termodinámica de la *Concanavalina A* mediante CTI, con los monosacáridos metil glucosa y metil manosa, experimentos obtenidos como parte de

una colaboración conjunta a este proyecto [Sauceda, 2004]. Para evaluar la efectividad de la CTM en sistemas de mediana afinidad decidimos adicionalmente determinar los parámetros termodinámicos de la Concanavalina A con la metil manosa, mediante CTM y comparar los valores obtenidos previamente por CTI.

Sistema de estudio experimental, Concanavalina A

La Concanavalina A (ConA) es una lectina unidora de manosidos y carbohidratos derivados de este azúcar. Esta proteína se encuentra en forma tetramérica a pH mayor de 7 y dimérica a pH inferior a 6 [Dam y Brewer, 2002] (panel A, Figura 5). Su estructura tridimensional ha sido resuelta a diferentes grados de resolución mediante difracción de rayos X. Por citar algunos ejemplos, en su forma libre de ligando se resolvió la estructura a 298 K, con una resolución de 2 Å [Reeke *et al.*, 1975], mientras que asociada se ha resuelto su estructura con: metil-manosa, metil-glucosa, α -1,2-metilmanobiosa, α -1,2-manobiosa, manotriosa y diferentes péptidos con complementaridad estereoquímica con el sitio de unión [Moothoo *et al.*, 1999, Harrop *et al.*, 1996, Naismith y Field 1996 y Jain *et al.*, 2001, entre otros] a resoluciones que van desde los 0.94 hasta los 3.2 Å.

La forma estructurada de cada monómero de esta proteína está constituida por una cadena de 237 aminoácidos. Dicha estructura tridimensional está caracterizada por la presencia de tres hojas β antiparalelas apiladas una sobre otra formando un motivo estructural conocido como “Jelly roll” (panel B, Figura 5). Se ha reportado que esta proteína posee un sitio de unión por monómero, y asimismo que la formación de este sitio de reconocimiento requiere la presencia de iones Ca^{2+} y Mn^{2+} [Goldstein y Poretz, 1986].

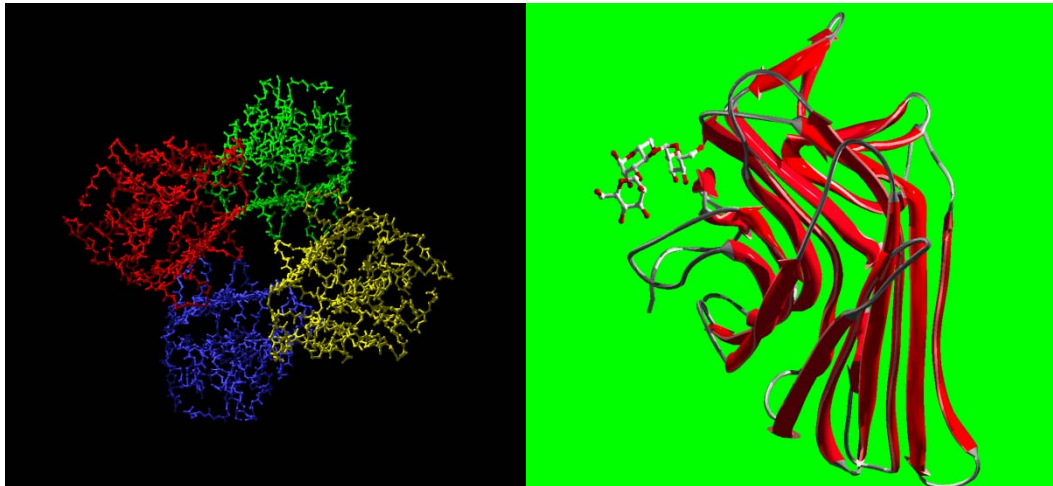


Figura 5. Representación esquemática de la Concanavalina A, preparada a partir de las coordenadas cristalográficas 1cvn del PDB, con el programa SPDBV versión 3.7b2 y generada con PovRay versión 3.1. **Panel A.** concanavalina A en forma tetramérica representada en forma de cilindros. **Panel B.** estructura del monómero representada en listones mostrando el motivo estructural “jelly-roll” y la posición espacial del ligando.

En un estudio anterior de la energética de asociación de esta proteína, se reportó que el ΔC_{p_u} de la Con A con el ligando metil-manosa fue de -90 cal/molK [Mandal *et al.*, 1994]. El valor reportado por Mandal tiene una gran incertidumbre asociada, pues éste se obtuvo mediante una regresión lineal entre únicamente dos valores distintos de ΔH_u (a 25 y 37°C). Debido a ello, decidimos caracterizar la formación de complejos de la Con A y determinar el ΔC_{p_u} con tres ligandos diferentes; la metil-glucosa, la metil-manosa y el disacárido α -1,2-manobiosa.

Sistema de estudio experimental, Lisozima de huevo de gallina

La lisozima es una enzima glicohidrolítica, agrupada dentro de las proteínas de clase estructural tipo $\alpha+\beta$ (Figura 6). Está constituida por una cadena polipeptídica de 129 aminoácidos, que contiene 4 puentes disulfuro en las posiciones 6-127, 30-115, 64-80 y 76-94, los cuales le proporcionan una gran estabilidad a su estructura en solución (estable a valores de pH desde 4 a 12) y posee punto isoeléctrico de 11. La lisozima cataliza la hidrólisis del enlace glicosídico β -1,4 de mucopolisacáridos de la pared celular compuestos de ácido N-acetilmurámico (MurNAc) y N-acetilglucosamina (NAcGlc), función conocida como N-acetilmuraminidasa. La lisozima también degrada quitina, polímero lineal de la GlcNAc con enlace glicosídico de tipo β -1,4.

Adicionalmente a su actividad hidrolítica, la lisozima puede llevar a cabo actividad de transglicosilación [Privalov, 1982., Jelesarov y Bosshard 1999].



Figura 6. Representación esquemática en listones de la lisozima mostrando a las hélices α y hebras β ocupando diferentes regiones de la estructura proteica. Adicionalmente se muestra el sitio de interacción con quitotriosa, una hendidura formada entre las hélices α y las hebras β .

El producto final de la degradación de la quitina por parte de la lisozima es una mezcla de monosacáridos, disacáridos (quitobiosa, Q2) y trisacáridos (quitotriosa, Q3) de la GlcNAc, los cuales a su vez funcionan como inhibidores naturales de la actividad enzimática compitiendo por el sitio de unión en la proteína [Cheetham *et al.*, 1992]. La estructura tridimensional de la lisozima en su forma libre y asociada con el inhibidor Q3 ha sido resuelta a 1.5 Å y, se ha reportado que, la asociación con Q3 muestra un comportamiento de cuerpo rígido [Maenaka *et al.*, 1995, Cheetham 1992]. De igual manera, las propiedades estructurales del sitio de reconocimiento son muy semejantes a las encontradas en los sitios de interacción de las lectinas [García-Hernández *et al.*, 2003].

Debido a su bajo peso molecular (14,307 daltones), facilidad de obtención y accesibilidad comercial, la lisozima ha sido utilizada para validar métodos fisicoquímicos empleados en el estudio de estructura de proteínas e investigaciones termodinámicas [Pfeil y Privalov 1976, Bjurulf y Wadsö 1972, Maenaka *et al.*, 1995]. Sin embargo, los antecedentes de los estudios calorimétricos efectuados con esta enzima y los correspondientes a la formación de los complejos con sus inhibidores

sacarídicos naturales, han arrojado datos poco precisos en parte a la baja sensibilidad del equipo utilizado, lo que había dificultado su caracterización termodinámica completa [Bjurulf y Wadsö 1972]. Esta baja sensibilidad, en particular, impidió la determinación de los valores de ΔC_p que acompañan la formación de complejos proteicos de la lisozima. Recientemente, hemos determinado el valor del ΔC_{pU} para la formación de complejos de la lisozima con el disacárido y el trisacárido de la NAcGlc mediante CTI [Chavelas 2002] (anexo 3).

MODELOS DE ADITIVIDAD SIMPLE PARA EL ΔH_u Y ΔS_u DE COMPLEJOS PROTEINA-CARBOHIDRATO

En los últimos años nuestro grupo de trabajo ha estado involucrado en el estudio de la energética asociada al proceso de reconocimiento de complejos P-C, tratando de esclarecer cuáles son las bases energético-estructurales subyacentes al fenómeno [García-Hernández *et al.*, 1997; García-Hernández y Hernández-Arana, 1999; García-Hernández *et al.*, 2000; García-Hernández *et al.*, 2003]. A partir del análisis conjunto de 10 complejos P-C (Tabla 1), se obtuvieron los parámetros adecuados para las funciones de entalpía y entropía descritas a través de las ecuaciones 1 y 2 [García-Hernández y Hernández-Arana, 1999].

Tabla 1. Base de datos energético-estructurales para complejos P-C. Las unidades de los valores de ΔG_u , ΔH_u y $-T\Delta S_u$ están expresadas en kcal/mol. Los cambios de áreas de tipo polar y no polar, están dados en Å². Por abreviación en el texto los complejos P-C son tratados individualmente de acuerdo a su código de acceso al PDB.

Proteína	Carbohidrato	Código PDB	$-\Delta G_u$	$-\Delta H_u$	$-T\Delta S_u$	$-\Delta A_{pol}$	$-\Delta A_{np}$
Heveina	GlcNAc(β1-4) GlcNAc		3.8	5.3	1.5	308.7	158.5
Heveina	GlcNAc(β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc		5.6	7.0	1.4	342.9	221.7
WGA	GlcNAc(β1-4) GlcNAc		4.9	13.5	8.6	237.0	277.0
Concanavalina A	Manα1Me	5cna	5.3	6.8	1.5	172.6	167.9
Concanavalina A	Glcα1Me	1gic	4.6	5.3	0.7	200.3	141.7
Concanavalina A	Man(α1-6) Man(α1-3) Man	1cvn	7.8	14.4	6.6	251.3	354.0
GSL	Fuc(α1-2) Gal(β1-3) Fuc(α1-4) GlcNAc	1led	6.5	11.9	5.4	312.8	344.9
Lectina de Chícharo	Manα1Me	1rin	4.6	6.5	1.9	144.5	167.0
ECL	Gal(β1-4) Glc	1lte	4.5	9.8	5.3	234.0	199.5
Lectina S	Gal(β1-4) GlcNAc	1slt	6.2	10.0	3.8	223.8	257.8

Modelo del cambio de Entalpía.

En la Figura 7 se muestra la distribución de los valores de entalpía en función del cambio en áreas superficiales para los complejos listados en la Tabla 1. La representación bidimensional de la ecuación 1 se obtuvo de su normalización por una de las variables independientes, en este caso ΔA_{np} .

$$\frac{\Delta H}{\Delta A_{np}} = \Delta h_p \frac{\Delta A_p}{\Delta A_{np}} + \Delta h_{np} \quad (28)$$

la cual se asemeja a la ecuación de una recta simple del tipo ($y = mx + b$).

De esta transformación podemos obtener una línea recta cuya pendiente (m) corresponde a la contribución entálpica de tipo polar (Δh_p), en tanto que la ordenada al origen (b) corresponde a la contribución entálpica de las áreas no polares (Δh_{np}). Para establecer una comparación entre la tendencia lineal específica de la energética estructural de los complejos P-C, se incluyeron en la figura los datos correspondientes de complejos P-P. Como puede ser observado, los dos tipos de complejos tienden a poblar regiones diferentes del espacio entálpico-estructural. El valor de Δh_p tanto para los complejos P-C como P-P es positivo, lo cual indica que el ocultamiento de grupos polares es entálpicamente favorable en ambos tipos de asociaciones. De forma similar, podemos apreciar que la contribución específica de los grupos no polares para ambos tipos de complejos es negativa (desfavorable) y la magnitud de su contribución específica, muy semejante para ambos complejos, a juzgar por los valores presentados en la Tabla 2.

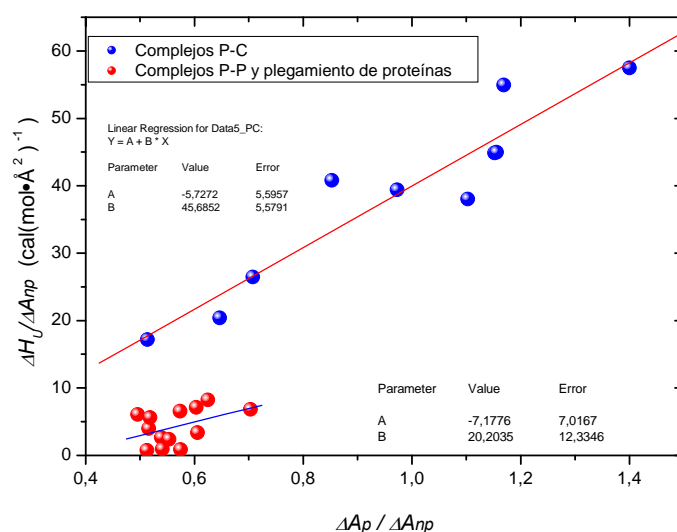


Figura 7. Entalpía de formación de complejos P-C (círculos azules) y P-P (círculos rojos) en función de cambios de área de tipo polar y no polar. Las regresiones lineales para ambos grupos de complejos proteicos, fueron reproducidas tomando los datos energético-estructurales publicados por García-Hernández (1999).

Notoriamente, el peso específico del valor de Δh_p en los complejos P-C es significativamente superior al obtenido para complejos P-P. Este resultado sugiere que las interacciones polares en los complejos P-C son determinantes en el valor del ΔH_u . [García-Hernández y Hernández-Arana, 1999].

Tabla 2. Contribuciones energético-específicas para la asociación P-C y P-P a 25°C. * Tomado de García-Hernández y Hernández-Arana (1999). † Calculado a 25 °C, usando la correlación derivada por Luque y Freire (1998). # Tomado de Amzel (1997). Las unidades para los coeficientes específicos de la entalpía Δh están dadas en cal/molÅ², mientras que para las contribuciones específicas de entropía corresponde a cal/molK Å².

	Δh_p	Δh_{np}	Δs_{pol}	Δs_{ap}	Δs_{or-t}
Unión P-C	46.1*	-5.8*	0.041*	-0.095*	-9*
Unión P-P	19.4*	-7.0*	0.030 [†]	-0.115 [†]	-10 [#]

Modelo del cambio de Entropía.

Adicionalmente, en la Tabla 2 se muestran los únicos juegos de parámetros con los que se cuenta en la actualidad para estimar el valor de la entropía de formación de complejos P-C (de acuerdo con la ecuación 2). En el caso de complejos P-C, todos los valores fueron obtenidos directamente del análisis de datos de formación de los complejos [García-Hernández y Hernández-Arana, 1999], mientras que para los complejos P-P, los parámetros de solvatación fueron derivados del análisis del plegamiento de proteínas, los cuales han logrado explicar satisfactoriamente el comportamiento de diversos complejos P-P [Edgcomb y Murphy, 2001]. El ΔS_{r-t} fue obtenido haciendo uso de la teoría celular de líquidos [Amzel, 1997].

Notablemente, los parámetros de entropía son semejantes entre ambos tipos de complejos, lo cual implica que las contribuciones entálpicas de tipo polar, son las contribuciones que sustentan la diferenciación energética de la formación de complejos P-C.

Cálculo del cambio de energía libre de Gibbs.

En la Figura 8 se muestra el ΔG_u calculado de acuerdo con la ecuación 13. Las contribuciones entálpicas y entrópicas para cada complejo P-C se estimaron usando los datos de ΔA de tipo polar y no polar, con sus correspondientes coeficientes específicos listados en la Tabla 2. La diferencia promedio entre los valores calculados y los determinados experimentalmente es de ± 1 kcal/mol. Esta incertidumbre experimental puede ser significativa en sistemas de muy baja afinidad ($K_a \leq 1 \times 10^2$), debido a que el valor del ΔG_u correspondiente para un complejo con una K_a de 100 mol^{-1} , es de 2.7 kcal/mol.

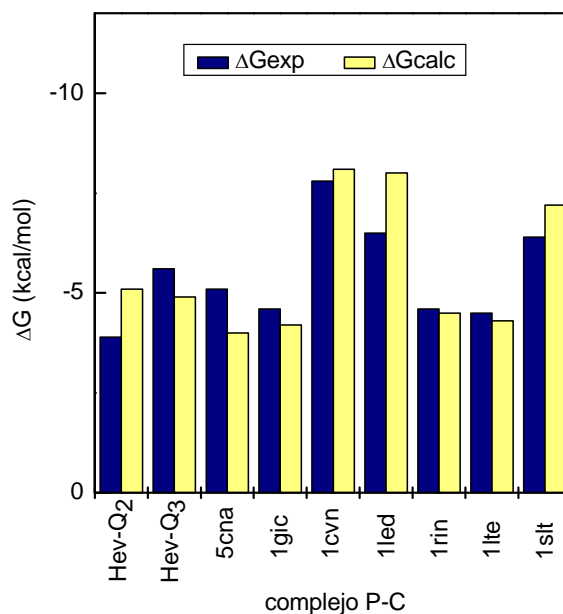


Figura 8. Estimación de la energía libre de formación para algunos complejos P-C enlistados en la Tabla 1 utilizando los parámetros de la Tabla 2. Hev-Q₂ y Hev-Q₃ representan a los complejos de heveína con quitobiosa y quitotriosa, respectivamente, en tanto que los otros complejos están representados por su código de acceso al Banco de Datos Proteicos (PDB por sus siglas en inglés).

Una conclusión importante de este estudio fue el encontrar que las magnitudes de todos los coeficientes específicos obtenidos para complejos P-C son muy similares a aquellos obtenidos para complejos P-P, con excepción de la contribución entálpica de las superficies polares (Δh_p), la cual resultó del doble de magnitud (Tabla 2) en comparación con su contraparte reportada para complejos P-P. Con base en esta mayor magnitud de Δh_p , fue planteado por vez primera, una explicación cuantitativa del alto coeficiente $\Delta H/\Delta A_t$ característico de los complejos P-C. A su vez, esta alta entalpía específica es la que de manera primaria determina la alta energía libre específica que acompaña la formación de estos complejos.

Con el propósito de entender con más detalle las bases estereoquímicas de la alta afinidad entre lectinas y carbohidratos, García-Hernández y colaboradores, efectuaron un análisis estadístico de las propiedades estructurales de las interfaces de 32 complejos de estructura 3D conocida [García-Hernández *et al.*, 2000]. El estudio mostró que las interacciones L-C han sido optimizadas estructuralmente de tal suerte que su grado de empaquetamiento es significativamente mayor al de interfaces P-P o al del interior de proteínas globulares. Además, fue mostrado que el origen de este

comportamiento está relacionado con un mayor grado de cooperatividad y mejor estereoquímica de los puentes de hidrógeno. En suma, la conclusión que emergió del estudio es que el alto valor de Δh_p observado para complejos L-C está sustentado por interacciones polares energéticamente más fuertes.

Modelo del cambio en la capacidad calorífica.

En virtud de que el grupo de complejos P-C con los cuales se llevó a cabo estos análisis, se caracteriza por una asociación tipo cuerpo rígido, el ΔC_{p_u} , una vez corregido por posibles efectos de protonación, está básicamente determinado por el cambio en la exposición (hidratación o deshidratación) al solvente de las superficies moleculares [Gómez *et al.*, 1995]. Por tanto, es posible desarrollar directamente de los datos energético-estructurales de los complejos P-C, un modelo basado en el esquema de aditividad simple separando en diversas contribuciones específicas. Considerando la ecuación 3, el punto de partida natural implica la separación de las contribuciones específicas de tipo polar y no polar. Pudiendo obtenerse dichos parámetros a partir de una regresión lineal simple, similar a la efectuada para resolver el modelo de ΔH_u .

El ΔC_{p_u} es un parámetro clave en la caracterización termodinámica de la asociación biomolecular. Este parámetro es indispensable para monitorear la distribución de la dependencia térmica de las especies moleculares resultantes de la reacción de equilibrio [Prabhu y Sharp 2005]. Éste también es un importante sensor del reordenamiento de la red de interacciones intermoleculares producto de los cambios en la accesibilidad de la superficie de los solutos al solvente [Gómez *et al.*, 1995 y Cooper 2005]. También es ampliamente conocido que la hidratación de grupos polares y no polares de proteínas, se caracterizan por cambios negativos y positivos, respectivamente, de la capacidad calorífica [Makhatadze *et al.*, 1997].

A diferencia de las demás funciones termodinámicas en donde generalmente se requiere determinar el valor de la función a una sola temperatura (usualmente a 25°C), para el caso de la determinación del ΔC_{p_u} se requiere conocer la dependencia térmica de la entalpía o entropía, es decir conocer el valor de estos parámetros evaluando su comportamiento a distintas temperaturas. Sin embargo, el número de complejos P-C

cuyo ΔC_{p_u} ha sido determinado calorimétricamente sigue siendo pequeño. Actualmente, hemos reunido una base de datos de 13 complejos P-C, para los cuales se han reportado sus coordenadas cristalográficas a un elevado grado de resolución y han sido caracterizados termodinámicamente, a partir de los cuales hemos propuesto un modelo inicial, separando en contribuciones de tipo polar y no polar (en concordancia con la ecuación 3).

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al esclarecimiento de las bases moleculares que sustentan el valor del ΔC_p en el reconocimiento proteína-carbohidrato a través del desarrollo y optimización de modelos moleculares, calibrados calorimétricamente, que relacionen de manera cuantitativa la energética de asociación con cambios en la hidratación de las moléculas interactuantes.

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterización termodinámica de la formación de 2 complejos proteicos, mediante las técnicas de CTI y CTM.

Desarrollo y en su caso refinamiento de un modelo ad-hoc de ΔC_p de complejos P-C, derivado directamente de datos estructurales y energéticos de este tipo de complejos y comparación con modelos energético estructurales propuestos en la literatura especializada.

Desarrollo de un modelo energético-estructural específico, para explicar los ΔC_p de disolución de azúcares.

Proponer un nuevo conjunto de parámetros dependientes de áreas superficiales capaces de explicar la contribución al ΔC_{p_u} asociada específicamente a grupos de proteína en la formación de complejos P-C.

Material y Metodología

PROTEÍNAS Y LIGANDOS

La Lisozima y la Concanavalina A fueron compradas a Sigma-Aldrich como proteínas con elevado grado de pureza (>98%). Las muestras proteicas de lisozima fueron preparadas utilizando un amortiguador de acetatos, concentración 50mM y pH 7.0 previamente filtrado y degasificado. La concentración de proteína fue determinada usando un coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{280} = 2.69 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En el caso de la Concanavalina A (ConA) se utilizó un amortiguador de ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin etanosulfónico (HEPES) a 50mM, 1mM de CaCl_2 , 1mM de MnCl_2 y 0.5M de NaCl, con pH 7.2, para preparar las muestras proteicas para efectuar los experimentos calorimétricos. La concentración de ConA para cada experimento se determinó usando un coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{280} = 1.37 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ de acuerdo con lo reportado previamente [Goldstein y Poretz 1986]. Posteriormente a la preparación de soluciones proteicas, éstas fueron exhaustivamente diafiltradas con un sistema Amicon™ usando una membrana de polietersulfona (PM-10,000NMWL) a una presión de 2.5-3kg/cm² de nitrógeno. La concentración de los ligandos sacarídicos para cada proteína (quitobiosa, quitotriosa para la lisozima y α -1,2-manobiosa para la Concanavalina A) fue determinada por gravimetría, es decir, fueron pesados en una balanza analítica MetLer modelo AT-250, con sensibilidad para 0.00001g y de igual manera fueron disueltos en su amortiguador correspondiente previo a los experimentos.

CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS PROTEINA-CARBOHIDRATO

La energética de asociación P-C fue determinada con alta precisión utilizando un calorímetro de titulación isotérmica VP-ITC (Microcal, Inc). Tanto para los experimentos de CTI como para los de CTM, la solución en la celda de reacción fue sometida a una agitación constante de aproximadamente 400rpm. Se juzgó que la línea base alcanzó la estabilidad apropiada cuando el rmsd (del inglés, root mean square deviation) fue menor de 0.5 ncal/s. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado para disminuir la incertidumbre de los valores reportados. Adicionalmente, se efectuaron experimentos colocando en la celda de reacción únicamente solución amortiguadora, esto con la finalidad de conocer los calores de disolución del ligando. Para ello, se utilizó el mismo protocolo de titulación correspondiente a cada temperatura y muestra proteica analizada. El calor de dilución del carbohidrato obtenido en estas condiciones fue sustraído de los calores desprendidos de la titulación de la proteína y su respectivo ligando. En el caso de los experimentos de CTM, el ajuste de los datos experimentales se logró mediante la substitución de las ecuaciones 26 y 27 en la ecuación 25, lo cual nos permite ajustar los datos típicos de una titulación multitérmica de una proteína con sitios de unión idénticos e independientes.

Cálculo del ΔC_p de solvatación ($\Delta C_{p_{solvat}}$) de carbohidratos.

El ΔC_p de solvatación de carbohidratos se obtuvo mediante la resta entre los valores del estado sólido ($C_{p_{sólido}}$) y los valores del carbohidrato en solución acuosa ($C_{p_{disol}}$). Las capacidades caloríficas volumétricas a presión constante de las soluciones azucaradas ($C_{p_{disol}}$), fueron determinadas con un microcalorímetro diferencial de Flujo "Picker" [Susset 1973] modelo CP-C con sensibilidad de 5×10^{-5} J/cm³K. El diseño del equipo cuenta con dos celdas, una de muestra y otra de referencia, en el cual fluyen simultáneamente dos líquidos (el que contiene la muestra y la solución amortiguadora) a una misma temperatura, empleando para ello una bomba peristáltica. Mediante sensores y calentadores colocados en cada celda, se mantiene constante la

temperatura entre ambas o bien sean calentadas simultáneamente. Debido a la diferencia de capacidades caloríficas de ambas soluciones, el equipo registra la cantidad de energía necesaria (ΔW) para mantener la misma temperatura en ambas celdas. Las capacidades caloríficas específicas fueron transformadas a base molar ($C_{p,m}$), usando las concentraciones molares calculadas a partir de las masas molares conocidas para cada carbohidrato. Finalmente, el valor del C_p a dilución infinita se calculó evaluando la dependencia lineal de los valores de $C_{p,disol}$ a diversas concentraciones molares.

Por otra parte, el valor del C_p en estado sólido fue determinado mediante un calorímetro diferencial para sólidos. Las mediciones correspondientes fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Miguel Costas (comunicación personal).

Cálculo de áreas superficiales accesibles al solvente.

Las áreas superficiales accesibles al disolvente (ΔA) fueron calculadas con NACCESS [Hubbard 1993] una versión computarizada del algoritmo de Lee y Richards [Lee y Richards 1971] usando un radio de prueba de 0.14nm, un ancho de rodaja de 0.01nm y los radios de van der Waals estimados por Chothia de moléculas de proteína para átomos de C, N, H, y O [Chothia 1976]. Basándonos en los radios reportados para estos átomos, la asignación de los radios de van der Waals para los átomos de los carbohidratos se efectuó en función de su tipo de hibridización. En este estudio, los cambios en área superficial accesible al disolvente (ΔA) fueron determinados como la suma de los cambios de área polar (ΔA_p), los cuales fueron obtenidos del cambio de área accesible de nitrógenos y oxígenos; y los cambios de área no polar (ΔA_{ap}), que fueron calculados de la contribución de átomos de azufre y carbono. Los cambios totales del área accesible al disolvente correspondientes con la formación del complejo fueron determinados como la diferencia entre el área superficial accesible al solvente del complejo proteína-ligando y la suma de las áreas de la proteína y el ligando libres (ecuación 29).

$$\Delta A_{(total)} = A_{(complejo)} - [A_{(proteína)} + A_{(ligando)}]. \quad (29)$$

Estructuras moleculares.

Las coordenadas tridimensionales de los complejos proteína-carbohidrato utilizadas en el análisis termodinámico estructural fueron obtenidas del Banco de Datos de Proteínas (PDB). Todas las estructuras seleccionadas para conformar nuestra base de datos, corresponden a las formas silvestres de cada proteína y han sido obtenidas con un alto grado de resolución (menor a 2.5 Å). El cálculo de áreas accesibles al solvente fue llevado a cabo a partir de datos estructurales para el complejo proteico asumiendo una interacción de tipo cuerpo rígido. Las estructuras de la proteína y el ligando libres fueron generadas a partir de las coordenadas respectivas del complejo. A excepción de los complejos de la heveína con quitobiosa y quitotriosa, los cuales fueron resueltos por resonancia magnética nuclear, todas las estructuras utilizadas en este estudio fueron obtenidas mediante cristalografía de rayos X. El código (PDB) de acceso para los complejos que conforman la base de datos fueron: para la lisozima en complejo con quitotriosa, *1lzb*; para la lisozima en complejo con quitobiosa se utilizó la misma estructura (*1lzb*), borrando las coordenadas correspondientes al tercer monómero de la quitotriosa, para la concanavalina A en complejo con metilmanosa, *5cna*; en complejo con manotriosa, *1cvn*; en complejo con metilglucosa, *1gic*; y en complejo con α 1,2-manobiosa, *1i3h*; para los módulos 9 de unión a carbohidrato de la Xilanasa de *Thermotoga maritima* en complejo con glucosa y cellobiosa, las estructuras correspondientes fueron *1i8a* y *1i82*, mientras que las estructuras para los módulos 4 de unión a carbohidrato de la Xilanasa de *Thermotoga maritima* en complejo con el pentasacárido y hexasacárido de la glucosa, fueron obtenidas de *1gu3* y *1gui*, respectivamente, en el caso de la lectina de *Dioclea grandiflora* en complejo con manotriosa, la estructura fue *1dgl* y finalmente la lectina CVIII en complejo con metilfucosa fue tomada de *2boi*.

Resultados y Discusión

CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE COMPLEJOS P-C MEDIANTE CTI.

Complejos de lisozima

Como mencionamos en la sección de antecedentes, previamente hemos caracterizado mediante CTI, la termodinámica de asociación de la lisozima de huevo de gallina con sus inhibidores catalíticos naturales derivados de la degradación de la quitina [García-Hernández *et al.*, 2003]. En la Figura 9, se muestra el termograma de titulación obtenido para la formación del complejo lisozima-Q₃ a 25°C. Del panel A de la Figura 9 es posible deducir que la reacción de asociación lisozima-Q₃ es exotérmica, pues se observa que en cada una de las adiciones del ligando una cantidad proporcional de calor es liberada al sistema (representada por cada uno de los picos). Esta señal se registra como la diferencia de potencia ($\mu\text{cal/s}$) entre las celdas de reacción y de referencia con respecto al tiempo (tiempo necesario para que el equipo recupere el equilibrio térmico entre ambas celdas y restablezca la línea base, Figura 9A). Cada pico formado es proporcional a la diferencia de potencial generado después de la adición de un volumen conocido (una alícuota) de ligando a la muestra de proteína. La integración de esta diferencia de potencia (área bajo la curva) con respecto al tiempo nos da la cantidad de energía calórica total intercambiada en cada inyección. Finalmente, la isoterma de titulación (Figura 9B) es generada al graficar estos calores contra el cociente de las concentraciones totales de ligando y proteína (X_R).

Con la finalidad de sustraer la contribución calórica generada por la disolución del azúcar en la solución amortiguadora, se efectuaron “experimentos blanco” para cada experimento de titulación independiente (a diferente temperatura). Estos calores de disolución fueron sustraídos a los valores de unión entre la proteína y el ligando. Como se puede observar en la Figura 9A, los calores de dilución del ligando presentaron una magnitud despreciable en comparación con los calores obtenidos en

la formación del complejo (menor del 0.5% del área del primer pico, donde la cantidad de sitios disponibles para interactuar con el ligando es mayor).

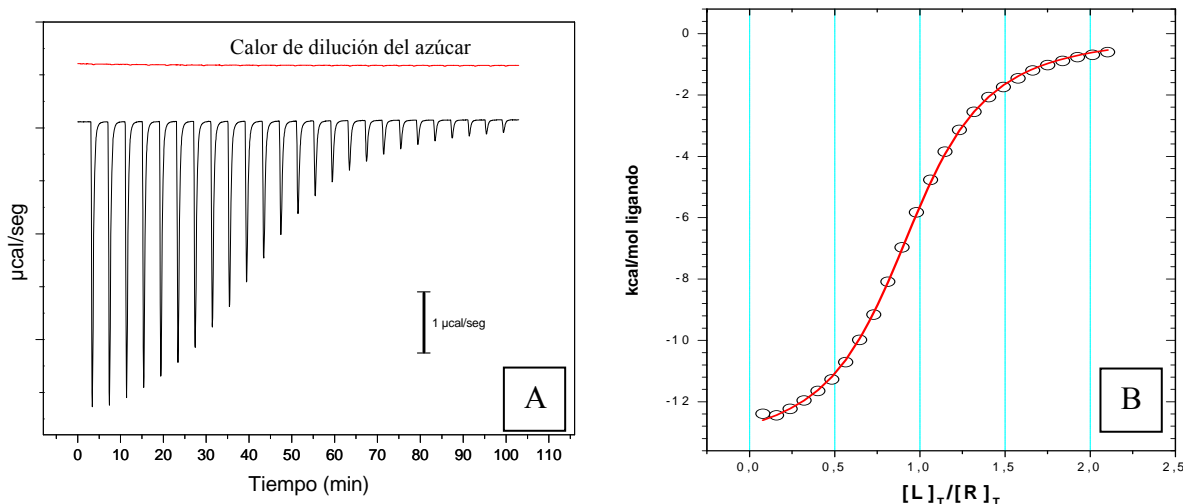


Figura 9. Termograma de asociación L-Q₃ a 25 °C en amortiguador de acetatos 0.05M pH 4.7, generado mediante CTI. Panel A. Diferencia de potencia vs tiempo, la línea en color rojo representa la diferencia de potencia debida a la dilución del ligando en una solución amortiguadora sin proteína. Panel B. Isotherma de titulación, construida mediante la integración de cada uno de los picos registrados en el panel A, así, cada círculo representa el valor integrado del calor liberado al sistema en cada inyección de ligando. El ajuste de los datos, representado por la línea roja, se efectuó utilizando la ecuación 25 [datos tomados de Chavelas 2002].

Diferentes curvas de titulación corregidas con sus respectivos blancos fueron obtenidas a 15, 25, 35 y 45 °C para los complejos lisozima-Q₃ y lisozima-Q₂, mientras que para el complejo lisozima-Q₁, sólo se determinó a 25 °C, debido a la baja constante de unión. La magnitud de los parámetros ΔH_u , ΔS_u , ΔG_u y η obtenidos del ajuste de cada una de las isothermas son mostradas en la Tabla 3. Como puede observarse, la principal contribución favorable al valor del ΔG_u , proviene del ΔH_u , el cual tiene un signo negativo, mientras que la contribución entrópica es desfavorable (con signo positivo). Este comportamiento energético es consistente con lo observado para complejos lectina-carbohidrato (Tabla 1). Finalmente, a partir de la relación lineal entre el valor de ΔH_u con respecto a la temperatura (ecuación 14), se pudo determinar el valor de ΔC_{p_u} experimental para los complejos lisozima-Q₃ y lisozima-Q₂ (Figura 10).

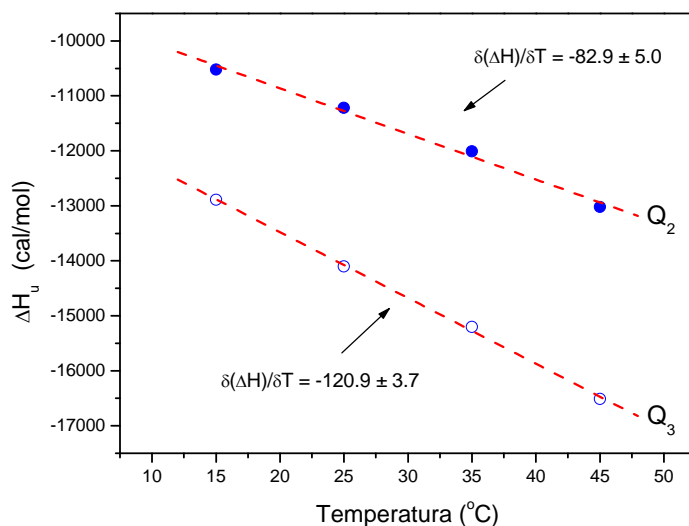


Figura 10. Dependencia térmica del ΔH_u del complejo lisozima-Q₂ (símbolos llenos) y lisozima-Q₃ (símbolos vacíos).

Como puede ser observado en la Tabla 3, todas las estequiometrías resultantes en cada experimento independiente (número de sitios de unión por molécula de proteína,) resultaron muy cercanas a la unidad. Estos resultados, además de evidenciar la alta sensibilidad del aparato y el pequeño margen de error con el que son determinados los parámetros termodinámicos de la unión, concuerdan con la estequiometría propuesta (un solo sitio de unión) a partir de la resolución de estructura tridimensional del complejo bajo las mismas condiciones experimentales (amortiguador de acetatos 0.05M pH 4.7), [Maenaka *et al.*, 1995]. Adicionalmente, los parámetros termodinámicos obtenidos del ajuste a cada temperatura, son concordantes con los obtenidos previamente por [Bjurulf y Wadsö, 1972].

Tabla 3. Valores termodinámicos de la Titulación Isotérmica para complejos lisozima-Qn, en amortiguador de acetatos 0.05M pH 4.7. ΔH , ΔG y ΔS están en cal/mol, mientras que ΔC_p está dado en cal/molK. En la tabla también son mostrados en azul los valores previamente reportados por Bjurulf y Wadsö, 1972.

<i>Ligando</i>	<i>T(°C)</i>	ΔH_u	ΔG_u	ΔS_u	ΔC_{p_u}	η	K_a
Q₃	15	-12890	-7072	-20.2		0.975	2.22 x 10 ⁵
	25	-13970	-6997	-23.4		0.986	1.334 x 10 ⁵
	35	-15200	-6819	-27.2	-121±4	0.968	6.771 x 10 ⁴
	45	-16510	-6579	-31.2		0.973	3.28 x 10 ⁴
Q₂	15	-10520	-5165	-18.6		0.983	8272
	25	-11220	-4988	-20.9		0.990	4533
	35	-12010	-4756	-23.5	-83±5	0.990	2364
	45	-13020	-4532	-26.7		0.990	1299
Q₁	25	-6548	-2141	-14.8	n.d.	1	37
Wadsö Q₃	25	-13575	-6883	-22.5			
Wadsö Q₂	25	-10588	-5043	-18.8			

Complejos de Concanavalina A

En forma similar, mediante un proyecto en colaboración con un grupo de investigación de la facultad de química de la UNAM, se logró la caracterización termodinámica de la asociación de la Con A con metilglucosa y metilmanosa (resultados publicados en la tesis de maestría de Jimena Saucedo Peña, [Saucedo, 2004]). Los parámetros termodinámicos de la unión de la Con A con estos dos ligandos (incluyendo la determinación experimental del ΔC_p) fueron determinados efectuando experimentos de unión en un amortiguador de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico (HEPES) 50mM, 1mM de $CaCl_2$, 1mM de $MnCl_2$ y 0.5M de NaCl, a pH de 7.2 (Tabla 4). Como puede observarse de los datos enlistados en la tabla, los experimentos fueron llevados a cabo en un intervalo de temperatura de 15 a 37 °C.

En forma paralela, en el transcurso de proyecto de doctorado obtuvimos los parámetros termodinámicos de la interacción de la Con A con el disacárido α ,1-2 manobiosa mediante CTI, a 6 temperaturas diferentes. Los valores de ΔH_u , ΔS_u , ΔG_u y η obtenidos del ajuste de cada una de las isotermas están enlistados en la Tabla 5. Como puede deducirse de los valores negativos de la entalpía, el complejo Con A- α ,1-2 manobiosa está dirigida entálpicamente (valores negativos de ΔG_u y ΔH_u), mientras que las contribuciones entrópicas son desfavorables a la unión, resultados concordantes con el comportamiento energético característico de la formación de complejos lectina-carbohidrato.

Tabla 4. Valores termodinámicos de la interacción de complejos ConA-metilmanosa y ConA-metilglucosa, en amortiguador HEPES 0.05 M, CaCl₂, MnCl₂ 1mM, NaCl 0.5M, pH 7.2. Los valores de ΔH_u y ΔG_u están dados en cal/mol, mientras que el $T\Delta S_u$ y el ΔC_{p_u} están expresados en cal/molK.

<i>Ligando</i>	<i>T(°C)</i>	ΔH_u	ΔG_u	$T\Delta S_u$	ΔC_{p_u}	η	K_a
Metil manosa	15	-8131	-5309	-2822		1	1.07×10^4
	20	-8574	-5286	-3288		1	8.74×10^3
	25	-8999	-5239	-3760	-53±6	1	6.93×10^3
	30	-9082	-5243	-3839		1	6.05×10^3
	37	-9348	-5246	-4102		1	4.97×10^3
Metil glucosa	15	-5943	-4595	-1348		1	3.06×10^3
	20	-6066	-4594	-1472		1	2.66×10^3
	25	-6329	-4567	-1762	-37±5	1	2.23×10^3
	30	-6518	-4548	-1970		1	1.90×10^3
	35	-6551	-4569	-1982		1	1.66×10^3

Tabla 5. Valores termodinámicos de la interacción de complejos ConA- α ,1-2manobiosa, en amortiguador HEPES 0.05 M, CaCl_2 , MnCl_2 1mM, NaCl 0.5M, pH 7.2. Las unidades del ΔH_u , ΔG_u y ΔS_u están en cal/mol, mientras que ΔC_{p_u} está dado en cal/molK. La magnitud de los valores termodinámicos enlistados en esta tabla, representa el valor promedio obtenido de 3 experimentos en similares condiciones a cada temperatura.

<i>Ligando</i>	$T(^{\circ}\text{C})$	ΔH_u	ΔG_u	$T\Delta S_u$	ΔC_{p_u}	η	K_a
α-1,2 manobiosa	20	-9106	-6315	-2791		1.01	5.11×10^4
	25	-9643	-6289	-3354		1.08	3.90×10^4
	30	-9661	-6235	-3426		1.03	3.11×10^4
					-67\pm2		
	35	-10175	-6189	-3986		1.11	2.45×10^4
	40	-10480	-6127	-4353		1.04	1.81×10^4
	45	-10915	-6118	-4797		1.03	1.47×10^4

En forma similar el valor de ΔC_{p_u} del complejo ConA- α 1,2-manobiosa se obtuvo determinando la dependencia lineal del ΔH_u contra la temperatura (Figura 11).

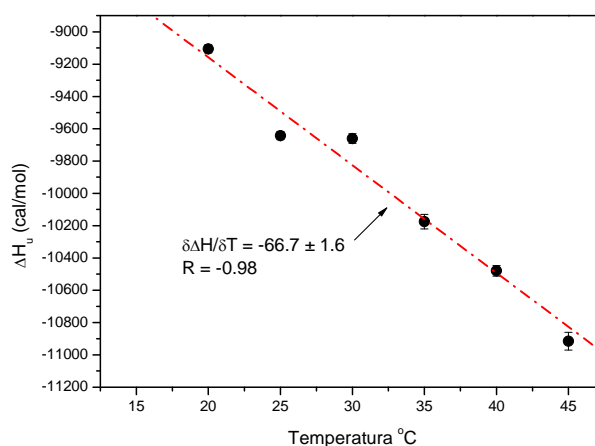


Figura 11. Dependencia térmica del cambio de entalpía de asociación del complejo ConA- α 1,2 manobiosa.

CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE COMPLEJOS P-C MEDIANTE CTM

En el transcurso del doctorado desarrollamos un nuevo protocolo de calorimetría de titulación para obtener los parámetros termodinámicos en un solo experimento, el cual representa una mejora significativa en cuanto a reducción en el costo y el tiempo de experimentación. Con dicha metodología (denominada Calorimetría de Titulación Multitérmica, CTM) nos fue posible determinar el valor de la K_a , el ΔH_u , la η y el ΔC_{p_u} en un experimento único para los complejos: lisozima-Q₃ (un sistema de afinidad moderada) [Chavelas *et al.*, 2006] y ConA-metilmanosa (un sistema de baja afinidad), previamente caracterizados en nuestro grupo de investigación.

La Figura 12 muestra una multiterma de titulación construida con datos colectados a tres temperaturas diferentes para el complejo lisozima-Q₃. Para determinar los valores termodinámicos promedio de la unión lisozima-Q₃, experimentos de CTM fueron hechos por triplicado para evaluar la reproducibilidad de esta nueva metodología (Tabla 6).

Como puede observarse, el valor de ΔC_{p_u} resultante del ajuste de los datos de CTM para el complejo lisozima-Q₃ substituyendo las ecuaciones 26 y 27 en la ecuación 25, fue de -121 ± 2 (cal/mol K), el cual dentro de la incertidumbre experimental es idéntico al obtenido mediante el método convencional de CTI (-119 ± 3 cal/mol K).

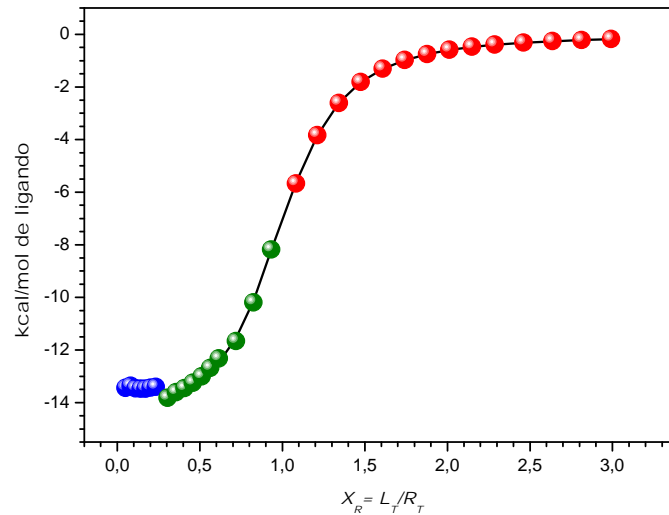


Figura 12. Multiterma de titulación a partir de la cual se determinaron caloriméricamente los valores de ΔC_{p_u} del complejo lisozima-Q₃, mediante calorimetría de titulación multitérmica. Tres temperaturas fueron muestreadas: 15 (azul), 25 (verde) y 35 (rojo) °C.

En forma similar el valor promedio de ΔC_{p_u} obtenido a partir de 2 experimentos de CTM para el complejo ConA-metilmanosa fue de -51.5 ± 3 cal/molK, mientras que a partir de datos de experimentos por triplicado de CTI, el valor obtenido fue de -52.5 ± 6 cal/molK (Tabla 6). Estos resultados indican que la metodología de la CTM tiene un gran potencial para el estudio de sistemas proteicos.

Tabla 6. Valores termodinámicos de la formación de complejos de Lisozima-Q₃ y ConA-metilmanosa medidos por CTM, en amortiguador de acetatos 0.05M pH 4.7 y HEPES 0.05 M, CaCl₂, MnCl₂ 1mM, NaCl 0.5M, pH 7.2, respectivamente. Las unidades del ΔH_u , ΔG_u y ΔS_u están en kcal/mol, mientras que ΔC_p_u está dado en cal/molK.

Método	η	K _a	ΔH_u	$-T\Delta S_u$	ΔG_u	ΔC_p_u
Sistema Lisozima-Q₃						
CTM1	1.01 ±0.00	68300 ±1500	-15.00 ±0.07	8.18	-6.82	-120 ±8
CTM2	1.00 ±0.00	64000 ±1500	-15.18 ±0.15	8.40	-6.78	-121 ±15
CTM3	1.04 ±0.01	64300 ±2500	-15.45 ±0.19	8.67	-6.78	-123 ±21
Promedio	1.02	65500	-15.21	8.42	-6.79	-121
1 d.s.	0.02	2400	0.23	0.25	0.02	2
CTI	0.97 ±0.01	68700 ±2300	-15.20 ±0.10	8.38	-6.82	-119 ±3
Sistema ConA- Meman						
CTM1	1.01 ±0.01	8735 ±373	-7.78 ±0.06	2.40	-5.38	-49.4 ±11
CTM2	0.89 ±0.01	8802 ±272	-7.91 ±0.07	2.53	-5.38	-53.5 ±12
Promedio	0.94	8769	-7.85	2.46	-5.38	-51.5
1 d.e.	0.11	47.4	0.09	0.09	0.00	3
CTI	1.13	9260 ±100	-7.66 ±0.03	2.68	-5.41	-52.5 ±6

DESARROLLO DE UN MODELO ENERGÉTICO-ESTRUCTURAL DE COMPLEJOS P-C PARA ESTIMAR LOS VALORES DEL ΔC_{p_u} .

Modelo inicial para estimar el valor del ΔC_{p_u}

Para el desarrollo de un modelo paramétrico con el cual sea posible estimar el valor del ΔC_{p_u} en la formación de complejos P-C [García-Hernández *et al.*, 2003], usamos inicialmente los datos energético-estructurales de 7 complejos (Tabla 7) para los cuales se había determinado el valor experimental de ΔC_{p_u} mediante CTI y, a la vez, sus estructuras en forma libre y acomplejada se habían resuelto con un elevado grado de resolución (resoluciones menores a 2.5 Å). Como se presenta en la Tabla 7, los datos energético-estructurales de los complejos de lisozima, fueron conjuntados con los de los complejos L-C, para el desarrollo de la parametrización del ΔC_{p_u} de complejos P-C, la decisión fue tomada en vista de la similitud estructural de los complejos de lisozima con los de las lectinas y la concordancia energético-estructural demostrada, previamente, en el desarrollo del modelo del ΔH_u descrito anteriormente [García-Hernández y Hernández-Arana, 1999].

En este modelo inicial del ΔC_{p_u} , decidimos efectuar una separación de las contribuciones específicas en base a la polaridad de los grupos químicos participantes en el reconocimiento, de acuerdo con la ecuación 3 (contribuciones polares y no polares). Dicha partición fue hecha en concordancia con las particiones propuestas por otros grupos de investigación y, a su vez, con la finalidad de tener un punto de comparación adecuado con las particiones hechas anteriormente [Murphy y Gill, 1990; Hilser *et al.*, 1996; Pace y Laurents, 1989; Spolar *et al.*, 1992; Makhatadze *et al.*, 1997]. Una justificación adicional para hacer esta partición es que se tienen evidencias claras de que los grupos polares y no polares en moléculas pequeñas contribuyen de manera inversa (signo positivo y negativo, respectivamente) a la capacidad calorífica específica tanto en el plegamiento de proteínas como en la formación de complejos de proteína [Gallagher, 2002].

La actual carencia de una parametrización adecuada para estimar el valor del ΔC_{p_u} de complejos P-C, generada directamente de datos estructurales y termodinámicos de proteínas, es debida a que aún se cuenta con muy pocos sistemas con estructura tridimensional conocida y cuyo valor de ΔC_{p_u} haya sido determinado experimentalmente. Por ejemplo, hasta la fecha de publicación de nuestro primer modelo de ΔC_{p_u} se habían caracterizado tan sólo siete complejos P-C para los cuales se habían reportado datos experimentales del ΔC_{p_u} (Tabla 7), y de estos complejos P-C, cuatro habían sido caracterizados en nuestro grupo de investigación, y los tres restantes fueron tomados de la literatura. Con estos datos resolvimos un modelo inicial basado en la ecuación 3, en donde se efectuó una separación de los coeficientes específicos por tipo de área polar y no polar, resultando en:

$$\Delta C_p = 0.23 \pm 0.03 (\Delta A_p) + 0.07 \pm 0.02 (\Delta A_{np}). \quad (30)$$

Tabla 7. Cambios de capacidad calorífica y de accesibilidad de área en la formación de complejos lisozima-Qn a 25 ° C. Las unidades para los cambios de área están expresadas en Å² y las unidades de los valores de $\Delta C_{p,u}$ son cal/molK. Los valores de ΔC_p calc en azul, son los valores predichos del ΔC_p exp para complejos P-C que no fueron utilizados para resolver los parámetros específicos de nuestro modelo inicial.

	Proteína	Ligando	ΔA_p	ΔA_{np}	$\Delta C_{p,p}$	$\Delta C_{p,np}$	$\Delta C_{p,calc}$	$\Delta C_{p,exp}$
Lisoz-Q₃	Lisozima	Trímero de la NAcGlc	-376	-373	-85.5	-26.1	-112.6	-120
Lisoz-Q₂	Lisozima	Dímero de la NAcGlc	-284	-284	-65.3	-19.9	-85.2	-83
Hev-Q₃	Heveina	Trímero de la NAcGlc	-222	-343	-51.1	-24.0	-75.1	-83
Hev-Q₂	Heveina	Dímero de la NAcGlc	-158	-309	-36.3	-21.6	-58	-64
ConA-Man3	Concanavalina A	Trímero de la manosa	-354	-251	-81.4	-17.6	-99	-109
ConA-MeMan	Concanavalina A	2-Metil manosa	-168	-173	-38.6	-12.1	-50.8	-48
CBD Xyl-Glc2	Dominio de unión a Carbohidratos de la Xilanasa	Dímero de la Glucosa	-237	-290	-54.5	-20.3	-74.8	-67
1DGL-Man3	Lectina de Dioclea grandiflora	Trímero de la manosa	-348	-229	-80.0	-16.0	-96	-96
ConA-MeGlc	Concanavalina A	2-Metil glucosa	-143	-197	-32.9	-13.8	-46.7	-37
ConA-α1,2-manobiosa	Concanavalina A	Dímero de la manosa (α 1,2)	-240	-209	-55.2	-14.6	-69.8	-68

De acuerdo a este modelo (ecuación 30), el valor final de $\Delta C_{p,u}$ depende particularmente de las contribuciones de tipo polar, comportamiento similar al encontrado en el modelo de ΔH_u . Ambas parametrizaciones (ΔH_u y $\Delta C_{p,u}$), indican que la desolvatación e interacción respectivamente, de grupos de átomos de tipo polar en los complejos P-C, contribuyen en mayor medida al valor final de ambos parámetros termodinámicos en comparación con las contribuciones de tipo no polar. Desde el punto de vista estructural, podemos asumir que la selección natural ha llevado al establecimiento de complejos P-C óptimos en los cuales los sitios de reconocimiento han complementado estereoquímicamente los grupos polares presentes en los carbohidratos. Por tanto, no es sorprendente, que el uso de los coeficientes específicos obtenidos en parametrizaciones generadas con datos de compuestos modelo o del plegamiento proteico (Tabla 8) para estimar los valores de $\Delta C_{p,u}$ en complejos

proteicos, presenten considerables diferencias entre los valores experimentales de complejos P-C y los calculados (Figuras 12 y 13).

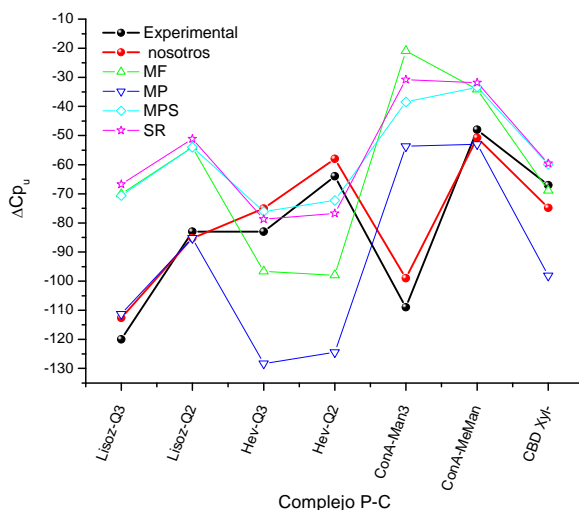


Figura 12. Comparación de los valores de ΔC_{p_u} obtenidos experimentalmente (esferas negras) con los estimados a partir de los modelos semiempíricos basados en ΔA . Los valores estimados utilizando la parametrización derivada a partir de datos estructurales de complejos P-C, son representados en esferas rojas y las parametrizaciones basadas en compuestos modelo propuestas por MF, Murphy and Freire (1992) en triangulos verdes; SR, MP, Makhatadze and Privalov (1995) en triangulos azules; MPS, Myers, Pace and Scholtz (1995) en rombos color cyan y SR, Spolar and Record (1992) en estrellas color magenta.

Tabla 8. Coeficientes específicos de capacidad calorífica para áreas accesibles al solvente de tipo polar y no polar. Las unidades para cada uno de estos coeficientes están dadas en $\text{cal/molK}\text{\AA}^2$. Las parametrizaciones propuestas por diversos grupos de investigación están basadas en la solución de la ecuación 3. **MF**, parametrización propuesta por Murphy y Freire (1992); **SR**, por Spolar y Record (1992); **MP**, por Makhatadze y Privalov (1995); y **MPS**, por Myers, Pace y Scholtz (1995).

	$\Delta c_{p,p}$	$\Delta c_{p,np}$
MF	-0.26 ± 0.03	0.45 ± 0.02
MP	-0.21	0.51
MPS	-0.09 ± 0.3	0.28 ± 0.12
SR	-0.14 ± 0.04	0.32 ± 0.04

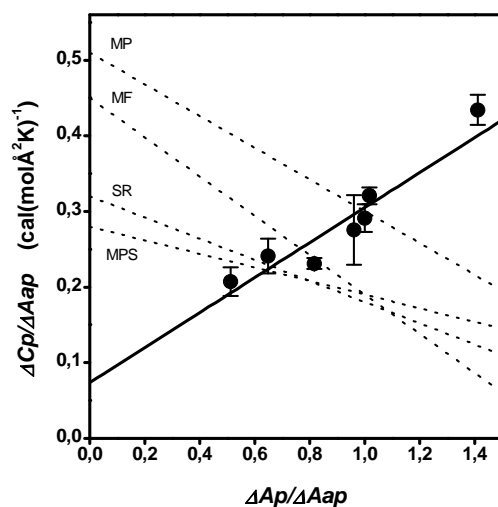


Figura 13. Cambios de capacidad calorífica para la formación de complejos P-C como función de los cambios de áreas de tipo polar y no polar (círculos llenos). Los valores para el ΔC_p (cal/molK), y los ΔA_p (Å²) y ΔA_{np} (Å²) de cada uno de los siete complejos utilizados para generar la parametrización inicial. La línea sólida, representa el ajuste lineal de los datos por mínimos cuadrados ($\chi^2 = 0.0024$). Las líneas punteadas corresponden a cuatro parametrizaciones distintas reportadas por diversos grupos de investigación de acuerdo a la ecuación 3, MF, Murphy and Freire (1992); SR, Spolar and Record (1994); MP, Makhatadze and Privalov (1995); MPS, Myers, Pace and Scholtz (1995).

Así, los valores calculados utilizando los parámetros específicos derivados de compuestos modelo en comparación con los calculados directamente de coeficientes específicos propios de datos P-C, nos sugiere nuevamente la necesidad de contar con modelos *ad-hoc* de ΔC_p y ΔH_u para cada sistema proteico [García-Hernández y Hernández-Arana, 1999; García-Hernández *et al.*, 2000 y 2003].

Al utilizar los parámetros específicos de nuestro modelo inicial de **0.23 y 0.07 cal/molKÅ²** correspondientes a grupos polares y no polares, respectivamente, y aplicarlos a los complejos de la Con A que fueron caracterizados recientemente en nuestro laboratorio, encontramos que la capacidad predictiva de este modelo de ΔC_p es aceptable (datos en azul de la Tabla 7). La diferencia promedio entre el valor experimental y el calculado, expresada en porcentaje es tan sólo del $-0.29\% \pm 6.6$.

Por otra parte, si utilizamos los datos de los tres complejos de la ConA y efectuamos una reparametrización del modelo inicial de ΔC_p , encontramos que los

parámetros específicos para grupos polares y no polares se mantienen en signo y orden magnitud (0.22 y 0.07 cal/molKÅ², respectivamente).

Sin embargo, estos coeficientes específicos fueron sensiblemente modificados cuando se efectuó una nueva reparametrización (Figura 14) donde se incluían 4 nuevos complejos P-C, los cuales son: el noveno módulo de unión a carbohidrato en interacción con glucosa (CBM9-Glc), la lectina CVIIL de la bacteria *Chromobacterium violaceum* acomplejada con metil-fucosa (CVIIL-MeFuc), y finalmente dos complejos formados por cuarto módulo de unión a carbohidrato de *Thermotoga marítima* interactuando con el pentasacárido y hexasacárido de la glucosa con enlace glicosídico β1-4 (Tabla 9).

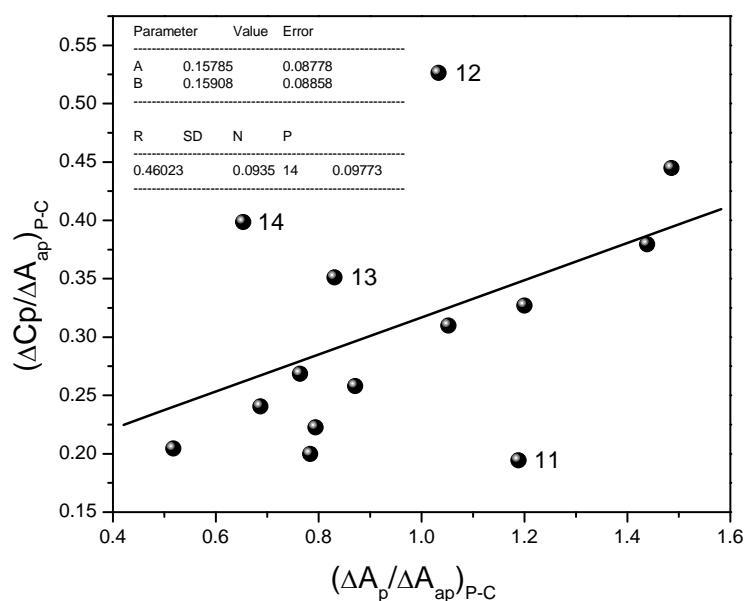


Figura 14. Reparametrización de los coeficientes específicos del $\Delta C_{p,u}$ de la interacción P-C separando en cambios de área de tipo polar y no polar. El parámetro A, corresponde a la contribución específica de tipo no polar, mientras que B representa la contribución específica de tipo polar. Como puede notarse del ajuste, el índice de correlación lineal es muy bajo ($R=0.46$). Los números del 11-14 en el gráfico indican los cuatro últimos complejos P-C añadidos en la base de datos, la numeración corresponde con el listado de la primera columna de la Tabla 9.

Tabla 9. Base de datos energético-estructurales de complejos P-C, donde se muestra la separación de los grupos químicos de la interface en cambios de área de tipo polar y no polar. En el caso de los cuatro últimos complejos las abreviaturas de proteínas y ligandos corresponden a: CBM9-Glc, noveno módulo de unión a carbohidrato de la Xilanasa, uniendo Glucosa; CVIIL-MeFuc, Lectina CVIIL uniendo metil-fucosa; finalmente CBM4-Glc₅ y CBM4- Glc₆, cuarto módulo de unión a carbohidrato de la Xilanasa interactuando respectivamente con el pentasacárido y hexasacárido de la glucosa Referencias de donde se tomaron los valores del $\Delta C_{p,u}$ de complejos P-C: **a.** García-Hernández *et al.* (1997). **b.** García-Hernández *et al.* (2003). **c.** Chervenak and Toone (1994). **d.** Clarke *et al.*, (2001) **e.** Boraston *et al.*, (2001) **f.** Esta tesis doctoral. **g.** Rozwarzki *et al.*, (1998). **h.** Pokorná M (2006) **i.** Boraston *et al.*, (2002).

		- ΔA_{pol}	- ΔA_{ap}	- ΔA_t	- ΔC_{pu}	pdb	Refs.
1	Hev-Q ₂	162	313	475	64±6		<i>a</i>
2	Hev-Q ₃	237	345	582	83±8		<i>a</i>
3	Liso-Q ₂	276	309	545	83±5	1lzb _m	<i>b</i>
4	Liso-Q ₃	404	384	788	119±3	1lzb	<i>b</i>
5	Con A- MeMan	162	186	348	48±8	5cna	<i>c,f</i>
6	Con A- Man ₃	364	245	609	109±5	1cvn	<i>c,d</i>
7	CBM9- Glc ₂	239	301	540	67±2	1i82	<i>e</i>
8	Con A- MeGlc	145	185	330	37±5	1gic	<i>f</i>
9	Con A- Man ₂	246	205	451	67±2	1i3h	<i>f</i>
10	DGL- Man ₃	364	253	617	96	1dgl	<i>c,g</i>
11	CBM9- Glc	208	175	383	34±6	1i8a	<i>e</i>
12	CVIIL- MeFuc	157	152	309	80	2boi	<i>h</i>
13	CBM4- Glc ₅	341	522	863	208±24	1gu3	<i>i</i>
14	CBM4- Glc ₆	407	490	897	172±14	1gui	<i>i</i>

Refinamiento del modelo de ΔC_{p_u} mediante un modelo extendido basado en áreas.

Para capturar en forma más detallada cuáles son los determinantes moleculares que promueven la diferenciación en el valor del ΔC_{p_u} de complejos P-C, comparado con el ΔC_p de plegamiento proteico o el ΔC_{p_u} de la formación de complejos P-P, desarrollamos un modelo “extendido” (con mayor número de contribuciones específicas) basado en ΔA . Este modelo extendido de complejos P-C, permite estimar las contribuciones por separado de cada una de las moléculas involucradas en la formación del complejo, es decir, con el podemos estimar la contribución particular del carbohidrato (ΔC_{p_c}) y de igual manera la de la proteína (ΔC_{p_p}), a partir de 2 modelos energético-estructurales independientes, como se representa en la siguiente ecuación:

$$\Delta C_{p_u} = \Delta C_{p_c} + \Delta C_{p_p} = \sum (\Delta c_{p_i} * \Delta A_i)_c + \sum (\Delta c_{p_i} * \Delta A_i)_p \quad (31)$$

En donde, ΔC_{p_c} representa la contribución del carbohidrato, mientras que ΔC_{p_p} representa la contribución de la proteína. Estas contribuciones pueden ser calculadas respectivamente por la sumatoria de contribuciones específicas de distintos grupos químicos del carbohidrato, ponderadas por su correspondiente ΔA ($\sum (\Delta c_{p_i} * \Delta A_i)_c$) y la sumatoria de contribuciones específicas de distintos grupos químicos de la proteína $\sum (\Delta c_{p_i} * \Delta A_i)_p$.

La solución de ambas sumatorias de contribuciones específicas se logró en 2 pasos secuenciales. El primero consistió en el desarrollo del modelo basado en ΔA para calcular la contribución del carbohidrato. Para ello, nos basamos en el hecho de que la capacidad calorífica en la formación de complejos proteicos, una vez corregida por efectos de protonación, es principalmente debida a los cambios en la hidratación de los grupos interactuantes [Gómez *et al.*, 1995]; sustentándonos, además, en el hecho de que los valores del ΔC_p de transferencia de una molécula de carbohidrato de un medio acuoso a un estado sólido, pueden ser usados para mimetizar el ΔC_p de la incorporación del azúcar libre a un ambiente altamente ordenado y empacado como lo es el sitio de reconocimiento en complejos P-C [García-Hernández *et al.*, 2000]. Así,

decidimos concentrar una serie de datos del ΔC_p de disolución ($\Delta C_{p_{\text{disol}}}$) de carbohidratos para generar y calibrar un modelo basado en ΔA que pudiera auxiliarnos en estimar las contribuciones del ΔC_{p_c} (ecuación 31). Una vez resuelto el primer paso, calculamos la contribución de ΔC_{p_c} en el complejo y la restamos al valor experimental del ΔC_{p_u} con la finalidad de obtener un estimado del ΔC_{p_p} . Con este valor se desarrolló, posteriormente, una parametrización específica de las superficies proteicas. Finalmente, la conjunción de ambas parametrizaciones nos permitió proponer un modelo global constituido por 10 contribuciones específicas diferentes (6 de ellas contribuciones del carbohidrato y 4 de ellas como contribuciones de la proteína).

Desarrollo y predicciones del modelo de ΔC_{p_c} .

La parametrización de carbohidratos fue desarrollada a partir de una base de datos de área y valores conocidos del $\Delta C_{p_{\text{disol}}}$ de 10 carbohidratos distintos (7 monosacáridos y 3 oligosacáridos lineales). La separación inicial de contribuciones específicas por grupo químico del carbohidrato fue pensada con base en las áreas de grupos tipo O_2 , $O_{0,1}$, C_0 y C_1 (Tabla 10, datos en negro). Donde O_2 es el coeficiente específico correspondiente al grupo de átomos de oxígeno del OH primario (unido al CH_2), $O_{0,1}$ es correspondiente a la suma de átomos de oxígeno del OH secundario (unido al CH del anillo) más los átomos de oxígeno del enlace glicosídico más los oxígenos del anillo furano o pirano, en C_0 se agrupan átomos de carbono que forman el anillo glicosídico (CH) y C_1 a átomos de carbono que no forman parte del anillo. Posteriormente, consideramos la inclusión de dos nuevos grupos de átomos dentro de la parametrización del $\Delta C_{p_{\text{disol}}}$ de carbohidratos (dos contribuciones específicas adicionales), los cuales son: las áreas de grupos metilo ($C_{2,3}$) y las áreas correspondientes a los átomos de los grupos N-acetilo (OCN) de azúcares modificados como la N-acetil-glucosamina (NAcGlc), debido a que al menos en la mitad de los complejos P-C (ver Tabla 7), los ligandos sacarídicos presentaban estos grupos químicos no considerados (Figura 15).

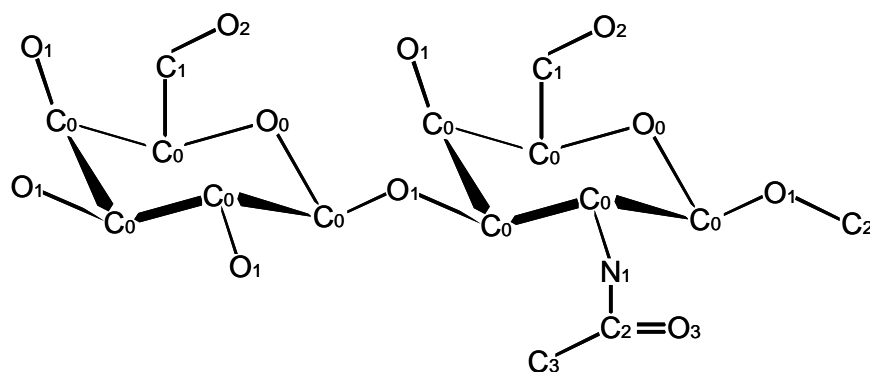


Figura 15. Representación esquemática de un disacárido hipotético, en la cual se muestra la nomenclatura usada en este trabajo para identificar los diferentes tipos de átomos considerados.

Tabla 10. Base de datos del $\Delta C_{p,disol}$ y ΔA por grupo químico específico de carbohidratos. Las áreas superficiales de los azúcares se clasificaron en base al tipo de heteroátomo involucrado y la localización configuracional en términos de distancia (número de enlaces covalentes) partiendo del anillo sacarídico. (Figura 15). Las referencias de donde fueron tomados los valores de $\Delta C_{p,disol}$ de carbohidratos son: 1. Banipal *et al.* (1997) 2. Briggner y Wadsö (1991). 3. Datos sin publicar, determinados en nuestro laboratorio.

Carbohidrato	$\Delta C_{p,disol}$ cal/molK	$A_{np}, \text{Å}^2$	$A_{pol}, \text{Å}^2$	ΔA_i Å^2						Ref
				C ₀	C ₁	C _{2,3}	O _{0,1}	O ₂	NCO	
Arabinosa (Ara)	24	115	156	115			156			1
Fructosa (Fru)	33	126	182	38	88		108	74		1
Galactosa (Gal)	31	116	188	75	41		147	41		1
Glucosa (Glc)	33	117	186	70	47		151	35		1
Manosa (Man)	32	126	178	82	44		139	39		1
Ribosa (Rib)	22	118	152	118			152			1
Xilosa (Xil)	29	114	158	114			158			1
Sacarosa (Sac)	51	191	258	81	110		175	83		1
Maltotriosa (Maltri)	55	277	357	190	87		248	109		2
Maltotetraosa (Maltet)	80	364	429	236	128		303	126		2
Metil-manose (MeMan)	49	187	144	66	46	75	109	35		3
Metil-glucose (MeGlc)	43	200	141	69	48	83	105	36		3
2-Desoxi-glucosa (dGlc)	35	150	137	103	47	0	101	36		3
N-acetil-glucosamina (GlcNac)	38	188	182	62	46	80	101	38	43	3

Después de efectuar una búsqueda de los valores del $\Delta C_{p,disol}$ para carbohidratos con grupos metilo o grupos N-acetilo, se encontró que estos valores aún no habían sido determinados o no se habían reportado en la literatura. Por lo tanto fue necesario obtener los datos experimentales el valor del $\Delta C_{p,disol}$ de 4 carbohidratos derivatizados: metil manosa, metil glucosa, 2-deoxi-glucosa y N acetil glucosamina (Tabla 10, datos en azul). Estos valores fueron obtenidos por el grupo del Dr. Miguel A. Costas Basín de la Facultad de Química, UNAM como parte de una colaboración con

nuestro grupo de investigación. Los valores del ΔC_p de disolución para estos carbohidratos, fueron obtenidos como la resta entre las capacidades caloríficas absolutas de los azúcares en estado sólido $C_{p_{sólido}}$, medidas en un calorímetro de barrido diferencial y las capacidades caloríficas del carbohidrato en solución ($C_{p_{disol}}$), medidas en un calorímetro de flujo, (brevemente descrito en la sección de material y metodología). Evidentemente, el carbohidrato en solución a altas concentraciones, puede interactuar tanto con el solvente como con otra molécula de carbohidrato. Para eliminar las posibles contribuciones de las interacciones soluto-soluto en el valor del C_p absoluto del carbohidrato en solución, se determinaron los valores del $C_{p_{disol}}$ a distintas concentraciones de azúcar, para finalmente calcular el valor del $C_{p_{disol}}$ a dilución infinita, haciendo una extrapolación a 0 de concentración de soluto.

Una vez conjuntados los datos para azúcares simples y azúcares derivatizados se desarrolló la parametrización del modelo de ΔC_p de solvatación de carbohidratos, incluyendo las contribuciones específicas de los grupos $C_{2,3}$ y OCN, de acuerdo con el modelo presentado en la ecuación 32. Los valores resultantes para los coeficientes específicos después de hacer un ajuste no lineal de los datos se muestran en la Tabla 11.

$$\Delta C_{p_C} = \Delta c_{p_{C0}} \cdot \Delta A_{C0} + \Delta c_{p_{C1}} \cdot \Delta A_{C1} + \Delta c_{p_{C2,3}} \cdot \Delta A_{C2,3} + \Delta c_{p_{O0,1}} \cdot \Delta A_{O0,1} + \Delta c_{p_{O2}} \cdot \Delta A_{O2} + \Delta c_{p_{NCO}} \cdot \Delta A_{NCO} \quad (32)$$

Tabla 11. Valores de los coeficientes específicos obtenidos para el modelo de ΔC_p de disolución de carbohidratos, dividido en 6 contribuciones diferentes. Las contribuciones específicas fueron separadas en base a su polaridad.

	Coeficiente Específico	Ajuste no lineal (cal/molKÅ ²)
Pol	Δc_{pO_2}	-0.09 ±.05
	Δc_{pOCN}	-0.14 ±.10
	$\Delta c_{pO_{0,1}}$	0.10 ±.04
Npol	$\Delta c_{pC_{2,3}}$	0.23 ±.09
	Δc_{pC_1}	0.32 ±.10
	Δc_{pC_0}	0.08 ±.03

Como podemos observar, el valor de los coeficientes específicos para cada tipo y grupo de átomos es semejante (en signo y magnitud) a lo reportado en parametrizaciones anteriores, desarrolladas a partir del estudio de compuestos modelo (Tabla 8). Sin embargo, una excepción fue encontrada con los valores de los coeficientes específicos correspondientes a grupos de átomos localizados a un enlace covalente de distancia del anillo glicosídico. Como puede notarse en la Tabla 11, para los átomos de oxígeno que se encuentran a un enlace covalente de distancia de los carbonos que forman el anillo ($\Delta c_{pO_{0,1}}$), la contribución específica es positiva, contrario al encontrado para grupos de átomos de tipo polar (Δc_{p_p}) obtenido con compuestos modelo (Tabla 8) o para grupos de átomos localizados a más de un enlace covalente de distancia (Δc_{pO_2} , Δc_{pOCN}). De igual manera, podemos observar que la magnitud de los coeficientes específicos de los átomos de carbono que forman el anillo glicosídico (Δc_{pC_0}) se ve considerablemente disminuida, en comparación con el mismo tipo de grupos de átomos que se encuentran más lejanos al anillo sacarídico (Δc_{pC_1} , $\Delta c_{pC_{2,3}}$).

Una posible explicación a este comportamiento diferenciado para grupos de átomos “asociados” al anillo glicosídico en carbohidratos, puede basarse en la hipótesis de Lemieux propuesta en 1989 [Lemieux, 1989 y 1996] después de una serie de experimentos de la dinámica molecular en la solvatación de carbohidratos, en la cual propone que la alta densidad de grupos hidroxilo en los carbohidratos, induce la

formación de espacios vacíos sobre las superficies no polares (de los carbonos) que constituyen el anillo, evitando con ello su total hidratación y, como resultado de ello, modificando su contribución característica a la capacidad calorífica.

Recientemente, basados en simulaciones de la hidratación de carbohidratos (dinámica molecular), y efectuando un riguroso análisis de ángulos y distancias principalmente de la primera esfera de solvatación, se observó un comportamiento diferencial (en el grado de estructuración del agua) entre las superficies de tipo polar con respecto a las no polares [Gallager and Sharp 2002]. Asimismo, se ha encontrado que la estructuración del agua también es distinta para azúcares cuando los grupos hidroxilo se encuentran orientados ecuatorialmente (lo cual les proporciona una mayor solubilidad) en comparación con los azúcares con grupos hidroxilo con posiciones predominantemente axiales (con menor solubilidad) [Dashnau *et al.*, 2005]. Aparentemente, la disminución en la solubilidad de los azúcares con grupos OH axiales, se debe a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares más estables, en relación a los formados con el agua.

Una forma de evaluar la calidad de nuestro modelo para describir las contribuciones propias de los carbohidratos es tratar de reproducir los valores de ΔC_p de disolución de un grupo de alcoholes y polioles de estructura conocida, moléculas que comparten similitud de grupos químicos con los carbohidratos. En la Figura 16, podemos observar que los valores de $\Delta C_{p_{\text{disol}}}$ calculados para alcoholes simples difieren significativamente del valor esperado, subestimando su valor. En cambio, para el grupo de los dioles, las estimaciones observadas mejoran significativamente si los grupos hidroxilo (OH) se encuentran adyacentes o muy cercanos uno del otro y, a medida que los grupos OH se alejan uno del otro, se observa la misma tendencia a subestimar para este conjunto de moléculas. Finalmente, los valores calculados para moléculas en donde la cercanía y densidad de grupos hidroxilo es mayor (polioles y ciclodextrinas), son muy semejantes a los valores esperados, lo cual nos permite concluir que las propiedades específicas de los carbohidratos sólo son compartidas de manera estricta por moléculas química y configuracionalmente semejantes.

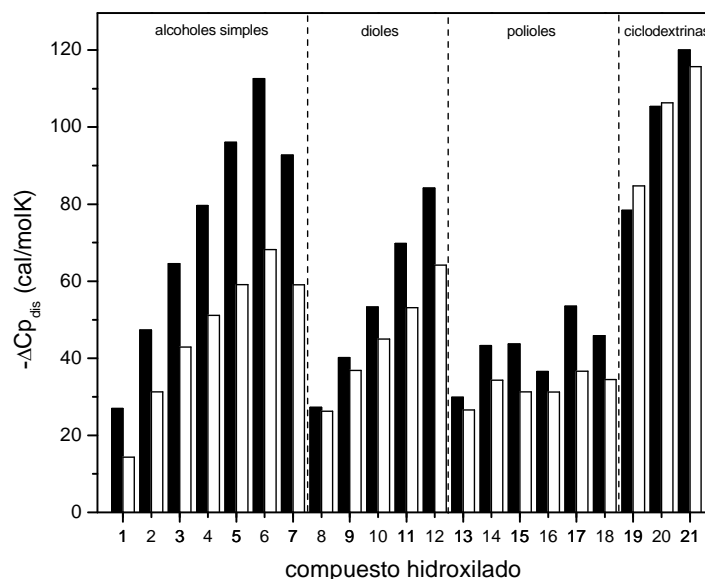


Figura 16. Comparación de los valores calculados contra los experimentales de ΔC_p de disolución para diferentes tipos de compuestos hidroxilados. Los valores de ΔC_p calculados están representados por las barras de color negro, mientras que los datos experimentales del ΔC_p de disolución de polioles están representados en barras blancas. Finalmente, los números corresponden a los siguientes compuestos hidroxilados: (1) metanol, (2) etanol, (3) 1-propanol, (4) 1-butanol, (5) 1-pentanol, (6) 1-hexanol, (7) ciclohexanol, (8) 1,2-etanodiol, (9) 1,3-propanodiol, (10) 1,4-butanodiol, (11) 1,5-pentanodiol, (12) 1,6-hexanodiol, (13) 1,2,3-propanotriol, (14) arabinitol, (15) ribitol, (16) xilitol, (17) manitol, (18) sorbitol, (19) α -ciclodextrina, (20) β -ciclodextrina, (21) γ -ciclodextrina. Los datos de los compuestos hidroxilados del 1-18 fueron tomados de Cabani et-al, 1981 y los datos para las 3 ciclodextrinas (compuestos 19-21), fueron tomados de Briggner y Wadsö 1990.

Desarrollo y comparación del modelo de ΔC_p .

Una vez desarrollada la parametrización exclusiva para carbohidratos y calculada su posible contribución a la formación de complejos P-C, substrajimos dichas contribuciones al valor total del ΔC_{p_u} , con la finalidad de obtener por separado la contribución de la parte proteica (de acuerdo con la ecuación 33). Con la contribución parcial del ΔC_{p_p} , y las estructuras proteicas en su forma libre y acomplejadas con el ligando, fue posible desarrollar un modelo energético-estructural tomando en cuenta 4 contribuciones específicas agrupando los cambios de áreas de átomos de proteína, en base a su polaridad como es expresado en la ecuación 34.

$$\Delta C_{p_u} - \Delta C_{p_C} = \Delta C_{p_P} = \sum (\Delta c_{p_i} * \Delta A_i)_P \quad (33)$$

$$\Delta C_p = \Delta c_{P_{cga}} \Delta A_{P_{cga}} + \Delta c_{P_{neu}} \Delta A_{P_{neu}} + \Delta c_{P_{cal}} \Delta A_{cal} + \Delta c_{P_{car}} \Delta A_{car} \quad (34)$$

Donde **Pcga** corresponde a la contribución de los grupos de átomos en las cadenas laterales de los aminoácidos con carga formal (his, lys, arg, asp, glu), **Pneu** es correspondiente a las contribuciones polares con carga neta cero (NCO, ser, thr, cys, asn, gln, tyr, trp), **Cal** es la contribución correspondiente al grupo de átomos de carbono de tipo alifático y, finalmente, **Car** corresponde a la contribución del grupo de átomos de carbono de tipo aromático. La resolución del modelo ajustando los datos a una correlación no lineal, produjo los valores presentados en la Tabla 12.

Tabla 12. Coeficientes específicos por grupo químico, para estimar la posible contribución de la proteína al ΔC_p de interacción P-C.

Parámetro	Valor cal/molKÅ ²	error
Pcga	-0.42247	0.28762
Pneu	0.35979	0.18907
Cal	0.50791	0.15643
Car	0.23134	0.10246

Para establecer una comparación adecuada del funcionamiento y al mismo tiempo evaluar la particularidad de este modelo, decidimos contrastar los valores calculados para la contribución del ΔC_p usando los coeficientes específicos de nuestro modelo, con aquellos calculados usando los coeficientes específicos de parametrizaciones previamente reportadas (parametrizaciones MF, MP, MPS y SR; descritas en tabla 8). Como es de esperarse, la predicción de los valores del ΔC_p fue mucho mejor al usar el conjunto de parámetros de nuestro modelo, en comparación con las parametrizaciones previamente reportadas (Figura 17).

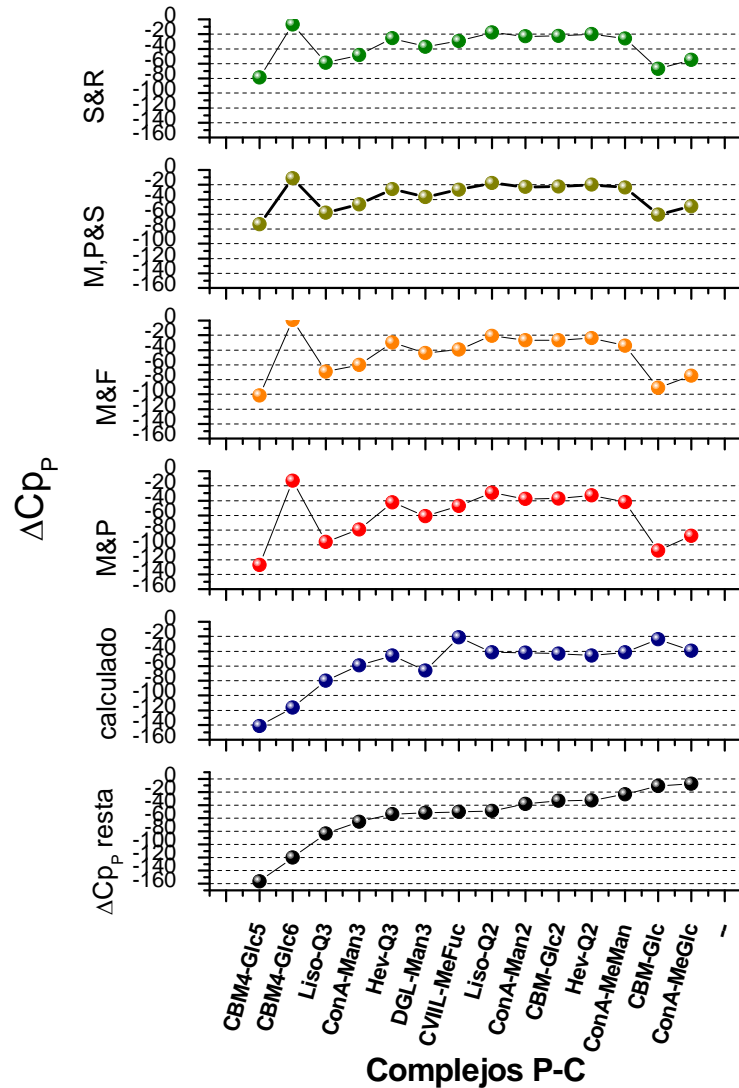


Figura 17. Comparación de los valores de ΔC_p calculados mediante el uso de diversos coeficientes específicos, reportados por MF, MP, MPS y SR y el desarrollado por nosotros. Los valores obtenidos de la resta, es decir; el ΔC_p (considerados como “experimentales”), están representados en esferas negras, Los valores calculados a partir de nuestro modelo, se representan en esferas color azul y los valores obtenidos a partir de otros modelos propuestos en la literatura, se presentan en esferas de distintos colores.

Adicionalmente, las limitantes de aplicabilidad de nuestro modelo de ΔC_p desarrollado a partir de datos energético-estructurales de complejos P-C fueron evidenciadas al tratar de estimar los valores de ΔC_p de desnaturalización de 20 proteínas previamente estudiadas [Makhatadze y Privalov 1995]. En su trabajo, Makhatadze y Privalov (MP 1995) desarrollaron un modelo basado en cambios de áreas, en el cual separaron las contribuciones polares específicas para cada uno de los

aminoácidos (cadenas laterales) más comunes. Adicionalmente consideraron por separado las contribuciones polares de los enlaces peptídicos del esqueleto proteico (NCO) y la contribución de los aminoácidos no polares fue separada en grupos de átomos alifáticos y aromáticos (tabla 13). Como podemos observar de los datos de la tabla 13, las contribuciones específicas de tipo no polar obtenidas a partir de datos de desnaturalización de proteínas, es muy semejante a lo encontrado en nuestra parametrización de ΔC_p a partir de datos de unión de complejos P-C (Tabla 12). Sin embargo, en la parametrización propuesta por MP 1995, la contribución específica de los grupos polares es mayoritariamente de signo negativo, no así en nuestra parametrización, donde solo dos contribuciones polares para grupos de proteína fueron consideradas por separado.

Tabla 13. Contribución específica por grupo polar y no polar para los aminoácidos comúnmente encontrados en proteínas, propuesta por Makhatadze y Privalov en 1995. Las unidades de las contribuciones específicas fueron reportadas en J/molK, pero en este trabajo, para fines comparativos fueron convertidas a cal/molK.

	<i>Parte no polar</i>	<i>Contribución específica</i>
	C _{al}	0.53
	C _{ar}	0.29
<i>Parte polar</i>		
P	Arg	-0.05
R	Asn	-0.23
O	Asp	-0.32
T	Cys	-0.93
E	Gln	-0.05
I	Glu	-0.12
N	His	-0.31
A	Lys	-0.38
	Met	-0.93
	Ser	-0.31
	Thr	-0.30
	Trp	0.90
	Tyr	0.02
	NCO	-0.39

La notable diferencia en el signo correspondiente a las contribuciones Pneu en nuestra parametrización, produce una consistente sobreestimación de los valores de ΔC_p de desnaturalización, como se muestra en la Figura 18, a pesar de que nuestro modelo es capaz de seguir las variaciones generales en los valores totales del ΔC_p de desplegamiento lo cual no es sorprendente, a juzgar por la similitud de los demás valores de coeficientes específicos.

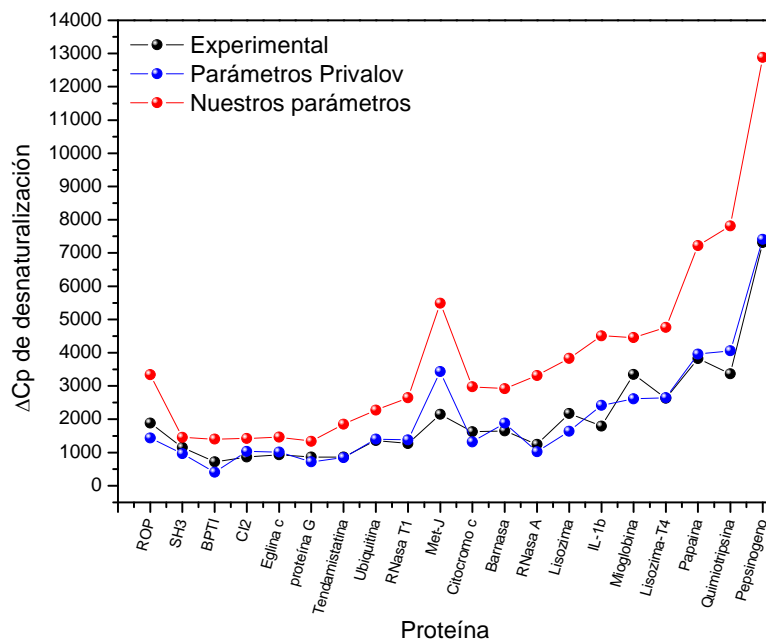


Figura 18. Estimación de los ΔC_p de desnaturalización de 20 proteínas diferentes. Los datos del ΔA para los grupos de átomos P_{cga} y P_{neu} en el proceso de desnaturalización proteica fueron calculados a partir de los datos del cambio de accesibilidad al solvente reportados por Makhatadze y Privalov, 1995 (MP 1995), los datos de C_{al} y C_{ar} fueron tomados directamente como reportan los autores. Las abreviaturas de cada proteína utilizadas en este gráfico, fueron tomadas directamente de las abreviaturas usadas por MP 1995.

En base a estas observaciones, podemos concluir que el conjunto de parámetros específicos por grupo de átomos resueltos en nuestra parametrización (tabla 10) son semejantes y están en concordancia tanto en signo y magnitud con los coeficientes previamente reportados para el estudio de complejos P-P y plegamiento proteico (datos de tabla 8, y valores reportados en Makhatadze 1995), a excepción del coeficiente específico de las contribuciones de grupos polares de carga neta cero, el cual tiene signo positivo.

Finalmente, la conjunción de los coeficientes específicos obtenidos de ambos modelos (ΔC_{p_c} y ΔC_{p_p}) en un solo modelo general (ecuación 31), nos permitió estimar con menor incertidumbre la contribución global al ΔC_{p_u} P-C, en comparación con nuestro modelo inicial propuesto, como se puede corroborar en la Figura 19.

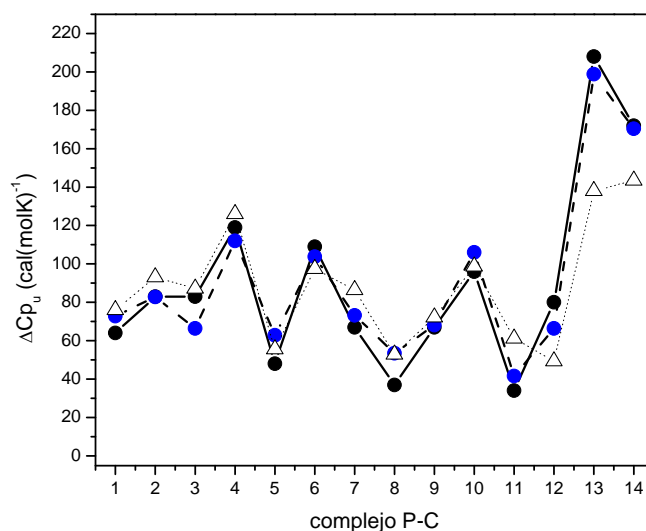


Figura 19. Comparación entre los valores experimentales y de los valores estimados del ΔC_{p_u} de complejos P-C. En círculos negros se representa el valor del ΔC_{p_u} experimental medido mediante CTI, en círculos azules están representados los valores del ΔC_{p_u} calculados usando el modelo en el cual se consideran 10 contribuciones específicas (6 para los grupos del carbohidrato y 4 para grupos de proteína, ecuación 31). Finalmente, en triángulos vacíos están representados los valores del ΔC_{p_u} calculados a partir del modelo inicial (ecuación 3), considerando la separación de contribuciones del complejo en polares y no polares. La numeración para los complejos P-C, corresponde al listado de la tabla 9.

Conclusiones

- Los valores termodinámicos obtenidos mediante CTM son muy semejantes a los obtenidos mediante el protocolo convencional de CTI. Se demostró que la CTM puede ser aplicable a complejos de alta y mediana afinidad. Por lo tanto, La CTM representa una mejora en cuanto a tiempos de operación y reducción de costos, sin sacrificar la precisión en la obtención de parámetros termodinámicos de la unión.
- Los modelos energético-estructurales basados en áreas han mostrado ser útiles en la predicción de los valores de ΔC_{p_u} en complejos P-C. De acuerdo con el coeficiente específico para grupos polares obtenido al resolver el modelo inicial de ΔC_{p_u} (ecuación 30), las áreas polares de los complejos P-C presentan propiedades de hidratación distintivas a complejos P-P y plegamiento de proteínas. La contribución de los grupos polares en los complejos P-C tiene un mayor peso en el valor final del ΔC_{p_u} , en comparación con las contribuciones no polares. Esta predominancia de los grupos polares ya había sido observada anteriormente durante el desarrollo del modelo de ΔH_u (Tabla 2).
- El uso del modelo extendido para calcular las contribuciones del ΔC_{p_u} de complejos P-C nos permitió hacer mejores estimados de los valores experimentales en comparación con el modelo que tan sólo considera la separación en contribuciones polares y no polares. Además, presentó una mayor capacidad para explicar complejos P-C no considerados en el desarrollo del modelo.

- En el modelo extendido se plantea una separación más detallada de contribuciones por molécula participante. En el caso particular del modelo de específico para estimar las contribuciones del ΔC_p de disolución de carbohidratos, la magnitud y signo de los coeficientes específicos de grupos de átomos (carbonos y oxígenos) depende de su disposición configuracional en el carbohidrato y de la abundancia de grupos polares adyacentes. Al intentar calcular (a partir de datos estructurales) los valores del ΔC_p de disolución de otras moléculas polihidroxiladas, encontramos que nuestro modelo propuesto para el ΔC_p de disolución de carbohidratos sólo es funcional a medida que la semejanza estructural entre los polioles y los azúcares es mayor (Figura 16).
- En cuanto al modelo específico para estimar las contribuciones de la proteína en la formación de complejos P-C, se observó que las contribuciones de tipo no polar están representadas por un coeficiente en signo y magnitud de acuerdo a lo previamente reportado, corroborando la conclusión propuesta por Cabani en 1981, que menciona que los grupos de tipo no polar, independientemente de las moléculas en que se encuentren contribuyen en promedio con la misma magnitud. En donde se presentaron diferencias significativas en comparación con coeficientes específicos previamente propuestos, fue en las contribuciones de tipo polar. Una posible explicación a nivel estructural es que los sitios de reconocimiento de las proteínas unidoras de carbohidratos están enriquecidas en grupos de tipo polar, para brindar complementariedad estereoquímica al

carbohidrato que reconocen. Con ello se ven modificadas las propiedades “normales” de hidratación para grupos polares en los sitios de reconocimiento de estas proteínas. Un comportamiento similar ya ha sido observado previamente en complejos con abundancia de grupos hidroxilo y en ácidos nucleicos.

Anexo 1

Anexo 2

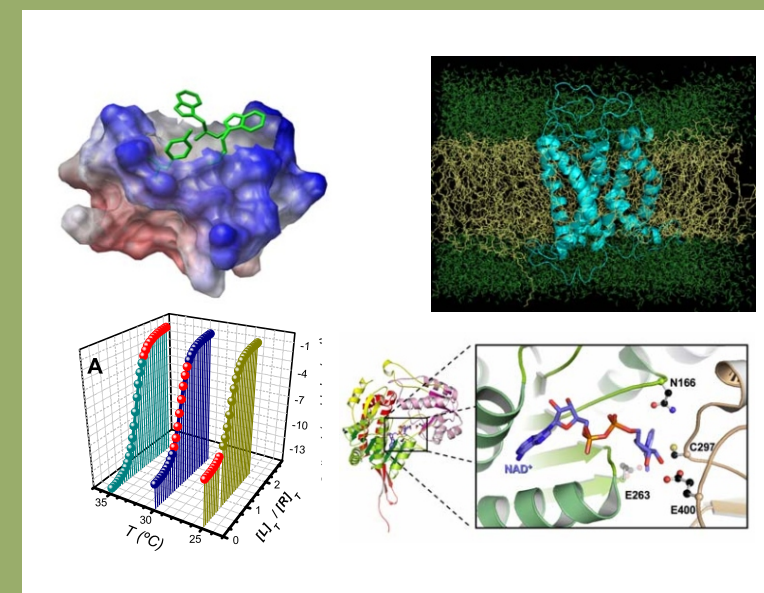
Anexo 1

ADVANCES IN PROTEIN PHYSICAL CHEMISTRY

Editors
Enrique García-Hernández
D. Alejandro Fernández-Velasco



ADVANCES IN PROTEIN PHYSICAL CHEMISTRY
Editors: Enrique García-Hernández, D. Alejandro Fernández-Velasco



TRANSWORLD RESEARCH NETWORK



7

Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes

Nancy O. Pulido, Eneas A. Chavelas, Francisco J. Torner
and Enrique García-Hernández*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química y Laboratorio de Termofísica,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Abstract

The absorption or liberation of heat has proven a widely spread property in biomolecular processes. Isothermal titration calorimetry (ITC) measures this property directly. This feature not only implies high precision in determining the binding enthalpy, but also allows us to infer the reaction mechanism in a more objective way than many non-calorimetric techniques. In this chapter, the principles of ITC are reviewed together with the basic thermodynamic formalism on which the technique is based. In addition, the current state of the art in calorimetry in protein recognition is described, with particular emphasis on advances in the last few years.

1. Introduction

The crucial role played by proteins in life's supporting frame generally involves non-covalent molecular recognition processes. The understanding of protein's capacity to form stable complexes through non-covalent forces remains a critical aspect in the comprehension of life's molecular basis.

Molecular recognition is dictated by two properties: specificity and affinity. Specificity relates to the protein's capacity to discriminate between similar ligands, while affinity involves the way in which molecular forces combine with each other to make recognition a spontaneous process. Increasing structural information has led to detailed descriptions of different strategies followed by nature to achieve specificity in several protein complexes. However, the study and understanding of the spontaneity of these processes requires not only structural information but an insight into the energetics involved, which implies knowing the thermodynamics of the process.

Thermodynamically speaking, the spontaneity of a complex formation is given by the Gibbs free energy difference between the complex and the un-complexed species (ΔG_b). Their relative abundances in the equilibrium state is given by the equilibrium constant (K_b):

$$\Delta G_b = -RT \ln K_b \quad (1)$$

where T is the absolute temperature and R is the ideal gas constant. The quantitative interpretation of ΔG_b in microscopic terms is one of the greatest challenges for modern biomolecular sciences. The goal in such an interpretation is not just to increase our knowledge of the underlying factors that may contribute to the structure-stability-function relationship, but also to generate quantitative feedback on these interactions in accurate way, so we may eventually be able to build an effective protein design framework. Although describing qualitatively the interactions involved in protein complex formation (hydrophobic effect, van der Waals forces, electrostatic forces, etc) is relatively simple, the way in which these factors are combined to yield the overall stability is very complex. Thus, it has been very difficult to establish energetic-structural correlations for the formation of biomolecular complexes.

The first step towards the dissection of ΔG_b is provided by equilibrium thermodynamics itself, in terms of the enthalpic (ΔH_b) and entropic (ΔS_b) changes:

$$\Delta G_b = \Delta H_b - T\Delta S_b \quad (2)$$

Nowadays, many models that correlate energetic and structural properties consider separately these different but related properties of the system. For molecular recognition reactions in liquid media, ΔH_b is approximately equal to the internal energy change, which is a result of changes in van der Waals and electrostatic interactions. On the other hand, ΔS_b is a result of the change in the degrees of freedom of the solute (mixing and conformational entropy) and the solvent (solvation entropy). The change in heat capacity at constant pressure (ΔCp_b) is another key property in the thermodynamic characterization of molecular binding, due to the fact that it is an important sensor of solvent rearrangements induced by changes in solute exposition.

In the past few years, isothermal titration calorimetry (ITC) became an important tool in the application of physical chemistry to several research fields. This technique allows us to find the interaction thermodynamic parameters between two molecular species by measuring the heat absorbed or evolved as successive known quantities of one substance are added over a known quantity of the other substance at a constant temperature. Heat absorption/liberation occurs as the recognition process takes place. At a constant pressure, the heat measured is equal to the enthalpy change in the process and, given that the heat is proportional to the number of complexes formed, it is also possible to obtain K_b . So, ITC is a useful tool that can, in a single experiment, measure the affinity constant as well as ΔG_b , ΔH_b , and ΔS_b associated to the processes of interaction between a receptor, i.e., a protein, and a particular ligand, such as carbohydrates, nucleic acids, aromatic compounds, or other proteins. ΔC_p_b can be determined throughout the thermal dependence of ΔH_b with unmatched accuracy compared to other techniques. With the recent development of more precise microcalorimeters, the use of ITC has grown exponentially and, as some scientists in this research field have pointed out, ITC has entered its golden age [1].

The examples described in this chapter cover only the main experimental possibilities using ITC. It is fair to say that, besides the protein applications which constitute the primary focus of this text, ITC has been a tool largely used for a much wider spectrum of compounds and phenomena.

2. Instrumentation

Typically, in an ITC experiment the molecule to be titrated, the receptor, is progressively saturated by the stepwise addition of the other binding partner, the ligand. The interaction between the molecular partners leads to the uptake or release of heat that is quantified during the experiment as a function of the total ligand and receptor concentrations in the cell. Nowadays, the differential microcalorimeter VP-ITC from MicroCal (Northampton, MA, USA; www.microcal.com) is the most popular and precise equipment commercially available. The instrument consists of two identical cells made of a highly efficient thermal conducting material. The cells are contained within an adiabatic jacket. Highly sensitive thermopile/thermocouple arrays detect temperature differences between the two cells and the cells and the jacket. Heaters located on both cells and the jacket are activated when necessary to maintain identical temperatures between all components. The receptor is loaded into the reaction cell. Water or buffer solution is loaded in the reference cell. The ligand is loaded into a spinning syringe coupled to a precision stepper motor which is computer-controlled. Prior to the start of the injection protocol, the instrument supplies electrical power to the two cells, keeping a small temperature difference between them ($\Delta T \sim 10^{-6}$ °C). The difference of electrical power (ΔP) between the two cells as a function of time corresponds to the calorimetric raw data. For an exothermic (endothermic) association, a definite amount of heat will be released (taken up) upon addition of an aliquot of ligand solution; to keep ΔT constant, the power supply for the reaction has to be reduced (increased) accordingly. After the signal returns to the baseline, another injection of ligand solution is made.

Following, a description of the most common ways of modeling ITC data is presented, covering some specific binding considerations.

3. Binding models

3.1. Identical independent sites case

In chemical equilibrium theory, the interaction between a ligand (L) and a protein (P) can be written as follows:



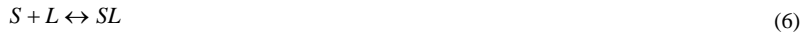
where n is the number of available sites in the receptor to which the ligand could bind, i.e., the binding stoichiometry. In the case of a protein bearing identical and independent binding sites, the resultant equilibrium constant is:

$$K = \frac{[RL_n]}{[R][L]^n} \quad (4)$$

Considering the total concentration of binding sites, $[S]_T$,

$$[S]_T = n[R]_T \quad (5)$$

the binding equilibrium is described as



from which the following matter balances can be written:

$$[S]_T = [S] + [SL] \quad (7)$$

$$[L]_T = [L] + [SL] \quad (8)$$

where $[S]$ and $[L]$ are the free sites and free ligand concentrations at equilibrium, respectively, and $[SL]$ is the concentration of the complex formed between the ligand and the site of the receptor. The individual equilibrium constant is:

$$k_s = \frac{[SL]}{[S][L]} \quad (9)$$

Equation 7 can also be written in terms of the occupied (Θ) and free ($1-\Theta$) sites fractions:

$$\frac{[S]}{[S]_T} + \frac{[SL]}{[S]_T} = \frac{[S]}{[S]_T} + \Theta = 1 \quad (10)$$

so equations 8 and 9 take the form:

$$[L]_T = [L] + n\Theta[R]_T \quad (11)$$

$$k_s = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[L]} \quad (12)$$

Combining equations 11 and 12:

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{[L]_T}{n[R]_T} + \frac{1}{nk_s[R]_T} \right] + \frac{[L]_T}{n[R]_T} = 0 \quad (13)$$

When the ligand is titrated within a cell of volume V_0 with the protein inside, the heat absorbed or released will be proportional to the ligand quantity that binds to the sites in each titration, so the heat involved in that process would be:

$$dq = V_0 \Delta H d[SL] \quad (14)$$

From equation 11, the heat involved is also:

$$dq = V_0 \Delta H d(n\Theta[R]_T) \quad (15)$$

This expression can be written as the heat normalized by the cell concentration of ligand added:

$$\frac{dq}{d[L]_T} = V_0 \Delta H \frac{d(n\Theta[R]_T)}{d[L]_T} \quad (16)$$

Using equation 13, it is possible to write the derivative of the last equation leading to the complete expression of the heat exchanged in the binding process by mol of ligand added as a function of the total receptor and ligand concentrations, thus having the stoichiometry, the binding constant per site and the enthalpy of interaction as parameters to be fitted to the experimental data:

$$\frac{dq}{d[L]_T} = V_0 \Delta H \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - \frac{1}{c}}{2\sqrt{\left(1 + X_R + \frac{1}{c}\right)^2 - 4X_R}} \right] \quad (17)$$

where $X_R = [L]_T/[S]_T = [L]_T/n[R]_T$, and $c = k_S[S]_T = k_{SN}[R]_T$.

Studying equation 17, Wiseman *et al.* [2] noticed the importance of the c parameter being within the range of 1 to 1000, to ensure the most reliable results from the fitting process. Turnbull and Daranas [3], however, demonstrated the viability of obtaining good calorimetric results in cases where the c value was less than 1, by reaching a proper ligand-receptor concentration ratio according to the value of the binding constant, i.e., by achieving a large saturation of the receptor (> 80%) when the last titration has been made.

Figure 1 shows an ITC curve obtained from the titration of a competitive inhibitor (S-octyl-GSH) over the dimeric mutant protein glutathione-S-transferase, which is an enzyme involved in the metabolism of certain drugs and xenobiotics [4]. The left panel shows the calorimetric raw data and the right panel shows the non-linear least squares fit of equation 17 to the binding isotherm.

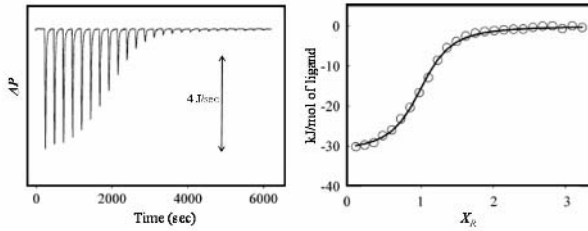


Figure 1. Calorimetric titration of the binding of S-octyl-GSH to a mutant of the protein glutathione-S-transferase. The left panel corresponds to the raw calorimetric signals due to the titrations over the time elapsed. The right panel presents the values of the integrated areas of the calorimetric peaks given as heat per mol of injectant ($dq/d[L]_T$) and plotted against the ligand/receptor molar ratio (X_R). Adapted from [4].

ITC measurements indicated that there was just one binding site between the protein and the S-octyl-GSH inhibitor, while there was more than one binding site for other smaller alkyl-chain compounds. Additionally, ΔS_b and ΔCp_b information obtained from the ITC experiments, along with structural data, allowed the authors to conclude that the S-octyl-GSH inhibitor was interacting with a different moiety of the protein in contrast to smaller alkyl-chain compounds, leading to a conformational change in one of the protein subunits. It was also proven that the binding of these kinds of compounds was tighter for the mutant than for the wild type previously reported [5], leading to further knowledge on important residues involved in the protein inhibition process [4]. Currently, there is a large list of protein complexes for which an identical-site model has been applied successfully. Some examples are protein function regulation by protein domain-peptide interactions [6], protein inhibition by drug binding, and cellular signal transduction-related effects [7], among others. Manak & Ferl [8] used ITC to show how the divalent cation concentration influences the interaction between two phosphopeptides and some isoforms of the *Arabidopsis* 14-3-3. This latter process is part of the maintenance of the phosphorylation state of the cell.

3.2. Different independent sites case

If the receptor has more than one site which presents a different affinity for the ligand, then a different independent sites model should be suitable for the case. The number of different global binding constants that ought to be considered depends on the number of different binding sites involved.

As a general scheme, considering that the receptor might have j different affinities for the ligand among their sites, the binding constant for each kind of affinity would be:

$$k_1 = \frac{\Theta_1}{(1-\Theta_1)[L]}, \quad k_2 = \frac{\Theta_2}{(1-\Theta_2)[L]}, \quad \dots, \quad k_j = \frac{\Theta_j}{(1-\Theta_j)[L]} \quad (18)$$

We may also write (as in equation 11) the total concentration of ligand as:

$$[L]_T = [L] + (n_1\Theta_1 + n_2\Theta_2 + \dots + n_j\Theta_j)[R]_T \quad (19)$$

Solving equation 18 for Θ and substituting it into equation 19 gives:

$$[L]_r = [L] + \left(\frac{n_1[R]_r[L]k_1}{1+[L]k_1} + \frac{n_2[R]_r[L]k_2}{1+[L]k_2} + \dots + \frac{n_j[R]_r[L]k_j}{1+[L]k_j} \right) \quad (20)$$

This equation may be cleared and, in combination with equations 15 and 18, will give a polynomial describing the calorimetric data in function of the stoichiometry, binding constant and enthalpy of each different site, as well as the total concentration of the receptor and ligand:

$$Q = [R]_r V_0 (n_1 \Theta_1 \Delta H_1 + n_2 \Theta_2 \Delta H_2 + \dots + n_j \Theta_j \Delta H_j) \quad (21)$$

where Q corresponds to the total heat delivered or absorbed until the i -th titration.

An illustrating example of association involving different binding sites was reported by Nielsen *et al.* [9], who studied the binding of C12 surfactants to bovine serum albumin because of its interest in SDS-polyacrylamide electrophoresis and for food sciences. It was found that anionic surfactants bind into separate classes of sites with different affinity. The measured binding curves for SDS (Figure 2) could be rationalized as an association to two classes of sites ($K_{b1}=3.3 \times 10^7$, $K_{b2}=1.9 \times 10^5$) with three and six similar independent sites, respectively.

In the same work, Nielsen *et al.* were also able to determine the thermodynamic properties of the micellization process for most of the surfactants handled. From the thermodynamic data, it was found that the binding strength of the high affinity sites is driven by a combination of hydrophobic and coulombic forces and not only by simple hydrophobic condensation onto non-polar patches on the protein surface. This latter affirmation is applicable even for the non-ionic surfactants used.

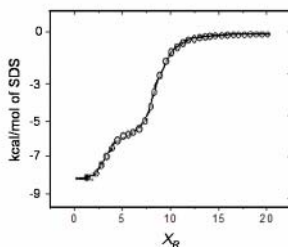


Figure 2. Binding isotherm for the titration of BSA with SDS. The solid line is the best fitting of equation 21 (two kinds of binding sites) to the experimental data. Adapted from [9].

3.3. Sequential binding sites model

In biological systems it often occurs that the binding of a ligand to one site is influenced by whether or not the ligands are bound to any of the other sites; this is a more complicated binding mechanism and involves the presence of different sequential

binding sites for the same ligand [10-15]. In this case, the availability of one binding site depends on the previous formation of other sites:



$$K_1 = \frac{[RL_1]}{[R][L]} \quad K_2 = \frac{[RL_2]}{[RL_1][L]} \quad \dots \quad K_n = \frac{[RL_n]}{[RL_{n-1}][L]} \quad (22)$$

The binding of multiple ligands to transition metal ions is an example where the sequential binding model is appropriate. Figure 3 shows a calorimetric curve for the titration of ATP with $MgCl_2$ (unpublished data from our laboratory). At a pH ≥ 8 , it is known that this reaction follows a sequential binding mechanism [16]:



Due to the low affinity associated with the second step, one of the most important factors in characterizing this kind of system was to reach an elevated molar relation of ligand/receptor. When the mechanism is unknown, the best strategy is to find the simplest mechanism that best fits the experimental data. Figure 3 also shows the trace that corresponds to the best fit of an independent binding sites model, which poorly describes the experimental data in the zone of larger X_R .

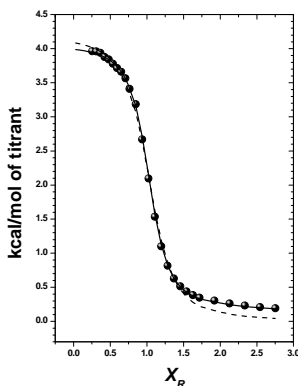


Figure 3. ITC analysis of Mg^{2+} binding by ATP at 25°C. The plot presents the best fitting of one set of binding sites model (dotted line) and two sequential binding sites model (continuous line) to the experimental data.

3.4. Experiments under ligand saturating conditions

It has already been said that in order to obtain complete thermodynamic parameters for a specific interaction it is pertinent to follow a stepwise titration curve. Nevertheless, the determination of K_b for high-affinity complexes ($K_b > 10^9$) is very difficult to achieve. This is because below the equimolar point, virtually all the added ligand binds

to the receptor. This leads to an almost constant heat signal until the protein becomes saturated; then a dramatic decrease in the heat evolved is observed, reaching magnitudes comparable to the dilution heat of the ligand in a narrow span of X_R (Figure 4). This situation precludes the accurate determination of K_b . Nevertheless, it is still possible to determine the binding enthalpy when the value of c is considerably large (> 1000). If this is the case, it can be assumed that the heats measured below the equimolar point (normalized by the moles of ligand added) correspond directly to ΔH_b . Large c values can be obtained with very high-affinity complexes or if one of the species is highly soluble. If more than one titration is made during the experiment, then it is also possible to estimate the uncertainty of ΔH_b .

Figure 4 shows a typical example of a large c value interaction in which it was possible to obtain the ΔH_b for an inhibitor–enzyme complex using ITC data [17]. The right panel presents the time integrated heat value per mole of inhibitor injected as the molar ratio inhibitor/enzyme increases. It can be seen the abrupt change in the heat detected when the saturation is reached at the fifth titration ($X_R = 1$), which can be attributed to the large c value of the system measured.

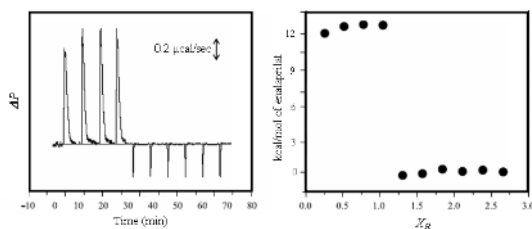


Figure 4. Calorimetric data for the binding of pig lung angiotensin-converting enzyme to an inhibitor (enalaprilat). Adapted from [17].

3.5. Displacement ITC

This method has proven very helpful when trying to characterize very high affinity interactions for which measurements are limited by the very low concentrations that are needed to get c values < 1000 . In displacement titration calorimetry, two different ligands are put into competition for the site's occupancy in the receptor molecule. In this technique, a ligand of low-to-moderate affinity is competitively inhibiting the binding of a high affinity ligand, whose binding constant determination is of interest. The experiment is carried out with the less strong ligand present in the cell and already bound to the receptor, and then adding the stronger ligand to the cell following a typical stepwise titration protocol.

Having two ligands A and B as potential binding species of a protein molecule R , and being A the strongest affinity ligand, the equilibria of the species can be expressed as:



from which the following matter balances can be written:

$$[A]_T = [A] + [RA] \quad (25)$$

$$[B]_T = [B] + [RB] \quad (26)$$

$$[R]_T = [R] + [RA] + [RB] \quad (27)$$

Regarding the equilibrium constant equations (23 and 24), it is feasible to arrive to the following relations:

$$[RA] = \frac{[R][A]_T}{\frac{1}{k_A} + [R]} \quad (28)$$

$$[RB] = \frac{[R][B]_T}{\frac{1}{k_B} + [R]} \quad (29)$$

Combination of equations 28-29 will result in a cubic polynomial of $[R]$ with coefficients in terms of the total and known concentrations $[A]_T$, $[B]_T$, $[R]_T$ and the equilibrium constants k_A and k_B . This polynomial can be solved analytically, determining $[R]$ and allowing fitting the experimental heat data considering that the heat evolved from each reaction after a single titration will be proportional to the changes in $[RA]$ and $[RB]$ and their respective molar binding enthalpies. The observed heat, dq , would then be:

$$dq = V_0(\Delta H_A d[RA] + \Delta H_B d[RB]) \quad (30)$$

It is important to clarify that the concentrations of the RA and RB species should be corrected by each titration because of the volume added each time. A concentration correction algorithm has been developed by Sigurskjöld [18] and some ITC devices already consider this issue, calculating and correcting it as the experiment is being performed.

Recently, displacement calorimetry has been useful in studying the action of several protein function regulation ligands, such as substrates for glycerolipid and phospholipid biosynthesis [19], metal complexes [20], ions in signal transduction [12,21-24], organic compounds as inhibitors, and anesthetic agents [25,26], among others.

Deniau *et al.* [27], for example, used displacement calorimetry to measure the affinity of a monomeric hemophore protein, HasA_{SM}, for the heme group. The heme group was displaced from a low-affinity protein to the higher affinity protein of unknown K_A . A mutant was used as the low-affinity protein. The heme was saturated with the mutant protein, introduced into the calorimeter cell, and titrated with injections of aliquots of the high-affinity protein (apo-HasA_{SM}).

Hellmann *et al.* [28] were interested in studying the oxygen-binding behaviour of hemocyanins, which are regulated by small organic compounds such as urate and

L-lactate. In this work, the binding characteristics of urate and the related compound caffeine to a 2×6-meric hemocyanin were studied under fully oxygenated conditions, employing isothermal titration calorimetry (ITC). An analysis of urate and caffeine binding based on a model of n identical binding sites resulted in approximately four binding sites for caffeine and eight for urate. This result suggested that the binding process for these effectors was more complex than the model originally proposed. Therefore, the authors introduced a number of alternative models. Displacement experiments (for titration of caffeine into urate and hemocyanin and urate into caffeine and hemocyanin) helped to select the appropriate model by comparison between the experimental data and each model tested. Based on the experimental results, it was found that at least two different types of binding sites for urate and caffeine existed on the 2×6-meric hemocyanin. The two binding sites differed strongly in their specificity towards the two analogues. It was hypothesized that two different subunit types are responsible for the two types of binding sites.

Displacement protocols can be planned not only for those cases where there is a tight or weak binding phenomenon that complicates some measurement, but when the competition between different ligands is of interest itself. Liu & Eckenhoff [26] elucidated the binding similarities and differences of two structural isomers (enflurane and isoflurane) which have different anesthetic strengths and side effects. The study focused on the binding site selectivity of these anesthetics in human serum albumin (HSA). The binding of isoflurane and enflurane with HSA was measured by ITC. A competition with a known ligand (propofol) allowed localization of binding sites within the HSA molecule. The analysis suggested that isoflurane binds to a single site, whereas enflurane binds to two sites. Competition experiments indicated that enflurane and isoflurane share one binding site, which also binds propofol. Propofol binds to the additional enflurane site but not to isoflurane. It was found also that increased salt concentration decreased the affinity for the isoflurane but not for the enflurane. The latter findings led the authors to the conclusion that two binding sites of different characteristics are present in HSA for the haloether anesthetics. One site is more polar and prefers isoflurane, presumably because of its larger dipole, while the second site is less polar and binds only to enflurane. Therefore, in addition to molecular volume and hydrophobic surface area, weak polar interactions confer considerable binding selectivity, which may underlie differences in drug action.

3.6. Single injection method (SIM)

For over 20 years, traditional ITC based on stepwise additions of the ligand has provided accurate determinations of the energetics of the formation of molecular complexes. However, some current works in drug discovery and target screening require more speed than traditional ITC can offer. Recently, a new calorimetric method has been introduced, the so-called Single Injection Method (SIM) [29]. The method is based on a continuous slow injection of a single and large aliquot of titrant into the calorimetric vessel. The slow and continuous addition of the ligand permits running the experiment under quasi-equilibrium conditions, whenever the kinetic of the complex formation's reaction is quick enough. At the end of the injection, the receptor is expected to reach an appropriately large degree of saturation. They used the binding of Ba^{2+} to 18-crown-6 and the binding of cytidine-2-monophosphate to RNase A as test systems. Both complexes are used as standard tests for titration calorimetry. SIM shortens the

experimental time by a factor of 10 compared to classical ITC and increases the number of data points 30-fold. However, for applications requiring maximum precision, the multiple injection ITC method is the gold standard for measuring molecular interactions. Therefore, SIM is very suitable for screening applications or initial exploratory binding characterization experiments.

3.7. Homo-oligomeric interactions: Dilution calorimetry

The self-association of a protein leading to the formation of homodimers has not usually been studied by ITC, and only a few studies can be found in the specialized literature [1,30-34]. Due to the self-associative nature of these systems, a dilution protocol is the method of choice for performing calorimetric measurements. A solution of a high protein concentration is placed in the syringe, while a buffer solution is loaded in the calorimetric cell. Dilution of the stock protein solution perturbs the equilibrium, triggering the dissociation of the homodimer in the cell to an extent that is determined by the equilibrium constant:

$$K_{disc} = \frac{[P]^2}{[P_2]}$$

where $[P]$ and $[P_2]$ are the molar concentrations of the free monomer and dimer, respectively.

According to a simple dimer dissociation model, the heat measured upon addition of the i^{th} injection of volume dV_i into the cell calorimeter of fixed-volume V_0 would be:

$$q_i = \Delta H_{disc} [P_2]_{syr} dV_i - \Delta H_{disc} ([P_2]_i - [P_2]_{i-1}) \left(V_0 + \frac{dV_i}{2} \right) \quad (31)$$

where ΔH_{disc} is the dissociation enthalpy of the dimer. The dimer concentration in the reaction cell $[P_2]_i$ and in the syringe $[P_2]_{syr}$ are in turn related to the corresponding equivalent monomer concentrations $[P_T]$ through the dissociation constant:

$$[P_T] = [P] + 2[P_2] = K_{disc}^{1/2} [P_2]^{1/2} + 2[P_2] \quad (32)$$

ΔH_{disc} and K_{disc} are determined from dilution calorimetric data through non-linear regression fitting of equations 31 and 32.

Figure 5 shows the calorimetric results obtained with dilution calorimetry for the dissociation of the homodimer of bovine β -lactoglobulin (β lg). The potentiogram shown in panel A indicates that dissociation occurred with heat absorption. As the protein concentration in the reaction cell was progressively increased, smaller heats were recorded with each new injection, tending asymptotically to a negative value that approximates the dilution heat of the protein [30]. Panel B shows the dissociation isotherm after subtracting dilution heats. The solid line corresponds to the best fitting of a dimer dissociation model (equations 31-32) to the experimental data [34].

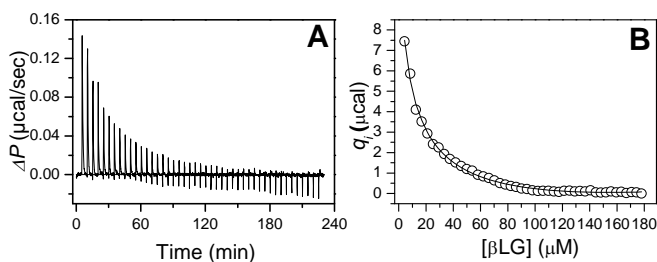


Figure 5. Heat effects of β lg dimer dissociation measured by ITC at 20 °C. **A)** Raw calorimetric trace. **B)** Dissociation isotherm corrected for dilution heats. The solid line corresponds to the best fitting of a dimer dissociation model (equations 31-32) to the experimental data.

A salient application of dilution calorimetry was reported by Luke et al. [33]. They demonstrated that ITC is useful in the thermodynamic analysis of protein homo-heptameric systems. They studied two co-chaperonin proteins from *Aquifex aeolicus* (*Aacpn10-del25*) and human mitochondria (*hmcpcn10*). ITC measurements revealed that the assembly processes of both *hmcpcn 10* and *Aacpn10-del25* heptamers are entropy driven. These results were explained by a release of ordered water molecules around the hydrophobic interfaces upon association.

4. Enriching thermodynamic information through systematic variation of solution conditions

The characterization of the binding process's response to environmental factors represents one of the richest sources of information for understanding the underlying principles that govern the formation of protein complexes. For instance, the formation of biomolecular complexes is often coupled to the exchange of small molecules such as protons, ions and water molecules [35]. Evaluation of the coupled equilibria is useful not only because it allows a finer dissection of the observed energetics, but also helps deepen our understanding of the physical bases of the function of biomolecules, and their adaptation to specific environmental conditions. Therefore, systematic experimental studies are performed over a wide range of solution conditions to assess the contribution of environmental factors to the observed thermodynamic properties.

4.1. Temperature

Heat capacity change (ΔCp_b) is a key function in the thermodynamic characterization of molecular binding. ΔCp_b is indispensable to account for the thermal dependence of the distribution of chemical species. It is also an important sensor of the re-arrangement of the network of intermolecular interactions elicited by events like changes in the accessibility of solute surfaces to the solvent [36,37]. It is well known that the hydration of polar and non-polar groups of proteins results in negative and positive changes in heat capacity, respectively [38]. Taking this into account, several semi-empirical methods have been formulated to calculate ΔCp_b from changes in water-accessibility of polar and non-polar surface areas in protein folding and binding. [39-43]. These models have

sufficed to account for the experimental ΔCp_b observed in a number of protein complexes. Nevertheless, in the last few years an increasing number of examples have been documented for which area models fail to explain the observed energetics. Often, this discrepancy has been shown to arise from the occurrence of coupled equilibria such as folding [44] or the exchange of counterions, protons and structural waters. In other instances, surface models have proven to be too simplistic to capture the intricate features inherent to particular complexes [35].

The approach currently most used to obtain the binding ΔCp_b using ITC entails the acquisition of binding isotherms at several temperatures (Figure 6A). Thus, ΔCp_b can be estimated as the first derivative of enthalpy (or entropy) with respect to temperature. This represents an enormous advantage in accuracy in relation to non-calorimetric techniques, where ΔCp_b is calculated as a second derivative of the equilibrium constant. Nevertheless, in spite of the boom in the number of ITC papers, the number of reports that include experimental ΔCp_b values is still scarce (about 10% of the papers using ITC published in the last five years). Since ΔCp_b is a fundamental binding function, the reason for this scarcity of data may often be related to limitations of economical and practical order. ITC can require up to several milligrams of reactants. These are prohibitively large amounts for many proteins, especially for those that must be purified directly from their natural sources. Furthermore, although ITC is a non-destructive technique, many receptors and ligands can not be recycled conveniently (or at all), thus requiring a new sample for each temperature to be evaluated.

Recently, a method was developed that allows the determination of ΔCp_b in a faster and cheaper way [45]. The salient advantage of this new method, named multithermal titration calorimetry (MTC), is that ΔCp_b can be determined in a single titration experiment. The MTC is based on a conventional stepwise titration. At an intermediate state of the titration process, the injection program is halted to allow the system to be equilibrated at a new temperature. Once thermal equilibrium is reached again, the injection program is restarted. Thermal readjustments are repeated to sample all desired temperatures, reaching at least 80% of receptor saturation at the highest temperature. As illustrated in Figure 6B, one can envision a single MTC curve built up as the sum of the partial segments of isotherms corresponding to different temperatures.

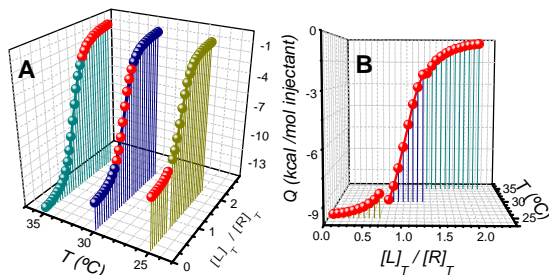


Figure 6. **A)** Simulated binding isotherms at three temperatures for a hypothetical 1:1 complex of moderate affinity ($K_b(25C) = 10^5 M^{-1}$, $\Delta H_b(25C) = -10 \text{ kcal mol}^{-1}$ and $\Delta Cp_b = -500 \text{ cal (molK)}^{-1}$). **B)** Simulated binding multitherm constructed as the sum of partial segments of the three binding isotherms in panel A.

For most of the complexes studied so far, it has been observed that the dependence of ΔH_b on temperature can be described satisfactorily through a straight line, i.e., assuming that ΔCp_b is independent of temperature. However, it is well known that ΔCp_b is a parameter that actually depends on temperature [36-37]. This thermal dependence is difficult to measure with modern isothermal calorimeters, and only in a few extraordinary cases has the associated curvature been solved ([35] and references cited therein). Evident deviations from linearity have been observed for ΔH versus temperature profiles when the binding process is coupled to additional equilibria, particularly in cases where folding and binding occur concurrently [46-49]. An interesting example of this situation was described by Milev et al. [44]. As shown in Figure 7 (open symbols), the binding of a domain of integrase Tn916 (74 residues) and a 13 bp DNA target duplex is characterized by a temperature-dependent ΔCp_b . The variation of the calorimetric ΔH versus temperature can be described adequately with a second-order polynomial, with ΔCp_b values ranging from $-335 \text{ cal}(\text{molK})^{-1}$ at 4°C to $-693 \text{ cal}(\text{molK})^{-1}$ at 30°C . This dependence can be rationalized in terms of the increasing structural motions that both the free protein and DNA duplex undergo upon heating, while thermal fluctuations are more limited in the complex. The magnitudes of these temperature-dependent contributions were inferred from DSC measurements as [50]:

$$\lambda = \int_{T_R}^T \{ [C_p(T) - C_p(T_R)]^c - \sum [C_p(T) - C_p(T_R)]^i \} dT \quad (33)$$

where C_p is the absolute heat capacity, superscripts i and c indicate the free and complexed forms, respectively, and T_R is a reference temperature. Upon subtraction of λ from ITC data, the binding enthalpy of a hypothetical rigid body association (ΔH_{corr}) was obtained

$$\Delta H_{corr} = \Delta H_{cal} - \lambda \quad (34)$$

Using ΔH_{corr} data (solid symbols in Figure 7) the temperature independence of ΔCp_b becomes apparent.

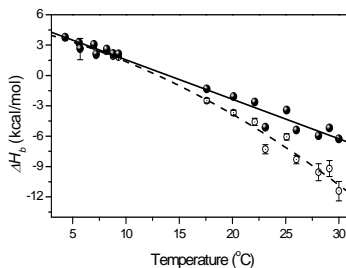


Figure 7. ΔH_b as a function of temperature for the interaction of a domain of integrase Tn916 and a 13 bp DNA target duplex. See text for details. Adapted from [44].

For the vast majority of protein complexes studied so far, the calorimetrically measured ΔC_p_b has presented a negative value. Nevertheless, counterexamples exist. For instance, the binding of murine translation initiation factor (eIF4E) to an mRNA5'Cap analogue was characterized by a large positive ΔC_p_b of $465 \text{ cal (molK)}^{-1}$ [51]. This atypical result seems to arise from the dominance of polar (charged and neutral) groups over apolar groups that become buried at the interface upon complex formation.

4.2. Coupled equilibria

4.2.1. Residual hydration

Two kinds of water molecules have traditionally been distinguished in the study of the formation of biomolecular complexes: bulk and solvation water molecules. The differences in the thermodynamic properties of these water types yield the basis for the solvation/desolvation contributions of the interacting surfaces. These contributions have been accounted for satisfactorily through surface area models for a number of protein-protein [30] and protein-ligand complexes [43]. Structural water molecules represent a third kind. Comprehensive analyses of X-ray structures of protein complexes have unveiled the presence of water molecules at intermolecular interfaces as a recurrent feature [52,53]. These water molecules have a reduced number of accessible soft vibrational and rotational modes because of the relatively rigid and strongly hydrogen-bonding matrix formed at the binding interface. As a consequence, their thermodynamic properties are different from those of solvating and bulk water molecules, making it necessary to consider them explicitly as an integral part of the equilibrium. However, it has been complicated to establish a direct connection between sequestered water molecules and binding energetics. This difficulty is partly due to the fact that the contribution of a water molecule is highly dependent on the particular environment in which it becomes buried upon complex formation. Furthermore, residence times for structural waters, which can vary within a wide range, are also very dependent on the environment. Despite these inherent complications, recently an increasing number of complexes have been shown to have a very significant contribution from the net ejection or incorporation of structural water molecules [34,52,54-59].

A way to experimentally assess hydration effects coupled to complex formation is provided by the osmotic stress approach [60,61]. This approach relies on measuring the variation of the equilibrium constant towards water activity. Water activity is modified with the use of a cosolute which is otherwise inert for the reaction being studied. Water activity can be perturbed conveniently with nonionic osmolytes, avoiding the electrostatic effects that take place with the use of charged osmolytes. Cosolutes exert opposite effects on the equilibrium constant for reactions that expel or incorporate water molecules. In the case of reactions that bury water molecules in microenvironments that are inaccessible to the osmolyte due to steric hindrance or chemical incompatibility, the latter competes indirectly for these molecules due to its dropping effect on bulk water activity, thus decreasing the magnitude of the equilibrium constant. On the contrary, osmotic stress favors reactions that eject water molecules. The number of water molecules that are not accessible to the osmolyte (ΔN_w) can be estimated from the dependence of the equilibrium constant on the osmolality of the solution, [osmol] [60]:

$$\Delta N_w = -55.6 \frac{\partial \ln K}{\partial [\text{osmol}]} \quad (35)$$

Figure 8 shows the results of coupled osmotic-ITC measurements for the formation of the bovine β -lg homodimer using sucrose or acetamide as stressing agents, two osmolytes with quite different chemical properties [34]. The behavior observed in Figure 8 is consistent with the net uptake of 36 ± 3 water molecules upon dimer formation. Furthermore, the virtually identical response observed for both osmolytes indicates that these water molecules become sterically sequestered upon complex formation. The incorporation of water molecules into the highly structured environment at the dimer interface must significantly restrict their soft vibrational and rotational modes, having therefore a decreasing effect on the ΔCp_b . Indeed, β -lg dimer is another example of a complex whose experimental ΔCp_b ($-495 \pm 9 \text{ cal (molK)}^{-1}$) is significantly more negative than estimates based on surface area models (-105 to $-174 \text{ cal (molK)}^{-1}$), even when the association of its subunits has been experimentally proved to be rigid-body like [34]. However, numerical estimates considering the contributions of water immobilization accounted satisfactorily for the increased magnitude of the negative ΔCp_b occurring in the formation of the β -lg dimer [34].

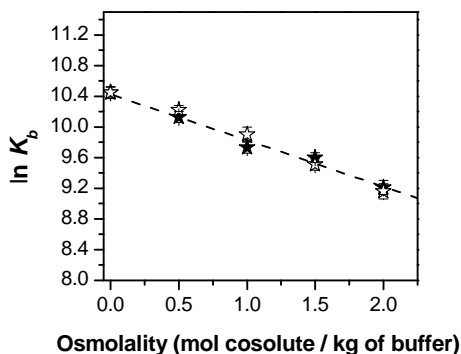
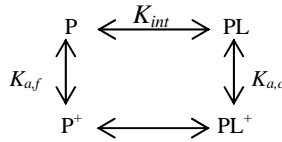


Figure 8. Coupled osmotic-ITC measurements for the formation of β -lg homodimer, using sucrose (solid symbol) or acetamide (open symbol) as stress agents. The linearity observed as well as the agreement in K_b in the number of exchanged water molecules for both osmolytes indicate that changes measured in K_b are nonspecific. Furthermore, calorimetric titrations of predominantly dimeric β lg ($>1 \text{ mM}$) with sucrose or acetamide (2 M) yielded caloric effects not differentiable from dilution heats. Adapted from [34].

4.2.2. Proton linkage

The role of ionizable groups in the formation of protein complexes has traditionally been assessed by measuring K_b as a function of pH . In the simplest case of the formation of a 1:1 protein-ligand complex linked to the binding of a single proton by a protein-ionizable group, the underlying mechanism can be depicted with the following scheme:



where P and P⁺ represent the deprotonated and protonated unligated forms of the protein, respectively; PL and PL⁺ are the deprotonated and protonated complexes, respectively, K_{int} is the binding constant for the unprotonated protein, and $K_{a,f}$ and $K_{a,c}$ are the protonation constants for the free and coupled forms of the protein, respectively. To subtract any protonation effect from the measured thermodynamic functions, every sub-equilibrium step must be taken into account. According to the linkage theory developed by Wyman and Gill [62], the observed binding constant K_b at a given pH is given by:

$$K_b = K_{int} \frac{1 + 10^{(pK_{a,c}) - pH}}{1 + 10^{(pK_{a,f}) - pH}} \quad (36)$$

The fitting of K_b versus pH through equation 36 lets us calculate $K_{a,f}$ and $K_{a,c}$ values. With the different pK_a ($= -\log K_a$) parameters determined, the fractional saturation of protons in the free species N_f^+ can be calculated as:

$$N_f^+ = \frac{10^{(pK_{a,f}) - pH}}{1 + 10^{(pK_{a,f}) - pH}} \quad (37)$$

and equally for the protein in complex with the ligand N_c^+ :

$$N_c^+ = \frac{10^{(pK_{a,c}) - pH}}{1 + 10^{(pK_{a,c}) - pH}} \quad (38)$$

Finally, the change in the number of protons bound to or released by the complex (N^+), characterized by plus or minus signs, respectively, is the difference between these values:

$$N^+ = N_c^+ - N_f^+ \quad (39)$$

If any additional protonation event occurred, it must be considered in the subpartition functions. For example, the model that should be applied to two protons linked to binding is:

$$K_b = K_{int} \frac{1 + 10^{(pK_{a,c2} - pH)} + 10^{(pK_{a,c1} - pH)}}{1 + 10^{(pK_{a,f2} - pH)} + 10^{(pK_{a,f1} - pH)}} \quad (40)$$

An alternative way to evaluate the role of protonation in complex formation was formulated by Baker and Murphy [63]. This approach is based on the analysis of binding ΔH and ΔCp obtained by ITC at several pH conditions. A salient characteristic of this approach is that the number of protons exchanged upon binding N^+ can be calculated directly from calorimetric data using buffers of different ionization enthalpy (ΔH_{ion}):

$$\Delta H = \Delta H_0 + N^+ \Delta H_{ion} \quad (41)$$

where ΔH_0 is the enthalpy that would be measured in a buffer solution of zero ΔH_{ion} . ΔH_0 is the sum of the intrinsic binding enthalpy (ΔH_{int}) plus protonation contributions of free or coupled species:

$$\Delta H_0 = \Delta H_{int} - N_f^+ \Delta H_f^+ + N_c^+ (\Delta H_f + \delta \Delta H^+) \quad (42)$$

where ΔH_f^+ is the enthalpy change of protonation for the free ionizable group and $\delta \Delta H^+$ is the change in this quantity due to binding.

Substitution of equation 39 into equation 42 gives:

$$\Delta H_0 = \Delta H_{int} + N^+ \Delta H_f^+ + N_c^+ \delta \Delta H^+ \quad (43)$$

The substitution of equation 43 into equation 41 results in:

$$\Delta H = \Delta H_{int} + N^+ \Delta H_f^+ + N_c^+ \delta \Delta H^+ + N^+ \Delta H_{ion} \quad (44)$$

Thus, with pH , ΔH_{ion} and ΔH as experimental variables, it is possible to construct a three-dimensional plot and fit equations 37-39 and 44 to these values. Thus, we obtain pK_a for the free and coupled species of ionizable groups, as well as the values of ΔH_{int} , ΔH_f^+ and $\delta \Delta H^+$.

Finally, the proton linkage effect in the heat capacity change upon binding can be calculated similarly to equation 41:

$$\Delta Cp = \Delta Cp_0 + \frac{\delta N^+}{\delta T} \Delta H_{ion} + N^+ \Delta Cp_{ion} \quad (45)$$

where ΔCp_0 is the temperature derivative of ΔH_0 and ΔCp_{ion} is the ionization ΔCp of the buffer. The intrinsic binding heat capacity change, ΔCp_{int} , can be calculated similarly to equation 43 as:

$$\Delta Cp_0 = \Delta Cp_{int} + \frac{\delta N^+}{\delta T} \Delta H_f^+ + N^+ \Delta Cp_f^+ + \frac{\delta N_c^+}{\delta T} \delta \Delta H^+ + N_c^+ \delta \Delta Cp^+ \quad (46)$$

where ΔCp_f^+ is the heat capacity change for the free species and $\delta \Delta Cp^+$ is the change of protonation upon binding. The temperature dependence of N^+ is described as:

$$\frac{\delta N^+}{\delta T} = \frac{\delta N_c^+}{\delta T} - \frac{\delta N_f^+}{\delta T} = \left[\frac{\Delta H_f^+ + \delta \Delta H_f^+}{RT^2} \frac{10^{(pK_{a,c} - pH)}}{(1 + 10^{(pK_{a,c} - pH)})^2} \right] - \left[\frac{\Delta H_f^+}{RT^2} \frac{10^{(pK_{a,f} - pH)}}{(1 + 10^{(pK_{a,f} - pH)})^2} \right] \quad (47)$$

Although equations 42-47 have been derived for a single protonation event, the treatment can be extended to two or more sites of ionization by including the appropriate polynomials, according to the linkage theory proposed by Wyman and Gill [62].

The Baker-Murphy's approach allows us to quantify the entire energetic contributions of proton exchange coupled to binding. Saliiently, this approach does not require for

binding constants to be determined, as it only requires the use of enthalpy and heat capacity changes. This situation allows the study of complexes of very high affinity, whose binding ΔH and ΔC_p can be readily and accurately determined with ITC (see section 3.4).

A study where proton linkage was exhaustively evaluated with the two approaches described above was carried out with a Src kinase [64]. The Src homology 2 domains (SH2) are protein modules involved in signal transduction that bind sites of tyrosine phosphorylation in cellular proteins, initiating a cascade of events that eventually leads to altered patterns of gene expression. This property makes these domains attractive targets for anticancer pharmaceuticals. To evaluate the contributions of protonation exchange to binding, ITC experiments of SH2 binding to a high-affinity tyrosyl phosphopeptide were carried out at several pH values. In a first set of experiments, measurements were carried out in a triple buffer system that allowed for constant buffered conditions in the 5-9 pH range. As can be seen in Figure 9, K_b shows a maximum around neutral pH .

The analysis of K_b versus pH data revealed that the observed behavior can be described satisfactorily by a two-proton linkage model: one proton for each transition observed under acidic and basic conditions. The sharper decrease of K_b at acidic conditions is explained by a considerable downward pK_a shift ($\Delta pK_a = -2.2$). The phosphate in phosphotyrosine (pTyr) was identified as the ionizable group that becomes protonated below neutral pH , while a cysteine of the Src SH2 domain was proposed as the other ionizable group. A second series of experiments was performed at pH values of 5.2, 6, 7 and 8 in several buffers with distinct ΔH_{ion} . The analysis of ΔH versus ΔH_{ion} (equation 41) gave negative N^+ values at acidic and neutral pH , and a positive value at pH 8, indicating a transition from a proton-releasing to a proton-absorbing mechanism as pH increases. Data in the pH 4.5-7.0 range were described satisfactorily by a single proton model according to equation 41, but it was not possible to obtain a robust fitting for data measured at basic conditions. The two approaches yielded very similar values for the acid constants and the number of protons exchanged. Using the approach based on ΔH data, it was possible to dissect the protonation ΔG of pTyr into its enthalpic and entropic components. The analysis revealed that the unfavourable protonation effect was mainly due to an entropic cost, while the enthalpic contribution was negligible.

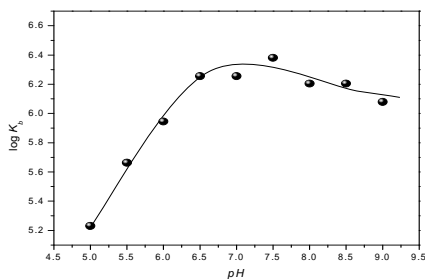


Figure 9. Binding constant as function of pH for the interaction of Src SH2 domain with a tyrosyl phosphopeptide. The solid line represents the best fit of a two-proton linkage model (equation 40). Adapted from [64].

Perhaps the most complete characterization performed so far of the thermodynamics of proton linkage to the formation of a protein complex is Baker and Murphy's study of the binding of turkey ovomucoid third domain (OMTKY3) to a serine protease inhibitor (porcine pancreatic elastase, PPE) [65]. However, although the authors included ΔCp_f^+ and $\delta\Delta Cp^+$ as fitting parameters, the standard errors associated were too large ($\Delta Cp_f^+ = -7 \pm 48 \text{ cal (molK)}^{-1}$ and $\delta\Delta Cp^+ = -0.17 \pm 0.14 \text{ cal (molK)}^{-1}$), showing the difficulty in obtaining protonation heat capacities even from the analysis of high-precision ITC data.

4.2.3 Counterion exchange

Thermodynamic formation parameters of biomolecular complexes involving changes in the environment of charged groups normally present a strong dependence on the concentration of ionic cosolutes [35]. The specific effects exerted by ions that form a central part of the chemical equilibrium as reactants or products represent a limiting case. In that case, the thermodynamic equilibrium is properly described through direct stoichiometric binding models. Examples of these interactions include proteins presenting defined recognition sites where ions can anchor with high affinity and specificity (e.g., metalloenzymes, hemoproteins, transporters) as well as complexes whose formation/disruption is sensitive to the ionization state of protonable groups. Ions can also perturb biomolecular equilibria through a rather nonspecific weak interaction mechanism, by condensing themselves around the macromolecules, e.g., by forming diffuse counterionic clouds.

Record and colleagues have formulated empirical relationships to describe the effect of salts on reactions involving polyelectrolyte molecules such as nucleic acids and their protein counterparts [66,67]:

$$\log K_b = \log K_{ref} - A \log [MX] \quad (48)$$

where A is the net number of ions (cations plus anions) released upon complex formation and $[MX]$ is the salt concentration. At low salt concentrations ($\leq 0.3 \text{ M}$), the chemical activity of water is minimally perturbed; hence, the dependence of K_b is assessed under those salt conditions to achieve a direct determination of the effects of counterion exchange. According to traditional physicochemical views, upon contact of the protein with the DNA polyanion, counterions are released producing a favorable, purely entropic effect. This effect arises from the mixing of released ions upon binding with bulk ions. The magnitude of K_b decreases at higher salt concentrations, since the cratic entropy is progressively less favorable as the difference in concentration of ions in bulk and over polyelectrolyte surfaces decreases. Extrapolation of K_{obs} at 1 M of salt concentration (i.e., $\log [MX] = 0$) allows a determination of the binding constant in the absence of any thermodynamic effect associated with the release of counterions, K_{ref} . Using this approach, the observed binding energy can be parsed into its non-counterionic (ΔG_{nci}) and counterionic (ΔG_{ci}) components [67].

So far, the response of thermodynamic binding parameters to variations in salt concentration has been calorimetrically studied more thoroughly for protein-DNA adducts [68-74]. For a number of complexes it has been observed that ΔG_{ci} is the major component of the total binding energy. Dragan *et al.* [75], for instance, found that ΔG_{ci} can represent up to 80% of the total binding energy in the formation of a DNA-

homeodomain complex. For some complexes, ITC measurements have shown ΔH_b to be fairly independent of salt concentration [68]. Nevertheless, several counterexamples showing a strong dependence of ΔH_b (and even of ΔCp_b) on salt concentration have been reported [71,72,76]. For the interaction of a SSB tetramer to a single-stranded DNA, it has been shown that around one-third of the observed ΔCp_b arises from salt effects [74]. Variations in the binding enthalpy can be anticipated on the basis of a Debye screening effect at high salt concentrations. Nevertheless, in some cases a screening mechanism was not sufficient to explain the observed salt dependence. It was necessary to formulate linkage thermodynamic models including explicitly binding sites for ions [74,76]. Overall, these studies have highlighted the importance of examining the full energetic binding profile in order to avoid misinterpretations that can be reached easily when drawing conclusions from the analysis of free energies only.

Equation 48 was formulated envisioning the net release of counterions upon complex formation as the underlying mechanism responsible for the observed decrease of the equilibrium constant with an increase of salt concentration. Nevertheless, the equation has also been used successfully in the analysis of complexes whose interaction becomes tighter increasing the salt concentration, i.e., involving a net uptake of counterions. A salient example of this inverse dependence was reported by Ladbury and co-workers for the binding of DNA by a TATA binding protein from the halophilic and hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* [68,69]. In analyzing the structural basis of the salt dependence of this complex, the authors hypothesized that cations are sequestered in the protein-DNA interface in order to mediate contacts between DNA phosphates and negative-charged (acidic) residues of the protein. This picture was experimentally proven through site-directed mutational studies. The replacement of a selected glutamate by a positively charged lysine was shown to alter drastically the effects of salt on the thermodynamic equilibrium, reducing the number of incorporated cations. Notably, this reversal mutation plus the substitutions of two additional glutamates by alanines sufficed to convert the behavior of the halophilic complex into the typical counterion-releasing behavior observed with its mesophilic counterparts.

Acknowledgment

This work was supported in part by CONACYT (Grants 47097, 41328) and the UNAM PAPIIT program (Grant IN217106-3).

References

1. Velazquez-Campoy, A., Leavitt, S. A., Freire, E. 2004, *Methods Mol Biol* 35, 261.
2. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., Lin, L.-N., 1989, *Anal Biochem* 179, 131.
3. Turnbull, W.B., Daranas, A.H., 2003, *J Am Chem Soc* 125, 14859.
4. Andujar-Sánchez, M., Smith, A., Clemente-Jimenez, J.M., Rodriguez-Vico, F., Las Heras-Vazquez, F.J., Jara-Pérez, V., Cámara-Artigas, A., 2005, *Biochemistry* 44, 1174.
5. Ortiz-Salmeron, E., Yassin, Z., Clemente-Jimenez, M.J., Las Heras-Vazquez, F.J., Rodriguez-Vico, F., Baron, C., Garcia-Fuentes, L. 2001, *Biochim Biophys Acta* 1548, 106.
6. Milev, S., Bjelic, S., Georgiev, O., Jelesarov, I. 2007, *Biochemistry* 46, 1064.
7. Garcia-Fuentes, L., Camara-Artigas, A., Lopez-Mayorga, O., Baron, C. 1996, *J Biol Chem* 271, 27569.
8. Manak, M., Ferl, R.J., 2007, *Biochemistry* 46, 1055.

9. Nielsen, A.D., Borch, K., Westh, P. 2000, *Biochim Biophys Acta* 1479, 321.
10. Kvaratskhelia, M., Wardleworth, B.N., Bond, C.S., Fogg, J.M., Lilley, D.M.J., White, M.F. 2002, *J Biol Chem* 277, 2992.
11. Jeromin, A., Muralidhar, D., Parameswaran, M.N., Roder, J., Fairwell, T., Scarlata, S., Dowal, L., Mustafi, S.M., Chary, K.V.R., Sharma, Y. 2004, *J Biol Chem* 279, 21758.
12. Mustafi, S.M., Mukherjee, S., Chary, K.V., Del Bianco, C., Luchinat, C. 2004, *Biochemistry* 43, 9320.
13. Park, A., Lamb, H.K., Nichols, C., Moore, J.D., Brown, K.A., Cooper, A., Charles, I.G., Stammers, D.K., Hawkins, A.R. 2004, *Protein Sci* 13, 2108.
14. Liu, R., Yang, J., H.A.C., Bhagavan, N.V., Eckenhoff, R.G. 2005, *Biochem J* 39, 388.
15. Thompsett, A.R., Abdelraheim, S.R. Daniels, M., Brown, D.R. 2005, *J Biol Chem* 280, 42750.
16. Wang, P., Oscarson, L.J., Izatt, R. M., Watt, G. D., Larsen, C.D. 1995, *J. Solution Chem* 24, 989.
17. Andújar-Sánchez, M., Cámara-Artigas, A., Jara-Pérez, V. 2004, *Biophys Chem* 111, 183.
18. Sigurskjold, B.W. 2000, *Anal Biochem* 277, 260.
19. Abo-Hashema, K.A., Cake, M.H., Lukas, M.A., Knudsen, J. 2001, *Int J Biochem Cell Biol* 33, 807.
20. Chao, Y., Fu, D. 2004, *J Biol Chem* 279, 17173.
21. Gopal, B., Swaminathan, C.P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Murthy, M.R., Suroli, A. 1997, *Biochemistry* 36, 10910.
22. Rosser, M.F., Nicchitta, C. V. 2000, *J Biol Chem* 275, 22798.
23. Flachner, B., Kovari, Z., Varga, A., Gugolya, Z., Vonderviszt, F., Naray-Szabo, G., Vas, M. 2004, *Biochemistry* 43, 3436.
24. Erickson, J.R., Sidell, B.D., Moerland, T.S., 2005 *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 140, 179.
25. Johansson, J.S., Manderson, G.A., Ramoni, R., Grolli, S., Eckenhoff, R.G. 2005, *FEBS J* 272, 573.
26. Liu, R., Eckenhoff, R.G. 2005, *Anesthesiology* 102, 799.
27. Deniau, C., Gilli, R., Izadi-Pruneyre, N., Letoffe, S., Delepierre, M., Wandersman, C., Briand, C., Lecroisey, A. 2003, *Biochemistry* 42, 10627.
28. Hellmann, N., Jaenicke, E., Decker, H. 2001, *Biophys Chem* 90, 279.
29. Markova, N., Hallen, D. 2004, *Anal Biochem* 331, 77.
30. Burrows, S.D., Doyle, M.L., Murphy, K.P., Franklin, S.G., White, J.R., Brooks, I., McNulty, D.E., Scott, M.O., Knutson, J.R., Porter, D., Young, P.R., Hensley, P. 1994, *Biochemistry* 33, 12741.
31. Lovatt, M., Cooper, A., Camilleri, P. 1996, *Eur Biophys J* 24, 354.
32. Chen, S., Chen, L., Tan, J., Chen, J., Du, L., Sun, T., Shen, J., Chen, K., Jiang, H., Shen, X. 2005, *J Biol Chem* 280, 164.
33. Luke, K., Apiyo, D., Wittung-Stafshede, P. 2005, *Biophys J* 89, 3332.
34. Bello, M., Pérez-Hernández, G., Fernández-Velasco, D.A., Arreguín-Espinosa, R., García-Hernández, E. 2007, *Proteins: Struct Funct Bioinformatics* DOI: 10.1002/prot.21639.
35. Ladbury, J.E., Williams, M.A. 2004, *Curr Opin Struct Biol* 14, 562.
36. Gomez, J., Hilsner, V.J., Xie, D., Freire, E. 1995, *Proteins: Struct Funct Genetics* 22, 404.
37. Cooper, A. 2005, *Biophys Chem* 115, 89.
38. Prabhu, N.V., Sharp, K.A. 2005, *Annu Rev Phys Chem* 56, 521.
39. Murphy, K.P., Freire, E. 1992, *Adv Protein Chem* 43, 313.
40. Spolar, R.S., Livingstone, J.R., Record, M.T., Jr. 1992, *Biochemistry* 31, 3947.

41. Makhatazde, G.I., Privalov, P.L. 1995, *Adv Protein Chem* 47,307.
42. Myers, J.K., Pace, C.N., Scholtz, J.M. 1995, *Protein Sci.* 4, 2138.
43. García-Hernández, E., Zubillaga, R.A., Chavelas, E.A., Vázquez-Contreras, E., Rojo-Domínguez, A., Costas, M. 2003, *Protein Sci* 12, 135.
44. Milev, S., Gorfe, A.A., Karshikoff, A., Clubb, R.T., Bosshard, H.R., Jelesarov, I. 2003, *Biochemistry* 42, 3481.
45. Chavelas, E.A., Zubillaga, R.A., Pulido, N.O., García-Hernández, E. 2006, *Biophys Chem* 120, 10.
46. Spolar, R.S., Record Jr., M.T. 1994, *Science* 263, 777.
47. Jen-Jacobson, L., Engler, L.E., Jacobson, L.A. 2000, *Structure* 8, 1015.
48. Dyson, H.J., Wrighth, P.E. 2002, *Curr Opin Struct Biol* 12, 54.
49. Fink, A.L. 2005, *Curr Opin Struct Biol* 15, 35.
50. Privalov, P.L., Jelesarov, I., Read, C.M., Dragan, A.I., Crane-Robinson, C. 1999, *J Mol Biol* 294, 997.
51. Niedzwecka, A., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., Sonenberg, N., Stolarski, R. 2002, *Biochemistry*, 41, 12140.
52. Ladbury, J.E. 1996, *Chem Biol* 3, 973.
53. Rodier, F., Bahadur, R.P., Chakrabarti, P., Janin J. 2005, *Proteins: Struct Funct Bioinformatics* 60, 36.
54. Jelesarov, I., Bosshard, H.R. 1994, *Biochemistry* 33, 13321.
55. Morton, C.J., Ladbury, J.E. 1996, *Protein Sci* 5, 2115.
56. Holdgate, G.A., Tunnicliffe, A., Ward, W.H.J., Weston, S.A., Rosenbrock, G., Barth, P.T., Taylor, I.W.F., Pauptit, R.A., Timms, D. 1997, *Biochemistry* 36, 9663.
57. Clarke, C., Woods, R.J., Gluska, J., Cooper, A., Nutley, M.A., Boons, G.J. 2001, *J Am Chem Soc*, 123, 12238.
58. Bergqvist, S., Williams, M.A., O'Brien, R., Ladbury, J.E. 2004, *J Mol Biol* 336, 829.
59. Wright, E., Serpersu, E.H. 2006, *Biochemistry* 45, 10243.
60. Parsegian, V.A., Rand, R.P., Rau, D.C. 1995, *Meth Enzymol* 259, 43.
61. Rau, D.C. 2006, *J Mol Biol* 361, 352.
62. Wyman, J., Gill, S. 1990, *Binding and linkage*, (University Science Books, Mill Valley, CA).
63. Baker, B.M., Murphy, K.P. 1996, *Biophys J* 71, 2049.
64. Bradshaw, J.M., Waksman, G. 1998, *Biochemistry* 37, 15400.
65. Baker, B.M., Murphy, K.P. 1997, *J Mol Biol* 268, 557.
66. Ha, J.H., Capp, M.W., Hohenwalter, M.D., Baskerville, M., Record, M.T., Jr. 1992, *J Mol Biol* 228, 252.
67. Record, M.T., Jr., Zhang, W., Anderson, C.F. 1998, *Adv Protein Chem* 51, 281.
68. Bergqvist, S., O'Brien, R. and Ladbury, J.E. 2001, *Biochemistry* 40, 2419.
69. Bergqvist, S., Williams, M.A., O'Brien, R., Ladbury, J.E. 2003, *Biochem Soc Transactions* 31, 677.
70. Dragan, A.I., Frank, L., Liu, Y., Makeyeva, E.N., Crane-Robinson, C., Privalov, P.L. 2004, *J Mol Biol* 343, 865.
71. Cui, T., Wei, S., Brew, K., Leng, F. 2005, *J Mol Biol* 325,629.
72. Milev, S., Bosshard, H.R., Jelesarov, I. 2005, *Biochemistry* 44, 285.
73. Kernchen, U., Lipps, G. 2006, *Biochemistry* 45, 594.
74. Kozlov, A.G., Lohman, T.M. 2006, *Biochemistry* 45, 5190.
75. Dragan, A.I., Li, Z., Makeyeva, E.N., Milgotina, E.I., Liu, Y., Crane-Robinson, C., Privalov, P.L. 2006, *Biochemistry* 45, 141.
76. Waldron, T.T., Schrifft, G.L., Murphy, K.P. 2005, *J Mol Biol* 346, 895.

Multithermal titration calorimetry: A rapid method to determine binding heat capacities

Eneas A. Chavelas^a, Rafael A. Zubillaga^b, Nancy O. Pulido^a, Enrique García-Hernández^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, México D.F., México 04510

^b Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, A.P. 55-534, México D.F., México 09340

Received 15 July 2005; received in revised form 19 September 2005; accepted 20 September 2005

Available online 24 October 2005

Abstract

Herein a new method that allows binding ΔC_p to be determined with a single experiment is presented. Multithermal titration calorimetry (MTC) is a simple extension of isothermal titration calorimetry (ITC) that explicitly takes into account the thermal dependences of ΔH and the binding constant. Experimentally, this is accomplished by performing a single stepwise titration with ITC equipment, allowing temperature re-adjustments of the system at intermediate states of the titration process. Thus, from the resulting multitherm, ΔC_p can also be determined. The experimental feasibility of MTC was tested by using the well-characterized lysozyme–chitotriose complex as a model system.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Isothermal titration calorimetry; Molecular recognition; Binding energetics

1. Introduction

An old maxim of chemistry and molecular biology states that in molecular recognition processes, structure underpins function [1]. In due course, this picture was complemented with the thermodynamic certainty that complex formation depends, in turn, on the energetics that makes it a spontaneous event. As a consequence, the thorough and precise characterization of the energetics of molecular complex formation, including its dependence on relevant environmental variables, became widely agreed to be of major concern, constituting nowadays one of the most vigorous branches of research in molecular sciences.

Thermodynamically, the stability of a complex is defined by the difference in free energy between the complex and the free molecular partners (ΔG). The quantitative interpretation of this state function in terms of its microscopic components continues to be one of the major challenges of current molecular sciences. In particular, it has proven to be difficult for systems of moderate or high complexity, as in the case of the vast majority of biomolecular processes. A first step towards the dissection of ΔG is the evaluation of its enthalpic (ΔH) and entropic (ΔS)

components. Many contemporary models aimed at establishing structure–function correlates consider separately these functions, capturing different, though interrelated, properties of the system. For instance, in the case of molecular recognition reactions occurring in an aqueous medium, ΔH is approximately equal to the change in internal energy of the solutes and the solvent, which in turn results from changes in electrostatic and van der Waals interactions. In contrast, ΔS arises from the change in the degrees of freedom of the solutes (conformational and mixing entropy) and the solvent (solvation entropy). In the thermodynamic characterization of molecular binding, the heat capacity change (ΔC_p) is another key function to be considered. ΔC_p is not only indispensable to account for the thermal dependence of the distribution of species, but is also an important sensor of the re-arrangement of the intermolecular interactions network elicited mostly by changes in the exposition of solutes to the solvent [2–4].

Isothermal titration calorimetry (ITC) is one of the most powerful and precise techniques currently available to characterize the energetics of molecular interactions (e.g., Refs. [5] and [6] and references therein). Heat effects have proven to be a widely spread property in molecular recognition processes, which ITC measures directly. Since the heat evolved is proportional to the moles of complex formed, the binding constant (K_B) can also be solved by conducting a conventional

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 44 24; fax: +52 55 56 16 22 03.
E-mail address: egarciah@servidor.unam.mx (E. García-Hernández).

titration protocol. Thus, ITC allows the binding functions ΔG , ΔH and ΔS to be determined with a single experiment. It also permits an accurate determination of the reaction stoichiometry, or alternatively, the actual concentration of the active form of one of the chemical species [7,8]. The current approach for determining ΔC_p by ITC involves the acquisition of binding isotherms at different temperatures. Thus, ΔC_p can be evaluated from the first derivative of the enthalpy with respect to temperature. This is an enormous advantage in accuracy in relation to non-calorimetric techniques, where ΔC_p is calculated as a second derivative of the equilibrium constant.

With the advent of commercially available high-precision ITC equipments, there has been a boom in the number of reports dealing with the calorimetric characterization of molecular complexes over the last fifteen years. For instance, a search for “isothermal titration calorimetry” in the *SciFinder Scholar* (V. 2004) database yielded a total of 203 papers published just in 2004, i.e., 75% of the total number of papers published during the entire decade of the 1990s. However, the number of studies reporting ΔC_p has remained relatively small even nowadays (about 1 out of every 10 papers published in 2004). Since ΔC_p is a fundamental binding function, the scarcity of data must often be rooted in reasons of economical and practical order. In fact, ITC typically requires large amounts of chemicals (up to several milligrams). Furthermore, although ITC is a non-destructive technique, many receptors and ligands cannot be recycled inexpensively, thus requiring a new sample for each temperature to be evaluated.

2. Multithermal titration calorimetry: description of the model

Herein we present a novel method, denominated multithermal titration calorimetry (MTC), which was developed to reduce the costs associated with the calorimetric determination of ΔC_p . The central idea underlying MTC is illustrated in Fig. 1. Fig. 1A shows simulated isotherms for a hypothetical complex at three different temperatures. Since ΔH and K_B

remain constant throughout each titration process, the analysis of isotherms at different temperatures is imperative for the determination of ΔC_p by conventional ITC. However, one can envision a single titration curve built up as the sum of partial segments of these isotherms (Fig. 1B). Hence, the resulting multi-temperature titration curve (binding multitherm) would contain not only information on K_B and ΔH , but also on the temperature dependence of these thermodynamic parameters, allowing ΔC_p to be determined.

The performance of an MTC experiment is based on a conventional stepwise titration. Nevertheless, at an intermediate state of the titration process the injection program is halted to allow the system to be equilibrated at a new temperature. This process of partial titration followed by a temperature jump is repeated to sample all the temperatures desired, ensuring a high degree of receptor saturation (>80%) at the highest temperature [9]. Analytically, the multitherm can be described by classical titration expressions, explicitly considering their dependence on temperature. At any given temperature T , the heat evolved ($Q_p(T)$) depends on $\Delta H(T)$ and the concentration of complex attained ($[RL](T)$):

$$Q_p(T) = \Delta H(T)V_0[RL](T) \quad (1)$$

where V_0 is the effective cell volume of the calorimeter. In turn, the complex concentration is a function of $K_B(T)$ and the total receptor ($[R]_T$) and ligand ($[L]_T$) concentrations:

$$[RL](T) = f(K_B(T), [R]_T, [L]_T). \quad (2)$$

The thermal dependences of $K_B(T)$ and $\Delta H(T)$ are formally described by the van't Hoff and Kirchoff relationships, respectively:

$$K_B(T) = K_B(T_R) \exp\left(\int_{T_R}^T \frac{\Delta H(T)}{RT^2} dT\right) \quad (3)$$

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_R) + \int_{T_R}^T \Delta C_p dT \quad (4)$$

where T_R is a reference temperature and R is the gas constant.

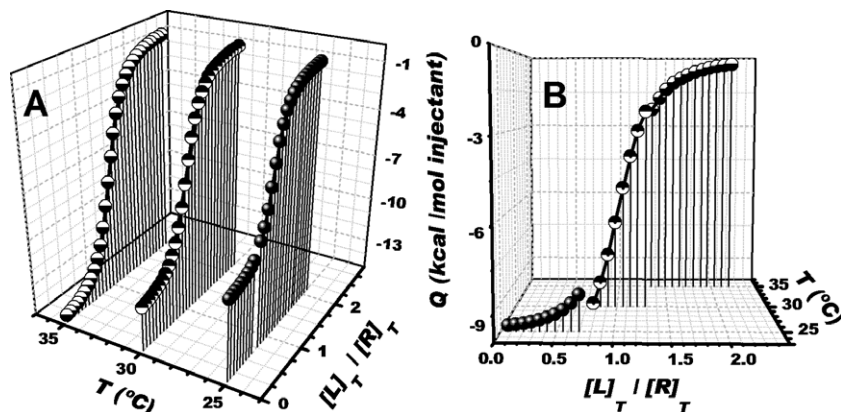


Fig. 1. (A) Simulated binding isotherms for a hypothetical 1:1 complex of moderate affinity ($K_B(25\text{ °C})=10^5$, $\Delta H(25\text{ °C})=-10\text{ kcal/mol}$, $\Delta C_p=-500\text{ cal/mol K}$) at three temperatures. Determination of ΔC_p by conventional ITC involves acquisition of the whole isotherms, each obtained from an independent titration experiment. (B) Simulated binding multitherm constructed as the sum of partial segments of the three binding isotherms in panel A. In contrast with ITC, in an MTC experiment the stepwise titration is carried out in a temperature range, allowing temperature re-adjustments of the system at intermediate states of the titration process.

3. Multithermal titration calorimetry: experimental validation

Although the MTC method may appear simple and conceptually well-grounded, its experimental feasibility with modern isothermal calorimeters needs to be proven. To address this issue, we used a VP-ITC equipment (MicroCal Inc., USA), one of the most popular and precise calorimeters commercially available nowadays. In the first step, different equilibration/heating regimes were tested to establish appropriate working conditions for the calorimeter. Once these conditions were met (see Fig. 2 legend for details), the method was tested by using the lysozyme–chitotriose complex as a model system. Lysozyme is an enzyme that cleaves the glycosidic bonds of chitin ($\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$)_{*n*} and cell-wall mucopolysaccharides ($\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{MurNAc}$)_{*n*}. Chitotriose, the trimer of GlcNAc, is the largest chitin-oligosaccharide that binds to lysozyme without being hydrolyzed, thus acting as a competitive inhibitor of the enzyme. This experimentally “well-behaved” adduct has been extensively characterized (Ref. [10] and references therein), and its binding energetics, including ΔC_p , has been determined by ITC [11].

Fig. 2A shows a raw MTC thermogram obtained from the progressive titration of lysozyme with chitotriose. Three temperatures were sampled in the course of the whole titration. The corresponding binding multitherm (constructed as the heat evolved in the *i*th injection per mol of ligand added vs. the molar ligand/receptor ratio, $X_T = [L]_T/[R]_T$) after subtraction of the heats of ligand dilution is shown in Fig. 2B. Although the overall shape of a multitherm may resemble that of an isotherm, an important difference is evident upon a closer inspection: the MTC trace is not as smooth as an ITC curve. It may present breaks between adjacent temperatures. On the one hand, this is due to the redistribution of the molecular species triggered by the change in the magnitude of the binding constant upon

temperature variation. In the case of the exothermic formation of the lysozyme-inhibitor complex, the equilibration of the system at a higher temperature leads to the dissociation of a fraction of the complex formed after the last addition at the lower temperature (Fig. 2C). On the other hand, since ΔC_p for this

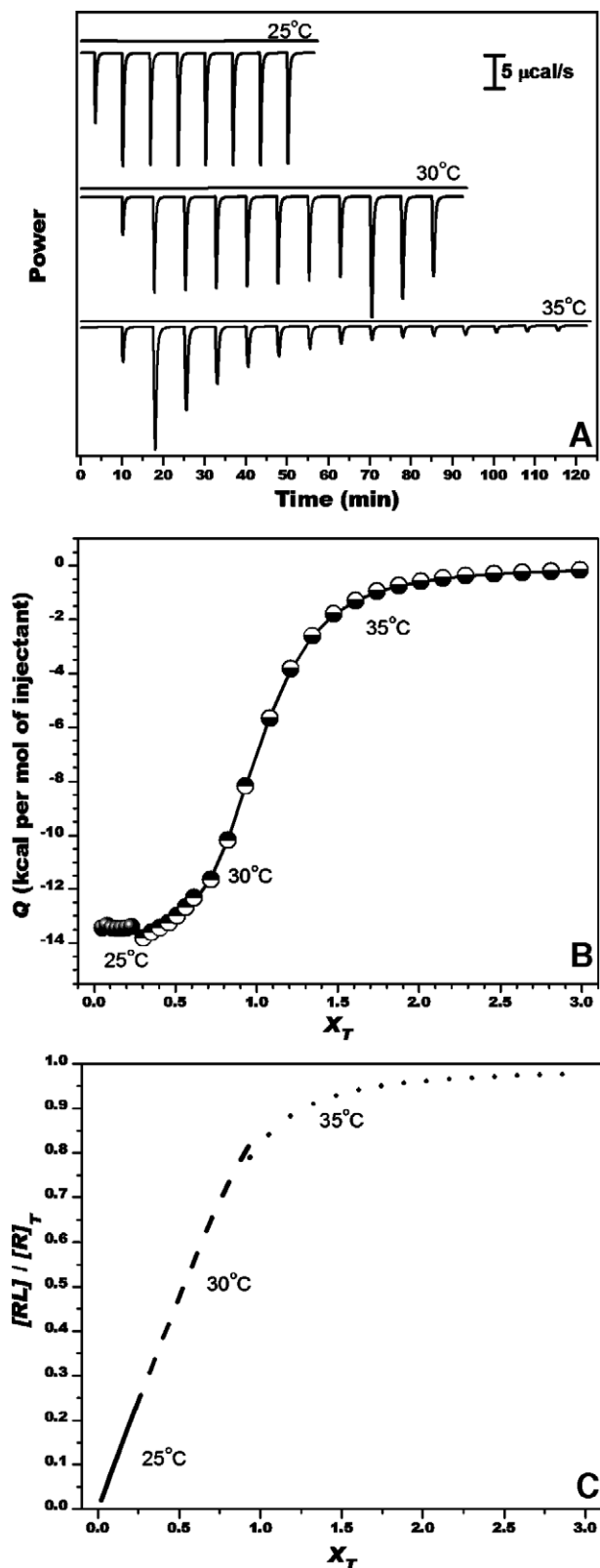


Fig. 2. Multithermal titration calorimetry (MTC) of lysozyme (0.402 mM) with chitotriose (5.75 mM) in 50 mM acetate buffer, pH 4.7. Samples were prepared as described in Ref. [11]. Throughout the whole experiment, the syringe was kept inside the reaction cell to avoid any mixing with the solution displaced out of the cell during previous injections. The experiment was started by equilibrating the sample-loaded equipment at 25 °C. After isothermally carrying out an injection program of one 2 μl (dummy) and $7 \times 3 \mu\text{l}$ ligand additions, the temperature was re-adjusted to 30 °C. The equipment was then allowed to thermostat at this new temperature for 45 min before one 2 μl (dummy), 7×5 and $3 \times 10 \mu\text{l}$ ligand injections were applied. Finally, this procedure was repeated at 35 °C, applying one 2 μl (dummy), $11 \times 12 \mu\text{l}$ and $3 \times 15 \mu\text{l}$ ligand injections. The appropriate equilibration/heating regime for our VP-ITC equipment was established by carrying out electronic and chemical calibrations. It was found that after the second temperature jump, at least 45 min were needed to thermostat the equipment at the new temperature. Otherwise, the instrument seemed to fall into a “false” equilibration state, yielding measurements with large deviations from the expected (electronically or chemically supplied) heats. (A) Raw potential difference traces vs. time at different temperatures. The figure also shows the traces corresponding to the dilution heats of the ligand obtained under the same injection schedule as in the binding experiment. (B) MTC curve constructed as the heat evolved normalized per mol of ligand injected vs. chitotriose/lysozyme molar ratio (X_T). The solid line represents the best fit obtained from an independent and identical binding sites model (Eqs. (5)–(7)). (C) Lysozyme’s saturation degree ($[RL]/[R]_T$) as a function of X_T at different temperatures.

Table 1
Energetics of lysozyme–chitotriose interaction at 35 °C determined by MTC and ITC^a

Experiment	η	ΔH (kcal/mol)	K_B	$-T\Delta S^\circ$ (kcal/mol)	ΔG° (kcal/mol)	ΔC_p (cal/mol K)
MTC 1	1.01±0.00	-15.00±0.07	68,300±1500	8.18	-6.82	-120±8
MTC 2	1.00±0.00	-15.18±0.15	64,000±1500	8.40	-6.78	-121±15
MTC 3	1.04±0.01	-15.45±0.19	64,300±2500	8.67	-6.78	-123±12
Average	1.02	-15.21	65,500	8.42	-6.79	-121
S.D. ^b	0.02	0.23	2400	0.25	0.02	2
ITC ^c	0.97±0.01	-15.20±0.10	68,700±2300	8.38	-6.82	-119±3

^aUncertainties correspond to regression standard errors, unless otherwise stated.

^bStandard deviation of the mean of three MTC experiments.

^cTaken from Ref. [11]. 1 cal=4.184 J.

complex is negative, a temperature increase yields a larger negative molar enthalpy, changing therefore the ratio between the heat evolved and the moles of complex formed upon ligand addition (Eq. (1)).

To analyze the binding multitherm of the lysozyme–chitotriose complex, an independent and identical binding sites model was used [8,11]:

$$\frac{\partial Q_p(T)}{\partial [L]_T} \frac{1}{V_0} = \Delta H(T) \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{X_T}{\eta} - K_B(T)\eta[R]_T}{2\sqrt{\left(1 + \frac{X_T}{\eta} + K_B(T)\eta[R]_T\right)^2 - 4\frac{X_T}{\eta}}} \right] \quad (5)$$

where η is the reaction stoichiometry. Although ΔC_p is known to be a function of temperature, its actual variation is small and typically beyond the resolution of modern ITC equipment. Assuming ΔC_p as temperature-independent, the integrated forms of Eqs. (3) and (4) become:

$$K_B(T) = K_B(T_R) \exp \left[\frac{1}{R} \left((\Delta H(T_R) - T_R \Delta C_p) \left(\frac{1}{T_R} - \frac{1}{T} \right) + \Delta C_p \ln \frac{T}{T_R} \right) \right] \quad (6)$$

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_R) + \Delta C_p(T - T_R). \quad (7)$$

It is to be noted that adaptation of the MTC method to more complex binding models is as straightforward as in the case of a single-independent sites model, since only the inclusion of Eqs. (6) and (7) into the particular binding model is required. The solid line in Fig. 2B corresponds to the best fitting of Eqs. (5)–(7) to the experimental data. Table 1 summarizes the results for the binding functions obtained from three independent MTC experiments. As can be seen, variations among experiments are rather small, exhibiting the reliability of the determinations. Table 1 also shows the magnitudes previously obtained for the same system by conventional ITC [11]. Overall, the excellent agreement between the two methods for each binding function demonstrates that the MTC method indeed preserves the advantages and robustness inherent to ITC.

The feasibility of the MTC method has been shown here by using a complex of moderate affinity, relatively large ΔH and

small ΔC_p . Satisfactory results have also been obtained in our laboratory for the titration of concanavalin A with methyl- α -mannose (data not shown), a low-affinity complex ($K_B \sim 9000$) that exhibits smaller ΔH and ΔC_p (-7.7 kcal/mol and -52 cal/mol K, respectively) as compared to those of the lysozyme–chitotriose complex. For both complexes, large calorimetric signals were obtained in relation to the minimum detection threshold of the calorimeter (<1 μ cal), as a result of the use of protein concentrations required to establish appropriate experimental conditions (i.e., $c = \eta K_B M_T > 1$). In part, this situation made possible a successful analysis of both complexes through the MTC model, even though the corresponding ΔC_p magnitudes were small. However, caution should be taken when studying the formation of adducts yielding small heat signals, e.g., systems with small molar enthalpies and/or systems with large affinity constants or poor solubility that require to be studied at very low concentrations. In fact, although this limitation is common to MTC and ITC methods, it should be noted that MTC also requires precise recordings to be obtained at higher temperatures, where the saturation degree is relatively high and therefore smaller heats are generated upon new ligand additions.

ITC represents a benchmark in the development of tools for measuring the thermodynamic properties of molecular complexes. In contrast to all indirect methods (surface plasmon resonance, fluorescence, ultracentrifugation, ELISA, etc.), ITC allows a straightforward measurement of the binding enthalpy. MTC may be seen as a new step in this direction. By performing temperature jumps at intermediate states of a titration process, a multitherm binding curve can be built from which ΔC_p can be evaluated with a single experiment. An enormous advantage achieved from this simple experimental variation is that the amounts of chemicals required can be brought down significantly. Furthermore, an MTC experiment is just slightly longer than a single-temperature ITC experiment, implying therefore a drastic reduction in time for the determination of ΔC_p . This time could be further reduced if ITC equipments are optimized to carry out MTC measurements, especially by decreasing the time of temperature re-adjustment and by fully automatizing the process.

Acknowledgments

We thank Dr. Miguel Costas for his critical reading of the manuscript. This work was supported in part by CONACyT

(Grants 47097, 41328, 46166). EAC and NOP received fellowships from CONACyT.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bpc.2005.09.022](https://doi.org/10.1016/j.bpc.2005.09.022).

References

- [1] J.S. Fruton, *Molecules and Life*, Wiley, New York, USA, 1972.
- [2] J.M. Sturtevant, Heat capacity and entropy in processes involving proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (1977) 2236–2240.
- [3] J. Gómez, V.J. Hilser, D. Xie, E. Freire, The heat capacity of proteins, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 22 (1995) 404–412.
- [4] A. Cooper, Heat capacity effects in protein folding and ligand binding: a re-evaluation of the role of water in biomolecular thermodynamics, *Biophys. Chem.* 115 (2005) 89–97.
- [5] M.J. Cliff, A. Gutierrez, J.E. Ladbury, A survey of the year 2003 literature on applications of isothermal titration calorimetry, *J. Mol. Recognit.* 17 (2004) 513–523.
- [6] A. Velázquez-Campoy, E. Freire, ITC in the post-genomic era...? Priceless, *Biophys. Chem.* 115 (2005) 115–124.
- [7] B.W. Sigurskjold, E. Altman, D.R. Bundle, Sensitive titration microcalorimetric study of the binding of *Salmonella* O-antigenic oligosaccharides by a monoclonal antibody, *Eur. J. Biochem.* 197 (1991) 239–246.
- [8] T. Wiseman, S. Williston, J.F. Brandts, L.N. Lin, Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, *Anal. Biochem.* 179 (1989) 131–137.
- [9] W.B. Turnbull, A.H. Daranas, On the value of c : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 14859–14866.
- [10] K. Hamaguchi, *The Protein Molecule: Conformation, Stability and Folding*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, 1992, pp. 199–228.
- [11] E. García-Hernández, R.A. Zubillaga, E.A. Chavelas-Adame, E. Vázquez-Contreras, A. Rojo-Domínguez, M. Costas, Structural energetics of protein–carbohydrate interactions. Insights derived from the study of lysozyme binding to its natural saccharide inhibitors, *Protein Sci.* 12 (2003) 135–142.

Protein Science

Structural energetics of protein–carbohydrate interactions: Insights derived from the study of lysozyme binding to its natural saccharide inhibitors

Enrique García-Hernández, Rafael A. Zubillaga, Eneas A. Chavelas-Adame, Edgar Vázquez-Contreras, Arturo Rojo-Domínguez and Miguel Costas

Protein Sci. 2003 12: 135-142

Access the most recent version at doi:[10.1110/ps.0222503](https://doi.org/10.1110/ps.0222503)

References

This article cites 41 articles, 14 of which can be accessed free at:
<http://www.proteinscience.org/cgi/content/full/12/1/135#References>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or [click here](#)

Notes

To subscribe to *Protein Science* go to:
<http://www.proteinscience.org/subscriptions/>

Structural energetics of protein–carbohydrate interactions: Insights derived from the study of lysozyme binding to its natural saccharide inhibitors

ENRIQUE GARCÍA-HERNÁNDEZ,¹ RAFAEL A. ZUBILLAGA,²
ENEAS A. CHAVELAS-ADAME,¹ EDGAR VÁZQUEZ-CONTRERAS,¹
ARTURO ROJO-DOMÍNGUEZ,² AND MIGUEL COSTAS³

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, México D.F., México 04510

²Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, A.P. 55–534, México D.F., México 09340

³Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, México D.F., México 04510

(RECEIVED July 2, 2002; FINAL REVISION October 14, 2002; ACCEPTED October 14, 2002)

Abstract

High-sensitivity isothermal titration calorimetry was used to characterize the binding of the glycohydrolitic enzyme hen egg-white lysozyme to its natural saccharide inhibitors, chitobiose and chitotriose. Measurements were done at a pH of 4.7, in the 15°C–45°C temperature range. Using a structural-energetic parameterization derived previously for lectin–carbohydrate associations, both binding enthalpies and entropies for the present systems and for the complex of chitobiose with turkey egg-white lysozyme from the literature were correctly accounted for. These observations suggest that both lysozymes and lectins follow the same structural-energetic behavior in the binding to their ligands. From the analysis of lysozyme data in conjunction with other binding data reported in the literature, an ad hoc parameterization of ΔCp for protein–carbohydrate complexes was derived for the first time. The novel parameters for both polar and apolar surface areas differed significantly from correlations obtained previously from model compounds and protein-folding data. As ΔCp is extremely sensitive to changes in solvent structure, this finding indicates that protein–carbohydrate complexes have distinctive hydration properties. According to our analysis, the dehydration of polar groups is the major cause for the observed decrease in ΔCp , which implies that these groups behave hydrophobically. The contribution of apolar surface areas was found of the expected sign, but their specific weight is much smaller than those obtained in other correlations. This small contribution to ΔCp is consistent with Lemieux's hypothesis of a low degree of hydration of apolar surfaces on carbohydrates.

Keywords: Isothermal titration calorimetry; heat capacity; lectin; surface area models

The existence of multiple points of attachment and branching in monosaccharides, along with their anomerization capacity, implies that a modest number of them can react to produce an astronomical number of different oligosaccha-

ride isomers. This makes carbohydrates the biomolecules with the largest capacity for coding high-density stereochemical information (Laine 1997). Another salient property of carbohydrates is that they form strong interactions with proteins (García-Hernández and Hernández-Arana 1999). In particular, this behavior has been documented for the binding of carbohydrates to lectins, an ubiquitous group of proteins specialized in deciphering the so-called sugar code (Gabiuis 2000). Considering the total change in accessibility of surface areas (ΔA_s) as a measure of the system

Reprint requests to: Enrique García-Hernández, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, México D.F., México 04510; e-mail: egarciah@servidor.unam.mx; fax: +52 55 56 16 22 03.

Article and publication are at <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1110/ps.0222503>.

size, the specific free energy ($\Delta G/\Delta A_i$) of lectin-carbohydrate (L-C) binding was found to be on the average ~ 1.7 times larger than that of protein-protein (P-P) binding, and ~ 10 times larger than that of protein folding (García-Hernández et al. 2000). According to these differences, the equilibrium constant of a hypothetical average L-C complex with 1000 \AA^2 of interfacial area would be $\sim 10^9$, whereas the corresponding values for a 1000 \AA^2 -sized P-P complex or a folded protein would be $\sim 10^5$ or $\sim 10^1$, respectively. As a consequence, stable L-C complexes can be formed with just a few interfacial contacts. This is a property with strong biological implications, inasmuch as it favors the efficient use of the high-density sugar code, with the concomitant benefits for cellular economy and organization. In this sense, it is not surprising that a major role of carbohydrates in biological systems is to serve as mediators in myriads of recognition events, including those evolved for self/nonself cellular discrimination (Vasta et al. 1994).

In the last decade, it has become well-established that protein folding and binding energetics can be expressed as a function of changes in the accessibility of surface areas (ΔA). One of the most successful surface area models developed for protein reactions includes individual expressions for the changes of enthalpy (ΔH), entropy (ΔS), and heat capacity (ΔCp), according to the following simple phenomenological partitions:

$$\Delta H = \Delta H_p + \Delta H_{ap} = \Delta h_p \Delta A_p + \Delta h_{ap} \Delta A_{ap}, \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \Delta S &= \Delta S_p + \Delta S_{ap} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{or-t} \\ &= \Delta s_p \Delta A_p + \Delta s_{ap} \Delta A_{ap} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{or-t}, \end{aligned} \quad (2)$$

$$\Delta Cp = \Delta Cp_p + \Delta Cp_{ap} = \Delta cp_p \Delta A_p + \Delta cp_{ap} \Delta A_{ap}, \quad (3)$$

in which lower-case parameters are the contributions per unit of polar (p) or apolar (ap) area to the thermodynamic function. In Equation 2, $\Delta S_p + \Delta S_{ap}$ represent the hydration entropy, ΔS_{conf} is the conformational entropy, and ΔS_{or-t} arises from changes in the degrees of freedom of overall rotation and translation modes due to molecular binding. Parameters in Equations 1 and 2 have been obtained from protein-folding data (Luque and Freire 1998), whereas four different sets of parameters for Equation 3 have been obtained (Murphy and Freire 1992; Spolar and Record, Jr., 1994; Makhatadze and Privalov 1995; Myers et al. 1995). These correlations have been used to infer the stability constants of individual residues, describing quantitatively a number of properties of protein systems (Hilser and Freire 1996; Pan et al. 2000; Edgcomb and Murphy 2001).

L-C interactions have been analyzed in the framework of surface area models, obtaining parameterizations for ΔH and ΔS (García-Hernández and Hernández-Arana 1999). A relevant conclusion from that work was that protein folding and L-C interactions share some parameters but require ad

hoc values for others, reflecting widely different stereochemical properties between both types of systems. For the case of ΔCp (Equation 3), direct parameterization for L-C complexes has been hampered by the scarcity of data.

In this work, our aim was threefold. The first was to characterize thermodynamically, using high-sensitivity isothermal titration calorimetry (ITC), the binding of hen egg-white lysozyme (HEW) to the dimer (chitobiose) and trimer (chitotriose) of N-acetylglucosamine (GlcNAc), which, along with GlcNAc, are the final degradation products of chitin. The complete binding site of lysozyme can accommodate up to six GlcNAc residues in six subsites denoted as A to F. Because the catalytic residues are located between subsites C and D, only the tetrasaccharide or longer oligosaccharides become enzymatically processed. On the other hand, GlcNAc, chitobiose and chitotriose bind to lysozyme subsites A to C, acting as competitive inhibitors. Due to the marked structural similarities between L-C and lysozyme-inhibitor interactions, our second goal was to explore the possibility of predicting the lysozyme-binding energetics from the previously obtained L-C parameterization. This aspect is relevant, as it is not known whether the pure binding event of a glycohydrolitic enzyme can be adequately described using information derived from carbohydrate-binding proteins with no enzymatic activity. Finally, adding the present experimental results to data in the literature, we gathered a minimum dataset from which, for the first time, a parameterization of ΔCp for protein-carbohydrate (P-C) complexes was obtained.

Results and Discussion

Binding energetics of lysozyme to chitobiose and chitotriose

The binding energetics of hen lysozyme to its inhibitors chitobiose (Ch_2) and chitotriose (Ch_3) were characterized by means of isothermal titration calorimetry, in the temperature range of 15°C – 45°C . Measurements were done at pH 4.7 for the following reasons: First, it belongs to the pH region in which the maximum affinity is observed (Banerjee and Rupley 1973); second, at this pH, the binding reaction is not coupled to any change in the protonation state of the protein (Banerjee et al. 1975), that is, the measured heats correspond directly to the intrinsic binding enthalpies. Furthermore, at higher pH values, lysozyme dimerizes, burying part of the carbohydrate-binding site (Sophianopoulos 1969). In this regard, the aggregation state of lysozyme at pH 4.7 was checked out by dynamic light scattering, finding a monomeric state with monomodal distribution at all concentrations used ($M_{w,app} = 12 \text{ kD}$, $Pd/R_H = 0.10$, $SOS = 0.6$, $baseline = 1.000$; see Material and Methods).

As an example of the experimental results, Figure 1A shows the raw calorimetric isotherm obtained at 25°C from

the progressive titration of lysozyme with chitotriose. The trace of the corresponding blank experiment consisting of the injection of the ligand solution into the buffer is also shown. In all experiments, ligand dilution heats were very small in relation to the binding heats. After blank subtraction, η (the number of binding sites on the protein), ΔH and K_b were obtained from the nonlinear fitting of an identical and independent binding sites model to the normalized titration curve (Fig. 1B). ΔG and ΔS were calculated from these magnitudes by using the basic relationships $\Delta G = -RT \ln K_b$ and $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$.

Calorimetric results obtained at different temperatures for both ligands are presented in Table 1. The η values indicate that the binding stoichiometry is 1:1, in agreement with the crystal structure of the complexes. Using batch calorimetry, Bjurulf and Wadsö (1972) characterized the binding of hen lysozyme to chitobiose and chitotriose at pH 5.0 and 25°C. As seen in Table 1, their measurements are in excellent agreement with the present results. At 25°C, the van't Hoff enthalpies [obtained from the slope $\partial \ln K_b / \partial (1/T)$] for chitobiose and chitotriose are -10.8 ± 0.3 and -12.6 ± 0.7 kcal mole⁻¹, respectively. These values compare favorably with those determined calorimetrically (see Table 1). As shown recently by Horn et al. (2001), the similarity between ΔH_{cal} and ΔH_{vH} can be considered as an internal control of the ITC measurements.

As typically observed in protein-carbohydrate (P-C) interactions, the binding of lysozyme to its saccharide inhibitors is enthalpically driven, and counterbalanced by an unfavorable entropic contribution (Fukada et al. 1983; Berland et al. 1995; Dam and Brewer 2002). Enthalpy-entropy compensations have been observed in a number of systems. In the case of lysozyme, the two complexes studied here fell into the same trend observed for L-C complexes (Figure 2). Although the origin of this phenomenon remains unclear, it is remarkable to observe that not only the compensation occurs within a determined type of system, but that different degrees of compensation are found for different types of

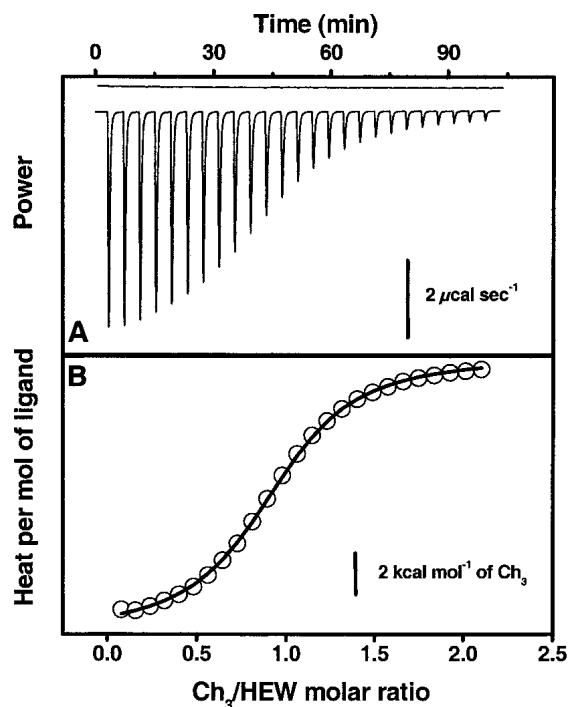


Figure 1. Isothermal microcalorimetric profile of the titration of lysozyme (0.12 mM) with chitotriose (1.96 mM) at 25°C. (A) Raw calorimetric trace; each peak corresponds to the thermal power evolved from a 7- μ L ligand addition to 1.441 mL of protein solution. The trace of ligand injection into buffer alone is also shown. (B) Normalized titration curve. The solid line represents the best-fitting curve obtained from an independent and identical binding sites model.

systems. For instance, the slope of $T\Delta S$ versus ΔH observed for protein folding at 25°C is 0.91 (Liu et al. 2000), whereas the corresponding value for the L-C complexes in Figure 2 is 0.62.

Assuming ΔCp to be temperature independent, linear regression analysis of enthalpy data versus temperature in Table 1 gave ΔCp values of -83 ± 5 and -119 ± 3 cal(mole K)⁻¹ for chitobiose ($r = -0.996$) and chitotriose ($r =$

Table 1. Thermodynamics of lysozyme-inhibitor binding^a

Ligand	Temperature (°C)	ΔG (kcal mole ⁻¹)	ΔH (kcal mole ⁻¹)	$T\Delta S$ (kcal mole ⁻¹)	η
Chitobiose	15	-5.16 ± 0.01	-10.52 ± 0.04	-5.36	0.983 ± 0.003
	25	-4.99 ± 0.00 (-5.04 ± 0.05)	-11.22 ± 0.04 (-10.59 ± 0.36)	-6.23 (-5.55)	0.990 ± 0.005
	35	-4.76 ± 0.02	-12.01 ± 0.14	-7.25	0.971 ± 0.004
	45	-4.53 ± 0.01	-13.02 ± 0.10	-8.49	0.962 ± 0.011
Chitotriose	15	-7.06 ± 0.03	-12.89 ± 0.07	-5.83	0.974 ± 0.004
	25	-7.00 ± 0.01 (-6.87 ± 0.18)	-14.10 ± 0.06 (-13.60 ± 0.24)	-7.10 (-6.73)	0.990 ± 0.003
	35	-6.82 ± 0.01	-15.20 ± 0.10	-8.38	0.970 ± 0.005
	45	-6.57 ± 0.02	-16.51 ± 0.12	-9.94	0.974 ± 0.005

^a Uncertainties represent standard errors from regression analysis. Values in brackets are from Bjurulf and Wadsö (1972).

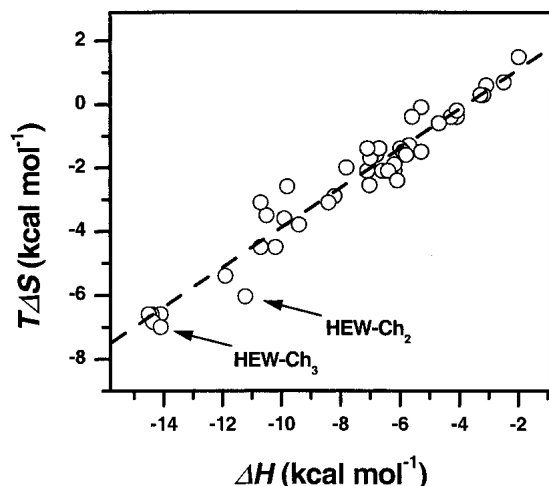


Figure 2. Enthalpy–entropy compensation in protein–carbohydrate binding. Data for 43 L–C complexes at 25°C were collected from literature. The two lysozyme-inhibitor complexes studied in this work (HEW–Ch₂ and HEW–Ch₃) are shown. The broken line comes from a least squares linear fitting to the literature L–C data ($T\Delta S = 0.624\Delta H + 2.36 \text{ kcal mole}^{-1}$, $r = 0.976$).

–0.999) complexes, respectively. The corresponding values obtained fitting the data to the basic relationship $\partial\Delta S/\partial\ln T = \Delta Cp$ are -81 ± 5 ($r = -0.996$) and -112 ± 7 ($r = -0.996$) $\text{cal}(\text{mole K})^{-1}$, in excellent agreement with the values derived from $\Delta Cp = \partial\Delta H/\partial T$.

Structural energetics of P–C complexes

Structural-based calculations of ΔH and ΔS

A great variety of proteins with different folding motifs and biological functions have evolved to recognize carbohydrates, which has resulted in the existence of widely diverse binding-site architectures (Taroni et al. 2000; Dodd and Drickamer 2001). Despite this topological diversity, certain definite trends and common basic patterns of interaction between proteins and carbohydrates have been identified (Quioco 1989; Vyas 1991; Weis and Drickamer 1996; Elgavish and Shaanan 1997). The formation of extensive hydrogen-bonding networks is one of the most essential aspects of P–C interactions, which relies on the full

coordination of many of the interacting polar groups (mainly hydroxyls) of the ligand. Also, the stacking between aromatic amino acids and hydrophobic patches on monosaccharides is a recurrent interaction mode. According to a comparative study of the stereochemical properties of L–C interfaces with other protein environments, the trend to maximize interactions on the basis of highly cooperative hydrogen bonding makes these complexes a structural group clearly distinguishable from other kinds of protein systems (García-Hernández et al. 2000). In the case of L–C complexes, it has been shown that they form not only a distinctive structural group, but a distinctive structural-thermodynamic group.

Table 2 compares the parameters of Equations 1 and 2 obtained independently for protein folding and L–C binding. Protein-folding parameters have been shown to be applicable to protein–protein, antibody–peptide, and protease–nonpeptide inhibitor complexes (Luque and Freire 1998; Edcomb and Murphy 2001), provided the ΔS_{or-t} term in Equation 2 is taken into account. In Table 2, the magnitudes of all parameters are very similar for both types of systems, except Δh_p , which is twice as large. This difference in Δh_p is illustrated by Figure 3, in which the normalized form of Equation 1 is plotted, that is, $\Delta H/\Delta A_{ap} = \Delta h_p \Delta A_p/\Delta A_{ap} + \Delta h_{ap}$; as such, the slope and y-intercept in Figure 3 are equal to Δh_p and Δh_{ap} , respectively. Figure 3 defines a structural-enthalpic surface where, due to the higher Δh_p , L–C complexes clearly segregate from globular proteins and P–P complexes, evidencing dissimilar basis of energetic stabilization (García-Hernández and Hernández-Arana 1999). It is on the basis of this large Δh_p value that the high $\Delta H/\Delta A_t$ ratio characteristic of L–C interactions can be quantitatively accounted for, which, in turn, chiefly determines their high specific-free energy. Molecularly, the large Δh_p value for L–C complexes seems to stem from a better interaction between polar groups, characterized by a larger hydrogen-bonding cooperativity and better stereochemistry (García-Hernández et al. 2000), as compared with the P–P and protein-folding cases. However, differential effects in solvation can not be ruled out (Lemieux 1989).

To assess the structural-thermodynamic behavior of the lysozyme-inhibitor complexes studied here, structural-based calculations were performed as described previously (García-Hernández and Hernández-Arana 1999). The acces-

Table 2. Structural-energetic parameters for lectin-carbohydrate binding and protein folding at 25°C

	Δh_p $\text{cal}(\text{mole } \text{Å}^2)^{-1}$	Δh_{ap} $\text{cal}(\text{mole } \text{Å}^2)^{-1}$	Δs_p $\text{cal}(\text{mole } \text{Å}^2 \text{ K})^{-1}$	Δs_{ap} $\text{cal}(\text{mole } \text{Å}^2 \text{ K})^{-1}$	ΔS_{or-t} $\text{cal}(\text{mole K})^{-1}$
L–C binding	46.1 ^a	–5.8 ^a	0.041 ^a	–0.095 ^a	–9 ^a
Protein folding	19.4 ^a	–7.0 ^a	0.030 ^b	–0.115 ^b	(–10) ^c

^a From García-Hernández and Hernández-Arana (1999).

^b Calculated at 25°C using the correlation given in Luque and Freire (1998).

^c From Amzel (1997), used along with the protein-folding parameters to analyze P–P binding.

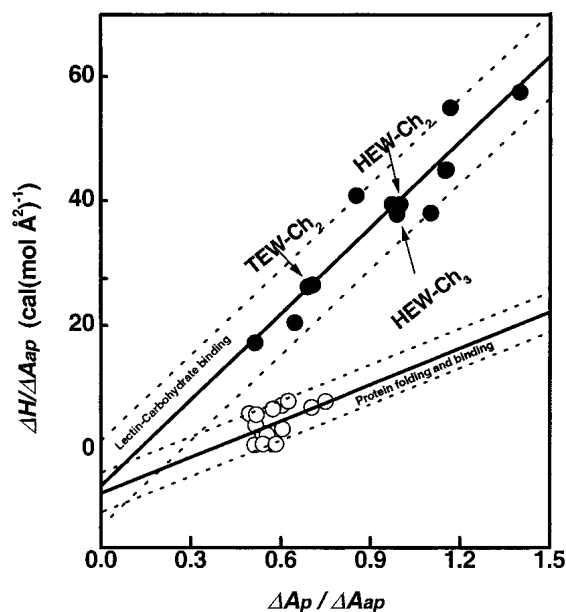


Figure 3. Structural-enthalpic surface defined by the relationship between changes in the enthalpy and in the surface area accessibility, according to the equation $\Delta H/\Delta A_{ap} = \Delta h_p \Delta A_p/\Delta A_{ap} + \Delta h_{ap}$ (see Equation 1). Solid and broken lines represent the best straight line and the observed dispersion, respectively, for the indicated type of system. This plot was built using the data reported by García-Hernández and Hernández-Arana (1999). The two lysozyme-inhibitor complexes studied in this work (HEW-Ch₂ and HEW-Ch₃) and the turkey lysozyme-chitobiose complex (TEW-Ch₂) are shown.

sible surface area changes upon lysozyme-chitotriose binding are given in Table 3. They were estimated from the difference between the areas of the complex (PDB file 1lzb; Maenaka et al. 1995) and the sum of those for the free protein (PDB file 1lza; Maenaka et al. 1995) and the free inhibitor (atomic coordinates taken from 1lzb). The three-dimensional structure of the lysozyme-chitobiose complex was built by removing the monosaccharide occupying the A subsite on lysozyme, that is, the nonreducing terminus. By use of the experimental ΔH values in Table 1, the results for the hen lysozyme complexes are shown in Figure 3. The corresponding point for turkey egg-white lysozyme (TEW)-binding chitobiose (PDB file 1jef; Harata and Muraki 1997) is also shown. Although HEW and TEW are similar, the architectures of their combining sites differ importantly in some aspects, such as polarity (the HEW-inhibitor interface is 20% more polar) and the fact that TEW lacks the subsite corresponding to the A subsite of HEW. It is immediately evident from Figure 3 that lysozyme and L-C complexes behave very similarly.

Table 3 shows the structural-based calculations of the formation energetics for the three lysozyme-inhibitor complexes, using Equations 1 and 2 with the L-C parameterization. The evaluation of ΔS_{conf} was done by use of the methodology described in García-Hernández and Hernández-Arana (1999), and involved the analysis of an ensemble

of 50 high-resolution NMR conformers for HEW reported recently (Schwalbe et al. 2001). The fact that the energetics of lysozyme-inhibitor binding can be accurately predicted using the L-C parameterization suggests that both types of protein systems share the same molecular basis of affinity. This is not surprising, as structural features such as preformed-binding site, hydrogen-bonding cooperativity and density, intermolecular packing, and preferential use of a subset of polar residues are seen in both lysozyme and lectin complexes (García-Hernández et al. 2000). Furthermore, it is significant that lysozyme inhibitors show no conformational distortions. In contrast, the L-C parameterization is expected to fail in predicting the energetics of lysozyme interacting with GlcNAc oligomers longer than chitotriose, due to the energy penalty associated with the distortion of the fourth monosaccharide from the normal chair conformation to the half-chair one (Bjurulf and Wadsö 1972). Table 3 allows an examination of the elemental energies that contribute to lysozyme-inhibitor affinities. According to these data, the favorable enthalpy component is basically determined from the exothermic contribution of polar groups, whereas apolar groups contribute with a rather small endothermic component. On the other hand, it is interesting to note that in the three complexes, a highly favorable hydrophobic contribution occurs, although it is counterbalanced by the ΔS_{conf} , ΔS_p , and ΔS_{or-t} contributions, yielding a net entropy change that opposes to the binding.

Heat capacity changes

Heat capacity changes have been used as a direct sensor of structural rearrangements in biomolecular reactions such

Table 3. Structural energetics of lysozyme-inhibitor binding at 25°C^a

	HEW-Ch ₂	HEW-Ch ₃	TEW-Ch ₂
ΔA_p	-284	-376	-256
ΔA_{ap}	-284	-373	-371
ΔH_p	-13.1	-17.3	-11.8
ΔH_{ap}	+1.6	+2.2	+2.2
ΔH_{calc}	-11.5	-15.1	-9.6
ΔH_{exp}	-11.2	-14.1	-9.8
$T\Delta S_p$	-3.5	-4.6	-3.1
$T\Delta S_{ap}$	+8.0	+10.6	+10.5
$T\Delta S_{conf}$	-7.5	-9.7	-7.5
$T\Delta S_{or-t}$	-2.6	-2.6	-2.6
$T\Delta S_{calc}$	-5.6	-6.3	-2.7
$T\Delta S_{exp}$	-6.1	-7.1	-3.7
ΔG_{calc}	-5.9	-8.8	-6.9
ΔG_{exp}	-5.1	-7.0	-6.1

^a ΔA in Å². All other functions in kcal mole⁻¹. Experimental magnitudes for TEW-Ch₂ at 30°C were taken from Banerjee and Rupley (1975), and extrapolated to 25°C using a ΔC_p value of -85 cal(mole K)⁻¹, which was estimated from surface area changes using the parameterization obtained in the present study for P-C complexes.

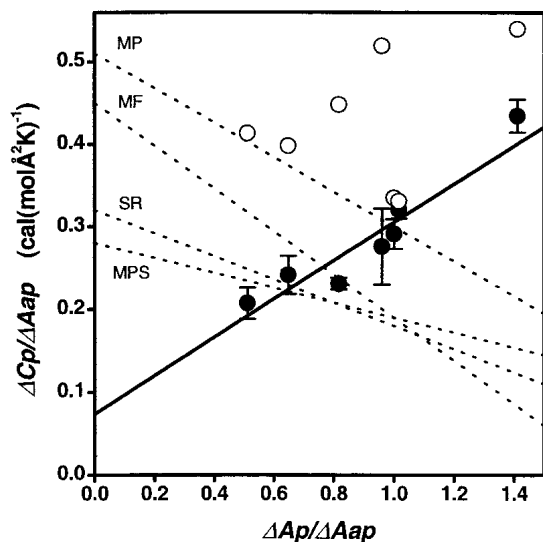


Figure 4. Heat capacity changes for protein–carbohydrate complex formation as function of changes in polar and apolar surface areas (●). The two HEW complexes studied here and five lectin–carbohydrate complexes from the literature are shown. The ΔC_p [cal(mole K) $^{-1}$], ΔA_p (\AA^2) and ΔA_{ap} (\AA^2) for each of these seven complexes are as follows: hevein–chitobiose: $[-64 \pm 6, -158, -309]$ (García-Hernández et al. 1997); hevein–chitotriose: $[-83 \pm 8, -223, -344]$ (García-Hernández et al. 1997); concanavalin A–methyl-mannose $[48 \pm 8, -167, -174]$ (García-Hernández et al. 1997); concanavalin A–tri-mannoside $[-109 \pm 5, -354, -251]$ (García-Hernández et al. 2000; Clarke et al. 2001; carbohydrate-binding module from xylanase 10A–cellobiose $[-67 \pm 2, -237, -290]$ (Boraston et al. 2001; pdb code 1182, Notenboom et al. 2001); lysozyme–chitobiose $[-83 \pm 5, -284, -284]$ (this work), and lysozyme–chitotriose $[-119 \pm 3, -376, -373]$ (this work). The solid line is a least-squares linear fitting ($\chi^2 = 0.0024$) to the data (see Equation 4). Broken lines correspond to the four parameterizations for Equation 3 reported previously and shown in Table 4. (MF) Murphy and Freire (1992); (SR) Spolar and Record, Jr., (1994); (MP) Makhatadze and Privalov (1995); (MPS) Myers et al. (1995). (○) Calculated using the MF parameters and adding a coefficient of 0.17 ± 0.08 cal(mole \AA^2 K) $^{-1}$ for hydroxyl surface areas (Habermann and Murphy 1996).

as protein folding and binding. It is now generally accepted that upon correction for protonation effects, ΔC_p values are mainly due to hydration or dehydration of apolar and polar groups ($\Delta C_{p_{hyd}}$), which, in turn, correlate with changes in the solvent-accessible surface areas (Gómez et al. 1995). Table 4 shows the four parameterizations of Equation 3 that have been reported so far, three of them based on model compounds (Murphy and Freire 1992; Spolar and Record, Jr., 1994; Makhatadze and Privalov 1995) and one on protein-folding data (Myers et al. 1995). In all of these correlations, negative and positive contributions to ΔC_p are found as due to polar and apolar groups, respectively. The two ΔC_p values for lysozyme–carbohydrate complexes reported in this work, together with five literature values for L–C complexes (Fig. 4 caption), allow the test of these correlations with a reasonable number of experimental data. For six of the seven complexes, it has been experimentally proven

that no protonation changes occur during binding, that is, $\Delta C_p = \Delta C_{p_{hyd}}$. This is not the case for the complex of cellobiose with the carbohydrate-binding module. Nevertheless, it seems rather unlikely that significant protonation contributions are involved in the ΔC_p value of this complex, as the experimental measurements were performed at pH 7 (Boraston et al. 2001), and the protein does not have any carbohydrate-binding histidines (Notenboom et al. 2001), the residues with the major probability to change their protonation state at neutral pH.

Figure 4 shows the normalized experimental heat capacity changes ($\Delta C_p/\Delta A_{ap}$ vs. $\Delta A_p/\Delta A_{ap}$) for the seven P–C complexes together with the predictions of the four correlations. Clearly, the P–C data do not sustain the existence of a negative contribution to ΔC_p arising from polar groups for these systems. Rather, it appears that an ad hoc parameterization for lysozyme- and lectin–carbohydrate complexes is required. Using Equation 3, the experimental results in Figure 4 are well represented by

$$\Delta C_p = (0.23 \pm 0.04)\Delta A_p + (0.07 \pm 0.03)\Delta A_{ap}, \quad (4)$$

in which coefficients units are cal(mole \AA^2 K) $^{-1}$. According to Equation 4, the sequestering of carbohydrate and protein polar areas from the solvent is the major cause for the observed decrease in the heat capacity. There are two salient differences between the parameters in Equation 4 and those for the previous correlations (see Table 4), namely, (1) the polar contribution to ΔC_p is positive, whereas in all other cases it is negative, and (2) the apolar contribution is much smaller than those reported previously. According to our results, the overall contribution to ΔC_p due to protein and carbohydrate polar groups (most of them hydroxyl groups) is hydrophobic like. In agreement with this, a positive polar contribution [0.17 ± 0.08 cal(mole \AA^2 K) $^{-1}$] has been found previously for the hydroxyl group by use of cyclic dipeptides containing serine residues (Habermann and Murphy 1996). On the other hand, the small apolar contribution is consistent with Lemieux's hypothesis (Lemieux 1989) that the high density of hydroxyl groups in carbohydrates induces the formation of void spaces over apolar surfaces, preventing full hydration and, hence, reducing their heat capacity contribution.

Table 4. Heat capacity parameterizations based on changes in polar and apolar accessible-surface areas^a

	Δc_{p_p}	$\Delta c_{p_{ap}}$
MF	-0.26 ± 0.03	0.45 ± 0.02
MP	-0.21	0.51
MPS	-0.09 ± 0.30	0.28 ± 0.12
SR	-0.14 ± 0.04	0.32 ± 0.04

^a Δc_{p_i} in cal(mole \AA^2 K) $^{-1}$ (MF) Murphy and Freire (1992); (MP) Makhatadze and Privalov (1995); (MPS) Myers et al., 1995; (SR) Spolar and Record, Jr., (1994).

From the above results and discussion, it is clear that the evaluation of the overall polar and apolar contributions to the thermodynamic functions in biomolecular binding certainly produces insightful information into the phenomenon. The novel ΔC_p parameterization for P-C complexes buttresses the notion that these systems need to be considered separately, as they clearly differ from other protein systems hitherto analyzed. Nevertheless, in this type of analysis, the polar and apolar contributions stemming from the protein and from its ligand cannot be distinguished. In principle, an analysis aimed at separating these four different contributions would allow a deeper understanding of the molecular basis of binding energetics. This analysis will be presented for the case of P-C complexes in a forthcoming communication.

Materials and methods

Materials

All chemicals were from Sigma Chemical Co. The homogeneity of triply crystallized lysozyme was verified with SDS-PAGE. Deionized double-distilled water was used in all experiments.

Isothermal titration calorimetry

ITC measurements were performed using a VP-ITC instrument (MicroCal, Inc.). During experiments, the stirrer-syringe was kept rotating at ~400 rpm. The binding reaction was monitored by recording the heat released upon small additions of saccharide solution to the protein solution. Typically, 25–30 aliquots of titrant were injected. The heat of dilution of the saccharide was obtained by adding ligand to a buffer solution under identical conditions and injection schedule used with the protein sample. The c parameter ($c = K_b \eta M_t$, in which M_t is the total protein concentration) was always greater than eight in the case of chitotriose, and at least one for chitobiose. The recommended window for optimal binding measurements is $1 \leq c \leq 1000$. An identical and independent-binding sites model was fit to the ITC data by means of nonlinear regression analysis using the software ORIGIN supplied with the calorimeter.

All experiments were performed at pH 4.7 in a 0.1 M buffer acetate solution (enthalpy ionization <0.1 kcal/mole). Lysozyme was dissolved into the buffer solution and diafiltered extensively in an Amicon-stirred cell through polyethersulfone ultrafiltration discs (cutoff 10 kD, PM10). The concentration of lysozyme was determined spectrophotometrically ($A_{1\%}^{280nm} = 26.9$) after thorough degassing of the solution by evacuation. Ligand solutions were prepared gravimetrically with previously degassed diafiltration buffer.

Dynamic light scattering

DLS experiments were performed with a DynaPro-801 molecular sizing instrument (Protein Solutions Co.) as described previously (Arreguín-Espinosa et al. 2001). On the basis of an autocorrelation analysis of scattered light intensity data, the following parameters were estimated: the hydrodynamic radius (R_H), the apparent molecular weight ($M_{w,app}$), the polydispersity (Pd), that is, the par-

ticular size standard deviation, and the sum of squares (SOS), that is, the error associated with the autocorrelation function. Following established statistical criteria (Morodian-Oldak et al. 1998), protein solutions can be considered as monodisperse when $Pd/R_H < 0.15$ and $SOS < 5.0$. Values for the baseline parameter in the range 0.997–1.002 indicate monomodal distribution.

Acknowledgments

This work was supported in part by CONACyT (Grants J34303-E, 27986-E and 29124-E) and DGAPA (Grant PAPIIT IN220601)

The publication costs of this article were defrayed in part by payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734 solely to indicate this fact.

References

- Amzel, L.M. 1997. Loss of translational entropy in binding, folding, and catalysis. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **28**: 144–149.
- Arreguín-Espinosa, R., Fenton, B., Vázquez-Contreras, E., Arreguín, B., and García-Hernández, E. 2001. PFA, a novel mollusk agglutinin, is structurally related to the ribosome-inactivating protein superfamily. *Arch. Biochem. Biophys.* **394**: 151–155.
- Banerjee, S.K. and Rupley, J.A. 1973. Temperature and pH dependence of the binding of oligosaccharides to lysozyme. *J. Biol. Chem.* **248**: 2117–2124.
- . 1975. Turkey egg white lysozyme. Free energy, enthalpy, and steady state of reaction with N-Acetylglucosamine oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **250**: 8267–8274.
- Banerjee, S.K., Holler, E., Hess, G.P., and Rupley, J.A. 1975. Reaction of N-Acetylglucosamine oligosaccharides with lysozyme. Temperature, pH, and solvent deuterium effects; equilibrium, steady state and pre-state state measurements. *J. Biol. Chem.* **250**: 4355–4367.
- Berland, C.R., Sigurskjold, B.W., Stoffer, B., Frandsen, T.P., and Svensson, B. 1995. Thermodynamics of inhibitor binding to mutant forms of glucosylase from *Aspergillus niger* determined by isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* **34**: 10153–10161.
- Bjurulf, C. and Wadsö, I. 1972. Thermochemistry of lysozyme-inhibitor binding. *Eur. J. Biochem.* **31**: 95–102.
- Boraston, A.B., Creagh, A.L., Alam, M.M., Kormos, J.M., Tomme, P., Haynes, C.A., Warren, R.A., and Kilburn, D.G. 2001. Binding specificity and thermodynamics of a family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A. *Biochemistry* **40**: 6240–6247.
- Clarke, C., Woods, R.J., Gluska, J., Cooper, A., Nutley, M.A., and Boons, G.-J. 2001. Involvement of water in carbohydrate-protein binding. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 12238–12247.
- Dam, T.K. and Brewer, C.F. 2002. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.* **102**: 387–429.
- Dodd, R.B. and Drickamer, K. 2001. Lectin-like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology* **11**: 71R–79R.
- Edgcomb, S.P. and Murphy, K.P. 2001. Structural energetics of protein folding and binding. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 62–66.
- Elgavish, S. and Shaanan, B. 1997. Lectin-carbohydrate interactions: Different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 462–467.
- Fukada, H., Sturtevant, J.M., and Quioco, F.A. 1983. Thermodynamics of the binding of L-arabinose and of D-galactose to the L-arabinose-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **258**: 13193–13198.
- Gabius, H.J. 2000. Biological information transfer beyond the genetic code: The sugar code. *Naturwissenschaften* **87**: 108–121.
- García-Hernández, E. and Hernández-Arana, A. 1999. Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: Comparison with protein-folding energetics. *Protein Sci.* **8**: 1075–1086.
- García-Hernández, E., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Rodríguez-Romero, A., and Hernández-Arana, A. 1997. New insights into the molecular basis of lectin-carbohydrate interactions: A calorimetric and structural study of the association of hevein to oligomers of N-acetylglucosamine. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **29**: 467–477.
- García-Hernández, E., Zubillaga, R.A., Rodríguez-Romero, A., and Hernández-

- Arana, A. 2000. Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: Comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology* **10**: 993–1000.
- Gómez, J., Hilser, V.J., Xie, D., and Freire, E. 1995. The heat capacity of proteins. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **22**: 404–412.
- Habermann, S.M. and Murphy, K.P. 1996. Energetics of hydrogen bonding in proteins: A model compound study. *Protein Sci.* **5**: 1229–1239.
- Harata, K. and Muraki, M. 1997. X-ray structure of turkey-egg lysozyme complex with tri-N-acetylchitotriose. Lack of binding ability at subsite A. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallography* **53**: 650–657.
- Hilser, V.J. and Freire, E. 1996. Structure based calculation of the equilibrium folding pathway in proteins. Correlation with hydrogen exchange protection factors. *J. Mol. Biol.* **262**: 756–772.
- Horn, J.R., Russell, D., Lewis, E.A., and Murphy, K.P. 2001. van't Hoff and calorimetric enthalpies from isothermal titration calorimetry: Are there significant discrepancies? *Biochemistry* **40**: 1774–1778.
- Laine, R.A. 1997. The information-storing potential of the sugar code. In *Glycosciences: Status and perspectives* (ed. H.-J. Gabius and S. Gabius), pp. 1–14. Chapman & Hall, London, UK.
- Lemieux, R.U. 1989. The origin of the specificity in the recognition of oligosaccharides by proteins. *Chem. Soc. Rev.* **18**: 347–374.
- Liu, L., Yang, C., and Guo, Q.-X. 2000. A study on the enthalpy-entropy compensation in protein unfolding. *Biophys. Chem.* **84**: 239–251.
- Luque, I. and Freire, E. 1998. Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods Enzymol.* **295**: 100–127.
- Maenaka, K., Matsushima, M., Song, H., Sunada, F., Watanabe, K., and Kumagai, I. 1995. Dissection of protein-carbohydrate interactions in mutant hen egg-white lysozyme complexes and their hydrolytic activity. *J. Mol. Biol.* **247**: 281–293.
- Makhatadze, G.I. and Privalov, P.L. 1995. Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.* **47**: 307–425.
- Morodian-Oldak, J., Leung, W., and Fincham, A.G. 1998. Temperature and pH-dependent supramolecular self-assembly of amelogenin molecules: A dynamic light-scattering analysis. *J. Struct. Biol.* **122**: 320–327.
- Murphy, K.P. and Freire, E. 1992. Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Protein Chem.* **43**: 313–361.
- Myers, J.K., Pace, C.N., and Scholtz, J.M. 1995. Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* **4**: 2138–2148.
- Notenboom, V., Boraston, A.B., Kilburn, D.G., and Rose, D.R. 2001. Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A in native and ligand-bound forms. *Biochemistry* **40**: 6248–6256.
- Pan, H., Lee, J.C., and Hilser, V.J. 2000. Binding sites in *Escherichia coli* dihydrofolate reductase communicate by modulating the conformational ensemble. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 12020–12025.
- Quiocho, F.A. 1989. Proteins-carbohydrate interactions: Basic molecular features. *Pure Appl. Chem.* **61**: 1293–1306.
- Schwalbe, H., Grimshaw, S.B., Spencer, A., Buck, M., Boyd, J., Dobson, C.M., Redfield, C., and Smith, L.J. 2001. A refined solution structure of hen lysozyme determined using residual coupling data. *Protein Sci.* **10**: 677–688.
- Sophianopoulos, A.J. 1969. Association sites of lysozyme in solution. I. The active site. *J. Biol. Chem.* **244**: 3188–3193.
- Spolar, R.S. and Record, Jr., M.T. 1994. Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* **263**: 777–784.
- Taroni, C., Jones, S., and Thornton, J.M. 2000. Analysis and prediction of carbohydrate binding sites. *Protein Eng.* **13**: 89–98.
- Vasta, G.R., Ahmed, H., Fink, N.E., Elola, M.T., Marsh, A.G., Snowden, A., and Odom, E.W. 1994. Animal lectins as self/non-self recognition molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **15**: 55–73.
- Vyas, N.K. 1991. Atomic features of protein-carbohydrate interfaces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**: 732–740.
- Weis, W.I. and Drickamer, K. 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 441–473.

Referencias

- Amzel, L.M. (1997). Loss of translational entropy in binding, folding, and catalysis. **Prot. Struct. Funct. Genet.** 28: 144-149.
- Bains G, Lee RT, Lee YC y Freire E. (1992). Microcalorimetric study of wheat germ agglutinin binding to N-acetylglucosamine and its oligomers. **Biochem.** 31: 12624-12628.
- Banipal PK, Banipal TS, Lark BS and Ahluwalia JC. (1997). Partial molar heat capacities and volumes of some mono-, di. and trisaccharides in water at 298.15, 308.15 and 318.15 K. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.** 93(1): 81-87.
- Baker BM y Murphy KP. (1998). Prediction of binding energetics from structure using empirical parameterization. **Meth. Enzymol.** 295: 294-315.
- Bjurulf C y Wadsö I. (1972). Thermochemistry of lysozyme-inhibitor binding. **Eur. J. Biochem.** 31: 95-102.
- Boraston AB, Creagh LA, Alam M, Kormos JM, Tomme P, Haynes CA, Warren RA y Kilburn DG. (2001). Binding specificity and thermodynamics of a family 9 carbohydrate binding module from *Thermotoga maritime* xylanase 10A. **Biochem.** 319: 1143-1156.
- Boraston AB, Nurizzo D, Notenboom V, Ducros V, Rose DR, Kilburn DG y Davies GJ. (2002). Differential oligosaccharide recognition by evolutionary related β -1,4 y β -1,3 glucan binding modules. **J.Mol.Biol.** 319: 1143-1156.
- Briggner LE and Wadsö I. (1990). Heat capacities of maltose, maltotriose, maltotetraose, and α -, β - and γ -cyclodextrin in the solid state and in dilute aqueous solution. **J. Chem. Therm.** 22: 1067-1074
- Briggner LE and Wadsö I. (1991). Test and calibration processes for microcalorimeters, whit special reference to heat conduction instruments used with aqueous systems. **J. Biochem. Biophys. Meth.** 22(2): 101-118.
- Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S y Karplus M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations. **J. Comput. Chem** 4: 187-217.
- Cabani S, Gianni P, Mollica V y Lepori L. (1981). Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous solution. **J. Sol. Chem.** 10: 563-595.
- Chavelas EA. (2002). Estabilidad estructural de complejos de lisozima con inhibidores sacarídicos naturales. **Tesis licenciatura.** Universidad Autónoma de Guerrero.
- Chavelas EA, Pulido NO, Bello M, Rojo-Domínguez A y García-Hernández E. (2006). Bases moleculares del reconocimiento proteína-carbohidrato. La física biológica en México. **Ediciones del Colegio Nacional** 2006: 255-278
- Chavelas EA, Zubillaga RA, Pulido NO and García-Hernández E. (2006). Multithermal titration calorimetry: A rapid method to determine binding heat capacities. **Biophys. Chem.** 120:10-14.
- Chervenak, MC and Toone EJ. (1994). A direct measure of the contribution of solvent reorganization to the enthalpy of ligand binding. **J. Am. Chem. Soc.** 116: 10533-10539.
- Cheetham JC, Artymiuck PJ and Phillips DC. (1992). Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy. Hen egg-white lysosyme and tri-N-acetylchitotriose at 1.75 Å resolution. **J. Mol. Biol.** 224(3): 613-628.
- Chothia, C. (1976). The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. **J. Mol. Biol.** 105: 1-14.

- Cooper A. (2005). Heat capacity effects in protein folding and ligand binding: a re-evaluation of the role of water in biomolecular thermodynamics. **Biophys. Chem.** 115(2-3): 89-97.
- Clarke, C., Woods, R.J., Gluska, J., Cooper, A., Nutley, M.A., and Boons, G.-J. 2001. Involvement of water in carbohydrate-protein binding. **J. Am. Chem. Soc.** 123: 12238–12247.
- D´Aquino JA, Gómez J, Hilser VJ, Lee KH, Amzel LM and Freire E. (1996). The magnitude of the backbone conformational entropy change in protein folding. **Prot. Struct. Funct. Genet.** 25: 143-156.
- Dam TK and Brewer CF. (2002). Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. **Chem. Rev.** 102:387-429.
- Dashnau JL, Sharp KA y Vanderkooi JM. (2005). Carbohydrate intramolecular hydrogen bonding cooperativity and its effects on water structure. **J. Phys. Chem. B** 109: 24152-24159.
- Doig AJ y Sternberg MJE. (1995). Side-chain conformational entropy in protein folding. **Prot. Sci** 4: 2247-2251.
- Edgcomb SP and Murphy KP. (2001). Structural energetics of protein folding and binding. **Curr. Opin. Biotechnol.** 11(1): 62-66.
- Freire E. (1993). Perspectivas in Biochemistry and Biophysics. Structural thermodynamics: prediction of protein stability and protein binding affinities. **Arch. Biochem. Biophys.** 303(2): 181-184.
- Gabius, H.J. (2000). Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. **Naturwissenschaften** 87(3): 108-121.
- Gabius HJ. (2002). The sugar code: functional lectinomics. **Biochem. Biophys. Acta** 1572: 165-177.
- Gallagher KR y Sharp KA (2002). A new angle on heat capacity changes in hydrophobic solvation. **J. Am. Chem. Soc.** 125: 9853-9860.
- García-Hernández E y Chavelas-Adame EA. (2001). Protein complexes differing from each other in their molecular bases of selectivity also rely on different energetics bases. **Prot. Sci.** 10: Suppl 1 pag 63.
- Garcia-Hernandez E, Zubillaga RA, Chavelas-Adame EA, Vazquez-Contreras E, Rojo-Dominguez A y Costas M. (2003). Structural energetics of protein-carbohydrate interactions. Insights derived from the study of lysozyme binding to its natural saccharide inhibitors. **Prot. Sci.** 12: 135-142.
- García-Hernández E, Zubillaga RA, Rojo-Domínguez A, Rodríguez-Romero A y Hernández-Arana A. (1997). New Insights Into the Molecular Basis of Lectin-Carbohydrate Interactions: A Calorimetric and Structural Study of the Association of Hevein to Oligomers of N-Acetylglucosamine. **Prot. Struct. Funct. Genet.** 29:467-477.
- García-Hernández E. y Hernandez-Arana A. (1999) Structural Bases of Lectin-Carbohydrate Affinities: Comparation with Protein-Folding Energetics. **Prot. Sci.** 8:1075-1086.
- García-Hernández, E., Zubillaga, R.A., Rodríguez-Romero, A. y Hernández-Arana, A. (2000). Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: Comparison with protein-protein interfaces. **Glycobiology.** 10: 993-1000.
- Goldstein IJ and Poretz FD. (1986). The lectins. (Liener IE, Sharon N and Goldstein IJ eds). p 35, Academic Press, Nueva York, USA.
- Gómez J, Hilser VJ, Xie D and Freire E. (1995). The heat capacity of proteins. **Prot. Struct. Funct. Genet.** 22: 404–412.
- Graziano G and Barone G. (1996). Group additivity analysis of the heat capacity changes associated with the dissolution into water of different organic compounds. **J. Am. Chem. Soc.** 118:1831-1835

- Gupta G and Surolia A. (2007). Collectins: Sentinels of innate immunity. **BioEssays**. 29:452-64.
- Harding SE and Chowdhry BZ. (2001). Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry. **Oxford University Press**. First edition.
- Hedwig GR and Hinz HJ. (2003). Group additivity schemes for the calculation of the partial molar heat capacities and volumes of unfolded proteins in aqueous solution. **Biophys. Chem.** 100: 239-260.
- Harrop SJ, Helliwell JR, Wan TCM, Kalb AJ, Tong L and Yariv J. (1996). Structure solution of a cubic crystal of concanavalin A complexed with Methyl α -D-glucopyranoside. **Acta Cryst. D52**: 143-155
- Hilser VJ, Gomez J and Freire E. (1996) The enthalpy change in protein folding and binding: refinement of parameters for structure-based calculations. **Prot.** 26(2):123-33.
- Homans SW and Rutherford T. (1993). Oligosaccharides and recognition: A shape problem probed by n.m.r. and molecular modeling. **Biochem. Soc. Trans.** 21: 449-452.
- Hubbard, S.J. y Thornton, J.M. 1993. NACCESS Computer Program. London UK: Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College.
- Jain D, Kaur K and Salunke DM. (2001). Enhanced binding of rationally designed peptide ligand of concanavalin A arises from improved geometrical complementarity. **Biochem.** 40: 12059-12066
- Jelesarov I and Bosshard R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetic of biomolecular recognition. **J. Mol. Recog.** 12:336-348
- Kuttel, M., Brady, J.W. y Naidoo, K.J. 2002. Carbohydrate solution simulations: Producing a force field with experimentally consistent primary alcohol rotational frequencies and populations. **J. Comput. Chem.** 23: 1236-1243.
- Lafont, V., Armstrong, A.A., Ohtaka, H., Kiso, Y., Amzel, L.M. y Freire E. 2007. Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization. **Chem. Biol. Drug. Des.** 69:413-422.
- Laine, R.A. 1997. The information-storing potential of the sugar code. In Glycosciences: status and perspectives (eds. H.-J. Gabius, and S. Gabius) pp. 1-14. **Chapman & Hall, London**.
- Lazaridis, T. y Karplus, M. (1999). Effective energy functions for proteins in solution. **Prot.** 35: 133-152.
- Lee, B. y Richards, F.M. 1971. The interpretation of protein structures: Estimation of static stability. **J. Mol. Biol.** 55: 379-400.
- Lemieux, R.U. 1989. The origin of the specificity in the recognition of oligosaccharides by proteins. **Chem. Soc. Rev.** 18:347-374.
- Lemieux, R.U. 1996. How water provides the impetus for molecular recognition in aqueous solution. **Acc. Chem. Res.** 29:373-380.
- Lin JC and Liu HL. (2006). Protein conformational diseases: From mechanisms to drug designs. **Curr. Drug. Discov. Technol.** 3: 145-53
- Luque, I y Freire, E. (1998) Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. **Meth. Enzymol.** 295: 100-127.
- Maenaka, K; Matsushima, M; Song, H.; Sunada, F.; Watanabe, K; y Kumagai, I. (1995). Dissection of protein-carbohydrate interactions in mutant hen egg-white lysozyme complexes and their hydrolytic activity. **J. Mol. Biol.** 247: 281-293
- Makhatadze GI and Privalov PL. (1995). Energetics of protein structure. **Adv. Prot. Chem.** 47:307-425
- Makhatadze GI, López MM y Privalov PL. (1997). Heat capacities of protein functional groups. **Biophys. Chem.** 64: 93-101

- Mandal DK, Kishore N and Brewer F. (1994). Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions. Titration microcalorimetry measurements of the binding of N-linked carbohydrates and ovalbumin to Concanavalin A. **Biochem.** 33: 1149-1156.
- Moothoo DN, Canan B, Field RA and Naismith JH. (1999). Man α 1-2Man α -OMe-concanavalin: A complex reveals a balance of forces involved in carbohydrate recognition. **Glycobiology** 9(6): 539-545
- Muraki M, Ishimura M y Harata K. (2002). Interactions of wheat germ agglutinin with GlcNAcb1,6Gal sequence. **Biochem. Biophys. Acta.** 1569:10-20.
- Murphy KP and Freire E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. **Adv. Prot. Chem.** 43:313-361
- Murphy, K.P. y Gill, S.J. 1990. Group additivity thermodynamics for dissolution of solid cyclic dipeptides into water. **Thermochimica Acta** 172: 11-20.
- Myers JK, Pace CN and Scholtz JM. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. **Prot. Sci.** 4:2138-214.
- Naismith JH and Field RA. (1996). Structural basis of trimannoside recognition by Concanavalin A. **J. Biol. Chem.** 271(2): 972-976
- Nilsson CL. (2003). Lectins: Protens that interpret the sugar code. **Anal. Chem.** 75(15): 348A-353A.
- Pace CN and Laurents DV. (1989). A new method for determining the heat capacity change for protein folding. **Biochem.** 28(6): 2520-2525.
- Pérez S, Imberty A and Carver JP. (1994). Molecular modeling: an essential component in the structure determination of oligosaccharides and polysaccharides. **Adv. Comp. Biol.** 1:147-202.
- Pfeil W and Privalov PL. (1976). Thermodynamic investigations of proteins. **Biophys. Chem.** 4:23-32
- Pokorná M, Cioci G, Perret S, Rebuffet E, Kostlánová N, Adam J, Gilboa-Garber N, MCTihell EP, Imberty A y Wimmerová M. (2006). Unusual entropy-driven affinity of *Chromobacterium violaceum* lectin CV-III toward fucose and mannose. **Biochem.** 45: 7501-7510.
- Prabhu NV and Sharp KA. (2005). Heat capacity in proteins. **Annu. Rev. Phys. Chem.** 56: 521-548.
- Privalov PL. (1982). Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. **Adv. Prot. Chem.** 35: 1-104
- Pulido NO, Chavelas EA, Torner FJ and García-Hernández E. (2008). Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes. **Adv. Prot. Phys. Chem.** Research Singpost India. 2008:115-138 *En prensa*
- Quioco FA. (1986). Carbohydrate-Binding Proteins: Tertiary Structures and Protein-Sugar Interactions. **Ann. Rev. Biochem.** 55:287-315.
- Ramakrishnan C and Ramachandran GN. (1965). Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. **Biophys. J.** 5: 909-933.
- Reeke Jr GN, Becker JW and Edelman GM. (1975). The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **J. Biol. Chem.** 250(4): 1525-1547
- Rini JM. (1995) Lectin Structure. **Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 24: 551-577.
- Rozwarzki DA, Swami BM, Brewer F and Sacchettini JC. (1998). Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with the core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates. **J. Biol. Chem.** 273(49):32818-32825.
- Harrop SJ and cols. (1996). Structure solution of a cubic crystal of concanavalin A complexed with Methyl α -D-glucopyranoside. **Acta Cryst.** D52: 143-155.

- Saucedo Peña J. (2004). Estudio calorimétrico de la interacción de la concanavalina A con dos monosacáridos. **Tesis de Maestría**, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM
- Spolar RS, Livingstone JR and Record Jr. MT. (1992). Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surface from water. **Biochem.** 31:3947-3955.
- Spolar RS and Record Jr. MT. (1994). Coupling of local folding to site specific binding of proteins to DNA. **Science.** 263:777-784
- Strurtevant JM. (1977). Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 74 (6): 2236-2240
- Susset JG, Picker P, Kretz M y Jorest R (1973). Critical evaluation of uroflowmeters and analysis of normal curves. **J. Urol.** 109(5):874-8.
- Taylor ME and Drickamer K. (2006). Introduction to Glycobiology. **Oxford University Press**, Second edition
- Turnbull WB and Daranas AH. (2003). On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?. **J. Am. Chem. Soc.** 125: 14859-14866
- Wiseman T; Williston S; Brandts JF y Lin LN. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Anal. Biochem.** 179:131-37.