



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

CINETICA ENZIMÁTICA DE LA TRIPSINA DE *Bos taurus*
UTILIZANDO CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. CÉSAR AGUIRRE MARTÍNEZ



TUTOR: DR. MIGUEL ANTONIO COSTAS BASÍN

AÑO: 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Al Dr. Miguel Costas por su asesoría, comentarios y consejos durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Luis Fernando Olguín por sus aportaciones y sugerencias.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios.

A mi familia y amigos.

Al CONACyT por la beca otorgada para mis estudios de maestría (No. de becario 235245) y a los proyectos PAPIIT IN104210-3 y CONACyT 99844.

Al Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM.

A la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi familia y amigos

Jurado asignado

Presidente:	Dra. Rosario Muñoz Clares.	Facultad de Química, UNAM
1^{er} Vocal:	Dra. Silvia Elena Castillo Blum.	Facultad de Química, UNAM
2^o Vocal:	Dra. Adela Rodríguez Romero.	Instituto de Química, UNAM
3^{er} Vocal:	Dr. Edgar Vázquez Contreras.	UAM-Cuajimalpa
Secretario:	Dr. Enrique García Hernández.	Instituto de Química, UNAM

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Biofisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Q. César Aguirre Martínez

Sustentante

Dr. Miguel Antonio Costas Basín

Asesor

Los resultados de este trabajo se presentaron en:

2nd Self-Assembly in Biology and Material Science Workshop, Bahías de Huatualco, Oaxaca, 2010.

XXVIII Congreso Nacional de Bioquímica, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 2010.

2nd USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Misfolding and Design, Torre de Ingeniería, Ciudad Universitaria, México, D.F., 2011.

III Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Torre de Ingeniería, Ciudad Universitaria, México, D.F., 2011.

Índice general

1. Antecedentes	8
1.1. Cinética Enzimática	8
1.1.1. Métodos tradicionales	12
1.1.2. Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)	15
1.1.2.1. Caracterización termodinámica de interacciones	15
1.1.2.2. Caracterización de la cinética de reacción	17
1.2. Mecanismo de la hidrólisis de sustratos catalizada por serina-proteasas	21
2. Hipótesis y Objetivos	29
3. Materiales y Métodos	31
3.1. Materiales	31
3.2. Empleo de ITC como técnica de estudio de la cinética enzimática de la tripsina de <i>Bos taurus</i>	33
3.2.1. Comparación entre ITC y Espectroscopía UV-Visible. BAEE	33
3.2.2. Comparación entre ITC y Stopped-Flow/UV-Visible. ZLysONp	35
3.3. Caracterización cinética de sustratos ciegos	36
3.4. Calorimetría de Barrido Diferencial	37
4. Tratamiento de datos	38

4.1. Método de Di Cera. Obtención de energías de activación y constantes de velocidad	38
4.2. Ajuste global simultáneo	44
4.3. Ajuste global de 6 parámetros	47
5. Resultados y Discusión	51
5.1. Contribuciones a la traza calorimétrica	51
5.2. Calidad de la tripsina	53
5.3. Ausencia de inhibición por producto	56
5.4. Empleo de ITC como técnica para estudiar cinética enzimática	58
5.5. Sustratos promiscuos	61
5.5.1. Resultados con el método de Di Cera	61
5.5.2. Resultados con el ajuste propuesto en este trabajo	65
5.5.2.1. Disociación del complejo Enzima-Sustrato	65
5.5.2.2. Acilación y desacilación	69
5.6. Otros sustratos promiscuos	72
6. Conclusiones	75
7. Perspectivas	77
8. Apéndice	78
Bibliografía	91

1

Antecedentes

1.1. Cinética Enzimática

La Cinética Química es un área de la ciencia encargada del estudio de la velocidad con la que ocurren las reacciones químicas. Una de las aplicaciones principales de la Cinética Química es el planteamiento, estudio y descripción de los mecanismos de reacción. Un mecanismo de reacción es la descripción de todas las etapas que contribuyen en la transformación química de reactivos a productos. La cinética hace uso de las matemáticas para expresar relaciones que describan la velocidad de las reacciones químicas [Logan, 2000]. Por ejemplo, para una reacción unidireccional que pueda ser descrita a través de un mecanismo de reacción de un paso elemental,



la ley de la velocidad está dada por la siguiente ecuación:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [B] \quad (1.1)$$

que nos indica que la velocidad de la reacción está definida por la velocidad con la que los reactivos desaparecen, o por la velocidad con la que el producto C es formado. La constante

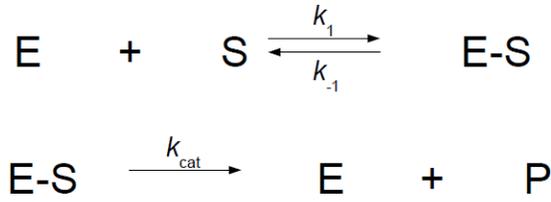
de proporcionalidad, k , es conocida como la constante de velocidad de la reacción, cuyas unidades dependen del orden de la reacción, como se muestra en la Tabla 1.1. El orden de la reacción se obtiene sumando los exponentes que acompañan a las concentraciones A y B, y sus valores pueden adoptar números enteros o fraccionarios.

Orden de reacción	Ley de velocidad	Unidades de k
0	$v = k \cdot [A]^0 = k$	$M \cdot s^{-1}$
1	$v = k \cdot [A]$	s^{-1}
2	$v = k \cdot [A]^2$	$M^{-1} \cdot s^{-1}$

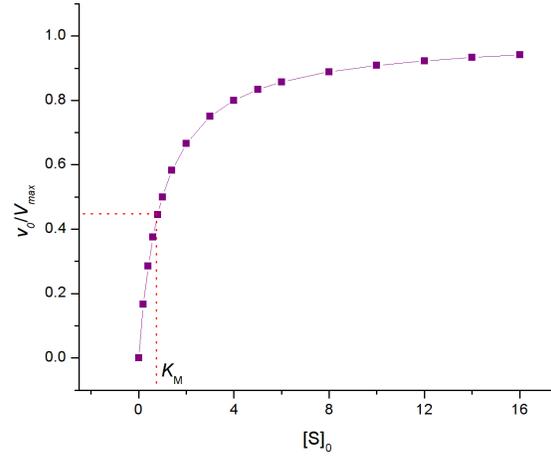
Tabla 1.1: Relaciones entre expresiones de velocidad, orden y unidades de la constante de velocidad k para una reacción $A \rightarrow B$.

La Cinética Enzimática es un área de la ciencia que se encarga del estudio de la rapidez de las reacciones catalizadas por enzimas y la dilucidación de mecanismos de reacción de las mismas, haciendo uso de los principios y tratamientos utilizados por la Cinética Química. Comúnmente, para estudiar este tipo de reacciones, se emplean técnicas espectroscópicas como UV-Visible y Fluorescencia.

El mecanismo cinético de reacción más importante en la cinética enzimática es el propuesto por Michaelis-Menten (Figura 1.1a) en 1913 [Nelson & Cox, 2006]. Este mecanismo consta de dos pasos. En el primero de ellos se forma, reversiblemente, el complejo E-S (complejo enzima-sustrato) y en el segundo se lleva a cabo la acción catalítica de la enzima (hidrólisis, condensación, reacciones de óxido-reducción, etc) irreversiblemente, y caracterizado por la *constante catalítica* (k_{cat}). A continuación se describe brevemente el tratamiento matemático del mismo. Las ecuaciones de velocidad para las especies E (enzima libre), S (sustrato), P (producto) y E-S son:



(a) El modelo de Michaelis-Menten consta de dos pasos: 1) la formación del complejo enzima-sustrato (E-S) y 2) la transformación catalítica.



(b) Comportamiento típico de una enzima michaeliana. La curva generada es una hipérbola rectangular.

Figura 1.1: Mecanismo de Michaelis-Menten.

$$\frac{d[\text{E}]}{dt} = -k_1[\text{E}][\text{S}] + k_{-1}[\text{E-S}] + k_{\text{cat}}[\text{E-S}] \quad (1.2)$$

$$\frac{d[\text{S}]}{dt} = -k_1[\text{E}][\text{S}] + k_{-1}[\text{E-S}] \quad (1.3)$$

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = k_{\text{cat}}[\text{E-S}] \quad (1.4)$$

$$\frac{d[\text{E-S}]}{dt} = k_1[\text{E}][\text{S}] - k_{-1}[\text{E-S}] - k_{\text{cat}}[\text{E-S}] \quad (1.5)$$

La velocidad de la reacción es $v = -\frac{d[\text{E}]}{dt} = -\frac{d[\text{S}]}{dt} = \frac{d[\text{P}]}{dt}$. Para estos tratamientos, tomaremos a $v = \frac{d[\text{P}]}{dt}$. Si aplicamos la aproximación del estado estacionario (ee) sobre la especie E-S, tenemos que

$$0 = k_1[\text{E}][\text{S}] - k_{-1}[\text{E-S}]_{\text{ee}} - k_{\text{cat}}[\text{E-S}]_{\text{ee}} \quad (1.6)$$

despejando a E-S

$$[E - S]_{ee} = \frac{k_1 \cdot [E][S]}{k_{-1} + k_{cat}} \quad (1.7)$$

un balance de materia nos muestra que $[E]_{total} = [E] + [E - S]$, sustituyendo esta expresión en (1.7) y reorganizando términos

$$[E - S]_{ee} = \frac{[E][S]}{K_M + [S]} \quad (1.8)$$

en donde $K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$. Sustituyendo (1.8) en (1.4), y denotando la concentración inicial de sustrato por $[S]_0$, obtenemos la expresión general de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{k_{cat} \cdot [E][S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (1.9)$$

en donde v_0 es la velocidad inicial de la reacción, k_{cat} es la *constante catalítica*, que es una constante de velocidad de primer orden, conocida también como tasa de recambio, y K_M , la *constante de Michaelis*, que tiene unidades de concentración y es numéricamente igual a la concentración inicial de sustrato en la que la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la velocidad máxima de la reacción ($V_{max} = k_{cat} \cdot [E]$), [Nelson & Cox, 2006], como se muestra en la Figura 1.1b.

Este mecanismo, que ha definido el área conocida como *Cinética del Estado Estacionario* [Bisswanger, 2008], ha resultado muy útil en el estudio de sistemas enzimáticos. Sin embargo, no describe de forma completa lo que ocurre en el proceso catalítico [Ascenzi et al., 1981]. En primer lugar, la descripción del equilibrio en el que se forma el complejo E-S queda incompleta ante la imposibilidad de determinar el valor de K_d (constante de disociación $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$). La única forma de poder estimar las características del primer paso de catálisis es a través del valor de K_M , siempre y cuando la k_{cat} sea de magnitud mucho menor que k_{-1} , lo cual, *a priori*, no puede afirmarse que se cumple para todos los sistemas enzimáticos. Por otro

lado, los múltiples eventos que ocurren en la enzima a través de los cuales la transformación química es llevada a cabo queda resumida en una única constante de velocidad aparente: la k_{cat} . Esto tiene la gran desventaja de dejar de lado las contribuciones secuenciales de los residuos de la enzima en el sitio catalítico. Algunos autores han demostrado que el valor de la k_{cat} corresponde al paso limitante de la reacción [Zerner & Bender, 1964], sin embargo, esto es válido sólo si las magnitudes de las demás constantes de velocidad del proceso de catálisis son muy diferentes a la del paso limitante. No obstante, la caracterización de los parámetros de Michaelis-Menten de sistemas enzimáticos es una herramienta útil en la explicación de diversos y, a veces, muy complicados fenómenos que ocurren en el interior de la célula [Bar-Even et al., 2011, Carrillo et al., 2010, Atkins & Nimmo, 1980].

Existen algunas enzimas que, habiendo evolucionado para realizar cierta transformación química, pueden también catalizar reacciones alternativas. Estas reacciones alternativas pueden ser de dos tipos: *i*) la enzima transforma sustratos alternativos que son estructuralmente muy similares a los sustratos nativos de esa enzima y *ii*) enzimas con la capacidad de realizar múltiples transformaciones químicas, es decir, son capaces de catalizar la ruptura de diferentes tipos de enlaces químicos. Este fenómeno, en cualquiera de sus dos vertientes, es conocido como *promiscuidad catalítica*. Descubrir y entender las actividades promiscuas potenciales de las enzimas podría proporcionar información acerca del pasado y el presente evolutivo así como ser de utilidad en el campo de la ingeniería de proteínas en la búsqueda de enzimas con nuevas actividades catalíticas [O'Brien & Herschlag, 1999].

1.1.1. Métodos tradicionales

Para poder determinar la actividad catalítica de una enzima es necesario identificar los cambios químicos involucrados en la conversión de un sustrato a producto. Para lograr esto, los ensayos enzimáticos son diseñados para distinguir las propiedades fisicoquímicas de un sustrato dado de las del producto de la reacción en una manera cuantificable

[Harris & Keshwani, 2009]. Existen diversas técnicas utilizadas en el campo de la cinética enzimática para estudiar la velocidad de las reacciones, que pueden ser métodos continuos o discontinuos.

Los métodos continuos incluyen a las espectroscopías de UV/Visible y de fluorescencia. Estos métodos se caracterizan por la capacidad que tienen de monitorear continuamente la desaparición o aparición de un sustrato o producto, respectivamente. En el caso de la espectroscopía UV/Visible, la concentración de algún compuesto (cromóforo) es determinada por la expresión de Lambert-Beer, $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, en donde A es la absorbancia, que es directamente proporcional a ϵ , que es el coeficiente de extinción molar y puede consultarse en la literatura, c es la concentración del sustrato o producto que absorbe en el espectro UV/Visible y l es la longitud de paso óptico de la celda que se utiliza, preferentemente de cuarzo. De esta forma, determinando la pendiente de la señal espectroscópica en función del tiempo a una longitud de onda, definida por las características de la especie química que se sigue, se puede obtener la velocidad de la reacción: $v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{\epsilon \cdot l} \cdot \frac{dA}{dt}$, [Segel, 1976].

En la espectroscopía de fluorescencia, un fluoróforo (generalmente grupos aromáticos) es excitado a una longitud de onda determinada y se mide la intensidad de la emisión de fluorescencia. En esta técnica, si bien no es posible calcular la concentración del fluoróforo mediante una constante de fluorescencia equivalente a ϵ , pueden observarse los cambios relativos de emisión de fluorescencia con el tiempo y así obtener la velocidad de la reacción [Lakowicz, 2004].

Las otras técnicas, denominadas *métodos discontinuos*, no son capaces de seguir los cambios en la concentración de alguna especie química de manera continua. En este tipo de métodos, la reacción se detiene, química o mecánicamente, después de cierto intervalo de tiempo y se determina la concentración de algún sustrato o producto. Ejemplos de estas téc-

nicas son HPLC (por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*), que se utiliza para mezclas de reacción que contienen moléculas o macromoléculas que pueden ser resueltas con base en una retención diferencial al hacerlas pasar por una columna (intercambio iónico, exclusión molecular, fase reversa, etc), espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (NMR), o bien midiendo el índice de refracción. En HPLC es necesario que los componentes de la mezcla puedan ser detectados por alguna técnica espectroscópica [Harris & Keshwani, 2009]. Estas técnicas son menos utilizadas que los métodos continuos.

Sin embargo, para que las técnicas continuas y discontinuas sean efectivas, es necesario que el sustrato contenga algún grupo químico detectable por UV o fluorescencia que nos permita detectar cambios significativos en el transcurso de la reacción. En su defecto, puede modificarse químicamente el sustrato para que contenga este grupo seguible espectroscópicamente [Kaufman et al., 1948], pero estas alteraciones químicas podrían interferir en el comportamiento de la reacción enzimática, modificando la afinidad de la enzima por el sustrato de interés por posibles cambios en la forma de interacción entre el sustrato modificado y el sitio catalítico. Otra posibilidad es emplear una reacción acoplada. Este conjunto de problemas limita nuestro alcance en el estudio de reacciones enzimáticas de interés a unos cuantos sustratos, de los cuales tan sólo un porcentaje muy bajo no está modificado químicamente.

Recientemente, la Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR, por sus siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance*) se ha utilizado como técnica para seguir reacciones enzimáticas, en la cual una macromolécula es unida covalentemente a una lámina de oro y, en tanto la reacción enzimática procede, a partir de la señal obtenida (el ángulo de resonancia de plasmón), es posible conocer la velocidad de la reacción. En esta técnica no es necesario contar con cromóforos, sin embargo se encuentra limitada por los altos costos del equipo, la poca especificidad en la unión de la macromolécula a la lámina de oro y al hecho de que, hasta hace algunos años, sólo era posible seguir reacciones cuyos sustratos sean de elevados

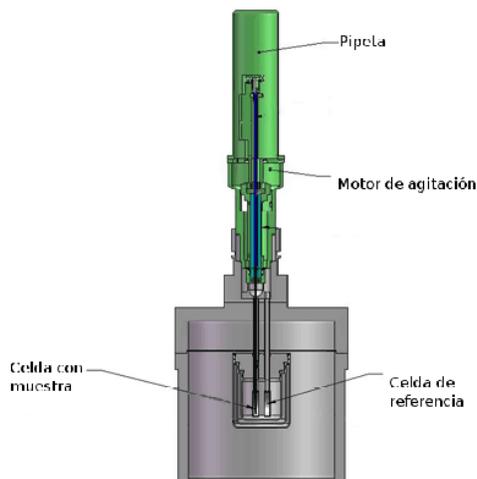


Figura 1.2: Esquema general de un Calorímetro de Titulación Isotérmica

pesos moleculares, esto es, superiores a 1 kDa [Pitarke et al., 2007].

1.1.2. Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

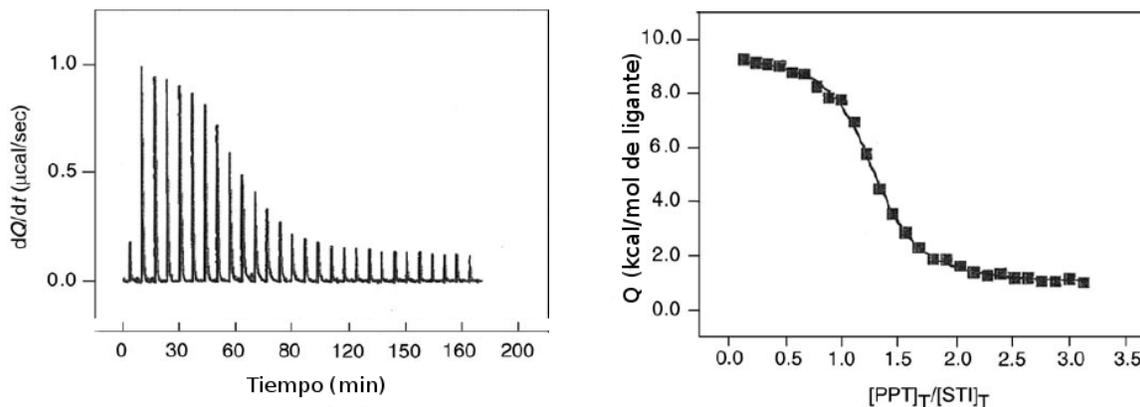
1.1.2.1. Caracterización termodinámica de interacciones

La Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés *Isothermal Titration Calorimetry*) es una técnica que es comúnmente utilizada para caracterizar termodinámicamente la interacción entre macromoléculas (proteína-proteína, DNA-DNA, etc.) y, con mucha frecuencia, entre macromoléculas y sustancias de bajo peso molecular (proteína-ligante). Esta técnica permite obtener, de forma precisa, la constante de afinidad K_a (o bien la constante de disociación, $K_d = \frac{1}{K_a}$), los cambios en la energía libre de Gibbs ΔG , en la entropía ΔS , en la entalpía ΔH y en la capacidad calorífica ΔC_p asociados con la interacción de macromoléculas [Velázquez-Campoy et al., 2004], [Velázquez-Campoy & Freire, 2005].

Un calorímetro de titulación isotérmica (ver Figura 1.2) es un instrumento que opera de acuerdo al principio de compensación dinámica de potencia, esto es, determina y suministra

la cantidad de potencia ($\frac{dQ}{dt}$, unidades: $\mu\text{cal/s}$) requerida para mantener una diferencia de temperatura muy cercana a cero entre la celda de muestra, donde el proceso a estudiar se desarrolla, y la celda de referencia. Ambas celdas se encuentran dentro de un contenedor adiabático. Inicialmente, el sistema de retroalimentación continuamente aplica una pequeña cantidad de potencia a la celda de muestra, la cual determina la línea base. En la celda de muestra se coloca la disolución de la macromolécula y en la jeringa la disolución del ligante. La jeringa es utilizada para agregar cierto volumen de la disolución de ligante, en cierta cantidad de tiempo, y, a la vez, agitar la mezcla de reacción en la celda de muestra. Con cada inyección del ligante de la jeringa, y dependiendo de la afinidad entre la macromolécula [M] y ligante [L] y la concentración de los mismos, una cierta cantidad del complejo [ML] se forma. La formación de este complejo se acompaña de la liberación o absorción de calor (proceso exotérmico o endotérmico, respectivamente) lo cual produce una pequeña diferencia de temperatura entre las dos celdas. El sistema de retroalimentación disminuye o incrementa la potencia suministrada para compensar el desbalance de temperatura. Es así como el sistema alcanza el equilibrio y el balance de temperatura se reestablece. La potencia suministrada se registra cada cierto intervalo de tiempo y la señal obtenida muestra un patrón como el ilustrado en la Figura 1.3. Integrando el área bajo cada pico, se obtiene la cantidad de calor asociada a cada inyección, tomando como referencia la línea base. Cuando la macromolécula es saturada, la señal obtenida disminuye hasta que solo se aprecia el calor de dilución del sustrato (ver Figura 1.3a, después de los 120 minutos) [Velázquez-Campoy et al., 2004, Velázquez-Campoy & Freire, 2006].

En la Figura 1.3 se muestra un experimento clásico de caracterización termodinámica de la unión entre macromolécula y ligante. La macromolécula es la tripsina de cerdo y el ligante es el inhibidor de la tripsina de soya [El-Harrou & Parody-Morreale, 1997]. En la Figura 1.3a se observa el termograma en donde cada pico corresponde a una inyección de la disolución de ligante. Las señales obtenidas en las inyecciones finales se deben al calor de



(a) Termograma. Este proceso es endotérmico.

(b) Calor integrado de cada pico, normalizado por mol de ligante inyectado graficado contra la relación $\frac{[L]_T}{[M]_T}$.

Figura 1.3: Experimento típico de interacción entre moléculas seguido por ITC. Titulación del Inhibidor de Tripsina de Soya (STI) con la Tripsina Pancreática Porcina (PPT), [El-Harrouis & Parody-Morreale, 1997]. Este proceso es endotérmico.

dilución del ligante. Estas contribuciones del calor de dilución del ligante deben sustraerse. En la Figura 1.3b se muestran las áreas bajo cada pico, normalizadas por mol de ligante inyectado, contra la relación molar $\frac{[L]_T}{[M]_T}$. Aplicando algún modelo de interacción adecuado, los parámetros termodinámicos de la interacción pueden obtenerse [Freire et al., 2009]; sin embargo, el formalismo matemático de los modelos de interacción no serán tratados en este trabajo.

1.1.2.2. Caracterización de la cinética de reacción

ITC puede utilizarse también para seguir la evolución del calor liberado o absorbido durante el transcurso de una reacción enzimática. Este calor liberado o absorbido asociado al avance de la reacción es directamente proporcional a la velocidad de la reacción, y se calcula directamente integrando el área bajo la traza calorimétrica, como una función del

tiempo. Debido a que virtualmente todas las reacciones químicas liberan o absorben energía, es posible seguir mediante esta técnica reacciones enzimáticas que involucran sustratos sin cromóforos y sin modificaciones químicas, que resultan totalmente inaccesibles para las espectroscopías UV y de fluorescencia [Haq, 2005].

En un experimento de cinética enzimática seguido por ITC (ver Figura 1.4a), se inicia la reacción inyectando el sustrato en la celda muestra, que contiene una disolución de la enzima, y se permite que la reacción concluya midiendo la potencia como una función del tiempo, $P(t)$. El área bajo esta curva corresponde a la entalpía de la reacción ΔH_{reac} :

$$\Delta H_{\text{reac}} = \frac{\int_0^t P(t) \cdot dt}{V_{\text{celda}} \cdot [S]_0} \quad (1.10)$$

en donde V_{celda} es el volumen de la celda de muestra, $P(T)$ es la potencia y $[S]_0$ es la concentración inicial de sustrato. El calor total liberado o absorbido en una reacción enzimática es la entalpía molar de la reacción ΔH_{reac} multiplicada por el número de moles n del sustrato hidrolizado en la celda:

$$Q = n \cdot \Delta H_{\text{reac}} = [\text{Producto}]_{\text{total}} \cdot V_{\text{celda}} \cdot \Delta H_{\text{reac}} \quad (1.11)$$

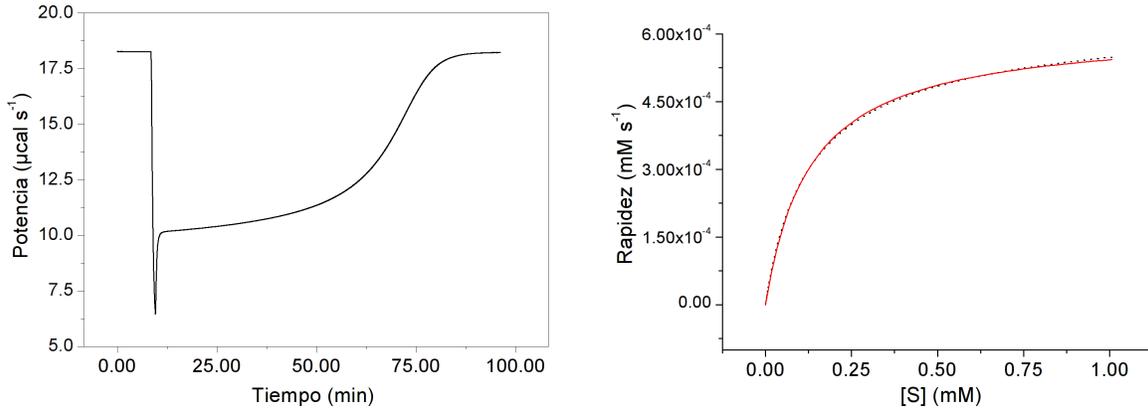
en donde $n = V_{\text{celda}} \cdot [\text{Producto}]$

Si se deriva esta ecuación respecto al tiempo t , se obtiene una expresión que relaciona la potencia, que es proporcionada directamente por el calorímetro, con la velocidad de la reacción $v(t)$:

$$P(t) = \frac{\partial Q}{\partial t} = V_{\text{celda}} \cdot \Delta H_{\text{reac}} \cdot \frac{d[\text{Prod}]}{dt} \quad (1.12)$$

despejando a $\frac{d[\text{Prod}]}{dt}$:

$$v(t) = \frac{d[\text{Prod}]}{dt} = \frac{P(t)}{V_{\text{celda}} \cdot \Delta H_{\text{reac}}} \quad (1.13)$$



(a) Potencia asociada a la reacción de hidrólisis de L-AEE como función del tiempo.

(b) Ajuste al modelo de Michaelis-Menten.

Figura 1.4: Experimento de cinética enzimática seguido por ITC (una sola inyección). Hidrólisis catalizada de L-AEE (L-arginina-etil-éster) por la β -tripsina de *Bos taurus*, obtenida en este trabajo. Condiciones: $[LAE]_0 = 1 \text{ mM}$, $[Trip] = 50 \text{ nM}$.

si integramos esta ecuación

$$[\text{Prod}(t)] = \frac{1}{V_{\text{celda}} \cdot \Delta H_{\text{reac}}} \cdot \int_0^t P(t) \cdot dt \quad (1.14)$$

y como $[\text{Prod}(t)] = [S]_0 - [S(t)]$, entonces la ecuación (1.14) se convierte en

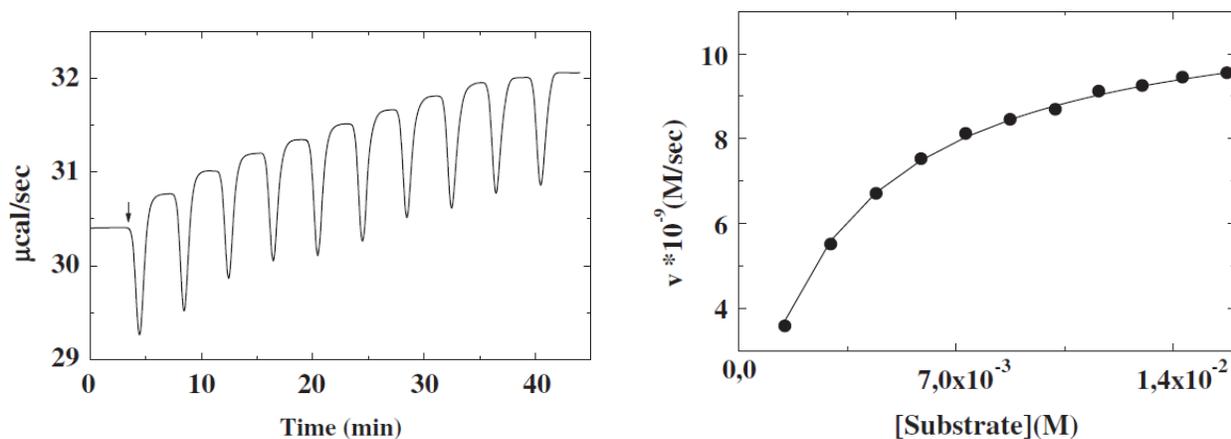
$$[S(t)] = [S]_0 - \frac{\int_0^t P(t) \cdot dt}{V_{\text{celda}} \cdot \Delta H_{\text{reac}}} \quad (1.15)$$

Las ecuaciones (1.13), (1.14) y (1.15) nos permiten conocer la velocidad de la reacción y la concentración del producto y del sustrato, respectivamente, como una función del tiempo, a partir de la lectura de la potencia $P(t)$. Conociendo estos datos, podemos graficar la velocidad de la reacción como función de la concentración de sustrato a cada tiempo t , [Bianconi, 2007, Todd & Gomez, 2001].

En la Figura 1.4 se muestra un ejemplo del estudio de una cinética enzimática seguida por ITC, obtenida en este trabajo. En la Figura 1.4a observamos el termograma de la hidrólisis

sis del L-arginina-etil-éster catalizada por la β -tripsina de *Bos taurus* a 30 °C. Después de obtener las concentraciones de sustrato y la velocidad de la reacción para cada tiempo t , se han graficado en la Figura 1.4b estos datos para ajustarlos al modelo de Michaelis-Menten por el método de mínimos cuadrados no lineal. Nótese que el número de datos obtenidos es bastante grande, del orden de 1500 puntos por experimento, lo cual facilita la determinación de los parámetros del modelo de Michaelis-Menten. Esta metodología resulta rápida, eficaz, requiere pequeñas cantidades de los reactivos y los sistemas estudiados pueden prescindir de cromóforos, que es más cercano a los eventos que ocurren en los seres vivos, en los cuales la presencia de cromóforos es algo poco común [Nelson & Cox, 2006]. Dentro de los requisitos para estudiar catálisis enzimática por ITC, es preferible que la reacción no sea inhibida por el sustrato o el producto de la reacción, en cuyo caso se requiere de un tratamiento matemático más complejo [Cai et al., 2001]. De igual forma que en un experimento clásico de interacción entre macromoléculas, es necesario sustraer la contribución del calor de dilución del sustrato que se inyecta, aunque generalmente este valor es muy pequeño comparado con la energía asociada a la reacción misma.

Existe otra estrategia experimental para estudiar la cinética enzimática utilizando ITC (ver Figura 1.5, [Andújar-Sánchez et al., 2006]). En este tipo de experimentos se realizan múltiples inyecciones de sustrato. Es necesario que la reacción no proceda más allá del 5 % antes de realizar la siguiente inyección, de esta forma, con cada inyección se tiene una concentración de sustrato que progresivamente aumenta. La señal indica, después de un pico debido al calor de dilución, una potencia que corresponde a una velocidad inicial de la reacción bajo esta concentración de sustrato. Antes de que el 5 % de este sustrato sea catalizado, se realiza una segunda inyección, aumentando con esto la concentración del sustrato en la celda, lo cual modifica la velocidad de la reacción bajo estas nuevas condiciones experimentales. Nuevamente, antes de consumir el 5 % del sustrato, se realiza otra inyección. Esto puede realizarse con un buen número de inyecciones hasta saturar la enzima, ver Figura 1.5a. En vista de que a



(a) Potencia asociada a la reacción de hidrólisis de la D-5-hidantoína.

(b) Ajuste al modelo de Michaelis-Menten.

Figura 1.5: Experimento de cinética enzimática seguido por ITC por el método de varias inyecciones. Hidrólisis de la D-5-hidantoína catalizada por la hidantoinasa. [Andújar-Sánchez et al., 2006]

cada concentración de enzima se determina una velocidad de reacción, el ajuste de estos datos al modelo de Michaelis-Menten puede realizarse, ver Figura 1.5b. El tratamiento matemático es muy similar al señalado usando el método de una sola inyección (Figura 1.4), por lo cual las ecuaciones (1.13), (1.14) y (1.15) son igualmente válidas [Todd & Gomez, 2001]. En este caso (Figura 1.5), la curva de Michaelis-Menten se construye aumentando la concentración de sustrato en el transcurso del experimento [Pey & Martínez, 2005, Lonhienne et al., 2001].

1.2. Mecanismo de la hidrólisis de sustratos catalizada por serina-proteasas

En este trabajo, la reacción enzimática que se ha elegido para ser estudiada por ITC es la hidrólisis de ésteres derivados de arginina y lisina catalizada por la β -tripsina de *Bos taurus*. La tripsina es una enzima proteolítica que se encuentra clasificada como una serina proteasa. Estas enzimas se caracterizan por contener en su sitio catalítico un residuo de Ser que actúa

como nucleófilo y que ataca al carbono carbonílico del sustrato a hidrolizar [Di Cera, 2009]. Las serina proteasas han sido agrupadas de acuerdo a la disposición de los residuos de aminoácidos que conforman la tríada catalítica. La tripsina pertenece al grupo 1, por lo cual su tríada catalítica se encuentra en la disposición espacial His57-Asp102-Ser195 (ver Figura 1.7a). El mecanismo de catálisis ha sido extensamente estudiado y en la actualidad se acepta que consta de tres pasos principales ([Hedstrom, 2002]; [Polgár, 2005]; [Case & Stein, 2003]):

1. La formación del complejo enzima-sustrato (E-S, ver Figura 1.6, paso 1) estableciendo interacciones de unión entre el sustrato (con residuos de lisina y arginina) y los residuos en la enzima encargados del reconocimiento y discriminación del mismo.
2. La acilación por el residuo Ser195 (ver Figura 1.6, paso 2) con la concomitante expulsión del grupo saliente (un alcohol en este trabajo), reacción que se favorece mediante diferentes puentes de hidrógeno que se establecen entre la Ser195 y el resto de los miembros de la tríada catalítica (Figura 1.7a). El oxianión que se genera en el estado de transición tetraédrico es estabilizado por el llamado *hueco del oxianión*, que está formado por los grupos -NH- de los residuos Gly193 y Ser195 [Matthews et al., 1977].
3. Desacilación, en donde una molécula de agua realiza un ataque nucleofílico que libera el producto y regenera el sitio catalítico de la proteasa (ver Figura 1.6, paso 3). Esta molécula de agua es activada a través de un puente de hidrógeno que se establece entre el agua y la His57, convirtiéndola en un nucleófilo más eficaz.

La formación del complejo E-S involucra interacciones que se establecen entre los residuos del sitio catalítico y el sustrato. El reconocimiento y discriminación del sustrato no es un proceso que se encuentre desacoplado al proceso de catálisis, por lo que todas las interacciones participan activamente a lo largo de todo el proceso enzimático [Hedstrom, 2002]. Puede decirse que el reconocimiento se da a través del sitio S1 (ver Figura 1.7b). Este sitio está formado principalmente, en la β -tripsina, por los residuos Asp189, Gly216 y Gly226, los cuales forman

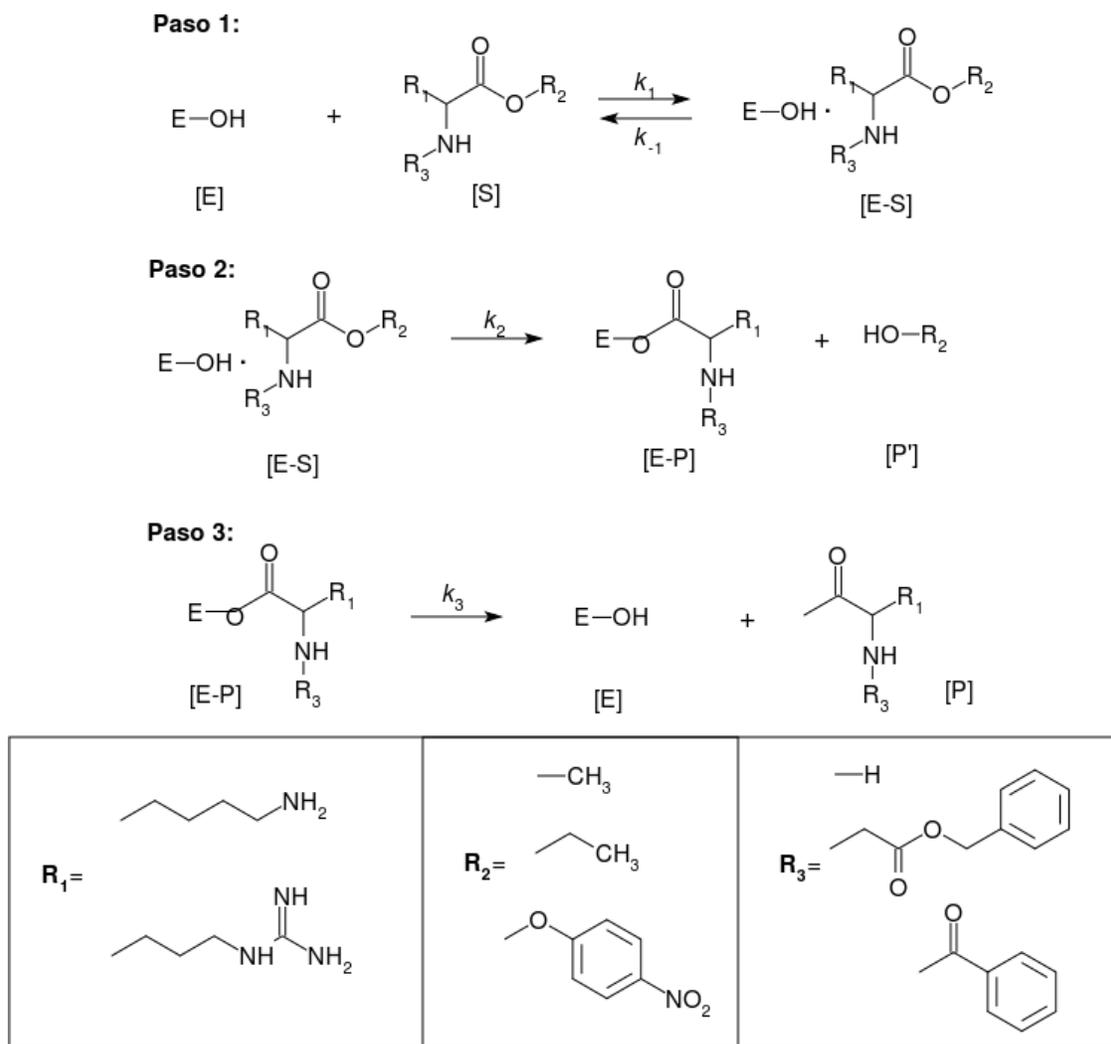


Figura 1.6: Mecanismo de hidrólisis de ésteres catalizada por las serina proteasas. Paso 1: Formación del complejo E-S. Paso 2: Acilación. Paso 3: Desacilación. En este trabajo: E: enzima, tripsina o quimotripsina; S: sustrato; E-S: complejo enzima-sustrato; E-P: complejo enzima-producto, P': subproducto (alcohol); P: producto hidrolizado. Respecto al sustrato S, R₁: residuo de lisina (cuadro R1, superior) o de arginina (cuadro R1, inferior). R₂: grupo saliente, que puede ser metanol (cuadro R2, superior), etanol (cuadro R2, medio) o paranitrofenol (cuadro R2, inferior). R₃: grupo añadido en el extremo amino terminal del sustrato, en este trabajo pueden ser un protón (cuadro R3, superior), un grupo carbobenzoilo (cuadro R3, medio) o un grupo benzoilo (cuadro 3, inferior).

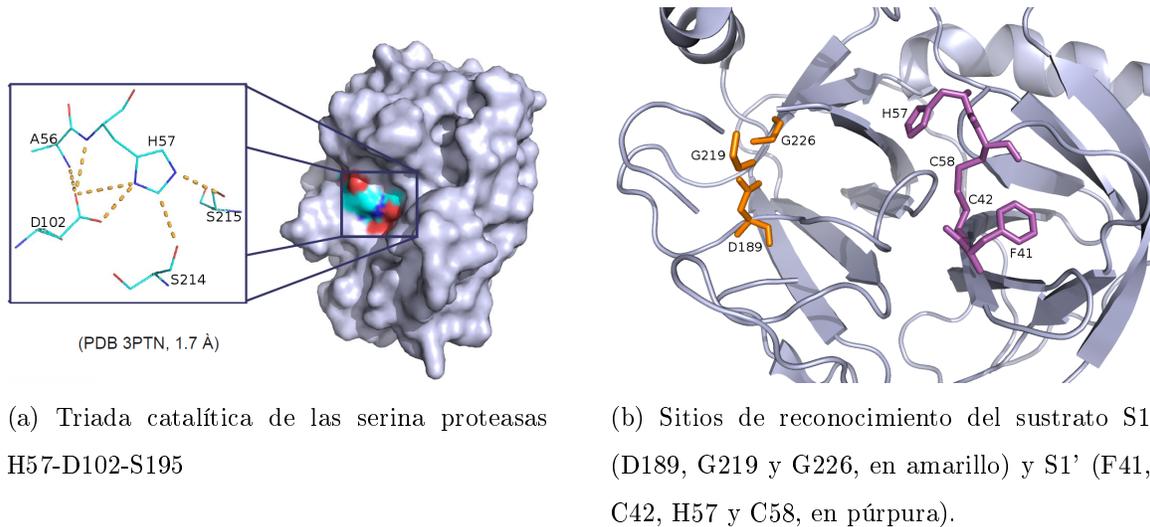


Figura 1.7: Sitio catalítico de las serina-proteasas. β -tripsina de *Bos taurus*. PDB: 3PTN.

una cavidad cargada negativamente, que explica por qué la tripsina hidroliza enlaces peptídicos en el extremo carboxilo terminal de residuos de lisina y arginina [Krieger et al., 1974]. Sin embargo, éstas no son las únicas interacciones que se presentan durante la catálisis.

En la la Figura 1.8, en donde se muestra la estructura cristalográfica de una acilenzima, la γ -quimotripsina y el péptido PGAY, puede observarse que los residuos Ser189, Gly216 y Gly226 conforman el sitio S1 (hidrofóbico por ser quimotripsina), en analogía con la β -tripsina; no obstante, existen otras interacciones de interés que pueden extrapolarse al resto de las serina proteasas. En esta misma figura se aprecia al grupo carbonilo de la tirosina posicionado en el hueco del oxianión y al oxígeno de la Ser195 formando, covalentemente, el intermediario tetraédrico. El grupo saliente del sustrato ya ha sido expulsado de la enzima en este punto. Sin embargo, debe hacerse notar la presencia de otras interacciones: el grupo -NH- del sitio P1 del sustrato (Tyr) forma un puente de hidrógeno con el átomo de O de la Ser214, el cual probablemente tenga la función de acercar al residuo con la triada catalítica porque también forma un puente de hidrógeno con la His57. El grupo -NH- y el

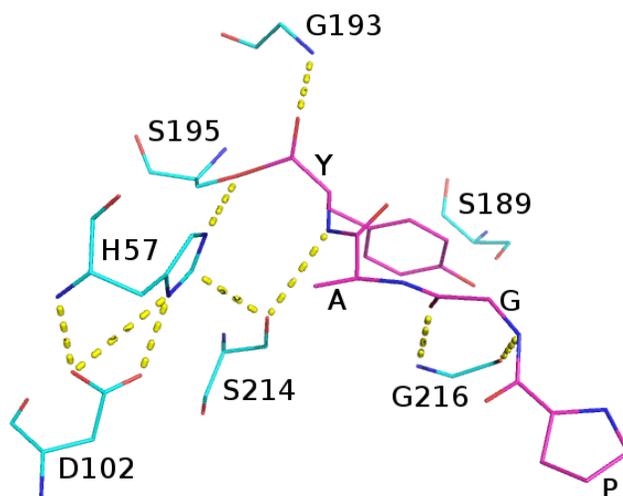


Figura 1.8: Interacciones de reconocimiento del sustrato (polipéptido PGAY, esqueleto carbonado en magenta) por la γ -quimotripsina (esqueleto carbonado en cian). Las líneas amarillas muestran puentes de hidrógeno representativos. PDB: 3GCT [Dixon et al., 1991].

O carbonílico de la Gly216 también forman puentes de hidrógeno con el O carbonílico de la glicina y el grupo NH de la prolina en el sustrato, respectivamente, [Dixon et al., 1991]. Este tipo de interacciones adicionales son la razón por la cual, al incrementarse la longitud de la cadena polipeptídica hacia el extremo amino terminal, las constantes de disociación disminuyen, lo que se refleja indirectamente en una disminución en los valores de la K_m , [Case & Stein, 2003]. Este fenómeno no se encuentra limitado exclusivamente a la quimotripsina, sino que es un comportamiento observado de manera general en las serina proteasas [Gul et al., 2006, Krem & Di Cera, 1998, Ascenzi et al., 1982].

Las interacciones del grupo saliente con la proteína también favorecen la formación del complejo E-S, [Bode et al., 1992]. Para el caso de la tripsina, el sitio S1' está conformado por los residuos Phe41, Cys42, His57 y Cys58 (ver Figura 1.7b), los cuales establecen interacciones de tipo puente de hidrógeno con el primer aminoácido hacia el carboxilo terminal del sustrato, conocido como el sitio P1'.

Podemos expresar las ecuaciones de velocidad para la enzima E, el sustrato S y el producto P, de acuerdo a este mecanismo de catálisis, como sigue [Bisswanger, 2008]:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[E - S] + k_3[E - P'] \quad (1.16)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[E - S] \quad (1.17)$$

$$\frac{d[E - S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[E - S] - k_2[E - S] \quad (1.18)$$

$$\frac{d[E - P]}{dt} = k_2[E - S] - k_3[E - P] \quad (1.19)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[E - P] \quad (1.20)$$

Si se aplica la aproximación del estado estacionario, esto es que la concentración de los intermediarios E-S y E-P se mantiene constante en el transcurso de la reacción, se cumple que:

$$\frac{d[E - S]}{dt} = \frac{d[E - P]}{dt} = 0 \quad (1.21)$$

entonces, la ecuación (1.18) se transforma en

$$k_1[E][S] - k_{-1}[E - S]_{ee} - k_2[E - S]_{ee} = 0 \quad (1.22)$$

Si realizamos un balance de materia para la concentración de la enzima E

$$[E] = [E]_0 - [E - S] - [E - P] \quad (1.23)$$

y sustituimos esta última expresión en la ecuación (1.22) se alcanza

$$k_1[E]_0[S] - k_1[E - S]_{ee}[S] - k_1[E - P]_{ee} - k_{-1}[E - S]_{ee} - k_2[E - S]_{ee} = 0 \quad (1.24)$$

por otra parte, si aplicamos la aproximación del estado estacionario para la especie E-P, se tiene que

$$k_2[E - S]_{ee} - k_3[E - P]_{ee} = 0$$

despejando a $[E - P]_{ee}$

$$[E - P]_{ee} = \frac{k_2}{k_3}[E - S]_{ee} \quad (1.25)$$

si sustituimos la ecuación (1.25) en (1.24), se obtiene

$$k_1[E]_0[S] - k_1[E - S]_{ee}[S] - \frac{k_1 k_2}{k_3}[S][E - S]_{ee} - k_{-1}[E - S]_{ee} - k_2[E - S]_{ee} = 0$$

y despejamos a $[E - S]_{ee}$

$$\left(k_1[S] + \frac{k_1 k_2}{k_3}[S] + k_{-1} + k_2 \right) [E - S]_{ee} = k_1[E]_0[S]$$

$$\left[k_{-1} + k_2 + \left(k_1 + \frac{k_1 k_2}{k_3} \right) [S] \right] [E - S]_{ee} = k_1[E]_0[S]$$

$$\left[\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + \left(1 + \frac{k_2}{k_3} \right) [S] \right] [E - S]_{ee} = [E]_0[S]$$

para llegar a la expresión (1.26)

$$[E - S]_{ee} = \frac{[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + \left(\frac{k_2 + k_3}{k_3} \right) [S]} \quad (1.26)$$

si sustituimos esta expresión en la ecuación (1.25)

$$[E - P]_{ee} = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_3(k_{-1}+k_2)}{k_1} + (k_2 + k_3)[S]} \quad (1.27)$$

y la multiplicamos y dividimos por $\frac{1}{k_2+k_3}$

$$[E - P]_{ee} = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_3}{k_1(k_2+k_3)} + (k_2 + k_3)[S]} \cdot \frac{1}{\frac{1}{k_2+k_3}}$$

$$[E - P]_{ee} = \frac{\frac{k_2}{k_2+k_3}[E]_0[S]}{\frac{k_3(k_{-1}+k_2)}{k_1(k_2+k_3)} + [S]} \quad (1.28)$$

Finalmente, sustituimos la ecuación (1.28) en (1.20) y obtendremos la expresión de la velocidad en función de las constantes microscópicas cinéticas, en el estado estacionario

$$v = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2+k_3}[E][S]}{\frac{k_3(k_{-1}+k_2)}{k_1(k_2+k_3)} + [S]} \quad (1.29)$$

Si recordamos la expresión general del modelo de Michaelis-Menten

$$v = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{K_M + [S]} \quad (1.30)$$

es posible escribir las constantes macroscópicas del modelo de Michaelis-Menten de la siguiente manera:

Constante catalítica

$$k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3} \quad (1.31)$$

Constante de Michaelis-Menten

$$K_M = \frac{k_3 \cdot (k_{-1} + k_2)}{k_1 \cdot (k_2 + k_3)} \quad (1.32)$$

Eficiencia catalítica

$$k_A = \frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (1.33)$$

2

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Las constantes microscópicas de velocidad para la hidrólisis de sustratos sin cromóforos de la actividad promiscua de la β -tripsina de *Bos taurus* pueden determinarse a partir de experimentos de Calorimetría de Titulación Isotérmica.

Objetivo General

Caracterizar la cinética enzimática de reacciones irreversibles correspondientes a la actividad promiscua de la β -tripsina empleando la Calorimetría de Titulación Isotérmica.

Objetivos Particulares

- Para la hidrólisis catalizada por la β -tripsina de *Bos taurus*, comparar los parámetros cinéticos obtenidos por espectroscopía UV y cinética rápida usando un equipo Stopped-Flow/UV, con aquellos determinados por ITC.

- Determinar las constantes de velocidad microscópicas para la hidrólisis de ésteres catalizada por la β -tripsina a partir de datos generados por ITC.
- Profundizar en el conocimiento de la promiscuidad catalítica de la tripsina utilizando como sustratos ésteres de lisina y arginina.

3

Materiales y Métodos

3.1. Materiales

Los sustratos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich como clorhidratos (*sustrato* · $2HCl$) con pureza de al menos 98 %. La β -tripsina de *Bos taurus* liofilizada y los compuestos inorgánicos utilizados para la preparación de las disoluciones amortiguadoras también fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El agua utilizada fue destilada y desionizada hasta obtener un valor de 18 m Ω . Los sustratos utilizados se muestran en la Figura 3.1.

La concentración de la enzima se cuantificó mediante un ensayo de actividad enzimática utilizando el siguiente protocolo (establecido por Sigma-Aldrich): en un amortiguador de NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 100 mM a pH 7.6 se preparó una disolución de BAEE 62.8 mM (BAEE, benzoíl-arginina-etil-éster) y se agregó una alícuota de 200 μ L de la disolución de tripsina cuya concentración desea determinarse, y se colocó 1 mL de la mezcla de reacción en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico. Se monitoreó la reacción midiendo los cambios en la absorción a una longitud de onda $\lambda = 253$ nm por 5 minutos. Se determinó la magnitud de la pendiente por regresión lineal y este valor se convirtió en la velocidad inicial de la reacción mediante la ley de Lambert-Beer:

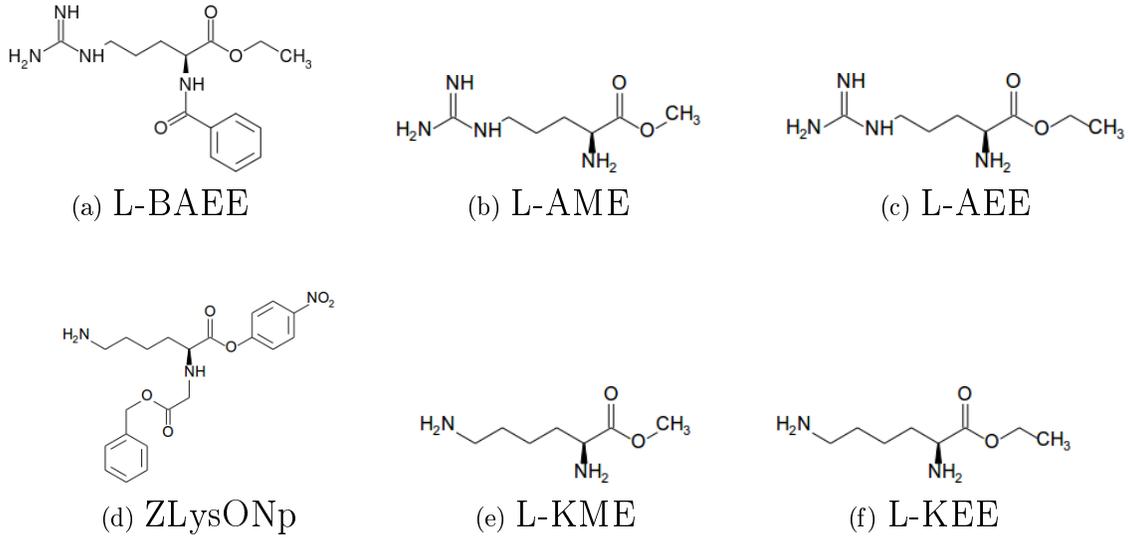


Figura 3.1: Sustratos utilizados para estudiar la promiscuidad catalítica de la tripsina. Para estos sustratos fue posible obtener las constantes microscópicas de velocidad para la hidrólisis catalizada por las serina-proteasas. **BAEE**: benzoil-arginina-etil-éster. **ZLysONp**: *N*- α -carbобензоил-L-lisina-nitrofenil-éster. **L-AME**: L-arginina-metil-éster. **L-KME**: L-lisina-metil-éster. **L-AEE**: L-arginina-etil-éster. **L-KEE**: L-lisina-etil-éster.

$$A = C \cdot \epsilon \cdot l$$

Si derivamos la ecuación de Lambert-Beer con respecto al tiempo, se obtiene:

$$\frac{dA}{dt} = \epsilon \cdot l \cdot \frac{dC}{dt} \quad (3.1)$$

y despejamos $\frac{dC}{dt}$

$$v_0 = \frac{dC}{dt} = \frac{1}{\epsilon \cdot l} \cdot \frac{dA}{dt} \quad (3.2)$$

Una vez sustituido el valor $\frac{dA}{dt}$ en la ecuación anterior, la velocidad inicial $v_0 = \frac{dC}{dt}$ es obtenida. Se conoce la concentración inicial del sustrato y, bajo estas condiciones experimentales, las constantes k_{cat} y K_M de Michaelis-Menten están informadas en la literatura (16 s^{-1}

y 4 μM , respectivamente, [Todd & Gomez, 2001]). Con todos estos valores, la concentración de la tripsina se determinó despejando de la expresión michaeliana:

$$[E] = v_0 \cdot \frac{K_M + [S]_0}{k_{\text{cat}} \cdot [S]_0} \quad (3.3)$$

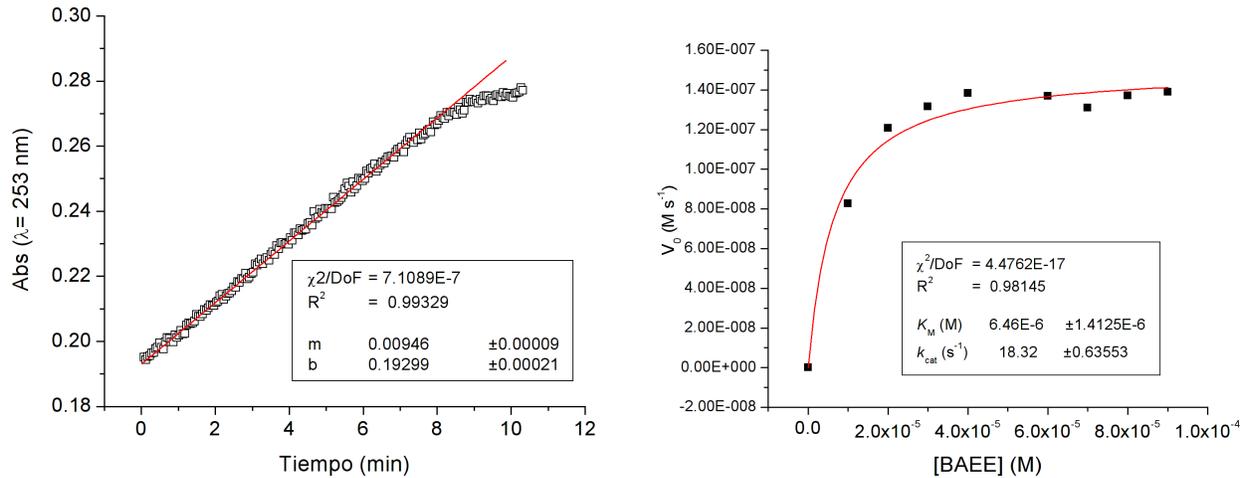
Encontramos que la pureza de la tripsina fue del 93 %.

3.2. Empleo de ITC como técnica de estudio de la cinética enzimática de la tripsina de *Bos taurus*.

3.2.1. Comparación entre ITC y Espectroscopía UV-Visible. BAEE

Con el objetivo de comparar los resultados que se obtienen al seguir reacciones enzimáticas por espectroscopía UV-Visible e ITC, se estudió la hidrólisis de BAEE (ver Figura 3.1a) catalizada por la β -tripsina. Este sustrato contiene un grupo benzoilo unido directamente en el extremo amino terminal. A una longitud de onda de 253 nm, se observa una absorción diferente entre el sustrato y la L-benzoil-arginina, el producto de hidrólisis. Gracias a estas características espectroscópicas, es posible seguir la reacción por UV.

Para seguir la reacción por UV, se determinó la velocidad inicial de la misma a diferentes concentraciones iniciales de sustrato, cubriendo el intervalo que va desde 10 μM hasta 150 μM . A cada disolución de sustrato se añadió una disolución de tripsina tal que la enzima alcanzara una concentración de 10 nM, en un volumen final de 1 mL. Rápidamente, la mezcla de reacción fue vertida en una celda de cuarzo de longitud de paso óptico de 1 cm y se siguió la evolución de la absorbancia por 15 minutos a 253 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 Modelo UV0909M003 . La temperatura de la celda fue controlada mediante un baño de agua a la temperatura deseada. Cada serie de experimentos se realizó a diferentes temperaturas (15-45 °C) en un amortiguador de Tris-HCl/CaCl₂/PEG a pH 8.0 (200 mM



(a) Determinación de la velocidad inicial de la reacción por regresión lineal. Conc. inic. BAEE: $80 \mu\text{M}$.

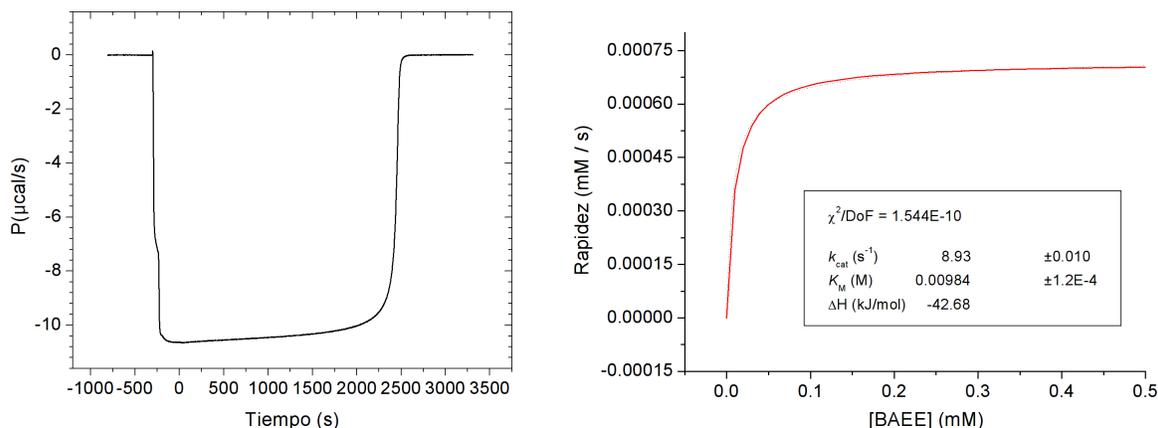
(b) Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de un conjunto completo de experimentos.

Figura 3.2: Experimento clásico de cinética enzimática seguido por espectrofotometría UV-Vis. Hidrólisis de BAEE a 30°C .

Tris-HCl pH 8.0, 50 mM CaCl_2 y 0.2% $\frac{g}{v}$ polietilenglicol 5000 [Inagami, 1964]).

La velocidad inicial de las reacciones enzimáticas se obtuvo a través de una regresión lineal de los datos obtenidos de absorbancia. La pendiente corresponde al valor de la velocidad inicial, como se muestra en la Figura 3.2a. En la Figura 3.2b se muestra un ejemplo de una serie completa de experimentos para una temperatura elegida, 30°C . Estos datos pueden ser ajustados al modelo de Michaelis-Menten para obtener los parámetros k_{cat} y K_M .

Para seguir la reacción por ITC, se preparó una disolución de tripsina en una concentración de 50 nM en el amortiguador Tris/ CaCl_2 /PEG, que se colocó cuidadosamente en la celda de muestra de un calorímetro de titulación isotérmica VP-ITC Microcalorimeter de Microcal (®). En la jeringa se introdujo una disolución de BAEE, concentración 35 mM en el mismo amortiguador, y se realizó una única inyección en la celda de $40 \mu\text{L}$ en 68.4 s , hasta alcanzar una concentración del sustrato en la celda de 1 mM , con agitación de 550 rpm .



(a) Termograma. Concentración inicial de BAEE: 2 mM

(b) Ajuste al modelo de Michaelis-Menten.

Figura 3.3: Hidrólisis de BAEE a 25 °C, seguida por ITC.

Se adquirió la traza calorimétrica hasta que la reacción se concretó (poco más de 2 horas, ver Figura 3.3). En la sección de *Antecedentes* se ha detallado el formalismo matemático necesario para el análisis de la traza calorimétrica y cómo obtener los valores de la velocidad de la reacción como función del tiempo y de la concentración inicial de sustrato.

3.2.2. Comparación entre ITC y Stopped-Flow/UV-Visible. ZLysONp

Para comparar la metodología de ajuste de resultados, descrita en la sección *Tratamiento de Datos* y que se propone para obtener constantes individuales de velocidad y las energías de activación de Arrhenius de cada paso de catálisis, se estudió la hidrólisis de ZLysONp (ver Figura 3.1d) catalizada por tripsina seguida por ITC con el objeto de comparar los resultados informados por Ascenzi et al. (1982), trabajo en el cual se estudió esta misma reacción utilizando la técnica Stopped-Flow/UV-Visible.

Para esto, en un amortiguador de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 100 mM a pH 5.8, se preparó una disolución de ZLysONp en concentración 4 mM y se realizó una sola inyección de tripsina

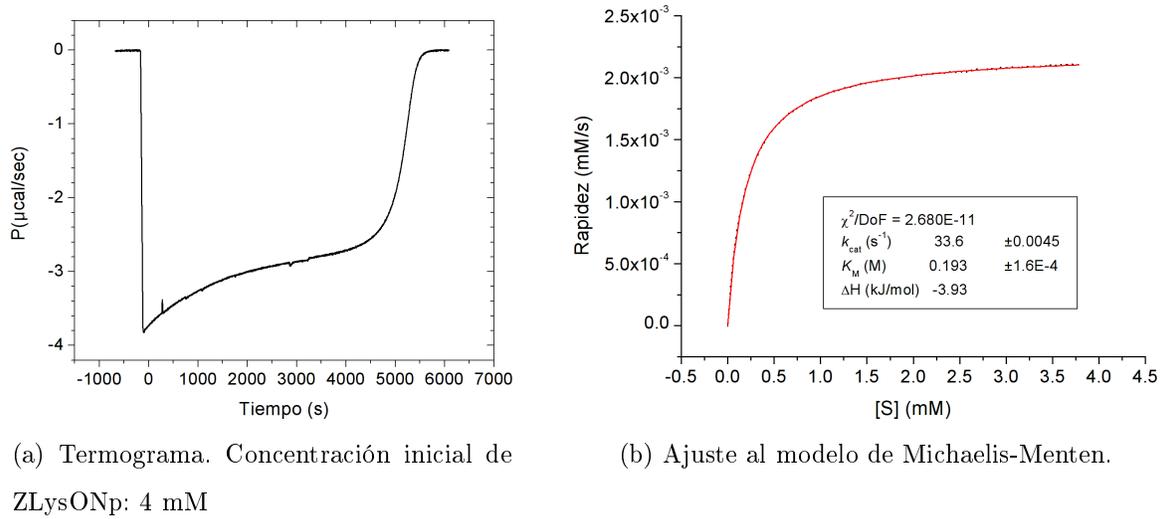


Figura 3.4: Hidrólisis de ZLysONp a 25 °C, seguida por ITC.

de 40 μL hasta tener en la celda una concentración final de 90 nM, con agitación de 550 rpm. Se registró la señal hasta que la reacción concluyó, en cerca de 2 horas (ver Figura 3.4). El intervalo de temperaturas en que se trabajó fue de 5 °C a 40 °C. Los valores de velocidad de la reacción en función de la concentración de sustrato se obtuvieron como se indicó en los *Antecedentes*. Estos resultados fueron procesados posteriormente de acuerdo con la metodología de ajuste que se describe en la sección de *Tratamiento de datos*.

3.3. Caracterización cinética de sustratos ciegos

Se estudió la cinética enzimática de la tripsina con los sustratos L-AME, L-AEE, L-KME y L-KEE, mostrados en la Figura 3.1. La tripsina se colocó en la celda muestra en una concentración de 50 nM y se realizó una inyección del sustrato hasta alcanzar una concentración final de 2 mM, en amortiguador de Tris-HCl/CaCl₂/PEG a pH 8.0, cubriendo el intervalo de temperaturas de 5 °C hasta 40 °C. Se permitió que la reacción terminara y se determinaron los parámetros cinéticos como se indica en la sección de *Tratamiento de datos*.

3.4. Calorimetría de Barrido Diferencial

Para observar el desplegamiento de la tripsina en un intervalo amplio de temperatura, se realizaron experimentos en el calorímetro diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimeter*, DSC, por sus siglas en inglés) VP-DSC Capillary Cell Microcalorimeter with Autosampler de Microcal. En un amortiguador de fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM, pH 8.0) se preparó una disolución 40 μM de tripsina (1 mg/mL). Las líneas base fueron obtenidas colocando el amortiguador de fosfatos en las celdas de muestra y de referencia. La velocidad de calentamiento fue de 300 $^\circ\text{C}/\text{min}$, cubriendo el intervalo de temperaturas de 5 $^\circ\text{C}$ hasta 80 $^\circ\text{C}$.

4

Tratamiento de datos

4.1. Método de Di Cera. Obtención de energías de activación y constantes de velocidad

La ecuación de Arrhenius, a partir de las constantes de velocidad de alguna reacción determinadas a diferentes temperaturas, nos permite conocer la energía de activación (E_a) y el factor preexponencial (A):

$$k(T) = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (4.1)$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (4.2)$$

Si diferenciamos esta expresión, obtendremos

$$d \ln k(T) = -\frac{E_a}{RT^2} \cdot dT \quad (4.3)$$

Si integramos esta última ecuación tomando como límites a k^0 y T_0 (constante de velocidad k^0 a una temperatura T_0), llegamos a la expresión (4.5)

$$\int_{\ln k^0}^{\ln k(T)} d \ln k = -\frac{E_a}{R} \int_{T_0}^T \frac{1}{T^2} dT \quad (4.4)$$

$$k(T) = k^0 \cdot e^{-\frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} \quad (4.5)$$

En la sección 1.2 se mostró el tratamiento matemático que nos permite relacionar los parámetros característicos de Michaelis-Menten con las constantes de velocidad planteadas en el mecanismo de catálisis de las serina-proteasas, ecuaciones (1.31), (1.32) y (1.33). Si introducimos la expresión de Arrhenius, ecuación (4.5), en cada una de las expresiones de las constantes de velocidad microscópicas:

$$k_1(T) = k_1^0 \cdot e^{-\frac{E_1}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}$$

$$k_{-1}(T) = k_{-1}^0 \cdot e^{-\frac{E_{-1}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}$$

$$k_2(T) = k_2^0 \cdot e^{-\frac{E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}$$

$$k_3(T) = k_3^0 \cdot e^{-\frac{E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}$$

A partir de este punto, las constantes k_i^0 se denotarán como k_i , pero debe entenderse que se refieren al valor de k_i evaluado en T_0 . Sustituyendo estas expresiones en las ecuaciones (1.31), (1.32) y (1.33), las expresiones de Michaelis-Menten se convierten en:

$$k_{\text{cat}}(T) = \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot e^{-\frac{E_2+E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}} \quad (4.6)$$

$$K_M(T) = \frac{k_{-1} \cdot e^{-\frac{E_{-1}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_1 \cdot e^{-\frac{E_1}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}} \cdot \frac{k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}} \quad (4.7)$$

$$k_A(T) = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot e^{-\frac{E_1+E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_{-1} \cdot e^{-\frac{E_{-1}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}} \quad (4.8)$$

De esta forma, en principio, si contamos con datos experimentales de catálisis a diferentes temperaturas en un intervalo relativamente grande, seríamos capaces de determinar las energías de activación y las constantes individuales de velocidad a T_0 para cada paso catalítico. Sin embargo, para poder obtener estos ocho parámetros a partir de datos procedentes de experimentos de cinética enzimática del estado estacionario, sólo se ha reportado una estrategia para las serina proteasas, [Ayala & Di Cera, 2000]; [Asgeirsson & Cekan, 2006]; [Verheyden et al., 2004]. Ésta consiste en realizar una serie de suposiciones respecto al comportamiento del sistema enzimático con la temperatura y con el tipo de sustrato que se estudia.

La primera suposición es considerar que la energía de activación de la acilación del sustrato (E_2) es de menor magnitud que la correspondiente a la disociación del complejo E-S (E_{-1}), de tal suerte que a bajas temperaturas el proceso que predomina es la acilación sobre la ruptura del complejo E-S, razón por la cual se acepta que $k_2 \gg \gg k_{-1}$, entonces la eficiencia catalítica k_A tiene aproximadamente el mismo valor que k_1 :

$$k_{A, T_{\text{baja}}} \approx \frac{k_1 \cdot k_2}{k_2}$$

$$k_{A, T_{\text{baja}}}(T) \approx k_1(T) = k_1 \cdot e^{-\frac{E_1}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} \quad (4.9)$$

cuya forma logarítmica es:

$$\ln k_{A, T_{\text{baja}}}(T) \approx \ln k_1(T) = \ln k_1 - \frac{E_1}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right) \quad (4.10)$$

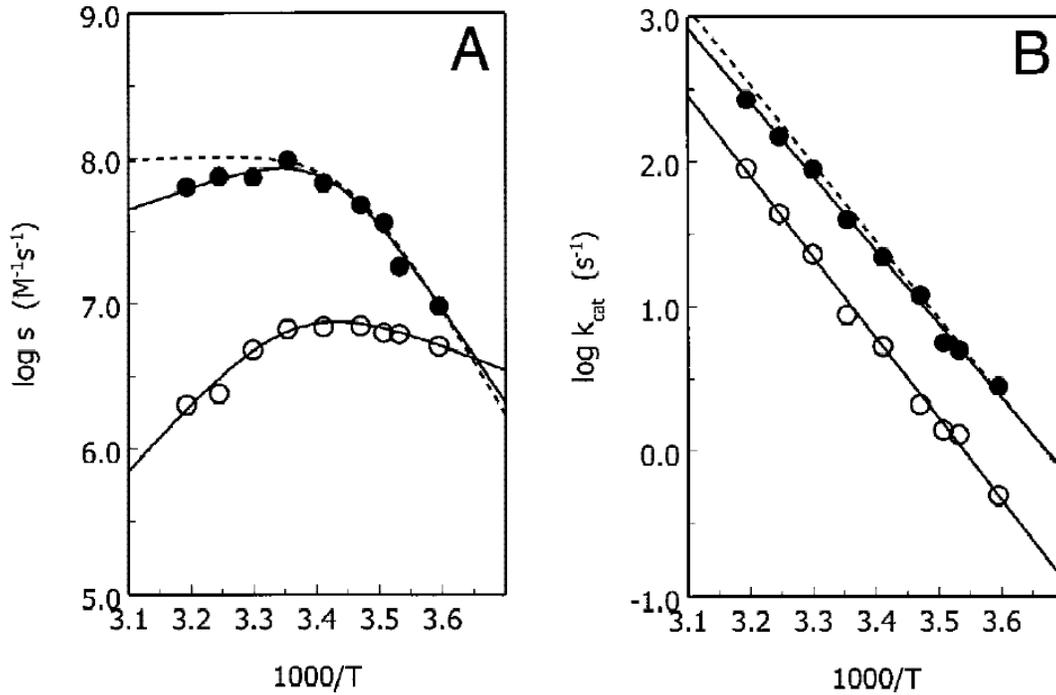
(a) Gráfico de Arrhenius de k_A (b) Gráfico de Arrhenius de k_{cat}

Figura 4.1: Determinación de las constantes individuales de velocidad y las energías de activación por el método de Di Cera para la hidrólisis de FPR por la trombina. [Ayala & Di Cera, 2000].

A bajas temperaturas se esperaría tener un comportamiento lineal del gráfico de Arrhenius de k_A con pendiente negativa, como puede verse en el lado derecho de la gráfica mostrada en la Figura 4.1a, para el caso de la hidrólisis del péptido FPR (H-D-Phe-Pro-Arg-*p*-nitroanilida) por la trombina, [Ayala & Di Cera, 2000]. A partir de este segmento del gráfico de Arrhenius es posible obtener, por regresión lineal, la energía de activación del primer paso y el valor de la constante correspondiente de velocidad a la temperatura deseada (normalmente 25 °C, 298.15 K).

La segunda suposición consiste en que a elevadas temperaturas la ruptura del complejo E-S se ve favorecida puesto que la energía de activación E_{-1} ahora puede superarse. De esta

forma, la constante de velocidad de la acilación tendría una magnitud mucho menor que la constante de ruptura del complejo, dicho de otro modo, que $k_{-1} \gg \gg k_2$, por lo que:

$$k_{A, T_{\text{alta}}}(T) \approx \frac{k_1(T) \cdot k_2(T)}{k_{-1}(T)} = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1}} \cdot e^{-\frac{E_1 + E_2 - E_{-1}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} \quad (4.11)$$

$$\ln k_{A, T_{\text{alta}}}(T) \approx \ln \frac{k_1(T) \cdot k_2(T)}{k_{-1}(T)} = \ln \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1}} - \frac{E_1 + E_2 - E_{-1}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right) \quad (4.12)$$

Conforme la temperatura aumenta, el gráfico de Arrhenius correspondiente (Figura 4.1a) muestra que se alcanza un máximo de eficiencia catalítica a partir del cual hay un cambio en el signo de la pendiente. En esta segunda parte de la gráfica, a partir de la pendiente, que ahora es positiva, es posible obtener una relación de las energías de activación $-m = E_1 + E_2 - E_{-1}$ y de la ordenada al origen la relación $b = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1}}$.

La tercera y última suposición para obtener los parámetros de Arrhenius depende del tipo de sustrato que la tripsina hidroliza. Si se trata de una amida, la enzima actúa sobre un enlace peptídico (sustrato natural), para lo cual el paso limitante es la acilación, de tal forma que $k_2 \ll \ll k_3$, [Case & Stein, 2003]. Si el sustrato es un éster (sustrato promiscuo), el paso limitante es la liberación del producto, o desacilación, entonces $k_2 \gg \gg k_3$, (ver Figura 1.6) [Zerner & Bender, 1964]. Esto es debido a que el ataque nucleofílico del residuo Ser195 sobre el carbono carbonílico del enlace peptídico es menos favorecido que para un carbono carbonílico de éster debido al efecto de resonancia que se presenta entre los átomos C-O-N, mientras que para los ésteres este efecto no es tan marcado [Hedstrom, 2002]. Por estas razones, los pasos limitantes difieren de sustrato a sustrato. De esta forma, para el caso de las amidas, el gráfico de Arrhenius para la k_{cat} quedaría determinado por las siguientes ecuaciones:

$$k_{\text{cat}}^{\text{pept}} \approx \frac{k_2 \cdot k_3}{k_3} = k_2$$

$$k_{\text{cat}}^{\text{pept}}(T) \approx k_2(T) = k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} \quad (4.13)$$

$$\ln k_{\text{cat}}^{\text{pept}}(T) \approx \ln k_2(T) = \ln k_2 - \frac{E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right) \quad (4.14)$$

A partir del correspondiente gráfico de Arrhenius (Figura 4.1b, para la trombina y FPR) se obtienen la energía de activación E_2 y k_2 . Con estos parámetros y los obtenidos anteriormente, es posible entonces caracterizar los pasos 1 y 2 de la hidrólisis catalizada por serina proteasas, realizando un par de pasos algebraicos simples, aunque el tercer paso no puede determinarse y solo podría concluirse que es una reacción elemental rápida.

En caso de que los sustratos fuesen ésteres, el tratamiento es ligeramente diferente:

$$k_{\text{cat}}^{\text{ester}} \approx \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2} = k_3$$

$$k_{\text{cat}}^{\text{ester}}(T) \approx k_3(T) = k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} \quad (4.15)$$

$$\ln k_{\text{cat}}^{\text{ester}}(T) \approx \ln k_3(T) = \ln k_3 - \frac{E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right) \quad (4.16)$$

Como puede verse, el paso de desacilación ahora sí sería caracterizado. Sin embargo, dada la ausencia de datos acerca del paso de acilación, no sería posible la determinación completa de los parámetros de Arrhenius. La única forma posible de conocer los tres pasos de catálisis, a través del método de Di Cera, sería que la curva $\ln k_{\text{cat}}$ vs $\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)$ mostrara un comportamiento similar al visto para la eficiencia catalítica k_A , teniendo regiones en donde alguno de los dos pasos de acilación o desacilación predominara sobre el otro en algún intervalo de temperatura, [Kappelhoff et al., 2009]. Sin embargo, esto no es común y la asignación de regiones donde algún paso predomine no es una decisión trivial.

4.2. Ajuste global simultáneo

En la sección anterior se mostró que la estrategia publicada para obtener energías de activación y constantes de velocidad de las serina proteasas consiste en hacer suposiciones que no tienen sólido sustento experimental, ya que se basan en una visión preconcebida del comportamiento catalítico del sistema que se estudia y puede ocultar comportamientos distintivos entre sustrato y sustrato. Para evitar problemas de este tipo, en este trabajo proponemos una metodología de ajuste global de los parámetros de Michaelis-Menten, considerando que al utilizar ITC se genera una cantidad muy grande de datos experimentales, del orden de millares de puntos por experimento, y que se ha estudiado cada sistema en un intervalo relativamente grande de temperaturas (entre 5 °C y 45 °C).

Primero tomamos las expresiones que relacionan a los parámetros de Michaelis-Menten, esto es, k_{cat} y K_M , en función de las constantes microscópicas de velocidad del mecanismo de catálisis de las serina-proteasas y sustituimos las expresiones de Arrhenius, como se mostró en la sección anterior (ver ecuaciones (4.6) y (4.7)). Si introducimos estas expresiones en la ecuación (1.30), obtendremos una ecuación en la que se muestra que la velocidad de la reacción es una función de los parámetros de Arrhenius para cada paso de catálisis.

$$v(t) = \frac{[E]_0 \cdot \left(\frac{k_2 \cdot k_3 \cdot e^{-\frac{E_2+E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} \right) \cdot \left([S]_0 - \frac{\int_0^t P(t) \cdot dt}{V_{\text{cell}} \cdot \Delta H} \right)_t}{\left(\frac{k_{-1} \cdot e^{-\frac{E_{-1}}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_1 \cdot e^{-\frac{E_1}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}} \cdot \frac{k_3 \cdot e^{-\frac{E_{-3}}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}} \right) + \left([S]_0 - \frac{\int_0^t P(t) \cdot dt}{V_{\text{cell}} \cdot \Delta H} \right)_t} \quad (4.17)$$

En un experimento de cinética enzimática, se conoce la concentración inicial de la enzima $[E]_0$, la temperatura T en que la reacción ocurre y en la sección 1.2 ya se ha demostrado cómo obtener los valores de v como una función de la concentración de sustrato. De esta manera, se pueden ajustar, por el método de mínimos cuadrados no lineal, los parámetros de Arrhenius tomando como punto de partida el conjunto de lecturas para cada $[S(t)]$ con

```

R= 0.00831;
To= 298.15;
A= (((1/T)-(1-To)/R);
B1= K1*EXP(-1*E1*A);
BM1= KM1*EXP(-1*EM1*A);
B2= K2*EXP(-1*E2*A);
B3= K3*EXP(-1*E3*A);
KCAT= (B2*B3)/(B2+B3);
KM= (B3/B1)*((BM1+B2)/(B2+B3));
Vi= (KCAT*S)/(KM+S);
y= (A1*V1)+(A2*V2)+(A3*V3)+...+(Ai*Vi);
/* END

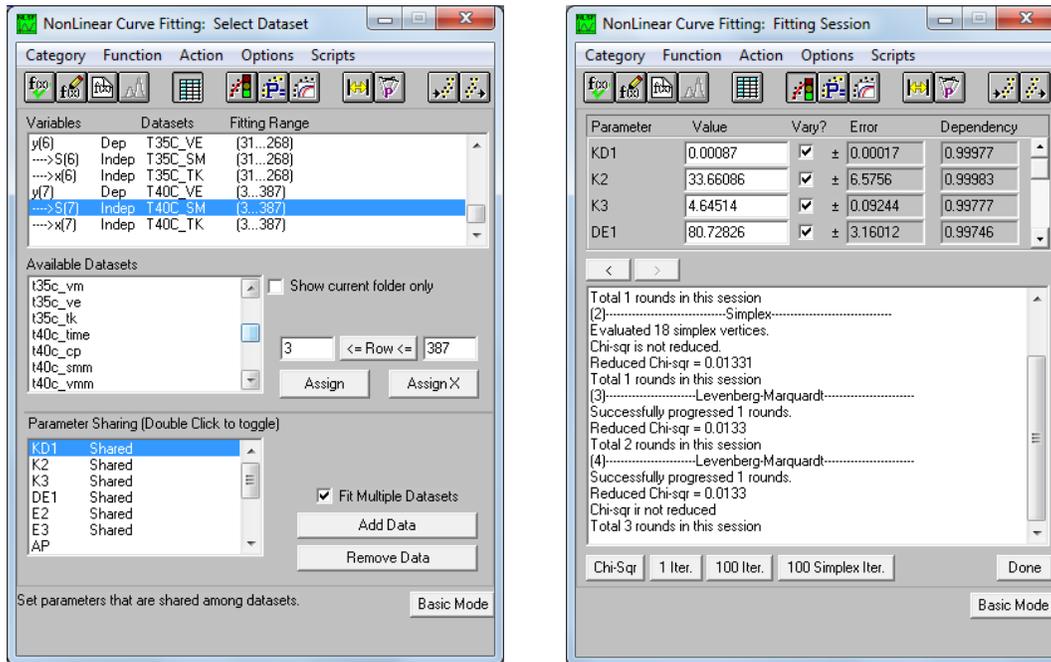
```

Figura 4.2: Script utilizado en Origin 7.0 para realizar un ajuste global simultáneo utilizando la ecuación (4.18) **R**: constante de los gases en kJ/mol. **To**: temperatura de referencia en K. **T**: temperatura, en K, a la que se estudia la reacción. **B_j**: expresión de Arrhenius de la constante de velocidad para el paso catalítico j. **k_j**: constante de velocidad para el paso catalítico j a la temperatura de referencia T_0 . **E_j**: energía de activación para el paso catalítico j en kJ/mol. **V_i**: expresión de la velocidad de la reacción a la temperatura **T_i**: . **y**: función de velocidad de la reacción que contempla todas las temperaturas **T_i** en las que se estudia la reacción. **A_i**: parámetro definido por 0 y 1 que asegura la alternancia en la función de velocidad **y** para incluir la contribución de cada curva **V_i**.

sus correspondientes valores de $v(t)$, a cada temperatura ensayada. Así, la ecuación (4.17) se vería transformada en la ecuación de ajuste (4.18):

$$\frac{v(t)}{[E]_0} = \frac{\left(\frac{k_2 \cdot k_3 \cdot e^{-\frac{E_2 + E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}} \right) \cdot [S(t)]}{\left(\frac{k_{-1} \cdot e^{-\frac{E_{-1}}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_1 \cdot e^{-\frac{E_1}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}} \cdot \frac{k_3 \cdot e^{-\frac{E_{-3}}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}}{k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)} + k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{T} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}} \right) + [S(t)]} \quad (4.18)$$

El ajuste de parámetros que se propone implica un ajuste simultáneo de todas las curvas $v(t)$ vs $[S(t)]$, que comparten los valores de las constantes de velocidad microscópicas k_i y las energías de activación E_i . Para lograr esto, hemos utilizado el programa Origin 7.0 de Microcal. En la Figura 4.2, se muestra el script diseñado para que en la ecuación de ajuste



(a) La serie de parámetros compartidos por todas las curvas son las constantes k_i y las energías de activación E_i

(b) Resultados del ajuste global de todas las curvas. El error del ajuste es aceptable.

Figura 4.3: Determinación de las constantes individuales de velocidad y las energías de activación por el método del ajuste global simultáneo para el sistema *Tripsina-LAEE*.

sean considerados los datos de las diferentes gráficas a cada temperatura T_i en la misma ecuación. Para un conjunto de experimentos que conste de 8 temperaturas diferentes, en Origin 7.0 se deben marcar como *shared* (compartidos, ver Figura 4.3a), los parámetros que son iguales para las ocho curvas, esto es, las constantes de velocidad microscópicas k_j y las energías de activación E_j . Como se trata de 8 temperaturas diferentes, las expresiones V_i también serán ocho. La formación de la función global y se realiza fijando los valores 0 y 1 al parámetro A_i en la sección de parámetros iniciales (ver Figura 4.3b) como se muestra a continuación:

Una vez hecho esto, se puede comenzar el ajuste global en el programa y, después de

T (°C)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
5	1	0	0	0	0	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0	0	0
15	0	0	1	0	0	0	0	0
20	0	0	0	1	0	0	0	0
25	0	0	0	0	1	0	0	0
30	0	0	0	0	0	1	0	0
35	0	0	0	0	0	0	1	0
40	0	0	0	0	0	0	0	1

alrededor de 600 iteraciones, los parámetros buscados serán proporcionados. La asignación de 0 y 1 asegura que los datos experimentales serán ajustados con su correspondiente temperatura aunque todas las curvas compartan algunos parámetros.

4.3. Ajuste global de 6 parámetros

En algunas ocasiones, el modelo cinético de ocho parámetros no resulta efectivo y no es posible obtener valores confiables de los parámetros, principalmente con sustratos en donde las gráficas de Arrhenius de k_{cat} y de k_A (eficiencia catalítica) no muestran cambios en la pendiente. El resultado es que no hay convergencia en los valores ajustados y los parámetros obtenidos tienen incertidumbres grandes y dependen de los valores iniciales semilla de los parámetros en el ajuste. Aún siendo poco confiables, los parámetros *sí* indican que, de ajuste a ajuste, *i*) los valores de k_{-1} y k_2 difieren pero siempre $k_{-1} \gg \gg k_2$ (nótese que este resultado es el opuesto a la primera suposición de Di Cera); *ii*) los valores de E_{-1} y E_1 varían, sin embargo, ΔE_1 es constante y *iii*) aunque los valores de k_{-1} y k_1 también varían, el cociente $\frac{k_{-1}}{k_1}$ también es constante. En otras palabras, el ajuste global indica relaciones claras

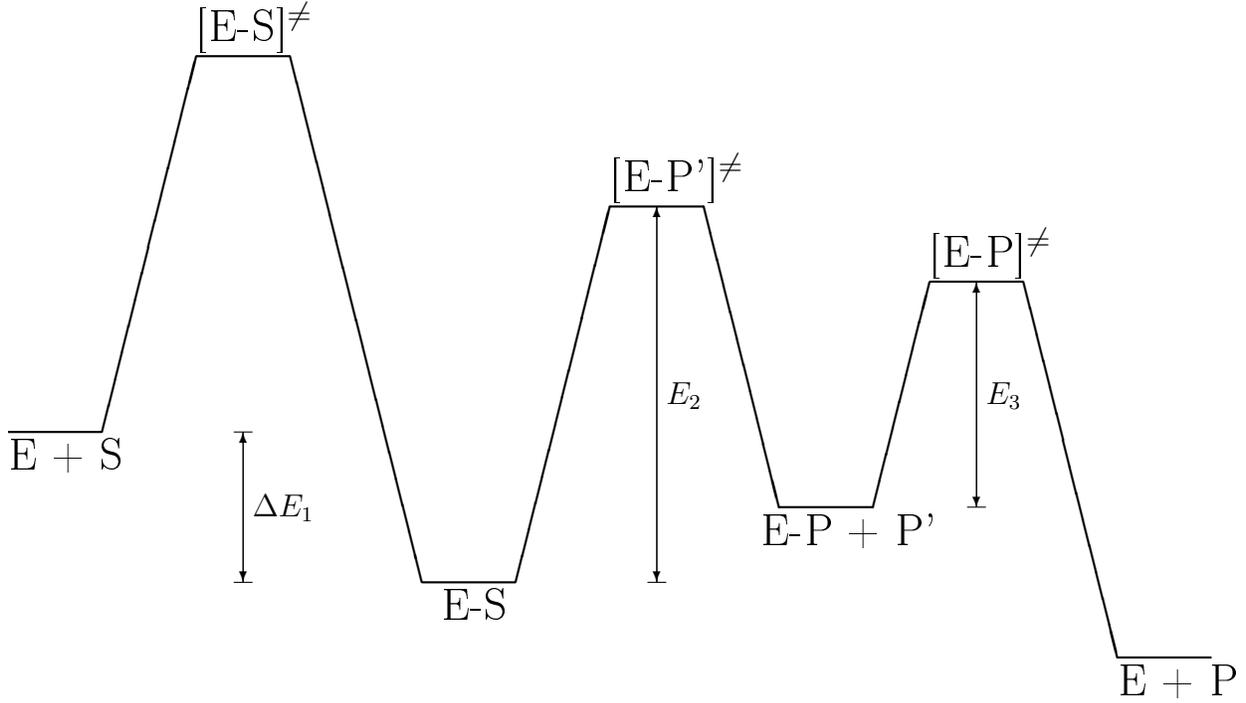


Figura 4.4: Diagrama energético del mecanismo de catálisis de las serina proteasas (ver Figura 1.6). El parámetro energético ΔE_1 se obtiene de la diferencia entre las energías de activación del primer paso de catálisis: $\Delta E_1 = E_{-1} - E_1$.

entre algunos de los ocho parámetros (ver sección 5.5). Tomando en cuenta este resultado, la expresión de la constante de Michaelis-Menten como función de las constantes microscópicas de velocidad puede transformarse de la siguiente manera:

Primero se toma la expresión de Michaelis-Menten y se multiplica y divide por k_{-1} :

$$K_M = \left(\frac{k_{-1}}{k_1} \right) \cdot \left(\frac{k_3}{k_2 + k_3} \right) \cdot \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_{-1}} \right) \quad (4.19)$$

Si se define que $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$, entonces

$$K_M = \left(\frac{K_d \cdot k_3}{k_2 + k_3} \right) \cdot \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_{-1}} \right) \quad (4.20)$$

Si $k_{-1} \gg \gg k_2$

$$K_M = K_d \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad (4.21)$$

K_d también puede expresarse en función de los parámetros de Arrhenius, entonces

$$K_d = \frac{k_{-1} \cdot e^{-\frac{E_{-1}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)}}{k_1 \cdot e^{-\frac{E_1}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)}} \quad (4.22)$$

$$K_d(T) = K_d \cdot e^{-\frac{\Delta E_1}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)} \quad (4.23)$$

en donde $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$ y $\Delta E_1 = E_{-1} - E_1$ (ver esquema en la figura 4.4)

Finalmente, la expresión de Michaelis, con esta aproximación y en función de los parámetros de Arrhenius, tomaría la forma:

$$\frac{v(t)}{[E]_0} = \frac{\left(\frac{k_2 \cdot k_3 \cdot e^{-\frac{E_2 + E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)}}{k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)} + k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)}} \right) \cdot [S(t)]}{\left(\frac{K_d \cdot k_3 \cdot e^{-\frac{\Delta E_1 + E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)}}{k_2 \cdot e^{-\frac{E_2}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)} + k_3 \cdot e^{-\frac{E_3}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)}} \right) + [S(t)]} \quad (4.24)$$

cuya forma simplificada es:

$$\frac{v(t)}{[E]_0} = \frac{k_{cat} \cdot [S(t)]}{K_d \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3} + [S(t)]} \quad (4.25)$$

Con esta nueva ecuación de ajuste reducimos de 8 parámetros ajustables a solamente 6. El precio a pagar por este ajuste es que ya no es posible conocer las constantes individuales y las energías de activación de la formación y disociación del complejo E-S, sino solamente la constante de disociación K_d y la diferencia de energía ΔE . Sin embargo, este método nos ha permitido caracterizar los parámetros de Arrhenius para los sistemas formados por

la tripsina y los sustratos de la Figura 3.1. El script utilizado es muy similar al mostrado en la Figura 4.2, con la salvedad de que en lugar de considerar a k_1 , k_{-1} y sus energías de activación, sólo se consideró K_d y ΔE_1 .

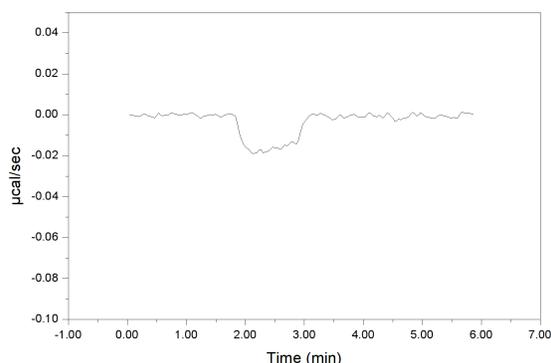
5

Resultados y Discusión

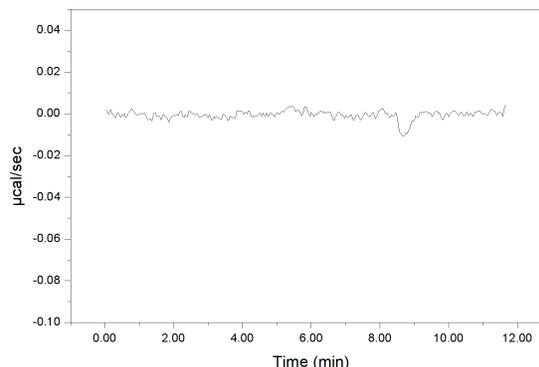
5.1. Contribuciones a la traza calorimétrica

En la Figura 1.4 de la sección de *Antecedentes* se mostró un experimento de cinética enzimática seguido por ITC. La traza calorimétrica que se obtiene es en realidad la suma de diferentes procesos que contribuyen a la señal detectada al titular el sustrato (en la jeringa) sobre la enzima (en la celda). Estos procesos son: *i*) dilución de la enzima, *ii*) dilución del sustrato y *iii*) catálisis enzimática. El calor debido a la unión del sustrato con los aminoácidos de la tripsina que lo reconocen debe ser aproximadamente igual al debido a la separación del producto una vez ocurrida la reacción.

Debido a que la energía involucrada en la ruptura de un enlace C-O oscila entre los ~ 357 kJ/mol (para un enlace sencillo C-O) y ~ 800 kJ/mol (para un enlace doble C=O) [Huheey et al., 2003], se espera que las contribuciones debidas a las diluciones no representen un porcentaje significativo en la señal registrada durante la hidrólisis de los sustratos de la Figura 3.1. Para comprobar esto en los sistemas bajo estudio, hemos realizado una serie de experimentos de control.



(a) Dilución de la disolución amortiguadora en la disolución amortiguadora



(b) Dilución de la disolución amortiguadora en la disolución de tripsina

Figura 5.1: Determinación de las contribuciones del calor de dilución del amortiguador y de la tripsina a la traza calorimétrica en un experimento de cinética enzimática.

En la Figura 5.1 se muestran las contribuciones de a) realizar una inyección de 40 μL de la disolución amortiguadora de Tris/HCl/CaCl₂ sobre la misma disolución amortiguadora (1.4196 mL en la celda) y b) realizar la misma inyección sobre una disolución 50 nM de tripsina. El primer experimento reveló que la inyección del amortiguador conlleva una entalpía de -9.71 J, muy similar a lo que se obtiene de titular el mismo volumen de agua sobre agua, un calor de -8.79 J. Esto no es sorprendente porque se trata de titular un medio sobre sí mismo y los efectos observados son debidos a la acción mecánica de la inyección. El segundo experimento, en donde se diluye la enzima, el proceso tiene un calor de dilución de -10.04 J.

Para obtener los valores del calor de dilución de los sustratos utilizados en este trabajo, en la Figura 5.2 se muestran las diluciones de cada compuesto de la Figura 3.1. Para el caso especial de ZLysONp, el cual presentó baja solubilidad en el amortiguador de fosfatos en el que se realizaron estos estudios, el experimento se desarrolló inyectando una disolución de tripsina 3.5 μM sobre una disolución de ZLysONp, la contribución por dilución de la tripsina fue de -54.40 $\mu\text{J}/\text{mol}$. Los demás compuestos se estudiaron titulando 40 μL de sustrato en

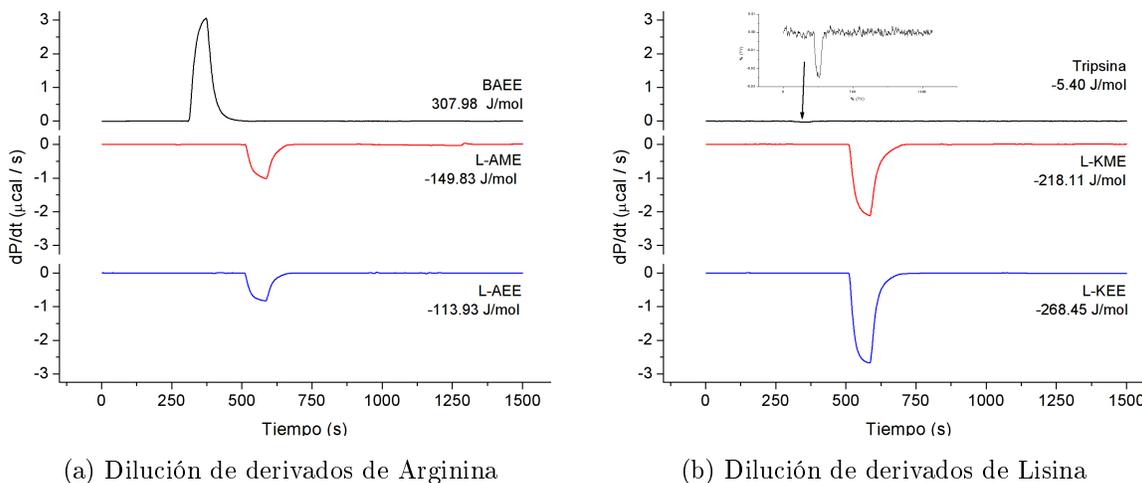
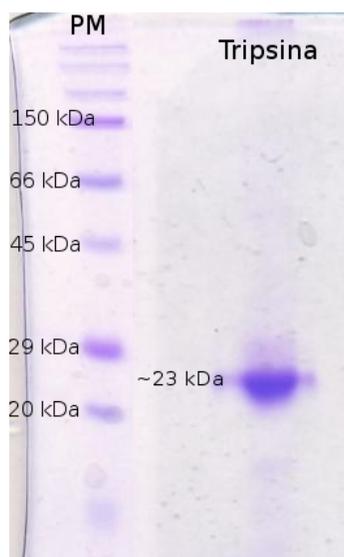


Figura 5.2: Determinación del calor de dilución de los sustratos caracterizados cinéticamente por completo. En el experimento correspondiente a la hidrólisis de ZLysONp se obtuvo el calor de dilución la tripsina sobre el amortiguador Tris/HCl/CaCl₂. En los restantes la concentración del sustrato final en la celda fue 2 mM.

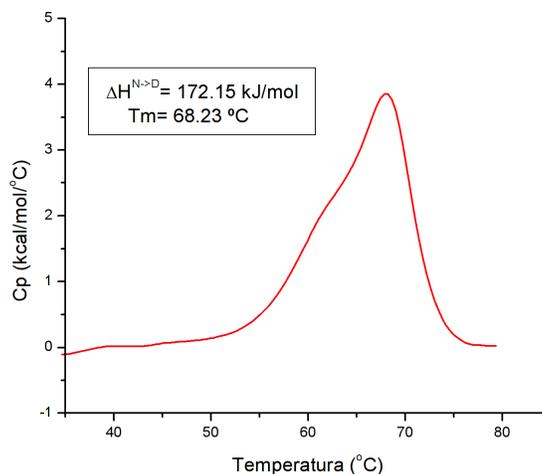
una concentración 70 mM sobre el amortiguador en la celda, bajo las mismas condiciones en las que se siguió la reacción catalítica. Como puede observarse, en la mayoría de los casos la contribución por dilución se encuentra en el intervalo de -104.6 J/mol a -271.96 J/mol. Para BAEE, el calor de dilución es endotérmico: 313.8 J/mol. En ningún caso se exceden los 400 J/mol, valores que, como se verá más adelante, no van más allá del 1.5 % del calor liberado en el transcurso de la reacción catalítica.

5.2. Calidad de la tripsina

Antes de comenzar los experimentos que la cinética enzimática utilizando la Calorimetría de Titulación Isotérmica, primero comprobamos la calidad de la enzima que utilizamos. El ensayo de actividad enzimática descrito en la sección de *Materiales y Métodos* mostró que



(a) Electroforesis SDS-PAGE



(b) Desnaturalización por calor estudiada por DSC

Figura 5.3: Evaluación de la calidad de la tripsina utilizada en este trabajo por electroforesis SDS-PAGE y DSC.

la pureza de la tripsina de Sigma es del 93 %. A través de una electroforesis SDS-PAGE (ver Figura 5.3, gel al 15% de acrilamida, teñido con azul de Coomasie) observamos una sola banda cercana a los 23 kDa, indicios de que no se encuentra presente alguna otra proteína de peso molecular diferente (la tripsina es una proteína monomérica de peso molecular 23.3 kDa).

Ante la posibilidad de que la α -quimotripsina se encuentre presente como contaminante enmascarado en el gel de electroforesis (el peso molecular de la unidad monomérica es de ~ 23 kDa), se realizó un ensayo de actividad catalítica colocando como sustrato un derivado de fenilalanina, L-BTEE (L-benzoil-tirosina-etil-éster), que es sustrato informado de la α -quimotripsina cuya cinética se ha caracterizado ampliamente [Wirnt, 1974], y no se encontraron señales de actividad catalítica por ITC. Este experimento se muestra en la Figura 5.4.

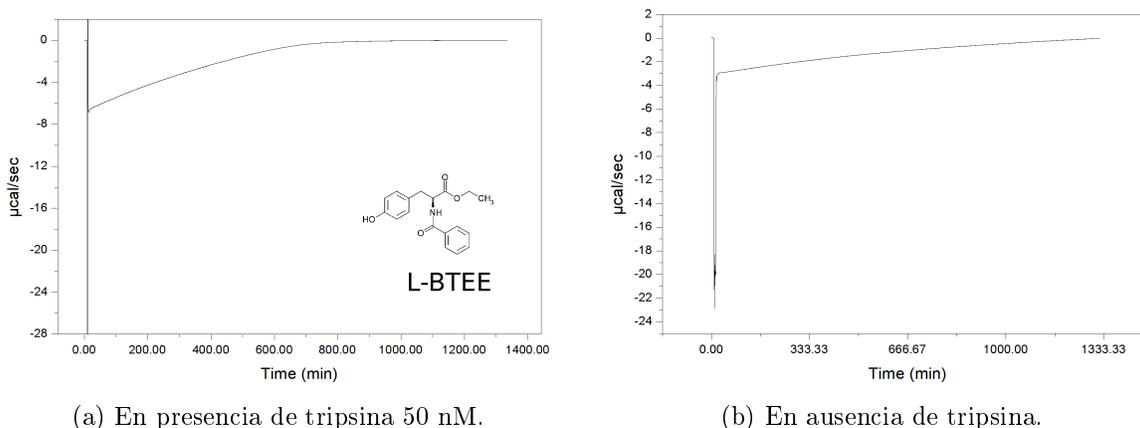


Figura 5.4: Hidrólisis de L-BTEE seguida por ITC.

En ambos casos, se hizo una inyección de 40 μL de una disolución de L-BTEE 350 mM sobre tripsina 1 μM en amortiguador de Tris-HCl/CaCl₂/PEG en la Figura 5.4a o sobre el amortiguador en la Figura 5.4b. Las concentraciones utilizadas en este experimento en particular son más altas comparadas con los otros sustratos ante la posibilidad de que la actividad catalítica que se presente se caracterice por constantes catalíticas muy pequeñas (k_{cat}). La señal fue detectada por 22 horas. Aunque en el experimento de la Figura 5.4a pareciera que se detecta catálisis, en el experimento de la Figura 5.4b se ve que la contribución principal a esta señal es debida mayoritariamente por la autohidrólisis del sustrato. Esto nos lleva a concluir que no tenemos una cantidad representativa de α -quimotripsina como contaminante.

Uno de los factores que limita el intervalo de temperaturas en el cual pueden realizarse los experimentos mostrados en este trabajo, es el comportamiento de la tripsina con el aumento de la temperatura. En la tripsina podemos hablar de dos procesos muy importantes: la desnaturalización de la tripsina por aumento de la temperatura y la autoproteólisis. Por un lado, se ha informado que la autoproteólisis representa contribuciones importantes, que afectan las propiedades catalíticas del sistema, por arriba de los 40 °C, [Di Cera, 2009]. Por otro lado, hemos realizado un experimento de calorimetría diferencial de barrido desde 10

°C hasta 80 °C (Figura 5.3). Por debajo de los 50 °C no se aprecia fenómeno alguno, sin embargo, después de esta temperatura, en el termograma se observan un pico asimétrico que tiene una T_m de 68.23 °C, que es parecido al reportado para la tripsina de porcino de 63.8 °C, [Thong Pham et al., 2007]. Cerca de los 60 °C se observa una señal que parece sobrelaparse con el pico principal. Una posible explicación a este comportamiento es que una porción menor de la población de tripsina ha sido parcialmente proteolizada y la señal cercana a 60 °C representa el desplegamiento de esta fracción, en tanto que el pico con T_m en 68.23 corresponde a la porción principal de la población de tripsina, que no ha sido proteolizada aún, y cuya entalpía de desnaturalización es de 172.15 kJ/mol. Se ha reportado que el desplegamiento de esta proteína no sigue un mecanismo de dos estados, [Otlewsky et al., 1996], sino un mecanismo más complicado no detallado aún, por lo cual no se ha intentado ajustar a algún modelo de desplegamiento en este momento. La conclusión inmediata y práctica para este proyecto es que el límite superior de temperatura para estudiar la cinética enzimática de estos sistemas es 45 °C, fijado por el proceso de autoproteólisis, mientras que la desnaturalización por calor no afecta de manera importante aún a esta temperatura. Sería muy interesante caracterizar más profundamente el desplegamiento de la tripsina; sin embargo, esto queda fuera de los alcances establecidos en este proyecto.

5.3. Ausencia de inhibición por producto

En las secciones anteriores se ha mencionado que para caracterizar cinéticamente el sistema formado por la tripsina y los sustratos empleados es necesario que no se presente el fenómeno de inhibición por producto. Para comprobar que no tenemos este fenómeno, se realizó un experimento en el que se determinan los parámetros de Michaelis-Menten de la hidrólisis de alguno de los sustratos y, una vez concluida la reacción, se realiza una segunda inyección del sustrato sobre la celda, que contiene tripsina y los productos de la reacción de

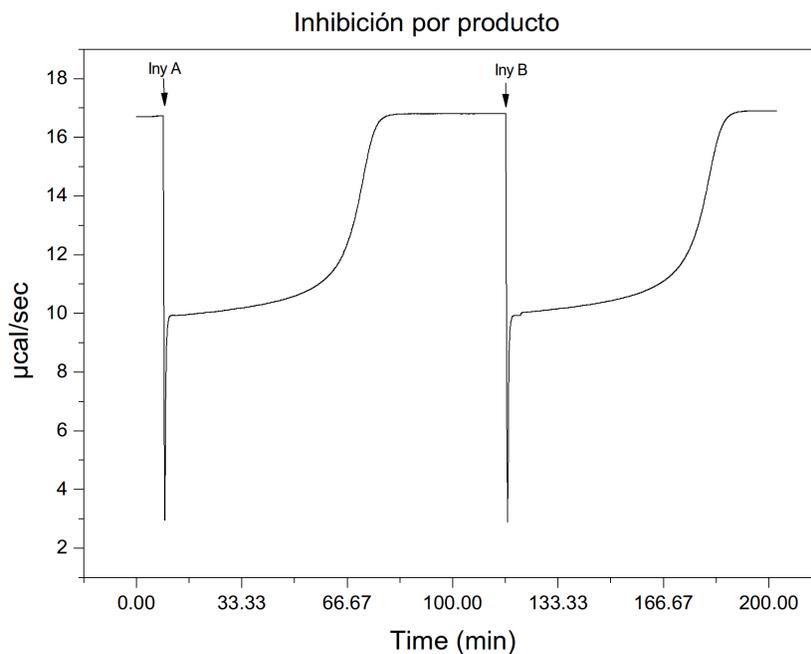


Figura 5.5: Hidrólisis de L-AME catalizada por la tripsina en presencia de L-Arg y MeOH. Parámetros cinéticos obtenidos en la **inyección A**: $k_{cat} = 4.62 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 66.3 \text{ } \mu\text{M}$, $\Delta H = -35.57 \text{ kJ/mol}$. Parámetros cinéticos obtenidos en la **inyección B**: $k_{cat} = 4.54 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 67.9 \text{ } \mu\text{M}$, $\Delta H = -36.35 \text{ kJ/mol}$.

la primera inyección, y se determinan nuevamente los parámetros de Michaelis. En la Figura 5.5 se muestra la hidrólisis de L-AME en condiciones normales (inyección A) y después de que la reacción de la primera inyección terminara (inyección B). Como puede observarse, las constantes de Michaelis-Menten son prácticamente iguales en ambos casos. Este tipo de experimentos se llevó a cabo con el resto de los sustratos y en ninguno de ellos se encontró que las constantes en presencia de los productos de reacción resultaran afectadas. Esto es una evidencia experimental clara de que, para los sistemas estudiados, no hay inhibición por producto.

5.4. Empleo de ITC como técnica para estudiar cinética enzimática

En la Figura 5.6 se muestran los resultados del estudio comparativo entre ITC y la espectroscopía UV para la hidrólisis de BAEE catalizada por tripsina, que es un sustrato que puede seguirse por ambas técnicas. En la Tabla 5.1 se resumen los valores obtenidos para cada técnica. Como puede observarse, los valores de las constantes de Michaelis-Menten son muy parecidos entre sí, con una ligera discrepancia a elevadas temperaturas (cerca de los 40 °C). Para el caso de la eficiencia catalítica k_A , las diferencias son mayores a temperaturas bajas (cerca de 15 °C) y altas (por arriba de los 40 °C). Esto nos indica que ITC es capaz de reproducir los resultados obtenidos por UV empleando cantidades menores de enzima, sustrato y tiempo (un experimento de cinética enzimática por ITC toma alrededor de 2 horas).

Temperatura ° C	UV-Visible			ITC		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_A (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_A (M ⁻¹ s ⁻¹)
15	6.51	1.67	3.89×10^6	7.80	4.40	1.77×10^6
20	9.23	3.63	2.54×10^6	10.40	6.44	1.61×10^6
25	15.16	6.00	2.53×10^6	17.70	6.63	2.67×10^6
30	18.32	6.46	2.83×10^6	25.60	9.10	2.81×10^6
35	27.66	10.27	2.69×10^6	33.50	9.50	3.53×10^6
37	29.49	10.82	2.73×10^6	36.60	13.20	2.77×10^6
40	37.66	21.47	1.75×10^6	48.40	15.20	3.18×10^6
45	35.40	24.08	1.47×10^6	48.30	16.00	3.02×10^6

Tabla 5.1: Constantes de Michaelis-Menten obtenidas para la hidrólisis de L-BAEE. Experimentos seguidos por UV-Visible e ITC.

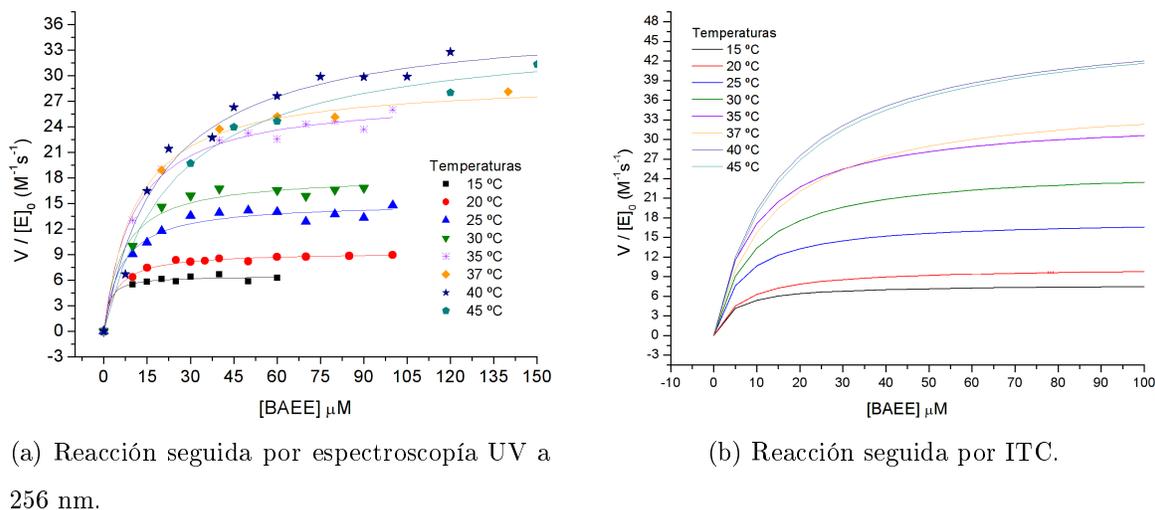


Figura 5.6: Comparación de la hidrólisis de BAE catalizada por tripsina seguida por espectroscopía UV y por ITC. Los parámetros de Michaelis-Menten se obtuvieron a diferentes temperaturas. Los resultados generados por ambas técnicas son estadísticamente iguales.

Las ligeras discrepancias entre los resultados obtenidos pueden tener las siguientes explicaciones: existen múltiples problemas cuando se sigue un experimento por espectroscopía. Utilizando el espectrofotómetro UV disponible en nuestro laboratorio resultó difícil mantener temperaturas bajas y altas, alrededor de los 10 °C y los 40 °C respectivamente, en el interior de la celda debido a la inherente manipulación de sustrato y tripsina fuera de los baños de agua durante el mezclado, de tal manera que, en muchos casos, la reacción se desarrolla aún cuando el equilibrio térmico no se ha alcanzado. Por otro lado, puede observarse en la Figura 5.6a que si la temperatura desciende por debajo de los 15 °C, los valores de K_m y k_{cat} son muy pequeños, es decir, la señal observada por espectroscopía UV es comparable con la incertidumbre del equipo y los valores de K_M se vuelven inaccesibles y poco confiables. Estos problemas no son limitantes para seguir la reacción por ITC. Un calorímetro de titulación isotérmica controla finamente la temperatura de la celda donde la reacción se lleva a cabo, por lo cual trabajar desde los 5 °C hasta los 45 °C no representa problema alguno. Respecto

a los valores de K_M , el calorímetro es capaz de detectar valores del orden de $1 \mu\text{M}$ hasta cerca de 1 mM , como se verá más adelante.

El sustrato ZLysONp (ver Figura 3.1d) fue seleccionado para realizar la comparación entre los resultados que se encuentran reportados por stopped-flow/UV-Visible [Ascenzi et al., 1982] y los obtenidos por ITC utilizando la ecuación de ajuste global (4.24). En la Tabla 5.5 se muestran los parámetros obtenidos en el ajuste. En primer lugar, debe recordarse que con este sustrato la estrategia experimental fue ligeramente diferente, esto es, la tripsina fue colocada en la jeringa y no en la celda de muestra, como se hizo con el resto de la serie de sustratos. Esta modificación no parece que haya afectado la calidad de los resultados obtenidos y muestra que también es posible estudiar sustratos muy poco solubles. Las constantes macroscópicas de Michaelis-Menten, k_{cat} y K_M , las cuales pueden obtenerse directamente sin la metodología de ajuste global, son estadísticamente iguales: $k_{\text{cat}}^{\text{ITC}} = 14.50 \text{ s}^{-1}$ y $K_M^{\text{ITC}} = 106.24 \mu\text{M}$, comparadas con $k_{\text{cat}}^{\text{Stop}} = 12.12 \text{ s}^{-1}$ y $K_M^{\text{Stop}} = 92.00 \mu\text{M}$. Las constantes microscópicas de velocidad, obtenidas por ajuste global por ITC y directamente por Stopped-Flow/UV [Ascenzi et al., 1982], también son muy similares, lo cual lleva a la conclusión de que ITC permite obtener datos de la misma calidad que Stopped flow. Así, en este trabajo ha sido posible demostrar que pueden obtenerse las energías de activación de cada paso de catálisis utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. En conjunto, los experimentos de BAEE y ZLysONp demuestran los grandes alcances que tiene la calorimetría de titulación isotérmica en el estudio de reacciones enzimáticas.

Llevando más lejos los resultados obtenidos, podemos utilizar el método de ajuste global de 6 parámetros para determinar las constantes individuales de velocidad y las energías de activación para cada paso de catálisis. En la Tabla 5.4 se muestran estos valores, que se discutirán detalladamente en las subsecciones posteriores. Si intentáramos hacer esto a partir de los datos generados por UV-Visible, nos encontraríamos con el problema insuperable de

que la cantidad de datos experimentales (aproximadamente 10 de ellos) es insuficiente para aplicar el método de ajuste global. En contraste, usando ITC, las “curvas continuas” que se observan son, en realidad, un conjunto de cientos de puntos experimentales. Por otro lado, si aplicamos el método de Di Cera para intentar determinar las constantes de velocidad, ver Figura 5.7a, no hay un cambio apreciable en las pendientes de las gráficas de Arrhenius para k_{cat} y k_A que nos permita plantear los sistemas de ecuaciones necesarios, además de que sería necesario recurrir a la suposición de que, para los sustratos de tipo éster, el paso limitante de la catálisis es la liberación del producto (k_3).

5.5. Sustratos promiscuos

Se estudió la cinética enzimática de la tripsina con todos los reactivos ciegos a las espectroscopías UV y de fluorescencia que se muestran en la Figura 3.1 por ITC. Los resultados fueron tratados de dos formas: 1) la propuesta de Di Cera de utilizar gráficas de Arrhenius de la k_{cat} y k_A para buscar regiones en donde se observen cambios en las pendientes para determinar las constantes de velocidad individuales y 2) la metodología de ajuste de 6 y 8 parámetros descrita en la sección de *Tratamiento de datos*.

5.5.1. Resultados con el método de Di Cera

Cuando a los datos se les da el tratamiento de Di Cera, Figura 5.7, se observa que para ninguno de los sustratos hay cambios significativos en las pendientes en las gráficas de k_{cat} y de k_A , al contrario, las tendencias muestran que en todos los casos se trata de comportamientos lineales. Si recordamos que, según Di Cera, un comportamiento lineal en estas gráficas refleja que alguno de los pasos de la reacción limita la velocidad de la misma y, para el caso de los ésteres, se acepta que el paso limitante es la desacilación o liberación del producto [Hedstrom 2002], debiera cumplirse en todos los casos que los valores de k_{cat} sean iguales o muy parecidos a los de k_3 (ver ecuación (4.1)). Por otro lado, los gráficos de la

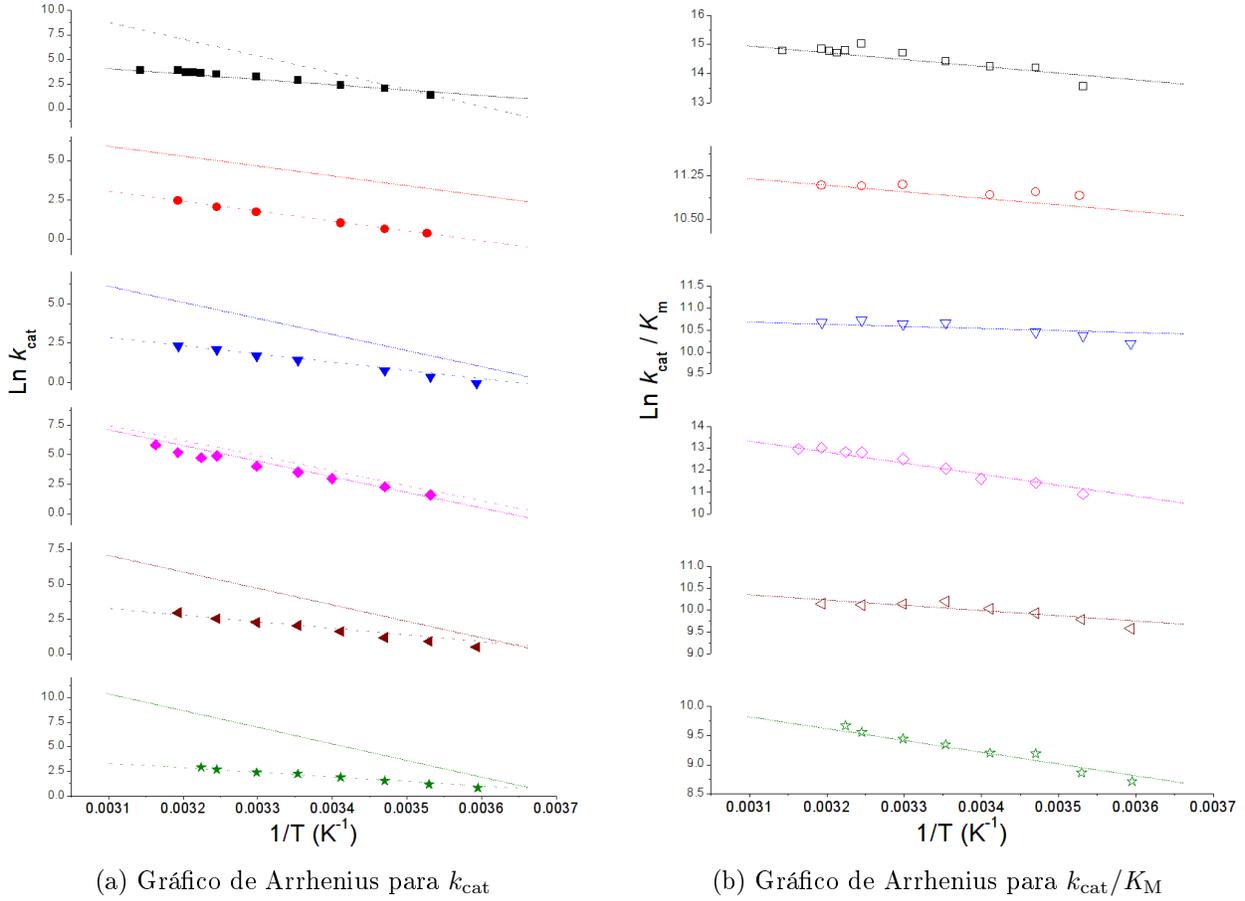


Figura 5.7: Método de Di Cera para la determinación de las constantes individuales de velocidad. Los resultados experimentales no son apropiados para aplicar este método para obtener los parámetros de Arrhenius de cada paso de catálisis. ■/□: BAEE. ●/○: L-AME. ▼/▽: L-AEE. ◆/◇: ZLysONp. ◀/◁: L-KME. ★/☆: L-KEE. Las rectas adicionales fueron colocadas utilizando los resultados obtenidos en el ajuste global de 6 parámetros.

eficiencia catalítica tampoco muestran cambios de pendiente. Se puede tomar como hipótesis inicial que no observamos cambios en la pendiente, en el intervalo de temperatura en el que se estudia, porque el proceso de ruptura del complejo E-S aún no es de una magnitud lo suficientemente grande como para competir contra el paso de acilación del sustrato. Dicho en otras palabras, la situación, matemáticamente hablando, sería muy parecida a la aproxi-

Sustrato	k_3 (s ⁻¹)	E_3 (kJ/mol)	k_1 (s ⁻¹)	E_1 (kJ/mol)
L-BAEE	15.57	54.48	1.77×10^6	24.92
L-AME	4.28	54.08	6.06×10^4	4.93
L-AEE	4.08	49.25	3.90×10^4	10.74
ZLysONp	20.37	91.30	1.29×10^5	49.59
L-KME	6.97	50.47	2.29×10^4	11.35
L-KEE	8.75	45.11	1.14×10^4	19.93

Tabla 5.2: Parámetros de Arrhenius de la formación del complejo E-S y la desacilación del producto obtenidos por el método de Di Cera.

mación de temperaturas bajas, con pendiente negativa, en el que $k_A \approx k_1$. Si esta idea es también cierta, este método únicamente sería capaz de proporcionarnos valores para el paso de formación del complejo E-S y para la liberación del producto, dejando el resto del proceso en la incertidumbre.

En la Tabla 5.2 se muestran los valores de las constantes que el método de Di Cera es capaz de proporcionar. Aunque es un logro importante generar estos valores, este método se limita a describir sólo parcialmente el sistema de estudio. De las pocas conclusiones que pueden obtenerse en este punto, es de interés hacer notar que, para los sustratos que no han sido modificados químicamente añadiendo algún cromóforo o fluoróforo (como ocurrió con BAEE y ZLysONp), los valores de k_3 y las energías de activación E_3 son muy similares entre ellos, por ejemplo, L-AME y L-AEE (4.28 s^{-1} y 4.08 s^{-1} , respectivamente para k_3). Este comportamiento no es extraño si se piensa que en el paso de desacilación la especie E-P es la misma y, por tanto, no se espera que las características catalíticas varíen demasiado, al menos en este paso, entre derivados del mismo aminoácido. Algo similar ocurre con L-KME y L-KEE. Sin embargo, para BAEE y ZLysONp las constantes son ligeramente diferentes entre ellas. En este punto aún es prematuro intentar dar alguna explicación a este fenómeno, pero

Parámetro	A partir de valores iniciales 1		A partir de valores iniciales 2	
k_1 (mM)	4.66×10^8	$\pm 5.44 \times 10^9$	2.26×10^9	$\pm 8.21 \times 10^9$
k_{-1} (mM)	6.55×10^3	$\pm 2.16 \times 10^5$	3.21×10^4	$\pm 9.61 \times 10^5$
k_2 (s^{-1})	27.99	± 1259.16	30.41	± 996.54
k_3 (s^{-1})	31.18	± 1666.10	35.68	± 1390.74
E_1 ($\frac{kJ}{mol}$)	284.87	± 62.00	414.81	± 73.76
E_{-1} ($\frac{kJ}{mol}$)	330.21	± 64.10	460.64	± 84.47
E_2 ($\frac{kJ}{mol}$)	55.48	± 63.93	58.24	± 48.15
E_3 ($\frac{kJ}{mol}$)	37.79	± 875.35	51.12	± 315.28
$\frac{k_{-1}}{k_1}$ (M)	1.405×10^{-5}		1.425×10^{-5}	
ΔE_1 (kJ/mol)	45.34		45.83	

Tabla 5.3: Constantes obtenidas tras aplicar el ajuste global simultáneo de 8 parámetros sobre los resultados de ZLysONp, usando valores iniciales diferentes.

por el momento es una divergencia que no debe perderse de vista. Las constantes de formación del complejo E-S van desde 1×10^4 hasta 1×10^6 $M^{-1}s^{-1}$. Nuevamente, los valores son parecidos entre los derivados de aminoácidos no modificados químicamente, pero ZLysONp y BAEE tienen constantes de formación mayores por uno o dos órdenes de magnitud con respecto a los sustratos de lisina o arginina, respectivamente. Debido a que se desconocen las constantes de la ruptura de este complejo, la termodinámica del proceso no puede describirse completamente. Este método ha logrado caracterizar parcialmente nuestros sistemas. No es posible calcular las demás constantes y parámetros de activación debido a que los valores de k_2 no son accesibles a partir de las pendientes obtenidas.

5.5.2. Resultados con el ajuste propuesto en este trabajo

Se aplicó el método del ajuste global de 8 parámetros sobre los datos obtenidos. Los parámetros que obtuvimos tienen errores asociados de varios órdenes de magnitud por arriba de los parámetros que intentaban ser ajustados (ver Tabla 5.3) y los valores finales dependían de cuáles eran los valores semilla antes de comenzar las iteraciones del ajuste. No obstante, estos intentos de ajuste revelaron dos puntos interesantes: (i) en todos los casos se observó que los valores de k_{-1} fueron mucho más grandes que k_2 , (este resultado es contrario a la primera suposición de Di Cera) y (ii) a pesar de que los valores finales resultaron muy distintos dependiendo de los valores iniciales, en todos los casos se observó que la relación $\frac{k_{-1}}{k_1}$ y la diferencia $E_{-1} - E_1$ era muy similar no importando cuál fuera el punto de partida para comenzar las iteraciones. Estos resultados nos llevaron a proponer que sería posible ajustar los valores si reducimos los parámetros ajustables de 8 a sólo 6, reemplazando a k_{-1} y k_1 por K_d y a E_{-1} y E_1 por $\Delta E_1 = E_{-1} - E_1$, como se discutió en la sección 4.3. Dados estos resultados, los datos de ITC para la hidrólisis catalizada de los ésteres se trataron con esta metodología de ajuste.

Se estudió la cinética enzimática mediante ITC de los sustratos promiscuos ciegos para las espectroscopías mostrados en la Figura 3.1 y los resultados se presentan en las Tablas 5.4 y 5.5 y en la Figura 5.8. Un análisis global breve de los resultados se presenta a continuación:

5.5.2.1. Disociación del complejo Enzima-Sustrato

Analizando con detalle los valores de las constantes de disociación del complejo E-S en las Tablas 5.4 y 5.5 y de ΔE_1 en la Figura 5.9, se notan dos tendencias muy claras. En primer lugar, los valores de ΔE_1 son mayores para los derivados de lisina que para los de arginina, lo cual indica que el el complejo E-S es más favorable para los derivados de lisina

Parámetro	BAEE			L-AME			L-AEE		
	UV Visible	ITC		ITC		ITC			
K_d (μM)	-	8.52	\pm 0.46	1370	\pm 510	870	\pm 160		
k_2 (s^{-1})	-	14.69	\pm 0.28	75.41	\pm 27.92	33.66	\pm 6.12		
k_3 (s^{-1})	-	84.51	\pm 10.74	4.33	\pm 0.08	4.64	\pm 0.11		
ΔE_1 ($\frac{kJ}{mol}$)	-	25.98	\pm 2.45	42.67	\pm 17.54	80.79	\pm 3.16		
E_2 ($\frac{kJ}{mol}$)	-	45.26	\pm 0.63	51.99	\pm 17.62	84.75	\pm 3.02		
E_3 ($\frac{kJ}{mol}$)	-	141.78	\pm 6.46	52.51	\pm 0.98	43.39	\pm 0.66		
k_{cat} (s^{-1})	15.20	12.51	\pm 0.27	4.09	\pm 0.08	4.08	\pm 0.11		
K_m (μM)	6.00	7.26	\pm 0.45	74.32	\pm 1.53	105.40	\pm 2.83		
$k_A/10^6$ ($M^{-1}s^{-1}$)	2.53	1.73	\pm 0.6	0.055	\pm 0.052	0.039	\pm 0.039		
ΔH_{dil} ($\frac{kJ}{mol}$)	-	0.31		-0.15		-0.11			
ΔH_{cat} ($\frac{kJ}{mol}$)	-	-42.68		-36.29		-42.22			
$\Delta H_{dil}/\Delta H_{cat}$	-	0.72%		0.41%		0.27%			

Tabla 5.4: Constantes de velocidad a 25 °C, energías de activación y calores de dilución obtenidos por ITC para sustratos promiscuos derivados de Arginina.

que los de arginina; sin embargo, las constantes de disociación también son mayores para los derivados de lisina. Esto tal vez indique que la barrera energética para la ruptura del complejo no sea muy elevada, razón por la cual las K_d 's sean ligeramente mayores. Para el caso de las argininas, puede observarse que el añadir un grupo benzoílo en el grupo amino disminuye radicalmente el valor de la K_d , lo cual posiblemente se debe a que se establecen interacciones adicionales entre este grupo y los residuos del sitio catalítico de la tripsina, que no se encuentran presentes en los otros dos derivados de arginina. Estas interacciones favorecen la formación del complejo E-S con BAEE en dos órdenes de magnitud en comparación con los otros dos sustratos. Un comportamiento análogo se ve en ZLysONp.

Parámetro	ZLysONp			L-KME			L-KEE		
	Stopped Flow*	ITC		ITC		ITC			
K_d (mM)	0.13	0.17	± 0.58	2.54	± 0.44	39.46	± 4.29		
k_2 (s^{-1})	16.00	23.20	± 76.78	58.78	± 9.83	435.15	± 45.15		
k_3 (s^{-1})	50.00	38.66	± 217.18	7.82	± 0.15	8.72	± 0.02		
ΔE_1 ($\frac{kJ}{mol}$)	-	67.97	± 56.80	88.27	± 3.82	123.36	± 2.76		
E_2 ($\frac{kJ}{mol}$)	-	109.91	± 50.29	98.20	± 3.63	140.12	± 2.73		
E_3 ($\frac{kJ}{mol}$)	-	106.24	± 59.18	39.51	± 0.88	38.22	± 0.28		
k_{cat} (s^{-1})	12.12	14.50	± 56.73	6.90	± 0.15	8.55	± 0.02		
K_m (μM)	92.00	106.24	± 428.51	298.32	± 6.60	774.90	± 1.97		
$k_A/10^6$ ($M^{-1}s^{-1}$)	0.13	0.14	± 0.13	0.023	± 0.023	0.011	± 0.010		
ΔH_{dil} ($\frac{kJ}{mol}$)	-	0.0013		-0.22		-0.27			
ΔH_{cat} ($\frac{kJ}{mol}$)	-	-3.99		-37.00		-29.21			
$\Delta H_{dil}/\Delta H_{cat}$	-	0.14 %		0.59 %		0.92 %			

Tabla 5.5: Constantes de velocidad a 21 °C (ZLysONp) y 25 °C (L-KME y L-KEE) y energías de activación obtenidos por ITC para sustratos promiscuos derivados de Lisina. * [Ascenzi et al., 1982].

Los valores de ΔE_1 y K_d son menores para ZLysONp que para los otros dos derivados de lisina. En ambos casos, para los sustratos sin cromóforos, la presencia de un grupo metileno adicional en el grupo saliente es el responsable del aumento de la K_d y de ΔE_1 , lo cual parece indicar que las interacciones entre los sitios S1' y P1' (ver Figura 1.7b) son importantes y modifican las características catalíticas de la reacción. La presencia de los cromóforos en los otros dos sustratos ha modificado sustancialmente el comportamiento catalítico de la enzima, dejando ver que estos grupos influyen en la cinética enzimática y que no es recomendable añadirlos sólo por querer estudiar la reacción por las espectroscopías tradicionales.

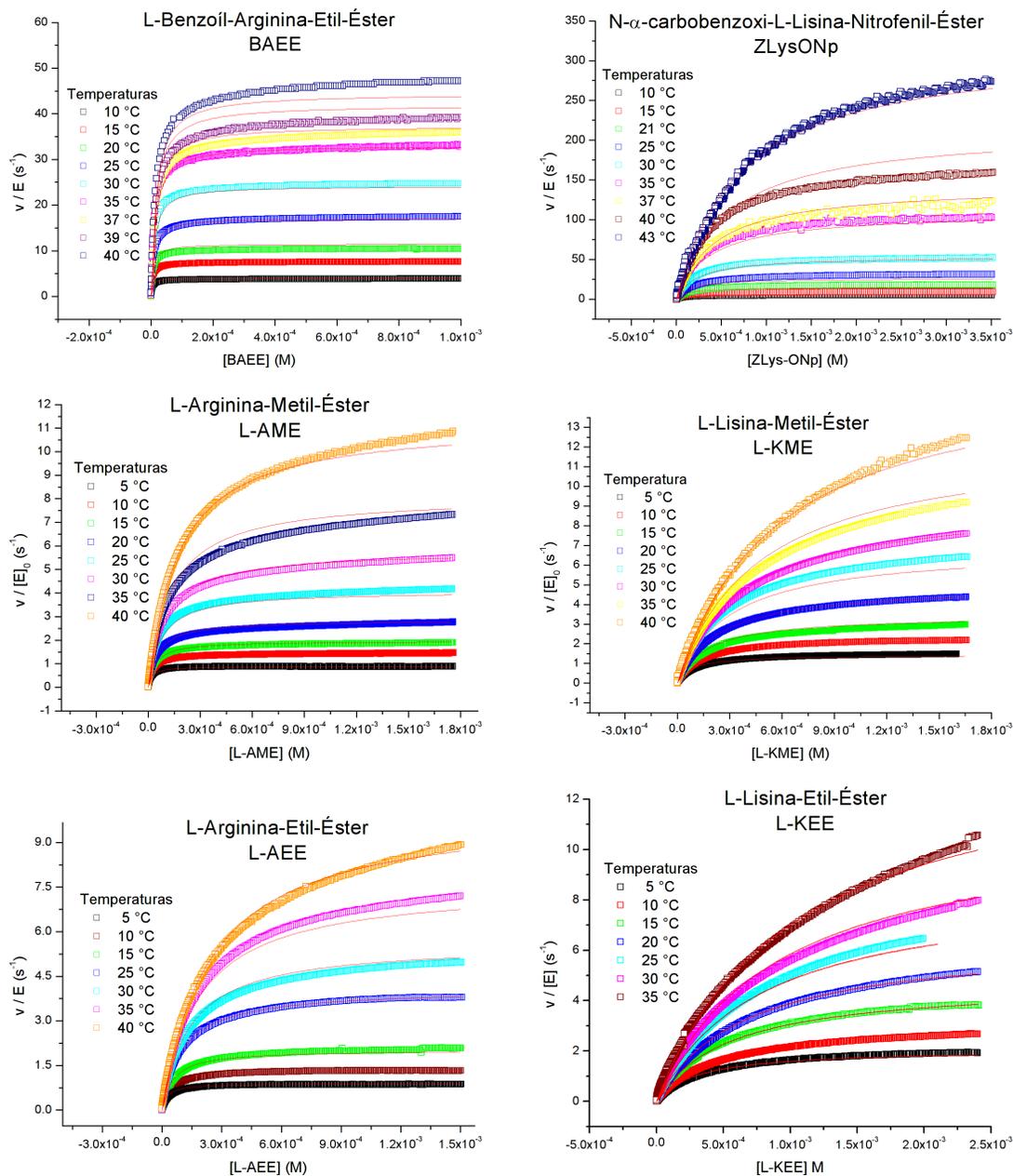


Figura 5.8: Ajuste global de los parámetros de Arrhenius para la hidrólisis catalizada por la β -tripsina de a) BAEE, b) ZLysONp, c) L-AME, d) L-KME, e) L-AEE y f) L-KEE. Los datos se muestran en las Tablas 5.4 y 5.5.

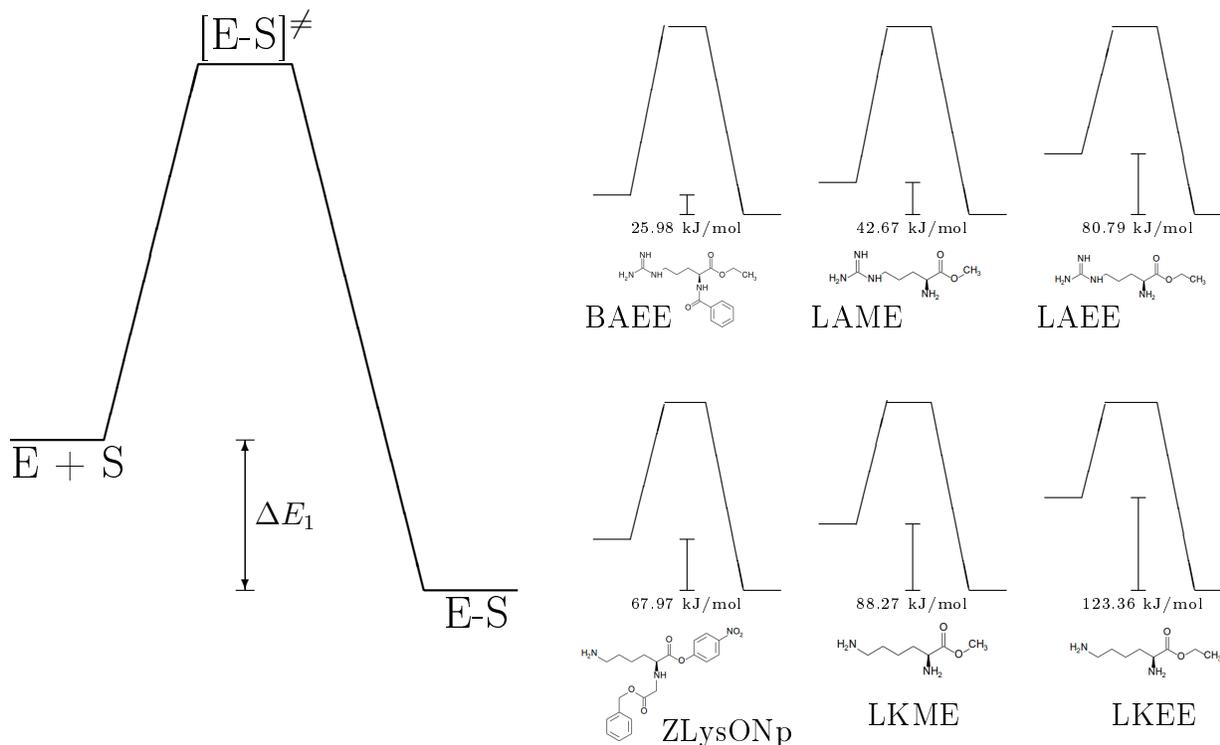


Figura 5.9: Representación esquemática de la energía de estabilización de la formación del complejo $E-S$ para los sustratos de la Figura 3.1

5.5.2.2. Acilación y desacilación

Los valores de k_2 , k_3 , E_2 y E_3 en las Tablas 5.4 y 5.5 muestran que, para el caso de los sustratos promiscuos derivados de arginina, la acilación del sustrato por Ser195 es más lenta con BAEE, probablemente por el impedimento estérico, a pesar de que es quien tiene la menor energía de activación, posiblemente producto de las interacciones que se establecieron con el grupo benzoilo. El efecto de un grupo metileno adicional que se presenta en LAEE es muy interesante. La acilación de LAME tiene un valor de la constante de velocidad del doble que la observada para LAEE y la energía de activación es 30 J/mol menor que para LAEE, consecuencia, al parecer, del grupo metileno. Finalmente, la desacilación es más rápida con BAEE, mientras que para LAEE y LAME tienen valores muy parecidos en sus constantes de

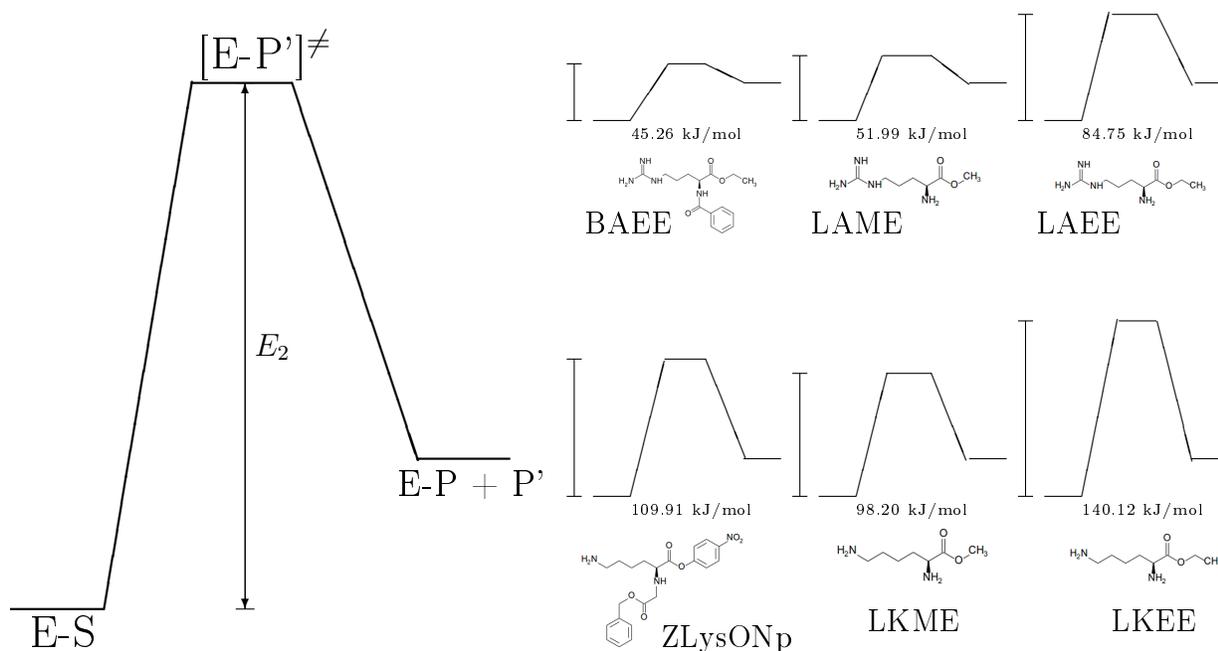


Figura 5.10: Representación esquemática de la energía de activación para la acilación, por el residuo Ser195 de la tripsina, de los sustratos mostrados en la Figura 3.1.

velocidad y energías de activación, que es de esperarse puesto que en este paso de catálisis el complejo E-P es el mismo.

Para el caso de los derivados de lisina, nuevamente se observa la tendencia vista con las argininas: el valor menor de K_d lo tiene ZLysONp y el mayor corresponde a L-KEE. Con ZLysONp, las interacciones adicionales que se establecen son debidas al grupo α -carboboizoxi en el grupo amino y al grupo ortonitrofenilo en el carboxilo, ausentes en LKME y LKEE. La acilación del sustrato es más lenta en ZLysONp probablemente por efectos estéricos, pero es sorprendente que este efecto no se presente en LKEE con respecto a LKME, por el contrario, la constante de acilación es casi 8 veces mayor en el caso de LKEE, aunque

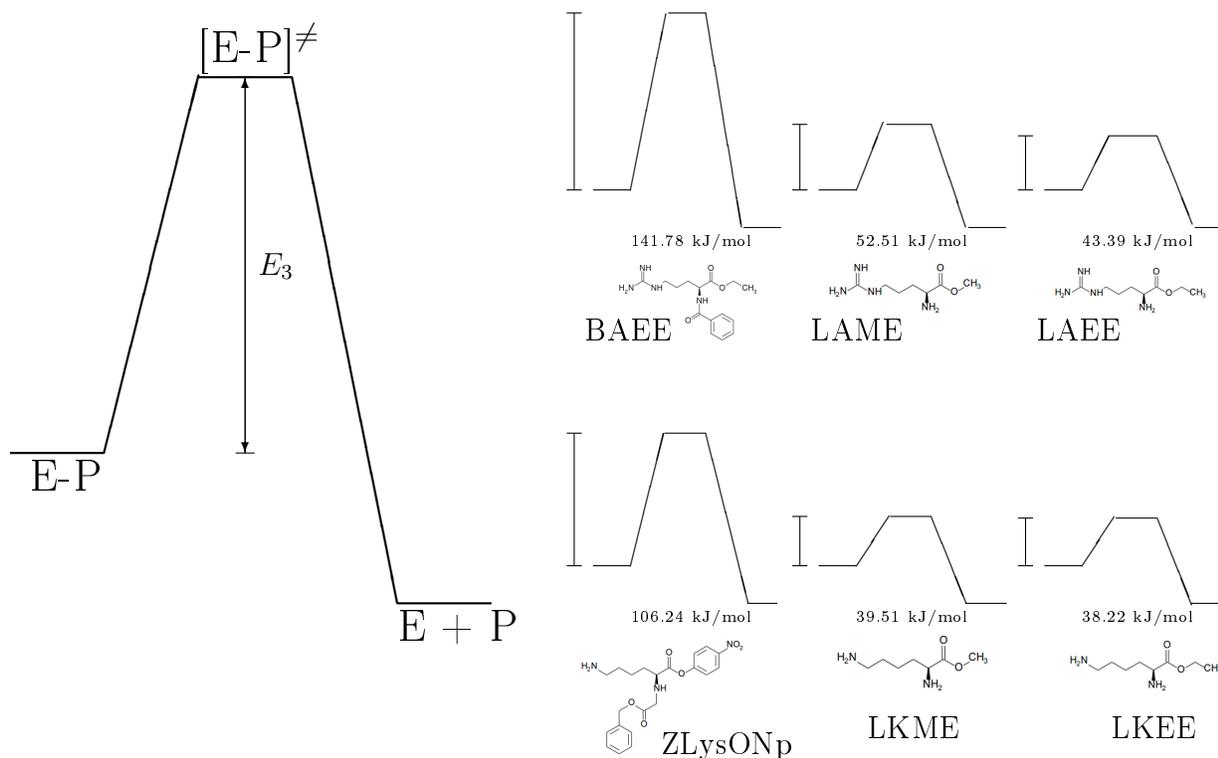


Figura 5.11: Representación esquemática de la energía de activación para la desacilación y liberación del producto de la hidrólisis.

es quien presenta la mayor energía de activación.

El paso de desacilación es más rápido para ZLysONp, mientras que LKME y LKEE tiene valores muy parecidos para k_3 y energías de activación muy similares. La explicación a este último comportamiento es debido nuevamente a que en este paso de catálisis el complejo E-P es el mismo para LKME y LKEE, como ocurrió con las argininas. Es interesante observar también que, aunque Hedström (2002) informa que el paso limitante cuando los sustratos ésteres es la desacilación, se observa que esto no ocurre con BAEE y ZLysONp.

5.6. Otros sustratos promiscuos

Adicionalmente a los sustratos en la Figura 3.1, se estudiaron otros cinco sustratos promiscuos mostrados en la Figura 5.12.. Se determinó el calor de dilución que se muestra en la Tabla 5.6. Los valores de D-AME y D-KME son muy parecidos a sus similares enantiómeros L. Los derivados truncados de lisina (L-OME, L-OEE y L-DAPM) tienen un calor de dilución mucho más elevado, lo cual puede deberse a la autohidrólisis de los sustratos.

Sustrato	$\Delta H_{dil} \left(\frac{J}{mol}\right)$
D-AME	-131.08
D-KME	-232.04
L-OME	-4826.41
L-OEE	-15069.30
L-DAPM	-2123.88

Tabla 5.6: Calor de dilución de otros sustratos estudiados.

Para los enantiómeros D-AME y D-KME por ITC fue posible caracterizar las constantes de Michaelis-Menten de estos sustratos a temperaturas menores de 25 °C. A temperaturas superiores la contribución por autohidrólisis es muy importante. Esto limitó el intervalo de temperatura de 5 °C a 25 °C, lo cual impidió que el ajuste global simultáneo resultara efectivo. Las contribuciones por autohidrólisis fueron más marcadas aquí debido a que, con la intención de detectar actividad catalítica, se utilizaron mayores concentraciones de enzima y sustrato con respecto a las reacciones de los correspondientes enantiómeros L. Aún así, es interesante el hecho de encontrar catálisis en este tipo de sustratos. Si bien los valores de K_M son superiores a 1.5 mM y los de k_{cat} no sobrepasan los 3 s⁻¹, estos resultados nos dicen que en el sitio catalítico existe una conformación que adoptan los residuos que permite el

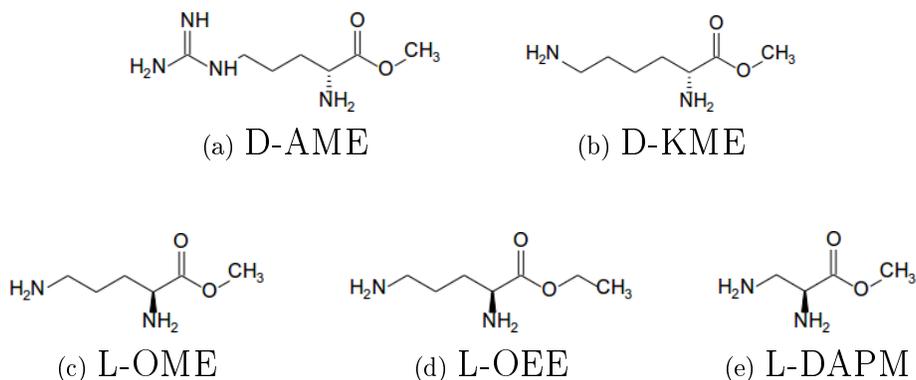


Figura 5.12: Otros sustratos utilizados para estudiar la promiscuidad catalítica de la tripsina. **L-Arg**: L-arginina. **D-Arg**: D-arginina. **D-AME**: D-arginina-metil-éster. **L-Lys**: L-lisina. **D-Lys**: D-lisina. **D-KME**: D-lisina-metil-éster. **L-OME**: L-ornitina-metil-éster. **L-OEE**: L-ornitina-etil-éster. **L-DAPM**: L-1,2-diaminopropanoato de metilo.

ataque nucleofílico por Ser195 para formar algún intermediario, posiblemente tetraédrico, lo cual permite que la catálisis exista. Debe notarse entonces que probablemente la estructura canónica del estado de transición no es tan rígida como se ha pensado, sino que los residuos adopten una conformación nueva. Por otro lado, se estudiaron los derivados truncados de lisina L-OME, L-OEE y L-DAPM (ver Figura 5.12). En estos sustratos no se observó catálisis, sino únicamente efectos de autohidrólisis. Las figuras correspondientes se encuentran en el *Apéndice*. Este resultado indica que la eliminación de un solo grupo metileno en la cadena que define a la lisina, imposibilita a la tripsina a efectuar su acción catalítica. Sería muy interesante realizar estudios más profundos al respecto que revelen, en primer lugar, si existe unión entre la tripsina y alguno de estos sustratos a través de experimentos clásicos de ITC y, en segundo lugar, modelar el sitio catalítico mediante algún software apropiado que nos proporcione indicios acerca de las interacciones que posiblemente estén dejando de formarse entre el sustrato y los residuos encargados del reconocimiento y discriminación. En caso de haber interacción E-S, posiblemente lo que ocurra es que las interacciones entre los sitios P1 y S1 no son de la calidad suficiente para que la catálisis continúe.

Existen evidencias de que la hidrólisis es posible con los enantiómeros D, pero no si se elimina un grupo metileno en los derivados de lisina. Desde este punto de vista, no se han generado los suficientes resultados como para concluir respecto a las interacciones perdidas en estos sistemas en particular; sin embargo, se abre una puerta interesante para explicar este comportamiento promiscuo con nuevos experimentos.

6

Conclusiones

1. La Calorimetría de Titulación Isotérmica es una técnica capaz de estudiar reacciones enzimáticas irreversibles en ausencia de cromóforos seguíbles espectroscópicamente.
2. Los resultados de BAEE muestran que por ITC se obtienen resultados estadísticamente iguales que por espectroscopía UV-Visible.
3. Los resultados de ZLysONp demuestran que la metodología de ajuste global simultáneo de 6 parámetros es válida en la determinación de las constantes microscópicas de velocidad y las energías de activación de este proceso enzimático.
4. Al comparar los resultados de sustratos ciegos (L-AME, L-AEE, L-KME y L-KEE) con los de BAEE y ZLysONp, se observa que la presencia de cromóforos en los sustratos BAEE y ZLysONp modifica de forma importante las características catalíticas. Los valores de K_d muestran que la tripsina tiene una afinidad mayor por estos compuestos con respecto a los sustratos sin cromóforos. Este resultado demuestra que al realizar modificaciones químicas a sustratos para poder estudiar su cinética por espectroscopía no es necesariamente una buena estrategia.
5. Para los derivados de arginina sin modificaciones, la desacilación es el paso limitante;

para BAEE lo es la acilación. El mismo efecto ocurre con los derivados de lisina, con lo que se demuestra que la tercera suposición de Di Cera no es válida en sustratos con modificaciones químicas.

6. ITC tiene las siguientes ventajas sobre las espectroscopías comunes: proporciona directamente la entalpía de la reacción, requiere una menor cantidad de enzima y sustrato, no es necesario modificar químicamente a los sustratos para poder estudiarlo espectrofotométricamente, puede detectar valores de K_M pequeños ($\approx 1 \mu\text{M}$) y grandes (1 mM), lo cual permitió estudiar los sustratos sin cromóforos mostrados en este trabajo.

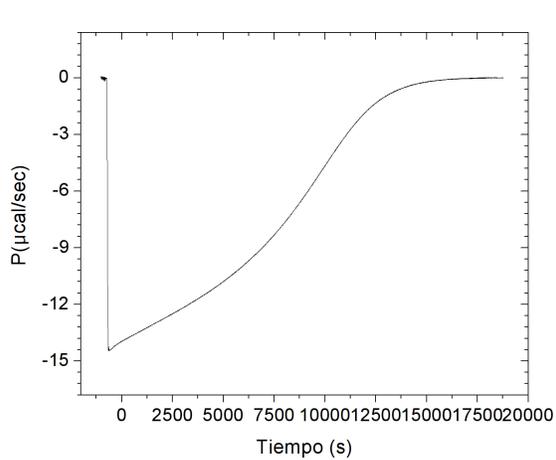
7

Perspectivas

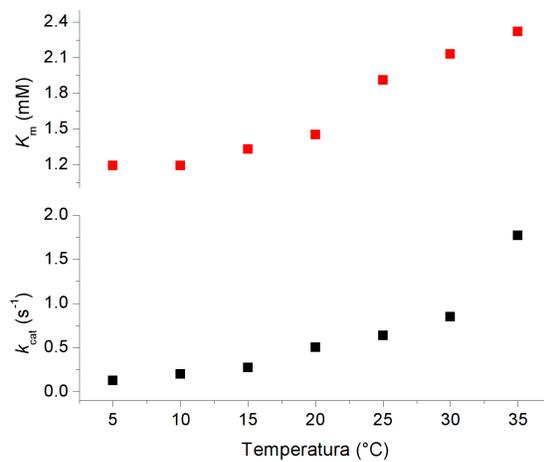
Comprobada ya la eficacia de la Calorimetría de Titulación Isotérmica en el estudio de la cinética enzimática de la tripsina, pretendemos utilizar esta técnica en la caracterización cinética de la promiscuidad catalítica de la sulfatasa SdsA1 y la fosfatasa de *Pseudomonas aeruginosa*, cuyas reacciones no pueden estudiarse directamente por las espectroscopías tradicionales. Para lograrlo, primero pretendemos realizar estudios sobre el mecanismo de catálisis de las sulfatasas y fosfatasa mediante mutaciones puntuales sobre los residuos de His presentes en el sitio catalítico de estas enzimas, cuya función es coordinar los átomos de Zn^{2+} clave en la catálisis. Los resultados de estas mutaciones y el estudio de las propiedades catalíticas de estas proteínas mutantes servirán para generar más evidencias experimentales acerca del mecanismo de hidrólisis de estas enzimas, lo cual es necesario para una caracterización apropiada de cada paso de reacción en los estudios de promiscuidad. Adicionalmente, se tienen pensados experimentos empleando mutantes catalíticamente inactivas que, en principio, nos permitirán separar las contribuciones de la unión de sustrato de la de catálisis. Los experimentos dirigidos a corroborar el mecanismo de reacción, en conjunto con aquellos correspondientes a la caracterización de las interacciones enzima-sustrato a través de experimentos clásicos de unión por ITC, serán cruciales en la determinación del paso (o pasos) responsable del comportamiento promiscuo de estas enzimas.

8

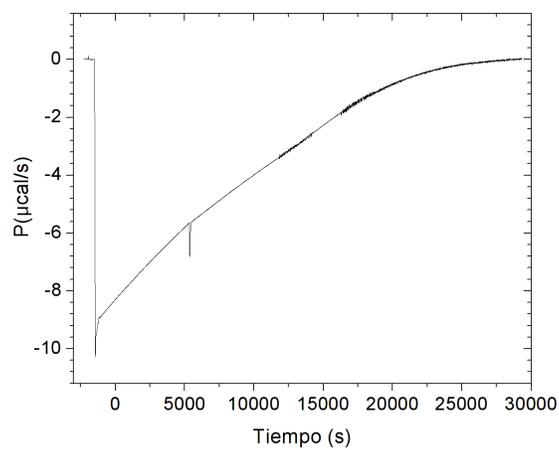
Apéndice



(a) Termograma de hidrólisis a 25 °C.

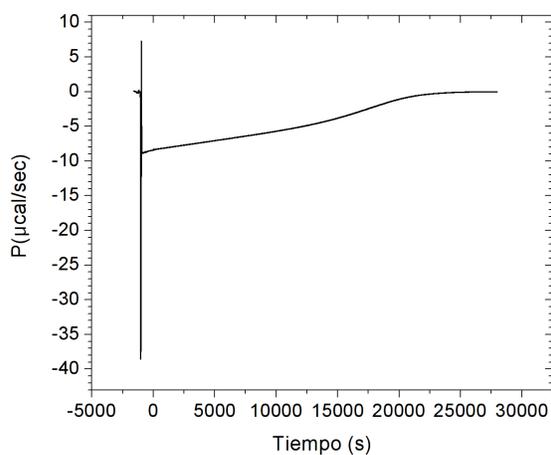


(b) Constantes de Michaelis-Menten en función de la temperatura.

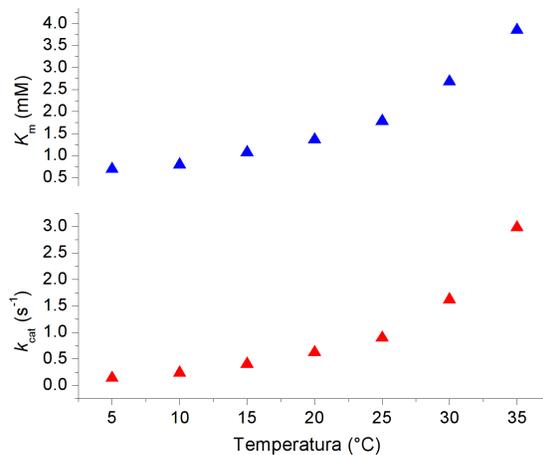


(c) Termograma de hidrólisis a 35 °C.

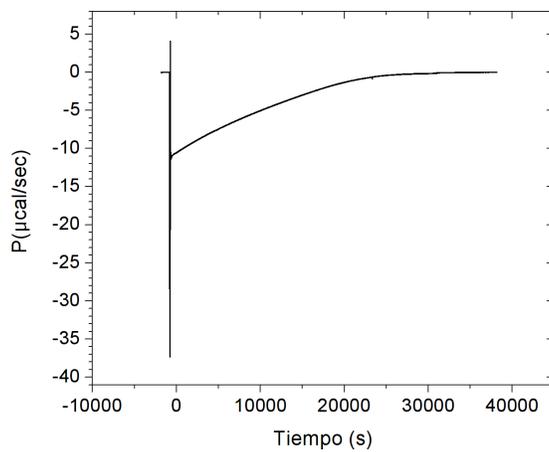
Figura 8.1: Hidrólisis de D-AME catalizada por la tripsina y seguida por ITC.



(a) Termograma de hidrólisis a 25 °C.

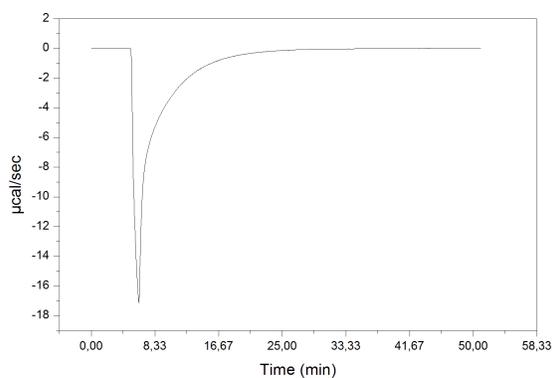


(b) Constantes de Michaelis-Menten en función de la temperatura.

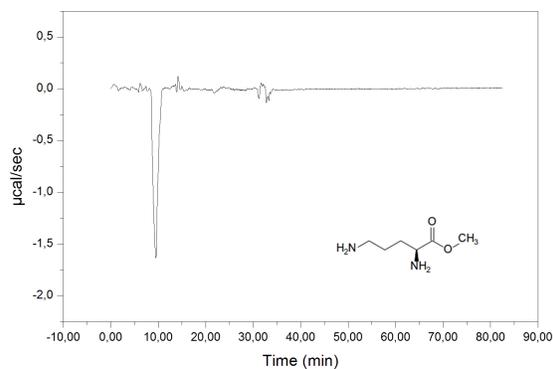


(c) Termograma de hidrólisis a 35 °C.

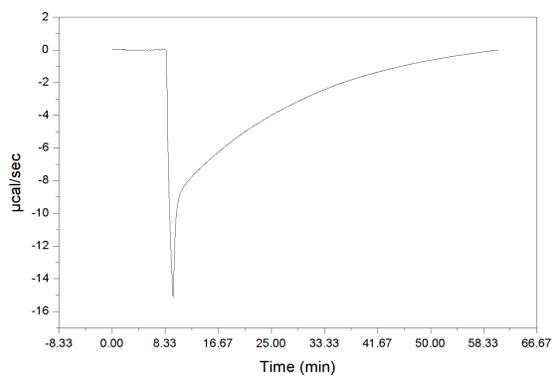
Figura 8.2: Hidrólisis de D-KME catalizada por la tripsina y seguida por ITC.



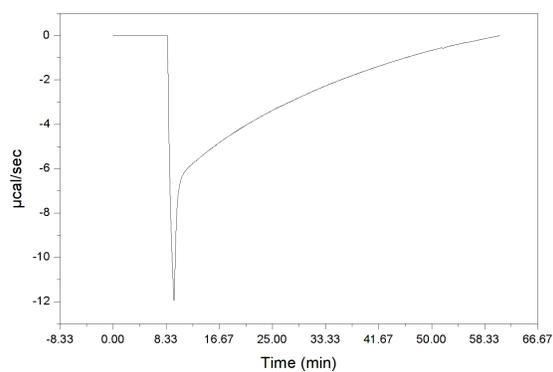
(a) Hidrólisis de L-OME + tripsina.



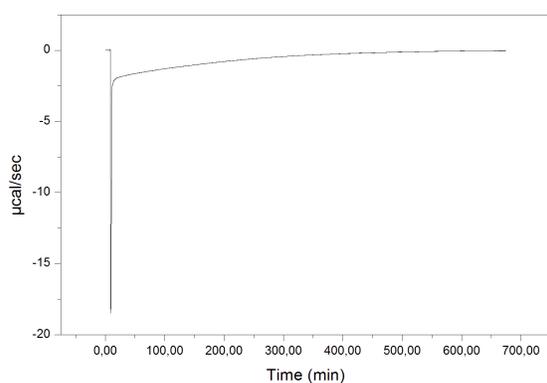
(b) Hidrólisis de L-OME + tripsina. (la tripsina se colocó en la jeringa).



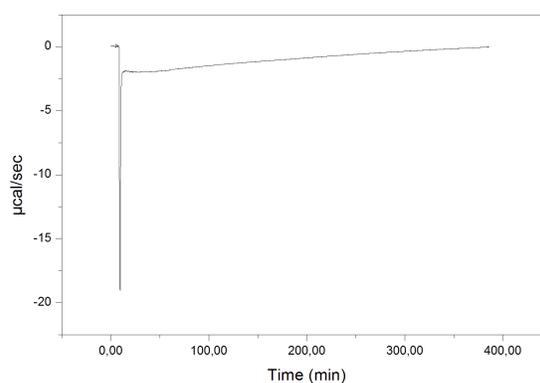
(c) Hidrólisis de L-OEE + tripsina.



(d) Hidrólisis de L-OEE sin tripsina.



(e) Hidrólisis de L-DAPM + tripsina.



(f) Hidrólisis de L-DAPM sin tripsina.

Figura 8.3: Cinética enzimática con otros sustratos derivados de Lisina.

Bibliografía

- [Andújar-Sánchez et al., 2006] Andújar-Sánchez, M., Heras-Vázquez, F. J. L., Clemente-Jiménez, J. M., Martínez-Rodríguez, S., Camara-Artigas, A., Rodríguez-Vico, F., & Jara-Pérez, V. (2006). ENZYMATIC ACTIVITY ASSAY OF D-HYDANTOINASE BY ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY. DETERMINATION OF THE THERMODYNAMIC ACTIVATION PARAMETERS FOR THE HYDROLYSIS OF SEVERAL SUBSTRATES. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67, 57–66.
- [Ascenzi et al., 1981] Ascenzi, P., Menegatti, E., Bortolotti, F., Guarneri, M., & Antonini, E. (1981). STEADY-STATE AND PRE-STEADY-STATE KINETICS OF THE TRYPSIN-CATALYSED HYDROLYSIS OF α -CBZ-L-LYSINE-*p*-NITROPHENYL ESTER. *Biochimica et Biophysica Acta*, 658, 158–164.
- [Ascenzi et al., 1989] Ascenzi, P., Menegatti, E., Guarneri, M., & Amiconi, G. (1989). TRYPSIN-LIKE SERINE PROTEASES ACTION: DETERMINATION OF THE CATALYTIC PARAMETERS K_s , k_{+2} AND k_{+3} UNDER CONDITIONS WHERE THE SUBSTRATE EXCEEDS THE ENZYME CONCENTRATION. *Biochimica et Biophysica Acta*, 998, 210–214.
- [Ascenzi et al., 1982] Ascenzi, P., Menegatti, E., Guarneri, M., Bortolotti, F., & Antonini, E. (1982). CATALYTIC PROPERTIES OF SERINE PROTEASES. 2. COMPARISON BETWEEN HUMAN URINARY KALLIKREIN AND HUMAN UROKINASE, BOVINE β -TRYPSIN, BOVINE THROMBIN, AND α -CHYMOTRYPSIN. *Biochemistry*, 21, 2483–2490.

- [Asgeirsson & Cekan, 2006] Asgeirsson, B. & Cekan, P. (2006). MICROSCOPIC RATE-CONSTANT FOR SUBSTRATE BINDING AND ACYLATION IN COLD-ADAPTATION OF TRYPSIN I FROM ATLANTIC COD. *FEBS Letters*, 580, 4639–4644.
- [Atkins & Nimmo, 1980] Atkins, G. L. & Nimmo, I. A. (1980). CURRENT TRENDS IN THE ESTIMATION OF MICHAELIS-MENTEN PARAMETERS. *Analytical Biochemistry*, 104(1), 1–9.
- [Ayala & Di Cera, 2000] Ayala, Y. M. & Di Cera, E. (2000). A SIMPLE METHOD FOR THE DETERMINATION OF INDIVIDUAL RATE CONSTANTS FOR SUBSTRATE HYDROLYSIS BY SERINE PROTEASES. *Protein Science*, 9, 1589–1593.
- [Banerjee & Kumar Pal, 2008] Banerjee, D. & Kumar Pal, S. (2008). CONFORMATIONAL DYNAMICS AT THE ACTIVE SITE OF α -CHYMOTRYPSIN AND ENZYMATIC ACTIVITY. *Langmuir*, 24, 8163–8168.
- [Bar-Even et al., 2011] Bar-Even, A., Noor, E., Savir, Y., Liebermeister, W., Davidi, D., Tawfik, D. S., & R., M. (2011). THE MODERATELY EFFICIENT ENZYME: EVOLUTIONARY AND PHYSICO-CHEMICAL TRENDS SHAPING ENZYME PARAMETERS. *Biochemistry*. (Por publicarse).
- [Bergstrom et al., 2003] Bergstrom, R. C., Coombs, G. S., Ye, S., Madison, E. L., Goldsmith, E. J., & Corey, D. R. (2003). BINDING OF NONPHYSIOLOGICAL PROTEIN AND PEPTIDE SUBSTRATE TO PROTEASES: DIFFERENCES BETWEEN UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR AND TRYPSIN AND CONTRIBUTIONS TO THE EVOLUTION OF REGULATED PROTEOLYSIS. *Biochemistry*, 42, 5395–5402.
- [Bianconi, 2003] Bianconi, M. L. (2003). CALORIMETRIC DETERMINATION OF THERMODYNAMICS PARAMETERS OF REACTION REVEALS DIFFERENT ENTHALPIC COMPENSATIONS OF THE YEAST HEXOKINASE ISOZYMES. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 18709–18713.

- [Bianconi, 2007] Bianconi, M. L. (2007). CALORIMETRY OF ENZYME-CATALYZED REACTIONS. *Biophysical Chemistry*, 126, 59–64.
- [Bisswanger, 2008] Bisswanger, H. (2008). *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*. Weinheim: Wiley-VCH.
- [Bobofchak et al., 2005] Bobofchak, K. M., Pineda, A. O., Mathews, F. S., & Di Cera, E. (2005). ENERGETIC AND STRUCTURAL CONSEQUENCES OF PERTURBING GLY-193 IN THE OXYANION HOLE OF SERINE PROTEASES. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 25644–25650.
- [Bode et al., 1992] Bode, W., Turk, D., & Karshikov, A. (1992). THE REFINED 1.9-Å X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF D-PHE-PRO-ARG CHLOROMETHYLKETONE-INHIBITED HUMAN α -THROMBIN: STRUCTURE ANALYSIS, OVERALL STRUCTURE, ELECTROSTATIC PROPERTIES, DETAILED ACTIVE-SITE GEOMETRY, AND STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS. *Protein Science*, 1(4), 426–471.
- [Brothers II & Kostić, 1990] Brothers II, H. M. & Kostić, N. M. (1990). CATALYTIC ACTIVITY OF SERINE PROTEASES α -CHYMOTRYPSIN AND α -LYTIC PROTEASE TAGGED AT THE ACTIVE SITE WITH A (TERPYRIDINE)PLATINUM (II) CHROMOPHORE. *Biochemistry*, 29, 7469–7474.
- [Bruylants et al., 2007] Bruylants, G., Wintjens, R., Looze, Y., Redfield, C., & Bartik, K. (2007). PROTONATION LINKED EQUILIBRIA AND APPARENT AFFINITY CONSTANTS: THE THERMODYNAMIC PROFILE OF THE α -CHYMOTRYPSIN-PROFLAVIN INTERACTION. *European Biophysics Journal*, 37, 11–18.
- [Cai et al., 2001] Cai, L., Cao, A., & Lai, L. (2001). AN ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRIC METHOD TO DETERMINE THE KINETIC PARAMETERS OF ENZYME CATALYTIC REACTION BY EMPLOYING THE PRODUCT INHIBITION AS PROBE. *Analytical Biochemistry*, 299, 19–23.

-
- [Carrillo et al., 2010] Carrillo, N., Ceccarelli, E., & Roveri, O. (2010). USEFULNESS OF KINETIC ENZYME PARAMETERS IN BIOTECHNOLOGICAL PRACTICE. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 27, 367–382.
- [Case & Stein, 2003] Case, A. & Stein, R. L. (2003). MECHANISTIC ORIGINS OF THE SUBSTRATE SELECTIVITY OF SERINE PROTEASES. *Biochemistry*, 42, 3335–3348.
- [Copley, 2003] Copley, S. D. (2003). ENZYMES WITH EXTRA TALENTS: MOONLIGHTING FUNCTIONS AND CATALYTIC PROMISCUITY. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 265–272.
- [Czodrowski et al., 2007] Czodrowski, P., Sotriffer, C. A., & Klebe, G. (2007). PROTONATION CHANGES UPON LIGAND BINDING TO TRYPSIN AND THROMBIN: STRUCTURAL INTERPRETATION BASED ON pK_a CALCULATIONS AND ITC EXPERIMENTS. *Journal of Molecular Biology*, 367, 1347–1356.
- [Di Cera, 2008] Di Cera, E. (2008). THROMBIN. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(4), 203–254.
- [Di Cera, 2009] Di Cera, E. (2009). SERINE PROTEASES. *Life*, 61(5), 510–515.
- [Dixon et al., 1991] Dixon, M. M., Brennan, R. G., & Matthews, B. W. (1991). STRUCTURE OF γ -CHYMOTRYPSIN IN THE RANGE PH 2.0 TO PH 10.5 SUGGESTS THAT γ -CHYMOTRYPSIN IS A COVALENT ACYL-ENZYME ADDUCT AT LOW PH. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(2), 89–96.
- [El-Harrouis & Parody-Morreale, 1997] El-Harrouis, M. & Parody-Morreale (1997). MEASUREMENT OF BIOCHEMICAL AFFINITIES WITH A GILL TITRATION CALORIMETER. *Analytical Biochemistry*, 254, 96–108.

- [Freire et al., 2009] Freire, E., Schön, A., & Velázquez-Campoy, A. (2009). ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY: GENERAL FORMALISM USING BINDING POLYNOMIALS. *Methods in Enzymology*, 455, 127–155.
- [Gul et al., 2006] Gul, S., Mellor, G. W., Thomas, E. W., & Brocklehurst, K. (2006). TEMPERATURE-DEPENDENCES OF THE KINETICS OF REACTIONS OF PAPAIN AND AC-TIDIN WITH A SERIES OF REACTIVITY PROBES DIFFERING IN KEY MOLECULAR RECOGNITION FEATURES. *Biochemical Journal*, 396, 17–21.
- [Haq, 2005] Haq, I. (2005). CALORIMETRY IN THE FAST LANE: THE USE OF ITC FOR OBTAINING ENZYME KINETICS CONSTANTS. *Microcal, Application Note*, <http://www.microcal.com/>, (pp. 1–9).
- [Harris & Keshwani, 2009] Harris, T. K. & Keshwani, M. M. (2009). MEASUREMENT OF ENZYME ACTIVITY. *Methods in Enzymology*, 463, 57–71.
- [Hedstrom, 2002] Hedstrom, L. (2002). SERINE PROTEASE MECHANISM AND SPECIFICITY. *Chemical Reviews*, 102, 4501–4523.
- [Hedstrom et al., 1994] Hedstrom, L., Perona, J. J., & Rutter, W. J. (1994). CONVERTING TRYPSIN TO CHYMOTRYPSIN: RESIDUE 172 IS A SUBSTRATE SPECIFICITY DETERMINANT. *Biochemistry*, 33, 8757–8763.
- [Huheey et al., 2003] Huheey, J. E., Keiter, E. A., & Keiter, R. L. (2003). *Química Inorgánica: Principios de Estructura y Reactividad*. Maryland: Oxford University Press.
- [Inagami, 1964] Inagami, T. (1964). THE MECHANISM OF THE SPECIFICITY OF TRYPSIN CATALYSIS. I. INHIBITION BY ALKYL AMMONIUM IONS. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 787–791.

- [Jeoh et al., 2005] Jeoh, T., Baker, J. O., Ali, M. K., Himmel, M. E., & Adney, W. S. (2005). β -D-GLUCOSIDASE REACTION KINETICS FROM ISOTHERMAL TITRATION MICROCALORIMETRY. *Analytical Biochemistry*, 347, 244–253.
- [Kappelhoff et al., 2009] Kappelhoff, J. C., Judy-Liu, S. Y., Dugdale, M. L., Mymianiw, D. L., Linton, L. R., & Huber, R. E. (2009). PRACTICAL CONSIDERATIONS WHEN USING TEMPERATURE TO OBTAIN RATE CONSTANTS AND ACTIVATION THERMODYNAMICS OF ENZYMES WITH TWO CATALYTIC STEPS: NATIVE AND N460T- β -GALACTOSIDASE (*E. coli*) AS EXAMPLES. *Protein Journal*, 28, 96–103.
- [Kaufman et al., 1948] Kaufman, S., Neurath, H., & Schwert, G. W. (1948). THE SPECIFIC PEPTIDASE AND ESTERASE ACTIVITIES OF CHYMOTRYPSIN. *Archives of Biochemistry*, 17(1), 203–205.
- [Kazlauskas, 2005] Kazlauskas, R. J. (2005). ENHANCING CATALYTIC PROMISCUITY FOR BIOCATALYSIS. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 195–201.
- [Khersonsky et al., 2006] Khersonsky, O., Roodveldt, C., & Tawfik, D. S. (2006). ENZYME PROMISCUITY: EVOLUTIONARY AND MECHANISTIC ASPECTS. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 498–508.
- [Kraut et al., 2003] Kraut, D. A., Carroll, K. S., & Herschlag, D. (2003). CHALLENGES IN ENZYME MECHANISM AND ENERGETICS. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 517–571.
- [Krem & Di Cera, 1998] Krem, M. M. & Di Cera, E. (1998). CONSERVED WATER MOLECULES IN THE SPECIFICITY POCKET OF SERINE PROTEASES AND THE MOLECULAR MECHANISM OF Na^{+} BINDING. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 30, 34–42.

-
- [Krieger et al., 1974] Krieger, M., Kay, L. M., & Stroud, R. M. (1974). STRUCTURE AND SPECIFIC BINDING OF TRYPSIN: COMPARISON OF INHIBITED DERIVATIVES AND A MODEL FOR SUBSTRATE BINDING. *Journal of Molecular Biology*, 83(2), 209–230.
- [Lakowicz, 2004] Lakowicz, J. R. (2004). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science + Business Media.
- [Li & Yeung, 2008] Li, J. & Yeung, E. S. (2008). REAL-TIME SINGLE-MOLECULE KINETICS OF TRYPSIN PROTEOLYSIS. *Annals of Chemistry*, 80, 8509–8513.
- [Logan, 2000] Logan, S. R. (2000). *Fundamentos de Cinética Química*. Madrid: Addison Wesley.
- [Lonhienne et al., 2001] Lonhienne, T., Baise, E., Feller, G., Bouriotis, V., & Gerday, C. (2001). ENZYME ACTIVITY DETERMINATION ON MACROMOLECULAR SUBSTRATES AND PSYCHROPHILIC CHITINASES. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1545, 349–356.
- [Mares-Guia et al., 1984] Mares-Guia, M., Silva, E., & Tunes, H. (1984). COMPETITIVE INHIBITION BY THE D-ISOMER IN RACEMIC MIXTURES USED AS SUBSTRATE IN KINETIC STUDIES: A SIMPLE METHOD FOR DATA TREATMENT. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 228(1), 278–281.
- [Matthews et al., 1977] Matthews, D. A., Alden, R. A., Birktoft, J. J., & Kraut, J. (1977). RE-EXAMINATION OF THE CHARGE RELAY SYSTEM IN SUBTILISIN COMPARISON WITH OTHER SERINE PROTEASES. *Journal of Biological Chemistry*, 252(24), 8875–8883.
- [Nelson & Cox, 2006] Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2006). *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Nueva York: Omega.
- [Nobeli et al., 2009] Nobeli, I., Favia, A. D., & Thornton, J. M. (2009). PROTEIN PROMISCUITY AND ITS IMPLICATIONS FOR BIOTECHNOLOGY. *Nature Biotechnology*, 27(2), 157–167.

-
- [O'Brien & Herschlag, 1999] O'Brien, P. J. & Herschlag, D. (1999). CATALYTIC PROMISCUITY AND THE EVOLUTION OF NEW ENZYMATIC ACTIVITIES. *Chemistry & Biology*, 6, R91–R105.
- [Otlewsky et al., 1996] Otlewsky, J., Kolasinski, M., & Krowarsch, D. (1996). UNFOLDING KINETICS OF BOVINE TRYPSINOGEN. *European Journal of Biochemistry*, 242(3), 601–607.
- [Perona & Craik, 1995] Perona, J. J. & Craik, C. S. (1995). SUBSTRATE BASIS OF SUBSTRATE SPECIFICITY IN THE SERINE PROTEASES. *Protein Science*, 4, 337–360.
- [Peterlin Mašič, 2006] Peterlin Mašič, L. (2006). ARGININE MIMETIC STRUCTURES IN BIOLOGICALLY ACTIVE ANTAGONISTS AND INHIBITORS. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 3627–3648.
- [Pey & Martínez, 2005] Pey, A. L. & Martínez, A. (2005). THE ACTIVITY OF WILD-TYPE AND MUTANT PHENYLALANINE HYDROXYLASE AND ITS REGULATION BY PHENYLALANINE AND TETRAHYDROBIOPTERIN AT PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CONCENTRATIONS: AN ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY STUDY. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86, S43–S53.
- [Pitarke et al., 2007] Pitarke, J. M., Silkin, V. M., Chulkov, E. V., & Echenique, P. M. (2007). THEORY OF SURFACE PLASMONS AND SURFACE-PLASMON POLARITONS. *Reports on Progress in Physics*, 70, 1–87.
- [Polgár, 2005] Polgár, L. (2005). THE CATALYTIC TRIAD OF SERINE PEPTIDASES. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2161–2172.
- [Segel, 1976] Segel, I. H. (1976). *Biochemical Calculations*. Londres: John & Wiley Sons.
- [Sekizaki et al., 2001] Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E., & Tanizawa, K. (2001). CHUM SALMON TRYPSIN-CATALYZED PREFERENTIAL FORMATION OF PEPTIDES CONTAINING D-AMINO ACID. *Amino Acids*, 21, 175–184.

-
- [Spencer & Raffa, 2004] Spencer, S. D. & Raffa, R. B. (2004). ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRIC STUDY OF RNASE-A KINETICS (cCMP \rightarrow 3'cCMP) INVOLVING END-PRODUCT INHIBITION). *Pharmaceutical Research*, 21(9), 1642–1647.
- [Spreti et al., 2001] Spreti, N., Di Profio, P., Marte, L., Bufali, N., Brinchi, L., & Savelli, G. (2001). ACTIVATION AND STABILIZATION OF α -CHYMOTRYPSIN BY CATIONIC ADDITIVES. *European Journal of Biochemistry*, 268, 6491–6497.
- [Talhout & Engberts, 2001] Talhout, R. & Engberts, J. B. F. N. (2001). THERMODYNAMIC ANALYSIS OF BINDING OF *p*-SUBSTITUTED BENZAMIDINES TO TRYPSIN. *European Journal of Biochemistry*, 268, 1554–1560.
- [Thong Pham et al., 2007] Thong Pham, V., Ewing, E., Kaplan, H., Choma, C., & Hefford, M. A. (2007). GLYCATION IMPROVES THE THERMOSTABILITY OF TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(3), 452–459.
- [Todd & Gomez, 2001] Todd, M. J. & Gomez, J. (2001). ENZYME KINETICS DETERMINED USING CALORIMETRY: A GENERAL ASSAY FOR ENZYME ACTIVITY? *Analytical Biochemistry*, 296, 179–187.
- [Tóth et al., 2006] Tóth, J., Gombos, L., Simon, Z., Medveczky, P., Szilágyi, L., & Gráf, L. (2006). THERMODYNAMIC ANALYSIS REVEALS STRUCTURAL REARRANGEMENT DURING THE ACYLATION STEP IN HUMAN TRYPSIN 4 ON 4-METHYLUMBELLIFERYL 4-GUANIDINO BENZOATE SUBSTRATE ANALOGUE. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12596–12602.
- [Velázquez-Campoy & Freire, 2005] Velázquez-Campoy, A. & Freire, E. (2005). ITC IN THE POST-GENOMIC ERA...? PRICELESS. *Biophysical Chemistry*, 115, 115–124.

- [Velázquez-Campoy & Freire, 2006] Velázquez-Campoy, A. & Freire, E. (2006). ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY TO DETERMINE ASSOCIATION CONSTANTS FOR HIGH-AFFINITY LIGANDS. *Nature Protocols*, 1(1), 186–191.
- [Velázquez-Campoy et al., 2004] Velázquez-Campoy, A., Ohtaka, H., Nezami, A., Muzamil, S., & Freire, E. (2004). *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons.
- [Venkatesh & Sundaram, 1998] Venkatesh, R. & Sundaram, P. V. (1998). MODULATION OF STABILITY PROPERTIES OF BOVIN TRYPSIN AFTER *in vitro* STRUCTURAL CHANGES WITH A VARIETY OF CHEMICAL MODIFIERS. *Protein Engineering*, 11, 691–698.
- [Verheyden et al., 2004] Verheyden, G., Matral, J., Volckaert, G., & Engelborghs, Y. (2004). A FLUORESCENCE STOPPED-FLOW KINETIC STUDY OF THE CONFORMATIONAL ACTIVATION OF α -CHYMOTRYPSIN AND SEVERAL MUTANTS. *Protein Science*, 13, 2533–2540.
- [Wirnt, 1974] Wirnt, R. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press Inc.
- [Wiseman et al., 1989] Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., & Lin, L. N. (1989). RAPID MEASUREMENT OF BINDING CONSTANTS AND HEATS OF BINDING USING A NEW TITRATION CALORIMETER. *Analytical Biochemistry*, 179, 131–137.
- [You et al., 2006] You, C. C., Agasti, S. S., De, M., Knapp, M. J., & Rotello, V. M. (2006). MODULATION OF THE CATALYTIC BEHAVIOR OF α -CHYMOTRYPSIN AT MONOLAYER-PROTECTED NANOPARTICLE SURFACES. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 14612–14618.
- [Zerner & Bender, 1964] Zerner, B. & Bender, M. L. (1964). THE KINETIC CONSEQUENCES OF THE ACYL-ENZYME MECHANISM FOR THE REACTION OF SPECIFIC SUBSTRATES WITH CHYMOTRYPSIN. *Journal of American Chemical Society*, 86, 3669–3674.

[Andújar-Sánchez et al., 2006] [Ascenzi et al., 1981] [Ascenzi et al., 1982] [Ascenzi et al., 1989]
[Asgeirsson & Cekan, 2006] [Ayala & Di Cera, 2000] [Banerjee & Kumar Pal, 2008] [Bergstrom et al., 2003]
[Bianconi, 2003] [Bobofchak et al., 2005] [Brothers II & Kostić, 1990] [Bruylants et al., 2007]
[Cai et al., 2001] [Case & Stein, 2003] [Czodrowski et al., 2007] [Di Cera, 2008] [Gul et al., 2006]
[Haq, 2005] [Harris & Keshwani, 2009] [Hedstrom et al., 1994] [Hedstrom, 2002] [Kappelhoff et al., 2009]
[Kaufman et al., 1948] [Krem & Di Cera, 1998] [Li & Yeung, 2008] [Perona & Craik, 1995]
[Peterlin Mašič, 2006] [Polgár, 2005] [Spreti et al., 2001] [?] [Talhout & Engberts, 2001] [Thong Pham et al.]
[Tóth et al., 2006] [Venkatesh & Sundaram, 1998] [Verheyden et al., 2004] [You et al., 2006]
[Bianconi, 2007] [Pey & Martínez, 2005] [Spencer & Raffa, 2004] [Jeoh et al., 2005] [Todd & Gomez, 2001]
[Lonhienne et al., 2001] [Velázquez-Campoy et al., 2004] [Freire et al., 2009] [Velázquez-Campoy & Freire,
[Velázquez-Campoy & Freire, 2006] [Wiseman et al., 1989] [Kazlauskas, 2005] [Khersonsky et al., 2006]
[Copley, 2003] [Nobeli et al., 2009] [Sekizaki et al., 2001] [Mares-Guia et al., 1984] [Di Cera, 2009]
[Kraut et al., 2003]