

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ESTUDIO TERMODINÁMICO Y ESTRUCTURAL
DE LA ASOCIACIÓN DE LA HEVEÍNA
CON OLIGÓMEROS
DE LA N-ACETILGLUCOSAMINA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
*DOCTOR EN CIENCIAS***

PRESENTA

ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ

**ASESORES: Dr. ANDRÉS HERNÁNDEZ ARANA
Dra. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO**

México, D.F., octubre de 1997

*A mi viejita linda,
a mis padres,
a mis amigos*

A G R A D E C I M I E N T O S

Deseo agradecer muy en especial al Dr. Andrés Hernández Arana, a quien siempre consideraré mi maestro, y quien es sin duda el verdadero pilar de la presente obra. Agradezco también al Dr. Rafael Zubillaga Luna y al Dr. Arturo Rojo Domínguez por haberse involucrado activamente en el desarrollo de la investigación. El presente manuscrito resultó significativamente mejorado por la lectura crítica realizada por el Dr. Miguel Costas Basín, el Dr. D. Alejandro Fernández Velasco y el Dr. Eduardo Horjales Reboredo, a quienes agradezco todos sus comentarios. Como amigo, tendré siempre en alta estima la calidad humana de mis profesores y compañeros. Estoy con la obligación moral de expresar mi agradecimiento en el nivel institucional al Departamento de Química, a través de su Área de Biofísicoquímica, por todo el apoyo y facilidades brindadas en estos años de investigación, y a CONACyT, por el apoyo económico (No. 86710).

Ofrezco mi trabajo como un pequeño tributo y homenaje a aquéllos que me siguen forjando con su esfuerzo y amor. A mis padres que son a la vez mis amigos inefables, a todos esos amigos inefables que no son mis padres, y, muy en especial, a la persona que le tocó disfrutar y sufrir con mayor intensidad los quehaceres y vicisitudes en la realización del doctorado: te agradezco a ti Marvila, mi viejita entrañable.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2: TERMODINÁMICA DE LA ASOCIACIÓN DE HEVEÍNA CON OLIGÓMEROS DE LA N-ACETILGLUCOSAMINA	6
•CARACTERÍSTICAS TERMODINÁMICAS DEL RECONOCIMIENTO DE HEVEÍNA Y SUS LIGANDOS	8
•LA HEVEÍNA VISTA COMO UNA LECTINA	13
•EL PAPEL FISIOLÓGICO DE LA HEVEÍNA	15
•MATERIALES Y MÉTODOS	16
CAPÍTULO 3: BASES TERMODINÁMICO-ESTRUCTURALES DEL RECONOCIMIENTO LECTINA-CARBOHIDRATO	18
•CÁLCULO DEL CAMBIO DE CAPACIDAD CALORÍFICA	20
•PROPIEDADES ENTÁLPICAS DE LA ASOCIACIÓN DE LECTINAS Y CARBOHIDRATOS	23
•¿POR QUÉ ES DE ESPERARSE UN VALOR MÁS PEQUEÑO DE Δh_{np} Y/O UN VALOR MÁS GRANDE DE Δh_{pol} EN LA UNIÓN DE UN CARBOHIDRATO CON UNA LECTINA?	30
•MÉTODOS	37
CAPÍTULO 4: PUENTES DE HIDRÓGENO EN LA INTERFASE LECTINA-CARBOHIDRATO	40
•GEOMETRÍA DE PUENTES DE HIDRÓGENO	41
•COOPERATIVIDAD DE PUENTES DE HIDRÓGENO	45
•DENSIDAD DE PUENTES DE HIDRÓGENO	46
•EL CARÁCTER PREDOMINANTEMENTE HIDROFÍLICO DE LAS INTERACCIONES LECTINA-CARBOHIDRATO	50
•IDENTIFICACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN LA INTERFASE LECTINA-CARBOHIDRATO	52
CAPÍTULO 5: PERSPECTIVAS	53
CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA	55

*Esta investigación fue desarrollada en
el Área de Biofísicoquímica del
Departamento de Química de la
Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa*



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

DENOMINACION DE LA TESIS

ESTUDIO TERMODINAMICO Y

ESTRUCTURAL DE LA ASOCIACION

DE LA HEVEINA CON OLIGOMEROS

DE LA N-ACETILGLUCOSAMINA.

En México, D. F. se presentaron a las 10:00 horas del día 29 del mes de OCTUBRE del año 1997

en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA;

DR. MIGUEL COSTAS BASIN;

DR. DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO;

DR. EDUARDO HORJALES REBOREDO Y

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron para proceder al examen de grado de

Doctor en: CIENCIAS

de ENRIQUE GARCIA HERNANDEZ

quien presentó una comunicación de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, IV y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

APROBARLO

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
Dirección de Sistemas Escolares



Casa abierta al tiempo

ENRIQUE GARCIA HERNANDEZ
FIRMA DEL INTERESADO

REVISO

DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

El suscrito Director de División de CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

hace constar que las firmas que aparecen son auténticas y corresponden a los señores Miembros del Jurado cuyos nombres aparecen en esta acta.

DR. LUIS MIER Y TERAN C.
FIRMA

DR. ANDRES HERNANDEZ A.
PRESIDENTE

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ
SECRETARIO

DR. MIGUEL COSTAS BASIN
VOCAL

DR. DANIEL A. FERNANDEZ V.
VOCAL

DR. EDUARDO HORJALES R.
VOCAL

El suscrito Secretario General de la Universidad Autónoma Metropolitana, certifica que los datos asentados en la fotocopia de este documento referentes a los estudios que ampara, son idénticos en su contenido y términos a los mismos que esta Institución incluyó en el original, de acuerdo a la información existente en los archivos correspondientes.

Se extiende la presente para los efectos legales a que haya lugar en México, Distrito Federal a los veintisiete días del mes de octubre de dos mil once.

MHM
LIC. IRIS EDITH SANTACRUZ FAMILIA
SECRETARIO GENERAL



INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos poseen una capacidad enorme para codificar eficientemente información estereoquímica en moléculas relativamente pequeñas [1]. Hasta donde es conocido, sólo un tipo de molécula es capaz de generar superficies moleculares complementarias que decodifiquen la información portada por un carbohidrato particular: una proteína. Así, no resulta sorprendente que la principal estrategia de reconocimiento célula-célula radique en las interacciones altamente específicas y complementarias entre carbohidratos y lectinas [1]. Ejemplos de este reconocimiento pueden ser encontrados en las toxinas de bacteria o las aglutininas de virus que se unen selectivamente a carbohidratos de la superficie de células eucarióticas como primer paso para la invasión [2]; en las lectinas animales que al reconocer carbohidratos median la adhesión celular o constituyen sistemas preinmunes [3]; o en las lectinas de plantas, las cuales están involucradas en la asociación simbióticas de la planta con bacterias fijadoras de nitrógeno o en defensa contra agentes patogénicos [4].

El hecho de que cualquier tipo de célula utilice la afinidad entre lectinas y carbohidratos como vía principal para reconocer o desconocer otra célula sugiere que esta estrategia molecular debió aparecer en una fase muy temprana de la evolución biológica. No obstante, ha sido mostrado que las lectinas, a pesar de tan prolongada historia evolutiva, se han especializado a través de un número relativamente pequeño de motivos estructurales. En el reino vegetal, dos grupos mayores han sido identificados: el grupo de

las lectinas de leguminosas [5] y el de las unidoras de quitina [6]. La gran mayoría de lectinas de origen animal conocidas hasta el momento pertenecen a uno de cinco grupos [7]: lectinas dependientes de calcio (o de tipo C), lectinas unidoras de galactosa (conocidas como galectinas o selectinas), receptoras de manosa-6-fosfato tipo P, lectinas tipo I, que incluyen sialoadhesinas y otras proteínas unidoras de tipo inmunoglobulina, y las lectinas de tipo L, relacionadas en secuencia con las lectinas de leguminosa. Adicionalmente, ha sido encontrado que lectinas provenientes de virus y de bacterias conforman dos grupos estructurales independientes [8].

En los últimos años, han sido logrados avances relevantes en cuanto a la comprensión de las bases estructurales del reconocimiento entre lectinas y carbohidratos [9]. La identificación de interacciones recurrentes entre diferentes lectinas que muestran afinidad por el mismo ligando [10,11], y el uso de mutaciones dirigidas en residuos que conforman el sitio de unión en la lectina [12] o de sustituciones en el carbohidrato han revelado las interacciones y disposiciones geométricas clave para el reconocimiento de diversos sistemas [13]. Dada la naturaleza polihidroxílica de los carbohidratos, no es sorprendente encontrar la formación de puentes de hidrógeno como un requisito indispensable para facultar la unión de estas moléculas con las lectinas [13,14]; de manera similar, ha sido mostrada la importancia de los contactos hidrofóbicos en la asociación. Un ejemplo notable de la solidez del conocimiento alcanzado al respecto de las bases estructurales del reconocimiento lectina-carbohidrato puede ser encontrado en el trabajo de mutación dirigida realizado por Drickamer y colaboradores, quienes lograron “transmutar” una proteína unidora de manosa en una proteína unidora de glucosa [15]. Otro logro relevante ha sido la creación de ligandos sintéticos que son reconocidos por la hemaglutinina del virus de la influenza con una afinidad hasta mil veces mayor que con la que es reconocido el ligando natural [16]. Sin embargo, estos ejemplos espectaculares muestran el grado de conocimiento de la mitad del problema, en el sentido de que la afinidad no está definida por la especificidad del reconocimiento, sino por la naturaleza y magnitud de las fuerzas que gobiernan la interacción entre lectinas y carbohidratos.

Hasta la fecha, existe un número muy limitado de estudios sobre la formación de complejos lectina-carbohidrato en donde haya sido efectuada una caracterización termodinámica completa y de alta precisión [17]. Esta carencia de información ha impedido

alcanzar un entendimiento cuantitativo de la relación entre los cambios de energía y de estructura que se generan en la formación de un complejo lectina-carbohidrato. En el presente estudio, hemos pretendido ampliar la base de datos energéticos al emprender una caracterización de la unión de la heveína con el monómero (GlcNAc), el dímero (quitobiosa) y el trímero (quitotriosa) de la N-acetil-glucosamina mediante calorimetría de titulación isotérmica (CTI). La heveína, una proteína de 43 aminoácidos aislada de las células laticíferas del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), es una lectina perteneciente al grupo de las proteínas unidoras de quitina, un polímero de la GlcNAc. Aunque el papel fisiológico de la heveína aún no ha sido elucidado, se cree que interviene en la protección de heridas contra el ataque de patógenos a través de la asociación con residuos de GlcNAc de una glicoproteína membranal de las partículas del hule, unión que produce la coagulación del látex [18]. La estructura tridimensional de esta proteína ha sido determinada por difracción de rayos X [19] y resonancia magnética nuclear (RMN) [20]. La estructura de la heveína uniendo quitobiosa también ha sido determinada mediante RMN (Fig. 1.1) [21].

Los resultados del estudio calorimétrico de la unión de heveína con quitobiosa y con quitotriosa son presentados en el capítulo 2. Tratando de tender un puente entre energética y estructura, los resultados de este estudio son analizados en el capítulo 3 en conjunción con datos termodinámicos y estructurales disponibles en la literatura para otros 6 complejos lectina-carbohidrato y un complejo enzima-carbohidrato. Para tal efecto, la estructura tridimensional del complejo heveína-quitotriosa (Hev-Q₃) fue construida mediante modelado molecular tomando como estructura de partida la del complejo heveína-quitobiosa (Hev-Q₂). Una conclusión de mayor importancia que se deriva de este análisis es que en la formación de un complejo lectina-carbohidrato, se crean interacciones entálpicamente más favorables que las formadas en el plegamiento de una proteína. Recientemente han aparecido en la literatura estudios que indican diferencias energético-estructurales entre los procesos de unión proteína-proteína y los que involucran el plegamiento de una proteína [22]. Estos estudios han estado limitados, no obstante, al análisis del cambio de energía libre. En el

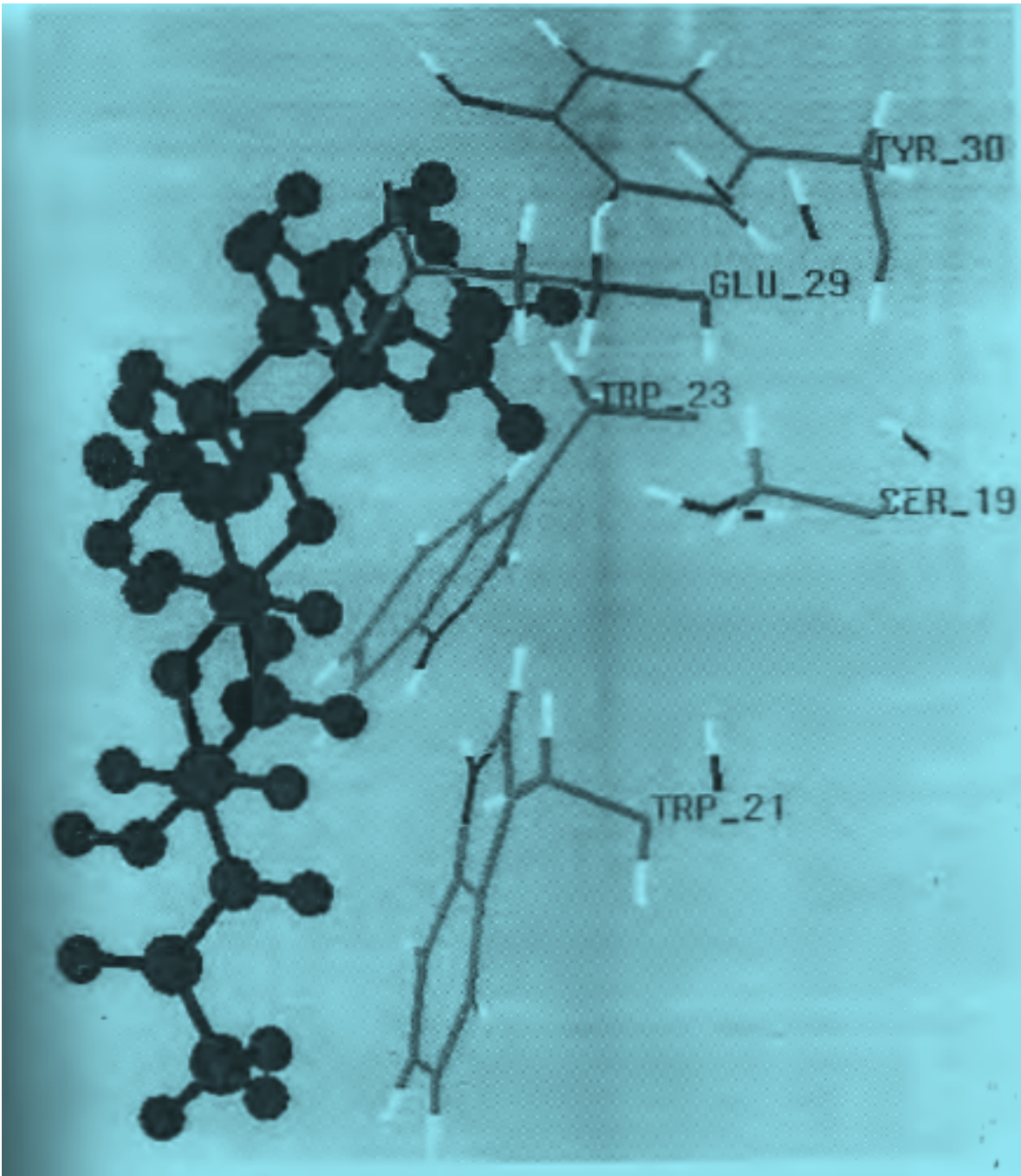
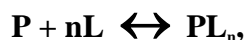


Fig. 1.1. La heveína uniendo quitobiosa. El sitio de unión de la heveína presenta propiedades comunes al resto de lectinas. Es un sitio de poca profundidad, compuesto por aminoácidos polares capaces de formar puentes de hidrógeno con el carbohidrato, y residuos aromáticos que hacen un contacto estereoespecífico con las partes no polares del ligando. Diversos estudios han mostrado que el sitio de unión de lectinas no sufre cambios conformacionales drásticos al unir al ligando. En cuanto al carbohidrato, ha sido mostrado que la conformación que adopta en el complejo corresponde a un mínimo de energía.

presente estudio mostramos que la capacidad entálpica desarrollada en el plegamiento de proteínas podría ser cercana a la de unión proteína-proteína. En el capítulo 4 es presentado un análisis geométrico-estadístico de la interfase de 14 complejos lectina-carbohidrato cuyas estructuras han sido obtenidas con alta resolución ($\leq 2.3 \text{ \AA}$). El estudio muestra con claridad una mejor geometría de formación de puentes de hidrógeno en las interfases de los complejos en relación con la de aquellos encontrados en el interior de una proteína, factor que bien podría explicar las diferencias energéticas observadas.

TERMODINÁMICA DE LA ASOCIACIÓN DE HEVEÍNA CON OLIGÓMEROS DE N-ACETILGLUCOSAMINA

Todo proceso químico que logra un estado de equilibrio dinámico posee como propiedad inherente y característica una constante macroscópica de equilibrio, K_a . En el caso de la asociación de una proteína (P) que posee n sitios de unión idénticos y su ligando (L)



el valor de K_a está dado por la concentración en el equilibrio de las especies involucradas

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n}. \quad (2.1)$$

Para reacciones que ocurren a presión y temperatura constante, K_a posee una correspondencia directa con el cambio de energía libre a través de

$$\Delta G = -RT \ln K_a, \quad (2.2)$$

considerando que el estado de referencia de reactivos y productos posee una concentración molar. La caracterización de un sistema en equilibrio estaría incompleta si se desconociera la dependencia térmica de K_a . A partir de ecuaciones fundamentales de la termodinámica

de sistemas macroscópicos, es posible demostrar que la variación de K_a con la temperatura está dictada por el cambio de entalpía que acompaña la reacción en una relación

$$\delta(\ln K_a)/\delta(1/T) = -\Delta H/R, \quad (2.3)$$

en donde R es la constante de los gases ideales. El conocimiento de ΔH , además de permitir definir la dependencia térmica de K_a , resulta crucial en el sentido de que permite calcular el cambio de entropía involucrado en la reacción:

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T. \quad (2.4)$$

Para un proceso que implica un cambio en la capacidad calorífica, la ecuación 2.3, conocida como ecuación de van't Hoff, describe un comportamiento no lineal, de acuerdo con la relación de Kirchoff:

$$\Delta C_p = \delta(\Delta H)/\delta T. \quad (2.5)$$

Así, es claro que para poder entender las fuerzas que conducen la asociación de lectinas y carbohidratos, es necesario determinar con precisión las magnitudes de un conjunto de funciones de estado que se conjugan para definir las características puntuales de la ecuación 2.1 para cada sistema de reacción.

Históricamente, la caracterización energética de la unión de lectinas y carbohidratos ha estribado en el uso de técnicas de tipo no calorimétrico. Este tipo de técnicas, fundamentalmente de origen espectroscópico, ha permitido efectuar disecciones parciales de la energética de unión [23], rindiendo valiosa información al respecto de las contribuciones entrópicas y entálpicas a la energía libre. Sin embargo, la lectura de estos datos debe ser cautelosa, en el sentido de que ha sido mostrado recientemente para diferentes sistemas de unión que el cambio de entalpía calculado a través de la ecuación 2.3 (ΔH_{vH}) puede diferir significativamente del valor medido directamente por calorimetría (ΔH_{cal}) [24]. De hecho, como será mostrado más adelante en este trabajo, diferencias sensibles entre ΔH_{vH} y ΔH_{cal} fueron observadas en el unión de la heveína con sus ligandos. Por otro lado, no ha sido posible realizar determinaciones confiables del valor de ΔC_p que se genera en una reacción de unión lectina-carbohidrato a partir de datos espectroscópicos. Como puede ser inferido del conjunto de ecuaciones arriba esbozado, ΔC_p es un parámetro termodinámico fundamental del cual depende el comportamiento térmico de ΔH y ΔS . Adicionalmente, ΔC_p resulta un poderoso indicador de la conducta del disolvente durante la unión.

Si se pretende desentrañar las sutiles conexiones entre la termodinámica de asociación y las propiedades estructurales en la unión de lectinas y carbohidratos, se precisa de caracterizaciones energéticas de alta resolución. La reciente disponibilidad de calorímetros de titulación isotérmica de alta sensibilidad ha brindado tal posibilidad [25]. En lo que resta del presente capítulo se describe el procedimiento y los resultados del estudio de la asociación de la heveína con oligómeros de la GlcNAc a través de microcalorimetría de titulación isotérmica.

Debido a que ha sido observada con frecuencia la presencia de grupos protonables en el sitio de unión [9], decidimos evaluar la posibilidad de que eventos de protonación o desprotonación del sistema amortiguador pudieran contribuir al valor de ΔH_{cal} . En caso de que la entalpía observada dependa del tipo de solución usada, el cambio de entalpía debido a la asociación de la proteína con el sacárido (ΔH_a) puede ser calculado a través de

$$\Delta H_{cal} = \gamma \cdot \Delta H_{prot} + \Delta H_a, \quad (2.6)$$

en donde γ es el número de protones intercambiados por molécula de proteína y ΔH_{prot} es la entalpía de protonación del sistema regulador. Los ensayos calorimétricos fueron realizados utilizando soluciones de acetatos 0.01M ($\Delta H_{prot} = -0.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), pH 5.5, y en soluciones de fosfatos ($\Delta H_{prot} = -1.22 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) y de Tris ($\Delta H_{prot} = -11.28 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), ambas de pH 7.0. Con el propósito de realizar una estimación del ΔC_p que acompaña la reacción, efectuamos determinaciones calorimétricas a diferentes temperaturas en espera de delinear la dependencia térmica de ΔH_{cal} .

• CARACTERÍSTICAS TERMODINÁMICAS DEL RECONOCIMIENTO DE HEVEÍNA Y SUS LIGANDOS

En la Fig. 2.1 es mostrado el perfil calorimétrico obtenido de la titulación isotérmica de la heveína con la quitotriosa. Las exotermas desarrolladas por la adición de alícuotas del trisacárido a la solución con proteína (Fig. 2.1a) fueron integradas para obtener la isoterma de titulación (Fig. 2.1b), la cual exhibe una disminución monotónica ante la adición sucesiva del ligando. La Fig. 2.1b muestra la curva de unión obtenida del mejor ajuste de la Eq. M2.5 a los datos experimentales. En todas las titulaciones realizadas con quitotriosa, el número de sitios de unión por molécula de proteína resultó cercano a la unidad ($\eta = 1.06 \pm 0.16$). Al

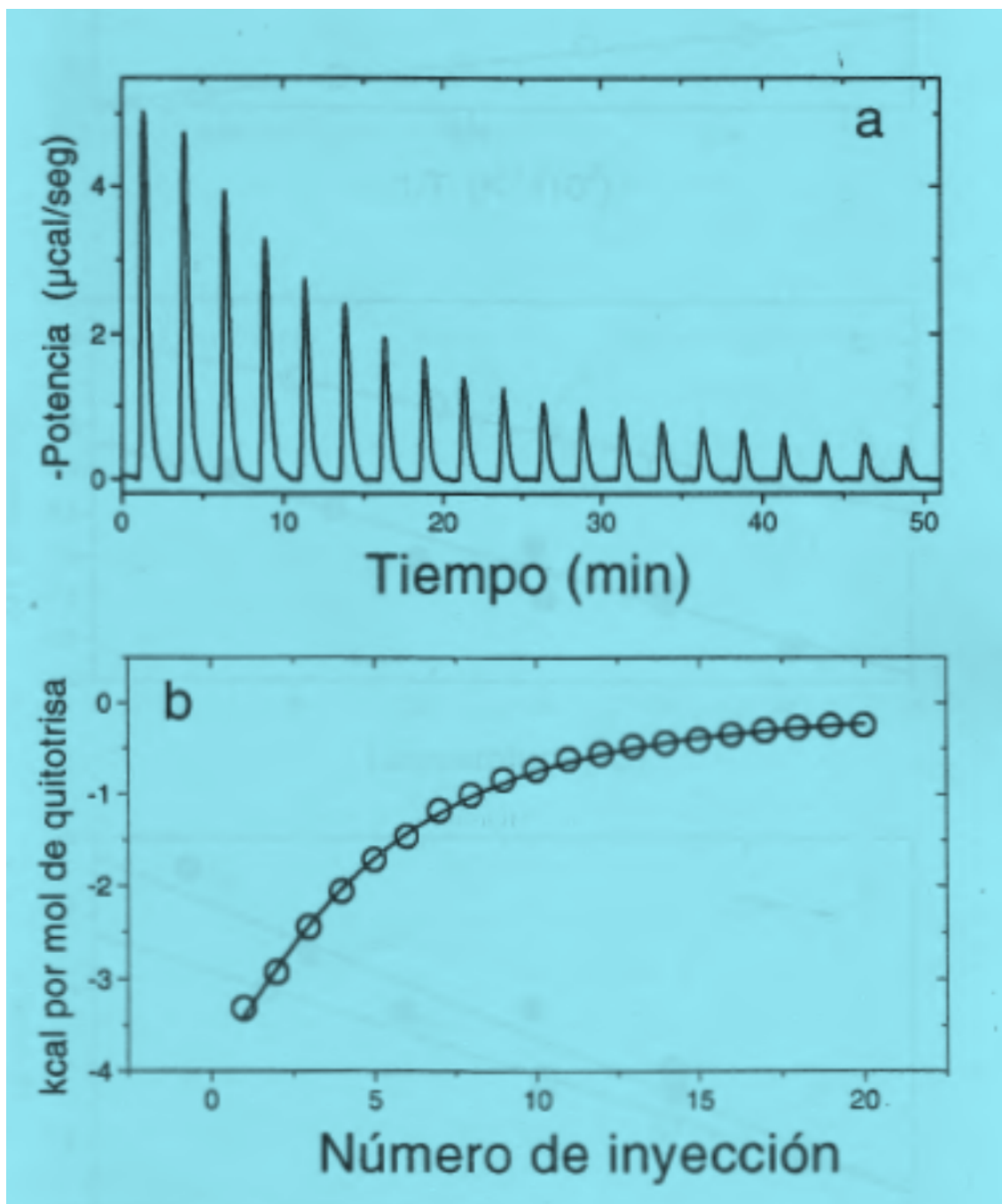


Figura 2.1. Perfil calorimétrico de la titulación isotérmica de la heveína con quitotriosa.

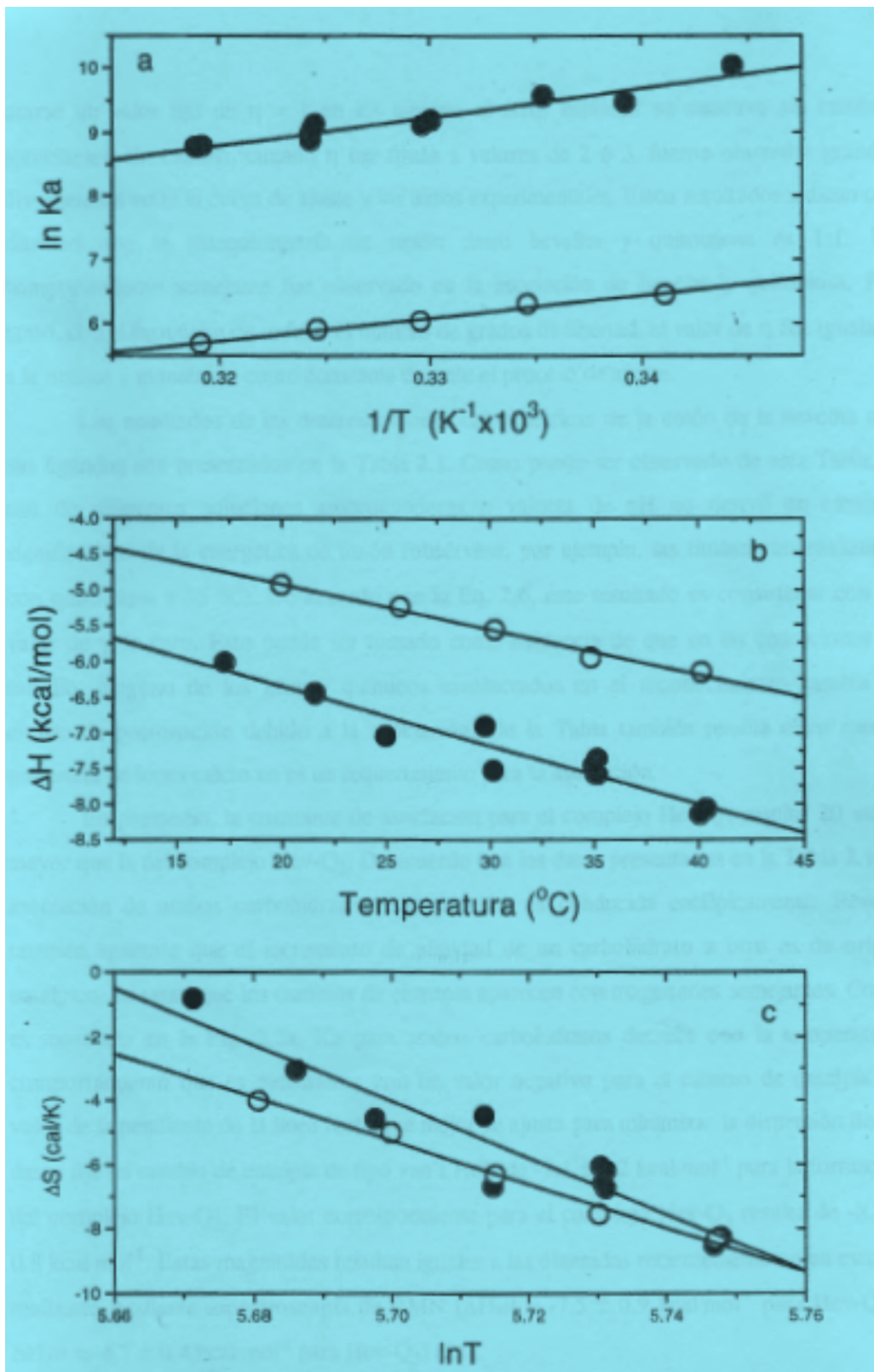


Figura 2.2. Dependencia térmica de los parámetros termodinámicos de asociación.

usarse un valor fijo de $\eta = 1$ en los ajustes, el error estándar se mantuvo sin cambios apreciables. En cambio, cuando η fue fijado a valores de 2 ó 3, fueron obtenidas grandes divergencias entre la curva de ajuste y los datos experimentales. Estos resultados indican con claridad que la estequiometría de unión entre heveína y quitotriosa es 1:1. Un comportamiento semejante fue observado en la asociación de heveína y quitobiosa. Por tanto, con el propósito de reducir el número de grados de libertad, el valor de η fue igualado a la unidad y mantenido como constante durante el proceso de ajuste.

Los resultados de las determinaciones calorimétricas de la unión de la heveína con sus ligandos son presentados en la Tabla 2.1. Como puede ser observado de esta Tabla, el uso de diferentes soluciones amortiguadoras o valores de pH no derivó en cambios significativos de la energética de unión (obsérvese, por ejemplo, las titulaciones realizadas con quitotriosa a 35 °C). De acuerdo con la Eq. 2.6, este resultado es consistente con un valor de γ de cero. Esto puede ser tomado como evidencia de que en las condiciones de estudio, ninguno de los grupos químicos involucrados en el reconocimiento cambia su estado de protonación debido a la asociación. De la Tabla también resulta claro que la presencia de iones calcio no es un requerimiento para la asociación.

En promedio, la constante de asociación para el complejo Hev-Q₃ resultó 20 veces mayor que la del complejo Hev-Q₂. De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 2.1, la asociación de ambos carbohidratos a la proteína es conducida entálpicamente. Resulta también aparente que el incremento de afinidad de un carbohidrato a otro es de origen entálpico, en tanto que los cambios de entropía aparecen con magnitudes semejantes. Como es mostrado en la Fig. 2.2a, K_a para ambos carbohidratos decrece con la temperatura, comportamiento que es consistente con un valor negativo para el cambio de entalpía. El valor de la pendiente de la línea recta que mejor se ajusta para minimizar la dispersión de los datos fija un cambio de entalpía de tipo van't Hoff de $-7.1 \pm 0.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para la formación del complejo Hev-Q₂. El valor correspondiente para el complejo Hev-Q₃ resulta de $-8.8 \pm 0.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Estas magnitudes resultan iguales a las obtenidas recientemente en un estudio realizado mediante espectroscopía de RMN ($\Delta H_{vH} = -7.5 \pm 0.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para Hev-Q₂ y $\Delta H_{vH} = -8.7 \pm 0.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para Hev-Q₃) [21].

Tabla 2.1. Determinaciones calorimétricas de la unión de heveína con oligosacáridos de la GlcNAc^a

T (°C)	-ΔH _{cal} (kcal·mol ⁻¹)	K _a	-ΔG (kcal·mol ⁻¹)	-TΔS (kcal·mol ⁻¹)	condiciones de solución ^b
Quitobiosa					
20	4.94 ±0.06	634 ±13	3.76	1.18	Ac
25.7	5.25 ±0.09	546 ±15	3.74	1.50	Ac
30.3	5.56 ±0.11	419 ±13	3.64	1.92	Ac
34.9	5.95 ±0.07	369 ±7	3.62	2.33	Ac
40.2	6.15 ±0.10	294 ±7	3.54	2.61	Ac
Quitotriosa					
17.3	6.02 ±0.11	22550 ±1519	5.79	0.24	Ac, Ca ²⁺
21.6	6.45 ±0.12	12971 ±530	5.52	0.90	Ac
25	7.04 ±0.13	14246 ±765	5.67	1.37	PO ₄
29.8	6.89 ±0.13	9812 ±501	5.53	1.36	Ac
30.2	7.54 ±0.10	9096 ±288	5.49	2.03	Tris
35	7.46 ±0.14	9171 ±438	5.59	1.87	PO ₄
35.1	7.58 ±0.04	8587 ±110	5.55	2.03	Ac
35.2	7.36 ±0.15	7203 ±367	5.44	1.91	Tris
35.2	7.59 ±0.14	7926 ±385	5.50	2.08	Ac, Ca ²⁺
40.1	8.15 ±0.07	6608 ±139	5.48	2.66	PO ₄
40.4	8.07 ±0.10	6499 ±141	5.47	2.60	Ac, Ca ²⁺

^a Las incertidumbres representan la desviación estándar del parámetro en el ajuste de regresión.

^b Ac: acetatos 0.1M, pH 5.5; PO₄: fosfatos 0.1M, pH 7.0; Tris: 0.1M Tris, pH 7.0; Ca²⁺: 0.1M CaCl₂.

La comparación entre ΔH_{vH} y los diferentes valores de ΔH_{cal} (Tabla 2.1) muestra cocientes ΔH_{vH}/ΔH_{cal} que van de ~1.1 a ~1.5 para ambos complejos de heveína. Es interesante notar que estos cocientes son cercanos a aquellos reportados por Sturtervant y colaboradores para otros sistemas de unión [24]. Aunque el origen de tales discrepancias permanece oscuro, el hecho advierte del cuidado que se debe tener en el análisis de los cambios de entalpía calculados a partir de la dependencia térmica de K_a; levanta dudas de los valores de K_a; y en un nivel más profundo, indica que en la formación del complejo pudieran existir eventos que no han sido considerados explícitamente en la definición de K_a (Eq. 2.1). En mediciones calorimétricas, sin embargo, como el intercambio de calor es el parámetro observable (ver Eq. M2.5), la incertidumbre en el valor de K_a se refleja en mucho menor medida en la magnitud de ΔH_{cal}.

El gráfico de ΔH_{cal} en función de la temperatura (Fig. 2.2b) revela un valor de ΔC_p pequeño y negativo en el intervalo de temperatura considerado para la unión de ambos sacáridos con la heveína. En el caso de la formación del complejo Hev-Q₂, el cambio de

capacidad calorífica resultante es de $-64 \pm 6 \text{ cal}(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$. El valor correspondiente para Hev-Q₃ es de $-83 \pm 8 \text{ cal}(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$. De manera alternativa, el cambio en capacidad calorífica puede ser estimado de la dependencia térmica de ΔS :

$$\Delta C_p = \partial(\Delta S) / \partial(\ln T). \quad (2.7)$$

Una de las características más valiosas que posee un calorímetro de titulación isotérmica es el permitir evaluar ΔH_{cal} y K_a a partir de los datos provenientes de un solo experimento; esta poderosa propiedad ofrece la posibilidad de estimar ΔS con alta precisión. El análisis numérico de la dependencia de ΔS con el logaritmo natural de la temperatura (Fig. 2.2c) a través del ajuste de una línea recta arroja valores de ΔC_p de $-68 \pm 7 \text{ cal}(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$ para Hev-Q₂ y de $-88 \pm 9 \text{ cal}(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$ para Hev-Q₃, magnitudes que resultan satisfactoriamente cercanas a aquellas obtenidas mediante la relación de Kirchoff (Eq. 2.5).

• LA HEVEÍNA VISTA COMO UNA LECTINA

En los últimos años, ha ido revelándose la naturaleza molecular de la asociación entre lectinas y carbohidratos. En este estudio microcalorimétrico hemos encontrado que la heveína comparte propiedades de una lectina típica. Su afinidad por el sacárido se incrementa del monómero al trímero de la GlcNAc, observando siempre una estequiometría de 1:1. Esta figura resulta consistente con un solo sitio de unión por molécula de proteína configurado por tres subsitios. Un resultado similar ha sido encontrado para la aglutinina de germen de trigo (AGT), una lectina relacionada filogenéticamente con la heveína [26], la cual también une oligómeros de la GlcNAc [27]. Como en el caso de la AGT, fue encontrado que los iones calcio no son requeridos para la unión de sacáridos por parte de la heveína; que la reacción en condiciones de neutralidad o ligeramente aciduladas no está acoplada a cambios del estado de protonación de algún grupo químico; y que la unión es conducida entálpicamente.

En la Fig. 2.3 es mostrada la relación entre ΔH y $T\Delta S$, a 25 °C, para 41 diferentes complejos lectina-carbohidrato, incluidos los datos de formación de los complejos de la heveína. Es interesante notar la existencia de una tendencia bien definida entre los cambios de entropía y entalpía. El origen de esta compensación sigue siendo desconocido. No

obstante, es claro que el comportamiento termodinámico de unión por parte de la heveína comparte elementos en común con los de un variado grupo de sistemas lectina-sacárido.

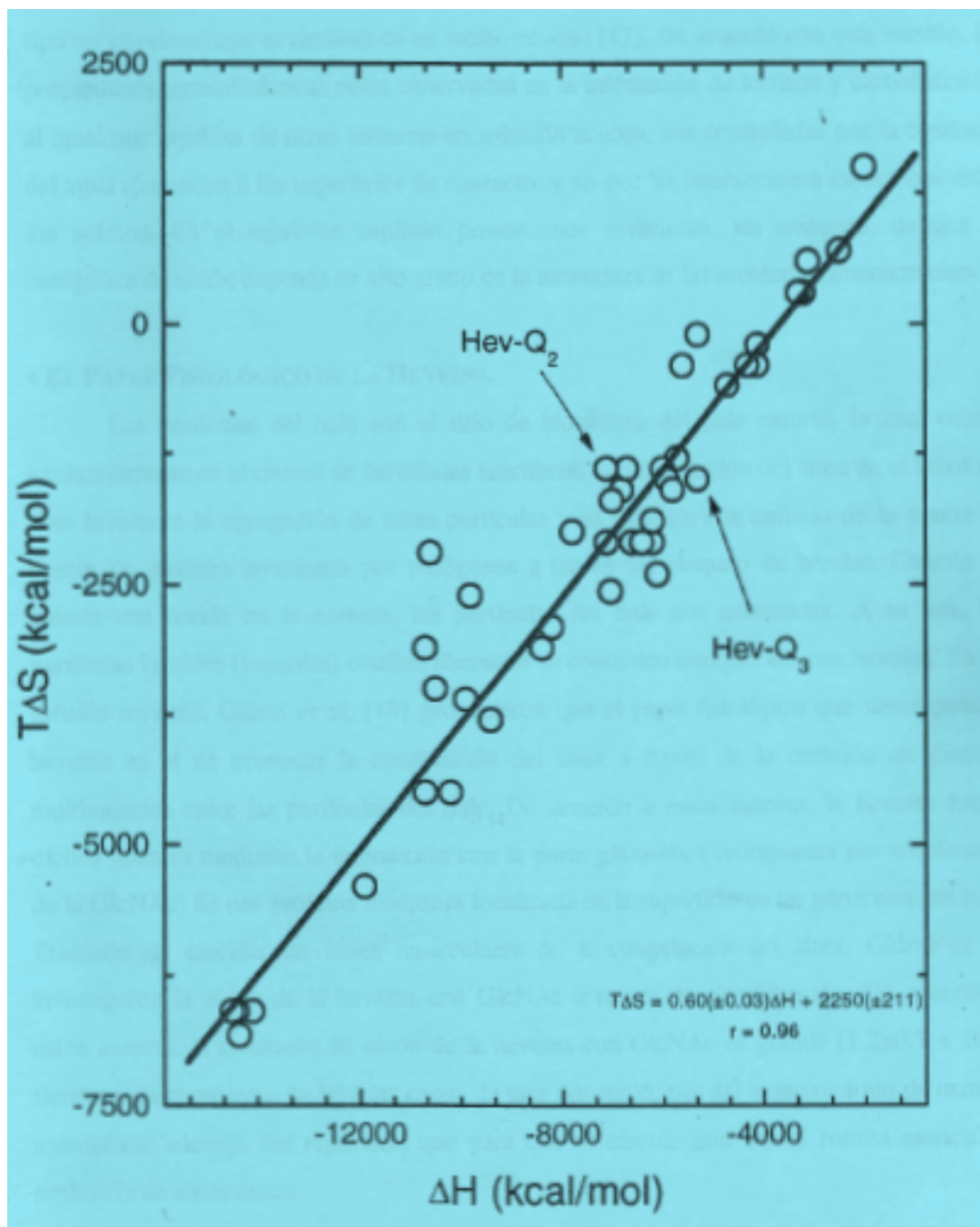


Figura 2.3. Gráfico de compensación entalpía-entropía de complejos lectina-carbohidrato.

Hasta donde es de nuestro conocimiento, no ha sido detectado un caso de unión lectina-carbohidrato conducido entrópicamente. Este hecho ha llevado a algunos autores a proponer que la conducción entálpica es un fenómeno general de los procesos de unión de tipo no covalente que se realizan en un medio acuoso [17]. De acuerdo con esta versión, las propiedades termodinámicas netas observadas en la interacción de lectinas y carbohidratos, al igual que aquéllas de otros sistemas en solución acuosa, son controladas por la conducta del agua que rodea a las superficies de contacto, y no por las interacciones específicas entre los solutos. En el siguiente capítulo presentamos evidencias, sin embargo, de que la energética de unión depende en alto grado de la naturaleza de las moléculas interactuantes.

• EL PAPEL FISIOLÓGICO DE LA HEVEÍNA

Las partículas del hule son el sitio de biosíntesis del hule natural, lo cual ocurre exclusivamente en el citosol de las células laticíferas. La coagulación del látex en el árbol del hule involucra la agregación de estas partículas y es vital para la defensa de la planta en contra de posibles invasiones por patógenos a través del bloqueo de heridas. Cuando se induce una herida en la corteza, las partículas del hule son excretadas. A su vez, las partículas lutoides (vacuolas) estallan liberando su contenido enriquecido con heveína. En un estudio reciente, Gidrol *et al.* [18] propusieron que el papel fisiológico que desempeña la heveína es el de provocar la coagulación del látex a través de la creación de puentes multivalentes entre las partículas del hule. De acuerdo a estos autores, la heveína forma dichos puentes mediante la interacción con la parte glicosídica (compuesta por oligómeros de la GlcNAc) de una proteína receptora localizada en la superficie de las partículas del hule. Tratando de elucidar las bases moleculares de la coagulación del látex, Gidrol *et al.* investigaron la unión de la heveína con GlcNAc a través de ultrafiltración. De acuerdo a estos autores, la constante de unión de la heveína con GlcNAc es grande ($1.2 \pm 0.7 \times 10^4$), siendo cada monómero de heveína capaz de unir dos moléculas del monosacárido de manera simultánea; además, fue reportado que para que se efectúe esta unión, resulta esencial la presencia de iones calcio.

En nuestras determinaciones calorimétricas, sin embargo, observamos un comportamiento diferente al reportado por Gidrol *et al.* Aun usando altas concentraciones

de GlcNAc (hasta 0.25 M de concentración final), no fueron detectados efectos calóricos en las titulaciones isotérmicas. La presencia de calcio no hizo diferencia. Este resultado fue confirmado mediante experimentos de fluorescencia, en donde no se observó variación en la intensidad fluorescente o desplazamiento de la longitud de onda en el máximo de emisión. En contraste, titulaciones efectuadas con quitobiosa o con quitotriosa generaron cambios en ambas propiedades fluorescentes (datos no mostrados). Resultados semejantes fueron obtenidos por Asensio *et al.* [21], al no observar señales de RMN que revelaran alguna evidencia significativa de la interacción de la heveína con la GlcNAc. Es de mencionarse que el hecho de que la heveína posea poca o nula afinidad por GlcNAc no es sorprendente, en el sentido de que ha sido encontrado que, en general, las interacciones entre lectinas y monosacáridos son débiles [8].

Aunque resulta difícil de sustraerse de la propuesta de que la heveína juega un papel importante en la coagulación del látex, parece claro de nuestros resultados que el mecanismo sugerido por Gidrol *et al.* [18] requiere de refinamientos adicionales. Por un lado, parecería más probable que la interacción ejercida entre la heveína y la glicoproteína de las partículas del hule es mediada a través del reconocimiento de oligómeros de la GlcNAc, y no del monómero. En particular, es de notarse que la magnitud de K_a observada por Gidrol *et al.* para la unión con el monosacárido es próxima a la obtenida en este trabajo para la unión con quitotriosa. Tanto el estudio espectroscópico de Asensio *et al.* [21] como nuestro estudio calorimétrico revelan que la heveína posee sólo un sitio de unión. Este hecho queda plenamente confirmado de la inspección de la estructura tridimensional del complejo Hev-Q₂. Así, una sola molécula de heveína sería incapaz de formar un puente entre dos terminaciones glicosídicas. Probablemente, este fenómeno podría ocurrir en el caso de que la heveína dimerizara. Aunque no se cuenta con evidencia alguna de que la heveína oligomerice *in vitro*, la posibilidad de que la heveína se encuentre como dímero *in vivo* no puede ser descartada.

●●● MATERIALES Y MÉTODOS ●●●

● MATERIALES Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La heveína fue purificada a partir del látex de la corteza del árbol del hule tal como ha sido descrito previamente [28]. La GlcNAc, la quitobiosa, la quitotriosa y el resto de los reactivos fueron comprados a Sigma Co. como reactivos químicos de alta pureza.

Las muestras de heveína fueron dializadas previamente contra la solución amortiguadora, de manera que las condiciones de solución de la proteína fueran idénticas a las del blanco. Previo al ensayo de unión, las soluciones fueron

desgasificadas al vacío y en agitación durante 15 minutos. La concentración de heveína fue entonces determinada espectrofotométricamente a 280 nm, usando un coeficiente de extinción de $2.56 \text{ ml}(\text{mg}\cdot\text{cm})^{-1}$. De acuerdo a su composición en aminoácidos, la masa molar para la heveína fue calculada como 4.73 kDa. Las soluciones de ligando fueron preparadas disolviendo al sacárido en la solución amortiguadora previamente equilibrada por diálisis con la solución de proteína. La concentración de ligando fue determinada gravimétricamente.

• **ENSAYOS DE CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA**

Las determinaciones calorimétricas de la unión de la heveína con sus ligandos se efectuaron usando un instrumento OMEGA (MicroCal, Co.). El diseño y la operación del aparato han sido descritos en detalle por Wiseman *et al.* [25].

La equilibración térmica del equipo fue lograda con la ayuda de un baño con agua recirculante. Durante los experimentos, la solución en la celda de reacción fue sometida a una agitación constante de 400 rpm. Se juzgó que la línea base alcanzó la estabilidad apropiada cuando el rms fue menor que $5 \text{ ncal}\cdot\text{s}^{-1}$. El calor de dilución del sacárido (obtenido de la adición del ligando a la solución amortiguadora bajo las mismas condiciones y programa de inyección que los ocupados con la solución con proteína) fue sustraído de los calores desprendidos en la unión de la heveína y su ligando. Típicamente, el calor de dilución del sacárido fue menor al 3% del calor generado en la primera adición de ligando a la solución con proteína.

A continuación se detalla la deducción del modelo matemático, el cual considera un solo tipo de sitios de unión, a través del cual los valores de K_a , ΔH_{cal} y η fueron estimados a partir de las curvas calorimétricas de titulación. El modelo considera un sólo tipo de sitio de unión. No obstante, es fácilmente generalizable a diferentes tipos de sitio. Siendo Θ la fracción de sitios ocupados por el ligando X, la constante de asociación puede ser expresada como

$$K_a = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)[X]}, \quad (\text{M2.1})$$

en donde $[X]$ es la concentración del ligando libre. La concentración total de ligando (X_t) puede ser expresada en términos de la concentración total de proteína M_t y del número de sitios de unión (η) a través de

$$X_t = [X] + \eta\Theta M_t \quad (\text{M2.2})$$

Combinando las ecuaciones M2.1 y M2.2 se obtiene

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{X_t}{\eta M_t} + \frac{1}{\eta K_a M_t} \right] + \frac{X_t}{\eta M_t} = 0. \quad (\text{M2.3})$$

El calor total desprendido hasta el punto de saturación Θ es

$$Q = \eta\Theta M_t \Delta H_{\text{cal}} V_o \quad (\text{M2.4})$$

en donde V_o es el volumen de la celda de reacción. Resolviendo la ecuación cuadrática M2.3 para Θ , y sustituyendo en M2.4, obtenemos

$$Q = \frac{\eta M_t \Delta H_{\text{cal}} V_o}{2} \left[1 + \frac{X_t}{\eta M_t} + \frac{1}{\eta K_a M_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{\eta M_t} + \frac{1}{\eta K_a M_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{\eta M_t}} \right] \quad (\text{M2.5})$$

Así, una ecuación que describe la asociación en términos de K_a , ΔH_{cal} y η (lado derecho) puede ser ajustada a través de un método de regresión no lineal a los cambios de calor observados experimentalmente (lado izquierdo). El ajuste fue realizado usando el método de Marquardt programado en ORIGIN (MicroCal, Co.).

BASES TERMODINÁMICO- ESTRUCTURALES DEL RECONOCIMIENTO LECTINA-CARBOHIDRATO

Debido al papel fundamental que la asociación entre lectinas y carbohidratos juega en un sinnúmero de eventos biológicos, la elucidación de las bases estructurales y energéticas que gobiernan este proceso ha llegado a un plano de primera importancia. En los últimos años, un cuerpo abundante de información estructural ha sido acumulado. A pesar de que la primera estructura de un complejo lectina-carbohidrato con resolución media fue obtenida en la década pasada [29], el número de estructuras que se cuenta en la actualidad asciende a varias decenas [9]. Estos estudios han permitido formar una imagen clara al respecto de los orígenes de la especificidad entre carbohidratos y lectinas. Ha sido mostrado, por ejemplo, que la especificidad corre por cuenta de la complementariedad de superficies de tipo polar y no polar. En particular, ha quedado firmemente establecido el papel preeminente de los puentes de hidrógeno en la habilitación de una asociación [13].

En contraste con los estudios de tipo estructural, la caracterización termodinámica de la interacción entre lectinas y carbohidratos ha estado limitada a unos cuantos sistemas [17], por lo que las bases moleculares de la estabilidad y afinidad en la unión entre estas

biomoléculas sigue siendo obscuras. Para todos los sistemas lectina-carbohidrato estudiados hasta la fecha ha sido encontrado que la asociación es conducida entálpicamente. Ante la prominente presencia de puentes de hidrógeno en las interfases lectina-carbohidrato, es fácil sugerir que este tipo de interacción podría ser la principal fuente de estabilidad. Sin embargo, la contribución energética *efectiva* de un puente de hidrógeno en la formación de este tipo de sistemas no sólo depende de la energía *intrínseca* de formación de un puente de hidrógeno, sino además del costo energético por la *desolvatación* y la *transferencia* del par hidrofílico a un medio de menor polaridad. Siendo el aporte energético de un puente de hidrógeno sensible a las condiciones ambientales antes y después de la reacción, no resulta sorprendente encontrar en la literatura estudios que sostienen que la formación de un puente de hidrógeno en procesos como el plegamiento de una proteína puede ser de una magnitud energética favorable [30], nula [31] o incluso desfavorable [32]. En el caso particular de la interacción lectina-carbohidrato, algunos autores han llegado a descartar cualquier peso energético de los puentes de hidrógeno, y han propuesto que, en virtud de un efecto estereoelectrónico ejercido por las superficies de contacto, las moléculas de agua solvatantes se encuentran en un estado energético mayor al alcanzado en el grueso del disolvente, por lo que la liberación y retorno al disolvente de estas moléculas perturbadas es la fuente principal de entalpía favorable para la formación del complejo [33].

En los últimos años ha sido mostrado que los cambios de entalpía y de capacidad calorífica que acompañan el plegamiento de proteínas [34], la asociación proteína-proteína [35] y la unión proteína-oligopéptido [36] pueden ser parametrizados en forma sencilla en términos del cambio de áreas superficiales accesibles al disolvente (ΔA) de las moléculas participantes. En tanto el común denominador de los “eventos polipeptídicos” englobados en este modelo termodinámico-estructural es la formación y ruptura de interacciones no covalentes entre los solutos y el agua, podría esperarse que la energética de interacción de otros solutos en un ambiente acuoso, *e. gr.* lectinas y carbohidratos, puede ser explicada adecuadamente mediante el mismo acercamiento. En este capítulo hemos intentado usar como guía este marco termodinámico-estructural en búsqueda de nuevos indicios sobre las bases moleculares de la asociación entre lectinas y carbohidratos. En particular, nuestro

análisis revela importantes diferencias en el comportamiento entálpico de estos sistemas con respecto al desarrollado en el plegamiento de proteínas.

Como primer paso hacia el logro de este objetivo, nos dimos a la empresa de buscar en la literatura aquellos complejos lectina-carbohidrato para los cuales se cuente con la estructura tridimensional y con datos calorimétricos de la unión. Esta búsqueda nos condujo a la colección de 6 sistemas lectina-carbohidrato adicionales a los de heveína. Cuatro pertenecientes al grupo de leguminosas: concanavalina A unida a metil- α -manopiranososa (ConA-MeMan), lectina número 4 de *Griffonia simplicifolia* unida al determinante de grupo sanguíneo *b* de Lewis, lectina de *Erythrina corallodendrom* unida a lactosa, lectina de chícharo unida a lactosa; una del grupo de las galectinas: lectina S-14 de mamífero unida a N-acetil-lactosamina; y una lectina perteneciente al grupo de proteínas unidoras de quitina: AGT unida a quitobiosa (AGT-Q₂). Adicionalmente, el caso del complejo de una enzima (lisozima) uniendo quitotriosa fue incluido en el análisis. Desafortunadamente, de entre estos sistemas, tan sólo a los complejos de heveína y a ConA-MeMan les ha sido determinado experimentalmente el valor de ΔC_p , por lo que el intento de evaluar si a través de las parametrizaciones empleadas en eventos puramente polipeptídicos es posible estimar esta función de estado en la unión lectina-carbohidrato tuvo que ser restringida a estos tres casos.

• CÁLCULO DEL CAMBIO DE CAPACIDAD CALORÍFICA

En los últimos años han sido propuestos diferentes métodos para estimar el cambio de capacidad calorífica a partir de información estructural. En estos métodos, la contribución por unidad de área que se oculta o expone al disolvente por la reacción ha sido estimada a partir de compuestos modelo. En el caso del plegamiento de proteínas, existen al menos tres parametrizaciones independientes. Spolar y Record (SR) han estimado las contribuciones de áreas polares y no polares usando datos de transferencia de hidrocarburos líquidos [37]. Murphy y Gill han generado una parametrización semejante a partir de la transferencia de dipéptidos cíclicos [38]. Privalov y Makhatadze (PM) han reportado la energética de hidratación para las partes alifáticas, aromáticas y polares de amino ácidos [39]. Los detalles de estas parametrizaciones pueden ser encontrados en la sección de

Métodos anexa al presente capítulo (Eqs. M3.1 y M3.2). Los métodos de SR y MG consideran las contribuciones por tipo de área polar (oxígenos y nitrógenos) y no polar (carbono y azufre), por lo que las parametrizaciones pueden ser aplicadas, en principio, a cualquier tipo de molécula. Sin embargo, el método de PM distingue entre los diferentes grupos químicos interactuantes. Privalov y Makhatadze han obtenido, a partir del análisis de compuestos modelo, las constantes de proporcionalidad para los grupos químicos de los 20 aminoácidos naturales que con mayor frecuencia aparecen en proteínas [39]. Con el propósito de obtener los parámetros apropiados para calcular ΔC_p a partir de áreas moleculares de grupos de carbohidrato, seguimos el algoritmo de PM para determinar, usando compuestos *ad hoc*, las contribuciones correspondientes a un grupo éter de piranosa, un carbono de alcano cíclico y un grupo hidroxilo unido a piranosa (Tabla 3.1; ver Métodos para mayor detalle).

Tabla 3.1. Entalpías y Capacidades Caloríficas de Hidratación para Diferentes Constituyentes de Carbohidratos a 25 °C.

Grupo ^a	A (Å ²)	-ΔH _{hid} (cal(mol Å ²) ⁻¹)	ΔC _{p, hid} (cal(mol K Å ²) ⁻¹)
CAL ^b		29.2	0.53
CAC	41.8	29.4	0.40
-O _{-cíc}	15.8	315.2	-0.27
-OH	39.7	244.4	-0.30 ^a
-CONH- ^b	35	406.8	-0.39

^a CAL: carbono de alcano lineal, CAC: carbono de alcano cíclico, -O_{-cíc}: éter cíclico.

^b Valores tomados de Makhatadze y Privalov [39].

Los cálculos de ΔA sobre los complejos de heveína, el sistema ConA-MeMan y las moléculas libres respectivas son mostrados en la Tabla 3.2. Las estimaciones del cambio de capacidad calorífica usando parametrizaciones de diferente origen (Eqs. M3.1 y M3.2) y los valores de ΔA de la Tabla 3.2 son mostrados en la Tabla 3.3, en donde se observa una buena correspondencia entre los valores estimados y los experimentales. En particular, la parametrización propuesta por SR parece rendir mejores estimados para los complejos de heveína, en tanto que los tres métodos subestiman la magnitud de ΔC_p para el sistema ConA-MeMan.

Como regla general ha sido observado que la unión lectina-carbohidrato está acompañada de un decremento pequeño en la capacidad calorífica [17]. Este hecho fija en

ocasiones cierto grado de complejidad en la determinación experimental de ΔC_p , por lo que la posibilidad de realizar predicciones de precisión razonable utilizando sólo datos estructurales resulta alentador.

Tabla 3.2. Cambios de Áreas Superficiales Accesibles al Disolvente^a en la Formación de Diferentes Complejos Lectina-Carbohidrato

Grupo	Hev-Q ₂	Hev-Q ₃	ConA-MeMan
	<i>Proteína + Carbohidrato</i>		
No polar	-308.7	-342.9	-172.6
Polar	-158.5	-221.7	-167.9
	<i>Proteína</i>		
Alifático	-27.3	-16.7	-58.1
Aromático	-113.2	-148.9	-13.5
<i>Parte polar de:</i>			
Arg			-2.9
Asn			-9.3
Asp			-6
Gln		-19.1	
Glu	-19.6	-20.1	
His		-12.4	
Ser		-0.6	
Thr			-2.5
Trp	-19.7	-23.0	
Tir	-21.5	-22.8	-6
-CONH-	-3.3		-13.6
	<i>Carbohidrato</i>		
Alifático	-108.5	-113.9	-71.9
-CH ₂ -cíc	-52.7	-51.5	-29.0
-O-cíc	-2.6	-10.4	-6.4
-OH	-46.9	-70.4	-121.3
-CONH-	-51.6	-54.8	

^a Las áreas están dadas en Å²

Tabla 3.3. Estimaciones de ΔC_p a partir de Datos Estructurales^a

Complejo	$\Delta C_{p,exp}^b$ (cal(mol·K) ⁻¹)	$\Delta C_{p,calc}^c$ (cal(mol·K) ⁻¹)		
		SR	MF	PM ^c
Hev-Q ₂	-64±6	-76	-98	-106
Hev-Q ₃	-83±8	-79	-97	-102
ConA-MeMan	-48±8 ^d	-32	-34	-36

^a Las incertidumbres representan el error típico en la regresión.

^b La determinación experimental de ΔC_p fue realizada a través de la dependencia térmica del cambio de entalpía ($\partial\Delta H/\partial T$).

^c Estimaciones de ΔC_p a través de datos termodinámico-estructurales. SR: estimación basada en datos de transferencia de hidrocarburos líquidos; $\Delta C_p = -0.14 \cdot \Delta A_{pol} + 0.32 \cdot \Delta A_{np}$ [37]. MF: estimación basada en datos de transferencia de dipéptidos cíclicos; $\Delta C_p = -0.26 \cdot \Delta A_{pol} + 0.45 \cdot \Delta A_{np}$ [36]. PM: Estimación basada en el algoritmo de Privalov y Makhatadze; ver métodos.

^d Valor tomado de Chervenak y Toone [40].

• PROPIEDADES ENTÁLPICAS DE LA ASOCIACIÓN DE LECTINAS Y CARBOHIDRATOS

La Tabla 3.4 detalla la composición del conjunto de sistemas lectina-carbohidrato considerado en el presente análisis termodinámico-estructural. El listado incluye la energética de unión y los cambios de accesibilidad de áreas debidos al proceso. Con el fin de enriquecer el análisis, se presenta en la Tabla 3.5 la misma información para el plegamiento de 12 proteínas globulares, las cuales constituyen el conjunto considerado en el análisis termodinámico-estructural de Murphy y Freire [34]; adicionalmente, dos casos de asociación son presentados: la formación del homodímero de interleucina 8 [35] y la interacción entre un anticuerpo y angiotensina II, un antígeno oligopeptídico [36].

Como se revela de la comparación de las Tablas 3.4 y 3.5 (octava columna), el cambio de energía libre por unidad de área que se oculta al disolvente ($\Delta G/\Delta A_t$) en la unión lectina-carbohidrato es un orden de magnitud superior al alcanzado en el plegamiento de proteínas. Este hecho pone en evidencia profundas diferencias termodinámico-estructurales entre los dos tipos de sistemas. En su forma más general, la energía libre se descompone en:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (3.1)$$

Así, la diferencia de $\Delta G/\Delta A_t$ entre los dos sistemas de reacción puede originarse de interacciones no covalentes energéticamente más favorables (ΔH) y/o de costos menores por ordenamiento ($T\Delta S$). En términos cualitativos, el tipo de ordenamiento que sufre una proteína en su plegamiento es fácilmente diferenciable del involucrado en la asociación de una lectina y un carbohidrato. En tanto que en el plegamiento ocurren cambios dramáticos en la conformación de la cadena polipeptídica, ha sido demostrado que estos cambios son despreciables en la formación de un complejo lectina-carbohidrato. En efecto, existe un importante cuerpo de evidencias que indica que estas biomoléculas en su asociación se comportan básicamente como “cuerpos rígidos” [51]. En contraste, la asociación implica un aumento de orden debido a la disminución del número total de partículas [52]. Así, el caso de una entropía de mezclado de magnitud pequeña en relación a la conformacional podría dar cuenta de las diferencias de $\Delta G/\Delta A_t$. Sin embargo, la comparación de la razón $T\Delta S/\Delta A_t$ indica que, en promedio, el costo entrópico por unidad de área que se oculta al disolvente es *significativamente menor* en eventos de plegamiento que en la unión lectina-carbohidrato o proteína-proteína (Tablas 3.4 y 3.5).

Tabla 3.4 Cambios Energéticos (a 25°C) y de Áreas Accesibles en la Unión entre Lectinas y Carbohidratos.

Sistema	$-\Delta H$ kcal/mo l	$-\Delta G$ kcal/mo l	$-\Delta S$ kcal/mo l	$-\Delta A_{np}$ (Å ²)	$-\Delta A_{pol}$ (Å ²)	$-\Delta C_p$ cal/mol·K	$\frac{\Delta G}{\Delta At}$	$\frac{\Delta H}{\Delta At}$	$\frac{\Delta S}{\Delta At}$	Ref.
Hev-Q ₂	5.3	3.8	1.5	308.7	158.5	64	8.1	11.3	3.2	21
Hev-Q ₃	7.0	5.6	1.4	342.9	221.7	83	10.0	12.4	2.4	
AGT-Q ₂	13.5	4.9	8.6	237.0	277.0	35 ^b	9.5	26.3	16.7	41
5cva ^a	7.1	5.0	2.1	172.6	167.9	48	14.7	20.9	6.2	40,42
1led ^a	11.9	6.5	5.4	312.8	344.9	51 ^b	9.9	18.1	8.2	33,43
1rin ^a	6.5	4.6	1.9	144.5	167.0	22 ^b	14.7	20.9	6.2	44,45
1lte ^a	9.8	4.5	5.3	234.0	199.5	53 ^b	10.6	23.2	12.7	46,47
1slt ^a	10.0	6.2	3.8	223.8	257.8	34 ^b	12.9	20.8	7.9	48,49
1hew ^a	12.0	ND	ND	425.3	396.3	88 ^b	ND	14.6	ND	41,50
Promedio							11.3	18.7	7.9	
σ							2.5	5.0	4.8	

^a La abreviatura corresponde al código PDB. 5cva: concanavalina A unida a metil- α -manopiranososa; 1led: lectina número 4 de *Griffonia simplicifolia* unida al determinante de grupo sanguíneo *b* de Lewis; 1rin: lectina de chícharo unida a manosa; 1lte: lectina de *Erythrina corallodendrom* unida a lactosa; 1slt: lectina S-14 de mamífero unida a N-acetilactosamina; 1hew: lisozima unida a quitotriosa.

^b Valor estimado usando la parametrización propuesta por Murphy y Freire [34].

Tabla 3.5 Cambios Energéticos (a 25°C) y de Áreas Accesibles en el Plegamiento y Asociación de Proteínas.^a

Sistema ^b	$-\Delta H$ kcal/mo l	$-\Delta G$ kcal/mo l	$-\Delta S$ kcal/mo l	$-\Delta A_{np}$ (Å ²)	$-\Delta A_{pol}$ (Å ²)	$-\Delta C_p$ kcal/mol·K	$\frac{\Delta G}{\Delta At}$	$\frac{\Delta H}{\Delta At}$	$\frac{\Delta S}{\Delta At}$
5CYT	22	12.9	9.1	5039	3726	1.6	1.5	2.5	1.0
2CAB	49	16.7	32.3	15950	105900	3.8	0.6	1.8	1.2
4CHA	100	15.9	84.1	13970	8762	3.0	0.7	4.4	3.7
1ALC	33	20.7	12.3	6773	4814	1.8	1.8	2.8	1.1
1LYM	56	16.5	39.5	6844	5473	1.6	1.3	4.5	3.2
4MBN	10	12.0	-2.0	8873	5927	2.6	0.8	0.7	-0.1
1SNC	8	4.0	4.0	8151	5344	2.4	0.3	0.6	0.3
9PAP	36.5	27.9	8.6	13070	8692	3.3	1.3	1.7	0.4
5CPV	47.5	18.7	28.8	5770	4027	1.3	1.9	4.8	2.9
1PSG	19.5	26.4	-6.9	22810	13430	6.1	0.7	0.5	-0.2
7RSA	62	11.4	50.6	6004	4963	1.4	1.0	5.7	4.6
1TLD	84.5	18.3	66.2	12370	8903	2.9	0.9	4.0	3.1
1IL8	6.2	6.7	-0.5	910	640	0.2	4.3 ^c	4.0 ^c	-0.3 ^c
AngII	7.7	10.9	-3.2	993	745	0.2	6.3 ^c	4.4 ^c	-1.8 ^c
Promedio							1.1	2.8	1.8
σ							0.5	1.8	1.6

^a Los datos energéticos y de cambios de áreas del plegamiento de proteínas fueron tomados de Murphy y Freire [34]; los de 1IL8 de Burrows *et al.* [35]; los de AngII de Murphy *et al.* [36].

^b La abreviatura corresponde al código PDB, excepto para AngII, que corresponde a la estructura de un anticuerpo unido a angiotensina II que no ha sido depositada. 5CYT: citocromo c; 2CAB: anhidrasa carbónica B; 4CHA: quimotripsina; 1ALC: lactalbúmina α ; 1LYM: lisozima; 4MBN: mioglobina; 1SNC: nucleasa de *Staphylococcus*; 9PAP: papaína; 5CPV: parvalbúmina; 1PSG: pepsinógeno; 7RSA: rnsa A; 1TLD: tripsina; 1IL8: dímero de interleucina 8.

^c Valor no incluido en el promediado de la columna.

Como es de esperarse ante tales comportamientos de entropía, el valor $\Delta H/\Delta At$ correspondiente a la formación de un complejo lectina-carbohidrato es varias veces superior al del plegamiento de una proteína. Así, una capacidad exotérmica notablemente aumentada en relación a la desvuelta en el plegamiento de una proteína es lo que conduce

a los complejos lectina-carbohidrato a estados de menor energía libre, complejos que de por sí requieren en su formación de costos entrópicos altos.

Los cambios de entalpía tanto de plegamiento como de asociación portan contribuciones de origen electrostático, en donde se conjuntan las fuerzas de dispersión de tipo van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, y de origen no polar, en donde caben las asociadas al efecto hidrofóbico. Como una aproximación que permite realizar una conexión con lo estructural, los cambios de áreas de tipo polar y no polar pueden ser tomados como las bases moleculares de los efectos electrostáticos e hidrofóbicos, respectivamente. Así, el cambio neto de entalpía estaría determinado por:

$$\Delta H = \Delta h_{\text{pol}} \cdot \Delta A_{\text{pol}} + \Delta h_{\text{np}} \cdot \Delta A_{\text{np}}, \quad (3.2)$$

en donde los prefactores Δh_i representan la contribución entálpica promedio por unidad de área de tipo i . En el estudio del desplegamiento de proteínas, esta visión simplificada ha resultado una excelente fuente de información al respecto de las bases moleculares de los cambios entálpicos [34], y sería de esperarse que, a través de la determinación de los valores de Δh_{pol} y de Δh_{np} , sea posible arrojar alguna luz al respecto del origen de las diferentes capacidades entálpicas entre la unión lectina-carbohidrato y el plegamiento de proteínas.

En los albores de los estudios calorimétricos del desplegamiento de proteínas globulares, Privalov y Khechinashvili observaron que las entalpías reducidas por el número de aminoácidos tienden a alcanzar un valor común a una temperatura elevada, T_H [53]. El origen de este fenómeno y el valor específico de la así llamada temperatura de convergencia siguen en controversia. Algunos autores, ante la observación de que existe una cantidad promedio constante de ΔA_{pol} por residuo en proteínas globulares, han intentado explicar el fenómeno de convergencia proponiendo que a T_H la transferencia de grupos no polares ocurre isoentálpicamente [54]. De acuerdo con esto, se seguiría que

$$\Delta h_{\text{np}} = \Delta C_{p,\text{np}}(T - T_H); \quad (3.3)$$

$$\Delta h_{\text{pol}} = \Delta h^* + \Delta C_{p,\text{pol}}(T - T_H); \quad (3.4)$$

$$\Delta H = \Delta h^* \cdot \Delta A_{\text{pol}} + \Delta C_p(T - T_H); \quad (3.5)$$

en donde $\Delta C_p = \Delta C_{p,\text{np}} + \Delta C_{p,\text{pol}}$. De ser correcta esta explicación, la ecuación 3.2 adoptaría una forma simplificada a la temperatura T_H , en donde sería posible evaluar directamente

Δh_{pol} como la razón $\Delta H(T_H)/\Delta A_{pol}$. Murphy y Freire, basando su análisis en el conjunto de proteínas enlistadas en la Tabla 3.5, han propuesto que las entalpías específicas de desplegamiento convergen a un valor de $35 \pm 1 \text{ cal}(\text{mol} \cdot \text{Å}^2)^{-1}$ alrededor de los 100 °C [34]. Al extrapolar a 100 °C las entalpías de formación de los complejos lectina-carbohidrato considerados en la Tabla 3.4, se obtiene una entalpía específica de $56 \pm 9 \text{ cal}(\text{mol} \cdot \text{Å}^2)^{-1}$, valor significativamente superior al observado con proteínas globulares [55].

De acuerdo con la ecuación 3.5, sería de esperarse que en un gráfico de $\Delta H/\Delta A_{pol}$ con respecto a la temperatura para el conjunto de proteínas analizadas por Murphy y Freire se hiciera evidente un punto de convergencia alrededor de los 100 °C . Sorpresivamente, la Fig. 3.1 no confirma tal expectativa. En todo caso, la Figura revela una zona de temperatura, la cual es inferior a los 100 °C , en donde los valores de $\Delta H/\Delta A_{pol}$ se estrechan moderadamente. Ante tal revelación, parece más apropiado estimar el valor Δh_{np} directamente de los datos experimentales, en lugar de suponerle un valor nulo en alguna temperatura arbitraria. Por tanto, los conjuntos de magnitudes experimentales del cambio de entalpía para la unión y para el plegamiento fueron ajustados a la forma bidimensional de la ecuación 3.2 (Fig. 3.2):

$$\Delta H/\Delta A_{np} = \Delta h_{pol} \cdot \Delta A_{pol}/\Delta A_{np} + \Delta h_{np}. \quad (3.6)$$

Ante la insuficiencia de datos experimentales del cambio de capacidad calorífica en la formación de complejos lectina-carbohidrato, la ecuación 3.2 fue resuelta para los dos tipos de sistema aquí analizados a partir de datos correspondientes a una temperatura de 25 °C .

El ajuste adecuado que se observa entre los datos experimentales de unión lectina-carbohidrato y el modelo simple de la ecuación 3.2 pone en relieve la existencia de tendencias y patrones comunes entre sistemas que pertenecen a un mismo tipo de proceso molecular pero que no necesariamente desarrollan comportamientos idénticos. En otras palabras, la Fig. 3.2 indica que los distintos complejos lectina-carbohidrato se conjuntan en un grupo termodinámico-estructural con propiedades que le distinguen de otros grupos, como el de la formación del estado nativo de proteínas globulares. El análisis de la Tabla 3.6 revela importantes características termodinámico-estructurales “promedio” de la unión

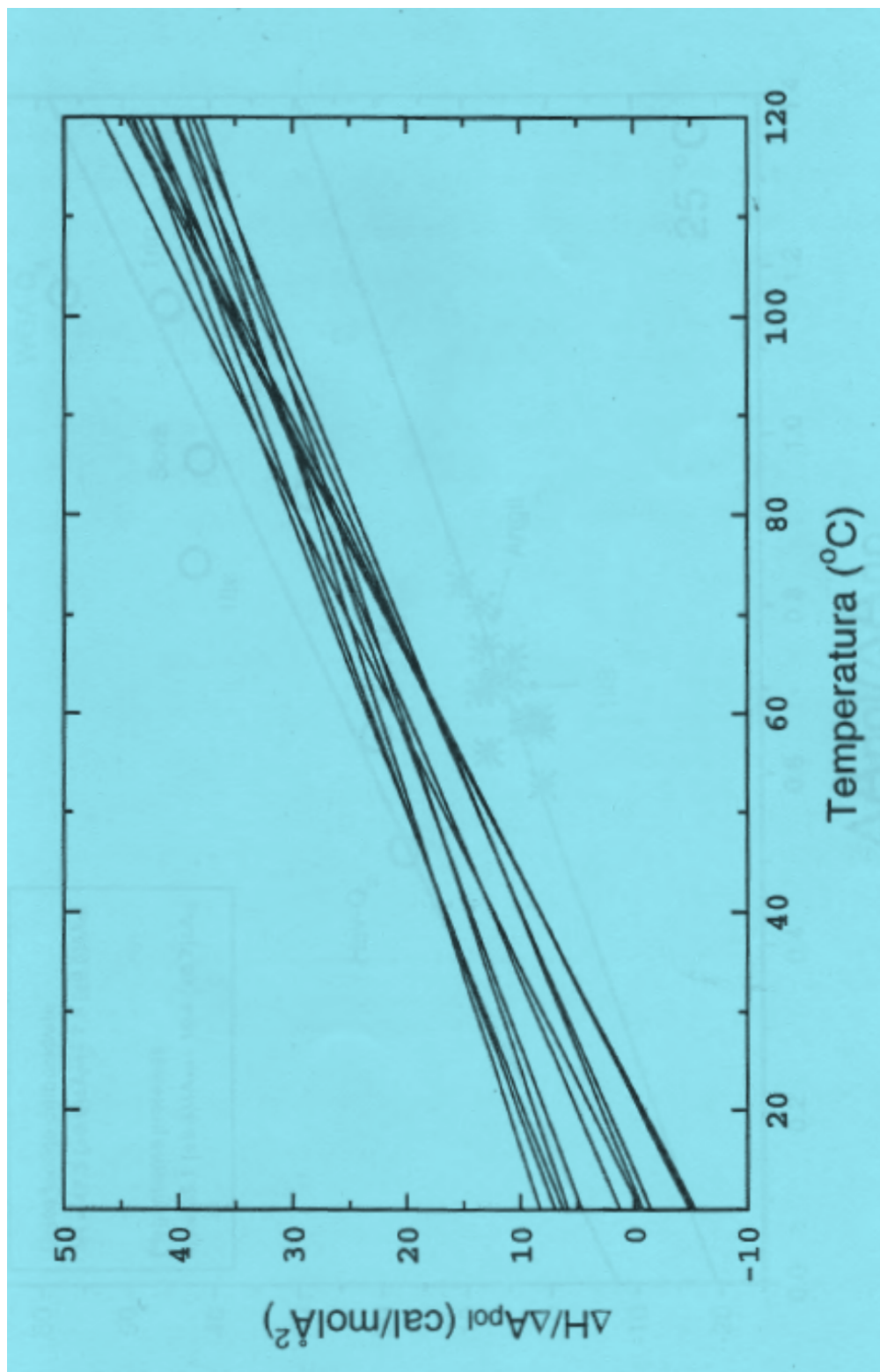


Fig. 3.1. Dependencia térmica del cambio de entalpía específica de plegamiento.

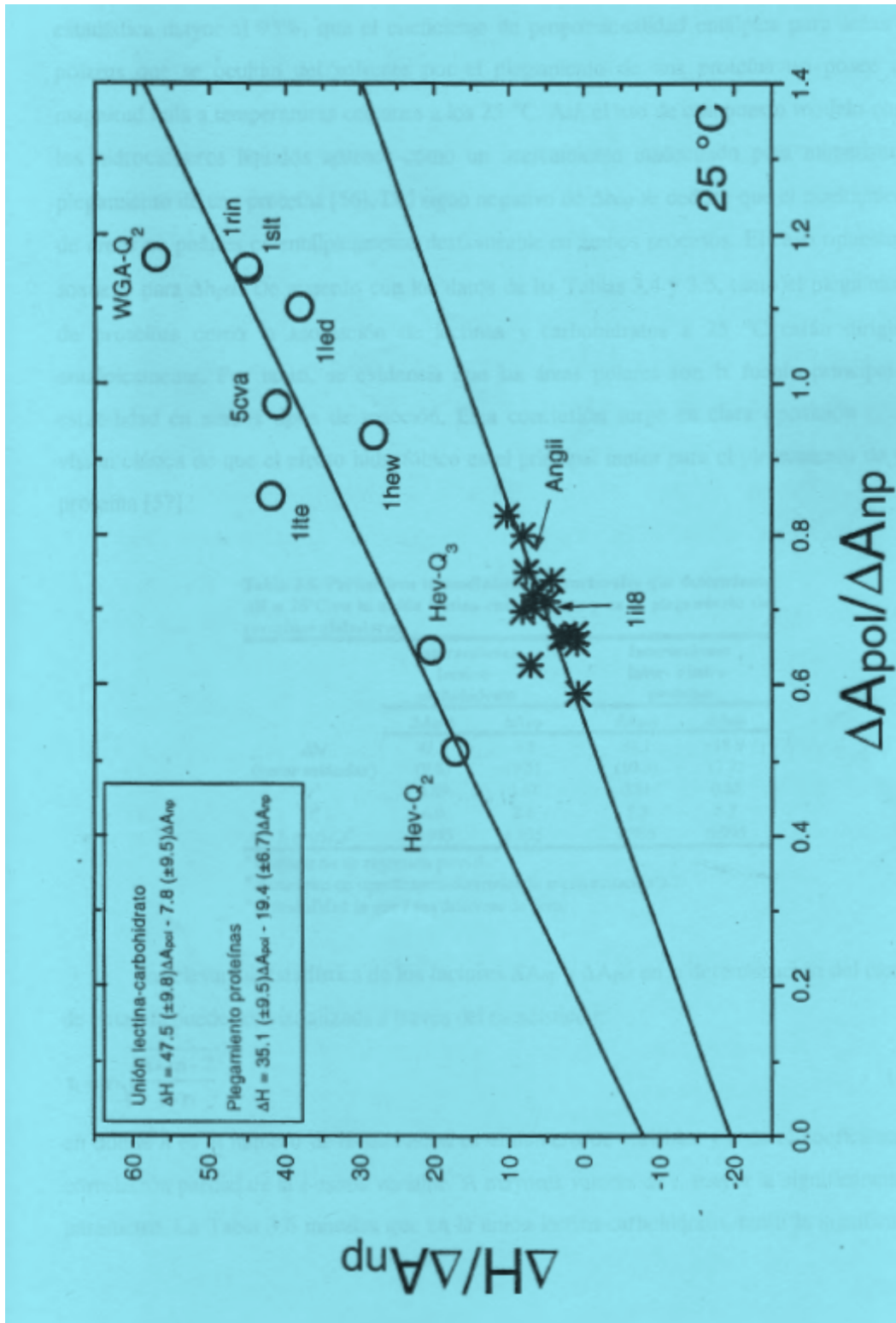


Fig. 3.2. Tendencias entálpico-estructurales en la asociación lectina-carbohidrato y en el plegamiento de proteínas.

lectina-carbohidrato y del plegamiento de proteínas. Es posible afirmar, con una significancia estadística mayor al 95%, que el coeficiente de proporcionalidad entálpica para áreas no polares que se ocultan del solvente por el plegamiento de una proteína no posee una magnitud nula a temperaturas cercanas a los 25 °C. Así, el uso de compuesto modelo como los hidrocarburos líquidos aparece como un acercamiento inadecuado para mimetizar el plegamiento de una proteína [56]. Del signo negativo de Δh_{np} se deduce que el ocultamiento de áreas no polares es entálpicamente desfavorable en ambos procesos. El caso opuesto se sostiene para Δh_{pol} . De acuerdo con los datos de las Tablas 3.4 y 3.5, tanto el plegamiento de proteínas como la asociación de lectinas y carbohidratos a 25 °C están dirigidos entálpicamente. Por tanto, se evidencia que las áreas polares son la fuente principal de estabilidad en ambos tipos de reacción. Esta conclusión surge en clara oposición con la visión clásica de que el efecto hidrofóbico es el principal motor para el plegamiento de una proteína [57].

Tabla 3.6. Parámetros termodinámico-estructurales que determinan ΔH a 25°C en la unión lectina-carbohidrato y en el plegamiento de proteínas globulares.

	Interacciones lectina-carbohidrato		Interacciones inter- e intra-proteína	
	ΔA_{pol}	ΔA_{np}	ΔA_{pol}	ΔA_{np}
Δh_i	47.5	-7.8	34.1	-18.9
(error estándar)	(9.8)	(9.5)	(10.3)	(7.2)
r^a	0.89	0.67	0.81	0.83
t^b	6.0	2.6	5.3	5.7
$1-\alpha (t>t_\alpha)^c$	0.995	0.975	0.995	0.995

^a Coeficiente de regresión parcial.

^b Parámetro de significancia determinado según ecuación 3.7.

^c probabilidad de que t sea diferente de cero.

La relevancia estadística de los factores ΔA_{np} y ΔA_{pol} en la determinación del cambio de entalpía puede ser visualizada a través del estadístico t :

$$t_i = r_i \sqrt{\frac{n - m - 2}{1 - r_i^2}} \quad (3.7)$$

en donde n es el número de muestras, m es el número de variables y r_i es el coeficiente de correlación parcial de la i -ésima variable. A mayores valores de t , mayor la significancia del parámetro. La Tabla 3.6 muestra que en la unión lectina-carbohidrato, tanto la

significancia como la magnitud de la contribución entálpica de las áreas no polares es relativamente pequeña, en tanto que se puede sostener lo opuesto para las áreas de tipo polar, con las cuales es posible explicar alrededor del 80% de las variaciones de las entalpías experimentales. En cambio, los niveles de significancia de estos factores en el plegamiento de proteínas aparecen muy cercanos (Tabla 3.6), sugiriendo que en estos eventos no existe una clara preponderancia de alguno de los dos tipos de ΔA en la determinación de ΔH .

La comparación de los prefactores de la ecuación 3.2 presentados en la Tabla 3.6 indica que el ocultamiento de una superficie polar es entálpicamente más favorable en la formación de un aducto lectina-carbohidrato que en el plegamiento de una proteína. De la misma forma, se desprende que el ocultamiento de áreas no polares es de menor costo energético en el caso del acomplejamiento. Bajo el criterio estadístico t de Student, la probabilidad de que los valores Δh_{np} y Δh_{pol} entre el plegamiento de proteínas y la unión lectina-carbohidrato sean diferentes es cercana al 80%. Esta alta probabilidad se ve apuntalada por la ineludible conclusión de que sólo a través de la existencia de importantes diferencias entre las bases moleculares que gobiernan el plegamiento de una proteína globular y la asociación entre un sacárido y una lectina, es posible explicar las diferentes tendencias dibujadas en la Fig. 3.2. En otras palabras, las tendencias de la Fig. 3.2 indican que *necesariamente* al menos uno de los dos siguientes casos debe operar: o que la *ganancia* entálpica por ocultar áreas es superior en la unión lectina-carbohidrato, o que el *costo* por ocultar áreas no polares es mayor en el plegamiento de una proteína. En lo que sigue presentaremos un conjunto de evidencias independientes que permiten sustentar que el valor de Δh_{pol} (de Δh_{np}) es mayor (menor) en la asociación lectina-carbohidrato.

- **¿POR QUÉ ES DE ESPERARSE UN VALOR MÁS PEQUEÑO DE Δh_{np} Y/O UN VALOR MÁS GRANDE DE Δh_{pol} EN LA UNIÓN DE UN CARBOHIDRATO CON UNA LECTINA?**

La entalpía de ocultamiento de áreas debido al plegamiento o unión de moléculas en un medio acuoso es una cantidad efectiva que surge de la suma de dos eventos diferentes, a saber: el rearrreglo del disolvente debido a la deshidratación de los solutos, y la interacción directa entre las superficies de contacto. En lo siguiente, presentamos evidencias de tipo geométrico que sugieren que en las interfases lectina-carbohidrato se podrían formar

interacciones energéticamente más favorables que en el interior de proteínas globulares. Adicionalmente, hemos realizado una estimación de la entalpía de deshidratación de las zonas de contacto de algunos complejos lectina-carbohidrato (ver Métodos). Este estudio, además de que brinda una imagen aproximada del peso que la deshidratación tiene en la determinación del cambio de entalpía observado experimentalmente, nos ha permitido probar la propuesta de Lemieux de que la entalpía de deshidratación es la principal fuente de estabilidad en los complejos lectina-carbohidrato.

A) *Los puentes de hidrógeno en las interfases lectina-carbohidrato presentan una mejor geometría y mayor abundancia que en el interior de proteínas globulares.* En el siguiente capítulo presentamos los resultados de una encuesta estadística levantada sobre la geometría de los puentes de hidrógeno presentes en las interfases de 14 diferentes complejos lectina-carbohidrato cuya estructura tridimensional ha sido determinada con alta resolución ($\leq 2.3 \text{ \AA}$). Los patrones geométricos resultantes, al ser comparados con los obtenidos por Stickle *et. al.* para un conjunto de 42 proteínas globulares [58], revelan que los puentes de hidrógeno formados entre lectinas y carbohidratos poseen en general mejor calidad estereoquímica. En virtud de que una mejor geometría podría traducirse en la formación de puentes de hidrógeno más fuertes, este factor bien podría expresarse en un coeficiente de

Δh_{pol} más grande en la unión de lectinas y carbohidratos. Por otro lado, en el mismo capítulo es mostrado que la densidad de puentes de hidrógeno es significativamente mayor en los aductos lectina-carbohidrato que en el interior de proteínas o que en la interfase de complejos proteína-proteína, fenómeno que podría estar contribuyendo adicionalmente a la mayor eficiencia entálpica desarrollada en el reconocimiento entre sacáridos y lectinas.

Recientemente, Xu *et. al.* realizaron un estudio de la relación entre la energía libre de Gibbs y los cambios de área accesible al disolvente para 21 diferentes sistemas de unión proteína-proteína [59]. Los autores mostraron, de manera similar a lo encontrado aquí en la asociación lectina-carbohidrato, que las interacciones hidrofílicas juegan un papel preponderante en la determinación de la energética de unión. En la Tabla 3.5 son mostrados los datos termodinámicos y estructurales para la asociación de dos sistemas proteína-proteína. Interesantemente, la parametrización obtenida para la ecuación 3.2 a partir de datos de plegamiento de proteínas resulta adecuada para explicar los cambios de entalpía en

la asociación proteína-proteína. De acuerdo con esta parametrización, se esperarían cambios de entalpía de -4.6 y -6.6 kcal/mol para los sistemas 1IL8 y AngII, respectivamente. Los valores experimentales correspondientes son de 6.6 y 7.7 kcal/mol. En cambio, la parametrización resuelta para la unión lectina-carbohidrato rinde estimados significativamente mayores (-23.3 y -16.6 kcal/mol para 1IL8 y AngII, respectivamente) que los valores experimentales. En vista de esto, parece sugerirse que la mayor eficiencia entálpica que presentan lectinas y carbohidratos en su reconocimiento podría radicar en la naturaleza molecular de este último tipo de biomoléculas polihidroxílicas. En cambio, al menos en términos entálpicos, las bases moleculares de la interacción entre átomos pertenecientes a diferentes cadenas polipeptídicas (por ejemplo, la asociación de dos monómeros) son muy semejantes a las de la interacción entre átomos pertenecientes a la misma cadena polipeptídica.

B) Los grupos polares involucrados en el reconocimiento de lectinas y carbohidratos son transferidos a un medio de mayor constante dieléctrica. Existe un sinnúmero de evidencias tanto teóricas como experimentales del alto costo energético asociado con la transferencia de grupos hidrofílicos de un medio polar a otro de constante dieléctrica pequeña [60]. Si el grupo polar es transferido en su totalidad al ambiente no polar, el costo puede ser elevado aun en el caso de que se encuentre formando un par hidrofílico [61]. Al parecer, el origen de este fenómeno radica en una interacción desfavorable entre los grupos polares y su entorno hidrofóbico. De acuerdo con los datos presentados en las Tablas 3.4 y 3.5, en una asociación lectina-carbohidrato se ocultan al disolvente cantidades similares de áreas de tipo polar y no polar, en tanto que en el plegamiento de proteínas dominan las áreas hidrofóbicas. Como se muestra en el siguiente capítulo, estos comportamientos son confirmados del análisis de un conjunto mayor de sistemas (Tablas 4.2 y 4.3). En virtud de estas diferencias en la composición de áreas de contacto, es de esperarse que el ambiente en una interfase lectina-carbohidrato sea más propicio para el ocultamiento de un grupo polar que en el del núcleo de una proteína nativa.

C) Las moléculas de agua que hidratan los sitios de unión son más fáciles de desplazar. Existen diversos métodos teóricos para predecir el sitio de unión en una proteína. El principio de estos métodos consiste en el muestreo de la superficie de la

proteína mediante un compuesto o grupo prueba, localizando zonas en donde ocurran máximos de energía de interacción [62,63]. De manera un tanto inesperada, ha sido encontrado con frecuencia que estos métodos, en los que el disolvente no es tratado de manera explícita, predicen la existencia de un número mucho mayor de sitios de unión que el observado experimentalmente. En virtud de que la deshidratación del sitio de unión implica el desplazamiento de un competidor (el agua) por otro (el ligando), ha sido postulado que esta competencia debe determinar que experimentalmente sólo un reducido número de sitios de unión sea observado [64]. A través de ingeniosos experimentos de cambios de disolvente en cristales de proteína, Ringe y colaboradores [65] han desarrollado una versión experimental de los métodos teóricos de predicción de sitios de unión. En este acercamiento, las partículas de prueba (el disolvente de recambio) son puestas a competir con las moléculas de agua que cristalizaron adheridas a las moléculas de proteína. Así, se ha logrado mostrar que, en efecto, la fuerza con la que las moléculas de agua se unen a la proteína no es constante a lo largo de la superficie de la macromolécula. Los estudios de estos autores han revelado que las moléculas de agua que solvatan el sitio de unión de la elastasa son más fáciles de desplazar que las unidas a la mayor parte de la superficie de la proteína.

Lemiux ha presentado argumentos para suponer que la deshidratación de las superficies de carbohidratos y lectinas es también de un costo energético relativamente bajo [13]. Los carbohidratos son moléculas polianfílicas cuya tendencia natural en un medio altamente polar es a maximizar la exposición de grupos polares y a minimizar la de no polares. Estudios de simulación por técnicas de Monte Carlo han mostrado que, dada la naturaleza estereoquímica de los carbohidratos, se crean “espacios vacíos” sobre las de regiones superficie no polar, *i.e.*, superficies que no están (o están en menor) contacto con el agua [66]. El mismo fenómeno ha sido propuesto para el comportamiento de solvatación del sitio de unión en la lectina [67]. Estos espacios vacíos implican, evidentemente, un ahorro energético que favorece la unión de lectinas y carbohidratos. En cambio, este efecto topológico no sería de esperarse que ocurriera en la mayoría de las áreas superficiales accesibles al disolvente de una cadena polipeptídica completamente desplegada [33]. La pregunta natural que se sigue es si estas diferencias en el comportamiento de solvatación pueden al menos en parte ser responsables de las diferencias de magnitudes de Δh_{pol} y de

ΔH_{np} entre la unión lectina-carbohidrato y el plegamiento de una proteína. El punto de partida para lograr una respuesta a esta pregunta, es averiguar el peso energético que la deshidratación tiene en la determinación del cambio neto de entalpía observado.

ΔH depende del balance entre una energía originada del proceso de deshidratación y otra debida a las interacciones entre solutos (ver Eq. M3.8). Ante la complejidad de medir ΔH_{hid} y ΔH_{int} experimentalmente, queda la alternativa de estimar de manera indirecta o teórica los valores de estos parámetros termodinámicos. Recientemente, Makhatadze y Privalov han utilizado los datos de transferencia de compuestos modelo del estado gaseoso a un medio acuoso para describir el proceso de reorganización del disolvente debido al plegamiento de una proteína [68,69]. Siguiendo a estos autores, en este trabajo hemos determinado la magnitud de ΔH_{hid} para la unión lectina-carbohidrato a partir del cambio de áreas superficiales, de acuerdo con la ecuación M3.6, y la de ΔH_{int} usando la ecuación M3.8. Las magnitudes para los complejos de la heveína y para el sistema ConA-MeMan son presentados en la Tabla 3.7. Nótese que debido al signo negativo que ΔA adquiere en un proceso de asociación o de plegamiento (*i.e.*, un ocultamiento de áreas), la magnitud ΔH_{hid} corresponde en realidad a la energía de deshidratación, por lo que, por motivos de claridad, en lo siguiente nos referiremos a ella como ΔH_{dhid} . Como puede ser observado en la Tabla 3.7, el valor observado de ΔH_{cal} aparece como una cantidad pequeña resultante de la suma de dos cantidades muy grandes y de signo opuesto. Dicho de otra forma, la ruptura de interacciones entre los solutos libres y el disolvente consume una parte mayor de la energía producida por la asociación de una lectina y su ligando.

Karplus y colaboradores [70] han mostrado que la diferencia de energía entre las estructuras nativa y desplegada de una proteína, calculada mediante funciones de potencial, se aproxima a la entalpía de desplegamiento en el vacío (ΔH_{vac}). Estos autores mostraron la validez de su método mediante la reproducción de los valores de transición de fase de alcanos simples usando el conjunto de constantes de potencial programados en CHARMM19 [71]. Para estimar ΔH_{vac} para la unión lectina-carbohidrato (el cual, en principio, corresponde a ΔH_{int}), nosotros hemos empleado otro campo de fuerza de tipo general, DREIDING II [72]. Como puede ser observado en la Tabla 3.8, los valores de ΔH_{vac} derivados con DREIDING II para el desplegamiento de citocromo c, ribonucleasa A,

lisozima y mioglobina resultan muy cercanos a los calculados por Lazaridis *et. al.* [70] mediante el uso de CHARMM19. Para su comparación, la Tabla 3.8 también muestra los valores de ΔH_{int} estimados por Makhatadze y Privalov para el mismo conjunto de proteínas. Los valores calculados de ΔH_{vac} correspondientes a los complejos lectina-carbohidrato son presentados en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Entalpías de deshidratación y unión en el vacío para complejos lectina-carbohidrato

Parámetro	Hev-Q ₂	Hev-Q ₃	ConA-MeMan	Promedio
$\Delta H_{\text{dhd}} (25^\circ\text{C})$ (kcal·mol ⁻¹)	56.6	75.4	50.0	
$\Delta H_{\text{cal}} (25^\circ\text{C})$ (kcal·mol ⁻¹)	-5.3	-7.0	-7.1	
$\Delta H_{\text{int}} (25^\circ\text{C})^{\text{a}}$ (kcal·mol ⁻¹)	-61.9	-82.4	-57.1	
$\Delta H_{\text{vac}}^{\text{b}}$ (kcal·mol ⁻¹)	-45.6	-61.3	-50.0	
ΔH^{c} (kcal·mol ⁻¹)	-16.3	-21.1	-7.1	
$\Delta\Delta H_{\text{int/vac}}^{\text{d}}$	0.26	0.26	0.12	0.21

^a $\Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{\text{cal}} - \Delta H_{\text{dhd}}$.

^b Calculado usando el campo de fuerzas DREIDING II.

^c $\Delta H = \Delta H_{\text{vac}} - \Delta H_{\text{int}}$.

^d $\Delta\Delta H_{\text{int/vac}} = \Delta H / \Delta H_{\text{int}}$.

Tabla 3.8. Comparación de las entalpías intrínsecas de desplegamiento para diferentes proteínas estimadas usando los campos de fuerza DREIDING II y CHARMM19, y mediante la aproximación de entalpías de deshidratación.

Proteína	$\Delta H_{\text{vac}}^{\text{a}}$ kcal·mol ⁻¹	$\Delta H_{\text{vac,LAK}}^{\text{b}}$ kcal·mol ⁻¹	$\Delta H_{\text{int}}^{\text{c}}$ kcal·mol ⁻¹	$\Delta\Delta H_{\text{vac/vac,LAK}}^{\text{d}}$	$\Delta\Delta H_{\text{vac,LAK/int}}^{\text{e}}$
Citocromo c	940	943	1246	0.00	0.24
RNAse A	1136	1068	1357	0.06	0.21
Lisozima	1207	1116	1475	0.07	0.24
Mioglobina	1625	1492	1819	0.08	0.18
<i>Promedio</i>				0.05	0.22

^a Valores calculados usando DREIDING II.

^b Valores calculados por Lazaridis *et al.* usando CHARMM19 [70].

^c Valores calculados por Makhatadze y Privalov a 25 °C a través de $\Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{\text{cal}} - \Delta H_{\text{dhd}}$ [69].

^d $\Delta\Delta H_{\text{vac/vac,LAK}} = |(\Delta H_{\text{vac,LAK}} - \Delta H_{\text{vac}}) / \Delta H_{\text{vac}}|$.

^e $\Delta\Delta H_{\text{vac,LAK/int}} = |(\Delta H_{\text{vac,LAK}} - \Delta H_{\text{int}}) / \Delta H_{\text{int}}|$.

El cálculo directo de la entalpía de interacción en el vacío mediante DREIDING II rinde valores de ΔH_{vac} consistentemente menores que los estimados para ΔH_{int} (Tabla 3.7). En promedio, ΔH_{int} excede a ΔH_{vac} en un 20%, aproximadamente. Interesantemente, la

misma discrepancia relativa entre estos dos estimados ha sido encontrado en el análisis del desplegamiento de proteínas [70]. No obstante, la consistencia entre los valores de ΔH_{int} y ΔH_{vac} sugiere acusadamente que al menos el signo y orden de magnitud de ΔH_{dhid} estimados en este trabajo para los complejos lectina-carbohidrato son correctos, *i.e.*, se requiere de inversiones energéticas muy altas para lograr la deshidratación de las superficies de contacto. Similarmente, queda claro que la magnitud de ΔH_{dhid} debe ser varias veces mayor que la de ΔH_{cal} . Así, queda en evidencia el enorme peso que la energía de desolvatación posee en la determinación de ΔH_{cal} , por lo que pequeñas alteraciones en el comportamiento de solvatación de las superficies de contacto lectina-carbohidrato (con respecto a las de una proteína desplegada) bien podrían resultar suficientes para dar cuenta de los valores más grandes de Δh_{np} y de Δh_{pol} obtenidos para estos aductos (Tabla 3.6).

Recientemente, Chervenak y Toone realizaron mediciones de CTI para la unión de ConA y MeMan [40]. Estos autores tomaron la diferencia de valores de ΔH_{cal} obtenidos en agua ligera y pesada como un reflejo directo de la energética de reorganización del agua debido a la asociación. De acuerdo a su análisis, ΔH_{dhid} para ConA-MeMan es pequeño y de signo negativo ($-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), lo cual resulta en franca oposición con los valores presentados en la Tabla 3.7.

En resumen, diversas evidencias confluyen independientemente para sustentar, si bien de manera indirecta, la observación de que la formación de un complejo lectina-carbohidrato se caracteriza por una capacidad entálpica notablemente superior a la desarrollada por una proteína al plegarse. Desafortunadamente, la dificultad para modelar el estado desplegado de una proteína transmite cierta incertidumbre en cuanto a la determinación precisa de los valores de Δh_{pol} y de Δh_{np} inherentes a un proceso de plegamiento. No obstante, las diferencias entálpicas observadas a través de la comparación de $\Delta H/\Delta A_t$ (Tablas 3.4 y 3.5) superan por mucho estas incertidumbres. Así, por ejemplo, al modelar el estado desplegado de las proteínas consideradas en la Tabla 3.5 mediante una cadena extendida, obtuvimos un valor para $\Delta H/\Delta A_t$ de $2.6 \pm 1.6 \text{ cal}(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)^{-1}$, el cual resulta prácticamente idéntico al obtenido usando los cambios de área reportados por Murphy y Freire, quienes hicieron uso de tripéptidos para estimar las áreas accesibles del estado desplegado [34]. Por contra, los cambios de áreas obtenidos usando una cadena

extendida rinden valores de Δh_{pol} y de Δh_{np} (21.7 ± 18.6 y -8.0 ± 10.4 cal(mol·Å²)⁻¹, respectivamente) que se alejan de los presentados en la Tabla 3.6. No obstante, el comportamiento cualitativo se sigue sosteniendo. En particular, estos nuevos valores sugieren que la diferencia en capacidades entálpicas radica en las interacciones hidrofílicas. Para finalizar esta sección, quisiéramos evocar dos elementos que dan confianza al respecto de los modelos simples que se emplean para describir el estado desplegado. Por un lado, es un hecho que a través de estos modelos ha sido posible realizar estimaciones aceptables tanto del cambio de entalpía como de la capacidad calorífica [69,73]. Por otro lado, es de resaltar que los datos termodinámico-estructurales del plegamiento de proteínas se conjuntan de manera prácticamente indistinguible con los datos de unión proteína-proteína (Fig. 3.2). En el caso de los dímeros de proteína presentados en la Tabla 3.5, existen evidencias de que en la asociación no se suscitan cambios conformacionales importantes [35,36], por lo que existe poca incertidumbre en cuanto a la determinación del cambio de áreas accesibles al disolvente.

●●● MÉTODOS ●●●

● ESTRUCTURAS MOLECULARES

Las coordenadas de los complejos lectina-carbohidrato utilizados en el análisis termodinámico-estructural cuyas estructuras han sido determinadas por rayos X fueron tomadas del *Protein Data Bank* (PDB) [74]; los códigos PDB correspondientes son enlistados en la Tabla 3.4. Los valores del cambio de áreas superficiales accesibles al disolvente para el complejo AGT- Q₂ fueron tomados de Bains *et al.* [41]. Las coordenadas obtenidas por RMN para el complejo Hev-Q₂ fueron amablemente facilitadas por el Dr. Jesús Jiménez Barbero, del Instituto de Química Orgánica General, CSIC, España.

Como fue mostrado en el capítulo anterior, la heveína posee un sitio extendido compuesto por tres subsitios. Usando como estructura molde la de Hev-Q₂, construimos mediante modelado molecular la estructura del complejo Hev-Q₃. La estructura de inicio fue obtenida mediante un relajamiento de la unidad de sacárido añadida conservando al resto de los átomos en posición fija. El modelo final fue obtenido mediante una minimización energética del ligando completo, y un subsecuente relajamiento del ligando junto con todos los átomos de la proteína englobados en una capa de 3.5 Å alrededor del trisacárido. El modelado y los cálculos de energía molecular fueron efectuados mediante BIOGRAF versión 3.1 (Molecular Simulations, Inc.), usando el campo de fuerza DREIDING II. En los cálculos se consideró una región de interacción no covalente de radio de 8.5 Å, con una función de apagamiento progresivo de 8 a 8.5 Å. Todas las minimizaciones energéticas fueron avanzadas hasta lograr convergencia con una fuerza RMS menor que 0.1 kcal·Å⁻¹. El proceso de relajamiento final consistió en una minimización energética, una simulación molecular adiabática de 200 ps, y una minimización energética final de la estructura promedio de los últimos 50 ps de simulación. En los cálculos energéticos, todos los átomos de hidrógeno fueron explícitamente considerados, usando una constante dieléctrica dependiente de la distancia.

● DETERMINACIÓN DEL CAMBIO EN LA ACCESIBILIDAD AL DISOLVENTE DE ÁREAS SUPERFICIALES

Las áreas superficiales accesibles al disolvente (A) fueron calculadas con NACCESS [75], una versión computarizada del algoritmo de Lee y Richards [76], usando un radio de prueba de 0.14 nm, un ancho de rodaja de 0.01 nm y los radios de van der Waals estimados por Chothia para átomos de proteína [77]. Con base en estos últimos valores, la asignación de los radios de van der Waals para átomos de carbohidrato se efectuó en función del tipo de hibridación. Los cambios en áreas accesibles al disolvente debido a la unión fueron determinados como la diferencia entre las áreas del complejo ligando-proteína y la suma de las de la proteína y el ligando libres.

En este estudio, los cambios en área superficial accesible al disolvente (ΔA) fueron determinados en dos modalidades: (a) los cambios de área polar (ΔA_{pol}) fueron obtenidos del cambio en área accesible de nitrógenos y oxígenos, en tanto que el cambio de área polar (ΔA_{np}) fueron calculados de la contribución de átomos de azufre y carbono. (b) Siguiendo a Privalov y Makhatadze [39], una disección de áreas moleculares más fina fue efectuada al considerar de manera explícita los siguientes grupos proteicos: alifáticos, aromáticos, enlaces peptídicos (-CONH-) y la parte polar de la cadena lateral de cada aminoácido. En cuanto a los carbohidratos, los tipos de contribuyentes fueron diferenciados en carbonos de alcano lineal (CAL), carbonos de alcano cíclico (CAC), oxígeno de éter cíclico (-O_{cíc}) y de hidroxilo (-OH). Los grupos N-acetil de carbohidratos fueron considerados como compuestos por un enlace peptídico y por un grupo metilo, el cual, a su vez, fue tomado como CAL.

• ESTIMACIÓN DEL CAMBIO DE CAPACIDAD CALORÍFICA A PARTIR DE DATOS ESTRUCTURALES

En la estimación del ΔC_p a partir de información estructural, usamos la relación empírica:

$$\Delta C_{p,calc} = \Delta C_{p,np} \Delta A_{np} + \Delta C_{p,pol} \Delta A_{pol} \quad (M3.1)$$

en donde *pol* y *np* representan las contribuciones polares y no polares, respectivamente. De estudios de la transferencia de dipéptidos cíclicos del estado sólido a agua [36], $\Delta C_{p,np}$ y $\Delta C_{p,pol}$ han sido estimados con un valor de 0.45 y -0.26 cal(molK²)⁻¹, respectivamente. Los valores obtenidos para estos coeficientes de la transferencia de hidrocarburos líquidos resultan un tanto diferentes ($\Delta C_{p,np} = 0.32$ y $\Delta C_{p,pol} = -0.14$ cal(molK²)⁻¹) [37].

Makhatadze y Privalov han propuesto una forma alternativa de estimar el ΔC_p que acompaña una reacción de tipo no covalente [39]. En esta aproximación, las áreas moleculares de diferentes grupos químicos son consideradas (ver arriba, en inciso (b) de los cálculos de ΔA). El cambio global de capacidad calorífica está dado por la forma general

$$\Delta C_{p,calc} = \sum \Delta C_{p,i} \cdot \Delta A_i \quad (M3.2)$$

en donde $\Delta C_{p,i}$ es la capacidad calorífica normalizada por la superficie de tipo *i*-ésimo. Las magnitudes de $\Delta C_{p,i}$ para cada tipo de constituyente químico considerado de proteína han sido calculadas por Privalov y Makhatadze mediante compuestos modelos como la diferencia de capacidad calorífica del grupo en solución acuosa y en el estado gaseoso [39]. A esta diferencia se le corrige descontando la contribución debida a la expansión térmica, mediante la adición del término *R*, la constante universal de los gases ideales. Siguiendo la misma filosofía, estimamos los valores correspondientes de $\Delta C_{p,i}$ para los grupos de carbohidrato CAC, -O_{cíc} y -OH usando datos de transferencia de compuestos modelo de acuerdo con:

$$(\Delta C_{p,CAC}) = (\Delta C_{p,ciclohexano})/6 \quad (M3.3)$$

$$(\Delta C_{p,-O_{cic}}) = (\Delta C_{p,tetrahidropirano}) - 5 \cdot (\Delta C_{p,CAC}) \quad (M3.4)$$

$$(\Delta C_{p,-OH}) = (\Delta C_{p,ciclohexanol}) - (\Delta C_{p,ciclohexano}) \quad (M3.5)$$

Las magnitudes correspondientes de ΔC_p para los compuestos utilizados como modelo fueron tomados de Cabani *et al* [78]. Las áreas para cada grupo *i* fueron calculadas de las estructuras minimizadas energéticamente, y los parámetros $\Delta C_{p,i}$ fueron derivados de la normalización con estos valores.

• ENTALPÍA DE DESHIDRATACIÓN LIGADA A LA UNIÓN

La contribución de la hidratación a la entalpía de desplegamiento de una proteína ha sido estimada por Makhatadze y Privalov de acuerdo con [69]

$$\Delta H_{hid} = \sum \Delta H_{hid,i} \cdot \Delta A_i \quad (M3.6)$$

en donde $\Delta H_{hid,i}$ es la entalpía de hidratación del *i*-ésimo tipo de superficie. Las magnitudes de $\Delta H_{hid,i}$ para diferentes grupos químicos proteicos han sido calculados de compuestos modelo. Este método fue aplicado aquí en el caso de la unión de proteínas con carbohidratos. La energía de hidratación de los grupos CAC, -O_{cíc} y -OH fue estimada de datos de transferencia del estado gaseoso a agua, usando el mismo conjunto de ecuaciones empleado arriba (M3.3-5), con $\Delta H_{hid,i}$ reemplazando a $\Delta C_{p,i}$. Las entalpías de transferencia de la fase gaseosa a agua para ciclohexano, ciclohexanol y tetrahidropirano fueron tomadas de Cabani *et al* [78]. Previo a la normalización de áreas, estos valores fueron corregidos con la inclusión del término de liberación térmica:

$$\Delta H_{hid} = \Delta H_{g \rightarrow w} + RT(1 - \alpha_w T) \quad (M3.7)$$

en donde $\Delta H_{g \rightarrow w}$ es la diferencia entálpica del grupo en solución acuosa y en el estado gaseoso, y α_w es el coeficiente de expansión térmica del agua a presión constante.

• ESTIMACIONES DE ENTALPÍA DE FORMACIÓN EN EL VACÍO

La estimación del cambio de entalpía en el vacío fue realizado a través de dos aproximaciones independientes. Siguiendo a Makhatadze y Privalov [69], ΔH_{int} fue calculado de sustraer ΔH_{hid} a la entalpía de acomplejamiento obtenida experimentalmente:

$$\Delta H_{int} = \Delta H_{cal} - \Delta H_{hid} \quad (M3.8)$$

Una forma alternativa para calcular la entalpía en el vacío ha sido propuesta por Lazaridis *et al.* [70] a través del uso de funciones de potencial que describen la energía de las moléculas en función de las posiciones relativas de los átomos. El campo de fuerza utilizado por estos autores (CHARMM19), fue aplicado al cálculo del cambio de energía debida al desplegamiento para cuatro proteínas. En este estudio, hemos hecho uso de DREIDING II [72], otro campo de

fuerza de uso general. Con el fin de realizar una comparación entre CHARMM19 y DREIDING II, hemos calculado la entalpía de desplegamiento al mismo conjunto de proteínas consideradas por Lazaridis *et al.*: citocromo c, RNAsa A, lisozima y mioglobina. En cuanto a la formación de complejos lectina-carbohidrato, hemos limitado el análisis a los sistemas Hev-Q₂, Hev-Q₃ y ConA-MeMan. En la estimación de las entalpías de desplegamiento y de unión, consideramos a las cadenas laterales de los residuos de proteína como eléctricamente neutras, asignando cargas atómicas en una forma similar a como lo hicieran Lazaridis *et al.* La distribución de la carga eléctrica entre los átomos de las moléculas de carbohidratos fueron realizadas mediante el algoritmo de Gasteiger [79] instrumentado en BIOGRAF para rendir ligandos eléctricamente neutros. Los estados nativos fueron obtenidos mediante minimización energética de las estructuras cristalográficas; los estados desplegados fueron modelados mediante una cadena en conformación de hoja β antiparalela minimizada energéticamente ($\Phi = 139^\circ$, $\Psi = 135^\circ$). Las entalpías en el vacío fueron calculadas mediante DREIDING II como la diferencia entre los valores correspondientes en la conformación nativa y desplegada para el proceso de desnaturalización, y como la diferencia entre el complejo y las moléculas de proteína y ligando aisladas para la reacción de unión. Para ser consistentes con el trabajo de Lazaridis *et al.*, no fue utilizada una zona de apagamiento en la determinación final de energía de interacción no covalente. Las estructuras tridimensionales de citocromo c, RNAsa A, lisozima y mioglobina fueron extraídas de los archivos del PDB 5CYT, 8RAT, 6LYT y 1MBC, respectivamente.

PUENTES DE HIDRÓGENO EN LA INTERFASE LECTINA-CARBOHIDRATO

Diversos estudios estructurales han dejado en claro el papel protagónico que juegan los puentes de hidrógeno en la especificidad del reconocimiento de lectinas y carbohidratos (Fig. 4.1) [9]. La geometría de estos puentes ha sido analizada individualmente en diversos complejos [80]. Sin embargo, hasta el momento no ha sido emprendido un estudio sistemático que muestre las tendencias y patrones geométricos de los puentes de hidrógeno en las interfases lectina-carbohidrato. En el presente capítulo presentamos los resultados de una encuesta geométrica practicada a 183 puentes de hidrógeno identificados en 24 interfases provenientes de 14 diferentes complejos lectina-carbohidrato. En el análisis han sido incluidas solamente estructuras determinadas con alta resolución (Tabla 4.1). Los patrones geométricos resultantes son comparados con los encontrados en un estudio similar del interior de 42 proteínas globulares [58]. Una conclusión notable que se desprende de esta comparación es que los puentes de hidrógeno de los aductos poseen una mejor geometría que la de los encontrados en el interior de proteínas. Esta observación checa cualitativamente con la mayor capacidad entálpica que se desarrolla en un evento de unión lectina-carbohidrato que en el plegamiento de proteínas.

Tabla 4.1. Complejos lectina-carbohidrato con estructura de alta resolución.

código				Resol.	
PDB	Lectina	Origen	Carbohidrato	(Å)	Ref.
<i>Lectinas unidoras de quitina</i>					
Hev-Q ₂ ^a	Heveína	árbol del hule	GlcNAcβ(1→4)GlcNAc	RMN	21
<i>Lectinas de leguminosas</i>					
2PEL	Lectina de cacahuete	Cacahuete	Galβ(1→4)Glc	2.25	81
5CVA	Concanavalina A	Frijol	Manα1Me	2.0	42
1CVN	Concanavalina A	Frijol	Manα(1→6)Manα(1→3)Man	2.3	82
1LOG	Isolectina I	Semilla de <i>Lathyrus ochrus</i>	Manα(1→3)Manβ(1→4)GlcNAc	2.1	83
1LOB	Isolectina I	Semilla de <i>Lathyrus ochrus</i>	Manα1Me	2.0	84
1LED	Lectina IV	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Fuca(1→2)Galβ(1→3) [Fuca(1→4)]GlcNAc	2.0	43
<i>Lectinas de tipo C</i>					
1RDI	Proteína C unidora de manosa	Hígado de rata	Fuca1Me	1.8	85
1RDL	Proteína C unidora de manosa	Hígado de rata	Manα1Me	1.7	85
2MSB	Proteína A unidora de manosa	Suero de rata	Manα(1→3)Manα(1→6) Manα(3←1)Manα(2←1)Man	1.7	86
<i>Galectinas</i>					
1SLT	Lectina S	Bazo de oveja	Galβ(1→4)GlcNAc	1.9	48
<i>Lectinas de bacteria</i>					
1LTT	Enterotoxina	<i>Escherichia coli</i>	Galβ(1→4)Glc	2.3	87
1LTA	Enterotoxina	<i>Escherichia coli</i>	Gal	2.2	88
1CHB	Toxina del cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	Galβ(1→3)GalNAcβ(1→4) [NeuAcα(1→4)]Galβ(1→4)Glc	2.2	89

^a Estructura determinada por RMN.

• GEOMETRÍA DE PUENTES DE HIDRÓGENO

El análisis de 24 interfases lectina-carbohidrato condujo a la identificación de un total de 183 puentes de hidrógeno. La distancia promedio entre pares donador-aceptor para el conjunto analizado resultó de 2.94 (±0.25) Å. El valor reportado por Stickle *et al.* para 7299 puentes de hidrógeno identificados en el interior de 42 proteínas globulares es de 3.04 (±0.24) Å [58]. En virtud del número grande de puentes de hidrógeno considerados, se puede afirmar con un nivel alto de significancia que las medias muestrales corresponden a dos poblaciones diferentes. En la Fig. 4.2 son mostradas las frecuencias acumuladas de las distancias acceptor-donador correspondientes a las interfases lectina-carbohidrato y al interior de proteínas; es clara de esta Figura la disimilitud en las distribuciones de distancias entre ambos sistemas. Es de notar que la gran mayoría de distancias heteroátomo-heteroátomo en

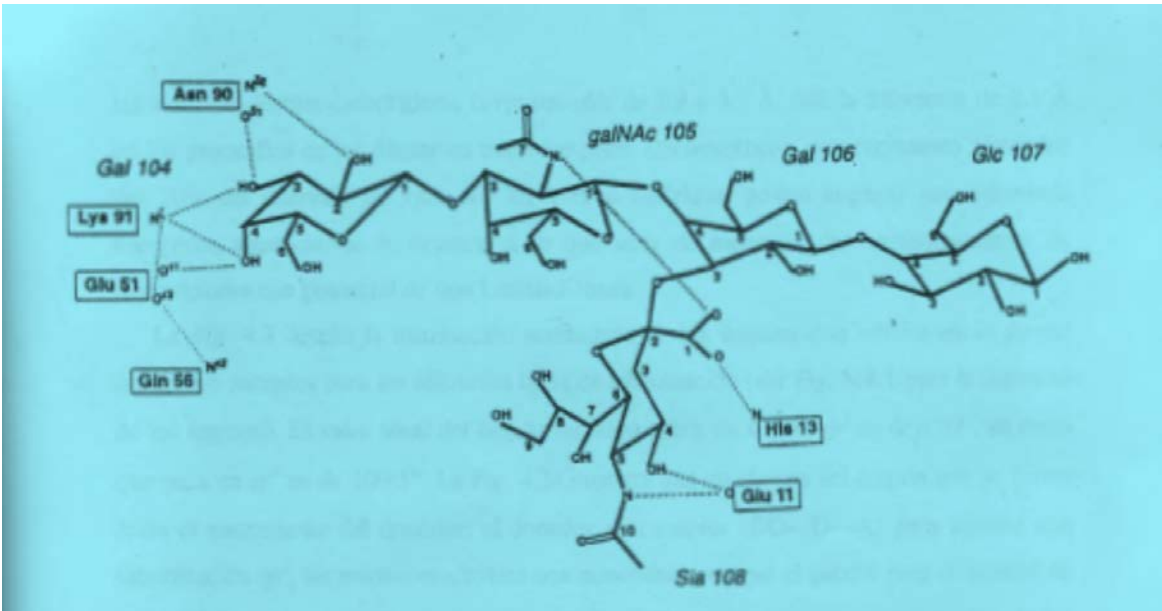


Fig. 4.1. Representación esquemática de los puentes de hidrógeno (líneas discontinuas) formados entre la toxina de cólera y el pentasacárido G_{M1} . Una de las características dominantes del reconocimiento entre lectinas y carbohidratos es la formación de entramadas redes cooperativas de puentes de hidrógeno.

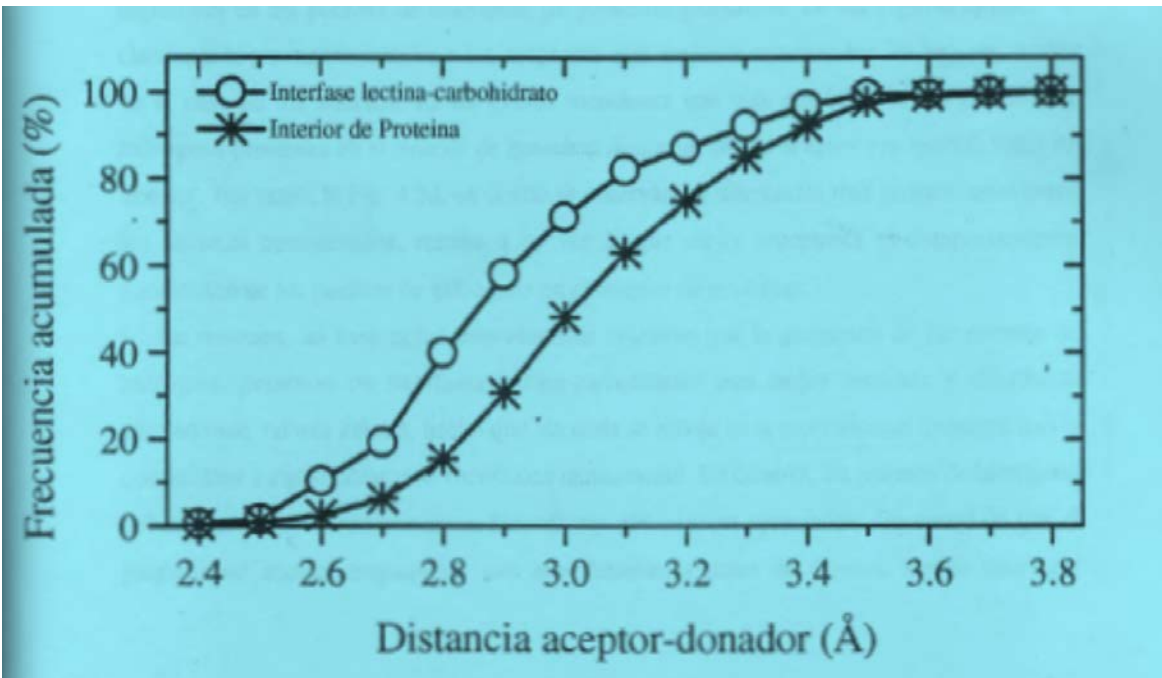


Figura 4.2. Distribución de distancias de puentes de hidrógeno.

las interfases lectina-carbohidrato corre tan sólo de 2.4 a 3.5 Å. Así, la diferencia de 0.1 Å en los promedios de las distancias entre los pares electrostáticos, que representa alrededor del 10% del intervalo de variación en lectinas-sacáridos, podría implicar una diferencia energética significativa, de acuerdo a lo que sería de esperarse del comportamiento de interacciones con potencial de tipo Lennard-Jones.

La Fig. 4.3 detalla la distribución acumulada de los ángulos con vértice en el átomo donador o aceptor para los diferentes tipos de hibridización (ver Fig. M4.1 para la definición de los ángulos). El valor ideal del ángulo formado sobre un átomo sp^2 es de 120° , en tanto que para un sp^3 es de 109.5° . La Fig. 4.3a muestra que en el caso del ángulo que se forma entre el antecedente del donador, el donador y al aceptor (DD—D—A) para átomos con hibridización sp^3 , las medias muestrales son semejantes, aunque el patrón para el interior de proteínas aparece un tanto más disperso. La Fig. 4.3b sugiere que aunque los valores de los dos sistemas se encuentran agrupados con una dispersión similar, los ángulos sobre los donadores de tipo sp^2 de los complejos se encuentran más cercanos a los valores ideales, con una media muestral de $119.5 \pm 15.4^\circ$. De las Figs. 4.3c y 4.3d, se revela que las varianzas y las medias poblacionales para el ángulo formado sobre los aceptores son notablemente superiores en los puentes de hidrógeno de proteínas globulares. De las Figuras también es claro que la geometría relativa a los aceptores está mejor centrada sobre los valores ideales en el caso de los aductos. Es de interés mencionar que más del 80% de los puentes de hidrógeno presentes en el interior de proteínas tienen un átomo aceptor con hibridización de tipo sp^2 . Por tanto, la Fig. 4.3d, en donde se observan las diferencias más pronunciadas entre los sistemas considerados, resulta a su vez la que mejor representa el comportamiento geométrico de los puentes de hidrógeno en el interior de proteínas.

En resumen, las evidencias coleccionadas muestran que la geometría de los puentes de hidrógeno presentes en interfases lectina-carbohidrato está mejor centrada y distribuida alrededor de valores ideales, hecho que sin duda se refleja en la especificidad exquisita con la que lectinas y carbohidratos se reconocen mutuamente. En cambio, los puentes de hidrógeno del interior de proteínas presentan distorsiones geométricas apreciables. En virtud de que el plegamiento implica empaquetar con alta densidad a miles de átomos, siendo necesario

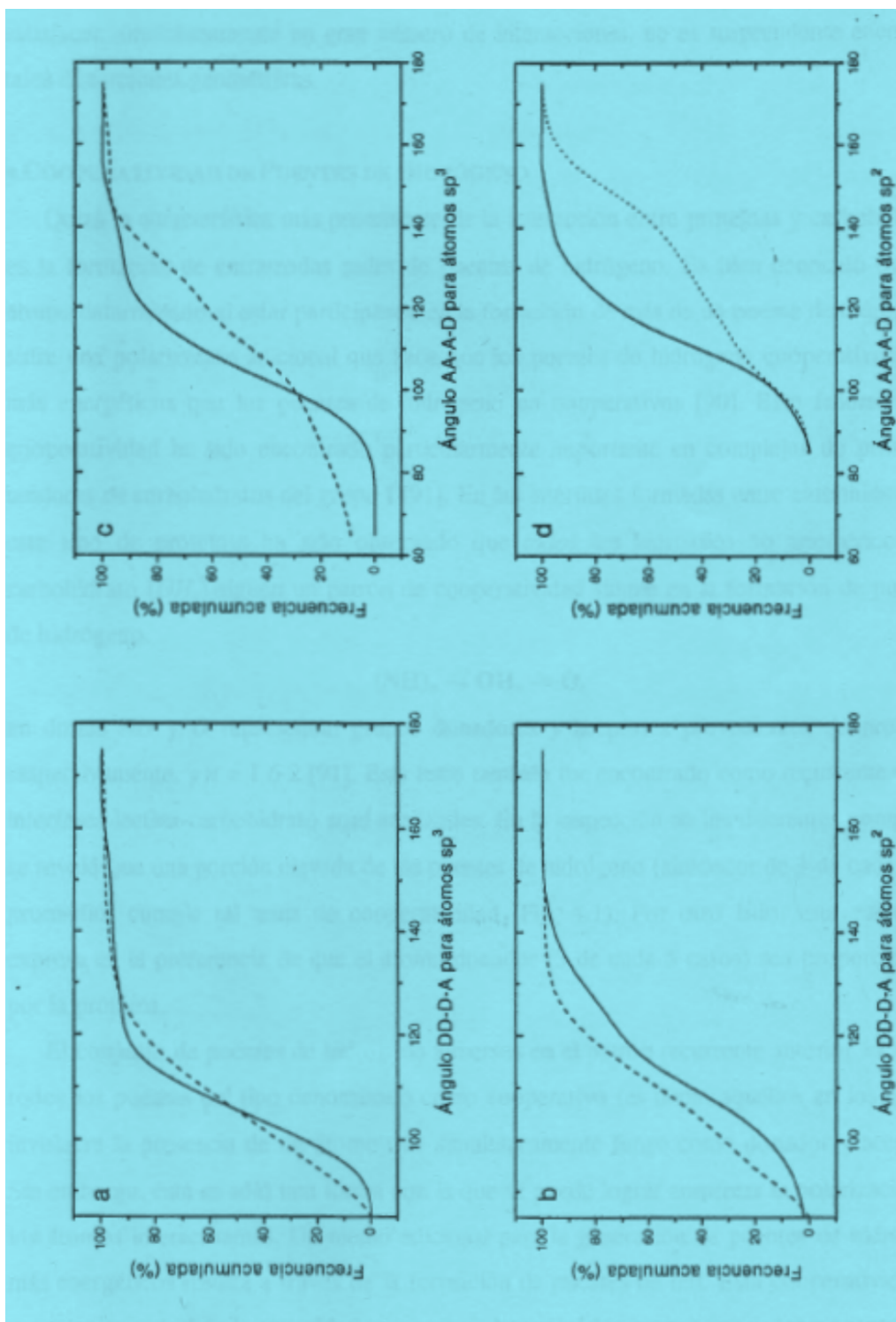
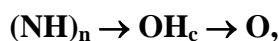


Figura 4.3. Patrón de la distribución de ángulos con vértice en el átomo donador y aceptor presentes en interfaces lectina-carbohidrato (línea continua) y el interior de proteínas (línea punteada).

satisfacer simultáneamente un gran número de interacciones, no es sorprendente encontrar tales distorsiones geométricas.

• COOPERATIVIDAD DE PUENTES DE HIDRÓGENO

Quizá la característica más prominente de la interacción entre proteínas y carbohidratos es la formación de entramadas redes de puentes de hidrógeno. Es bien conocido que un átomo determinado al estar participando en la formación de más de un puente de hidrógeno, sufre una polarización adicional que hace que los puentes de hidrógeno cooperativos sean más energéticos que los puentes de hidrógeno no cooperativos [90]. Este fenómeno de cooperatividad ha sido encontrado particularmente importante en complejos de proteínas unidoras de carbohidratos del grupo I [91]. En las interfases formadas entre carbohidratos y este tipo de proteínas ha sido observado que *todos* los hidroxilos no anoméricos del carbohidrato (OH_c) siguen un patrón de cooperatividad simple en la formación de puentes de hidrógeno,



en donde NH y O representan grupos donadores y aceptores provenientes de proteína, respectivamente, y $n = 1$ ó 2 [91]. Este tema también fue encontrado como recurrente en las interfases lectina-carbohidrato aquí analizadas. En la inspección de los diferentes complejos se reveló que una porción elevada de los puentes de hidrógeno (alrededor de 3 de cada 4, en promedio) cumple tal tema de cooperatividad (Fig. 4.1). Por otro lado, este patrón se expresa en la preferencia de que el átomo donador (3 de cada 5 casos) sea proporcionado por la proteína.

El conjunto de puentes de hidrógeno inmersos en el patrón recurrente anterior incluye a todos los puentes del tipo denominado como cooperativo (es decir, aquéllos en los que se involucra la presencia de un átomo que simultáneamente funge como donador y aceptor). Sin embargo, ésta es sólo una forma con la que se puede lograr aumentar la polarización de los átomos interactuantes. Un medio adicional para la generación de puentes de hidrógeno más energéticos resulta a través de la formación de puentes de red. Esta cooperatividad se presenta en virtud de la capacidad que poseen determinados grupos por ceder o aceptar más de un átomo de hidrógeno. Incluyendo a los de red, 9 de cada 10 puentes de hidrógeno entre lectinas y carbohidrato fueron encontrados

con alguna propiedad cooperativa. Una medida de la presencia de puentes de red puede surgir de la comparación entre el número total de puentes de hidrógeno y el número que resulta de restringir a todo aceptor a poseer un solo donador y, viceversa, a todo donador a ceder un sólo hidrógeno. Esta propiedad, denominada como número reducido de puentes de hidrógeno [58], fue evaluada en las interfases lectina-carbohidrato, revelándose que existe alrededor de 1.55 (± 0.24) puentes por cada puente de hidrógeno reducido. Esta magnitud resulta notablemente cercana al valor de 1.6 reportado por Stickle *et al.* en su análisis del interior de proteínas globulares [58].

• DENSIDAD DE PUENTES DE HIDRÓGENO

En la Tabla 4.2 se presenta la densidad de puentes de hidrógeno y su relación con el cambio de área accesible al solvente para los 14 diferentes complejos lectina-carbohidrato. En el caso del análisis de oligómeros, los valores de ΔA corresponden a un promedio aritmético de los dominios analizados. La densidad de puentes de hidrógeno fue obtenida en función del número de puentes de hidrógeno normalizados por el cambio de área de tipo polar ($\delta_{PH/pol}$) o por el cambio total de área ($\delta_{PH/t}$). Una información similar para el interior de proteínas globulares es presentada en la Tabla 4.4. En este caso, los valores del número de puentes de hidrógeno fueron tomados de Stickle *et al.* [58]. Para poder realizar una comparación con los sistemas lectina-carbohidrato, al conjunto de proteínas consideradas en el estudio de estos autores les fueron determinados los valores de ΔA_{pol} y ΔA_t a partir de la diferencia de áreas entre el estado nativo y el completamente desplegado. En la Tabla 4.4 son presentados los valores resultantes de promediar las densidades de puentes de hidrógeno de ambos sistemas. Como puede ser observado en esta última tabla, el número de puentes de hidrógeno formados por unidad de área polar que cambia su accesibilidad debido a la unión de lectinas y carbohidratos resulta un tanto superior a la alcanzada en el plegamiento de proteínas. Tomando en cuenta que la cooperatividad de red de estos dos sistemas es semejante (~ 1.6), y que en general todo grupo polar en el interior de una proteína se encuentra formando pares hidrofílicos [92], la diferencia observada de $\delta_{PH/pol}$ resulta un tanto sorprendente.

En la Fig. 4.4 es mostrada la dependencia de $\delta_{PH/pol}$ y de $\delta_{PH/t}$ con respecto a la fracción combinada de aminoácidos en conformación hélice α y giro ($f_{H\alpha+G}$).

Resulta claro de la Figura que existe una buena relación entre la densidad de puentes de hidrógeno y el grado helicoidal de la proteína, aunque una mejor descripción puede ser lograda incluyendo como variable independiente a la fracción de proteína en conformación de hoja β [58]. A través de la extrapolación de $f_{H\alpha+G}$ a la unidad se predice un valor de $\delta_{PH/pol}$ próximo a 4, magnitud que resulta cercana a los valores más altos observados en la interfase de lectinas y carbohidratos (Tabla 4.2). Así, aun cuando resulta claro que $\delta_{PH/pol}$ es altamente sensible a la composición de la base de datos analizada, por lo que cualquier comparación directa entre los dos sistemas moleculares debe ser realizada con cautela, se evidencia que en el reconocimiento entre lectinas y carbohidratos existe una fuerte tendencia hacia la maximización de la densidad de interacciones electrostáticas. Por otro lado, como se mostró arriba, los puentes de hidrógeno formados en segmentos hélice α se alejan de una geometría ideal, por lo que, aun cuando las densidades de enlaces hidrofílicos para proteínas helicoidales y complejos lectina-carbohidrato pudieran ser similares, las energéticas de formación podrían resultar diferentes.

Tabla 4.2. Densidad de puentes de hidrógeno y áreas ocultas al solvente en interfases lectina-carbohidrato.^a

Complejo	PH	$-\Delta A_{pol}$ (\AA^2)	$-\Delta A_t$ (\AA^2)	$\delta_{PH/pol}$ ($\text{\AA}^{-2} \times 0.01$)	$\delta_{PH,t}$ ($\text{\AA}^{-2} \times 0.01$)	$f_{\Delta A_{pol}}$	Sitios analizados
Hev-Q ₂	4	158.5	467.2	2.5	0.9	33.9	1
2PEL	8	210.9	414.3	3.8	1.9	50.9	2
5CVA	6	167.9	340.5	3.6	1.8	49.3	2
1CVN	12	347.1	597.9	3.5	2.0	58.1	2
1LOG	6	205.5	441.5	2.9	1.4	46.6	2
1LOB	6	159.1	333.4	3.8	1.8	47.7	2
1LED	14	344.9	657.7	4.1	2.1	52.4	1
1RDI	6	142.6	223.4	4.2	2.7	63.8	2
1RDL	5	145	219.2	3.5	2.3	66.2	2
2MSB	7	262.6	400.8	2.7	1.8	65.5	1
1SLT	8	257.8	481.6	3.1	1.7	53.5	2
1LTT	8	230.9	431.9	3.5	1.9	53.5	2
1LTA	8	194.4	340.4	4.1	2.4	57.1	2
1CHB	12	378.3	850.8	3.2	1.4	44.56	1

^a Abreviaciones y símbolos: PH, número total de puentes de hidrógeno; $\delta_{HB/pol} = PH / |\Delta A_{pol}| \times 100$; $\delta_{PH,t} = PH / |\Delta A_t| \times 100$; $f_{\Delta A_{pol}} = \Delta A_{pol} / \Delta A_t \times 100$

En el propósito de elucidar las diferencias moleculares entre el reconocimiento de lectinas y carbohidratos y el plegamiento de proteínas, la comparación del parámetro $\delta_{PH/t}$

resulta especialmente revelador. Como puede ser observado en la Tabla 4.4, el valor medido para proteínas globulares es sensiblemente inferior al de complejos lectina-carbohidrato. En este caso, la diferencia parece trascender a la composición particular de la base de datos. Utilizando la tendencia delineada entre $\delta_{PH/t}$ y $f_{H\alpha+G}$ para proteínas globulares (Fig. 4.4), se deriva un valor de ~ 1.4 puentes de hidrógeno por cada 100 \AA^2 de área total oculta al solvente para una proteína globular de $f_{H\alpha+G} = 1$. Esta densidad máxima resulta inferior a la detectada en la gran mayoría de complejos lectina-carbohidrato aquí analizados (Tabla 4.2).

Tabla 4.3 Densidad de puentes de hidrógeno y áreas ocultas al disolvente en el interior de proteínas.^a

Código	Número de		$\delta_{PH/pol}$	$\delta_{PH/t}$		
PDB	residuos	PH	($\text{\AA}^2 \times 0.01$)	($\text{\AA}^2 \times 0.01$)	$f_{H\alpha+G}$	$f_{\Delta A_{pol}}$
351c	82	93	3.07	1.08	0.683	35.4
2act	218	238	2.81	1.01	0.482	36.0
2app	323	312	2.63	0.93	0.39	35.4
2aza	129	125	2.55	0.91	0.434	35.5
1bp2	123	155	3.37	1.30	0.78	38.5
2ca2	256	266	2.67	0.93	0.418	35.0
2cdv	107	102	2.38	0.79	0.57	33.3
5cha	237	191	2.34	0.78	0.325	33.1
5cpa	307	368	2.96	1.03	0.596	34.7
1crn	46	52	3.88	1.43	0.63	36.8
2cts	437	524	3.10	1.07	0.762	34.5
5cyt	103	106	2.68	1.01	0.718	37.7
4dfr	159	151	2.68	0.88	0.365	32.9
1ecd	136	199	4.20	1.31	0.978	31.3
4fxn	138	146	2.94	0.95	0.587	32.2
1gcr	174	158	2.16	0.78	0.178	36.1
1gd1	331	376	3.00	1.06	0.548	35.4
3grs	461	487	2.88	0.98	0.529	33.9
1hmq	113	158	3.47	1.28	0.858	36.9
1hoe	74	62	2.41	0.92	0.203	38.0
1ins	51	51	3.40	1.16	0.667	34.2
2lhb	149	202	3.87	1.24	0.893	32.1
1lz1	130	159	3.07	1.13	0.815	36.8
3lzm	164	242	3.73	1.35	0.86	36.1
1mbo	153	244	4.11	1.41	0.941	34.3
2ovo	56	60	3.92	1.36	0.411	34.6
9pap	212	221	2.63	0.94	0.491	35.6
2pcy	99	80	2.61	0.82	0.384	31.6
4pep	326	296	2.60	0.87	0.377	33.4
1ppt	36	35	3.50	1.37	0.694	39.2
5pti	58	39	2.13	0.70	0.362	33.0
1rdg	52	41	2.69	0.88	0.731	32.6
2rhe	114	97	2.52	0.95	0.377	37.7
3rnt	104	104	2.88	1.06	0.452	36.7
7rsa	124	130	2.76	1.06	0.379	38.4
1sn3	65	48	2.29	0.86	0.477	37.5
1snc	135	151	2.90	1.06	0.53	36.5
3tln	316	396	3.67	1.24	0.595	33.8
1tpp	220	190	2.33	0.81	0.386	34.6
1ubq	76	76	3.02	1.05	0.279	34.7
2wrp	105	156	4.13	1.70	0.905	40.6

^a Para abreviaciones y símbolos ver pie de Tabla 4.2.

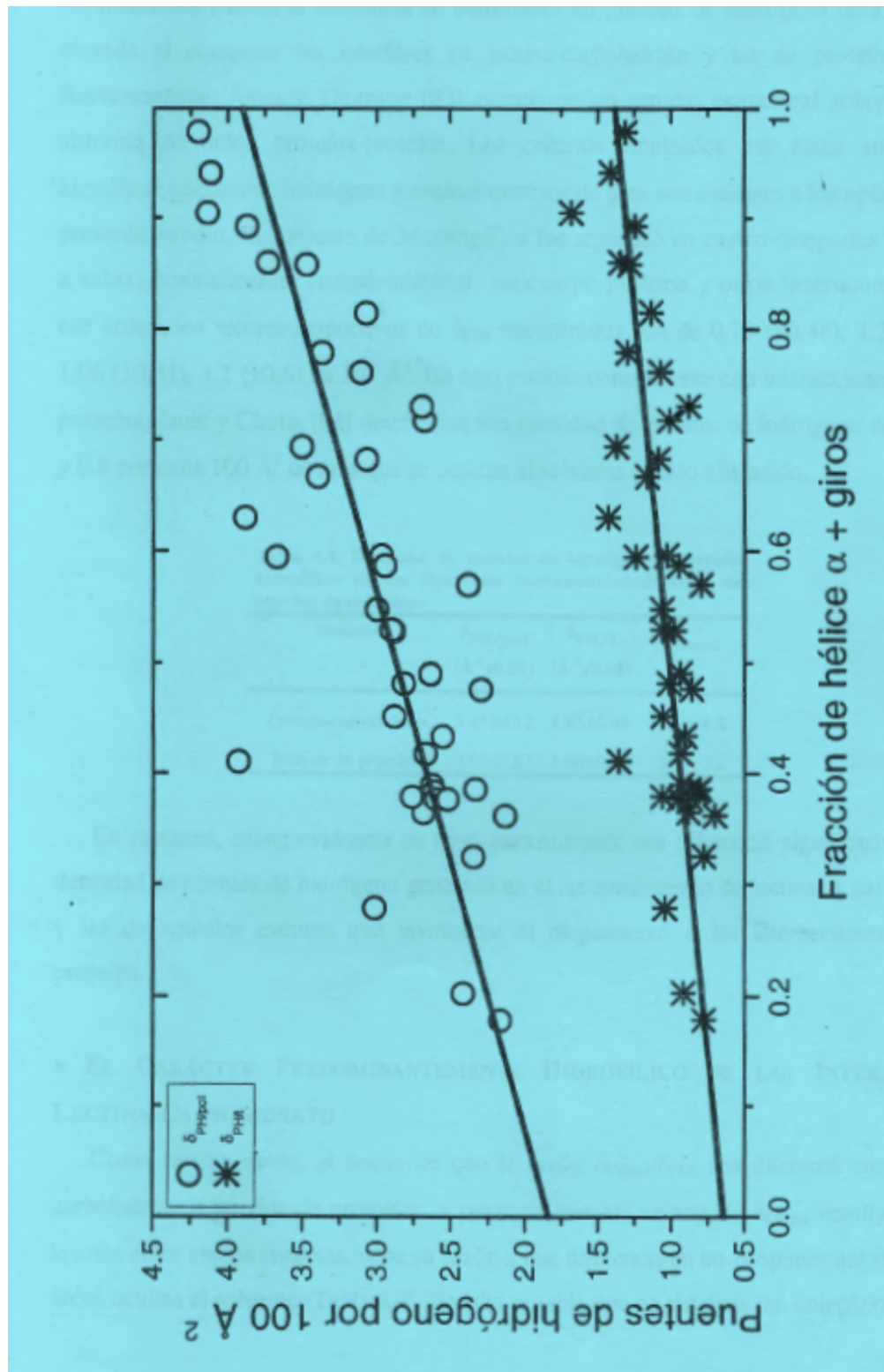


Figura 4.4. Relación entre la densidad de puentes de hidrógeno y el contenido de estructura secundaria de 41 proteínas globulares.

Interesantemente, la diferencia en densidades de puentes de hidrógeno también resulta elevada al comparar las interfases de lectina-carbohidrato y las de proteína-proteína. Recientemente, Jones y Thornton [93] efectuaron un estudio estructural sobre diferentes sistemas de unión proteína-proteína. Los criterios empleados por estos autores para identificar puentes de hidrógeno y evaluar cambios de área son similares a los aplicados en el presente estudio. El conjunto de 34 complejos fue separado en cuatro categorías de dímero, a saber: homodímeros, enzima-inhibidor, anticuerpo-proteína y otros heterocomplejos. En ese orden, los valores respectivos de $\delta_{PH/t}$ encontrados son de 0.70 (± 0.46), 1.37 (± 0.37), 1.06 (± 0.51), 1.1 (± 0.61) $\times 10^{-2} \text{ \AA}^2$. En otro estudio concierne con interacciones proteína-proteína, Janin y Chotia [94] detectaron una densidad de puentes de hidrógeno de entre 0.5 y 0.8 por cada 100 \AA^2 de área que se ocultan al solvente debido a la unión.

Tabla 4.4. Densidad de puentes de hidrógeno y carácter hidrofílico de las interfases lectina-carbohidrato y del interior de proteínas.

Sistema	$\delta_{PH/pol}$ ($\text{\AA}^{-2} \times 0.01$)	$\delta_{PH/t}$ ($\text{\AA}^{-2} \times 0.01$)	$f_{\Delta A_{pol}}$
Lectina-carbohidrato	3.45 \pm 0.52	1.85 \pm 0.46	53.1 \pm 8.8
Interior de proteína	3.00 \pm 0.57	1.06 \pm 0.22	35.3 \pm 2.2

En resumen, existe evidencia de peso para suponer una diferencia significativa entre la densidad de puentes de hidrógeno generada en el reconocimiento de lectinas y carbohidratos y las de aquellos eventos que involucran el plegamiento o las interacciones proteína-proteína.

• EL CARÁCTER PREDOMINANTEMENTE HIDROFÍLICO DE LAS INTERACCIONES LECTINA-CARBOHIDRATO

Como resulta obvio, el hecho de que la razón $\delta_{PH/pol}/\delta_{PH/t}$ sea diferente entre lectina-carbohidrato e interior de proteínas, a pesar de que los valores de $\delta_{PH/pol}$ resultan no muy lejanos entre ambos sistemas, debe su razón a una diferencia en las proporciones de tipos de áreas ocultas al solvente (Tabla 4.4). Resulta notable que en

sistemas tan complejos como lo es una cadena polipeptídica plegada en el espacio de una manera específica, la fracción de área polar que se oculta al solvente ($f_{\Delta\text{Apol}}$) aparezca con una magnitud con poca variación de especie a especie ($35.3 \pm 2.2\%$, según estadísticas levantadas sobre los valores de la Tabla 4.3). Una encuesta de los diferentes valores de $f_{\Delta\text{Apol}}$ reportados en la literatura para el plegamiento de proteínas revela con claridad que este parámetro es prácticamente independiente de la secuencia de aminoácidos, del tamaño de la proteína, o del tipo de estructura secundaria, terciaria o cuaternaria. Esta propiedad debe sin duda estar anidada dentro de las bases moleculares más profundas del plegamiento de una proteína. Tomando a $f_{\Delta\text{Apol}}$ como parámetro de referencia, se concluye que el interior de una proteína es predominantemente hidrofóbico. Interesantemente, del análisis de la Tabla 4.2 resulta claro que la interacción entre lectinas y carbohidratos está cargada de un carácter más hidrofílico. El valor de $f_{\Delta\text{Apol}}$ encontrado para nuestra base de complejos es semejante al determinado por Miller *et al.* en el análisis de la superficie de proteínas globulares [95]. Esto contrasta claramente con el carácter de los sitios de reconocimiento proteína-proteína, el cual posee un carácter hidrofílico intermedio entre el interior de proteínas y el resto de la superficie del glóbulo [94].

La separación cualitativa reflejada en los valores de $f_{\Delta\text{Apol}}$ debe jugar un papel fundamental en la diferenciación energética entre los procesos de acomplejamiento lectina-carbohidrato y el plegamiento de proteínas. Diversos estudios teóricos, apuntalados con evidencias estructurales y con comparaciones energéticas entre mutantes, sugieren que una interacción electrostática puede ser más favorable en medios con constantes dieléctricas más elevadas [96], al reducirse el costo energético de transferencia de las cargas desde el solvente acuoso a un medio de menor polaridad.

Existe una prolija información que documenta el papel fundamental que juegan los puentes de hidrógeno en la especificidad del reconocimiento entre una lectina y su carbohidrato. En el capítulo anterior se adujeron evidencias de que las áreas de tipo polar poseen una capacidad notable de formar interacciones estables. En virtud de que la mayor parte del área que se oculta al solvente en la formación de un complejo lectina-carbohidrato proviene de grupos engarzados en complejas redes de puentes de hidrógeno, se desprende la conclusión de que este tipo de interacciones juega también un papel prominente en la estabilización del complejo.

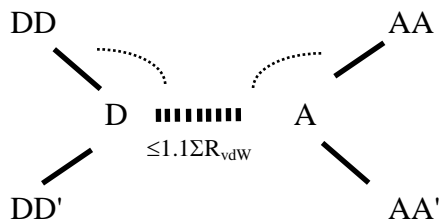
●●● IDENTIFICACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN LA INTERFASE LECTINA-CARBOHIDRATO ●●●

Construcción de la base de datos. La búsqueda de complejos lectina-carbohidrato en una versión actualizada del PDB [74] generó una colección de varias decenas de estructuras tridimensionales. De entre este universo fueron retenidas, sólo aquellas estructuras de alta resolución ($\leq 2.3 \text{ \AA}$). Con el fin de no incurrir en una sobrerepresentación en el análisis estadístico, impusimos un límite máximo de hasta dos complejos por lectina. Estos filtros redujeron la base de datos a un total de 13 complejos, en los que se incluye a 9 lectinas diferentes. La base fue ampliada a su composición final de 14 casos (Tabla 4.1) por la inclusión del complejo Hev-Q₂, una estructura resuelta por RMN [21]. Ocurre con frecuencia que una lectina sea un oligómero en su forma funcional [8]. Cuando éste fue el caso, dos dominios estructurales por complejo, independientemente del estado de agregación del oligómero, fueron incluidos en la encuesta geométrica. Así, un total de 24 sitios de unión fueron analizados.

Identificación de puentes de hidrógeno. Con excepción de la de Hev-Q₂, las estructuras de los complejos que conforman nuestra base de datos han sido resueltas por rayos X, técnica que no permite ubicar la posición espacial de los átomos de hidrógeno. Aunque existen diversos algoritmos para deducir la posición de estos átomos en una estructura cristalográfica, la alternativa de analizar los puentes de hidrógeno a partir de la geometría de los pares aceptor-donador de átomos de hidrógeno resulta preferible.

En la identificación de potenciales puentes de hidrógeno en la interfase lectina-carbohidrato, fueron aplicados criterios similares a los utilizados por Stickle *et al.* [58] en un estudio de la geometría de puentes de hidrógeno de 42 proteínas globulares (Figura M4.1). La distancia máxima para considerar la existencia de un puente de hidrógeno se fijó como 1.1 veces la suma de los radios de van der Waals de los respectivos heteroátomos. Satisfecha esta restricción, los heteroátomos fueron evaluados en virtud de su geometría. En el caso de átomos aceptores con orbitales híbridos de tipo sp^2 , el valor mínimo y máximo permitido para el ángulo D—A—AA fue de 90° y 180°, respectivamente. Límites de inclusión similares fueron impuestos para donadores sp^2 y sp^3 en la evaluación del ángulo DD—D—A. En el caso de átomos aceptores de tipo sp^3 , los valores mínimo y máximo para fijar la presencia de un puente de hidrógeno fueron de 60° y 180°, respectivamente. La identificación de los puentes de hidrógeno fue realizada de manera automatizada mediante el programa HBPLUS. La versión original de este programa fue modificada para permitir el análisis de átomos de carbohidratos.

Figura M4.1



PERSPECTIVAS

El presente estudio finalizó como una investigación que atiende más a las propiedades termodinámicas y estructurales generales de los complejos lectina-carbohidrato, que a las características de asociación de una lectina en particular con sus ligandos. En este sentido, una de las tareas que quedan como continuación es la caracterización calorimétrica de otros sistemas lectina-carbohidrato para los cuales sea conocida su estructura tridimensional. Sin duda, la ampliación de la base de datos permitirá elaborar conclusiones más firmes y finas al respecto de las bases moleculares del reconocimiento entre proteínas y carbohidratos.

Uno de los objetivos últimos que se persiguen al intentar encontrar la conexión entre los cambios energéticos y los cambios estructurales que se suceden en la formación de un complejo, es el de contar con una herramienta que asista en el diseño racional de ligandos artificiales. A través de la solución de ecuaciones empíricas, en este estudio hemos encontrado que los cambios de entalpía y de capacidad calorífica pueden ser estimados de manera satisfactoria a partir de información estructural. La disponibilidad de más datos permitirá ensayar ecuaciones con mayor número de parámetros, de manera que se logre una descripción más fina de los cambios energéticos. En particular, nos proponemos generar modelos en los cuales el grado de empaquetamiento de los átomos que conforman la interfase de los complejos sea considerado explícitamente. La predicción de la constante de afinidad, que es finalmente el parámetro clave para describir termodinámicamente una

asociación, precisa también de la posibilidad de predecir los cambios de entropía. Análisis preliminares nos han mostrado que en el caso de la unión lectina-carbohidrato, la entropía experimental puede ser explicada mediante un formalismo que considera los cambios de entropía debidos a la deshidratación de las zonas de contacto, la pérdida de grados de libertad de los enlaces rotables que quedan fijos en el complejo, y la disminución del número total de partículas.

El hecho de que los ligandos de las lectinas sean moléculas relativamente pequeñas, provee de una inmejorable oportunidad para estudiar los cambios energéticos asociados con la hidratación de estas moléculas sin tener que recurrir al uso de compuestos modelo. Desafortunada y sorprendentemente, no existe algún estudio en donde se haya explorado con detalle las propiedades de transferencia de los carbohidratos de la fase vapor a un medio acuoso. Esta información podrá revelarnos con mayor detalle cuál es el papel energético que juega el disolvente en la formación de los complejos lectina-carbohidrato.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sharon, N., Lis, H. *Science* 246:227-234, 1989.
2. Karlsson, K.A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:622-635, 1995.
3. Lee, Y.C., Lee, R.T. *Acc. Chem. Res.* 28:321-327, 1995.
4. Díaz, C.L., Melchers, L.S., Hooykaas, P.J.J., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W. *Nature* 338:579-581, 1989.
5. Sharon, N., Lis, H. *FASEB J.* 4:3198-3208, 1990.
6. Beintema, J.J. *FEBS Lett.* 350:159-163, 1994.
7. Drickamer, K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:612-616, 1995.
8. Rini, J.M. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:551-577, 1995.
9. Weis, W.I., Drickamer, K. *Annu. Rev. Biochem.* 65:441-473, 1996.
10. Young, N.M., Oomen, R.P. *J. Mol. Biol.* 228:924-934, 1992.
11. Sharma, V., Surolia, A. *J. Mol. Biol.* 267:433-445, 1997.
12. Weis, W., Brown, J.H., Cusak, S., Paulson, J.C., Skehel, J.J., Wiley, D.C. *Nature* 333:426-431, 1992.
13. Lemieux, R.U. *Chem. Soc. Rev.* 18:347-374, 1989.
14. Solís, D., Jiménez-Barbero, J., Martín-Lomas, M., Díaz-Mauriño, T. *Eur. J. Biochem.* 223:107-114, 1994.
15. Drickamer, K. *Nature* 360:127-134, 1992.
16. Watowich, S.J., Skehel, J.J., Wiley, D.C. *Structure* 2:719-731.
17. Toone, E.J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4:719-728, 1994.
18. Gidrol, X., Chrestin, H., Tan, H-L., Kush, A. *J. Biol. Chem.* 269:9278-9283, 1994.
19. Rodríguez-Romero, A., Ravichandran, K.G., Soriano-García, M. *FEBS Lett.* 291:307-309, 1991.
20. Andersen, N.H., Cao, B., Rodríguez-Romero, A., Arreguín, B. *Biochemistry* 32:1407-1422, 1993.
21. Asensio, J.L., Cañada, F.J., Bruix, M., Rodríguez-Romero, A., Jiménez-Barbero, J. *Eur. J. Biochem.* 230, 621-633, 1995.
22. Horton, N., Lewis, M. *Protein Sci.* 1:169-181, 1992.
23. Spohr, U., Hindsgaul, O., Lemieux, R.U. *Can. J. Chem.* 63:2644-2652, 1985.
24. Naghibi, H., Tamura, A., Sturtevant, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:5597-5599, 1995.
25. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., Lin, L.-N. *Anal. Biochem.* 179:131-137, 1989.
26. Wright, H.T., Sandrasegaram, G., Wright, C.S. *J. Mol. Evol.* 33:283-294, 1991.
27. Allen, A.K.; Neuberger, A., Sharon, N. *Biochem. J.* 131:155-162, 1973.
28. Rodríguez, A., Tablero, M., Barragán, B., Lara, P., Rangel, M., Arreguín, B., Possani, L., Soriano-García, M. *J. Cryst. Growth* 76:710-714, 1986.
29. Derewenda, Z., Yariv, J., Helliwell, J.R., Halb, A.J., Dodson, E., Paiz, M., Wan, T., Campbell, J.W. *EMBO J.* 8:2189-2193, 1989.

30. Makhatadje, G.I., Kim, K.S., Woodward, C., Privalov, P.L. *Protein Sci.* 2:2028-2036, 1993.
31. Fersht, A.R. *Trends Biochem. Sci.* 12:301-304, 1987.
32. Eisenberg, D., Wesson, M., Yamashita, M. *Chemica Scripta* 29A:217-221, 1989.
33. Lemieux, R.U. *Acc. Chem. Res.*, en prensa.
34. Murphy, K.P., Freire, E. *Advan. Protein Chem.* 43:313-361, 1992.
35. Burrows, S.D., Doyle, M.L., Murphy, K.P., Franklin, S.G., White, J.R., Brooks, I., McNulty, D.E., Scott, M.O., Knutson, J.R., Porter, D., Young, P.R., Hensley, P. *Biochemistry* 33:12741-12745, 1994.
36. Murphy, K.P., Xie, D., García, K.C., Amzel, M., Freire, E. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 15:113-120, 1993.
37. Spolar, R.S., Livingstone, J.R., Record, M.T., Jr. *Biochemistry* 32:3947-3955, 1992.
38. Murphy, K.P., Gill, S.J. *J. Mol. Biol.* 222:699-709, 1991.
39. Privalov, P.L., Makhatadze, G.I. *J. Mol. Biol.* 224:715-723, 1992.
40. Chervenak, M.C., Toone, E.J. *J. Am. Chem. Soc.* 116:10533-10539, 1994.
41. Bains, G., Lee, R.T., Lee, Y.C., Freire, E. *Biochemistry* 31:12624-12628, 1992.
42. Naismith, J.H., Wimmerich, C., Habash, J., Harrop, S.J., Helliwell, J.R., Hunter, W.N., Raftery, J., Kalb, A.J., Yariv, J. *Acta Crystallogr. D* 50:847-858, 1994.
43. Delbaere, L.T.J., Vandonselaar, M., Prasad, L., Quail, J.W., Wilson, K.S., Dauter, Z. *J. Mol. Biol.* 230:950-965, 1993.
44. Schwarz, F.P., Puri, K. D., Bhat, R.G., Surolia, A. *J. Biol. Chem.* 268:7668-7677, 1993.
45. Rini, J.M., Hardman, K.D., Einspahr, H., Suddath, F.L., Carver, J.P. *J. Biol. Chem.* 268:10126-10132, 1993.
46. Surolia, A., Sharon, N., Schwarz, F.P. *J. Biol. Chem.* 271:17697-17703, 1996.
47. Shaanan, B., Lis, H., Sharon, N. *Science* 254:862-866, 1991.
48. Ramkumar, R., Surolia, A., Podder, S.K. *Biochem. J.* 308:237-241, 1995.
49. Liao, D.-I., Kapadia, G., Ahmed, H., Vasta, G.R., Herzberg, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1428-1432, 1994.
50. Cheetham, J., Artymiuk, P.J., Phillips, D.C. *J. Mol. Biol.* 224:613-628, 1992.
51. Imberty, A., Bourne, Y., Cambillau, P.R., Pérez, S. *Advan. Biophys. Chem.* 3:71-117, 1993.
52. D'Aquino, J.A., Gómez, J., Hilser, V.J., Lee, K.H., Amzel, L.M., Freire, E. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 25:143-156, 1996.
53. Privalov, P.L., Khechinashvili, N.N. *J. Mol. Biol.* 59:665-684, 1974.
54. Fu, L., Freire, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9335-9338, 1992.
55. García-Hernández, E., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Arana, A. *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 1997, en prensa.
56. Baldwin, R.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8069-, 1986.
57. Kauzmann, W. *Advan. Protein Chem.* 14:1-63, 1959.
58. Stickle, D.F., Presta, L.G., Dill, K.A., Rose, G.D. *J. Mol. Biol.* 226:1143-1159, 1992.
59. Xu, D., Lin, S.L., Nussinov, R. *J. Mol. Biol.* 265:68-84, 1997.
60. Yang, A.-S., Sharp, K.A., Honig, B. *J. Mol. Biol.* 227: 889-900, 1992.
61. Hendsch, Z.S., Tidor, B. *Protein Sci.* 3:211-226, 1994.
62. Goodford, P.J. *J. Med. Chem.* 28:849-857, 1985.
63. Miranker, A., Karplus, M. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 11:29-34, 1991
64. Ringe, D. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 5:825-829, 1995.

65. Allen, K.N., Bellamacina, C.R., Ding, X., Jeffrey, C.I., Mattos, C., Petsko, G.A., Ringe, D. *J. Phys. Chem.*, 1995.
66. Beierbeck, H., Lemieux, R.U. *Can. J. Chem.* 68:820-827, 1990.
67. Beierbeck, H., Delbaere, L.T.J., Vandonselaar, M., Lemieux, R.U. *Can. J. Chem.* 72:463-470, 1994
68. Makhatadze, G.I., Privalov, P.L. *J. Mol. Biol.* 232:639-659, 1993.
69. Makhatadze, G.I., Privalov, P.L. *Advan. Protein Chem.* 47:307-425, 1995.
70. Lazaridis, T., Archontis, G., Karplus, M. *Advan. Protein Chem.* 47:231-306, 1995.
71. Brooks, C.L., III, Karplus, M., Pettitt, B.M. *Advan. Chem. Phys.* 71, 1988.
72. Mayo, S.L., Olafson, B.D., Goddard III, W.A. *J. Phys. Chem.* 94:8897-8809, 1990.
73. Hilser, V.J., Gómez, J., Freire, E. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 26:123-133, 1996.
74. Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, E.F., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O. Shimanouchi, T., Tasumi, M. *J. Mol. Biol.* 112:535-542, 1977.
75. Hubbard, S.J., Thornton, J.M. 'NACCESS' Computer Program. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College, London, 1993.
76. Lee, B., Richards, F.M. *J. Mol. Biol.* 55:379-400, 1971.
77. Chothia, C. *J. Mol. Biol.* 105:1-14, 1976.
78. Cabani, S., Gianni, P., Mollica, V., Lepori, L. *J. Sol. Chem.* 10:563-595, 1981.
79. Gasteiger, J., Marsili, M. *Tetrahedron.* 36:3219-3228, 1980.
80. Vyas, N.K. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 1:732-740, 1991.
81. Banerjee, R., Das, K., Ravishankar, R., Suguna, K., Surolia, A., Vijayan, M. *J. Mol. Biol.* 259:281-296, 1995.
82. Naismith, J.H., Field, R.A. *J. Biol. Chem.* 271:972-976, 1996.
83. Bourne, Y., Rougé, P., Cambillau, C. *J. Biol. Chem.* 265:18161-18165, 1990.
84. Bourne, Y., Roussel, A., Frey, M., Rougé, P., Fontecilla-Camps, J.C., Cambillau, C. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 8:365-376, 1990.
85. Kenneth, K.-S., Drickamer, K., Weis, W.I. *J. Biol. Chem.* 271:663-674, 1996.
86. Weis, W.I., Drickamer, K., Hendrickson, W.A. *Nature* 360:127-134, 1992.
87. Sixma, T.K., Pronk, S.E., Kalk, K.H., van Zanten, B.A.M., Berghuis, A.M., Hol, W.G.J. *Nature* 355:561-564, 1992.
88. Merritt, E.A., Sixma, T.K., Kalk, K.H., van Zanten, B.A.M., Hol, W.G. *J. Mol. Biol.* 13:745-753, 1994.
89. Merritt, E.A., Sarfaty, S., van den Akker, F., L'Hoir, C., Martial, J.A., Hol, W.G.J. *Protein Sci.* 3:166-175, 1994.
90. Jeffrey, G.A., Saenger, W. (1991) *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag, New York.
91. Quioco, F.A. *Annu. Rev. Biochem.* 55:287-315, 1986.
92. McDonald, I.K., Thornton, J.M. *J. Mol. Biol.* 238:777-793, 1994.
93. Jones, S. Thornton, J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13-20, 1996.
94. Janin, J., Chothia, C. *J. Biol. Chem.* 265:16027-16030, 1990.
95. Miller, S., Janin, J., Lesk, A.M., Chothia, C. *J. Mol. Biol.* 196:641-656, 1987.
96. Ben-Naim, A. *J. Phys. Chem.* 95:1437-1444, 1991.