



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

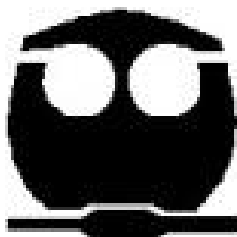
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE
LA FORMACIÓN DEL HOMODÍMERO DE LA
 β -LACTOGLOBULINA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A
Q.F.B MARTINIANO BELLO RAMÍREZ



TUTOR: Dr. ENRIQUE GARCÍA HERNANDEZ

MEXICO, D.F

JUNIO 2006



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.

Esta Investigación se realizó en el
Departamento de Bioquímica del
Instituto de Química de la
Universidad Nacional Autónoma de
México

“La experiencia más hermosa que tenemos a nuestro alcance es el misterio. Es la emoción fundamental que está en la cuna del verdadero arte y de la verdadera ciencia. El que no la conozca y no pueda ya admirarse, y no pueda ya asombrarse ni maravillarse, está como muerto y tiene los ojos nublados”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Dr. Enrique García Hernández por haber dirigido esta investigación y por el apoyo que siempre me ha brindado.

Quiero agradecer también al Dr. Armando Gómez Poyou y al Dr. Alejandro Fernández, integrantes de mi comité tutorial, por el interés mostrado y el impulso que recibí de parte de ellos.

Al Dr. Alejandro Fernández de la Facultad de Medicina, UNAM, por permitirnos amablemente trabajar en su laboratorio

Al Dr. Miguel Costas Basín de la Facultad de Química, UNAM, por permitirnos el uso del equipo de calorimetría de titulación isotérmica VP-ITC.

Al Dr. Arturo Rojo Domínguez, al Dr. Alejandro Fernández, al Dr. Edgar Vázquez Contreras, a la Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez y al Dr. Miguel Costas Basín, quienes amablemente accedieron a revisar esta tesis y contribuyeron significativamente a su enriquecimiento.

A CONACYT por la beca otorgada con número de registro 185513. Asimismo a los proyectos PAPIIT-UNAM IN-217505, PAPIIT-UNAM IN-217106-3 y al proyecto CONACYT 47097 por el gran apoyo en el desarrollo de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mi madre a quien le debo lo que soy

A Osiris que ha viajado conmigo por este sendero la mayor parte del tiempo

A mi padre a quien aun no termino de entender

A mis hermanos que son tantos y tan diferentes

Al Dr. Enrique García Hernández mi mentor

Al Dr. Roberto Arreguín por su apoyo y buena voluntad

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y apoyo

A la Universidad Veracruzana por haberme formado

Al Maky y al Varela por las buenas farras, al Sergio y al Rafa por todas las aventuras que disfrutamos juntos, al machaco y al manolo por las buenas platicas.

También quiero agradecer a todos aquellos que se interesaron en algún momento en mi trabajo y me brindaron el placer de ser escuchado.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
	1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
	1.2 OBJETIVOS.....	6
II.	ANTECEDENTES.....	7
	2.1 PROTEÍNAS.....	7
	2.2 INTERACCIONES NO COVALENTES.....	10
	2.2.1 EFECTO HIDROFÓBICO.....	11
	2.2.2 PUENTES DE HIDRÓGENO.....	11
	2.2.3 INTERACCIONES ELECTROSTÁTICAS.....	12
	2.2.4 INTERACCIONES DE VAN DER WAALS.....	13
	2.2.5 COMPLEMENTARIEDAD ESTÉRICA Y MOLÉCULAS DE AGUA EN LA INTERFASE.....	14
	2.3 TIPOS DE COMPLEJOS PROTEICOS.....	15
	2.4 IMPORTANCIA DE UN SISTEMA DIMÉRICO.....	16
	2.5 TERMODINÁMICA DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	18
	2.6 LA β -LACTOGLOBULINA VARIANTE A (β LG A).....	20
	2.6.1 LA ESTRUCTURA Y ORIGEN DE LA β LG A.	20
	2.6.2 FUNCIÓN DE LA β LG A.....	23
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
	3.1 MATERIALES.....	25
	3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.....	25
	3.3 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA.....	25
	3.3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	26

3.2 ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS.....	26
3.2.1 FLUORESCENCIA INTRÍNSECA.....	27
3.2.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	27
3.2.3 DICROÍSMO CIRCULAR.....	28
3.2.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	28
3.5 MODELOS DE ÁREAS SUPERFICIALES.....	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (CTI) Y OBTENCIÓN DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICOS DE LA DIMERIZACIÓN DE LA β LG A.....	31
4.2 MODELOS DE ÁREA SUPERFICIAL.....	42
4.3 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA.....	43
4.4 ACOPLAMIENTO DE LA DIMERIZACIÓN DE LA β LG A, INTERCAMBIO DE CONTRAIONES Y MOLÉCULAS DE AGUA.....	48
4.4.1 ESTRÉS OSMÓTICO.....	49
4.4.2 ANÁLISIS DE AGUAS EN LA INTERFASE DEL DÍMERO DE β LG A.....	51
4.4.3 CALCULO DEL Δ CP DEBIDO A LA INCORPORACIÓN DE MOLECULAS DE AGUA.....	52
4.6 CÁLCULO DE Δ H MEDIANTE MODELOS DE ÁREA SUPERFICIAL.....	55
V. CONCLUSIONES.....	56
VI. PERSPECTIVAS.....	59
VII. APÉNDICE.....	60
VIII. REFERENCIAS.....	73

I INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macromoléculas encontradas en todos los sistemas biológicos, desde los más simples procariontes hasta los más complejos eucariontes pluricelulares. Ellas ocupan una posición prominente en las células, tanto cuantitativa como cualitativamente, de lo cual se sigue el origen de su nombre, derivado de la palabra griega *protos*, que significa de primera importancia.

Cuantitativamente, las proteínas son la clase más abundante de biomoléculas. Constituyen el 50% o más del peso de la biomasa seca celular, superando por mucho a otros biopolímeros de importancia, como los ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (Lehninger, 2000).

Cada organismo contiene una gran variedad de proteínas específicas, de acuerdo al número de genes expresables presentes en sus cromosomas. Este número varía de unos cientos en bacterias, a unos miles en animales y humanos.

Cualitativamente, la importancia de las proteínas es fundamental en la lógica molecular de la vida. Las proteínas están involucradas prácticamente en todos los procesos biológicos. La mayoría de las reacciones químicas que ocurren en los sistemas biológicos son catalizadas por proteínas específicas, llamadas enzimas, que son capaces de incrementar la velocidad de reacción de 10^6 hasta 10^{14} veces más rápido que la misma reacción no catalizada (v.g., la triosafosfato isomerasa, cuya velocidad de reacción en ausencia de enzima es de 4.3×10^{-6} y en presencia de esta de 4300, lo cual incrementa su rendimiento 10^9 veces). Las proteínas también transportan y almacenan un amplio grupo de iones, pequeñas moléculas y electrones. Poseen actividad hormonal y, al actuar como anticuerpos

o lectinas, distinguen lo propio de lo extraño, defendiendo al cuerpo de agentes externos. Participan en la recepción y transmisión de señales. Además juegan un papel crucial en la regulación de la expresión de la información genética. También son necesarias para dar soporte mecánico, y proveer de una arquitectura filamentosa, tanto dentro como entre las células, y por consiguiente, son esenciales para la contracción y coordinación del movimiento celular.

Por lo anteriormente descrito, podemos asumir que virtualmente cualquier proceso biológico depende de la acción altamente especializada de las proteínas. Independientemente de la actividad que estas realicen, involucran necesariamente eventos de asociación molecular de alta especificidad y afinidad. Siendo las interacciones no covalentes, las principales responsables de la formación y estabilización de los complejos moleculares, por lo tanto la comprensión de como operan estas fuerzas es fundamental para entender las bases fisicoquímicas que dan sustento a la vida.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La interacción proteína-proteína es un mecanismo recurrente, responsable del funcionamiento de numerosos procesos en la célula. La formación de complejos proteicos es crucial para la formación de “sitios activos” en enzimas oligoméricas y para el mantenimiento de su conformación efectiva (Banci *et al.*, 1998; Holwerda, 1999). La estabilidad conferida a los complejos en la asociación de proteínas está determinada por fuerzas de cohesión no covalentes (interacciones estereo específicas y efecto hidrofóbico), las cuales son muy definidas dependiendo del tipo de complejo proteico. Aunque de manera cualitativa resulta sencillo atribuir preponderancia a las fuerzas involucradas en una asociación molecular, su comprensión en términos cuantitativos dista aún de ser clara. Una manera de solucionar este problema, precisa del análisis de sistemas de los cuales se conozcan sus propiedades estructurales y termodinámicas.

Con el reciente advenimiento de los calorímetros de titulación isotérmica (CTI) cuya suficiente sensibilidad y reproducibilidad, ha sido posible realizar evaluaciones detalladas de la energética de asociación de biocomplejos. La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica termodinámica que permite estudiar el calor de interacción entre dos moléculas. Cuando dos moléculas se unen o se disocian, pueden generar o absorber calor. La medición del cual, permite una determinación muy precisa de las constantes de unión, la estequiometría de reacción y un perfil termodinámico de la reacción en el cual se incluyen la variación en la entalpía (ΔH) y en la entropía (ΔS). A la vez, la

determinación de la entalpía (ΔH) a diferentes temperaturas nos permite obtener el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p).

En este trabajo se caracterizó el proceso de dimerización de la β -lactoglobulina bovina variante A (β LG_A), cuya estructura tridimensional ha sido resuelta experimentalmente (Brownlow *et al.*, 1997; Uhrinova *et al.*, 2000). El estudio se realizó a pH neutro y dentro de un intervalo de temperatura de 15 a 35 °C. Los resultados obtenidos muestran que el proceso de asociación está entálpicamente conducido, las constantes de afinidad muestran un decrecimiento conforme la temperatura aumenta y la energía libre de Gibbs se mantiene casi constante. Además, pudimos obtener la temperatura de máxima estabilidad, esto es la temperatura a la cual $\Delta S=0$, es decir, donde la energía libre de Gibbs esta dada totalmente por la entalpía. Las entalpías y las entropías de dimerización a diferentes temperaturas nos permitieron obtener el cambio en la capacidad calorífica a presión constante. La obtención de este último parámetro termodinámico es particularmente importante, ya que es un reflejo de los cambios estructurales que ocurren en el proceso de asociación (deshidratación) o de disociación (hidratación).

Por otro lado, comparamos el valor de ΔC_p determinado calorimétricamente con el obtenido a partir de un modelo energético-estructural empírico, este modelo postula que el ΔC_p es proporcional al área de contacto entre las moléculas que forman el complejo (modelo de áreas superficiales accesibles), con la finalidad de corroborar si la parametrización se ajustaba a este tipo de sistemas. El resultado obtenido indicó que el valor experimental es mucho más negativo (4 a 5 veces)

que el teórico. Para conocer las causas de esta importante discrepancia, exploramos 2 posibles escenarios:

- 1) La existencia de cambios conformacionales significativos tras la asociación, es decir, que la asociación no es tipo cuerpo rígido.
- 2) Los modelos de área superficial accesible no se ajustan a este tipo de sistemas, ya que no dan importancia a otras fuentes de ΔC_p particulares a la β LGA.

Para tratar de contestar esta problemática, se realizaron estudios espectroscópicos (dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca), así como experimentos que permitieron establecer el grado de acoplamiento de la homodimerización de la β LGA bajo las condiciones de estudio a procesos de intercambio de protones, contraiones y moléculas de agua.

1.2 OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de investigación fueron:

- A. Caracterizar termodinámicamente la formación del homodímero de la β LGA, con la finalidad de conocer las bases energéticas del proceso de auto-asociación.
- B. Explicar, a través del uso de modelos energético-estructurales empíricos y la consideración de factores adicionales pertinentes, el origen molecular de la energética observada experimentalmente.
- C. Contribuir a enriquecer la base de datos energético-estructural para uniones proteína-proteína.

II ANTECEDENTES

2.1 PROTEINAS

Las proteínas son macromoléculas cuya organización estructural ha sido descrita clásicamente a través de 4 niveles de estructura, a saber (Creighton, 1993; Cozzone *et al.*, 2000):

Estructura primaria: corresponde a la secuencia de aminoácidos que forman el “esqueleto” de cualquier proteína, cuyo origen se cuenta a partir del extremo amino-terminal. Incluye la descripción de todos los enlaces peptídicos y puentes disulfuro que conectan a los residuos de aminoácidos en una cadena polipeptídica (**Fig.1**). Cada proteína presenta un número y disposición muy particular de residuos de aminoácido y su estructura primaria determina cómo se pliega en un arreglo único tridimensional, la así llamada conformación nativa.

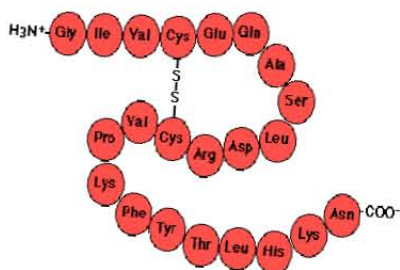


Fig.1: Estructura primaria de proteínas. Se puede observar el amino y carboxilo terminal, además un puente disulfuro formado entre dos cisteínas.

Estructura secundaria: especifica la conformación local de segmentos de la proteína, en los que la cadena adopta conformaciones regulares repetitivas, como las hélices α y las hebras β , o no repetitivas, como las asas y giros de conformación irregular. Algunos tipos de estructura secundaria son particularmente estables y ocurren con mucha frecuencia entre las proteínas. Los

patrones que ilustran mejor este hecho son las hélices α y las hebras β . La estructura secundaria se estabiliza por la formación de puentes de hidrógeno entre un protón unido a un nitrógeno y un oxígeno del carbonilo pertenecientes a dos diferentes residuos de aminoácidos en una secuencia de éstos (**Fig.2 y 3**).

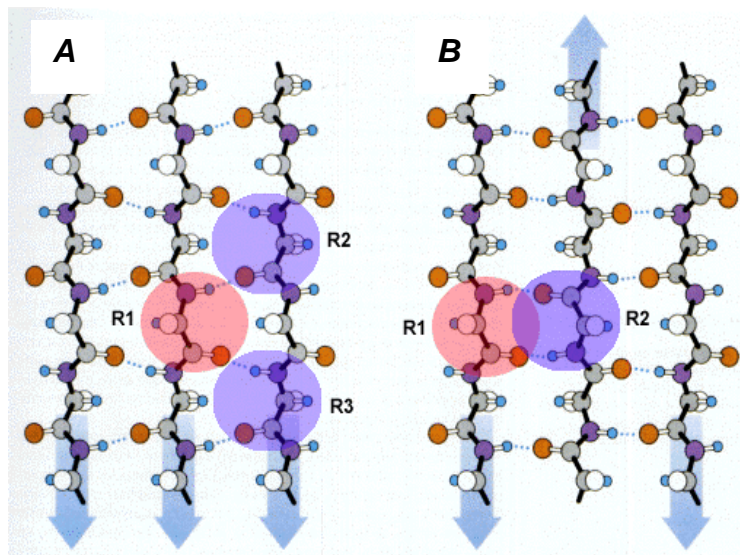


Fig.2: Las cadenas adyacentes de una hebra beta pueden orientarse en la misma dirección A) Hebras β paralelas, o en direcciones opuestas B) Hebras β antiparalelas.

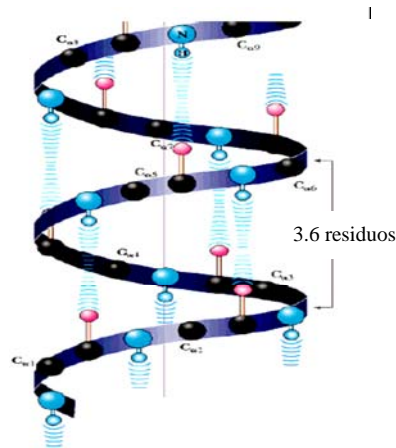


Fig.3: Hélice α . Se puede apreciar como está estabilizada por puentes de hidrógeno entre los grupos amino y carbonilo del esqueleto del polipéptido. El grupo carbonilo de cada residuo forma un puente de hidrógeno con el grupo amino del aminoácido situado cuatro residuos más adelante, repitiéndose 3.6 residuos por vuelta.

Estructura terciaria: es la descripción tridimensional de todas las posiciones atómicas de una proteína (**Fig.4**).

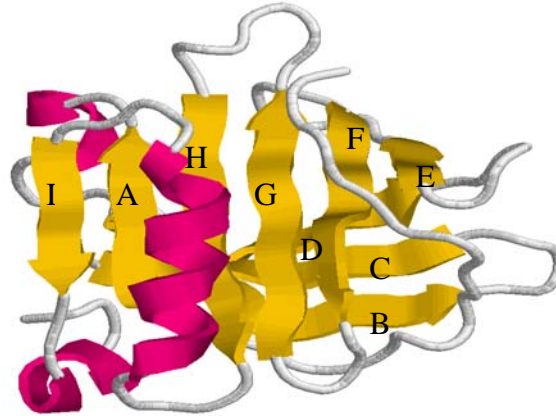


Fig.4: Estructura terciaria de la β LGA (PDB 1BEB). Consiste de 9 segmentos de hebras beta antiparalelas (A-I), de una porción pequeña de hélice α ubicada en la región carboxilo terminal, y de diferentes fragmentos de cadena plegada irregularmente y asas β .

Estructura cuaternaria: cuando las proteínas están conformadas por varias subunidades polipeptídicas, el arreglo específico de éstas recibe el nombre de estructura cuaternaria (**Fig. 5**).



Fig.5: Estructura cuaternaria de la β LGA, constituida por dos protómeros de β LGA.

2.2 INTERACCIONES NO COVALENTES

Las proteínas existen en un mundo de interacciones débiles no covalentes, en el que ellas se asocian con pequeños ligandos, substratos, ADN, carbohidratos y, lo más importante para el presente trabajo, a otras proteínas. Las interacciones no covalentes son propiamente aquellas en la que no hay formación de un enlace resultado de compartir electrones. Los enlaces covalentes son muy fuertes. Por ejemplo, un enlace C-C posee una energía de $\sim 100 \text{ kcal mol}^{-1}$. Por lo tanto, si dos proteínas se unieran covalentemente, experimentarían una alta asociación, en la que sería necesario tan sólo un enlace para superar en estabilidad cualquier dímero de proteína estudiado hasta el momento. Entonces, habiendo otras posibles fuentes mucho más eficaces de estabilización, ¿por qué las proteínas evolucionaron en un esquema de interacciones no covalentes? Como lo es el plegamiento proteico, las fuerzas que estabilizan las interacciones interproteicas son fácilmente reversibles, involucrando la participación de moléculas de agua, las cuales a su vez forman redes acuosas dando origen a superficies de interacción extendida (Ladbury *et al.*, 2004). La flexibilidad de estas interacciones, su reversibilidad y el hecho de que sean lo suficientemente estables para desempeñar su trabajo, nos hace recordar la verdadera naturaleza dinámica dentro de la célula (Lakey *et al.*, 2000). Los sistemas biológicos han optimizado el uso de una serie de fuerzas débiles, en gran medida por el margen dinámico que permiten. Estas fuerzas son el efecto hidrofóbico, las interacciones de van der Waals, las fuerzas electrostáticas y los puentes de hidrógeno.

2.2.1 EFECTO HIDROFOBICO

Las superficies de interacción entre proteínas son generalmente de naturaleza hidrofóbica. El esqueleto proteico es una estructura muy polar, por lo tanto, la hidrofobicidad esta dada por sus cadenas laterales hidrofóbicas. En casos particulares, la presencia de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas en una interfase entre proteínas puede ser tan abundante o más que en el núcleo de la proteína. No obstante, en promedio las interfases de las proteínas tienden a ser más polares con respecto al núcleo proteico. Una característica frecuente de los aminoácidos de naturaleza hidrofóbica en la superficie de la proteína es su tendencia a formar parches discontinuos, que son a la vez lo suficientemente pequeños como para no hacer a la proteína insoluble (Lakey *et al.*, 2000). El efecto hidrofóbico estabiliza estructuras que tienden a excluir agua de su superficie. Molecularmente, esto se ha explicado debido a que cuando se exponen superficies hidrofóbicas a un medio acuoso, las aguas formando la capa de solvatación tienen disminuida su entropía, lo cual implica una energía libre de solvatación desfavorable. Por tanto, ante la liberación de agua a la masa acuosa con alta entropía, la nueva interacción es estabilizada.

2.2.2 PUENTES DE HIDROGENO

Los puentes de hidrógeno son formados cuando dos átomos electronegativos compiten por el mismo átomo de hidrógeno. El hidrógeno se encuentra covalentemente unido al átomo donador y es atacado por el aceptor. Una interfase con tamaño promedio de $\sim 1600 \text{ \AA}^2$ oculta alrededor de 900 \AA^2 de superficie no polar y 700 \AA^2 de área polar y contiene alrededor de 10 puentes de hidrógeno (Lo

Conte *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1997). El análisis de un conjunto de proteínas diméricas con interfases $> 1000 \text{ \AA}^2$ arrojó un promedio de 0.9-1.4 puentes de hidrógeno por cada 100 \AA^2 de área oculta, aunque el número de puentes de hidrógeno varía en algunos casos de cero (*v.g.*, uteroglobina) a 46 en una variante de una glicoproteína membranal (Xu *et al.*, 1997). La mayor proporción de puentes de hidrógeno son formados por las cadenas laterales de los aminoácidos polares (alrededor del 76%).

2.2.3 INTERACCIONES ELECTROSTATICAS

La forma más fuerte de interacción electrostática está dada por la formación de puentes salinos, en la que un átomo de una cadena lateral cargado positivamente, por ejemplo la amina primaria de la lisina ($-\text{NH}_3$), atrae a un átomo cargado negativamente de otro grupo, por ejemplo el grupo carboxílico del ácido aspártico ($-\text{COO}^-$). Las cargas en la superficie de contacto se localizan de manera complementaria, y por lo tanto son de notable importancia para determinar la especificidad (McCoy *et al.*, 1997). La densidad de cargas varía de 0 a 12 grupos cargados por interfase (Xu *et al.*, 1997). La distribución de las cargas opuestas en la interfase de contacto han mostrado que los puentes salinos formados entre ellos son altamente favorables (Drozdov-Tikhomirov *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1997). Además, se ha reportado que el costo de desolvatar puentes salinos es menor cuando los grupos cargados además de tener interacciones con otras cargas, están rodeados por residuos hidrófilos (Xu *et al.*, 1997). Se ha propuesto que fuerzas atractivas de largo alcance podrían promover el encuentro y formación de

complejos, además de acelerar su velocidad de formación (Gabdolline y Wade, 1999).

2.2.4 INTERACCIONES DE VAN DER WAALS

Las interacciones de van der Waals son otro tipo de interacciones dipolares. Los átomos que no poseen un momento dipolar permanente tienen una distribución fluctuante de electrones que trae como resultado dipolos momentáneos. Esto a la vez puede inducir un dipolo en un átomo vecino, que seguirá la fluctuación en el originador. Dando como resultado fuerzas atractivas (fuerzas de dispersión de London) que pueden ocurrir entre todos los átomos. Quienes, junto con los efectos de dipolos permanentes-inducidos, dan lugar a las interacciones de van der Waals.

Las interacciones dipolares inducidas se debilitan con la sexta potencia de la distancia entre los átomos. Como resultado, las interacciones de van der Waals, sólo ocurren en un intervalo de corto alcance, inferior a 7\AA , entre los centros de los átomos. La aproximación más cercana entre dos átomos no unidos está restringido por repulsiones de corto alcance, correspondiente a la suma de los radios de van der Waals. Esto es debido al principio de exclusión de Pauli, en el que los electrones distribuidos no pueden traslaparse. Este efecto y la tendencia a mantener las moléculas de agua no necesarias lejos de la interfase, probablemente expliquen por qué las superficies de interacción proteína-proteína son tan complementarias. Las interacciones de van der Waals de esta manera son la sumatoria de muchas interacciones débiles establecidas a lo largo de una superficie, con una interacción cercana.

2.2.5 COMPLEMENTARIEDAD ESTÉRICA Y MOLÉCULAS DE AGUA EN LA INTERFASE

Las interfases en complejos proteicos contienen algunas cavidades. Usualmente estas cavidades representan el 10% del total de la interfase. La mayoría de las cavidades (aproximadamente el 60%) son ocupadas por el solvente (Hubbard *et al.*, 1994). Las moléculas de agua frecuentemente están presentes en la interfase del complejo (Davies *et al.*, 1996; Janin, 1999; Wells, 1996). El número de moléculas de agua varía usualmente de 1 a 50 (Cohen *et al.*, 1996). Las moléculas de agua en la cavidad se encuentran generalmente coordinadas (Pardanani *et al.*, 1998). Ellas forman puentes de hidrógeno con grupos proteicos y otras moléculas de agua, que trae como resultado una red acuosa alrededor de la interfase proteica (Dall'Acqua *et al.*, 1998; Janin, 1999; Xu *et al.*, 1997). Las moléculas de agua en la interfase estabilizan el complejo proteico por formación de puentes de hidrógeno adicionales, interacción con cargas y por el incremento en la forma y la complementariedad de las cargas (Janin, 1999; Larsen *et al.*, 1998; Pardanani *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1997). Este fenómeno ha llegado a ser considerado como un estabilizador proteico que en casos particulares puede tener tanta preponderancia como el efecto hidrofóbico (Janin *et al.*, 2005).

La unión proteína-proteína va acompañada por una desolvatación parcial de las superficies de contacto y esto predomina en los complejos en los que uno de los reactantes es neutro o débilmente cargado (Camacho *et al.*, 1999; 2000). En cambio, el número de aguas incorporadas a una interfase correlaciona

directamente con la polaridad de la interfase (Thornton *et al.*, 2003; Janin *et al.*, 2005).

En algunos casos, no se ha encontrado diferencia entre la estructura de los protómeros libres y cuando están formando un complejo (Thornton *et al.*, 1996; Muegge *et al.*, 1998). A este tipo de complejos se les ha descrito como sistemas que siguen una asociación tipo cuerpo rígido. No obstante, la mayoría de los casos muestran cambios estructurales significativos con la formación del complejo. Estos cambios han sido denominados como de “efecto inducido” (Betts *et al.*, 1999; Decrescenzo *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2001; McCammon, 1998; Mariuzza *et al.*, 2000). La interacción proteína-proteína puede inducir cambios en la posición de las cadenas laterales y movimiento de la cadena principal (especialmente si es un asa), o de un dominio (Betts *et al.*, 1999; Car *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 1998).

2.3 TIPOS DE COMPLEJOS PROTEICOS

Dependiendo de la estabilidad y del mecanismo de formación del complejo proteína-proteína, los complejos proteicos pueden ser subdivididos en: complejos “no obligados” , cuya disociación no involucra cambios conformacionales significativos en los protómeros (Jones y Thornton, 1996, 2000) y complejos “obligados”, cuya disociación conlleva cambios estructurales significativos en sus protómeros (Jones y Thornton, 1996, 2000). Tsai *et al.*, (1997), propusieron dos modelos generales para describir la formación de tales complejos (2 y 3 estados). El modelo de 3 estados implicaría dos protómeros que se pliegan

independientemente y posteriormente se asocian, para dar lugar a un dímero (v.g., homodímero no obligado). En cambio, en el modelo de 2 estados, 2 protómeros desplegados se pliegan cooperativamente y simultáneamente se asocian (v.g., homodímero obligado). La estructura y propiedades de interfase de unión de estos complejos son muy diferentes. Las interfases de complejos obligados tienden a ser similares a los del núcleo de una proteína (Tsai, Xu y Nussinov, 1997), es decir, existe mayor predominancia de aminoácidos hidrofóbicos. En cambio, en complejos no obligados, donde el contacto de la interfase con el solvente acuoso es total en la forma de protómeros, los aminoácidos hidrofílicos tienden a ser predominantes (Jones y Thornton, 1996).

2.4 IMPORTANCIA DE UN SISTEMA DIMÉRICO

La estructura cuaternaria de las proteínas corresponde al mayor nivel jerárquico de organización observado en macromoléculas. Las proteínas multiméricas que resultan de la formación de la estructura cuaternaria involucran la asociación de subunidades, a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. La estructura cuaternaria de una proteína puede tener importantes implicaciones para su plegamiento y la función (Jones y Thornton, 2000).

La habilidad proteica para alcanzar una estructura cuaternaria final a través de múltiples estados conformacionales transitorios es sorprendente. Los estudios energético-estructurales referentes a diferentes sistemas proteicos han demostrado una correlación directa entre su estructura y sus parámetros termodinámicos (Neet *et al.*, 1994). Otras características importantes, como lo son

superficies hidrofóbicas, cavidades internas y cavidades con moléculas de agua, distribuciones hidropáticas de residuos de aminoácidos, juegan un papel importante en el proceso de plegamiento y asociación proteica (Hubbard *et al.*, 1994; Goodfellow *et al.*, 1994).

Diversos estudios han demostrado que de los oligómeros presentes en la naturaleza, gran cantidad de éstos poseen estructura dimérica (Mei *et al.*, 2004). Tratando de entender por qué se ha optado por esta conformación preferencial con respecto a las otras estructuras cuaternarias, se han planteado diversas hipótesis. Para el caso en que cada una de las subunidades constituyentes es diferente (heterodímero), la respuesta es sencilla de formular: en este caso, se ha observado que cada una de las subunidades tiene un papel diferente; por ejemplo, una subunidad presenta una actividad catalítica y otra una actividad regulatoria. Otro escenario fácil de explicar es aquél en que las afinidades de los protómeros fueran diferentes en función de la estructura cuaternaria. No obstante, la situación se torna un tanto más intrigante en el caso de estructuras conformadas por dos subunidades idénticas (homodímeros). Una explicación funcional simple se encuentra cuando la formación de la interfase de unión entre las subunidades genera el sitio activo. Sin embargo, en la mayoría de los sistemas homodiméricos, cada una de las subunidades posee su sitio activo estructuralmente independiente. Las posibles ventajas que traería consigo una estructura dimérica fueron descritas por Monod *et al.*, (1965) en un trabajo clásico sobre regulación alostérica en enzimas. En este estudio, se enfatizó el hecho de que las asociaciones isólogas (unión de subunidades idénticas, involucrando dominios idénticos de unión) dan lugar a una estructura más compacta, con una simetría

intrínseca y probablemente una actividad potenciada. Los autores también sugirieron que la formación rápida de una estructura oligomérica *in vivo* podría evitar asociaciones azarosas de las subunidades con otras proteínas. De hecho, la separación mecánica de las subunidades en sistemas diméricos puede inducir cambios conformacionales en la estructura de los protómeros, demostrando cómo las interacciones cuaternarias pueden afectar la estructura de cada monómero (Weber, 1986; 1987). Sin embargo, esta ventaja de estabilización de la estructura activa a través de la oligomerización es más clara en los homodímeros obligados. En contraste, se ha observado que un número elevado de homodímeros no obligados son capaces de retener su función plenamente independientemente de su estado de oligomerización. En estos casos, se ha postulado que posiblemente la ventaja funcional sea el aumento de concentración de sitios activos en alguna región particular del organismo. En otros casos, ha sido sugerido incluso un comportamiento dimérico de origen “casual o aleatorio” (Nooren y Thornton, 2003).

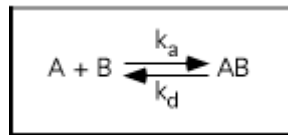
2.5 TERMODINÁMICA DE LA INTERACCIÓN PROTÉINA-PROTÉINA

Cuando estudiamos la caracterización de interacciones macromoleculares en reacciones de asociación, dos situaciones pueden ser posibles (Velásquez-Campoy *et al.*, 2004).

- 1) El complejo esté formado por dos subunidades diferentes (complejo heterodimérico).

- 2) El complejo esté formado por dos subunidades idénticas (complejo homodimérico).

El estudio de los dos tipos de sistemas requiere estrategias experimentales diferentes. Sin embargo, los principios fundamentales son los mismos en ambos casos, esto es, se rigen por el mismo esquema químico, basado en asociaciones reversibles al equilibrio.



Donde A y B son las macromoléculas interactuantes. La fuerza de la interacción está dada por la constante de asociación (K_{asoc}), o por la constante de disociación (K_{disoc}):

$$K_a = \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{1}{K_d} \dots\dots\dots(1)$$

Donde [A] y [B] son las concentraciones de los reactantes libres y [AB] es la concentración del complejo. Estas constantes están relacionadas con las energías libres de Gibbs de asociación (ΔG_{asoc}) y de disociación (ΔG_{disoc}), las cuales pueden ser expresadas en términos de las contribuciones entálpicas (ΔH) y entrópicas (ΔS) del proceso:

$$\Delta G_{asoc} = -RT \ln K_{asoc} = \Delta H_{asoc} - T\Delta S_{asoc} \dots\dots\dots(2)$$

$$\Delta G_{disoc} = -RT \ln K_{disoc} = \Delta H_{disoc} - T\Delta S_{disoc} \dots\dots\dots(3)$$

Donde R es la constante de los gases ($1.9872 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta (Kelvin). Las contribuciones entálpicas y entrópicas a la energía de Gibbs reflejan los diferentes tipos de interacciones.

Por otro lado, la determinación de ΔH_{asoc} a diferentes temperaturas nos permite obtener el cambio en la capacidad calorífica a presión constante, ΔC_p , que es definido como:

$$\Delta C_{p_{asoc}} = (\partial \Delta H_{asoc}) / (\partial T)_p \dots \dots \dots (4)$$

Alternativamente, ΔC_p puede ser estimado a partir de la dependencia de ΔS_{asoc} con respecto a la temperatura:

$$\Delta C_{p_{asoc}} = (\partial \Delta S_{asoc}) / (\partial \ln T)_p \dots \dots \dots (5)$$

2.6 LA β -LACTOGLOBULINA VARIANTE A (β LGA)

La β LGA es una pequeña proteína globular con un peso molecular de aproximadamente 18 kDa. La β LGA es la proteína sérica más abundante en la leche de los rumiantes y está presente en la leche de diversas especies monogástricas como los equinos, porcinos, cetáceos, felinos, y ausente en la leche humana.

2.6.1 ESTRUCTURA Y ORIGEN DE LA β LGA

Su estructura tridimensional fue definida hace casi una década (Brownlow *et al.*, 1997). y recientemente ha sido resuelta por RMN (Uhrinova *et al.*, 2000). El

monómero de la β LG está compuesto por 162 residuos, contiene 2 puentes disulfuro (Cys66- Cys160 y Cys106-Cys119) y un tiol libre (Cys 121), (Kontopidis *et al.*, 2002, 2004). Su diseño estructural consiste de un barril β formado por 8 hebras β antiparalelas (A-H), seguidas por una hélice α (**Fig.4**) y de otra hebra β (I) próxima al extremo C terminal, la cual forma la interfase de unión con la hebra β (I) del otro protómero (**Fig.6A**). La estructura terciaria de la β LGA muestra gran similitud con otra proteína conocida como RBP (proteína transportadora de retinol en sangre). Ambas proteínas pertenecen a la familia de las lipocalinas. Estas proteínas se caracterizan por poseer una estructura tridimensional conservada que les confiere propiedades de unión a moléculas hidrofóbicas.

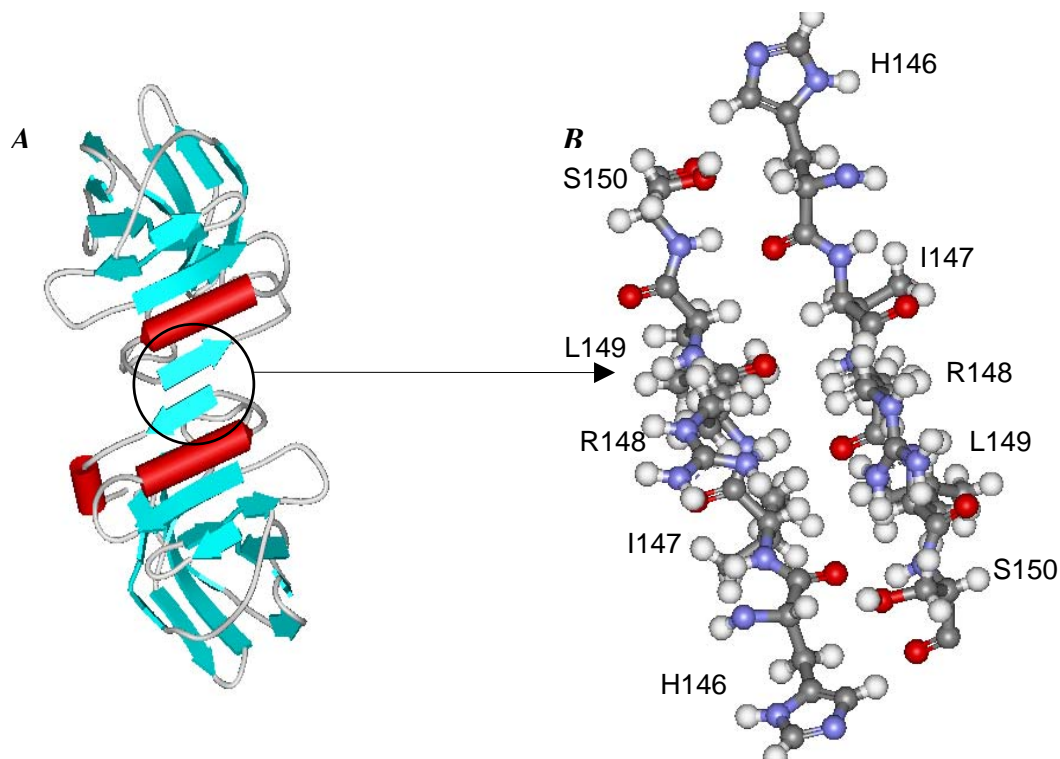


Fig.6: A) Estructura cuaternaria y B) Interfase de unión del homodímero de β LGA.

La β LGA es codificada por un gen polimórfico; hasta el momento son conocidas 6 variedades de las que destacan por su frecuencia las formas A y B. Estas variedades difieren entre sí por dos mutaciones puntuales: el Asp⁶⁴ y la Val¹¹⁸ de la variedad A, están sustituidos por Gly y Ala, respectivamente, en la variedad B. En términos estructurales, las diferencias entre esas dos variedades parecen ser despreciables (Brownlow *et al.*, 1997; Uhrinova *et al.*, 2000).

Estudios realizados a principios de la década de los 60 mediante técnicas de ultracentrifugación, de electroforesis y de dispersión dinámica de luz, dejaron establecido el patrón de agregación para la β LGA en función del pH. Dependiendo del pH, la temperatura y la concentración, la β LGA puede existir como monómero, dímero y octámero (Gottschalk *et al.*, 2003).

Bajo condiciones “fisiológicas” (pH neutro y en concentraciones >1 mM), β LGA es predominantemente un dímero (**Fig.5**). Diversos estudios estructurales han reportado una alta planaridad, una alta polaridad en la interfase de unión (**Fig.6B**) y un ocultamiento de alrededor del 6% de la área superficial de cada uno de los monómeros, con 12 puentes de hidrógeno y dos pares de iones involucrados tras la asociación (Kontopidis *et al.*, 2002; 2004). Estas interacciones específicas demostraron ser críticas para la estabilidad dimérica. A pH ácido (Sakurai *et al.*, 2001) en que la proteína tiene una carga neta de $\sim +20$, β LGA es predominantemente un monómero en condiciones libres de sal. La adición de sal apantalla la repulsión electrostática incrementando la población de dímero. A bajas temperaturas (< 4 °C) y en un intervalo de pH de 3.7-5.2, la β LGA octameriza de manera reversible, alcanzando su punto máximo a pH=4.6, justo debajo de su

punto isoeléctrico ($pI = 5.2$). En cambio, el dímero es el estado de máxima agregación de la β LGB, indicando que el residuo superficial en la posición 64 es fundamental para la octamerización.

2.6.2 LA FUNCIÓN DE LA β LGA

Aunque no se ha atribuido ninguna función biológica definitiva, la composición aminoacídica y la cantidad de β LGA presente en la leche de los rumiantes respaldan un posible papel nutricional de esta proteína. Sin embargo, su similitud en secuencia y estructura terciaria con otros miembros de las lipocalinas sugiere una función de esta proteína en el transporte de moléculas hidrofóbicas.

En 1986, Papiz *et al.*, propusieron que la función de la β LGA era el transporte de vitamina A (retinol) desde la glándula mamaria materna hasta el intestino del lactante. Esta hipótesis se veía reforzada por la gran similitud de la β LGA con la RBP, la existencia de receptores específicos para el complejo β LGA-retinol en el intestino de terneros recién nacidos y la elevada estabilidad de la β LGA en medio ácido resistiendo a la proteólisis gástrica. No obstante, estudios realizados *in vitro* muestran una asociación del retinol con otras proteínas lácteas como la seroalbúmina o la α -lactoalbúmina (Puyol *et al.*, 1991).

Por otra parte, la β LGA ha sido aislada de la leche de los rumiantes unida a diferentes ácidos grasos y triglicéridos, pudiendo tener un papel importante en el transporte de los lípidos de la leche. La composición de ácidos grasos que une la β LGA es muy similar a la que se encuentra en la fracción sérica de la leche,

indicando que no hay una selección de determinados ácidos grasos en la unión con la β LGA (Pérez *et al.*, 1989).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Todos los reactivos, así como la β LGA liofilizada 99% de pureza (No. L7880), fueron comprados a Sigma. Se preparó una disolución amortiguadora filtrada y desgasificada de 50 mM de fosfatos, pH 7.0, 0.1 M NaCl, para disolver a la proteína. El agua utilizada fue destilada y desionizada previo a la preparación de los reactivos. Se comprobó mediante electroforesis la pureza de la β LGA, por lo que se utilizó sin purificación posterior.

3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

La concentración de β LGA fue evaluada espectrofotométricamente ($0.1\% A^{280nm}=0.97$), utilizando un espectrofotómetro Beckman–Coulter DU 7500. Para ello se realizaron diluciones de dichas muestras: se tomaron 3 alícuotas de 10 μ L cada una y se llevaron a un volumen de 1 mL. Se midió absorbancia por triplicado y de forma independiente, utilizando la solución amortiguadora como blanco.

3.3 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (CTI)

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica termodinámica que permite estudiar el calor de interacción entre dos moléculas. Cuando dos moléculas se unen o se disocian, pueden generar o absorber calor. La medición de este calor permite una determinación muy precisa de la constante de unión y un perfil termodinámico de la reacción en el cual se incluyen la variación en energía libre

(ΔG), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS). En el Apéndice 1 se presentan de manera breve los principios básicos y el funcionamiento operativo del calorímetro.

3.3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se realizó en un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal). Las soluciones de la proteína β LGA fueron preparadas disolviendo directamente la proteína liofilizada en el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 con NaCl 0.1 M, poco antes de realizar los experimentos para asegurar estabilidad. La solución proteica fue exhaustivamente diafiltrada utilizando una membrana de polisulfonato (10,000 PM), en un equipo de diafiltración (Amicon).

Los valores del parámetro adimensional c en todos los casos estuvieron entre 40 y 70 (ver Apéndice 1.1). El intervalo de temperatura evaluada fue de 15 a 35 °C. Los volúmenes de inyección típicamente fueron de 4 μ L y se asignó un tiempo de 4 minutos entre inyecciones, período suficiente para que la señal regresara a la línea base. Los calores obtenidos en las últimas adiciones experimentales fueron considerados como equivalentes a calores de dilución de la proteína.

3.4 ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS

Además del método calorimétrico existe una variedad de técnicas con las que es posible estudiar el proceso de asociación proteica. Estas técnicas experimentales abarcan diferentes aspectos que dependen de la conformación de las proteínas, como lo son cambios en el radio hidrodinámico de la molécula (viscosidad o

dispersión de luz), pérdidas de epítopes (anticuerpos monoclonales) o cambio del ambiente de cromóforos (fluorescencia o dicroísmo circular).

Todos estos métodos presentan una fuerte limitante frente al método calorimétrico, ya que la determinación de los parámetros energéticos (ΔH_{asoc} y K_{asoc}), a diferencia del método calorimétrico, son obtenidos de manera indirecta y generalmente con mayor incertidumbre. Sin embargo, las técnicas no calorimétricas siguen siendo utilizadas por una razón de peso, y es que es posible inferir aspectos estructurales importantes acerca del evento de asociación proteica.

En este trabajo, hemos estudiado el proceso de asociación de la β LGA inducido por concentración a través de dos potentes técnicas espectroscópicas: dicroísmo circular (DC) y espectroscopía de fluorescencia intrínseca. En los apéndices 2 y 3 se presentan de manera breve los principios básicos de estas técnicas.

3.4.1 FLUORESCENCIA INTRÍNSECA

Las proteínas con fluorescencia intrínseca poseen un espectro de emisión particular, reflejo de su contenido de residuos aromáticos y de la posición de éstos dentro de su estructura, lo cual da la pauta apropiada para determinar si durante la asociación ocurren cambios estructurales significativos (ver Apéndice 2).

3.4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Con la finalidad de observar si ocurrían cambios significativos en la estructura terciaria de β LGA tras su asociación, los cuales pudieran alterar el ambiente de los aromáticos, se monitorearon los cambios en el espectro de emisión de

fluorescencia usando un espectrofluorofotómetro ISS PCI Photon Counting Spectrofluorometer /SS en función de la concentración total de proteína. Se utilizó como blanco un amortiguador de fosfatos 50mM NaCl 0.1M pH 7.0, mismo que se empleó en todos los experimentos. Las condiciones experimentales para todos los casos fueron rendijas de 0.5 nm y 1.0 nm para excitación y emisión respectivamente, $\lambda_{exc} = 295$ nm y el espectro de emisión se cuantificó de 300 a 400 nm a 25 °C. Se utilizó una celda de cuarzo (Starna 3/I/10) con un paso de luz de 10 mm de forma rectangular y de 3500 μ L de capacidad.

3.4.3 DICROÍSMO CIRCULAR

El dicroísmo circular (ver Apéndice 3) ha sido ampliamente utilizado para estudiar la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. Por lo tanto, la perturbación de tales estructuras proteicas debido a los cambios conformacionales sufridos tras la asociación proteica pueden ser monitoreadas mediante esta técnica.

3.4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se realizaron experimentos de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano (250 a 350 nm) con la intención de observar si existían cambios en la estructura terciaria de la β LGA ocasionados debido al proceso de asociación de sus protómeros. Se realizaron experimentos a diferentes concentraciones, recordando que la β LGA a pH neutro y a bajas concentraciones es predominantemente un monómero, desplazándose su equilibrio hacia la forma dimérica a altas concentraciones. Se siguió la señal de DC en un espectropolarímetro Jasco J-720. Se tomaron tres

barridos para cada espectro de dicroísmo circular, se promediaron y se obtuvo el espectro final. Se restó la señal del amortiguador a los espectros de dicroísmo y se transformaron a valores de elipticidad molar. Las soluciones de proteína fueron preparadas a partir de diluciones de la solución madre en amortiguador de fosfatos 50mM NaCl 0.1M pH 7.0, mismo que se empleó en todo el experimento. Las concentraciones de proteína fueron de 0.011, 0.027, 0.051, 0.102, 0.204 y 0.408 mM. Las celdas que se utilizaron fueron de 0.1, 0.5 y 1.0 cm de recorrido óptico.

3.5 MODELOS DE ÁREAS SUPERFICIALES

Se determinó el área superficial accesible al solvente (*ASA*) para el dímero y los monómeros de la β LGA, haciendo uso del programa NACCESS (Hubbard y Thornton, 1993). Para ello se utilizó un radio prueba de 1.4 Å y cortes en las moléculas de 0.1 Å. Los cambios totales del *ASA* para el proceso de unión se estimaron como la diferencia entre el complejo formado y la suma de las moléculas libres:

$$\Delta ASA_{complejo} = ASA_{complejo} - (ASA_{proteína} + ASA_X) \dots \dots \dots (6)$$

Los ΔASA_p (cambios en accesibilidad de superficies polares) se calcularon como el cambio en la accesibilidad de los átomos de nitrógeno y oxígeno en las estructuras analizadas. Los ΔASA_{np} (cambios en accesibilidad de superficies no polares) se calcularon como el cambio en la accesibilidad de carbono y azufre. Los cálculos se realizaron usando las coordenadas cristalográficas de la β LGA a 1.8 Å de resolución, con código de acceso pdb *1beb*. Dado que los átomos de hidrógeno

típicamente no se resuelven en la estructura cristalográfica de una proteína, las áreas de estos átomos no se consideraron en los cálculos de ASA (para una explicación más detallada sobre la parametrización ver Apéndice 4).

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA Y OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA DIMERIZACIÓN DE LA β LG A.

Convencionalmente la calorimetría de titulación isotérmica se ha aplicado al estudio de la formación de complejos heterodiméricos. Sin embargo, los sistemas de autoasociación como los homodímeros de proteína requieren de otra estrategia experimental, dada la imposibilidad física de tener por separado a los dos protómeros. Como estrategia alternativa, se estudió el proceso de disociación de la β LGA. Bajo este protocolo experimental, el propósito central es inducir la disociación del dímero a través de la perturbación del equilibrio por dilución de una solución de proteína concentrada (Burrow *et al.*, 1994).

Tratando de disminuir la incertidumbre experimental, en todos los experimentos realizados se siguieron protocolos de dilución similares. La **Fig.7** presenta un ejemplo de una corrida calorimétrica para el proceso de disociación a 25 °C. El procedimiento particular se detalla a continuación:

- 1) Una solución de β LGA en alta concentración (aproximadamente 1.3 mM) se colocó en la jeringa de inyección del microcalorímetro VP-ITC, mientras que la celda de reacción se cargó con una solución amortiguadora con condiciones idénticas a las de la proteína.
- 2) Se corrió un programa de inyecciones secuenciales (típicamente 45) de pequeñas alícuotas de proteína concentrada (típicamente 4 μ L) a la solución amortiguadora. Las primeras adiciones llevan al sistema a una disociación acentuada, requiriéndose energía para tal proceso (endotérmico), dado que los picos resultantes del termograma son positivos (**Fig.7A**).

1) Conforme la concentración de proteína en la celda calorimétrica se incrementa por la adición secuencial de alícuotas, el proceso de disociación se ve cada vez menos favorecido. Esto se debe a que con el aumento gradual de proteína se forman cada vez más dímeros en la celda de reacción, los cuales cancelan progresivamente el número de dímeros que se disocian por la dilución de la solución de proteína inyectada. Por tanto, con cada adición se da lugar a señales calóricas cada vez más pequeñas. Esto provoca que la señal presente un comportamiento asintótico. En principio, la señal debería tender a un valor de cero. Sin embargo, como puede ser observado en la **Fig. 7A**, llega un momento en que la señal pasa por el cero, y se vuelve negativa. Estas señales negativas corresponden a los calores propios de la dilución de la proteína, los cuales deben ser restados a la curva de disociación para poder hacer el análisis de los datos. Siguiendo lo sugerido por Burrow *et al.*, (1994), se tomaron los últimos calores experimentales como el valor correspondiente al calor de dilución, la resta del calor de dilución solo es válido para sistemas para los que el equilibrio monómero-dímero sea reversible y no involucre la formación de agregados, como ha sido reportado para la β LGA (Uhrinova *et al.*, 2000; Galani y Apenten *et al.*, 2000; Apenten *et al.*, 2002).

2) Del termograma crudo, se procedió a obtener la curva isotérmica de disociación, a través de la integración de las áreas bajo los picos de cada adición. Una vez corregidos estos calores por el calor de dilución, se procedió a hacer el ajuste no lineal de un modelo de disociación simple (**Figura 7B**):

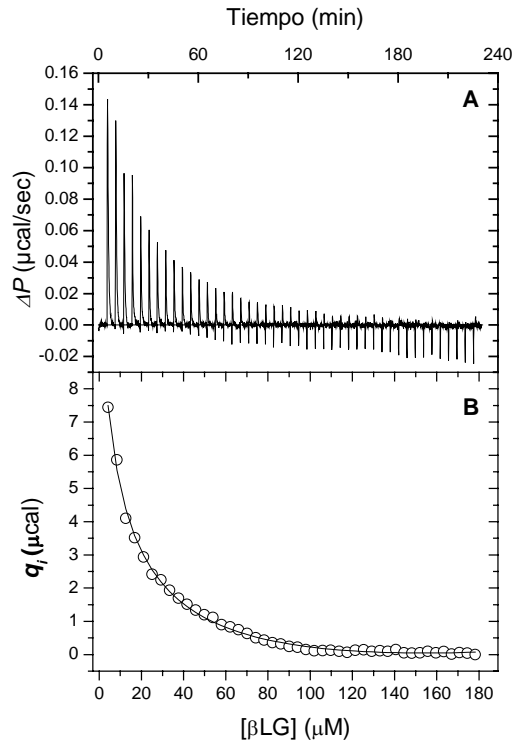


Fig.7: Perfil calorimétrico de la disociación del homodímero de la β LGA A) Termograma crudo. B) Isotherma de disociación corregida por calor de dilución 1.28 mM β -lg, pH 7.0, 0.05M fosfatos, 0.1M NaCl, 25 °C, 45 inyecciones de 4 μ L cada una.

Se realizaron experimentos a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 y 35°C). Las isotermas de disociación obtenidas son mostradas en la **Fig.8**.

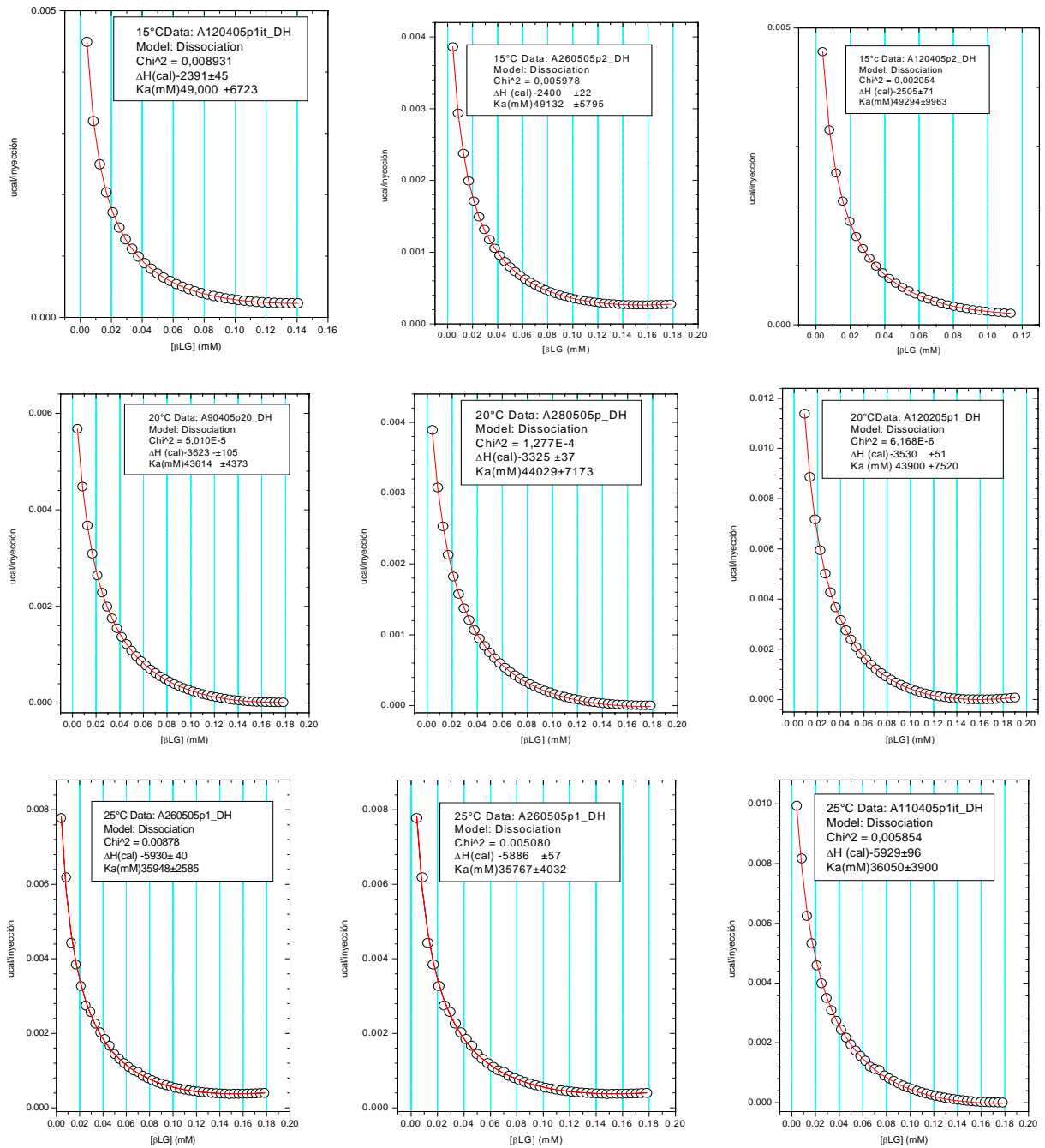


Fig.8: Continúa en la siguiente página.

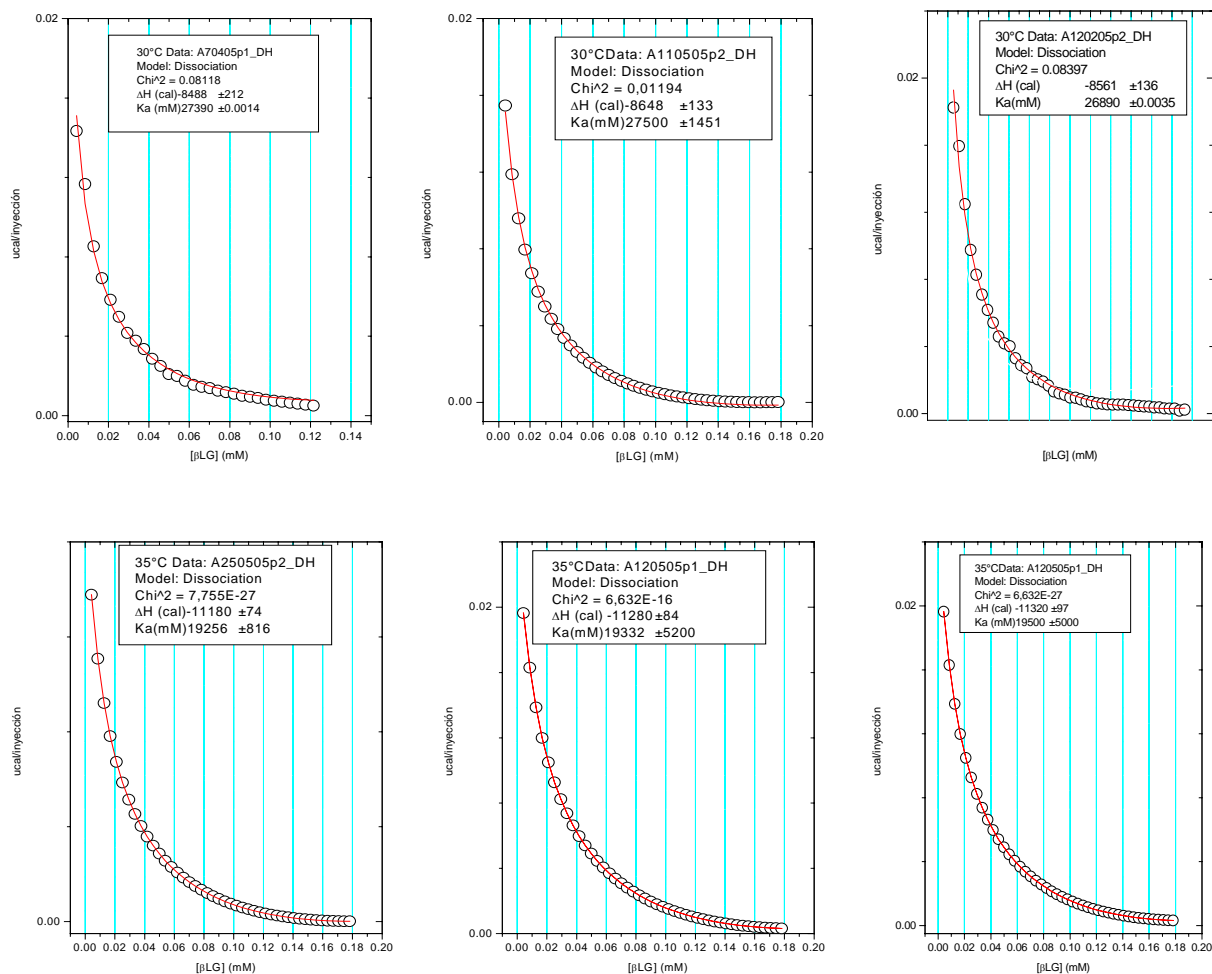


Fig.8: Isothermas de disociación de la β LG corregidas por calor de dilución a diferentes temperaturas: 15, 20, 25, 30 y 35°C. Se realizaron experimentos por triplicado, utilizando en cada caso muestras proteicas preparadas de manera independiente.

Los experimentos se realizaron al menos por triplicado (muestras de proteína preparadas de manera independiente) para cada una de las temperaturas. Los resultados para cada experimento se muestran en la **Tabla 1**. Como puede ser observado, existe una reproducibilidad satisfactoria de los parámetros termodinámicos entre diferentes experimentos a la misma temperatura.

Temperatura	$K_{asoc}M^{-1}$	$\Delta G_{asoc}cal/mol^{-1}$	$\Delta H_{asoc}cal/mol^{-1}$	$T\Delta S_{asoc}cal/mol^{-1}$
15°C	49000 ± 6723	-6185	-2391 ± 45	3795
15°C	49294 ± 9963	-6178	-2505 ± 71	3673
15°C	49132±5795	-6193	-2400 ± 22	3792
20°C	43614 ±4377	-6226	-3623 ± 105	2696
20°C	44029 ±7173	-6185	-3325 ±37	2860
20°C	43900 ±7520	-6202	-3530 ± 51	2579
25°C	36050±3900	-6211	-5929 ± 96	886
25°C	35767 ±4032	-6217	-5886 ± 57	1231
25°C	35948 ±2585	-6215	-5930 ± 40	912
30°C	26890 ±2531	-6186	-8561 ± 136	-1971
30°C	27390±1051	-6120	-8488 ± 212	-2239
30°C	27500 ±1451	-6150	-8648±133	-2622
35°C	19500 ±760	-6018	-11320 ± 97	-5278
35°C	19256 ±816	-6071	-11180 ± 74	-5188
35°C	19332 ±748	-6042	-11280 ± 84	-5178

Tabla 1: Parámetros termodinámicos de la formación del homodímero de la β LGa a diferente temperatura.

Para conocer las incertidumbres reales en la determinación de los parámetros termodinámicos, se obtuvo un promedio de los experimentos para cada temperatura (**Tabla 2**).

Temperatura	ΔG_{asoc}	ΔH_{asoc}	$T\Delta S_{asoc}$	K_{asoc}
°C	cal mol ⁻¹	cal mol ⁻¹	cal mol ⁻¹	M ⁻¹ x 10 ⁻³
15	-6175 ± 9	-2432 ± 350	3753 ± 370	48 ± 75
20	-6204 ± 20	-3492 ± 153	2712 ± 141	42 ± 63
25	-6214 ± 4	-5915 ± 243	299 ± 314	36 ± 52
30	-6152 ± 33	-8566 ± 293	-2414 ± 327	27 ± 17
35	-6044 ± 39	-11260 ± 85	-5216 ± 124	19 ± 7

Tabla 2: Parámetros termodinámicos promedio de la formación del homodímero de la β LGGA a diferentes temperaturas.

La **Tabla 2** muestra que a lo largo de todo el intervalo de temperatura, el proceso de dimerización de la β LGGA es entálpicamente conducido, en tanto que entrópicamente se ve favorecido a bajas temperaturas y desfavorecido a altas temperaturas. Además, como es regla para procesos exotérmicos, la constante de asociación decrece conforme la temperatura aumenta. Se observa que el ΔG_{asoc} cambia poco con respecto a la temperatura, debido a una acentuada compensación en la variación de la entalpía y la entropía. Otro rasgo importante es que el ΔG_{asoc} presenta un máximo en su valor alrededor de los 25 °C. Termodinámicamente, se espera que el máximo de estabilidad ocurra cuando la afinidad esté dada exclusivamente por el componente entálpico, es decir, cuando $\Delta S_{asoc} = 0$. Como puede observarse en la **Tabla 2**, este es el caso para la β LGGA.

Las **Fig.9 y 10** muestran las dependencias de la entalpía y la entropía con respecto a la temperatura. A partir de estos datos, el ΔC_p de asociación ($\Delta C_{p_{asoc}}$) fue calculado $\Delta C_{p_{asoc}} = (d\Delta H_{asoc}/dT) - T(d\Delta S_{asoc}/dT)$. Como puede observarse en las figuras, se obtiene una magnitud semejante de $\Delta C_{p_{asoc}}$ a través del análisis de ambas funciones

termodinámicas, lo cual puede tomarse como un indicador interno de la calidad de las determinaciones experimentales.

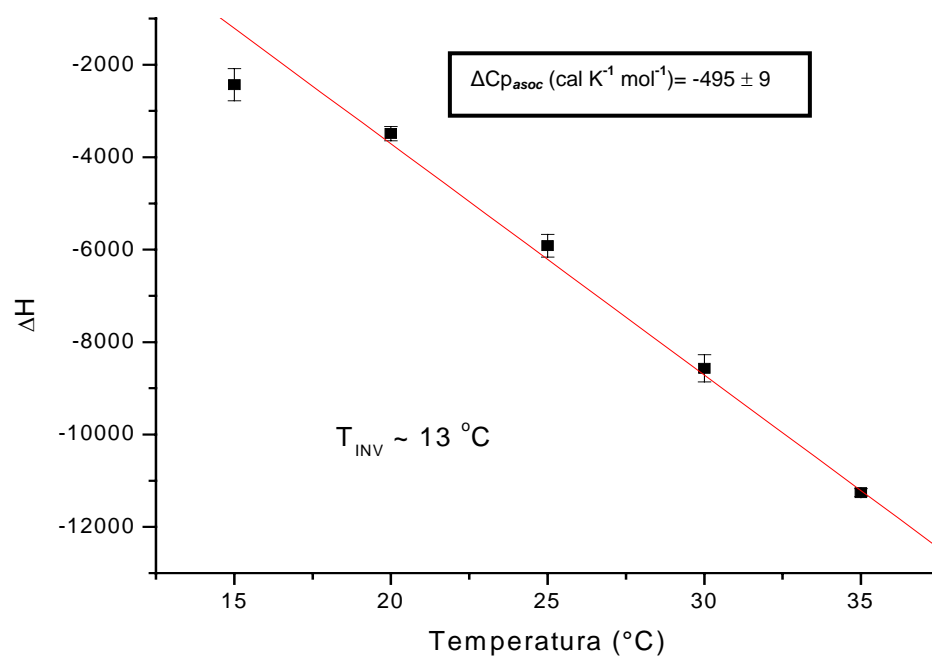


Fig.9: Dependencia de la entalpía con respecto a la temperatura.

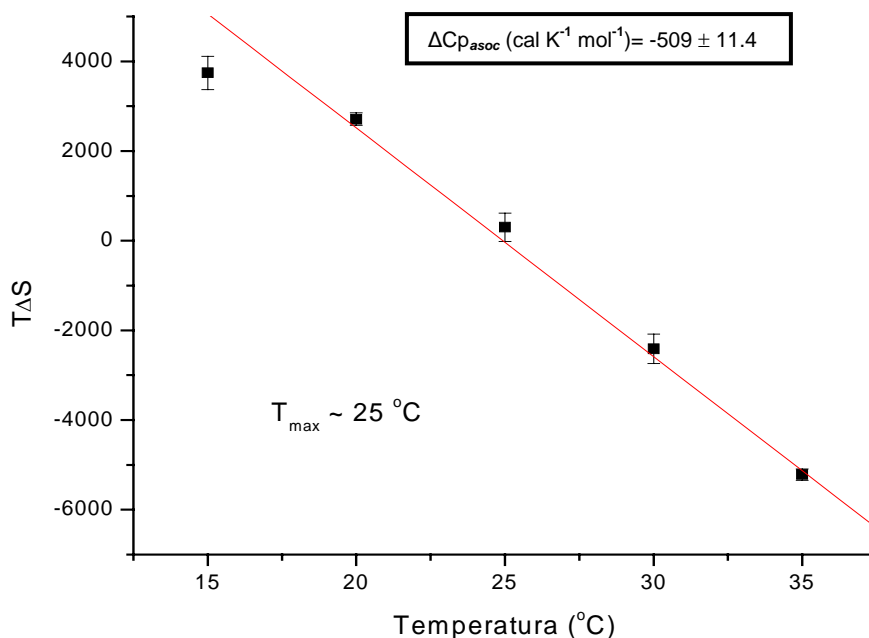


Fig.10: Dependencia de la entropía con respecto a la temperatura.

De la **Figura 10**, es posible determinar con precisión el punto de inversión de la entropía de unión (*i.e.*, cuando $\Delta S_{asoc} = 0$), lo cual corresponde a la temperatura de mayor estabilidad del sistema ($T_{m\acute{a}x}$). En este caso, $T_{m\acute{a}x}$ resultó de 23.4 °C.

La **Figura 11** muestra de manera general el comportamiento de ΔG_{asoc} , ΔH_{asoc} y ΔS_{asoc} en función de la temperatura. Podemos observar cómo tanto la entalpía (ΔH_{asoc}) como la entropía (ΔS_{asoc}) son fuertemente dependientes de la temperatura, mientras que la energía libre de Gibbs (ΔG_{asoc}) presenta cambios muy pequeños, lo cual se explica debido al comportamiento compensatorio en los cambios de entalpía y entropía.

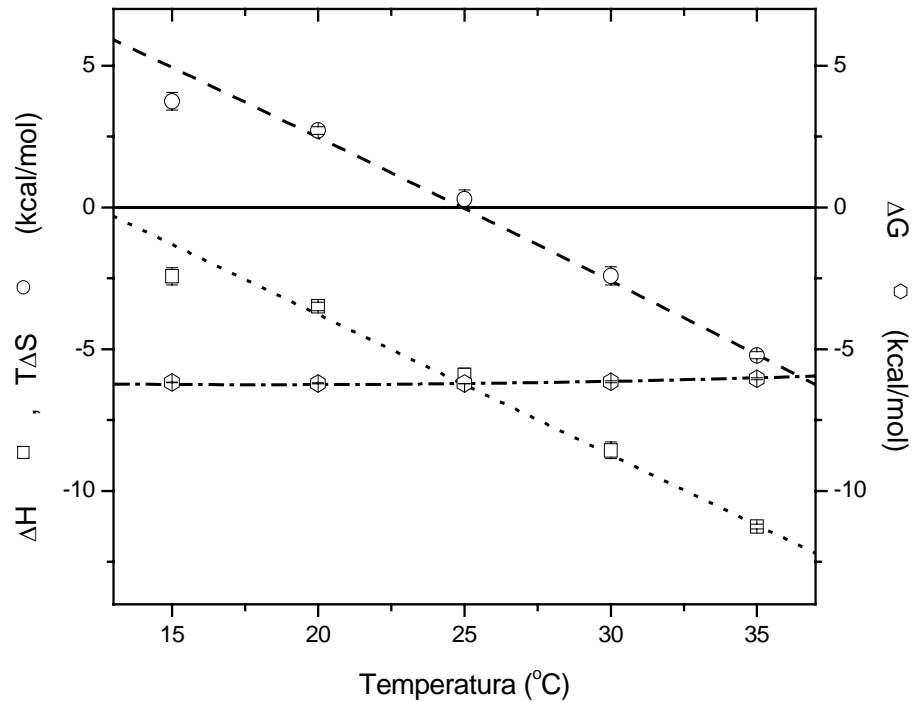


Fig.11. Perfil termodinámico de la formación del dímero de la β LGA en función de la temperatura.

El comportamiento auto-asociativo de la β LGA ha sido estudiado ampliamente desde hace más de tres décadas por diferentes técnicas, pero una de las técnicas que más ha profundizado en su estudio es la sedimentación al equilibrio. En la **Tabla 3** se muestra una recopilación de parámetros termodinámicos obtenidos para la β LGA mediante sedimentación al equilibrio, haciendo referencia al pH y la fuerza iónica en la que se realizaron.

pH	[NaCl]	ΔG_{asoc} cal mol ⁻¹	ΔH_{asoc} cal mol ⁻¹	$T\Delta S_{asoc}$ cal mol ⁻¹	K_{asoc} M ⁻¹ x 10 ⁻³	Ref.
8.2	0.13	-6.29	ND	ND	49	1
7.5	0.10	-5.63	ND	ND	16	5
7.0	0.10	-6.27	-15.52	-9.25	47	2
6.9	0.13	-6.29	ND	ND	49	1
6.5	0.10	-6.35	ND	ND	54	3
6.5	0.02	-7.11	ND	ND	203	4
5.2	0.10	-8.08	-6.91	1.17	1058	2

Tabla 3: Recopilación de datos de Ultracentrifugación de la dimerización de la β LGA reportados en la literatura. 1) Zimmerman et al., 1970 2) Kelly y Reithel, 1971 3) Sakai et al., 2000 4) Sakurai y Goto, 2002 5) McKenzie y Sawyer, 1967.

Podemos observar cómo la constante de asociación se incrementa a medida que nos acercamos al punto isoeléctrico de la β LGA, debido posiblemente a que la carga global de la proteína se acerca a la neutralidad, disminuyendo la repulsión electrostática y favoreciendo la asociación. En contraste, a pH neutro y ligeramente alcalino la constante de asociación muestra un comportamiento independiente de la concentración de protones, implicando a su vez que en esas condiciones la dimerización no es un proceso ligado al intercambio de protones con el solvente. Una manera de demostrar calorimétricamente que no hay intercambio de protones es realizando experimentos que involucren amortiguadores con diferentes entalpías de ionización (ΔH_{ion}). La entalpía observada (ΔH_{obs}) variará en función del número de protones intercambiados, v .

$$\Delta H_{obs} = v\Delta H_{ion} + \Delta H_{int} \dots \dots \dots (9)$$

donde ΔH_{int} es la entalpía intrínseca de dimerización. El experimento calorimétrico realizado usando amortiguador Tris ($\Delta H_{ion} = 11.3 \text{ kcal mol}^{-1}$), mostro un $\Delta H_{obs} \sim 2 \text{ kcal mol}^{-1}$ menos negativo que el obtenido con amortiguador de fosfatos ($\Delta H_{ion} = 0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$)

¹). De acuerdo a esto, ν es pequeño (~ 0.2), descartándose por tanto efectos significativos de protonación en la energética de homodimerización a pH neutro.

A diferencia de la K_{asoc} , el ΔH_{asoc} y el ΔS_{asoc} obtenidas calorimétricamente difieren significativamente de los obtenidos mediante sedimentación al equilibrio. Estas diferencias podrían deberse a variaciones en las condiciones experimentales y/o a la fuerte compensación de la entalpía-entropía observada en la **Fig.11**, lo cual hace difícil la determinación de la entalpía de asociación a través de un análisis de van't Hoff. Usando datos de sedimentación al equilibrio, (Sakurai *et al.*, 2001) obtuvieron valores de ΔC_p a pH 3.0 de $-461 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ en NaClO_4 . Además, a partir de datos obtenidos por Joss y Ralston, (1996) para βLGB a pH 2.6, se estimó un ΔC_p de $-704 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Aunque ambas determinaciones del ΔC_p difieren significativamente una del otro, los dos caen en el mismo orden de magnitud del obtenido en este estudio.

4.2 MODELOS DE ÁREA SUPERFICIAL

Se ha encontrado que el ΔC_p es proporcional al área de contacto entre las moléculas que forman el complejo. Estas áreas pueden estimarse para la βLGA empleando las estructuras tridimensionales del dímero y los monómeros, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$\Delta ASA_{complejo} = ASA_{complejo} - (ASA_{monómero A} + ASA_{monómero B}) \dots \dots \dots (10)$$

El análisis de la estructura cristalográfica del dímero de βLGA , rindió los siguientes valores de ASA (Å^2) para cada especie involucrada:

β LGA	ASA_{np}	ASA_p
Dímero	8531	6333
Monómero A	4598	3445
Monómero B	4472	3407
ΔASA	-539	-517

Tabla 4. Cálculo del área accesible al solvente, empleando la estructura cristalográfica de la β -lg obtenida a pH 6.5 (PDB ID: 1beb).

Murphy y Freire (1992) han reportado un modelo de área superficial para ΔC_p , de acuerdo con la siguiente parametrización obtenida del análisis de dipéptidos cíclicos:

$$\Delta C_p = -0.26 \Delta ASA_p + 0.45 \Delta ASA_{np} \dots \dots \dots (11)$$

Usando estos parámetros y los cambios de áreas de la β LGA, se estimaría un ΔC_p de -113 cal K⁻¹ mol⁻¹, el cual es significativamente inferior al determinado experimentalmente (-495 cal K⁻¹ mol⁻¹).

Tratando de encontrar las posibles causas de tal diferencia, realizamos una caracterización espectroscópica, con el afán de indagar si ocurren rearrreglos estructurales significativos que ocasionen una diferencia tan notable en los valores de ΔC_p .

4.3 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

Una exploración de la estructura tridimensional del dímero de la β LGA revela, que no existe la participación de aminoácidos aromáticos en la interfase de unión de los

protómeros (**Fig.12**). Por tanto, la señal de estos residuos puede ser convenientemente evaluada, para revelar si existen rearrreglos estructurales más allá de la zona de contacto. La β LGA posee dos triptofanos, de los cuales el Trp¹⁹ se encuentra inmerso en el núcleo de la proteína, mientras que el Trp⁶¹ se encuentra al final de la hebra β C, estando parcialmente expuesto al solvente a pH ácido y totalmente expuesto a pH neutro. La disposición de estos residuos ha permitido utilizarlos en numerosos estudios como sondas altamente sensibles de los rearrreglos estructurales inducidos por numerosos factores incluyendo temperatura (Mills, 1976; Matsuura *et al.*, 1994; García-Hernández *et al.*, 1998), pH (Renard *et al.*, 1998; Taulier y Chalikian, 2001), presión (Dufour *et al.*, 1994; Ikeuchi *et al.*, 2001), sal (Renard *et al.*, 1998), agentes caotrópicos (Molinari *et al.*, 1996) y unión de ligandos (Muresan *et al.*, 2001).

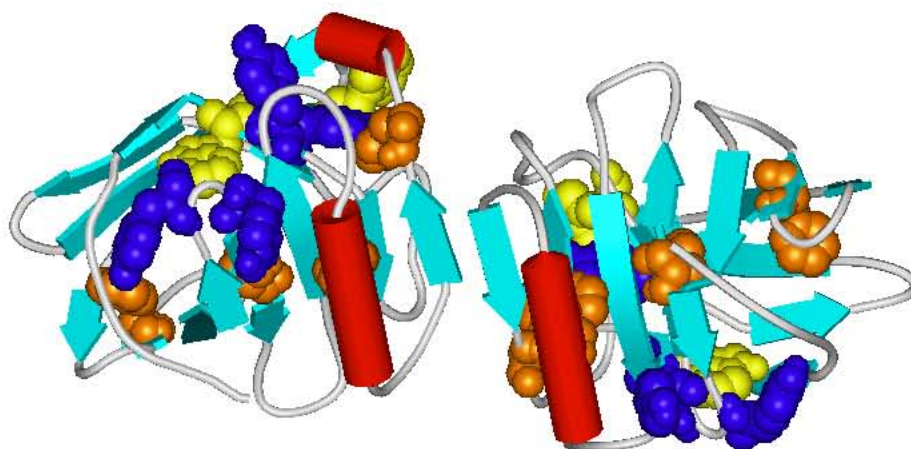


Fig.12. Representación esquemática de la estructura 3D del dímero de la β LGA (pdb 1beb), en la que se resalta la posición de los residuos de triptófano (amarillo), tirosina (azul) y fenilalanina (naranja).

En la **Figura 13** delinea el porcentaje de monómeros formando dímero en función de la concentración de proteína, calculado de acuerdo con el valor de $K_{asoc}(25\text{ }^{\circ}\text{C})$ descrito en la **Tabla 2**. La **Figura 14A** muestra los espectros de emisión de la β LGA a diferentes

concentraciones y la **Fig. 14B** el comportamiento de la intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de proteína. Podemos observar que se exhibe un comportamiento lineal sólo por debajo de 0.8 mg/ml. De acuerdo a la **Fig. 13**, a esta concentración el porcentaje de dímero es de tan sólo 32%. Arriba de esta concentración, la linealidad desaparece, demostrando lo sensible que es esta técnica a concentraciones altas de proteína debido a efectos de filtro interno. Por tanto, estos resultados no pueden ser utilizados de manera contundente para saber si existen rearrreglos conformacionales debido al proceso de dimerización, dado el reducido intervalo de concentración que fue posible muestrear. Por lo que recurrimos a la realización de experimentos de dicroísmo circular (DC), dado que es una técnica menos sensible a efectos laterales surgidos de la variación en la densidad óptica de la solución, permitiendo trabajar en un intervalo más amplio de concentraciones. Los espectros de dicroísmo circular en el uv cercano obtenidos usando diferentes concentraciones de proteína son mostrados en las **Figuras 15 y 16**.

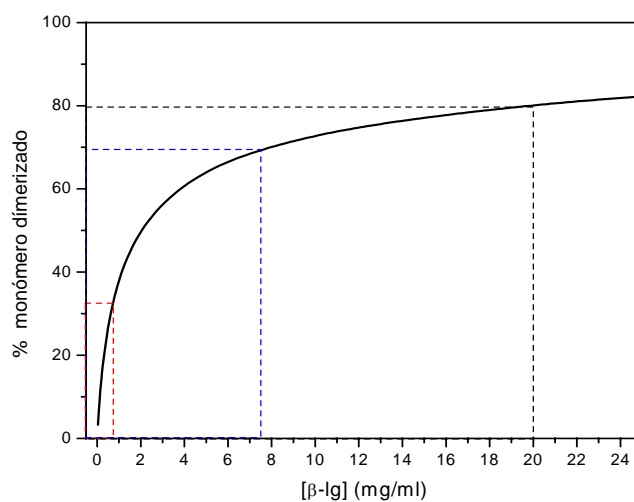


Figura 13: Porcentaje de dímero versus concentración de βLGA a 25°C.

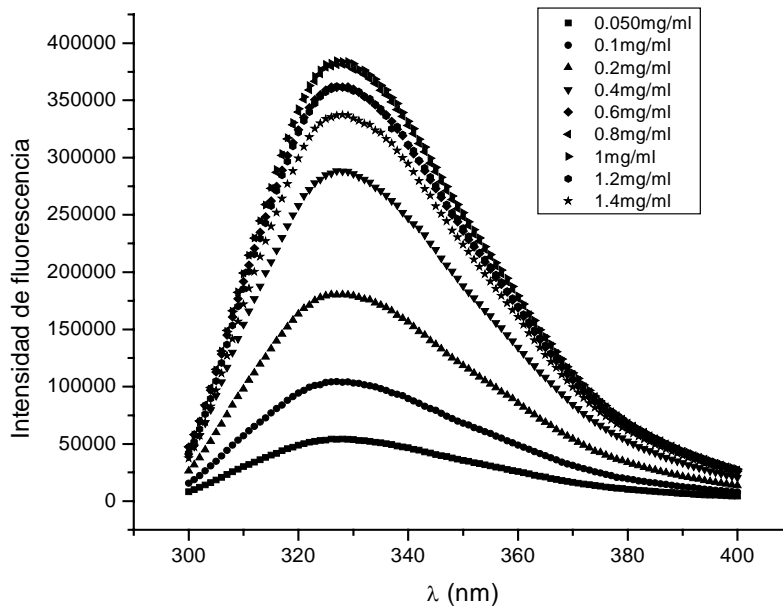


Figura 14A: Espectros de emisión de la β LGA. Se muestran los espectros de emisión a diferentes concentraciones de β LGA, $\lambda_{excitación}= 295$

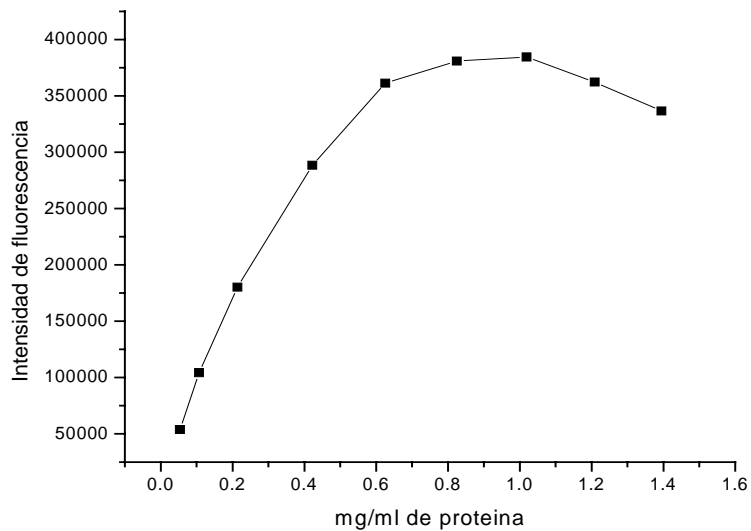


Figura 14B: Comportamiento de la intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de proteína a 25°C, pH= 7, $\lambda_{excitación}= 295$ y $\lambda_{emisión}= 328$

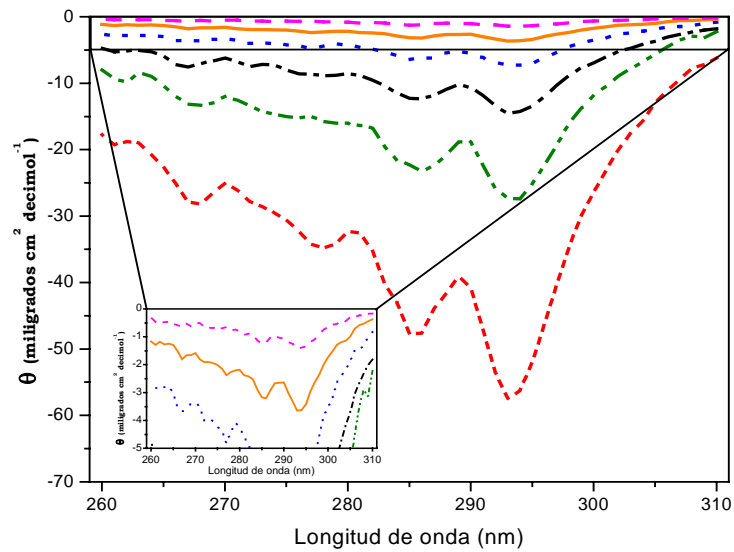


Figura 15: Espectros crudos del comportamiento de la señal de DC en función de la concentración de β LGA a pH 7.0, 25 °C.

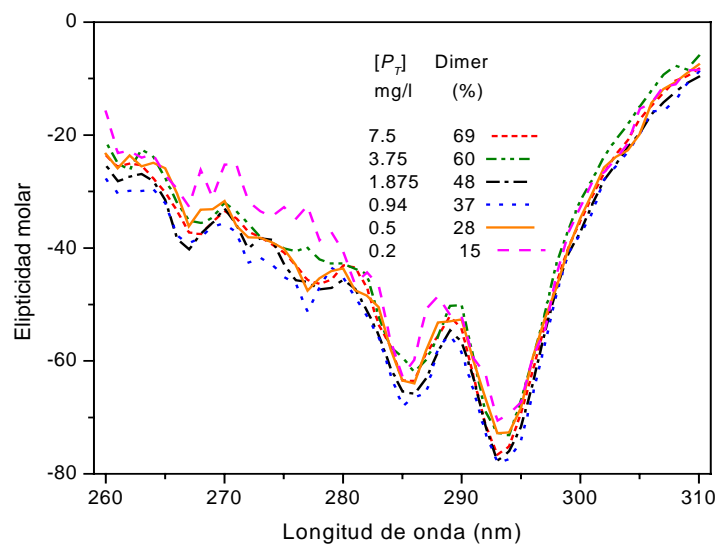


Figura 16: Espectros normalizados por concentración de proteína del comportamiento de la señal de DC en función de la concentración de β LGA a pH 7.0, 25 °C.

En la **Figura 15** se muestran los espectros crudos de DC. En la **Figura 16** se puede ver que, dentro de la incertidumbre experimental, la elipticidad molar tuvo un comportamiento independiente de la concentración de proteína. En este caso, la fracción de monómeros formando dímeros varió en un intervalo de 15 a 69% (**Fig. 13**). Por lo consiguiente, los resultados sugieren que el equilibrio monómero-dímero a pH neutro no va acompañado por cambios significativos en la estructura terciaria. Esta conclusión concuerda con evidencias previas que indican que la afinidad de la β LGa hacia moléculas hidrofóbicas no depende del grado de dimerización de la proteína (Zimmerman *et.al.*, 1970). Recientemente, D'Alfonso *et al.* (1999) reportaron que la dimerización no afecta la fuerza de la interacción de la β LGa con el ANS.

4.4 ACOPLAMIENTO DE LA DIMERIZACIÓN DE LA β LGa, INTERCAMBIO DE CONTRAIONES Y MOLÉCULAS DE AGUA

De acuerdo a Record *et al.* (1978), el número de contraiones intercambiados en un proceso de asociación molecular, Δn , puede ser determinado evaluando la dependencia de la constante de equilibrio con respecto a la fuerza iónica de la solución, I :

$$\Delta n = \frac{\partial \log K_{asoc}}{\partial I} \dots\dots\dots(12)$$

Utilizando NaCl en un intervalo de concentración de 50-300 mM se realizaron experimentos calorimétricos a pH neutro en amortiguador de fosfatos 50 mM (**Figura 17**), el comportamiento de la K_{asoc} fue apreciablemente constante con respecto a la fuerza iónica. La pendiente observada es consistente con un intercambio de $\sim 0.06 \pm 0.36$ contraiones. Estos resultados concuerdan con estudios previos que indican que el

equilibrio monomero/dímero de β LGA es moderadamente sensible a las variaciones en la fuerza iónica a pH neutro (Kelly y Reithel, 1971; Verheul *et al.*, 1999).

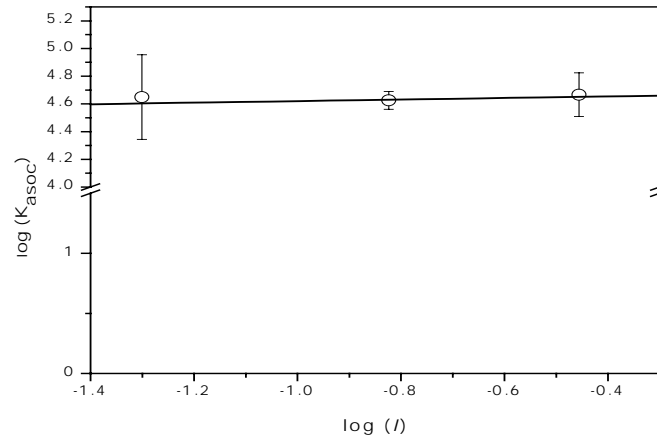


Figura 17: Constante de asociación en función de la fuerza iónica. La pendiente de $\log(K_{asoc})$ versus $\log(I)$ corresponde al número de contraiones incorporados ante la formación del dímero de β LGA.

4.4.1 ESTRÉS OSMOTICO

Se realizaron estudios de estrés osmótico con el objetivo de medir los efectos de hidratación asociados a la dimerización de la β LGA. Los osmolitos decrecen la actividad del agua, ejerciendo un efecto diferencial sobre la constante de equilibrio para asociaciones que liberan o capturan moléculas de agua (Parsegian *et al.*, 1995; Kiser *et al.*, 2005). El número aparente de aguas intercambiadas (ΔN) puede estimarse a partir de:

$$\Delta N = -55.6 \frac{\partial \ln K_{asoc}}{\partial [osmol]} \dots\dots\dots (13)$$

donde $[osmol]$ es la osmolalidad de la solución. Un requisito importante para realizar estudios de estrés osmótico, es que el osmolito quede excluido del sitio molecular de

interés. Titulaciones calorimétricas de β LG (>1 mM) con sacarosa o con acetamida (2M), dos osmolitos con propiedades químicas muy distintas, mostraron un comportamiento calórico característico de calores de dilución, indicando que no existen interacciones preferenciales de los osmolitos con la proteína. Considerando lo anterior, estos osmolitos fueron elegidos como agentes estresantes. Como se puede observar en la **Fig. 18**, conforme la concentración del agente estresante se incrementa, la constante de asociación va disminuyendo progresivamente. Esta observación es consistente con la captura de moléculas de agua con la formación del dímero. Un análisis de regresión lineal de los datos obtenidos para la sacarosa y acetamida mostrados en la **Fig. 18** proporciona un ΔN de $\sim 36 \pm 2$ y $\sim 33 \pm 2$, respectivamente. Del ajuste global de estos datos se obtiene un total de 36 ± 3 moléculas de agua.

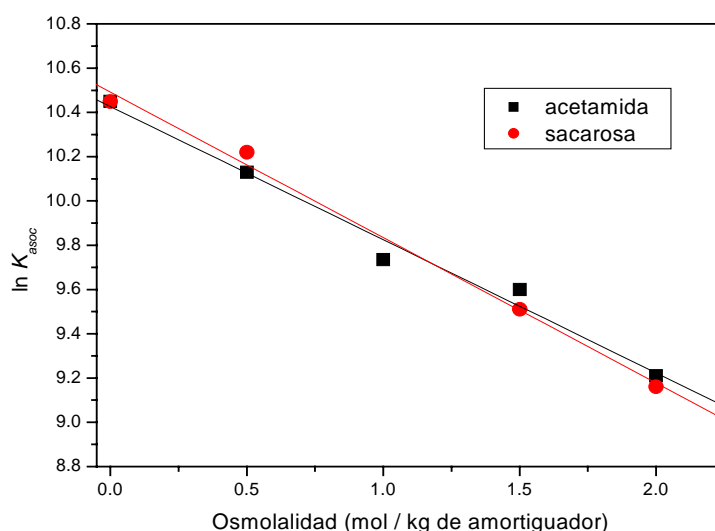


Figure 18: Dependencia de la K_{asoc} con respecto a la concentración osmolal de sacarosa.

4.4.2 ANÁLISIS DE MOLÉCULAS DE AGUA EN LA INTERFASE DEL DÍMERO DE LA β LGA

Estudios estructurales han reportado que la interfase de unión del dímero de β LGA se caracteriza por tener una alta planaridad y una alta polaridad en la interfase de unión, situando a la β LGA como uno de los homodímeros más polares caracterizados hasta el momento (Rodier *et al.*, 2005; Nooren y Thornton, (2003).

El análisis de la estructura cristalográfica de la β LGA reveló que la interfase de unión es altamente abundante en moléculas de agua. Usando un criterio de corte de distancia de 4 Å² hacia ambas subunidades, se identificaron 16 moléculas de agua interfaciales. Este número de moléculas de agua es 2.25 veces más pequeño que el obtenido mediante experimentos de estrés osmótico ($\sim 36 \pm 3$). Esta diferencia puede deberse a la relativamente baja resolución de la estructura proteica, aunque también existe la posibilidad de que otras zonas fuera de la interfase puedan incorporar moléculas de agua al formarse el dímero. De las moléculas de agua encontradas en el análisis de la estructura cristalográfica, ocho se encuentran totalmente ocultas en la interfase de los protómeros mediando la unión, mientras que el resto de las aguas se encuentran en los alrededores. Aunque hasta el momento la razón de esta abundancia no es clara, se cree que es debido a la necesidad de proveer una complementariedad estereoquímica en su interfase de naturaleza altamente polar.

4.4.3 CÁLCULO DEL ΔC_p DEBIDO A LA INCORPORACIÓN DE MOLÉCULAS DE AGUA

Discrepancias significativas entre el ΔC_p experimental y calculado han sido postulados en algunos casos como evidencias de perturbaciones conformacionales significativas que acompañan a la reacción. No obstante, este escenario no parece aplicar a la β LGA, ya que nuestras evidencias espectroscópicas señalan que la asociación de los protómeros es más de tipo cuerpos rígidos. Intercambios de protones o de contraiones pueden contribuir significativamente al valor del $\Delta C_{p_{asoc}}$. No obstante, estos efectos también pueden ser descartados, dado que nuestros estudios sobre la dimerización de β LGA a pH neutro demostraron que no existe acoplamiento significativo a ninguno de estos procesos. En contraste, tanto los experimentos de estrés osmótico como el análisis estructural de la interfase del dímero revelaron que un número significativo de moléculas de agua son secuestradas al formarse el dímero.

En los últimos años, se ha reunido una gran cantidad de evidencias que respaldan que el ocultamiento de moléculas de agua en la interfase de unión puede ejercer un efecto significativo sobre la magnitud del $\Delta C_{p_{asoc}}$ (Guinto y Di Cera, 1996; Holdgate *et al.*, 1997). El paso de una molécula de agua del solvente en que se encuentra a una interfase ordenada debería contribuir con una magnitud negativa al ΔC_p , debido a la reducción en los modos vibracionales, translacionales y rotacionales (Cooper *et al.*, 2000). Desafortunadamente, la evaluación de lo que las moléculas de agua puedan añadir a la energética de un complejo proteico no es simple y a la fecha no es posible lograrlo con una precisión razonable. Diversas propuestas experimentales han dado un rango extenso de valores para la contribución de moléculas de agua que llegan a ser

capturadas del solvente bulto a un ambiente más estructurado. Usando datos sobre la dilución de cristales de dipéptidos cíclicos Haberman y Murphy (1996) estimaron un valor de $-60 \pm 8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ por molécula de agua. Asumiendo que las diferencias entre las magnitudes del ΔC_p calculado y el experimental para la unión de la novobiocina (un antibiótico) a un fragmento de la proteína B *girasa* fueron completamente debido al secuestro de moléculas de agua. Holdgate *et al.* (1997) estimaron un valor de $-48 \pm 31 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Usando consideraciones similares, Morton y Ladbury (1996) estimaron valores entre -6 y $-12 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para distintos tipos de complejos proteína-DNA. Sin embargo, como todos los autores puntualizaron apropiadamente, estas magnitudes deberían considerarse tan sólo como aproximaciones gruesas, debido a la complejidad inherente del sistema de estudio. Por ejemplo, no fue posible determinar con precisión el número real de moléculas de agua involucradas o distinguir entre los diferentes niveles de inmovilización de las aguas. También las contribuciones de otras fuentes deben de ser substraídas. Recientemente, Clarke *et al.*, (2001) encontraron en la comparación de 2 complejos similares proteína-carbohidrato un modelo de estudio más apropiado. Estos autores estudiaron dos complejos de concanavalina A que son idénticos excepto por la substitución del hidroxilo atado al C-2 en el trimanósido silvestre por un segmento hidroxietil. Esta modificación del ligando fue diseñada para forzar el desplazamiento de una molécula de agua oculta en la interfase, que conecta a la proteína y al azúcar. De acuerdo a este estudio, el desplazamiento de la molécula de agua estructural proporcionó un ΔC_p de $-17 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Analizando computacionalmente este mismo tipo de complejos a través de la teoría de solvatación de fluidos no homogéneos, Li y Lazaridis, (2006) obtuvieron un ΔC_p de $(-10 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1})$. Usando esta misma

aproximación, se obtuvieron valores similares (-10 a -12 cal mol⁻¹ K⁻¹) para la unión de una molécula de agua que formaba parte de la interfase entre la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana HIV-1 e hidroxiourea, un inhibidor de la proteasa (Li y Lazaridis, 2003).

Estudios de transferencia de compuestos modelo entre dos fases diferentes han sido usados recurrentemente para deducir la energética de grupos químicos en los procesos de desplegamiento y unión (Haberman y Murphy (1996); Murphy y Freire (1992)). Se ha pensado que las fases orgánicas líquidas o cristalinas pudieran simular el ambiente altamente empaçado característico de proteínas globulares y de sus interfaces al formar los complejos. Siguiendo esta filosofía de transferencia de grupos químicos, el ΔC_p que se esperaría de ocultar una molécula de agua dentro de un ambiente “sólido”, semejante al de una interfase proteína-proteína, se puede estimar directamente de la diferencia en capacidades caloríficas isobáricas del hielo y del agua. Esta diferencia nos permite obtener un valor de ~ -9 cal mol⁻¹ K⁻¹. De acuerdo con los datos obtenidos de estrés osmótico, $\sim 36 \pm 3$ moléculas de agua se incorporan al dímero de la β LGA. Por consiguiente, el efecto adicional sobre el ΔC_p de este fenómeno sería $\sim -324 \pm 18$ cal mol⁻¹ K⁻¹. Cuando esta magnitud se agrega al ΔC_p calculado con modelos de área superficial, el valor resultante es -437 cal mol⁻¹ K⁻¹, el cual concuerda con el obtenido experimentalmente (-495 ± 9 cal mol⁻¹ K⁻¹).

4.6 CÁLCULO DE ΔH CON MODELOS ASA

García-Hernández y Hernández-Arana (1999) han reportado un modelo de área superficial para ΔH , de acuerdo con la siguiente parametrización obtenida del análisis conjunto de desplegamiento y asociación protéica:

$$\Delta H(25\text{ }^\circ\text{C})_{calc} = 19.4 \Delta ASA_p - 7.0 \Delta ASA_{ap} = -6250 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

Usando estos parámetros y los cambios de áreas de la Tabla 4, se estimaría un ΔH de $-6250 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, el cual concuerda con el determinado experimentalmente ($-5915 \pm 243 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

Esta concordancia podría sugerir que la incorporación de aguas a la interfase está asociada a cambios moderados de ΔH . Sin embargo, también existe la posibilidad de que se trate de una simple coincidencia, por lo que mayores estudios son requeridos.

V CONCLUSIONES

- El proceso de dimerización del homodímero de β LGA es un proceso entálpicamente guiado en las temperaturas estudiadas. No obstante, la entropía mostró ser un proceso favorable a bajas temperaturas.
- La estabilidad máxima para el homodímero fue observada a temperatura ambiente, donde la energía libre de unión estuvo contribuida totalmente por la entalpía.
- El ΔC_p obtenido experimentalmente resultó casi 5 veces más grande al obtenido mediante modelos de áreas superficiales. Comúnmente cuando ocurren estas discrepancias se piensa que rearrreglos estructurales pudieran ser la causa de. No obstante, estudios espectroscópicos (dicroísmo circular en el UV cercano y fluorescencia intrínseca), mostraron un comportamiento independiente de la concentración proteica, indicando que la asociación de los protómeros sigue un comportamiento tipo cuerpo rígido, que concuerdan con estudios previamente reportados.
- Estudios calorimétricos realizados para obtener el ΔH de protonación a pH neutro, utilizando soluciones amortiguadoras con diferentes entalpías de ionización, demostraron que el proceso de dimerización no está acoplado a cambios significativos en el estado de protonación de grupos ionizables.

- Estudios calorimétricos realizados utilizando diferentes fuerzas iónicas demostraron que el proceso de dimerización no está acoplado al intercambio de contraiones.
- El análisis de la estructura tridimensional mostró la existencia de aguas estructurales formando parte del sitio de unión de los monómeros. Además, datos reportados sitúan a la β LGA en el nivel más alto de polaridad de homodímeros.

Los resultados anteriormente mencionados nos motivaron a pensar que las diferencias en los valores de ΔC_p podían ser debido a que la interfase de unión de los protómeros estaba constituida por un número considerable de moléculas de agua y que el efecto de la incorporación de estas moléculas a la interfase era la causa de tales discrepancias.

- Por la razón anterior se realizaron estudios de estrés osmótico, encontrando un valor aproximado de $\sim 36 \pm 3$ moléculas de agua capturadas al dimerizar la proteína. Considerando este número de aguas y asumiendo que el ΔC_p que se esperaría de pasar una molécula de agua del hielo a un medio líquido es de $\sim -9 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, se obtuvo un ΔC_p adicional de $\sim -324 \pm 18 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Cuando esta magnitud es añadida al ΔC_p calculado con modelos

de ASA, obtenemos un valor de ΔC_p calculado de $-437 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, acorde con el obtenido experimentalmente.

- Por último utilizando una parametrización para el cálculo del ΔH a 25°C , a partir de modelos de área superficial accesible al solvente, se obtuvo un valor de -6250 , muy parecido al obtenido experimentalmente ($-5915 \pm 243 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

VI PERSPECTIVAS

- Caracterizar termodinámicamente la formación del homodímero de la β LGA en función del pH.
- Caracterizar termodinámicamente la formación del homodímero de la β -lactoglobulina variante B de manera similar a la variante A.
- De ser posible, y en colaboración con un grupo competente en el manejo de técnicas de biología molecular, generar mutantes intermedias entre las variantes A y B.
- Realizar un análisis comparativo del comportamiento termodinámico de las dos variantes, con la finalidad de tener una visión más detallada del proceso de asociación.

VII APÉNDICE

1 FUNCIONAMIENTO DE UN CALORIMETRO DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC).

Este instrumento de ITC consiste de dos celdas idénticas de un material altamente conductor del calor, como el oro o una aleación de níquel, con alta resistencia anticorrosivo (Hasteloy[®]), rodeadas de una chaqueta adiabática, como se muestra en la **Figura 1**:

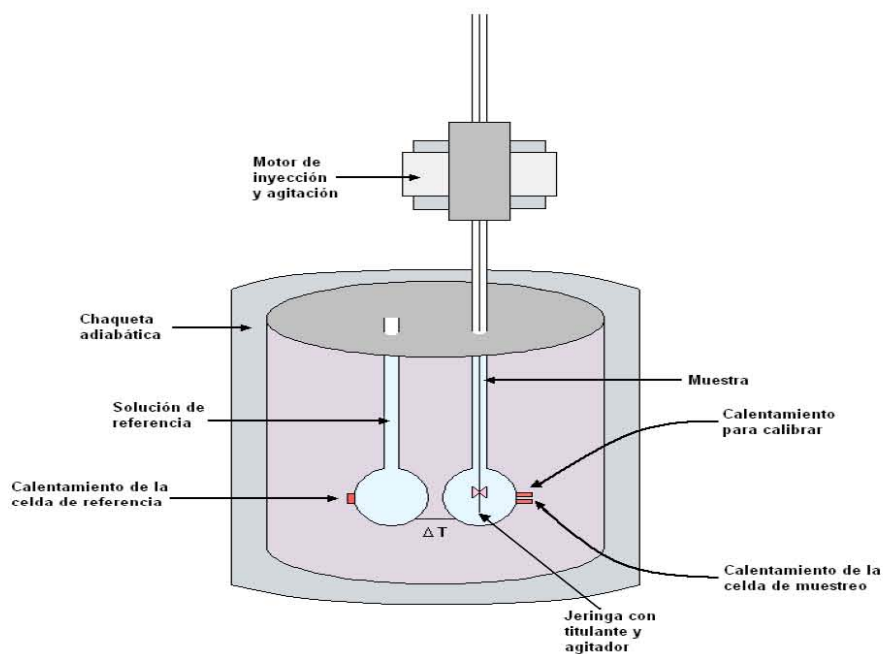


Figura 1: Diagrama esquemático de un aparato de calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Las dos celdas se encuentran conectadas por medio de un circuito termopar (ΔT) en la Fig.1 cuya función es detectar pequeñas diferencias de temperatura entre ellas, y entre las celdas y las paredes adiabáticas. La celda de referencia generalmente contiene agua desionizada y filtrada. La celda de reacción contiene la solución problema. Ambas celdas y las paredes adiabáticas se calientan

utilizando elementos resistivos que se activan para mantener temperaturas idénticas entre todos los componentes del arreglo.

Por lo general, en un experimento de ITC la celda de reacción se llena con la solución de la macromolécula a estudiar. Una jeringa exterior que se introduce en la celda de reacción inyecta cantidades de ligando previamente determinadas.

Para el estudio de sistemas de autoasociación la metodología experimental es diferente, ya que desde un punto de vista práctico, resultaría imposible aislar los monómeros y realizar un experimento de titulación clásico. En este caso, para poder medir la fuerza de la interacción, lo que se realizan son experimentos de dilución (Burrow *et al.*, 1994), tal como se describe a continuación: Una solución de proteína en alta concentración es colocada en la jeringa de inyección, mientras que la celda calorimétrica es cargada con una solución amortiguadora con condiciones idénticas a las de la solución de proteína. Antes de que ocurra la primera inyección se aplica una pequeña potencia constante a la celda de referencia. Esto se hace con el fin de que la potencia aplicada a la celda de referencia active la alimentación a la celda de reacción, y esta última se mantenga bajo un régimen de microcalentamiento, mientras no haya liberación o requerimiento de calor por efecto de una reacción. Dicha señal constituirá la línea base, y es importante que ésta se mantenga constante a lo largo de todo el experimento. Una vez estabilizada la línea base, la inyección de proteína a la solución amortiguadora provocará que la reacción libere o absorba calor, dependiendo de si la asociación es un proceso exotérmico o endotérmico respectivamente. Para una reacción exotérmica, la temperatura en la celda de reacción aumentará de forma diferencial, provocando que disminuya la

alimentación de potencia, de forma tal que el arreglo mantenga la misma temperatura con respecto a la celda de referencia. En el caso de una reacción endotérmica, la alimentación a la celda de reacción se incrementará. El valor observable en calorimetría de titulación isotérmica es la diferencia de potencia que se debe suministrar al arreglo para mantener la misma temperatura entre las celdas de referencia y de reacción. La integral de la señal observada con respecto al tiempo representa el calor liberado o absorbido a causa de la reacción que se lleva a cabo en la celda.

Además del cuidado que se debe tener para conocer la concentración de proteína, es esencial que tanto la solución de proteína como la solución amortiguadora se encuentren en condiciones idénticas (i.e., mismo amortiguador, pH, fuerza iónica, etc.), ya que si la composición de una muestra es ligeramente diferente, los efectos de calor asociados a procesos de pérdida o adición de protones o dilución de la solución amortiguadora, por mencionar algunos de ellos, influirán en el resultado de la curva de titulación. Para evitar estas contribuciones no deseadas a la señal se debe dializar tanto la muestra como la misma solución amortiguadora, o por lo menos preparar ambas muestras con el mismo lote de solución.

1.1 EL PARÁMETRO c

Para sistemas de auto-asociación que pueden ser medidos por calorimetría de disociación, diferentes parámetros pueden ser considerados para definir límites prácticos y obtener mediciones satisfactorias de las constantes de disociación. Para este caso se ha definido el parámetro $c = [M]_T / K_{disoc}$, que debe de oscilar

entre 10 y 10000 (Freire y Mayorga, 1990; Indyk y Fisher, 1998). Este intervalo impone un límite inferior y superior a la constante de disociación (K_{disoc}) a una concentración dada de macromolécula ($[M]_T$). Conforme el parámetro c se incrementa, la transición de bajas a altas concentraciones totales de proteína en la celda de reacción es más abrupta. Para el caso en que la K_{disoc} es pequeña ($[M]_T$ será mas grande que la K_{disoc}), la mayor parte de la macromolécula en la jeringa estará formando dímeros y cuando diluimos en la celda de reacción, la fuerza de la interacción determina que solo una pequeña fracción del dímero disociara. Por esa razón los calores observados son muy pequeños. Para K_{disoc} muy grandes ($[M]_T$ será mas pequeña que la K_{disoc}), la interacción entre los monómeros formando el dímero será débil, por lo que es posible que una gran población disocie al diluirla; sin embargo, debido a que la interacción monómero-monómero es débil, la población de dímero en la jeringa será escasa. En general para obtener un estimado preciso de la K_{disoc} , se debe de elegir un caso intermedio de los dos anteriormente descritos.

1.2 MODELO TERMODINÁMICO PARA ASOCIACIONES HOMODIMÉRICAS.

La autoasociación de una proteína lleva a la formación de homodímeros o oligomerización de orden superior. No obstante, la fuerza de la interacción puede ser cuantificada mediante experimentos de dilución (Burrow *et al.*, 1994). Bajo el protocolo de disociación inducida por dilución, una solución de proteína predominantemente acomplejada es colocada en la jeringa y una solución amortiguadora es colocada en la celda calorimétrica. La adición paso a paso del

reactante colocado en la jeringa, promueve la dilución de la macromolécula, incrementando la reacción de disociación, llevando al sistema a través de una secuencia de estados de equilibrio, donde la composición de cada uno de los estados está determinado por el valor de la constante de disociación (K_{disc}).

$$K_{disc} = \frac{[P]^2}{[P_2]} = \frac{1}{K_{asoc}} \dots\dots\dots(1)$$

Donde $[P]$ y $[P_2]$ son las concentraciones molares de la forma monomérica y de la forma dimérica, respectivamente. De acuerdo a un modelo de disociación simple, el calor asociado a la i -ésima inyección de volumen dV_i dentro de la celda calorimétrica de volumen fijo V_0 , es:

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

Donde ΔH_{disc} , es la entalpía de disociación del dímero. $[P_2]_i$ y $[P_2]_{iny}$ son las concentraciones de dímero en la celda de reacción y en la jeringa de inyección, respectivamente. Estas dos están estrechamente relacionadas con la concentración total de monómero $[P_T]$ a través de la constante de equilibrio.

$$[P_T] = [P] + 2[P_2] = K_{disc}^{1/2} [P_2]^{1/2} + 2[P_2] \dots\dots\dots(3)$$

El ajuste no lineal de las ecuaciones 1 y 2, permite obtener ΔH_{asoc} y K_{asoc} de las curvas de diluciones calorimétricas. ΔG_{asoc} y ΔS_{asoc} fueron calculados a partir de relaciones básicas de la termodinámica:

$$\Delta G_{asoc} = -RT \ln K_{asoc} = \Delta H_{asoc} - T\Delta S_{asoc} \dots\dots\dots(4)$$

La determinación de la entalpía (ΔH) a presión constante a diferentes temperaturas, nos permite obtener el cambio en la capacidad calorífica a presión constante, ΔC_p , que es definido como:

$$\Delta C_{p_{asoc}} = \frac{\partial \Delta H_{asoc}}{\partial T} = \frac{\partial \Delta S_{asoc}}{\partial \ln T} \dots\dots\dots(5)$$

La pendiente de graficar la entalpía vs. temperatura nos permite obtener la capacidad calorífica de la reacción. El cambio en la capacidad calorífica a presión constante funciona como una sonda de los cambios en la organización del solvente que ocurren en el proceso de asociación (deshidratación) o de disociación (hidratación). Esto genera información relacionada con la naturaleza de la interacción que conduce la unión, además de que permite describir con precisión la dependencia de la temperatura sobre los otros parámetros termodinámicos (energía libre de Gibbs, entalpía y entropía de unión).

2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Cuando la radiación electromagnética atraviesa un determinado material, e interactúa con las moléculas que lo componen, se pueden producir dos tipos de

fenómenos: aquellos en los que la luz atraviesa la materia, sin que haya cambio alguno, o aquellos en los que la luz es absorbida, ya sea parcial o totalmente. En el último caso, la energía luminosa se transfiere a las moléculas (Lakowicz, 1999). Los niveles de energía constituyen los estados característicos de una molécula: el estado basal está definido como el estado menos energético y los estados de mayor energía son denominados estados excitados. La absorción de energía electromagnética adecuada por parte de una molécula resulta en un estado excitado y la transición a niveles vibracionales superiores. La mayoría de las veces, para regresar a su estado basal, esta energía se pierde en forma de calor o cualquier otro proceso no radiativo (sin emitir radiación electromagnética) o bien de forma radiativa (emitiendo un fotón). En fluorescencia se observa emisión de radiación cuando una molécula en un estado electrónico excitado regresa a su estado basal. Los grupos moleculares que dan origen a este comportamiento se denominan fluoróforos. En el fenómeno de fluorescencia, la luz emitida es de una longitud de onda mayor (menos energética) que la luz incidente, pues los procesos no radiativos que compiten con la fluorescencia para despoblar el estado excitado ocasionan una disminución en la energía de éste.

Cuando una molécula posee de modo natural un fluoróforo, a éste se le califica como intrínseco. En otros casos es conveniente unir a una molécula, covalentemente o no, un fluoróforo ajeno a ella. El fin de esta manipulación es dotarla de fluorescencia, en caso de que no poseyera fluoróforos, o de una fluorescencia diferente a la que pudiera tener de modo natural. A este tipo de fluoróforos se les denomina extrínsecos. Las proteínas, por su parte, deben su fluorescencia intrínseca a la presencia de aminoácidos aromáticos que son los

fluoróforos triptofano, tirosina y fenilalanina. En la **Figura 2** se muestran los espectros de absorción y de emisión típicos de estos aminoácidos.

La fluorescencia es muy sensible al ambiente que rodea al fluoróforo y, por consiguiente, los diferentes parámetros cuantificables (espectros de emisión y excitación, la intensidad y el tiempo de vida) pueden ser afectados de diferentes maneras. Por lo que, dentro del estudio de las proteínas, la fluorescencia ha sido empleada ampliamente para medir la unión de ligandos y los cambios conformacionales de las proteínas, entre otros (Dwek, 1989).

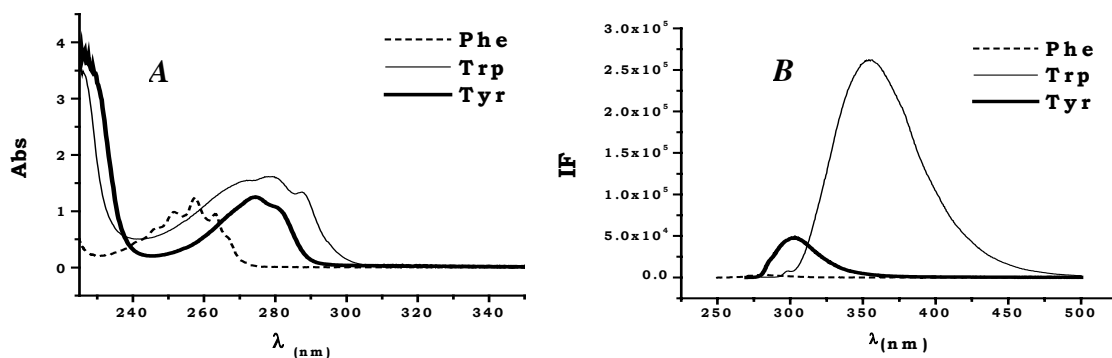


Figura 2: Espectros de A) absorción y B) fluorescencia de los aminoácidos fenilalanina, triptofano y tirosina. En b) fenilalanina fue excitado a 240 nm, triptofano a 270 nm y tirosina a 260 nm.

3 DICROÍSMO CIRCULAR

El dicroísmo circular (DC) es una técnica espectroscópica sensible a la estructura de las moléculas, por lo que es de gran ayuda para el estudio de sistemas bioquímicos. La señal del DC depende de la actividad óptica, la cual es característica de las moléculas quirales (Bayley, 1980).

Antes de explicar los fenómenos que dan origen al DC, es necesario considerar algunos aspectos de la naturaleza de la luz y su interacción con la materia. La luz es radiación electromagnética y está caracterizada por un campo eléctrico oscilatorio y un campo magnético, los cuales son siempre perpendiculares entre sí. La radiación electromagnética puede oscilar en cualquier dirección perpendicular a la dirección de propagación. No obstante la luz puede polarizarse en un solo plano, es decir, restringir las oscilaciones a un solo ángulo (Bayley, 1980).

La luz circularmente polarizada se forma si dos haces de luz polarizados viajan mutuamente perpendiculares y una de las ondas de luz tiene un retraso de un cuarto de fase de longitud de onda con respecto a la otra onda de luz. (**Figura 3**). Si el signo del retraso se invierte, el sentido hacia el cual la luz emergente gira también se invierte.

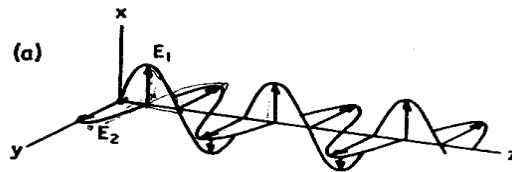


Figura 3: Ilustración de (a) como dos haces polarizados a lo largo de xz y xy con un retraso de un cuarto de fase uno con respecto a otro, generan un haz circularmente polarizado.

Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud diferenciales en

ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo alfa (α). Si además existe una absorción diferencial entre los dos haces se genera una elipse (**Figura 4**).

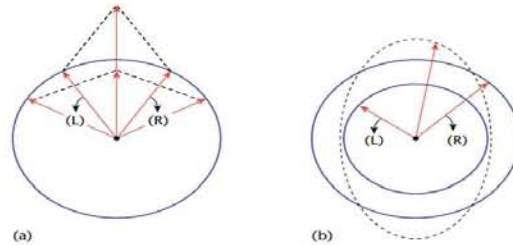


Figura 4: Esquema de los componentes de un haz de luz plano-polarizado. (A) Se representan los vectores de los componentes del haz antes de llegar a la muestra. (B) Esos mismos vectores después de interactuar con los solutos de la muestra, fuera de fase (Price, 2000).

La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular de proteínas se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación

global de la proteína, por lo que un espectro en el ultravioleta cercano puede ser considerado como una “huella digital” de la proteína (**Figura 5**). Además, las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación

Los espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural.

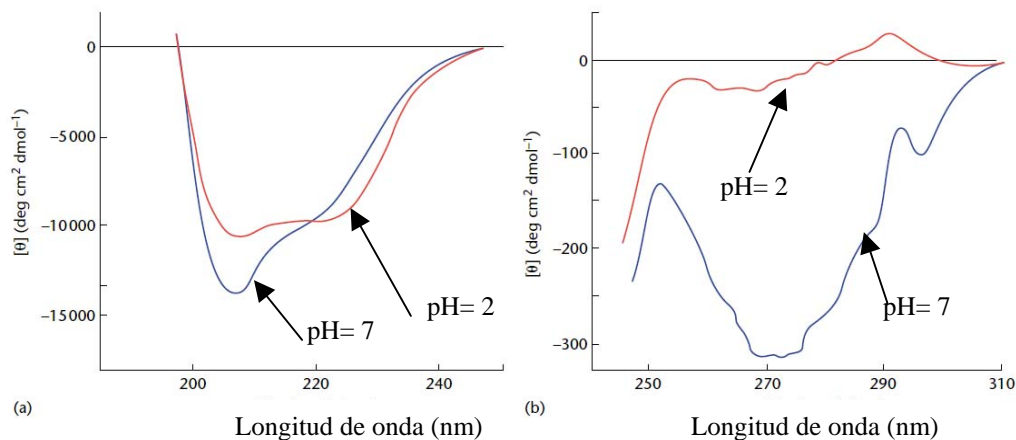


Figura 5: Espectros de DC de α -lactoalbumina: a) Espectros de DC en la región del ultravioleta lejano y b) Espectros de DC en la región del ultravioleta cercano. Las líneas representan los espectros obtenidos a pH 7 y 2, respectivamente (Price, 2000).

4 MODELOS DE ÁREAS SUPERFICIALES

La contribución principal al ΔC_p para los procesos de unión, surge de la deshidratación de las superficies tanto de la proteína como del ligando con contribuciones negativas debido al ocultamiento de superficies apolares (ΔASA_{apolar}) y contribuciones positivas debido al ocultamiento de superficie de tipo polar (ΔASA_{polar}). A partir de estudios de disolución de alcanos en agua se determinó que el ΔC_p es proporcional al área accesible al solvente, es decir hay una cantidad definida de moléculas de agua por unidad de área estableciendo contacto con la macromolécula en solución, la cual puede ser estimada en términos de área superficial accesible al solvente (Tunon *et al.*, 1992; Gomez *et al.*, 1995). Este comportamiento también está presente en la energía libre de Gibbs y la entalpía del estudio de la disolución de alcanos, compuestos alifáticos y aminoácidos. Siguiendo este esquema Makhatadze y Privalov (1992) propusieron que el ΔC_p para el plegamiento de una proteína se puede estimar a partir de las contribuciones de cada grupo químico i de la siguiente forma:

$$\Delta C_p = \sum \Delta C_{pi} * \Delta ASA_i \dots\dots\dots(6)$$

Donde ΔC_{pi} , es el cambio en la capacidad calorífica a presión constante para la transferencia de un “grupo químico i ” de la fase de gas a la fase acuosa (proceso de hidratación), normalizado por unidad de área. Los ΔC_{pi} se calculan utilizando datos experimentales de compuestos modelo; por ejemplo el ΔC_p de un carbono aromático corresponde al ΔC_p del benceno dividido entre 6. En la ecuación (6) el

ΔASA_i es el cambio de área que ocurre cuando el grupo químico i cambia de entorno como consecuencia de la formación del complejo. Una estrategia alternativa para la parametrización es evaluar la contribución por unidad de área en una serie de proteínas, con estructura tridimensional y parámetros termodinámicos de desplegamiento conocidos, en lugar de grupos químicos. De esta manera, el ΔCp_{hid} puede describirse como:

$$\Delta Cp_{hid} = a * \Delta ASA_{pol} + b * \Delta ASA_{npol} \dots\dots\dots(7)$$

Dividiendo por ΔASA_{npol} , y reorganizando

$$\frac{\Delta Cp_{hid}}{\Delta ASA_{npol}} = a * \frac{\Delta ASA_{pol}}{\Delta ASA_{npol}} + b \dots\dots\dots(8)$$

Es claro que la ecuación anterior es la forma general de una función lineal ($y= mx + b$). Si se excluyen los efectos de protonación, al graficar el cociente del ΔCp_{hid} experimental y el ΔASA_{npol} vs, $\frac{\Delta ASA_{pol}}{\Delta ASA_{npol}}$ de la pendiente se obtiene la contribución específica por unidad de área de tipo polar, mientras que de la ordenada al origen resulta la contribución específica por unidad de área de tipo no polar.

Asumiendo, que el ambiente de la proteína es homogénea, tal que el promedio del valor obtenido es aplicable a cualquier otro tipo de proteína, la contribución específica al ΔCp_{hid} por unidad de área polar o no polar estará dada en el contexto de la molécula proteica y no, por el comportamiento de compuestos modelo.

Para el ΔH_{hid} y el ΔS_{hid} se realizan tratamientos semejantes.

VIII REFERENCIAS

- Apenten, R.K.O., Khokhar, S., and Galani, D. (2002). Stability parameters for beta-lactoglobulin thermal dissociation and unfolding in phosphate buffer at pH 7. *Foods Hydrocolloids* **16**:95-103.
- Bardi JS, Luque I, Freire E. (1997). Structure-based thermodynamic analysis of HIV-1 protease inhibitors. *Biochemistry* **36**:6588–6596.
- Banci L, Benedetto M, Bertini I, Delconte R, Piccioli M, Viezzoli MS. (1998). Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry* **37**: 11780-11791.
- Bayley P. (1980). Circular Dichroism and Optical Rotation: An Introduction to Spectroscopy for Biochemists. S. B. Brown (ed.). Academic Press. Nueva York, E. U. A.
- Betts MJ, Sternberg MJE. 1999. An analysis of conformational changes on protein-protein association: implications for predictive docking. *Protein Engng.* **12**: 271-283.
- Brownlow S., Morais Cabral J.H., Cooper R., Flower D.R., Yewdall S.J., Polikarpov I., North A.C.T and Sawyer L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8Å resolution still an enigmatic lipocalin. *Structure* **5**:481-495.
- Burrow, S. D., Doyle, M. L., Murphy, K. P. (1994) Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveal it is a monomer at physiological concentrations. *Biochemistry* **33**:12741-12,745.
- Camacho CJ, Kimura SR, Delisi C, Vajda S. (2000). Kinetics of desolvation-mediated protein-protein binding. *Biophys. J.* **78**: 1094-1105.
- Camacho CJ, Weng ZP, Vajda S, Delisi C. (1999). Free energy landscapes of encounter complexes in protein-protein association. *Biophys. J.* **76**: 1166-1178.
- Campbell I. D. y R. A. Dwek. (1984). Biological Spectroscopy. Benjamín /Cummings Publishing Company. California, E. U. A. 405 pp.
- Carr PA, Erickson HP, Palmer AG. (1997). Backbone dynamics of homologous fibronectin type III cell adhesion domain from fibronectin and tenascin. *Structure* **5**:949-959.
- Cooper A. (2000). Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. *Biophysical Chemistry* **85**:25-39.

Cozzone, Alain J (July 2000) Proteins: Fundamental Chemical Properties: Nature Encyclopedia of Life Sciences. London: Nature Publishing Group. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0001330].

Clarke C, Woods RJ, Gluska J, Cooper A, Nutley MA, Boons GJ. (2001). Involvement of water in carbohydrate-protein binding. *J Am Chem Soc.* **123(49)**:12238-47.

Creamer, L.K. (1995) Effect of sodium dodecyl sulfate and palmitic acid on the equilibrium unfolding of bovine β -lactoglobulin, *Biochemistry* **34**:7170-7176.

Creighton, T.E. (1993) Proteins. Structure and molecular properties. 2^a Ed. W. H. Freeman and company, NY 507 pp.

Dall'Acqua W, Goldman ER, Lin W, Teng C, Tsuchiya D, Li H, Ysern X, Braden BC, Li Y, Smith-Gill SJ, Mariuzza RA. (1998). A mutational analysis of binding interactions in an antigen-antibody protein-protein complex. *Biochemistry* **37**:7981-7991.

Davies DR, Cohen GH. (1996). Interactions of protein antigen with antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**: 7-12.

Decrescenzo G, Grothe S, Lortie R, Debanne MT. (2000). Real-time kinetic studies on the interaction of transforming growth factor alpha with the epidermal growth factor receptor extracellular domain reveal a conformational change model. *Biochemistry* **39**: 9466-9476.

Drozdov-Tikhomirov LN, Linde DM, Poroikov VV, Alexandrov AA, Skurida GI. (2001). Molecular mechanisms of protein-protein recognition: Whether the surface placed charged residues determine the recognition process? *J. Biomol. Struct. Dyn* **19**: 279-284.

Dufour E, Bertrand-Harb C, Haertlé T. (1993). Reversible effects of medium dielectric constant on structural transformation of β -lactoglobulin and its retinol binding. *Biopolymers* **33**:589-598.

Dufour E, Hui Bon Hoa G, Haertlé T. (1993). High-pressure effects on β -lactoglobulin with ligands studied by fluorescence. *Biochem. Biophys. Acta* **1206**:166-172.

Freire E, Mayorga O.L, Straume, M. (1990) Isothermal titration calorimetry. *Anal. Chem.* **62**:950-959.

García-Hernández, E., Hernández-Arana, A., Zubillaga, R. A., and Rojo-Domínguez, A. (1998). Thermodynamic and spectroscopic evidence for a complex denaturation mechanism of bovine β -lactoglobulin A, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**:761-768.

Gabdoulline RR, Wade RC. (1999). On the protein-protein diffusional encounter complex. *J Mol Recognit.* **12**(4):226-34.

Galani, D. and Apenten, R.K.O. (2000). Revised equilibrium thermodynamic parameters for the denaturation of beta-lactoglobulin at pH 2.6. *Thermochimica Acta* **363**:137–142.

García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., Chavelas-Adame, E. A., Vázquez-Contreras, E., Rojo-Domínguez, A., and Costas, M. (2003) Structural energetics of protein–carbohydrate interactions. Insights derived from the study of lysozyme binding to its natural saccharide inhibitors, *Protein Sci.* **12**:135–142.

Gottschalk, M., Nilsson, H., Ross, H., Halle, B. (2003). Protein self-association in solution: The bovine b-lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Science* **12**: 2404-2411.

Guinto ER, Di Cera E.(1996). Large heat capacity change in a protein-monovalent cation interaction. *Biochemistry.* **35**(27):8800-8804.

Habermann, S.M., and Murphy, K.P. (1996) Energetics of hydrogen bonding in proteins: A model compound study, *Protein Sci.* **5**:1229–1239.

Hamada, D., and Goto, Y. (1997) The equilibrium intermediate of β -lactoglobulin with non-native α -helical structure, *J. Mol. Biol.* **269**: 479-487.

Hubbard SJ, Argos P. (1994). Cavities and packing at protein interfaces. *Protein Sci.* **3**: 2194-2206.

Hubbard JS, Gross KH and Argos P. (1994) Intramolecular cavities in globular proteins. *Protein. Eng* **7**:613-626.

Holwerda B. (1999). Activity in monomers of human cytomegalovirus protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**: 370-373.

Hubbard, S. J., Thornton, J. M. (1993), Programa de Cómputo NACCESS. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, University Collage, Londres.

Ikeuchi, Y., Nakagawa, K., Endo, T., Suzuki, A., Hayashi, T., and Ito, T. (2001). Pressure-induced denaturation of monomer β -lactoglobulin is partially irreversible: Comparison of monomer form (highly acidic pH) with dimer from (neutral pH), *J. Agric. Food Chem.* **49**:4052–4059.

Indyk, L., Fisher, H. F. (1998), “Theoretical Aspects of Isothermal Titration Calorimetry”, *Methods in Enzymology* **295**:350 – 364.

Nooren IM, Thornton JM. (2003). Structural Characterization and Functional Significance of Transient Protein–Protein Interactions. *J. Mol. Biol.* **325**:991–1018.

Janin J. (1999). Wet and dry interfaces: the role of solvent in protein-protein and protein-DNA recognition. *Struct. Fold. Des.* **7**:277-279.

Jones S, Thornton JM. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. USA* **93**:13-20.

Jones, Susan and Thornton, Janet M (July 2000) Protein Quaternary Structure: Subunit–Subunit Interactions. In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npq.els.0003120].

Jones S, Thornton JM. (2000). Analysis and classification of protein-protein interactions from a structural perspective. In *Protein-protein recognition*, Oxford University Press: New York: 33-59.

Kelly MJ, Reithel FJ. (1971). Thermodynamic analysis of the monomer-dimer association of β -lactoglobulin A at the isoelectric point. *Biochemistry*. **10(13)**:2639-2644.

Kimura SR, Brower RC, Vajda S, Camacho CJ. (2001). Dynamical view of the positions of key side chains in protein-protein recognition. *Biophys. J.* **80**: 635-642.

Kiser JR, Monk RW, Smalls RL, Petty JT. (2005). Hydration changes in the association of Hoechst 33258 with DNA. *Biochemistry*. **44(51)**:16988-97.

Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. (2002). The ligand-binding site of bovine beta-lactoglobulin evidence for a function?. *J.Mol. Biol.* **318**:1043-1055.

Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. (2004). Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J Dairy Sci.* **87(4)**:785-96.

Kuwajima, K., Yamaya, H., and Sugai, S. (1996) The burst-phase intermediate in the refolding of β -lactoglobulin studied by stopped-flow circular dichroism and absorption spectroscopy, *J. Mol. Biol.* **264**:806-822.

Ladbury, J. E., Williams, M. A., (2004), The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Current Opinion in Structural biology.* **14**:562-569.

Lakey, Jeremy H and Gokce, Isa (December 2000) Protein–Protein Interactions. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npq.els.0001346].

Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescent Spectroscopy, 1999, Plenum Press Pub, Co., USA.46. Guilbault, G. G. Practical Fluorescent, Theory, Methods and Techniques, 1973, Marcel Dekker, N. Y., U.S.A.

Larsen TA, Olson AJ, Goodsell DS. (1998). Morphology of protein-protein interfaces. *Structure* **6**: 421-427.

Leckband D. and Israelachvili J. (2001). Intermolecular forces in biology. *Quarterly Reviews of Biophysic* **34 (2)**:105-267.

Li Z, Lazaridis T. (2003). Thermodynamic contributions of the ordered water molecule in HIV-1 protease. *J Am Chem Soc.* **125(22)**:6636-6647.

Li Z, Lazaridis T. (2006). Thermodynamics of buried water clusters at a protein-ligand binding interface *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys.* **110(3)**:1464-1475.

Lo Conte L, Chothia C, Janin J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* **285**: 2177-2198.

McCoy AJ, Chandana EV, Colman PM. (1997). Electrostatic complementarity at protein/protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **268**: 570-584.

Matsuura, J.E., and Manning, M.C. (1994) Heat-induced gel formation of β -lactoglobulin: A study on the secondary and tertiary structure as followed by circular dichroism spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* **42**:1650–1656.

McCammon JA. (1998). Theory of biomolecular recognition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 245-249.

McKenzie, H. A., and W. H. Sawyer. (1967). Effect of pH on β -lactoglobulins. *Nature* **214**:1101–1104.

Mei G, Di Venere A, Rosato N & Fináís-Agro A (2005) The importance of being dimeric. *FEBS Journal* **272**:16-27.

Mills, O.E. (1976) Effect of temperature on tryptophan fluorescence of β -lactoglobulin B, *Biochim Biophys. Acta* **434**:324-332.

Molinari, H., Ragona, L.; Varani, L., Musco, G.; Consonni, R., Zetta, L., and Monaco, H. L. (1996). Partially folded structure of monomeric bovine β -lactoglobulin, *FEBS Lett.* **381**: 237–243.

Morton CJ, Ladbury JE. (1996). Water-mediated protein-DNA interactions: the relationship of thermodynamics to structural detail. *Protein Sci.* **5(10)**:2115-2118.

Monod J, Wyman J & changeaux JP (1965) On the nature of allosteric transition: a plausible model. *J Mol Biol* **12**:88-118.

Muegge I, Schweins T, Warshel A. (1998). Electrostatic contributions to protein-protein binding affinities: application to Rap/Raf interaction. *Proteins* **30**: 407-423.

Murphy, K.P. and Freire, E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Protein Chem.* **43**: 313–361

Murphy, K.P., Xie, D., Garcia, K.C., Amzel, M., Freire, E. (1993). *Proteins Struct. Function Genetic.* **15**:113-120,.

Neet KE & Timm DE (1994) Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Proteins Sci* **3**:2167-2174.

Nelson, D. L., Cox, M. M., Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, Worth Publisher, N.Y., USA.

Papiz MZ, Sawyer L, Eliopoulos EE, North AC, Findlay JB, Sivaprasadarao R, Jones TA, Newcomer ME, Kraulis PJ. (1986). The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature.* **324(6095)**:383-385.

Pardanani A, Gambacurta A, Ascoli F, Royer WE. (1998). Mutational destabilization of the critical interface water cluster in Scapharca dimeric hemoglobin. Structural basis for altered allosteric activity. *J. Mol. Biol.* **284**: 729-739.

Parker, M.H., Lunney, F. A., Ortwine, D. F., Pavlosky, A. G., Humblet, C., and Brouillete, C. G.(1999) Analysis of the binding of hydroxamic acid and carboxylic acid inhibitors to the stromelysin –1(matrix metalloproteinase-3) catalytic domain by isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* **38(13)**:592-601.

Parsegian, V. A., R. P. Rand, and D. C. Rau. (1995). Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods Enzymol.* **259**:43–94.

Perez, M.D., Villegas, C.D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J.M., y Calvo, M. (1989) Interaction of fatty acids with β -lactoglobulin and albumin from ruminant milk. *Journal of Biochemistry*, **106**:1094-1097.

Price NC, (December 2000) Circular Dichroism: Studies of Proteins. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npq.els.0001346].

Puyol, P., Perez, M.D., Ena, J.M., y Calvo, M. (1991) Interaction of bovine β -lactoglobulin and other bovine and human whey proteins with retinal and fatty acids. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**:2515-2520.

Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N., and Jameson, G. B. (1998) Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin, *Biochemistry* **37**:14014-14023.

Record MT Jr, Lohman ML, De Haseth P. (1976). Ion effects on ligand-nucleic acid interactions. *J Mol Biol.* **107(2)**:145-158.

Renard, D., Lefebvre, J., Griffin, M.C.A., and Griffin, W.G. (1998) Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies, *Int. J. Biol. Macromol.* **22**:41-49.

Rodier F, Bahadur RP, Chakrabarti P, Janin J. (2005). Hydration of protein-protein interfaces. *Proteins*: **60(1)**:36-45.

Sakai K, Sakurai K, Sakai M, Hoshino M, Goto Y. (2000). Conformation and stability of thiol-modified bovine beta-lactoglobulin. *Protein Sci.* **9(9)**:1719-1729.

Sakurai K, Oobatake M, Goto Y. (2001). Salt-dependent monomer-dimer equilibrium of bovine beta-lactoglobulin at pH 3. *Protein Sci.* **10(11)**:2325-2335.

Sakurai K, Goto Y. (2002). Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine Beta-lactoglobulin by amino acid substitution. *J Biol Chem.* **277(28)**:25735-25740.

Sundberg EJ, Mariuzza RA. (2000). Luxury accommodations: the expanding role of structural plasticity in protein-protein interactions. *Struct. Fold. Des.* **8**:R137-R142.

Tanford, C., Bunville, L. G., and Nozaki, Y. (1959) The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5, *J. Am. Chem. Soc.* **81**:4032-4036.

Tanford, C. (1960). Ionization-linked changes in protein conformation. II. The N-R transition in β -lactoglobulin, *J. Am. Chem. Soc.* **83**:1634-1638.

Taulier, N., and Chalikian, T.V. (2001) Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies, *J. Mol. Biol.* **314**:873-889.

Tsai, G.L., Xu, D, Nussinov R (1997) Structural motifs at protein-protein interfaces: protein cores versus two-state and three-state model complexes. *Protein Sci.* **6**:1797-1809.

Turnbull, W. B., Daranas, A. H. (2003), "On the Value of c . Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry?", *J. Am. Chem. Soc.* **125**:14859 – 14866.

Uhrinova, S., Smith, M.H., Jameson, G.B., Uhrin, D., Sawyer, L., and Barlow, P.N. (2000). Structural Changes Accompanying pH-Induced Dissociation of the beta-Lactoglobulin Dimer. *Biochemistry* **39**:3565 – 3574.

Velazquez-Campoy A, Leavitt SA, Freire E. (2004), Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol.* **261**:35-54.

Veselovsky, A. V., Ivanov, Y. D., Archakov, A. I, Janssen, L. P (2002) Protein-protein interactions: mechanism and modification by drugs. *Journal of molecular recognition* **15**:405-422.

VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual, MicroCal, LLC.

Wahl, P., and Timasheff, S.N. (1969) Polarized fluorescence decay curves for β -lactoglobulin A in various states of association, *Biochemistry* **8**:2945-2949.

Wall MA, Posner BA, Sprang SR. (1998). Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. *Structure* **6**: 1169-1183.

Weber G (1986) Phenomenological description of the association of proteins subunits subjected to conformational drift. Effect of dilution and of hydrostatic pressure. *Biochemistry* **25**:3626-331.

Weber G (1987) Fluorescence spectroscopy at high pressure: techniques and results. In current perspectives in high pressure biology 235-243. Academic Press Inc. London.

Williams MA, Goodfellow JM and Thornton JM (1994) Buried waters and internal cavities in monomeric proteins. *Protein Sci* **3**:1224-1235.

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Nin, I., N. (1989). Rapid measurement of binding constant and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Bioch.* **179**:131-137.

Xu D, Tsai C-J, Nussinov R. (1997). Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. *Protein Engng.* **10**: 999-1012.

Zimmerman JK, Barlow GH, Klotz IM. (1970). Dissociation of beta-lactoglobulin near neutral pH. *Arch Biochem Biophys.* **138**(1):101-9.