



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

***ESTABILIDAD ESTRUCTURAL DE LA
β-LACTOGLOBULINA.***

TESIS PRESENTADA EN LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

POR

ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

México, D.F.

Mayo de 1994

UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Michoacán y La Purísima, Col. Vicentina, Iztapalapa, D.F. C.P. 09340. Tel.: 686-03-22 TELEFAX: (5) 686-89-99 TELEX: UAMME 176496

153845

*A mi viejita linda,
a mis padres.*

AGRADECIMIENTOS

La formación de un estudiante esta constituida por dos partes complementarias: la del alumno y la del profesor. Como alumno, agradezco con profunda sinceridad la valiosa forma con que tomaron su parte mis profesores Arturo Rojo y Andrés Hernández, los cuales, con plena certeza decirlo, son los pilares de la presente obra. Deseo también agradecer la asesoría del Dr. Alberto Hamabata. Estoy con la obligación moral de expresar mi agradecimiento en el nivel institucional a la Maestría en Biología Experimental, en especial a su coordinadora la Dra. Concepción Gutiérrez, y al Departamento de Química, a través de su Área de Biofísicoquímica, por todo el apoyo y facilidades brindadas en estos tres intensos años de trabajo.

Como amigo, tendré siempre en alta estima la calidad como personas de mis profesores y compañeros.

Como familiar, ofrezco mi trabajo como un pequeño tributo y homenaje a aquéllos que me forjaron con su esfuerzo y amor.

Como esposo, quiero desandar el camino para llegar a quien ahora es mi origen, y al hacerlo inevitablemente avanzar hacia adelante, por que también es mi fin: te agradezco a ti Marvila, mi viejita, porque supiste afrontar y apoyarme en todos esos momentos difíciles que se suscitaron por la realización de esta tesis.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Arturo Rojo Domínguez y del Dr. Andrés Hernández Arana. El Área de Biofísicoquímica contó con el apoyo de CONACYT (convenio No. 0609-N9110).

El autor de la presente obra agradece el apoyo directo brindado por CONACYT mediante una beca económica (número de registro 80762).

La Maestría en Biología Experimental es una Maestría registrada en el Padrón de Excelencia de Programas de Posgrado de CONACYT. Éste apoyó a la Maestría en Biología Experimental a través del convenio No. PFPN/66/92.

ÍNDICE

CAPÍTULO PRIMERO: INTRODUCCIÓN	2
§1.1. El Código de Plegamiento de las Proteínas	2
§1.2. La Ingeniería de Proteínas	4
§1.3. La Termodinámica de Proteínas	5
§1.4. El Objetivo	9
§1.5. La β -Lactoglobulina	11
§1.6. La Superfamilia de las Lipocalinas	14
CAPÍTULO SEGUNDO: ESTUDIOS CALORIMÉTRICOS	16
§2.1. Instrumentación y Marco Teórico	16
El instrumento	16
Los Termogramas y su Interpretación	16
El Análisis	18
§2.2. Desarrollo Experimental	22
Materiales	22
Pureza	22
Estado de Agregación	23
Determinaciones Calorimétricas	23
§2.3. Resultados y Discusión	24
Pureza	24
Estado de Agregación	24
Condiciones de Concentración de Proteína	24
Reversibilidad	26
Número de Unidades Cooperativas de Plegamiento	26
Interdependencia de los Parámetros pH - T_m - ΔH_p	27
Tendencia I: $0.6 \leq pH \leq 1.6$	27
Tendencia II: $1.6 \leq pH \leq 2.4$	32
Tendencia III: $2.4 \leq pH \leq 3.0$	35
CAPÍTULO TERCERO: ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS	40
§3.1. Instrumentación y Marco Teórico	40
Las Técnicas	41
Técnica de Espectroscopía Diferencial Ultravioleta	41
Técnica de Dicroísmo Circular	41
El Análisis	44
§3.2. Desarrollo Experimental	47
Materiales	47
Estudios de Desnaturalización Térmica mediante Espectroscopía	

Diferencial Ultravioleta	47
Estudios de Desnaturalización Térmica mediante Dicroísmo Circular	47
Proceso de Calentamiento	48
§3.3. Resultados y Discusión	48
Datos de Dicroísmo Circular	48
Datos de Espectroscopía Diferencial Ultravioleta	50
CAPÍTULO CUARTO: ESTUDIOS PRACTICADOS A LA VARIEDAD B DE LA β-LACTOGLOBULINA	54
§4.1. El Propósito	54
§4.2. Resultados y Discusión	55
§4.3. Comparación de las Variedades A y B de la β -lactoglobulina	56
1) Diferencias de Estabilidad y Cooperatividad	57
2) La Diferencia en la Intensidad de la Banda Anómala	58
3) La no coincidencia del ΔH_{VH} y el ΔH_{cal}	58
CAPÍTULO QUINTO: CONCLUSIONES	60
§5.1 Desnaturalización de la β -lactoglobulina	60
I. Dependencia de la estabilidad y la cooperatividad con respecto al pH	60
1) El glóbulo fundido	60
2) Evaluación del ΔC_p de desnaturalización	61
3) Manifestación de un " ΔC_p aparente" negativo	62
II. Modelo de Desplegamiento	63
§5.2. Comparación de los Patro de Desnaturalización de la β -lactoglobulina y la Glicoproteína ácida α_1	65
§5.3. Comentarios Finales	67
BIBLIOGRAFÍA	69

CAPÍTULO PRIMERO

INTRODUCCIÓN

§1.1. El Código de Plegamiento de las Proteínas.

La Biología Molecular nos enseña cuál es la criptografía en la que está basado el *código genético*: los codones son la unidad básica de información a través de la cual se relacionan los nucleótidos de un gen y los aminoácidos de una cadena polipeptídica. En otras palabras, tenemos conocimiento de la manera en la que el material genético porta la información precisa para definir la secuencia específica de las proteínas, esas obreras moleculares que son *de facto* las confeccionadoras de la vida.

Pareciera, por tanto, que tenemos los elementos suficientes para describir la relación de los dos procesos

fundamentales de la vida: la herencia y el metabolismo. Sin embargo, el solo conocimiento del código genético deja un gran abismo que aún nos mantiene distantes de poder enlazar de manera total la información genética con los procesos metabólicos, abismo al cual se le ha nombrado como el problema del *desciframiento del código de plegamiento de las proteínas*, o, de una manera que no carece de elegancia, el *desciframiento de la segunda mitad del código genético* [01]: una vez logrado el proceso de traducción del "lenguaje" de codones al "lenguaje" de aminoácidos, ¿cómo es dictada la ruta de plegamiento de la cadena polipeptídica para la generación de la arquitectura funcional o *nativa* de una proteína?, ¿por qué la proteína, partiendo de una estructura aleatoria, adopta precisamente esa configuración altamente

compleja y específica capaz de llevar con la mayor celeridad y precisión las reacciones bioquímicas, y no otra? ¿cuáles son las bases moleculares bajo las que está cifrado el código de plegamiento? ¿cuál es la información mínima que determina la segunda mitad del código genético?

Al respecto de estas interrogantes, existe un argumento de orden teórico, conocido como la paradoja de Levinthal, que nos advierte sobre la complejidad que encierra el responder a estas preguntas tan simples de formular.

Levinthal formuló su paradoja en términos del número astronómico de conformaciones diferentes que en principio puede adquirir una cadena polipeptídica, aun suponiendo un número muy pequeño de grados de libertad conformacionales para cada residuo de aminoácido [02]. Levinthal razonaba que si concediéramos tan sólo cuatro diferentes orientaciones permisibles para cada residuo en una cadena de 100 aminoácidos, el número de posibles conformeros sería de 4^{99} (ó $\sim 4 \times 10^{59}$). Si a una proteína de tales dimensiones que se plegara a través de una búsqueda aleatoria, le facultáramos con una tasa de isomerización alta de, digamos, mil billones (10^{14}) de conformaciones por segundo [03], necesitaría de ¡seis mil cuatrillones (6×10^{27}) de veces la vida del universo para poder recorrer todas las posibles conformaciones!. Y, sin embargo, *in vivo*, una proteína logra su plegamiento en intervalos de tiempo de tan sólo 10^{-1} a 10^3 segundos. He allí la paradoja.

Esta colosal cantidad de tiempo puede ser reducida en varios órdenes de magnitud al tomarse en cuenta que la conformación nativa no es única, sino que en realidad consiste de una colección de estructuras de propiedades energéticas

muy cercanas [04], y que la búsqueda de plegamiento puede ser alejada de manera sustancial de lo completamente aleatorio si son impuestas restricciones de costo energético menores en la adopción de configuraciones locales incorrectas [05]. Sin embargo, aun con las restricciones y las consideraciones más favorables, la escala temporal de exploración de conformeros seguiría superando con mucho a la biológica, por lo que la paradoja, desde esta perspectiva, ha permanecido.

Una paradoja es una contradicción aparente, y el origen de la paradoja de Levinthal está en la suposición de cómo se dobla una proteína. La parte constructiva y realmente importante que se infiere de la paradoja de Levinthal, es que el proceso de plegamiento de una cadena polipeptídica *no puede ser un evento aleatorio*, sino que debe ser dirigido de alguna manera a través de una ruta que le conduzca "directamente" a adquirir la conformación nativa. Por el número prácticamente infinito de conformaciones posibles que puede adquirir una proteína, se deduce también de la paradoja que las bases moleculares del plegamiento deben de ser en extremo sofisticadas y sutiles.

Los trabajos visionarios de Anfinsen, que, usando una frase de Perutz [06], gravitaron en torno al propósito de "descocer el huevo" ("unboiling the egg"), sentaron de una vez y para todas la filosofía con la cual ha sido abordado el planteamiento fundamental que se deriva de la paradoja de Levinthal. Anfinsen [07] descubrió que *in vitro*, bajo ciertas condiciones favorables de fuerza iónica, pH y concentración de agentes caotrópicos, la forma desplegada de la ribonucleasa A es capaz de reconstituir, *por sí sola y espontáneamente*, la

compleja topología nativa. De este hallazgo fueron derivadas conclusiones de importancia primerísima:

La primer conclusión constituye la hipótesis fundamental en el estudio del código de plegamiento, y establece que la información requerida para que una proteína, bajo condiciones "fisiológicas", adopte una configuración tridimensional particular —la funcional— de entre un grupo astronómicamente grande de conformeros, *es portada en su totalidad por la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica*. Esta conclusión ha sido tema de amplias discusiones, y aunque se le ha cuestionado de diferentes formas, su validez parece estar completamente demostrada [07-10].

El hecho de que una proteína sea capaz de renaturalizarse por sí sola, trajo, por otra parte, una segunda conclusión de un profundo peso epistemológico: significó que, en principio, es posible estudiar el proceso de plegamiento de una proteína a través de su proceso inverso, *i.e.*, a través de su desplegamiento o desnaturalización¹. Un corolario inmediato y trascendente de esta conclusión, es que el proceso de desnaturalización puede llevarse a cabo en condiciones adecuadas para que se entable un equilibrio químico dinámico entre las formas plegadas y desplegadas, hecho que sentó la validez de hacer uso del profuso campo de la termodinámica de procesos reversibles para caracterizar energéticamente el plegamiento-desplegamiento de la cadena polipeptídica [11,12].

¹ Dentro del ámbito de la Ingeniería de Proteínas, la desnaturalización de una proteína no la debemos entender como la simple pérdida de la actividad catalítica, sino como la ruptura de las interacciones no covalentes que estabilizan la topología nativa, de manera que la cadena polipeptídica adquiere una conformación desplegada y altamente desordenada ("estado desnaturalizado") [11].

§1.2. La Ingeniería de Proteínas.

El desciframiento del código de plegamiento lo podemos concebir como el punto de aterrizaje de uno de los proyectos científicos más ambiciosos que jamás se haya emprendido, y que lleva como nombre de disciplina *Ingeniería de Proteínas*. El conocimiento de cómo y por qué una determinada cadena polipeptídica adquiere una conformación espacial particular, dará en principio la posibilidad de diseñar proteínas artificiales concebidas para realizar tareas moleculares específicas. Claramente previsible es que las consecuencias de ello serán de proporciones incalculables. La construcción de microcircuitos, de vacunas virales y de agentes capaces de hidrolizar sustancias no biodegradables son tan sólo algunos ejemplos de la revolución tecnológica que significará el establecimiento de la Ingeniería de Proteínas.

El desciframiento del código de plegamiento es un asunto tan complejo, que resulta natural la cantidad de métodos y formas con las cuales está siendo abordado el problema.

Han sido desarrollados métodos predictivos de los diferentes niveles de organización estructural proteica a partir de la secuencia de aminoácidos. Algoritmos estadísticos de preferencias por los diferentes tipos de estructura permiten realizar predicciones de estructura secundaria con una precisión promedio del 65% [13]. Programas de búsqueda de homología de secuencias primarias han resultado adecuados en un número limitado de familias de proteínas [14]. Íntimamente ligadas a estos programas de homología, se encuentran las técnicas de modelado molecular, las

cuales permiten proponer topologías específicas, susceptibles de corroboración experimental [15].

Otra rama de estudio de la Ingeniería de Proteínas de gran interés y auge es, naturalmente, la de la determinación de la estructura tridimensional. La técnica que actualmente más promete y que está creciendo de manera explosiva, es la resonancia nuclear magnética (RMN), la cual tiene la insuperable ventaja con respecto a difracción de rayos X, de que la estructura que resuelve corresponde a la de la proteína en solución. El otro gran mérito de la RMN es que permite realizar estudios dinámico-estructurales con una resolución mucho mayor que la de otras técnicas espectroscópicas [16]. Aunque aun bajo las condiciones más favorables, la RMN es tan sólo capaz de resolver estructuras de proteínas relativamente pequeñas (menos de 150 aminoácidos), se espera que en breve este umbral sea superado.

El establecimiento del código de plegamiento tendría como requisito poder describir cómo las propiedades fisico-químicas intrínsecas de un polipéptido y sus cadenas laterales, se enlazan cinética y termodinámicamente para producir la estructura tridimensional nativa [58]. Por tanto, los estudios del plegamiento de una proteína han sido desarrollados utilizando técnicas cinéticas [17] y en el equilibrio, estas últimas cuya interpretación y alcances han estado de la mano con la aplicación de la termodinámica de procesos reversibles y macroscópicos [04,11,19].

El presente trabajo está directamente relacionado con este último rubro, al cual le podemos distinguir con el nombre de Termodinámica de Proteínas, rama a la cual quisiéramos dedicarle un breve espacio.

§ 1.3. La Termodinámica de Proteínas.

El propósito fundamental de la Termodinámica de Proteínas lo expresó claramente P. L. Privalov, uno de los autores más influyentes en este ramo, en su artículo *Thermodynamic Problems of Protein Structure* [20]:

Sin el conocimiento de las propiedades termodinámicas, todas las discusiones de los principios de la organización proteica, así como del mecanismo de plegamiento y estabilización de la estructura tridimensional de la proteína, son meras especulaciones. Esto ha llegado a ser evidente sólo después de muchos años de intentos infructuosos de resolver estos problemas sólo mediante el análisis de la información estructural de las proteínas. El fracaso ha hecho obvio que la información estructural tan sólo revela una cara de la molécula proteica, mientras que la otra cara es revelada por la información de las bases energéticas de su estructura, *i. e.*, su termodinámica.

Deducir las propiedades termodinámicas de una proteína a partir de su estructura tridimensional, o, en el caso complementario, derivar de las bases energéticas la conformación geométrica es el objetivo final a resolver dentro de la Termodinámica de Proteínas, punto que a su vez constituiría un factor clave para alcanzar la cúspide en la construcción de la Ingeniería de Proteínas [20].

Una forma directa de tratar de elucidar las bases energéticas de la estructura nativa de una proteína, es a través del estudio de su estabilidad. Para poder juzgar qué tan estable es la estructura de una proteína, basta con someterla a algún tipo de influjo externo y determinar cuánto le resiste, *i. e.*, desnaturalizarla y caracterizar el proceso termodinámicamente².

²Existen diversas formas de desnaturalizar a una proteína (*e. gr.*, condiciones extremas de pH, altas temperaturas o presencia de agentes caotrópicos o desnaturalizantes como urea o hidrócloruro

Han existido tres grandes "eras" que han marcado el devenir del estudio de las bases energéticas de la estructura tridimensional de las proteínas en solución: la *era precalorimétrica*, la *era calorimétrica* y la *era postcalorimétrica*.

Ptitsyn englobó en la "*era precalorimétrica*" [21] a aquella época en la que hubo un auge en el uso de técnicas que permiten cuantificar los parámetros termodinámicos de una manera indirecta. Este tipo de estudios fueron practicados desde fechas tan tempranas como 1934 [22], más fueron desarrollados sistemática y formalmente en la década de los 60's, quizá teniendo como obra cúlpe el trabajo de revisión realizado por Tanford en 1969 [11,12]. Los experimentos estriban en rastrear los cambios de alguna propiedad cuantificable y dependiente de la conformación proteica $Y(X)$ al ser elevada la magnitud del factor externo X . Las técnicas más socorridas por su sensibilidad y por el tipo de información que brindan son las espectroscópicas [23]. Un ejemplo típico de los resultados rendidos por estos experimentos, es mostrado en la figura 1.1, en donde la propiedad medida es el cambio en la absorción de radiación ultravioleta con respecto a la temperatura.

Del análisis de curvas como la de la figura 1.1, surgieron conceptos que aún siguen siendo de mucha actualidad. Un aspecto que sobresale, es que existe un cambio abrupto de absorción en un intervalo estrecho de temperatura, el cual es atribuible a la desnaturalización de la proteína, y que recuerda por su forma a

de guanidinio [11,19]). Aunque se cuenta con un amplio marco teórico para cada una de las modalidades de desnaturalización, la forma más rica en cuanto a la información que proporciona y en cuanto a la precisión de determinación experimental, es la desnaturalización a través del incremento de temperatura. Debemos mencionar que ésta es la razón fundamental por la que el grueso de nuestro trabajo está sentado en estudios de desnaturalización térmica.

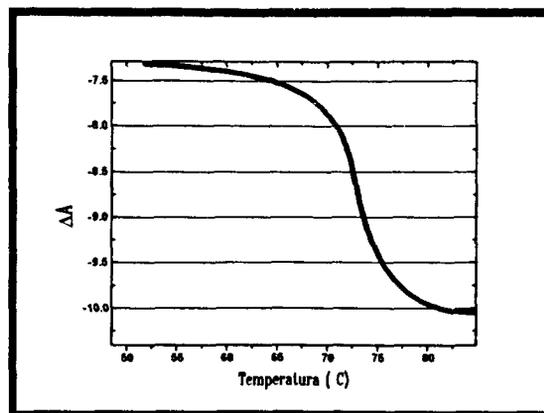


Figura 1.1. Patrón de desnaturalización típico de una proteína obtenido mediante espectroscopía diferencial ultravioleta. El cambio en la intensidad de absorción en este caso es para una longitud de onda de 300 nm.

una transición de fase. Este hecho condujo a suponer que el fenómeno de desnaturalización proteica es altamente cooperativo, por lo que para el análisis de los datos fue propuesto, de manera *a priori*, que el proceso ocurre a través de una sola transición, es decir, que la proteína puede estar o "completamente plegada" o "completamente desplegada", siendo los estados intermedios entre estas formas muy poco estables, y, por ello, encontrándose en concentraciones extremadamente pequeñas. Como apuntaremos con mayor detalle en los capítulos venideros, la aplicación de este *modelo de dos estados* permite obtener de forma *indirecta* los parámetros termodinámicos que caracterizan al proceso de desnaturalización³.

La primer explicación importante al respecto de las bases moleculares de la cooperatividad, y del hecho de que las proteínas observan una desnaturalización cercana al *todo o nada*, fue brindada por Tanford estudiando la energía libre de transferencia de aminoácidos de un medio

³ Por caracterizar termodinámicamente al proceso de desnaturalización debemos entender el determinar el conjunto de parámetros a partir de los cuales sea posible reproducir los datos experimentales.

apolar a otro polar [24,25]. A la luz de estos estudios, fue propuesto que el grueso de la estabilidad de una proteína proviene del así llamado efecto hidrofóbico generado de la exclusión de los residuos apolares del medio acuoso, siendo las contribuciones de tipo polar (*e. gr.*, puentes de hidrógeno o interacciones de van der Waals) poco importantes. Del alto nivel de organización estructural de la forma nativa y del bajo aporte entrópico por residuo de aminoácido hidrofóbico, fue dado explicar la alta cooperatividad y la aparente inexistencia de intermediarios en la mayoría de proteínas estudiadas.

A través de estos estudios de desnaturalización fue posible inferir la diferencia de energía libre de Gibbs entre el estado nativo y el desnaturalizado a temperaturas fisiológicas, encontrándose en todos los casos una estabilidad apenas marginal (de 10 a 15 kcal por mol de proteína), lo cual concuerda con las características de flexibilidad y dinamismo propias de la estructura nativa funcional [11].

En contra de este tipo de estudios debemos decir que sufren de varias incertidumbres, dentro de las cuales una de las más importantes es la dificultad de distinguir con precisión las propiedades del estado nativo y del desnaturalizado a diferentes temperaturas, distinción sin la cual no es posible definir cuantitativamente la estabilidad de una proteína [04,26]. Por otro lado, por sí solos, estos estudios son insuficientes para rendir la información termodinámica de proteínas cuyo proceso de desnaturalización se aleje del modelo de dos estados. Finalmente, con el tiempo se cayó en la cuenta que incluso este tipo de proteínas pueden desplegar una curva sigmoidal como la de la figura 1.1, por lo que la suposición del todo o nada siguió

siendo un elemento evidentemente *a priori*.

Estos problemas fueron superados con el advenimiento del microcalorímetro diferencial de barrido [26], el cual permitió determinar, *directamente* y con un grado de incertidumbre mucho menor, el calor de desnaturalización y la temperatura de transición media, variables extensiva e intensiva que conjugadas contienen toda la información termodinámica requerida para describir totalmente el proceso de desnaturalización [04,27].

Un sinnúmero de conclusiones han sido el resultado del desarrollo teórico para la interpretación de las curvas obtenidas mediante microcalorimetría. Este apartado ha sido objeto de excelentes trabajos de revisión, dentro de los cuales destacan los realizados por Privalov en 1979 [04] y en 1989 [20] y por Freire en 1989 [28].

Una consecuencia de suponer que la desnaturalización ocurre como una transición de fase, es que existe un cambio en el valor del calor específico entre la especie nativa y la desnaturalizada, el cual corresponde a la derivada de la entalpía de desnaturalización con respecto a la temperatura ($(\partial\Delta H/\partial T)_p = \Delta C_p$). Con el microcalorímetro fue posible medir de manera precisa este ΔC_p , encontrándose que tal valor se correlaciona con el número de contactos hidrofóbicos [04,29], por lo que el aumento en la capacidad calorífica ha sido imputado a la exposición de los grupos apolares originalmente insertos en el núcleo hidrofóbico de la molécula nativa hacia el agua [26,46]. Por otro lado, fue encontrado que existe una temperatura en la cual el calor de desnaturalización específico es muy similar para diferentes proteínas [04,20,30,31]. Este hecho, que trataremos con mayor detalle en otros

capítulos, hizo ver la importancia de los puentes de hidrógeno y, en general, de las interacciones de tipo polar en la estabilidad de la conformación nativa [20].

El clímax de esta *era calorimétrica* [21] ha llegado a tal grado, que recientemente ha sido posible reproducir satisfactoriamente las curvas calorimétricas de algunas proteínas a partir exclusivamente del análisis de sus estructuras tridimensionales y del uso de valores termodinámicos obtenidos ya sea de compuestos modelo o bien, empleando proteínas de estructura tridimensional conocida y bien caracterizadas termodinámicamente, de regresiones lineales múltiples entre el área apolar y polar ocultas que al desplegarse la proteína se exponen al disolvente y los correspondientes valores termodinámicos de desnaturalización térmica [31-35].

Sin duda, la consecuencia conceptual de mayor peso emanada de esta época fue el afianzamiento del modelo de dos estados [04]. Fue demostrado que los intermediarios estables que surgen en tanto se desnaturaliza una proteína muy compleja que *no* se ajusta en lo global a un modelo de dos estados, resultan de la transición de *unidades cooperativas de plegamiento* independientes que *sí* se ajustan a la modalidad de *todo o nada* [27,32]. Los ajustes entre el modelo propuesto y los datos experimentales llegaron a ser tan espectaculares, que del modelo de dos estados fueron aventuradas implicaciones incluso de orden evolutivo [04].

Sin embargo, en la actualidad esta visión está siendo seriamente cuestionada, y cada vez gana mayor terreno la idea de que la forma de *todo o nada*, más que ser el factor causal de la estabilidad estructural de una proteína, es una consecuencia más

de las propiedades globales de ensamblaje de ésta [21,36].

Estudios a través de diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y agentes desnaturalizantes han llevado a la certeza de que pueden existir conformaciones parcialmente plegadas que comparten propiedades del estado desnaturalizado y del nativo; un punto de suma importancia es que tales conformaciones han sido demostradas para proteínas globulares pequeñas de las cuales se pensaba como prototipos de unidades cooperativas de plegamiento [21]. Llamaremos a esta etapa del desarrollo de la termodinámica como la *era postcalorimétrica* o la *del glóbulo fundido*.

El glóbulo fundido es un macroestado en el cual la proteína conserva el grueso de su estructura secundaria prácticamente intacta, pero las interacciones que estabilizan la estructura terciaria han sido fuertemente alteradas, al punto de ser inespecíficas [37,38]. Una propiedad más que es requerida para considerar a una conformación como glóbulo fundido es la presencia de un núcleo hidrofóbico comparable al de la forma nativa [39]. El glóbulo fundido ha sido hallado bajo condiciones extremas de pH y fuerza iónica y bajo condiciones moderadas de temperatura y de concentración de agentes desnaturalizantes [40-43].

Las consecuencias que están discurriéndose por el hallazgo de este tipo de intermediario estable son de alcances muy profundos. La revolución que actualmente está ocurriendo es quizá tan sólo comparable con la propiciada hace dos décadas con la llegada del calorímetro. Esto resulta natural al sopesar la valía de tener acceso al estudio de formas moleculares que equivalen a un punto intermedio en la ruta de plegamiento de la

cadena polipeptídica. Es de esperarse del estudio sistemático de los glóbulos fundidos, un alud de información nueva que permita un avance significativo hacia la elucidación del código de plegamiento. Por lo demás, muchos conceptos y formas de estudio, que hasta hace muy poco estaban firmemente establecidos, están cambiando, y aún muchos otros lo harán en un futuro quizá ya previsible.

Nos hemos permitido, aunque sea *grosso modo*, describir estas tres "eras del estudio de la estabilidad proteica", en virtud de que nuestro proyecto de investigación está imbricado en mayor o menor grado con todas ellas. Teniendo como marco de ubicación el contexto arriba construido, estamos ahora en condiciones de describir con detalle cuáles fueron los propósitos que dirigieron el presente trabajo de investigación.

§ 1.4. El Objetivo.

El objetivo de la presente tesis lo podemos formular, de manera sucinta, como *la caracterización termodinámica del proceso de desnaturalización térmica de la β -lg*. Tal objetivo emanó de dos propósitos, uno para cumplir de manera inmediata y otro en un plazo mediano.

El objetivo a mediano plazo es realizar un estudio termodinámico comparativo entre diferentes miembros del grupo proteico al cual pertenece la β -lg. En este sentido, la intención con esta proteína era contar con sus patrones de desnaturalización, de manera que fuera posible compararlos con los desplegados por otra proteína emparentada estructuralmente, la glicoproteína ácida α_1 de suero humano (GPA α_1), la cual había

sido estudiada previamente por nuestro grupo de trabajo bajo los mismos criterios experimentales que los previstos para esta investigación [44,45].

¿Con qué objeto realizar tal comparación?

La β -lg y la GPA α_1 pertenecen a la superfamilia proteica de las lipocalinas, grupo de pequeñas moléculas globulares no compactas que por las características de poseer una topología que semeja a un cáliz y por su alta afinidad por residuos hidrofóbicos ganaron el nombre que lleva la superfamilia.

Como comentaremos poco más adelante, el criterio fundamental que dio identidad propia y bien definida al grupo de las lipocalinas fue de orden sustancialmente estructural. El significado de este criterio podemos entenderlo en su real magnitud al considerar que la homología en la secuencia de aminoácidos dentro de este grupo es, para la gran mayoría de los casos, no superior al 20% [60]. Actualmente son más de 25 el número de lipocalinas conocidas [91], y lo cierto es que tan sólo para siete de ellas se cuenta con el modelo de estructura tridimensional derivado de datos de difracción de rayos X, además de una conformación obtenida por modelado molecular para la GPA α_1 [48]. Naturalmente, resulta un problema de orden mayor el pretender obtener datos de esta índole para todas las lipocalinas, aun sin contar los casos de proteínas para las que parece muy lejana la posibilidad de resolver por rayos X su estructura. Por tanto, ante la carencia de evidencias estructurales directas, el criterio de agrupación de las lipocalinas ha tenido que ser radicado, además de en algunas propiedades adicionales como la capacidad de unir pequeños ligandos hidrofóbicos, en

la presencia de una "huella digital" o "región consenso" al parecer común en la superfamilia, consistente de un segmento de aminoácidos colocado en el extremo amino terminal (ver §1.6).

En contra de la fiabilidad que significa tal huella digital, hemos de mencionar que existen casos, como el de la proteína unidora de pequeñas partículas olorosas (OBP), una de las siete lipocalinas a las que se les ha estudiado exitosamente por difracción de rayos X [49], que no presentan tal región consenso [50]. Así las cosas, es claro que sería de interés contar con algún tipo de evidencia adicional que implique de alguna manera información sobre la topología estructural.

Una hipótesis inicial que queríamos investigar, era la posibilidad de derivar un criterio de orden estructural sentado en patrones de desplegamiento inducidos térmicamente. Postulábamos que quizá para este peculiar grupo de proteínas, valdría como cierta y como operacional la idea de que si secuencias de aminoácidos con escasa homología al plegarse rinden topologías tan semejantes, entonces su proceso de desplegamiento debe ser al menos cualitativamente muy cercano. Debemos señalar con énfasis que dirimir este postulado no era uno de los objetivos de este trabajo, sino lo era simplemente el sentar un precedente que permitiera la formulación de un proyecto de mayor envergadura.

Ante el propósito de tener un punto de comparación de los patrones de desnaturalización de la GPA α_1 , escogimos a la β -lg proveniente de leche de vaca motivados por diferentes circunstancias. La primera de ellas es que contamos con la estructura tridimensional de la proteína, factor fundamental para intentar sentar estudios termodinámicos en

elementos estructurales. Y de entre el resto de las lipocalinas que ya han sido estudiadas por difracción de rayos X, la β -lg cuenta a su favor con que existe una profusa información termodinámica al respecto de ella y de que es la lipocalina más fácilmente asequible, disponible en el mercado con un grado de pureza muy elevado.

Sin embargo, además de pretender utilizar a la β -lg para la comparación antedicha, existieron motivos que hicieron *per se* atractiva la idea de estudiarla, y que en realidad forman la parte principal de esta investigación. Uno de ellos provino del estado de cosas en que se encuentra la literatura especializada al respecto del proceso de desnaturalización de esta proteína. Estudios fisicoquímicos sobre la β -lg existen prácticamente de cualquier tipo, y, sin embargo, aún no se cuenta con una versión definitiva para el modelo de desnaturalización que describe esta proteína (*e.gr.*, [51-53]). Como lo comentaremos profusamente en su momento, los resultados y su interpretación han sido tan dispares de un laboratorio a otro, que la única conclusión en firme que ha sido legada es que la desnaturalización térmica de esta proteína es un proceso complejo, sin poder determinar si tal complejidad es una propiedad intrínseca de la forma de desplegamiento, o de la combinación de ciertos factores extrínsecos que se le sobreponen.

Los ensayos experimentales que proyectamos para esta investigación consistieron en estudios por dos técnicas espectroscópicas (dicroísmo circular, que permite rastrear las transformaciones en el contenido de estructura secundaria y en la asimetría de los grupos aromáticos [55,56], y espectroscopía diferencial en el

ultravioleta, técnica que nos informa sobre cambios en el ambiente de los grupos aromáticos [54]); y una calorimétrica: (microcalorimetría diferencial de barrido, poderosa técnica que permite determinar directamente los parámetros termodinámicos que caracterizan un proceso de desnaturalización térmica [04,23,27]).

Al plantear el estudio haciendo uso de diferentes técnicas, pretendimos, además de lograr la caracterización termodinámica, obtener la información necesaria para formular una interpretación molecular de los datos de desnaturalización térmica, objetivo que en buena medida fue satisfecho.

Los resultados de la técnica calorimétrica los presentamos en el capítulo segundo; en tal espacio proponemos que en condiciones de alta acidez la β -lg adquiere una conformación del tipo glóbulo fundido; la probabilidad de que así sea el caso, lo discutimos en función de datos de DC y de calorimetría.

En el capítulo tercero reportamos los hallazgos derivados del estudio mediante técnicas espectroscópicas. Por interesante quisieramos adelantar que estos estudios de desnaturalización fueron realizados en condiciones de pH en las cuales al parecer domina el glóbulo fundido, hecho que nos ha permitido enriquecer y aventurar con mayores implicaciones nuestro trabajo.

La β -lg posee varias variedades. El grueso de nuestro trabajo corresponde a estudios practicados con la variedad *A* (capítulo segundo y tercero). De acuerdo a los patrones espectroscópicos de desnaturalización desplegados por esta variedad, inferimos la presencia de un intermediario estable parcialmente plegado. En búsqueda de mayor número de elementos probatorios, nos vimos impelidos a practicar los mismos estudios

espectroscópicos a la variedad *B* de la β -lg, la cual difiere de la *A* en tan sólo dos mutaciones, resultados que mostramos en el capítulo cuarto. De esta inclusión resultó un apoyo importante y consistente con la interpretación molecular que aquí proponemos sobre el proceso de desnaturalización térmica que despliega la β -lg.

En el quinto y último capítulo compendiamos los resultados de las diferentes técnicas proponiendo una interpretación molecular de los patrones de desnaturalización térmica que rinde la β -lg. También en este último capítulo efectuamos la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los encontrados para la GPA α_1 .

§ 1.5. La β -Lactoglobulina

La β -lg es el componente proteico más abundante del suero de la leche de rumiantes [57], equinos [58], porcinos [59], caninos, cetáceos [60] y felinos [61], constituyente que no está presente en la leche humana. La abundancia y fácil disponibilidad de esta proteína ha significado que desde 1934, fecha en que fue por vez primera aislada y cristalizada [62], haya sido escrito al respecto de ella más de una miríada de artículos cuya naturaleza ha sido de la más diversa índole.

La secuencia de este polipéptido de 162 residuos y de masa molar de alrededor de 18000 Da sido determinada [47], y su estructura tridimensional fue definida hace menos de una década con una resolución de 2.8 Å a partir de dos formas cristalinas diferentes [63,64]. El diseño estructural de la β -lg consiste de nueve segmentos de

hoja beta antiparalela, ocho de los cuales se pliegan conjuntamente para conformar un barril al que se le ha comparado con un cáliz [65], de una porción pequeña de hélice α ubicada en la región carboxilo terminal, y de diferentes fragmentos de cadena plegada irregularmente y asas β (figura 1.2). El fondo del barril es marcadamente hidrofóbico, en tanto que en la abertura de la cavidad están dispuestos algunos residuos hidrofílicos.

Esta proteína ha sido expresada exitosamente en *Escherichia coli* [66] y en *Saccharomyces cerevisiae* [67].

La β -lg bovina es codificada por un gen polimórfico; hasta el momento son conocidas 6 variedades [68], de las que destacan por su alta concentración las formas *A* y *B*. Estas variedades difieren entre sí por dos mutaciones puntuales: el Asp⁶⁴ y la Val¹¹⁸ de la variedad *A*, están sustituidos por Gli y Ala, respectivamente, en la variedad *B*. Aunque en términos estructurales las diferencias entre estas dos variedades parecen ser despreciables [65], han sido reportadas diferencias en propiedades fisicoquímicas como solubilidad [70], movilidad electroforética [71], punto isoeléctrico [72] y estado de agregación [73]. En este trabajo, presentamos evidencias de que estas variedades también difieren en su resistencia ante la desnaturalización térmica, de manera análoga a como ha sido hallado desnaturalizando por urea [69].

Para el estudio de la estabilidad estructural de una proteína es conveniente evitar en lo posible factores adicionales que pudieran complicar el seguimiento del proceso de desnaturalización. Uno de los factores que puede influir importantemente es el estado de agregación de la proteína. Estudios realizados a principios de la

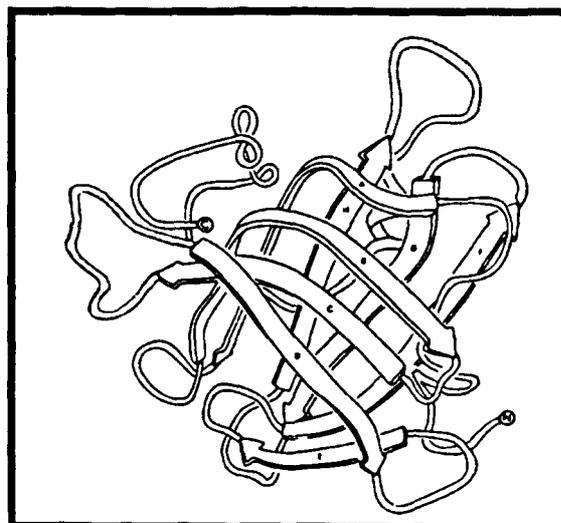


Figura 1.2. Representación esquemática de la estructura tridimensional de la β -lg. Adaptada de [64].

década de los 60's mediante técnicas de ultracentrifugación, de electroforesis y de dispersión de luz, dejaron establecido el patrón de agregación para la β -lg en función del pH [72,73]. Fue encontrado que la variedad *B* está como dímero en valores de pH mayores que 2, en tanto que el dímero de la variedad *A* tetrameriza en el intervalo de 3.7 a 5.2. Según estos estudios, para valores de pH menores que 2, ambas variedades se disocian, dominando el monómero libre. Esta información ha sido tomada como correcta hasta la actualidad, y, en particular, las condiciones bajo las cuales domina la especie monomérica no han sido objeto de reconfirmación experimental. Sin embargo, como lo demostraremos más adelante, la conclusión de que la disociación del dímero ocurre abajo de pH 2 es errónea, al menos para las condiciones en las cuales fueron realizados los presentes estudios, y, como también lo pormenorizaremos en su momento, este hallazgo nos ha permitido dar una interpretación molecular plausible y simple para una de las tendencias que conforman el complejo patrón de desnaturalización térmica que exhibe la β -

Ig en la región ultravioleta del espectro electromagnético (ver capítulo 3).

La β -lg representa un caso peculiar en los anales de la ciencia de proteínas, en el sentido de que es una de las moléculas sobre la cual más información se cuenta, y, sin embargo, sobre la que, comparativamente hablando, muy poco se conoce. El espectro de incertidumbres y contradicciones sobre esta proteína es muy amplio, y, como quedará manifiesto en este trabajo, uno de los aspectos más relevantes en este tenor son los reportes de su estabilidad estructural. No obstante, el punto que más resalta al respecto de la ignorancia que se tiene sobre esta proteína, es que son ya seis décadas de estudiarla, y aún se desconoce su papel funcional.

Actualmente existen dos hipótesis sobre la función de la β -lg, las cuales no resultan mutuamente excluyentes, y que parten de la consideración de tres observaciones experimentales, a saber:

1) Al ser resuelta la estructura tridimensional de la β -lg, fue encontrada una geometría globular no compacta superponible en más del 95% al modelo conformacional derivado también por difracción de rayos X para la proteína unidora de retinol (RBP) [75].

2) Al igual que su homóloga estructural, fue encontrado que la β -lg tiene alta afinidad por pequeñas moléculas hidrofóbicas tales como el retinol [76].

3) La β -lg es, junto con la α -lactalbúmina, la proteína globular más abundante del suero de la leche de vaca [77]. Ha sido encontrado que durante los primeras etapas de calostro, el nivel de esta lipocalina aumenta dramáticamente hasta alcanzar concentraciones de 20 mg/ml. Aunque es sintetizada en las glándulas mamarias, la evolución de la concentración de la β -lg decae de manera semejante a

como lo hace la de las inmunoglobulinas sanguíneas también presentes en el calostro [77].

La primer hipótesis sobre la función de la β -lg fue formulada apenas hace poco más de un lustro por el grupo británico de L. Sawyer [65], y parte de la notable semejanza estructural y afinidad por ligandos hidrofóbicos que comparten la β -lg y la RBP, en la estabilidad estructural que ostenta la β -lg en condiciones altamente aciduladas [78], y en el hecho de que esta proteína puede atravesar la zona estomacal y arribar intacta al intestino [79], sin ser susceptible de hidrólisis por parte de la pepsina [80]. Los autores de la hipótesis proponen que la β -lg, al igual que la RBP, también es una proteína transportadora, cuyo ligando es la vitamina A, a la cual captura en la leche, y la conduce a lo largo del tracto digestivo del becerro neonato, protegiéndola de la acción digestiva de los ácidos gástricos.

Esta hipótesis puede ser enriquecida con las evidencias experimentales de que, por un lado, la proteína sufre una transición molecular a valores de pH ligeramente básicos (conocida como "transición de Tanford") [71], de lo cual podría aventurarse que dicho relajamiento estructural permite la liberación de la vitamina A dentro del intestino delgado, y, por otro lado, el hallazgo de receptores membranales que reconocen específicamente al complejo β -lg-retinol dispuestos en las microvellosidades intestinales de los becerros recién nacidos [75].

La segunda hipótesis fue formulada recientemente por un grupo español [81], y postula la "asistencia" de la β -lg en la actividad hidrolítica de una lipasa pregástrica, al secuestrar los ácidos grasos liberados al medio por la digestión de triglicéridos, los cuales, de otra forma,

inhibirían fuertemente a la lipasa. Fue hallado que la presencia de esta lipocalina en concentraciones semejantes a las del calostro en un extracto faríngeo de becerro, suscita que la actividad de la lipasa incremente hasta en 250%.

La anterior propuesta encuentra eco en las observaciones de que: 1) ha sido aislada β -lg de rumiantes la cual porta ácidos grasos de cadena larga, 2) especies como las bovinas en la fase temprana de su vida poseen niveles muy bajos de lipasas pancreáticas y sales biliares, 3) las especies que no sintetizan β -lg, tales como la humana y las de roedores, tienen mecanismos alternativos a los de los bovinos para que los neonatos sean capaces de digerir los lípidos lácteos [81 y referencias en ella].

Infortunadamente, ambas hipótesis distan de ser definitivas, aun en el caso de que se les complementara una con la otra, por lo que el esclarecimiento de la función de la β -lg tendrá que esperar mayor confirmación experimental.

§ 1.6. La Superfamilia de las Lipocalinas.

La β -lg es uno de los miembros prominentes de una familia nueva de proteínas que al parecer comparten la encomienda de transportar ligandos hidrofóbicos a lo largo de ambientes extracelulares muy disímiles. Ha sido propuesto que el tipo de barril β que ostenta la β -lg puede ser un motivo estructural general para el transporte de pequeñas moléculas hidrofóbicas dentro de los organismos animales [82].

De entre las cuatro decenas de lipocalinas hasta ahora conocidas, resalta

también la RBP, proteína plasmática sintetizada por los hepatocitos, que transporta de manera específica a la vitamina A, previniéndola de ser filtrada por los glomérulos del riñón, y depositándola selectivamente en receptores celulares de la retina [83]. Otros miembros relevantes de la familia son la GPA α_1 [45,84] y la microglobulina α_1 [85].

Una vez obtenida la estructura tridimensional de la β -lg y de la RBP, y con la posterior resolución de la estructura de dos transportadoras provenientes de insecto (la proteína unidora de bilina [86] y la insecticianina [87]), fue fácil caer en la cuenta de que estas moléculas conforman una superfamilia estructural independiente y bien definida [82]. La proclividad hacia ligandos hidrofóbicos, y la peculiar forma globular con una cavidad central, ganó para el grupo el nombre de *lipocalinas* [84]. Un poderoso argumento que descarta del todo la posibilidad de que tal agrupación sea artificial, es el hecho de que la arquitectura de los genes que codifican a estas proteínas es muy semejante, por lo que su parentesco filogenético ha quedado bien establecido [84].

Actualmente, como lo hemos mencionado con anterioridad, el elemento principal de agrupación de las lipocalinas, además de criterios como la capacidad de unir grupos hidrofóbicos pequeños, es la presencia de una región consenso dispuesta cerca del extremo amino terminal, una "huella digital" que ha permanecido invariante durante la evolución de la mayoría de lipocalinas, y cuya composición es Asn-hid-áci-hid-X-bas- hid-X-Gli-X- Trp-aro-X-hid-hid-hid-hid, en donde *áci* puede ser Asp o Glu, *bas* Arg o Lis, *hid* algún residuo

hidrofóbico, *aro* aromático y *X* cualquier residuo [88].

La superfamilia de las lipocalinas son en más de un aspecto un grupo que reclama una atención especial. Por principio, está el hecho de su inusual patrón estructural. Hasta el momento han sido obtenidas por difracción de rayos X las estructuras tridimensionales de siete lipocalinas (las cinco antes mencionadas y la globulina urinaria α_2 y la proteína urinaria mayor [92 y referencias]), y el elemento relevante en común ha sido la cadena polipeptídica plegada en el espacio en forma de cáliz. Este hecho distingue a esta familia del resto de los grupos estructurales que hasta el momento son conocidos, en el sentido de que se trata de proteínas esféricas, solubles, pero *no compactas*: —"huecas", como si dijéramos. Esta propiedad permite prever posibles desviaciones del comportamiento de desnaturalización térmica que dibujan las lipocalinas con respecto a aquéllos que comúnmente presentan los otros tipos de proteínas.

Aunado a esta geometría tan peculiar, el interés por las lipocalinas resulta de que se dice de ellas que ostentan un código de plegamiento particularmente degenerado. Con ello se quiere decir que si bien comparten una estructura tridimensional notablemente semejante, la homología en la secuencia de aminoácidos entre los diferentes miembros apenas supera la homología que sería de esperar entre polipéptidos generados aleatoriamente. De hecho, la homología entre las lipocalinas es tan baja, que fue desconocida la existencia de la superfamilia hasta que no se contó con datos de difracción de rayos X para algunos de los miembros.

Las propiedades arriba desglosadas nos dan el marco para finalizar este

capítulo introductorio apuntando un aspecto que le da un realce especial al estar laborando estudios energéticos con miembros de la peculiar familia proteica de las lipocalinas. Como hemos apuntado anteriormente, uno de los objetivos cúlpe de la Ingeniería de Proteínas, es el poder predecir las propiedades termodinámicas de una proteína a partir del análisis de su estructura tridimensional, y viceversa. El tipo de estudios de desnaturalización que aquí fueron empleados, aplicados precisamente a una familia proteica que ostenta un código de plegamiento particularmente degenerado, quizá pueda brindar una invaluable oportunidad para sondear desde una nueva perspectiva el problema central de la Ingeniería de Proteínas. "Canónicamente", los estudios del papel de los aminoácidos en la adquisición de tal o cual conformación, han sido abordados tratando de elucidar las diferencias estructurales y energéticas ante ligeras variaciones en la composición de aminoácidos (estudiando, por ejemplo, las diferencias entre variantes naturales de la misma enzima [89] o de enzimas de alta homología secuencial y estructural [90]). Con el grupo de las lipocalinas, sería en principio posible abrir un nuevo abordaje, al inquirirse sobre cómo estructuras primarias de escasa homología mantienen la información de plegamiento y de estabilización energética para brindar conformaciones tridimensionales tan próximas.

Naturalmente, este tópico está más allá de los alcances de esta tesis; no obstante, se trata sin duda de una de las perspectivas de investigación más atractivas para realizar a mediano plazo.

CAPÍTULO SEGUNDO

ESTUDIOS CALORIMÉTRICOS

§2.1. Instrumentación y Marco Teórico.

El Instrumento. La constitución de un microcalorímetro diferencial de barrido (CDB) es sencilla [47]. El núcleo operacional lo compone un par de celdas inmersas en una cámara adiabática. Cada celda está rodeada por una resistencia eléctrica, la cual tiene el encargo de elevar la temperatura del sistema. Durante el desarrollo del experimento, las resistencias calientan paulatinamente, y el aparato registra la diferencia de la energía que es consumida para lograr el mismo incremento de temperatura en cada una de las celdas.

Los Termogramas y su Interpretación. El propósito fundamental que se persigue con un CDB es medir de

manera directa el calor de desnaturalización de una proteína. En la figura 2.1 es presentado un termograma

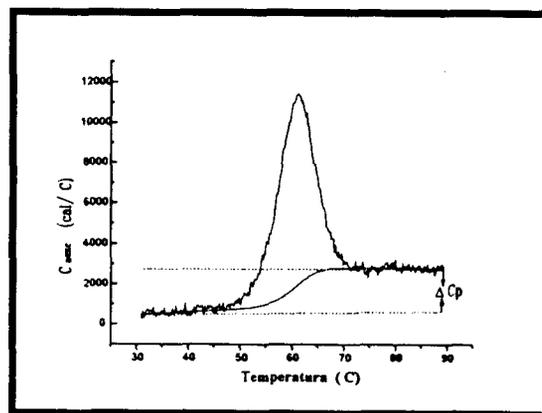


Figura 2.1. Termograma típico de desnaturalización de una proteína obtenido a través de un CDB.

típico resultado de un barrido con un microcalorímetro diferencial. En zonas de baja temperatura, la diferencia de energía entre las dos celdas es cercana a cero, manteniéndose prácticamente constante, y es atribuible a la pequeña diferencia de capacidad calorífica entre la solución con

proteína y la que no la posee. Llegada a la zona de desnaturalización, la proteína comienza a desplegarse a costa de un flujo de calor que toma del medio, por lo que el CDB precisa, para lograr el mismo incremento de temperatura en ambas celdas, invertir mayor energía en la celda con la solución problema que en la de referencia. A esta energía le nombraremos como calor de exceso aparente (C_{aexc}).

La forma "típica" que presenta el termograma de la figura 2.1, puede ser explicada de dos maneras.

Por ser la desnaturalización de una proteína un proceso endotérmico, en tanto la temperatura va en incremento, la constante de equilibrio ($K_D(T)$) lo hace a la par, de forma tal que la fracción de moléculas de proteína que se encuentra en forma desnaturalizada ($f_D(T)$) crece exponencialmente. Así, cada incremento de temperatura significa una mayor inversión de energía para calentar a la celda con la solución problema: este fenómeno es el que da origen al lado izquierdo de la campana. El aumento en la tasa de crecimiento de la población desnaturalizada alcanza el máximo en un punto muy cercano a la mitad del proceso ($f_D(T) = 0.5$), puesto que aun cuando más allá de ese punto $K_D(T)$ continúa en aumento, la velocidad de crecimiento de $f_D(T)$ comienza a decaer debido a la disminución en la población molecular que conserva la conformación nativa ($f_N(T)$).

Una explicación alternativa sobre la forma que adquiere típicamente un termograma involucra el concepto de microestado.

Hemos comentado que la desnaturalización de una proteína puede ser descrita como una transición de fase que ocurre entre dos macroestados. Desde hace tiempo, ha sido una cuenta clara que cada uno de estos macroestados no están

constituidos por una sola especie conformacional, sino por un conjunto que fluctúan alrededor de una arquitectura promedio [11,12]. En términos termodinámicos, se ha dicho de las formas nativa y desnaturalizada que están compuestas por microestados isoenergéticos, los cuales están separados por transiciones conformacionales pequeñas y no cooperativas [04,26]. Sin embargo —y aunque tal punto es de naturaleza controversial—, esto en rigor no puede ser cierto, en virtud de que la transición de desplegamiento ocurre en un *intervalo* de temperatura (figura 2.1), y no en un *punto único*, como sucede, por ejemplo, con el cambio de estado del agua líquida a vapor. Si postuláramos, en cambio, que el estado nativo está compuesto por un conjunto de microestados de diferencia energética marginal, pero ostensible, los cuales, bajo condiciones no desnaturalizantes, se distribuyen alrededor de un microestado dominante, estaríamos entonces en condiciones de explicar cualitativamente el por qué de la forma acampanada de la transición de una proteína.

Al ser elevada progresivamente la temperatura del medio, los microestados menos estables, que son a la vez los que menor calor requieren para su desplegamiento, son los primeros en desplegarse. Paulatinamente, son alcanzadas las condiciones para propiciar la desnaturalización de microestados más poblados, los cuales, a la vez, precisan de mayor entalpía. En consecuencia, en esta fase de desnaturalización, cada incremento de temperatura se traduce en un C_{aexc} mayor. Éste llega al máximo cuando se desnaturalizan los microestados más poblados, lo cual ocurre alrededor de $f_D = 0.5$. Rebasado este punto, comienza a disminuir el C_{aexc} debido a que, a pesar de

que las especies por desnaturar requieren mayor cantidad de calor por molécula para sufrir la transición, el número total de ellas disminuye rápidamente.

Es importante señalar que aunque cualitativamente la segunda explicación parece superior en cuanto a su posible correspondencia con la realidad, la primera es cuantitativamente preferible debido a que de ella se desprende un análisis termodinámico mucho más simple y, quizá lo más importante, que la determinación de las variables implicadas en el formalismo es asequible experimentalmente; por otro lado, tanto las limitaciones técnicas del instrumental utilizado como las pequeñas diferencias energéticas entre los microestados permiten que se logre un ajuste satisfactorio entre los datos experimentales y el modelo; además, como veremos más adelante, de tal formalismo es posible inferir información al respecto de las propiedades energéticas de los microestados.

Una vez completada la transición de todas las moléculas de la proteína, sería de esperarse que el C_{aexc} alcanzara nuevamente su nivel original. Sin embargo, como puede ser apreciado en la figura 2.1, esto no ocurre, sino que el C_{aexc} final es mayor que el del punto de partida. La razón de este incremento en el C_p total de la solución ha sido atribuida en efectos de interacción disolvente-proteína, en especial en la exposición al disolvente de los residuos ocultos originalmente en la conformación nativa [04,20]. De lo anterior, es claro por qué se dice que el de la figura 2.1 es un calor de exceso aparente (C_{aexc}) y no real (C_{exc}). Para llegar a este segundo, es decir, para que el termograma coincida exclusivamente con la energía requerida

para la transición de desplegamiento, es preciso restar los efectos por ΔC_p (figura 2.1)

Una conclusión importante de los estudios estructurales de las proteínas es que la distribución de aminoácidos observa ciertos patrones generales [93]. Ha sido encontrado que la mayoría de proteínas globulares compactas poseen un núcleo enriquecido por residuos hidrofóbicos, los cuales permanecen ocultos al disolvente, en tanto que la mayoría de los aminoácidos hidrofílicos tienden a distribuirse en la superficie de la proteína [93]. (De hecho, como ya hemos comentado anteriormente, la exclusión de los residuos hidrofóbicos por parte del agua (*i.e.*, el efecto hidrofóbico) es una de las razones que han sido aducidas para explicar la estabilidad de la conformación nativa). Una vez que el polipéptido se despliega, las moléculas de agua responden a la presencia de las cadenas laterales hidrofóbicas originalmente ocultas conformando alrededor de ellas "jaulas" o "clatratos" estabilizadas mediante puentes de hidrógeno agua-agua [04]. La presencia de estos clatratos es responsable, en buena medida, del ΔC_p observado [20]¹.

El Análisis. Desde un punto de vista termoestadístico, el proceso de desnaturación de una proteína queda caracterizado una vez es evaluada la función de partición ($Q(T)$), la cual está compuesta por la suma de los pesos estadísticos de todos los posibles estados energéticos de la molécula:

¹ Por información derivada de compuestos modelo [94] y de correlación entre datos estructurales y experimentales [29,32], se sabe que en realidad el ΔC_p recibe tanto una contribución positiva de los grupos hidrofóbicos como una negativa producto de la exposición de los grupos polares.

$$Q(T) = \sum_{i=0}^n e^{-\Delta G_i(T)/RT} \quad (1)$$

en donde $\Delta G_i(T)$ representa la diferencia de energía libre entre el estado i y el estado nativo, R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta [27]. Haciendo uso del riguroso aparato de la termodinámica estadística, es demostrable que el sistema conjugado de variables extensiva e intensiva: entalpía de desnaturalización/temperatura contiene la información necesaria para evaluar esta función de partición [27]. De acuerdo al formalismo desarrollado por Freire y Biltonen [27], la función de partición puede ser evaluada experimentalmente a través de la doble integral:

$$\ln Q(T) = \int_{T_0}^T \frac{1}{RT^2} \left[\int_{T_0}^T \langle \Delta C_p \rangle (T) dT \right] dT \quad (2)$$

Aquí $\langle \Delta C_p \rangle (T)$ representa el incremento en la capacidad calorífica de exceso² en la temperatura T , y equivale a

$$\langle \Delta C_p \rangle (T) = \frac{\partial}{\partial T} \langle \Delta H_p \rangle (T) \quad (3)$$

en donde $\langle \Delta H_p \rangle (T)$ es la entalpía acumulada en el proceso de desnaturalización hasta una determinada temperatura. De acuerdo a la relación (3), la primera integral de la ecuación (2) puede ser evaluada experimentalmente conociendo el calor de exceso consumido en cada punto de la transición de desnaturalización. Por lo que expusimos

² El subíndice p denota que los cambios de estado son evaluados a presión constante.

en la sección anterior, es obvio que un CDB permite evaluar *directamente* tal sistema, siendo el total del área bajo el termograma igual a la entalpía consumida por toda la transición (ΔH_p) (figura 2.1) [26] y $\langle \Delta H_p \rangle (T)$ el área acumulada bajo la curva hasta la temperatura T .

La segunda integral de la ecuación (2) representa la dependencia del $\langle \Delta H_p \rangle (T)$ como una función continua de la temperatura, información que también nos la proporciona un CDB.

El punto crítico del análisis radica en reproducir los valores de la función (2) a través de relaciones que dependan de la entalpía de desnaturalización, de la temperatura y del número de estados energéticos que son poblados principalmente a lo largo de la transición.

De acuerdo con la ecuación (1), si la función de partición corresponde a la suma de los pesos estadísticos de todos los posibles estados, entonces se sigue que la probabilidad $P_i(T)$ de una molécula de estar en un determinado estado está dada por el cociente de su peso estadístico dividido por la suma de los pesos estadísticos de todas las especies:

$$P_i(T) = e^{-\Delta G_i/RT} / Q(T) \quad (4)$$

Bajo condiciones de equilibrio, $P_i(T)$ adquiere la forma de distribución de las moléculas en los diferentes estados. De la aseveración anterior, se sigue el proponer que la entalpía total acumulada a una determinada temperatura puede ser calculada de

$$\langle \Delta H_p \rangle (T) = \sum_{i=1}^n P_i(T) \Delta H_i \quad (5)$$

Es decir, que la entalpía total consumida hasta determinado punto de la transición es debida a las entalpías particulares para pasar del estado nativo al estado i (ΔH_i) pesadas por la fracción de moléculas que, en promedio, han transitado hasta ese estado. Debemos resaltar que la validez de la ecuación (5) está delimitada por la restricción de que en el intervalo de temperatura de análisis, ΔH_i es una función independiente de la temperatura, lo cual, como veremos más adelante, es una aproximación. Nótese, por otro lado, que en el caso particular de únicamente dos estados, la ecuación (5) se reduce a

$$\langle \Delta H_p \rangle = P_D(T) \Delta H_D \quad (6)$$

en donde $P_D(T)$ es la probabilidad de poseer las propiedades energéticas del estado desnaturalizado y ΔH_D , la entalpía asociada para este estado, corresponde al ΔH_p total. Es muy claro de esta relación que la probabilidad $P_i(T)$ equivale a la fracción de proteína desnaturalizada del estado conformacional involucrado [27].

Las ecuaciones anteriores proveen el marco fundamental para el análisis termodinámico de un proceso de desnaturalización [27]. En principio, por medio de un análisis numérico sería posible realizar un ajuste para reproducir el valor de la función de partición evaluado experimentalmente (ecuación (2)) a partir del mejor juego de valores de parámetros termodinámicos y número de estados contenidos en (4) y (5) [27].

Sin embargo, tal ajuste nos exigiría conocer la dependencia de las energías libres de cada estado en función de la temperatura (ecuación (4)), valor que no es asequible directamente mediante un CDB. Este problema puede ser superado en tanto se continúe apegado a la aproximación de que, en el intervalo de

estudio, la entalpía de transición para cada estado no es función de la temperatura. Recordando que la energía libre está definida como:

$$\Delta G_i = \Delta H_i - T \Delta S_i \quad (7)$$

en donde ΔS_i es el cambio de entropía ocurrido en la transición al estado i ; y, por otro lado, tomando en cuenta que ha cierta temperatura (T_m) la energía libre de Gibbs llega a ser cero debido a que coexisten en la misma proporción la fracción de población de proteína en el estado i y en el nativo, podemos llegar a una forma equivalente de la ecuación (4) en términos de los parámetros termodinámicos ΔH_i y T_{mi} para cada estado:

$$P_i(T) = e^{\frac{-\Delta H_i}{RT^2} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{mi}} \right)} / Q(T) \quad (8)$$

Para llevar a cabo el ajuste del formalismo anterior, es preciso que no se incluya el efecto del aumento del C_p debido a la interacción de los grupos hidrofóbicos, ocultos originalmente dentro de la proteína, y el disolvente; por tanto, antes de su manipulación, a los termogramas se les debe restar el ΔC_p , tal como lo ilustra la figura 2.1.

El hecho de que las ecuaciones (5) y (8) estén abiertas para más de dos estados, exige una aclaración de nuestra parte. En pro de la sencillez, anteriormente habíamos hablado del proceso de desnaturalización haciendo referencia de tan sólo dos macroestados, el nativo y el desnaturalizado, los cuales estaban mediados por una sola transición. Sin embargo, lo cierto es que existen proteínas que pueden exhibir un comportamiento un tanto más complejo [30,31]; para estas proteínas, ha sido

encontrado que sus termogramas son la suma de más de una transición parecida a la de la figura 2.1, lo que significa la presencia de intermediarios termodinámicamente estables en concentraciones apreciables.

Es importante señalar que desde el punto de vista termodinámico, el descubrimiento de la presencia de intermediarios estables en la desnaturalización de ciertas proteínas no ha significado la pérdida de validez del modelo de dos estados.

Recientemente ha sido acuñado el término de unidad de plegamiento cooperativo, el cual está definido formalmente como un elemento estructural que exhibe una transición de dos estados [32]. En el caso de proteínas globulares pequeñas, ha sido encontrado que la molécula en su totalidad se comporta como una sola unidad de plegamiento; evaluando la función de partición de estos sistemas, ha sido demostrado que, desde el punto de vista mecánico estadístico, los intermediarios parcialmente plegados son tan poco favorecidos, que sus fracciones nunca llegan a superar el 5% [04,27]³.

Para proteínas de mayor tamaño, en cambio, la función de partición puede quedar determinada por la contribución de intermediarios. No obstante, por las propiedades termodinámicas de estos intermediarios, ha sido propuesto que

←—————→
³ Aunque en espacios venideros nos detendremos para analizar las posibles causas moleculares de tal cooperatividad, quisiéramos adelantar aquí que una de las interpretaciones más aceptadas en la actualidad atribuye este fenómeno a las desventajas entrópicas que posee un intermediario parcialmente plegado al exponer al disolvente áreas apolares que permanecen insertas en la región que conserva la conformación nativa, y que son complementarias a las zonas expuestas del segmento de la cadena polipeptídica desplegado. Este último incrementa su entropía en una cantidad que no logra compensar la disminución de la zona complementaria [x].

éstos surgen de transiciones cooperativas [20,30,32]. Ello significa que proteínas complejas pueden estar constituidas por más de una unidad de plegamiento cooperativo, cada una de las cuales corresponde a una determinada zona estructural de la molécula.

Es claro que esta figura no rompe en absoluto con la noción del modelo de dos estados, puesto que los intermediarios son considerados como macroestados separados por transiciones fundamentales de unidades de plegamiento que sí se ciñen al modelo de dos estados [20].

Uno de los grandes atributos de evaluar la función de partición a partir del ΔH_p y la temperatura obtenidos caloriméricamente, es que da la flexibilidad para proponer el número de estados que llegan a ser poblados a lo largo de la transición [27].

Naturalmente, uno de los propósitos de este trabajo ha sido determinar, haciendo uso del formalismo termodinámico, el número de unidades de plegamiento que componen a la β -lg.

Aparte de la evaluación del ΔH_p y de la T_m asociada, un parámetro de alto interés por determinar es el ΔC_p . Al decirse de la desnaturalización de una proteína que es una transición de fase, se desprende, por la relación de Kirchoff, que el ΔC_p corresponde a la razón de cambio $(\partial \Delta H / \partial T)_p$, valor que ha sido tomado como constante para los intervalos de temperatura usualmente estudiados [27]. Visto de otra forma, el conocimiento del ΔC_p y de un solo par de datos de ΔH_p y de T_m que sirvan como referencia, nos permite predecir el $\Delta H_p(T)$ para cualquier temperatura [04,20]:

$$\Delta H_p(T) = \Delta H_p^* + \Delta C_p(T - T^*) \quad (9)$$

en donde los términos acompañados por un asterisco denotan los valores de referencia.

El cambio de energía libre ΔG está determinado por las relaciones termodinámicas convencionales

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (10)$$

De la ecuación (10) es obvio que para un proceso a presión constante de tan sólo dos estados, ΔG_p es igual a cero a la mitad de la transición (es decir, cuando $K=1$), por lo que

$$\Delta H_p(T_m) = T_m \Delta S_p(T_m) \quad (11)$$

usando la definición de ΔH_p dada por la relación de Kirchoff, e integrando desde T_m , es posible calcular el ΔS_p a cualquier temperatura

$$\Delta S_p(T) = \Delta S_p(T_m) + \Delta C_p \ln(T/T_m) \quad (12)$$

A partir de las ecuaciones (9) y (12), y simplemente conociendo los valores de referencia y el ΔC_p , es posible evaluar las propiedades termodinámicas de desnaturalización a cualquier temperatura [20]. Por la interpretación molecular que dimos de la forma de un termograma en términos de microestados no isoenergéticos, y postulando que las ecuaciones anteriores son lo suficientemente generales, puede hacerse uso de éstas para obtener la energética de los microestados que componen al estado nativo.

Al respecto de estos microestados, quisiéramos realizar una observación final. Por estudios que han sido hechos con diferentes proteínas, es sabido que, comúnmente, el ΔC_p toma valores de 0.5 a 4 kcal/mol [04]. Por otro lado, ha sido encontrado que el intervalo de

temperatura de desnaturalización puede ser de 20 a 30°C. Por tanto, al evaluar las ecuaciones (9) y (12) con estas magnitudes, se hace evidente que los microestados *no pueden ser isoenergéticos*.

De la figura 2.1, parecería como suficiente una sola determinación experimental para la caracterización termodinámica del proceso de desnaturalización de una proteína, puesto que, en principio, de un termograma es posible evaluar el ΔH_p , la T_m y el ΔC_p . Sin embargo, en la práctica, es muy incierta la determinación de este último parámetro a través de su medición directa en un solo termograma.

Una forma alternativa para lograr medir el ΔC_p es diseñando un conjunto de experimentos que permitan obtener datos para evaluar la función $(\partial \Delta H / \partial T)_p$. En la práctica, esto se logra evaluando el ΔH_p y la T_m de soluciones de proteína con diferente valor de pH [26].

§2.2. Desarrollo Experimental.

Materiales. Las variedades *A* y *B* de la β -lg utilizadas en el presente trabajo, fueron compradas a Sigma Chemical Co., bajo la presentación de producto que despliega esencialmente una banda por el método modificado de electroforesis en columna [95]. Salvo cuando se especifique otra cosa, la proteína fue disuelta en una solución amortiguadora de glicina 0.01M.

Pureza. Para corroborar la pureza de la proteína comercial, fueron practicadas pruebas cromatográficas de intercambio aniónico en una columna de carboximetilos TSK CM-3SW acoplada a

un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Millipore Waters 600E controlado a través de una estación de trabajo Maxima 820. La elución cromatográfica fue practicada con soluciones amortiguadoras de valores de pH cercanos a la neutralidad (fosfatos, 0.01M) y muy ácidos (glicina, 0.01M acidulada con HCl). La fuerza iónica fue variada con un gradiente salino lineal empleando una solución NaCl 1M preparado con el mismo eluyente. Fueron practicados diferentes programas de elución, modificando la tasa de cambio y el punto de mayor fuerza iónica.

Estado de Agregación. La determinación del estado de agregación de las dos variedades de la β -lg bajo diferentes condiciones de pH fue efectuada mediante cromatografía de filtración en gel con una columna TSK gel G2000SW acoplada al mismo cromatógrafo de líquidos utilizado en las determinaciones de pureza.

Bajo esta técnica, fueron obtenidas las constantes de distribución (k_d) —que dependen de los tiempos de retención— de varias proteínas patrón de masa molar conocida (ovoalbúmina (43.00 kDa), anhidrasa carbónica (29.00 kDa), mioglobina (16.95 kDa) y citocromo c (12.38 kDa)) [96]. La constante de distribución k_d es un valor normalizado de los tiempos de retención

$$k_d = \frac{t - t_{minr}}{t_{máxr} - t_{minr}} \quad (12)$$

en donde t es el tiempo de retención de la proteína, t_{minr} el tiempo en que tarda en recorrer el sistema una molécula que no es retenida en absoluto y $t_{máxr}$ es el tiempo de máxima retención [96]. Para determinar

t_{minr} fue utilizado dextrán azul y para $t_{máxr}$ tirosina.

El estado de agregación de la β -lg fue determinado a partir de la interpolación de la recta resultante de graficar la constante de distribución contra el logaritmo de la masa molar de las proteínas patrón (figura 2.2) [96].

Estas evaluaciones fueron realizadas a valores de pH de 7.0, 3.0, 2.0, 1.5 y 1.0.

Determinaciones Calorimétricas. Los ensayos para obtener los termogramas de desnaturalización de la β -lg A fueron realizados en un microcalorímetro diferencial de barrido Microcal MC-2. Cada determinación experimental consistió en la obtención de la curva de desnaturalización para un valor de pH determinado. El intervalo de pH de estudio fue de 0.6 a 3.0 unidades. La tasa de calentamiento para todos los experimentos fue de 60 Kmin^{-1} .

La colecta de datos fue lograda mediante el programa de cómputo DA-2 (Microcal Inc.).

A través de otro programa de cómputo, ORIGIN (Microcal Inc.), fue realizado el análisis de las curvas calorimétricas. Líneas base, obtenidas de barridos glicina-glicina, fueron restadas a los termogramas de desnaturalización de la proteína. Los termogramas fueron normalizados por concentración de proteína y volumen de la celda. El ΔC_p fue sustraído mediante líneas base progresivas en proporción al área bajo la curva. El ajuste del formalismo termodinámico basado en el modelo de dos estados (o, mejor dicho, en las unidades cooperativas de plegamiento) a los datos experimentales fue logrado mediante una regresión no lineal basada en el método de Levenberg-Marquardt [74]. Este método, en breve, consiste en la

linealización del modelo a través de una expansión de Taylor, de la cual tan sólo es tomado el primer término, y una variación iterativa y simultánea de los parámetros por determinar hasta lograr los valores con los cuales la distancia cuadrática media entre los datos estimados y experimentales resulta la mínima [74].

La concentración de proteína en solución fue determinada espectrofotométricamente con un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV160U, usando un coeficiente de extinción de $A_{278nm}^{1\%} = 0.96$ [89].

§2.4. Resultados y Discusión.

Pureza. Para las dos variedades de la β -lg, y en todos los valores de pH y programas de elución utilizados, el resultado del intercambio aniónico fue invariante: un solo pico de forma simétrica (datos no mostrados), por lo que concluimos que la pureza de la proteína bajo la presentación comercial que adquirimos es prácticamente del 100%.

Estado de Agregación. Hace aproximadamente tres décadas, fue realizada una serie de experimentos para determinar el estado de agregación de las dos principales variedades de la β -lg [72, 73]. Los resultados de estos experimentos, como lo mencionamos en el capítulo introductorio, indicaron que las dos variedades están en forma de dímero entre 2.0 y 3.5 unidades de pH [73], en tanto que sufren de una disociación total a sus formas monoméricas cuando el pH desciende de 2.0 [72].

Hasta donde es de nuestro saber, estos hallazgos no fueron sujetos de

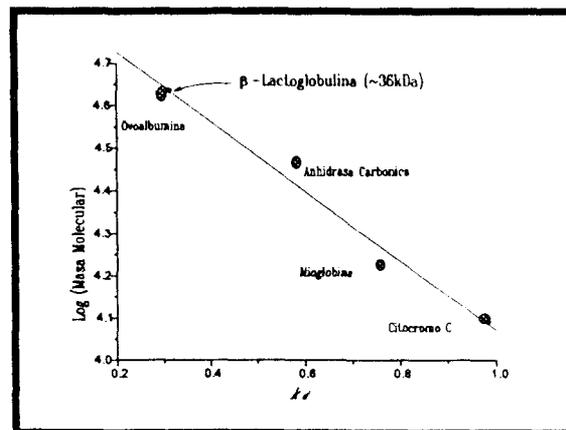


Figura 2.2. Por la interpolación de la recta obtenida por cromatografía de filtración en gel, fue determinado que el dímero es el estado de agregación dominante de las dos variedades de β -lg a valores de pH de 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 7.0. Ver el texto para detalles.

reconfirmación experimental por otro laboratorio.

En la figura 2.2 presentamos los resultados que obtuvimos por filtración en gel.

De acuerdo a lo dibujado en la figura 2.2, la β -lg es un dímero a pH de 1.5 (recuérdese que la masa molar del monómero es de ~18 kDa). En el capítulo siguiente, mostraremos que este resultado es consistente con los patrones de desnaturalización desplegados por la proteína por espectroscopía diferencial ultravioleta.

Los coeficientes de distribución obtenidos para las dos variedades en los otros valores de pH utilizados (pH = 1.0, 2.0, 3.0 y 7.0; datos no mostrados), también indicaron que es dimérico el estado de agregación dominante.

Condiciones de Concentración de Proteína. Existe un límite superior y uno inferior en cuanto a la concentración de proteína que es posible laborar para realizar una caracterización termodinámica del proceso de desnaturalización de una proteína. Estos límites, naturalmente, aparte de las

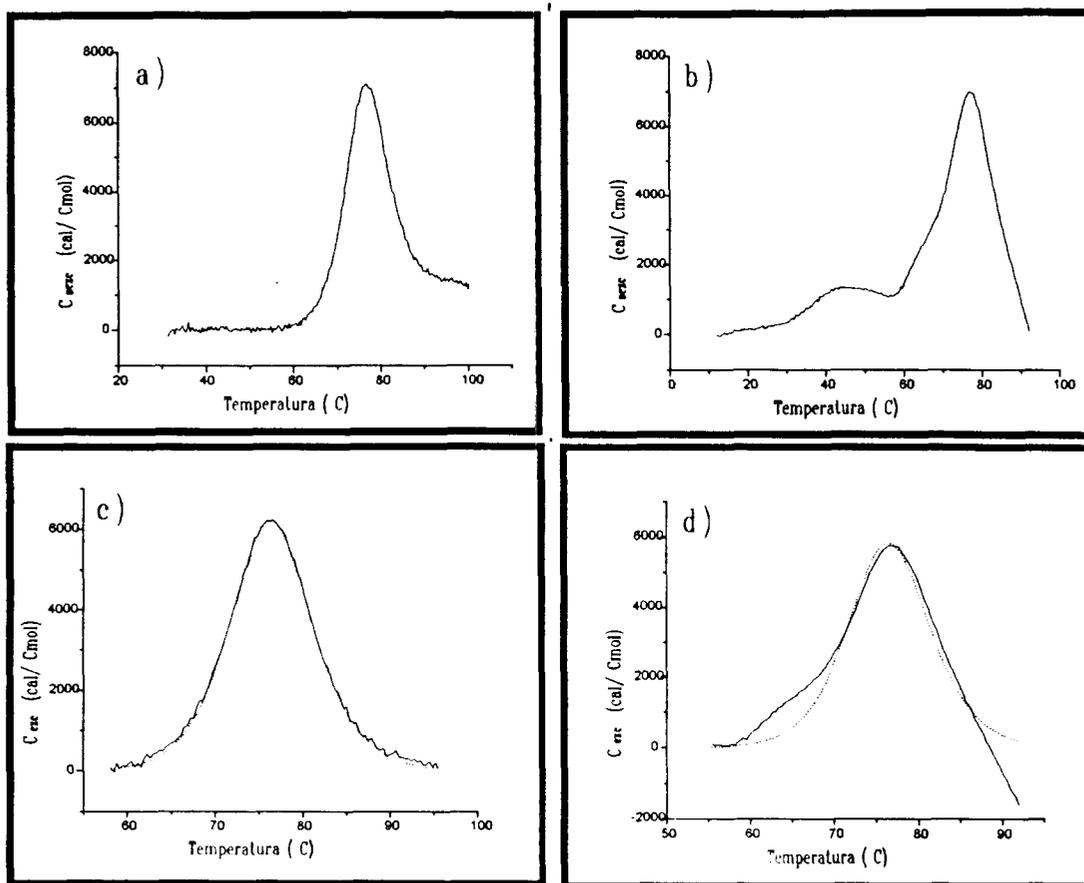


Figura 2.3. Termogramas obtenidos por CDB para la β -lg A con una concentración de proteína de 2.38 mg/ml (a) y 6.00 mg/ml (b). Las transiciones prominentes de ambos termogramas fueron aisladas, y sujetas a un análisis termodinámico. Las figuras (c) y (d) corresponden a la solución con menor y mayor concentración de proteína, respectivamente. El pH de la solución para ambos casos fue de 1.5.

dependen fundamentalmente de las propiedades fisicoquímicas de cada proteína.

El límite superior está generalmente determinado por la concentración crítica en la cual las interacciones intermoleculares comienzan a ser importantes, sobre todo entre cadenas parcial o totalmente desplegadas. En la figura 2.3 son mostradas curvas calorimétricas de la β -lg A evaluadas a un pH de 1.5. La figura 2.3a corresponde a una concentración de 2.38 mg/ml, en tanto que la 2.3b a una de 6.00 mg/ml. Las transiciones prominentes de estos termogramas fueron aisladas, y sujetas a un análisis termodinámico. Como puede ser observado de la figura 2.3c, para

concentraciones menores de proteína, la transición se ajusta muy satisfactoriamente a un modelo de dos estados, siendo la desviación estándar residual (DER) menor al 2% del valor del máximo del termograma. En cambio, en la figura 2.3d se observa que bajo las mismas condiciones experimentales, pero con una concentración de proteína superior, el ajuste resulta muy pobre.

En la literatura ha sido reportado que arriba de los 70°C la β -lg A comienza a sufrir un proceso de agregación debido al aumento de reactividad del único grupo sulfhidrilo libre de la molécula [97]. Siendo la formación de enlaces disulfuro y la asociación entre monómeros procesos exotérmicos, es muy probable que la

distorsión que se observa en la zona derecha de la curva 2.3d se deba al fenómeno de agregación.

Ahora bien, este fenómeno de agregación, irreversible para las condiciones de estudio aquí empleadas, es un proceso de naturaleza cinética. Por ende, el grado de manifestación del fenómeno depende de dos factores: el tiempo de incubación y la concentración del reactivo. Para todas las condiciones de pH estudiadas y utilizando siempre la misma tasa de calentamiento ($60^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$), fue encontrado que la manifestación del efecto de agregación fue prácticamente imperceptible en tanto la concentración de proteína no superara los 5 mg/ml. Para estos casos, la DER resultante del ajuste termodinámico de la transición principal nunca fue superior al 5% del máximo en el calor de exceso (tabla 2.1).

Por otro lado, los experimentos realizados con soluciones de concentración de proteína menor que 2 mg/ml presentaron un cociente señal/ruido desfavorable para realizar determinaciones experimentales precisas, de manera que tomamos a este valor como el límite inferior de los ensayos calorimétricos aquí presentados.

Reversibilidad. El proceso de desnaturalización de la β -lg A resultó parcialmente reversible. Tomando como índice al área del termograma, se encontró un reversibilidad de alrededor de 50% para soluciones de proteínas de concentración menor que 5 mg/ml, y prácticamente nula para las de concentración superior.

Número de Unidades Cooperativas de Plegamiento. Utilizando bajas concentraciones de proteína (< 5 mg/ml), los termogramas de desnaturalización

consistieron de tan sólo una transición aparente (figura 2.3a). Al ser ésta aislada y analizada mediante el procedimiento termodinámico delineado anteriormente, encontramos que la curva puede ser reproducida satisfactoriamente con un modelo de exclusivamente dos estados utilizando la concentración de proteína referida al monómero. En otras palabras, de estos datos pareciera evidente que la β -lg A está constituida por tan solamente una unidad de plegamiento cooperativo.

Sin embargo, cuando fueron analizadas soluciones con mayores concentraciones de proteína, los termogramas desplegaron, adicionalmente, un pico de absorción pequeño y ancho, centrado alrededor de los 45°C (figura 2.3b), al cual no fue posible ajustar un modelo de dos estados: como muestra la figura 2.4, con respecto a la forma que desplegaría una transición de dos estados, el pico obtenido resultó muy alto y angosto.

Una explicación plausible al respecto del origen de esta asimetría puede ser sentada en efectos de orden cinético. Como ya hemos indicado, el formalismo termodinámico ocupado aquí está desarrollado para sistemas en el equilibrio. Sin embargo, si el experimento fuera practicado en condiciones en las que no se permitiera alcanzar el equilibrio (por ejemplo, si la tasa de calentamiento fuera muy alta), sería de esperarse que las proporciones del pico fueran diferentes a las de uno que correspondiera a una transición en el equilibrio. De hecho, para un calentamiento rápido, el pico resultante sería de proporciones similares a las del termograma de la figura 2.4. En este caso, la interconversión inicial entre las dos fases sería muy lenta, por lo que a bajas temperaturas se observaría una absorción de calor menor a la consumida si el

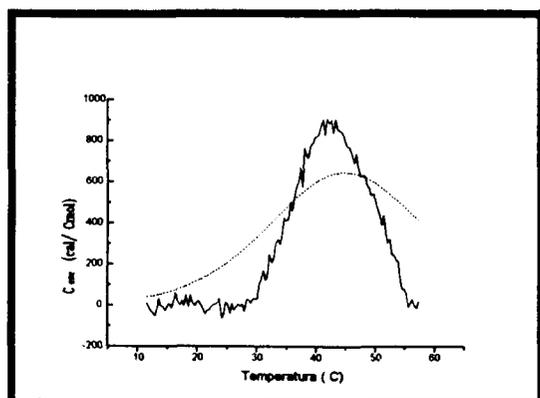


Figura 2.4. Transición de baja temperatura exhibida por la β -Ig A cuando la concentración de proteína excedía los 5 mg/ml. La línea discontinua representa el modelo de mejor ajuste.

calentamiento fuera más lento. Al ser aumentada progresivamente la temperatura, habría un "rezago" de moléculas que no han sufrido la transición; al ser lograda la temperatura de Arrhenius, se desencadenaría una rápida conversión molecular, generándose, por ende, un pico de absorción de calor alto y angosto.

Tomando en cuenta las propiedades en solución de la β -Ig A, existen dos posibles causas moleculares de la transición observada a bajas temperaturas.

Una causa podría ser que se produzca la disociación del dímero. Si esta suposición es cierta, el área bajo la curva correspondería a la energía de contacto de los monómeros, la cual resultó de 13,317 cal.

Por otro lado, el fenómeno podría ser el resultado de una transición conformacional, una transición que, a juzgar por el ancho del intervalo en el que ocurre y por el total del área bajo la curva, debe corresponder a un proceso poco cooperativo. Como lo discutiremos en el siguiente capítulo a la luz de datos espectroscópicos, es probable que al menos parte de la energía del pico ubicado a bajas temperaturas se deba a la transición del estado nativo a un intermediario parcialmente plegado. Naturalmente, este hecho no corresponde

con la idea de cooperatividad que se tiene de las proteínas globulares, pero, sin embargo, como lo discutiremos más adelante, su ocurrencia es sustentable en la topología "atípica" de la β -Ig.

Interdependencia de los Parámetros pH - T_m - ΔH_p . Los resultados de las determinaciones calorimétricas obtenidas a diferentes valores de pH son compendiados en la figura 2.5 y en la tabla 2.1. Las relaciones dibujadas en esta figura marcan claramente tres tipos de tendencias. La primera, ubicada entre 0.6 y 1.6 unidades de pH, señala una variación prácticamente nula de la T_m y el ΔH_p con respecto al pH (figuras 2.5b y c). La segunda tendencia corresponde a una variación directamente proporcional tanto de la T_m como del ΔH_p con respecto al pH. La tercera consiste en un decremento del ΔH_p en tanto aumenta la T_m (figura 2.5a). Esta última tendencia se presenta en el intervalo de 2.4 a 3.0 unidades de pH (figuras 2.5b y c).

Procedamos a analizar cada una de las tendencias por separado.

Tendencia I: $0.6 \leq pH \leq 1.6$

Cualitativamente, el valor de T_m ha sido tomado como un reflejo de la estabilidad estructural [11]. Por otro lado, ha sido observado que en tanto el pH cambia hacia valores extremos, la T_m disminuye paulatinamente [04], por lo que ha resultado claro que existe una dependencia estrecha entre la estabilidad estructural y el estado de protonación o desprotonación de los grupos químicos que componen la cadena polipeptídica. Sin embargo, aún no existe una explicación consensuada sobre los mecanismos de desestabilización estructural, por lo que las razones moleculares de la dependencia de la estabilidad de la conformación nativa

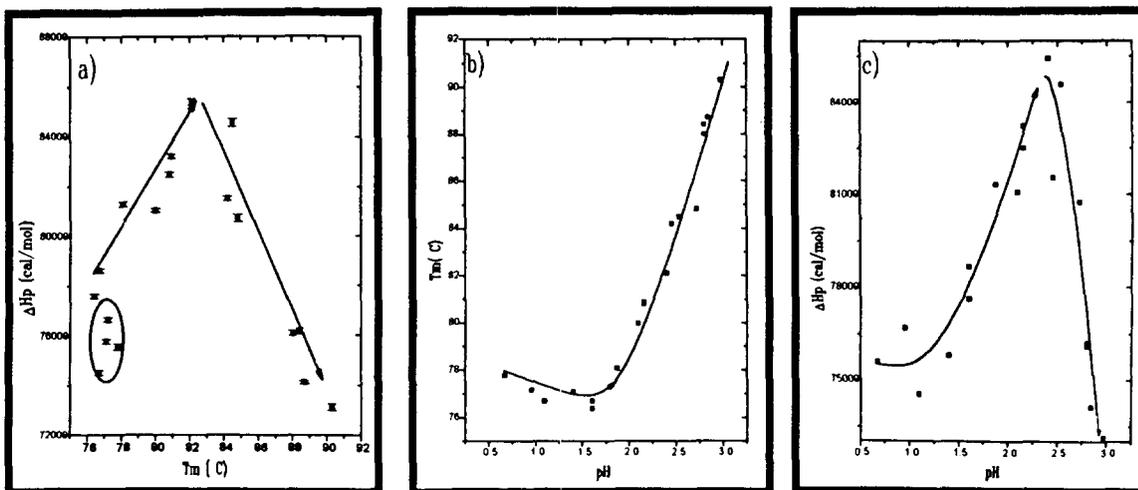


Figura 2.5. Interdependencia de los parámetros de desnaturalización térmica de la β -Ig A y del pH de la solución. El sistema amortiguador empleado fue glicina 0.01M. La concentración de proteína nunca excedió los 5 mg/ml. Determinaciones realizadas mediante un CDB.

de una proteína con respecto al pH siguen siendo inciertas.

Freire ha propuesto que la variación de la T_m con respecto al pH es explicable en términos de una diferencia en el potencial de la constante de acidez (pK_a) que presentan los grupos químicos dependiendo si la proteína está plegada o desplegada [39, 98]. Desde este punto de vista, el pH actúa a través de la modificación de la proporción de moléculas que se protonan o desprotonan en tanto la proteína transita de un macroestado a otro, lo cual implica un cambio en la energía total generada o consumida por la captura o liberación de iones hidronio, energía que, finalmente, redundará en una disminución o aumento de la entalpía de desnaturalización [39].

Una explicación alternativa ha sido radicada en los efectos de repulsión electrostática o de ruptura de interacciones polares generados por la protonación de los residuos [11]. La transición del pH a valores muy ácidos conllevaría a la protonación de grupos que, como las aminas, al quedar cargadas positivamente, generen un campo electrostático local susceptible de ser repelido por otras cargas, significándose

así una desestabilización de la estructura nativa. Un caso adicional puede resultar de la protonación de grupos como los carboxilo, lo cual podría implicar la desaparición de interacciones de van der Waals o de puentes de hidrógeno.

Aunque la propuesta anterior había sido formulada desde hacía ya varias décadas, sólo hasta recientemente ha sido realizada una serie de experimentos muy reveladores al respecto del papel de las interacciones electrostáticas en la estabilidad de la proteína. Goto *et al.* [99-101] encontraron para tres proteínas, que si a sus formas desnaturalizadas por pH se les continúa acidulando el medio, llega un punto en el cual ocurre una "renaturalización parcial", adquiriéndose una conformación del tipo glóbulo fundido. Por otro lado, detectaron que el fenómeno de replegamiento ocurre si en lugar de adicionar el ácido (HCl), se hace uso de la sal del mismo ácido (KCl). Los autores reportaron datos similares utilizando otros ácidos y sus correspondientes sales, por lo que resultó evidente el papel de los aniones en el replegamiento.

pH	T_m (°C)	ΔH_p (cal/mol)	DER (cal)
0.67	77.8	75,580	121
0.95	77.2	76,676	98
1.09	76.7	74,530	89
1.40	77.1	75,806	87
1.50	76.9	76970	94
1.60	76.4	77,618	89
1.60	76.7	78,649	88
1.87	78.1	81,310	97
2.09	80.0	81,064	68
2.15	80.8	82,498	99
2.15	80.9	83,220	88
2.40	82.1	85,431	128
2.45	84.2	81,534	93
2.53	84.5	84,581	160
2.72	84.8	80,737	147
2.80	88.0	76,104	108
2.80	88.4	76,186	112
2.84	88.7	74,136	64
2.97	90.3	73,140	144

Tabla 2.1. Resultados de las determinaciones calorimétricas de desnaturalización térmica para la β -lg A logrados mediante un CDB.

De acuerdo a los hallazgos de Goto *et al.*, el efecto fundamental de los aniones es a través de la unión directa a grupos cargados positivamente [101], de lo que se deduce que la desnaturalización por ácido se efectúa por el incremento de la repulsión entre cargas positivas en la estructura nativa.

Estas observaciones, aunque no se traducen en evidencias directas sobre la variación paulatina de la estabilidad estructural con respecto al pH, nos autorizan a especular que el fenómeno también se pueda deber a efectos de repulsión electrostática.

Naturalmente, las hipótesis planteadas por Goto y por Freire no son mutuamente excluyentes, y cabe pensar que el fenómeno de desestabilización de la

estructura proteica por parte del pH sea tan complejo, que las tendencias observadas puedan ser el producto tanto de la repulsión electrostática como de las diferencias en las constantes de acidez.

Con base en estas dos aproximaciones cualitativas al fenómeno, podemos ahora tratar de explicar los comportamientos obtenidos para la β -lg.

En la figura 2.5b, en donde se muestra la dependencia de la T_m con respecto al pH, se despliegan dos tipos de tendencias. Arriba de 1.6 unidades, la T_m aumenta en forma directamente proporcional al incremento de pH; de esta tendencia hablaremos poco más adelante. En cambio, abajo de 1.6, se observa una ruptura de la dependencia de la T_m con respecto al pH. Es de interés señalar que tal fenómeno había sido observado por Privalov, pero exclusivamente en regiones alcalinas [30]; hasta donde es de nuestro saber, no ha sido reportado previamente para zonas ácidas.

En términos de la hipótesis de Goto y sus colaboradores, podríamos interpretar el evento postulando que a valores de pH menores que 1.6, prácticamente todos los grupos susceptibles de protonación de la molécula lo han sido, por lo que la adición de mayor número de protones al medio no afecta sensiblemente la estabilidad de la proteína.

Por otro lado, nosotros observamos que por debajo de 0.6 de pH, la proteína pasa al estado desnaturalizado, por lo que cabría esperar que bajo esas condiciones comiencen a protonarse algunos otros grupos que contribuyan con la repulsión necesaria para superar la precaria estabilidad de la conformación nativa, o bien, se logre una estabilización adicional del estado desnaturalizado.

La hipótesis de Freire establecería que los valores de pK_a de la mayoría de los

grupos químicos tanto en el estado nativo como en el desnaturalizado son superiores a 1.6, de manera que por debajo de ese valor de pH la adición de más protones al medio no se traduce en algún cambio en el grado de protonación del estado nativo o el desnaturalizado.

Sin embargo, ambas interpretaciones parecen ser no del todo consistentes —o suficientes— con los comportamientos delineados en la figura 2.5a. En la parte inferior izquierda de esta figura, existe un "cúmulo" de puntos experimentales que corresponde a las magnitudes de T_m y a los ΔH_p obtenidos bajo condiciones de pH menor que 1.6 unidades. De acuerdo, por un lado, a lo que se desprende de las hipótesis tanto de Goto como de Freire, y, por otro lado, de las observaciones realizadas para otras proteínas, sería de esperar que bajo cualquier circunstancia de pH no desnaturalizante, la estabilidad de la proteína se apegue a un "comportamiento global" caracterizado por la función de Kirchoff (*i.e.*, que la magnitud del ΔH_p sea determinado por el valor de la T_m , teniendo como constante de proporcionalidad el ΔC_p). De la figura 2.5a podemos suponer ese "comportamiento global" como el desplegado entre 1.6 y 2.4 unidades de pH, en donde la variación de ΔH_p es directamente proporcional a la de T_m . (Pedimos al lector que, por el momento, haga caso omiso a la tendencia observada más allá de 2.4 unidades de pH; más adelante atenderemos el punto detenidamente, mas su consideración en este espacio complicaría innecesariamente la discusión actual). Por la gráfica 2.5a, es claro que los valores obtenidos experimentalmente para $pH < 1.6$ no corresponden a los derivados de extrapolar el comportamiento de $1.6 < pH < 2.4$. Pareciera como si para estos valores el valor del ΔC_p

hubiera cambiado sensiblemente; en otras palabras, pareciera que la proteína hubiera sufrido en la susodicha zona de pH algún tipo de perturbación molecular adicional a las estipuladas por Freire y Goto.

Para tratar de dilucidar información sobre posibles cambios estructurales de la β -lg A al descender el pH más allá de 1.6 unidades, obtuvimos el espectro de dicroísmo circular de la proteína en las regiones del ultravioleta lejano y del cercano. El fundamento de esta técnica lo detallaremos en el siguiente capítulo, así como los particulares de las condiciones experimentales y del instrumental ocupado. Aquí tan sólo quisiéramos adelantar que dicha técnica permite obtener dos tipos de información estructural:

1) En la región del ultravioleta lejano, la señal de dicroísmo circular es debida principalmente al tipo de conformación de los enlaces peptídicos; existen fuertes evidencias de que las propiedades espectrales específicas de cada molécula dependen primordialmente de su contenido en estructura secundaria [55].

2) En la región del ultravioleta cercano, la señal es producida por los residuos aromáticos; esta señal está íntimamente relacionada con la asimetría del ambiente de los cromóforos, la cual es específica para cada proteína, al grado de que el espectro obtenido puede ser considerado como una "huella digital" de la molécula [102].

En la figura 2.6 mostramos los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano y en el cercano de la β -lg. Las mediciones fueron realizadas bajo dos diferentes valores de pH: uno por debajo de 1.6, y otro en un pH cercano a 2.0, en donde la interrelación de los parámetros termodinámicos se ciñe a la obtenida en general para las proteínas

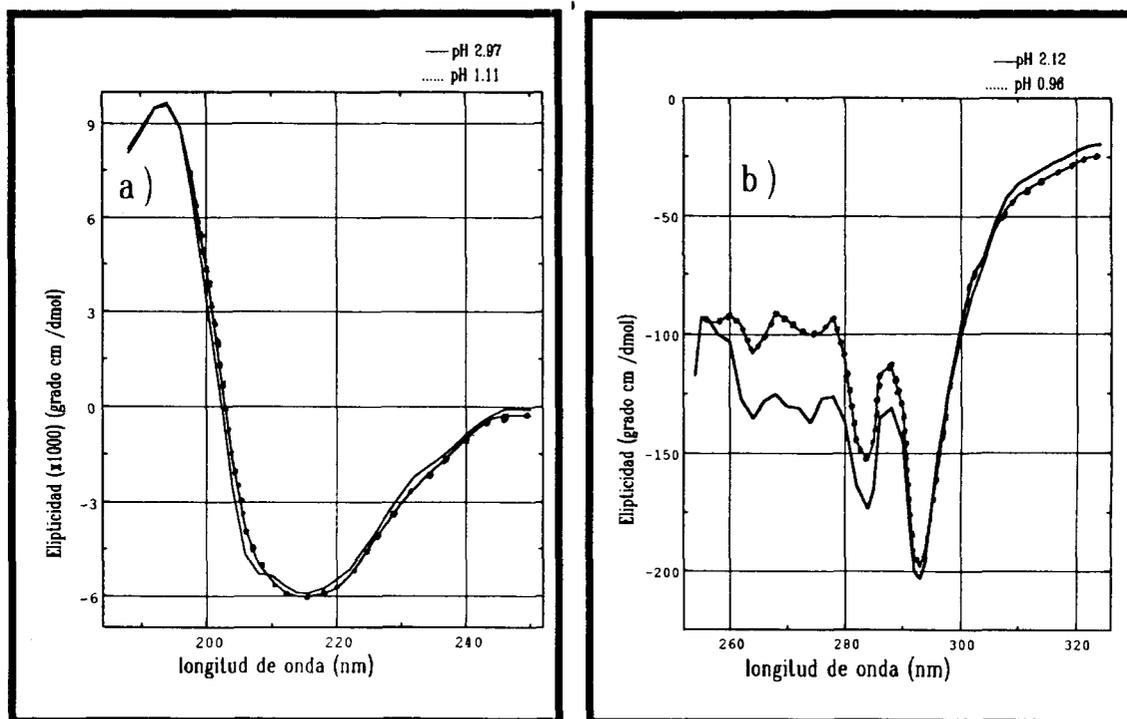


Figura 2.6. Espectros de dicroísmo circular de la β -IgA en el UV lejano (a) y en el cercano (b). Las determinaciones fueron realizadas a valores de pH menor (....) y mayor (—) que 1.6 unidades.

globulares. La figura 2.6a muestra que la proteína no sufre mayor alteración en cuanto al contenido de estructura secundaria de variar el pH de 2.1 a 0.9 unidades; mas, por otro lado, en la figura 2.6b es evidente que el ambiente de los cromóforos aromáticos sufre un cambio notable en tal transición.

El dicroísmo circular es una técnica cuya señal resulta de la actividad óptica de las moléculas; por ende, ello significaría que los grupos aromáticos, al no poseer centros quirales, no deberían dar señal por esta técnica. Sin embargo, se sabe que la absorción quirodependiente de estos cromóforos es debida a la conjugación de dos factores: la asimetría del entorno del grupo y la libertad de rotación de la cadena lateral. Se espera que un residuo aromático ambientado en un entorno asimétrico despliegue señal, siempre y cuando el cromóforo no tenga gran libertad de rotación; en el caso contrario,

el libre movimiento ocasionaría la cancelación de la señales de diferentes conformeros [102].

La disminución en la intensidad de las bandas de dicroísmo circular en la región del ultravioleta cercano al disminuir el pH puede ser motivada, de acuerdo a lo señalado en el párrafo anterior, a la pérdida de la asimetría del ambiente o a la ganancia de grados de libertad de los residuos aromáticos. Conjuntando el hecho de que la estructura secundaria no sufre mayores alteraciones (figura 2.6a), la interpretación más plausible del cambio en la intensidad de absorción en el ultravioleta cercano (figura 2.6b) es que sea debida a un "relajamiento estructural" de la proteína, de manera que los cromóforos ganan mayor libertad de rotación.

En términos estructurales, las evidencias portadas por la figura 2.6 sugieren que en la transición a zonas de

pH muy ácido, la β -lg A sufre una transformación de estructura terciaria sin alteraciones significantes en la secundaria, lo cual corresponde con la figura que se tiene de un glóbulo fundido [21]. Por otro lado, también es sabido de un glóbulo fundido que puede poseer un núcleo hidrofóbico afectado parcialmente con respecto a la integridad de la estructura nativa: para el caso de la β -lg A, este aspecto es evidente en la figura 2.5a.

Cabe la mención de que este hallazgo, hasta el momento, no ha sido reportado por algún otro laboratorio. Para esta proteína, ha sido detectado un intermediario cinético que coincide también con la imagen estructural que se tiene de un glóbulo fundido [114,115].

Tendencia II: $1.6 \leq \text{pH} \leq 2.4$. El ΔC_p de desnaturalización de una proteína globular que posee núcleo hidrofóbico siempre es positivo. (Como hemos mencionado anteriormente, la razón de ello es la formación de clatratos alrededor de los residuos hidrofóbicos que se exponen al disolvente una vez que la cadena polipeptídica se despliega). Por tanto, de acuerdo a las relaciones termodinámicas antes descritas, es de esperarse que la variación de ΔH_p ocurra en el mismo sentido que la variación de la T_m . Este comportamiento "canónico" es el que observa el β -lg A en el intervalo de pH de 1.6 a 2.4 (figura 2.5a y c).

En la figura 2.7 son mostradas las tendencias de desnaturalización obtenidas por Privalov y sus colaboradores para un conjunto de proteínas de naturaleza estructural muy diversa [04,26]. Nótese que, en este caso, no está siendo considerado el ΔH_p molar, sino el específico o por unidad de masa (Δh_p). Adicionalmente, en la figura presentamos los resultados obtenidos para dos

lipocalinas: los logrados en este trabajo para la β -lg A y los de la GPA α_1 [44].

Al tratar de determinar qué parámetro estructural se correlacionaba de la mejor manera con los ΔC_p de las diferentes proteínas, Privalov *et al.* encontraron que la mejor interrelación se daba con el número de contactos apolares por gramo de proteína (n_p), mostrando una correlación estadísticamente significativa (figura 2.8). (Más tarde, merced a observaciones estructurales más detalla-

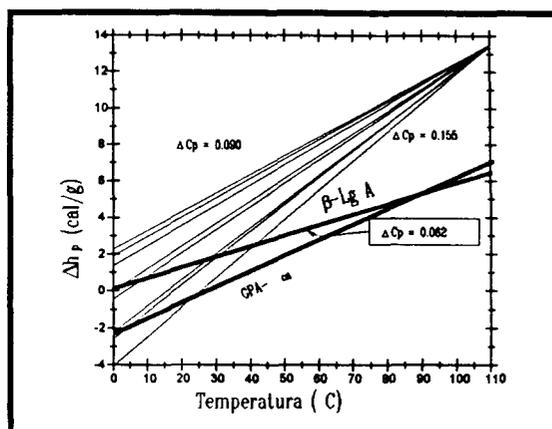


Figura 2.7. Dependencia de la entalpía de desnaturalización (por gramo de proteína) con respecto a la temperatura. Gráfico adaptado de [04] Se presentan la tendencia obtenida para la β -lg A en este trabajo y la de la GPA α_1

das, a estudios con compuestos modelo [94] y a mediciones directas del ΔC_p real [29], quedó claro que el valor de este parámetro no está determinado por los contactos hidrofóbicos, sino que se correlaciona mejor con el área oculta al disolvente; por otro lado, se cayó en la cuenta de que el ΔC_p real recibe no sólo la contribución positiva del área hidrofóbica, sino también una negativa debida al área polar [28]).

Un punto más de alta importancia que Privalov y sus colaboradores encontraron fue que existe una temperatura (T^*) en la cual el Δh_p de diferentes proteínas converge a un mismo valor Δh_p^* (figura

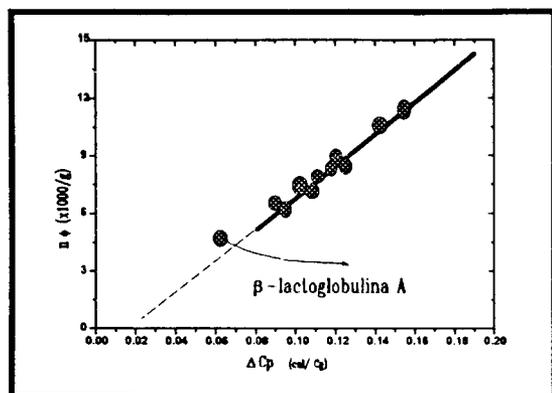


Figura 2.8. Relación entre el número de puentes de hidrógeno por unidad de masa (n_H) y el ΔC_p específico. Adaptado de [04].

2.7). En búsqueda de un elemento estructural común, los autores encontraron que el número de puentes de hidrógeno por unidad de masa permanecía prácticamente invariante. La interpretación molecular brindada para este fenómeno consistió en suponer que a T^* , el efecto hidrofóbico llega a ser nulo (esto es, que no existen efectos entrópicos y entálpicos debido a la exposición de grupos apolares, puesto que no se da la formación de clatratos), por lo que a esa temperatura la estabilización de la proteína corre a cuenta, en primera aproximación, sólo de los puentes de hidrógeno. Por tanto, el valor de Δhp^* fue tomado como una medida directa del valor energético de los puentes de hidrógeno, magnitud que fue evaluada en 1.7 kcal/mol de puente. Según esta hipótesis, abajo de esta temperatura el efecto hidrofóbico sí se manifiesta, por lo que el Δhp de las diferentes proteínas comienza a divergir.

El valor preciso de la T^* y de su respectivo Δhp^* es en la actualidad materia de controversia. Las determinaciones de mayor aceptación, estipulan una temperatura de convergencia de alrededor de 100.2°C [31]. Para la discusión presente, nosotros haremos referencia

fundamentalmente a los valores propuestos por Privalov y sus colaboradores.

Una de las suposiciones más fuertes que han prohiado los partidarios del modelo de dos estados, es que existen propiedades comunes para todas las proteínas que trascienden el tipo de conformación estructural [98]. Dos de estos atributos son la densidad de puentes de hidrógeno y el valor del ΔC_p en función de la proporción de área hidrofóbica e hidrofílica del área total no expuesta [98].

De ser lo anterior correcto, sería de esperarse que todas las proteínas convergieran en una misma T^* con un valor común de Δhp^* . En la figura 2.7 es evidente que esto no es el caso con la β -lg A y la GPA α_1 .

Sin embargo, este resultado "anómalo" pudiera quizá ser explicado postulando que las características estructurales "particulares" de estas lipocalinas provocan que sus valores de T^* y Δhp^* se alejen del del resto de las proteínas. Debemos recordar que, a diferencia de las otras proteínas globulares, las lipocalinas poseen estructuras no compactas. La propiedad de poseer una estructura con una cavidad interna, podría implicar que la densidad de puentes de hidrógeno por gramo de proteína sea menor a la de una proteína de la misma composición pero de estructura más compacta. Por tanto, si fuera cierta la existencia de una T^* universal con un valor común de Δhp^* , sería de esperarse que al ser corregido por un factor que homologue las densidades de puentes de hidrógeno, el valor de Δhp obtenido para la β -lg A debería acercarse al valor de las otras proteínas.

En el análisis de la estructura de una proteína, existen dos criterios para considerar cuándo existe o no un puente de hidrógeno de energía "significativa": la

distancia entre los átomos enlazantes y el alineamiento entre los mismos. Infortunadamente, los valores de estos parámetros son inciertos de definir, por lo que la contabilización de puentes para la misma proteína puede variar de un autor a otro. Para determinar el número de puentes de hidrógeno en la β -lg A, ocupamos inicialmente como restricción una distancia de 4 Å entre los dos átomos electronegativos (la misma ocupada por Privalov) y un ángulo de distorsión máxima de $\pm 35^\circ$ (Privalov no especifica tal valor). Obtuvimos un total de 44 puentes por molécula, lo que equivale a 0.002413 moles de puentes por gramo de proteína. El intervalo para esta densidad encontrado por Privalov fue de 0.005956 a 0.007430. Tomando los límites superior e inferior de este intervalo, el factor para homologar la densidad de puentes de la β -lg A sería de 3.079 y de 2.468, respectivamente. Si el factor menor lo aplicamos al Δhp evaluado a 110°C para la β -lg A, obtenemos un valor de 16 cal/g. El reportado por Privalov para el resto de proteínas es de alrededor de 13 cal/g.

Aunque aparentemente no existe una buena concordancia entre el Δhp evaluado a 110°C de la β -lg A y el del resto de las proteínas, debemos hacer mención especial de la incertidumbre que corre en la cuenta del número de puentes de hidrógeno. Por ejemplo, si nosotros aumentáramos en tan sólo cinco grados el ángulo de torsión previamente establecido, obtendríamos un total de 58 puentes de hidrógeno por molécula, lo que derivaría en un Δhp^* corregido de aproximadamente 12 cal/g.

En otras palabras, desde esta perspectiva es muy difícil entrever si una proteína globular no compacta posee atributos termodinámicos semejantes o discrepantes con respecto a los de las

proteínas más compactas. Vale mencionar que dirimir esta interrogante no es un punto trivial, puesto que implica encontrar evidencias a favor o en contra de dos propiedades de alto interés: ¿existen realmente propiedades de las proteínas que trascienden la estructura globular? ¿el valor energético de los puentes de hidrógeno es, en promedio, el mismo, independientemente de la constante dieléctrica del medio? Si pudiéramos descontar tantas incertidumbres, sin duda la β -lg, por ser una proteína muy disímil al resto de proteínas estudiadas por Privalov, sería una buena candidata para dar luz a tales interrogantes.

El ΔCp derivado de la β -lg A en el intervalo de pH de 1.6 a 2.4 es de 0.0619 cal/°Kg (1130 cal/°Kmol), valor que resulta bajo con respecto al de otras proteínas (figura 2.7). De igual manera, la GPA α_1 también ostenta un ΔCp que sale de la generalidad⁴. Nuevamente, estos casos de excepción pueden ser imputados al menor grado de empaquetamiento de las lipocalinas. En contraste con el caso del valor de Δhp^* , para el del ΔCp no se precisaría alguna corrección. Simplemente, de ser correcto que las propiedades termodinámicas de una proteína trascienden el tipo de arquitectura, el valor del ΔCp específico de la β -lg A y su correspondiente densidad de contactos hidrofóbicos debería de ajustarse a la tendencia descrita por otras proteínas. Como puede ser observado en la figura 2.8, tal parece ser el caso.

Para terminar esta sección, queremos mencionar que hicimos un intento de evaluar el ΔCp de la β -lg A a través del computo del área polar y apolar oculta al disolvente. Murphy y Gill [94], a través

⁴ Aunque este último valor es más incierto, puesto que fue derivado de datos espectroscópicos [45], es lo suficientemente confiable para suponer que el ΔCp de la GPA α_1 comparte atributos semejantes a los de la β -lg A.

del estudio con dipéptidos cíclicos, encontraron que la contribución al ΔC_p total por unidad de área polar oculta es de $-0.26 \text{ cal mol}/\text{Å}^2$, y la del área apolar oculta de $0.45 \text{ cal mol}/\text{Å}^2$. Nosotros encontramos que la β -lg posee 10026 Å^2 de área apolar oculta y 5563 Å^2 de área polar oculta. De estos valores, siguiendo el método de Freire *et al.* [98], se obtendría un ΔC_p estimado de $3065 \text{ cal}/^\circ\text{Kmol}$, magnitud que está desproporcionada en relación al valor experimental que nosotros obtuvimos ($\sim 1130 \text{ cal}/^\circ\text{Kmol}$). Nos proponemos en un futuro cercano realizar una revisión meticulosa de nuestro algoritmo, esperando que con el método de Freire podamos derivar información más confiable sobre el valor esperado de ΔC_p en función de la estructura tridimensional de la β -lg.

Tendencia III: $2.4 \leq \text{pH} \leq 3.0$.

Hemos mencionado ya algunas propiedades exhibidas por la β -lg A que le hacen alejarse de ser un prototipo en cuanto a patrones de desnaturalización térmica se refiere: una transición de baja energía que muestra distorsiones de orden cinético cuando es usada una tasa de calentamiento que es adecuada para la mayoría de proteínas, e incluso lenta para algunas otras; en determinada zona *ácida* de pH la T_m no sufre cambios con la variación de la concentración de protones, fenómeno que puede ser debido a que la proteína adquiere en tales condiciones la conformación de glóbulo fundido; un ΔC_p inusualmente pequeño; un valor de ΔH_p a 110°C inferior al del resto de las proteínas; y una T^* que es diferente al de las proteínas globulares compactas, y que, probablemente, sea característica propia del grupo de las lipocalinas.

Sin embargo, a pesar de ser ya varias las *peculiaridades* que hemos mencionado, todavía nos queda por describir los hallazgos más "atípicos" que obtuvimos para la β -lg A.

Uno de estos hallazgos corresponde a la tendencia desplegada en el intervalo de pH de 2.4 a 3.0 unidades. Como puede ser observado en la figura 2.5, en este intervalo de pH el ΔC_p aparente es negativo, hecho jamás detectado para otra proteína.

Debemos adelantar tres observaciones relacionadas con los resultados que muestran un ΔC_p aparente negativo, que resultan fundamentales para dar paso a la interpretación de este fenómeno:

- 1) El ajuste de la curva de transición a un modelo de dos estados siguió siendo muy satisfactorio;
- 2) La variación de la T_m con respecto al pH continuó la misma tendencia que la observada en el pH de 1.6 a 2.4 (figura 2.5b); y
- 3) El ΔC_p real de la solución (es decir, el observado en un termograma como el de la figura 2.1) fue siempre positivo.

De entrada, estas observaciones sugieren que en la zona de pH de 2.4 a 3.0, la conformación nativa (punto 2) y el mecanismo de desplegamiento de la β -lg A (puntos 1 y 3) no sufren alguna perturbación dramática —con respecto a los que ostenta en el intervalo de 1.6 a 2.4— a la cual pudiera serle atribuida la aparición de un ΔC_p negativo. Por tanto, la primera suposición que cabe hacer es que después de 2.4 unidades de pH, al comportamiento "canónico" de desnaturalización de la β -lg A se le agrega algún proceso *adicional* que está involucrado con el estado de protonación de algún (o algunos) grupos químicos de la molécula. De ser éste el caso, el ΔH_p

aparente ($\Delta H_p(pH, T)$) estaría determinado por la suma de dos contribuciones:

$$d\Delta H_p(pH, T) = \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_{pH} dT + \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial pH} \right)_T dpH \quad (14)$$

El primer término de la ecuación (14) corresponde a la variación de la entalpía con respecto a la temperatura, el cual, al suponerlo independiente del segundo término, adquiriría simplemente la forma de la relación de Kirchoff:

$$\Delta H_p(T) = \Delta C_p \Delta T \quad (15)$$

siendo la parte derecha de la ecuación (15) equivalente a la tendencia desplegada por la β -lg A en el intervalo de 1.6 a 2.4 unidades de pH (figura 2.5).

Por otro lado, el segundo término de la ecuación (14) implica la dependencia del ΔH_p con respecto al pH. El modelo más simple para describir este comportamiento, estribaría en suponer que la protonación de sólo un grupo químico contribuye al $\Delta H_p(pH, T)$, y que esta contribución es función del grado de protonación del grupo:

$$\int \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial pH} \right)_T dpH \approx \Delta H_1 f_{aa^+} \quad (16)$$

en donde ΔH_1 es la entalpía de desprotonación y f_{aa^+} es la fracción de moléculas desprotonadas del aminoácido en cuestión.

Como para cualquier reacción de titulación de un grupo monoprótico, podemos definir la constante de acidez como:

$$Ka = \frac{[aa^+][H^+]}{[aaH]} \quad (17)$$

Al dividir las concentraciones de aminoácido desprotonado $[aa^+]$ y protonado $[aaH]$ entre la concentración total de proteína, la ecuación quedaría expresada en términos de las respectivas fracciones molares:

$$Ka = \frac{f_{aa^+}[H^+]}{f_{aaH}} \quad (18)$$

Tomando las definiciones convencionales de pH, pKa , y estableciendo que

$$f_{aa^+} + f_{aaH} = 1 \quad (19)$$

se llega a la expresión

$$10^{pH - pKa} = \frac{f_{aa^+}}{1 - f_{aa^+}} \quad (20)$$

la cual, al ser rearmada, deriva, finalmente, en una expresión que evalúa la fracción desprotonada en función del pH

$$f_{aa^+} = \frac{10^{pH - pKa}}{10^{pH - pKa} + 1} \quad (21)$$

El juego de ecuaciones arriba desglosado, permitiría, en principio, tratar de evaluar las entalpías de desnaturalización y de desprotonación, así como el pKa del grupo químico relacionado, a través de un análisis de regresión no lineal. Sin embargo, este modelo, aun cuando es el más simple posible, y que además si reproduce la forma de la curva obtenida en el pH de 1.6 a 3.0 (datos no mostrados), predice un ΔH_1 negativo, lo cual no concuerda con los datos

experimentales que se tienen sobre entalpías de desprotonación [104].

Un modelo un poco más complicado que el anterior, pero del cual obtuvimos

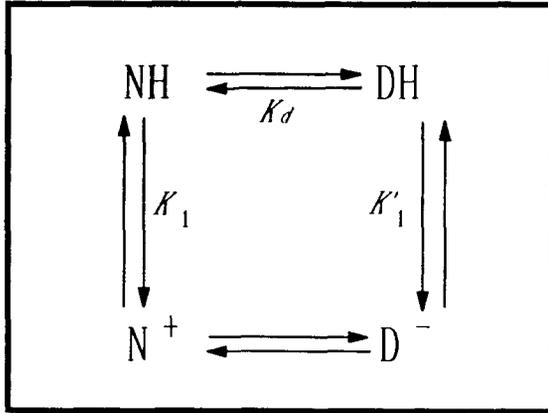


Figura 2.9. Esquema de un modelo de desnaturalización para la β -lgA en el que se incluye constantes de acidez diferentes para el mismo grupo químico dependiendo si la molécula está en la conformación nativa o en la desnaturalizada. Ver texto para detalles.

resultados verosímiles, consistió en suponer que la constante de acidez del grupo químico pueda ser diferente en el estado nativo que en el desnaturalizado (figura 2.9).

De manera análoga a la ecuación (14), podemos proponer que el $\Delta H_p(pH, T)$ tiene la contribución de diferentes factores:

En la figura 2.9, N representa al estado nativo y D al desnaturalizado, H simboliza la forma protonada, y K_1 y K_1' son las constantes de acidez que posee el grupo químico en el estado nativo y en el desnaturalizado, respectivamente. Para cada constante de equilibrio, naturalmente, está asociada una entalpía de transición.

$$\Delta H_p(pH, T) = f_{DH}H_{DH} + f_{D^-}H_{D^-} - f_{NH}H_{NH} - f_{N^+}H_{N^+} \quad (22)$$

en donde, H y f representan la entalpía y la fracción de población asociadas a cada estado, respectivamente.

Siguiendo a la ecuación de (18), podemos definir la constante de equilibrio K_1 :

$$K_1 = \frac{f_{N^+}[H^+]}{f_{NH}} \quad (23)$$

Considerando que para un determinado valor de pH, en condiciones de temperatura en la que domina la especie nativa, se cumple que

$$f_{NH} + f_{N^+} = 1 \quad (24)$$

y reorganizando la ecuación (23), llegamos a

$$f_{NH} = \frac{K_1}{K_1 + [H^+]} \quad (25)$$

La función de f_{DH} con respecto a K_1' y a la concentración de protones puede ser obtenida de la misma manera.

$$f_{DH} = \frac{K_1'}{K_1' + [H^+]} \quad (26)$$

Sustituyendo (25) y (26) en (22) y reorganizando obtenemos

$$\Delta H_p(pH, T) = \frac{[H^+]H_{DH} + K_1'H_D}{[H^+] + K_1'} - \frac{[H^+]H_{NH} + K_1H_{N^+}}{[H^+] + K_1} \quad (27)$$

Si fijamos a NH como el estado de referencia, entonces se seguiría que $H_{NH} = 0$, por lo que, de acuerdo a la ecuación (22), H_N puede ser sustituido como la diferencia de entalpías entre el estado NH y el N^+ (ΔH_1), H_{DH} como la diferencia de entalpía entre NH y DH (ΔH_p), y H_D como la suma de ΔH_p y $\Delta H_1'$ (esta última representa la diferencia de entalpía entre N^+ y D^+).

Finalmente, sustituyendo las definiciones anteriores en (27) y efectuando las operaciones algebraicas correspondientes, llegamos a:

$$\Delta H_p(\text{pH}, T) = \Delta H_d +$$

$$\frac{K_I' K_I (\Delta H_I' - \Delta H_I) + [H^*] (\Delta H_I' K_I' - \Delta H_I K_I)}{([H^*] + K_I') ([H^*] + K_I)} \quad (28)$$

Los resultados del ajuste por regresión no lineal de la ecuación (28) a los datos experimentales son mostrados en la tabla 2.2 y en la figura 2.10. La zona de pH de 0.6 a 1.6 unidades no fue incluida en el análisis.

Parámetro	
K_I	7.13×10^{-4}
ΔH_I	54,413 cal
K_I'	10,163
$\Delta H_I'$	56 cal
ΔC_p	1175 cal/°mol
ordenada	-8573 cal

Tabla 2.2. Mejor juego de valores para los parámetros del modelo de desnaturalización que incluye diferentes constantes de acidez y entalpías de desprotonación (ecuación (28)). El ajuste fue realizado por regresión no lineal. La DER fue de 976 cal.

Al igual que con el modelo anterior, con el de la ecuación (28) es posible reproducir la forma de la curva desplegada por los datos experimentales (figura 2.10); sin embargo, la gran diferencia es que este modelo predice una entalpía de desprotonación positiva.

Teniendo resueltas las magnitudes de los parámetros que determinan la ecuación (22), sería posible, en principio, especular en torno a la naturaleza del grupo químico que influye en el $\Delta H_p(\text{pH}, T)$ a través de su protonación; esto podría ser logrado, en particular, al contrastar el valor de las

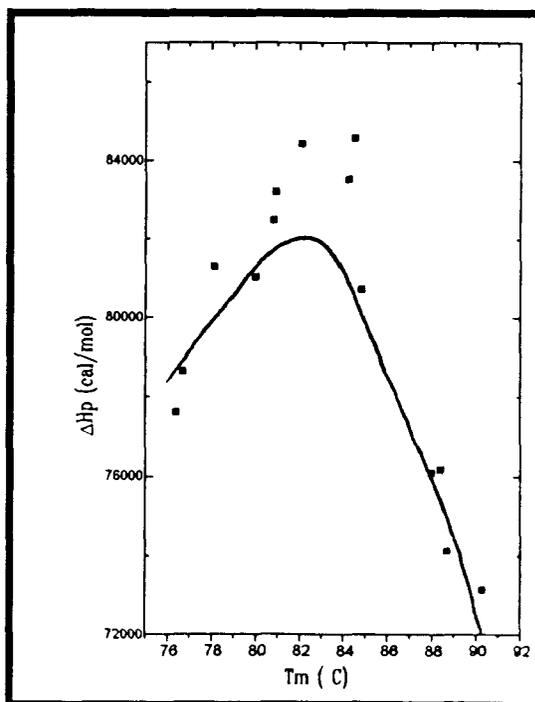


Figura 2.10. Curva estimada a partir del ajuste de la ecuación (22) a los datos experimentales. T_m está expresada en °C.

constantes de acidez con las reportadas para diferentes cadenas laterales.

Infortunadamente, si bien el modelo logra reproducir una tendencia semejante a la experimental, el ajuste que logramos no fue del todo satisfactorio. La DER fue de 976 cal, lo que equivale a alrededor del 10% del máximo de variación de los datos de $\Delta H_p(\text{pH}, T)$ (tabla 2.1). Por otro lado, hubo una gran incertidumbre para precisar la magnitud de las constantes de equilibrio; en especial la de K_I' .

No obstante, los valores obtenidos para los parámetros permiten hacer algunas observaciones sobre el modelo. Es interesante notar que aun cuando la entalpía de desprotonación en el estado nativo (ΔH_I) es elevada (~54 kcal/mol), la constante de equilibrio asociada es pequeña (~0.0007), factores que, combinados, indican que en el estado nativo es difícil que ocurra la desprotonación del grupo químico relacionado. Por otro lado, el $\Delta H_I'$ resultó

de una magnitud adecuada en cuanto a los valores de desprotonación se refiere, y, aunque es difícil saber con precisión el valor de K_1' , parece claro que su valor debe ser muy superior al de K_1 . En resumen, el ajuste del modelo indica que la contribución del fenómeno de protonación al ΔH_p total se origina fundamentalmente cuando la proteína está desplegada, y que muy probablemente el grupo que sufre el cambio de protonación se encuentra oculto al disolvente en el estado nativo. Este resultado es fundamental, puesto que significa que el estado nativo no resiente mayores alteraciones estructurales o energéticas cuando el pH supera 2.4 unidades.

Basado en lo anterior, un modelo molecular que daría cualitativamente cuenta de todas las observaciones experimentales, consistiría en suponer que el desplegamiento y la desprotonación del grupo son pasos secuenciales. Solamente después de desplegarse la cadena polipeptídica, el grupo estará en condiciones de protonarse o desprotonarse; y viceversa, para que ocurra el plegamiento, será necesario que primero el grupo químico readquiera su constitución original. Lo anterior es consistente con el hecho de que la dependencia de la T_m hacia el pH no sufre alguna transformación sensible y también con las evidencias de que el mecanismo de desplegamiento de la proteína sigue siendo el mismo a lo largo del intervalo de pH de 1.6 a 3.0 unidades.

CAPÍTULO TERCERO

ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS

§3.1. Instrumentación y Marco Teórico.

Aparte del método calorimétrico, existe un sinnúmero de técnicas con que es posible estudiar el comportamiento de desnaturalización de una proteína. La gama de técnicas experimentales es muy amplia, y abarca aspectos tan disímiles como cambios en el radio hidrodinámico de la molécula (viscosidad, sedimentación o dispersión de luz [23]), pérdida de epítopes (anticuerpos monoclonales [103]) o cambio del ambiente de cromóforos (fluorescencia, dicroísmo circular o espectroscopía diferencial ultravioleta [102]).

En términos de una caracterización termodinámica, todos estos métodos

presentan una fuerte dolencia frente al calorimétrico: al contrario de éste, a través de los primeros el ΔH_p y la T_m son evaluados de una manera indirecta y, generalmente, más incierta. Sin embargo, las técnicas no calorimétricas no han entrado en desuso por una razón de peso profundo, y es que es posible inferir aspectos estructurales relevantes acerca del mecanismo de desdoblado de la proteína.

En la presente investigación, hemos rastreado el proceso de desplegamiento de la β -Ig inducido térmicamente a través de dos potentes técnicas espectroscópicas: dicroísmo circular (DC) y espectroscopía diferencial ultravioleta (EDUV). La razón que obedeció el uso de tales técnicas, es que permiten estudiar los cambios en los distintos niveles de organización estructural de la proteína plegada (es decir, cambios en la estructura secundaria,

lo cual es posible mediante DC, y cambios en la estructura terciaria, información que se obtiene tanto de DC como de EDUV), lo cual da la pauta apropiada para determinar si durante la desnaturalización son poblados estados intermediarios entre las especies nativa y desnaturalizada, y poder caracterizar, aunque sea en forma burda, la naturaleza estructural de tales intermediarios.

Las Técnicas. Mediante técnicas espectroscópicas (y, en general, mediante cualquier técnica no calorimétrica) se persigue evaluar los cambios de alguna propiedad Y conforme es aumentado el influjo del agente caotrópico (en nuestro caso de estudio, conforme la temperatura de la solución es incrementada). Como veremos en un apartado siguiente, la obtención de esta variable en función de la temperatura permite caracterizar de una *manera indirecta* las propiedades termodinámicas de la transición. Antes de considerar la relevancia de esta información, tengamos un espacio para describir el principio de las técnicas espectroscópicas aquí empleadas.

Técnica de Espectroscopía Diferencial Ultravioleta. A través de EDUV es posible detectar el cambio en el ambiente de los residuos aromáticos. Al desplegarse la cadena polipeptídica, los grupos aromáticos insertos originalmente en el núcleo hidrofóbico de la proteína quedan expuestos al disolvente, lo que conlleva a una modificación de sus niveles energéticos y, por tanto, de su espectro de absorción. La experiencia con compuestos modelo [105] y con proteínas [23] ha enseñado que los cromóforos aromáticos absorben con menor intensidad en un medio polar que en un medio apolar.

La diferencia de absorción total entre la cadena polipeptídica plegada y desplegada es muy pequeña (del orden de una milésima del máximo), por lo que para evitar en lo posible incertidumbres experimentales, los espectros de desnaturalización en el ultravioleta se registran restando la absorción de una celda con proteína nativa a la absorción de la celda que es sujeta a la variación del ambiente.

En esta técnica, se hace uso de un espectrofotómetro de doble haz, en el cual son colocadas dos celdas gemelas con la misma solución de proteína. A lo largo del experimento, una de las celdas es sometida al incremento de temperatura, en tanto que la otra, sirviendo como celda de referencia, es mantenida a una temperatura constante baja, en la cual se sabe con seguridad que domina la conformación nativa.

Los resultados experimentales mediante EDUV consisten en un conjunto de espectros que abarcan el intervalo de longitud de onda de 320 a 260 nm; cada espectro corresponde a una determinada temperatura bajo la cual la proteína fue mantenida por cierto tiempo. Los diferentes valores del cambio en absorción en una determinada longitud de onda (ΔA) y sus correspondientes temperaturas son los datos utilizados para hacer el análisis termodinámico.

Técnica de Dicroísmo Circular. Esta técnica que depende de la actividad óptica de las moléculas comprende dos intervalos de estudio del espectro electromagnético, los cuales rinden diferente información.

En la región del ultravioleta lejano (180-250 nm), la señal es debida fundamentalmente a los enlaces peptídicos. Como es sabido, estos grupos químicos, en forma aislada, no presentan actividad

óptica; sin embargo, la asimetría que se genera debido a las conformaciones de estructura secundaria que adquiere la cadena polipeptídica, provocan que un conjunto de enlaces peptídicos pueda comportarse como centro quiral [55].

En la región del ultravioleta lejano (320-260 nm) la señal la efectúan los grupos aromáticos, los cuales, aunque al igual que los enlaces peptídicos no son centros quirales, presentan actividad óptica en virtud del entorno asimétrico que les rodea dentro de la proteína [102].

El fenómeno de DC está estrechamente emparentado con el fenómeno de dispersión rotatoria óptica (ORD), el cual no es más que la actividad óptica (*i.e.*, el cambio en el ángulo del plano de propagación de un haz de luz plano polarizado) en función de la longitud de onda [107]. La diferencia fundamental entre ellos, es que en tanto el ORD resulta de la interacción de la materia con la luz sin que se produzca absorción, en el DC la señal es debida adicionalmente a la absorción quiro-dependiente de esta luz.

El DC y la ORD son fenómenos muy complejos, cuya descripción fina obligaría incurrir al campo de la mecánica cuántica. Sin embargo, es posible dar una idea cualitativa clara de sus orígenes moleculares [23]. Para ello, comencemos pidiendo al lector que concentre su atención en la figura 3.1.

Para explicar el fenómeno de actividad óptica, es conveniente introducir el concepto de *haz circularmente polarizado*, el cual está esquematizado en las figuras 3.1a y b. Un haz de luz circularmente polarizado posee un vector eléctrico que, a diferencia de uno plano polarizado, no está confinado a un sólo eje, sino que describe una circunferencia con respecto a un observador que está

ubicado sobre el eje de propagación. Visto en tres dimensiones, este tipo de haz describe una hélice.

Esta hélice, al igual que como sucede con cualquier espiral, puede ser de sentido levógiro o dextrógiro. Imaginemos que montamos un haz circularmente polarizado a la izquierda con uno polarizado a la derecha; de la suma de ellos obtendríamos un haz de luz plano polarizado (figuras 3.1c).

Si nosotros hiciéramos incidir un haz de esta naturaleza sobre una muestra ópticamente activa, el haz emergente, dependiendo de la longitud de onda, puede portar dos tipos de transformaciones. Tomemos primero el caso en el cual no existe absorción por parte de la muestra.

Cuando un haz de luz pasa del aire a un medio más denso, cambia su velocidad de propagación. En un medio ópticamente no activo, la velocidad de propagación de los dos componentes circularmente polarizados será la misma; en cambio, en un medio activo, la interacción de los haces con la materia será diferencial, de manera que uno de ellos se retrasará con respecto al otro (figura 3.1d). La consecuencia de ello es que la suma de los dos haces genera un haz plano polarizado pero con un eje de propagación que ha rotado (figura 3.1e). En otras palabras, habremos obtenido una rotación óptica.

El fenómeno de DC lo podemos explicar sobre las mismas bases cualitativas, pero en él está involucrada adicionalmente la absorción de los haces incidentes. Aquí, los haces de luz circularmente polarizada también sufrirán una pérdida de velocidad desigual, por lo que se esperaría la rotación del plano de propagación; mas adicional a ello, los haces serán absorbidos con diferente intensidad (figura 3.1f). El resultado

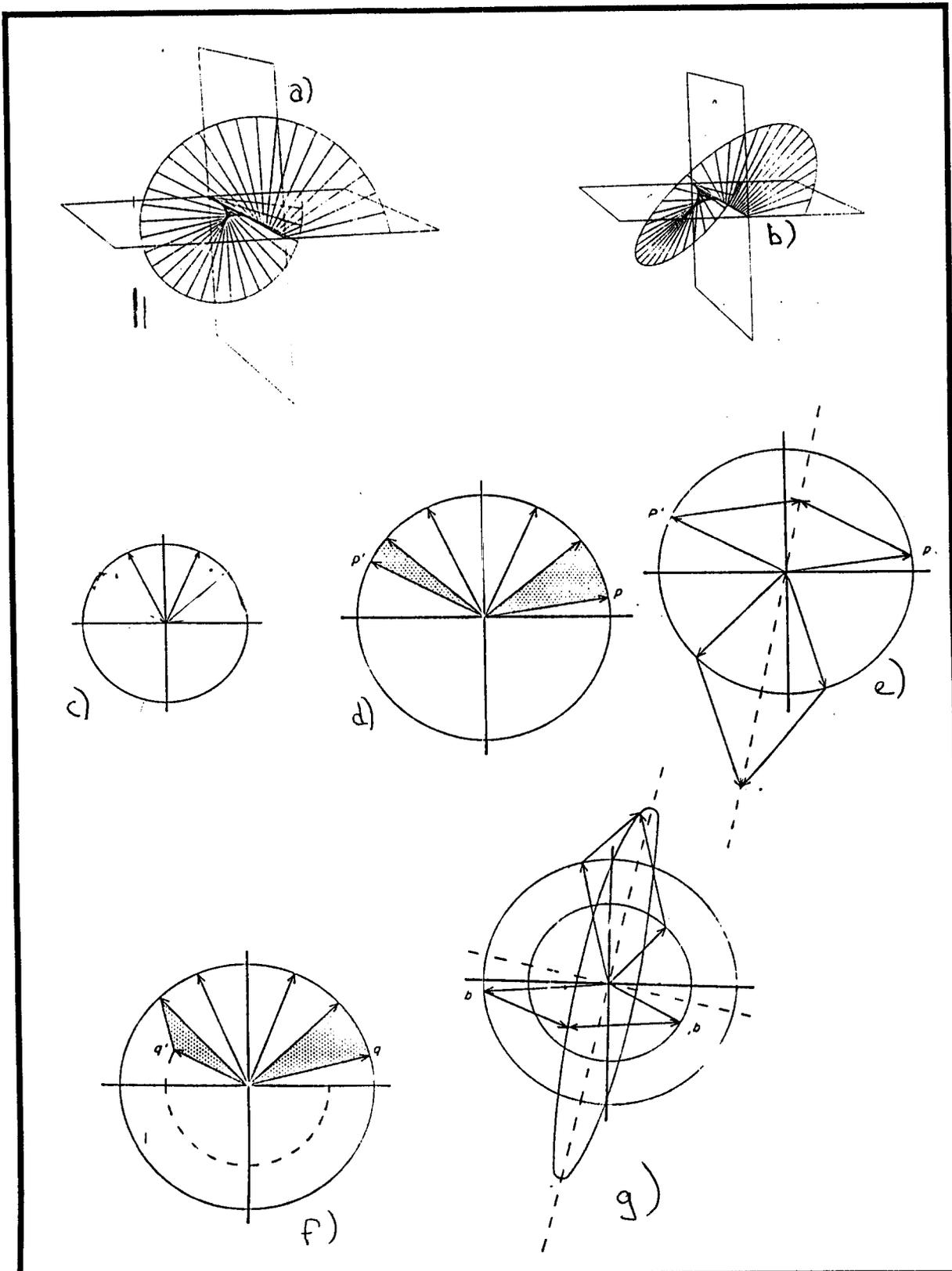


Figura 3.1. Explicación fenomenológica del fenómeno de rotación óptica y dicroísmo circular. Haz de luz circularmente polarizado a la derecha a) y a la izquierda b). c) Generación de un haz de luz plano polarizado a partir de la suma de dos haces circularmente polarizados. d) y e) Rotación del plano de propagación del haz plano polarizado debido a la diferente velocidad de propagación de los haces circularmente polarizados dentro de un medio ópticamente activo. f) Cada componente es absorbido con diferente intensidad por el medio activo, por lo que el vector resultante ya no se propaga en un plano, sino describiendo una espiral elíptica g).

combinado de estos eventos, será un haz de luz cuyo vector de energía describe una elipse con semieje de propagación diferente al eje del haz incidente (figura 3.1g). A este fenómeno se le conoce como *dicroísmo circular*.

En el caso de dicroísmo circular debido a los enlaces peptídicos, la forma espectral depende estrechamente del tipo de estructura secundaria [55], por lo que ha sido posible desarrollar métodos para estimar el contenido de estructura secundaria de una proteína a través de la forma de su espectro en el ultravioleta lejano [56]. En cuanto a la absorción por cromóforos aromáticos, se sabe que depende de la asimetría del ambiente que les rodea, por lo que un espectro en el ultravioleta cercano puede ser considerado como una "huella digital" de la proteína. Esta "huella digital" es el producto combinado del tipo de estructura terciaria de la molécula y de la cantidad y distribución espacial de los aminoácidos aromáticos, por lo que no ha sido posible adecuar alguna técnica de análisis que permita derivar aspectos estructurales específicos de la molécula tal como lo permite el espectro en el ultravioleta lejano.

El equipo de DC comparte varios atributos de un espectrofotómetro convencional [108]. Está compuesto por una fuente de luz, la cual debe ser muy potente y estable. La radiación atraviesa un monocromador que selecciona la longitud de onda, y después es polarizada mediante un prisma. Mediante un modulador, del haz incidente es absorbido uno de los componentes circularmente polarizados. El modulador absorberá a cualquiera de los dos haces circulares en función del tipo de pulso eléctrico que recibe del sistema electrónico, de tal suerte que a la muestra llegue

alternativamente tan sólo uno de los haces. Un detector registra la absorción, y el sistema electrónico calcula la diferencia de absorción de la radiación circularmente polarizada en ambos sentidos.

Es costumbre que los equipos de DC comerciales reporten los datos en unidades de elipticidad ($[\Theta]$), la cual está definida como el arco cuya tangente es el cociente del semieje menor entre el semieje mayor de la elipse (ver figura 3.1), valor que es directamente proporcional a la diferencia de absorción del haz circularmente polarizado izquierdo (A_I) menos el derecho (A_D) [23]:

$$[\Theta] = 33.005(A_I - A_D) \quad (1)$$

Esta elipticidad es normalizada considerando la longitud del recorrido óptico de la celda (l), la concentración de la proteína (c), y utilizando una masa molar promedio por residuo de aminoácido (M_{Mr}), de acuerdo a la relación:

$$[\Theta]_{mrw} = \frac{100 \cdot [\Theta] \cdot M_{Mr}}{c \cdot l} \quad (2)$$

A $[\Theta]_{mrw}$ se le conoce como elipticidad promedio por residuo, y sus unidades son grado·cm²/decimol [55].

El Análisis. El tratamiento clásico que se le sigue a los datos espectroscópicos [23,24] parte de dos premisas fundamentales. La primera de ellas es estipular que el proceso de desnaturalización sigue estrictamente un modelo de dos estados, lo que significa que para cualquier temperatura:

$$f_N(T) + f_D(T) = 1 \quad (3)$$

en donde $f_N(T)$ y $f_D(T)$ son la fracción de población proteica en el estado nativo y en el desnaturalizado, respectivamente.

La segunda restricción supone que las propiedades espectroscópicas de las especies nativa ($Y_N(T)$) y desnaturalizada ($Y_D(T)$) muestran una dependencia lineal contra la temperatura y que a cualquier temperatura la simple suma aritmética de ellas pesadas por las fracciones de población origina la magnitud del parámetro $Y(T)$, esto es:

$$Y(T) = f_N(T)Y_N(T) + f_D(T)Y_D(T) \quad (4)$$

Utilizando la definición de la ecuación (3) en la (4), y efectuando un rearrreglo podemos obtener la expresión:

$$f_D(T) = \frac{Y(T) - Y_N(T)}{Y_D(T) - Y_N(T)} \quad (5)$$

A partir de la ecuación anterior es posible calcular, simplemente a través del cambio en la magnitud de señal en una longitud de onda determinada, la forma en que evoluciona la fracción de población desnaturalizada en función de la temperatura.

Debido a que los experimentos suceden en condiciones cercanas al equilibrio, una vez conocida $f_D(T)$ puede ser calculada la constante de equilibrio del proceso de desnaturalización en función de la temperatura:

$$K_D(T) = \frac{f_D(T)}{1 - f_D(T)} \quad (6)$$

Recordando, por otro lado, que K_D y ΔG_D están relacionados por

$$K_D = e^{-\Delta G_D / RT} \quad (7)$$

y que

$$\Delta G_D = \Delta H_D - T\Delta S_D \quad (8)$$

y haciendo uso de la ecuación (6), es posible llegar, finalmente, a la así llamada ecuación de van't Hoff:

$$\ln K_D(T) = \frac{-\Delta H_{vH}(T)}{RT} + \frac{\Delta S_D(T)}{R} \quad (9)$$

en donde $\Delta H_{vH}(T)$ corresponde a la entalpía de desnaturalización estimada por métodos indirectos.

Nótese que el valor de ΔH_{vH} puede ser evaluado simplemente de la pendiente que toma en cada punto la ecuación (9). Este juego de valores, a través de la relación de Kirchoff, nos permite evaluar el ΔC_p , con lo cual, en principio, estaría completada nuestra caracterización termodinámica.

Como ya ha sido discutido en alguna otra parte [44], a la obtención de los parámetros termodinámicos mediante el conjunto de ecuaciones anteriores le es inherente una gran carga de incertidumbres. Entre los diferentes pasos, están involucradas transformaciones logarítmicas y evaluaciones gráficas de pendientes que frecuentemente propician que los valores finales sean poco precisos. En el laboratorio donde fue realizada esta tesis, fue desarrollado un modelo analítico que evalúa directamente los parámetros termodinámicos en función de las $K_D(T)$, disminuyendo considerablemente el grado de incertidumbre en el cálculo [45]:

$$K_D(T) = e^{\left(\frac{\Delta H_m}{RT_m} - \frac{\Delta C_p}{R}\right)\left(1 - \frac{T_m}{T}\right)} \left(\frac{T}{T_m}\right)^{\frac{\Delta C_p}{R}} \quad (10)$$

en donde ΔH_m es la entalpía de van't Hoff evaluada a la T_m , es decir, cuando $f_D = f_N$ o $\Delta G_D = 0$. El ajuste de la ecuación (10) se lleva a efecto mediante una regresión no lineal [74].

Debemos recordar que las ecuaciones anteriores surgieron de imponer un

modelo de dos estados al formalismo dado, por lo que los valores de $f_D(T)$ obtenidos y las magnitudes de los parámetros termodinámicos que de ellos se desprendan corresponderán con los reales del proceso exclusivamente cuando la proteína sufra una transición fundamental. En el caso de que existan intermediarios, los valores obtenidos serán aparentes, por lo que, en términos de una caracterización energética, no tendrán significado real.

Sin embargo, los estudios espectroscópicos revisten especial interés debido a que a través de ellos es posible dar evidencia de la presencia de intermediarios estables en la ruta de desnaturalización, pudiéndose en ocasiones incluso inferir algunas propiedades moleculares específicas de tales intermediarios:

1) Ha sido demostrado que cuando existe algún intermediario estable, el valor aparente de ΔH_{vH} siempre es diferente al real, en virtud de la relación [23]

$$\Delta H_{vH} = \Delta H_D \left(1 - \frac{\sum_i d_i(K_i/K_D)(1 - \Delta H_i/\Delta H_D)}{1 + \sum_i d_i(K_i/K_D)} - \frac{\sum_i (1-d_i)K_i(\Delta H_i/\Delta H_D)}{1 + \sum_i (1-d_i)K_i} \right) \quad (11)$$

en donde K_i y ΔH_i son la constante de equilibrio y el incremento de entalpía del intermediario i (tomando como referencia al estado nativo), respectivamente, ΔH_D es el incremento de entalpía total, el cual es evaluado por microcalorimetría diferencial de barrido (ver capítulo segundo), y $d_i(T)$ está definida como

$$d_i(T) = \frac{Y_i(T) - Y_N(T)}{Y_D(T) - Y_N(T)} \quad (12)$$

De las ecuaciones (11) y (12) es evidente que en la presencia de un intermediario estable, aun en el caso extremo de que el parámetro $Y_i(T)$ sea igual a $Y_N(T)$ o a $Y_D(T)$ (i.e., que $d_i(T)$ sea igual a 0 o a 1, respectivamente), el incremento de entalpía total real siempre será diferente al aparente deducido por métodos indirectos.

2) Una consecuencia del modelo de dos estados es que las curvas de desnaturalización f_D vs T y K_D vs T deben de ser independientes de la técnica o de la longitud de onda empleada, por lo que la no coincidencia entre ellas puede dar luz al respecto de la complejidad del proceso.

Los criterios anteriores, conjuntados al uso de diferentes técnicas experimentales, permiten establecer la presencia de intermediarios estables en el proceso de desnaturalización, así como especular sobre su posible naturaleza estructural [23].

Con el propósito de tener un criterio adicional para determinar la existencia de intermediarios, Rojo Domínguez *et al.* [45] adecuaron el método matricial de eigenvectores (del alemán *eigen*, propio), también conocido como análisis de factores. Este método, en breve, estriba en obtener el número mínimo de componentes espectrales que por combinación lineal reproduzcan, dentro del error experimental, a los espectros obtenidos en las diferentes temperaturas. Cabe señalar que un uso similar del análisis de factores ha sido efectuado para determinar el contenido en estructura secundaria a través del espectro de dicroísmo circular tomado en el ultravioleta lejano [55].

En el método de Rojo-Domínguez *et al.*, se determinada el valor de la señal cada 2 Å para cada uno de los espectros experimentales. Los datos son agrupados

en una matriz $[D]$ de $n \times m$, en donde n es el número de columnas, correspondiendo cada columna a un espectro tomado en una determinada temperatura.

Para realizar el análisis de factores, la matriz de datos originales es transformada en una matriz cuadrada simétrica al multiplicarla por su transpuesta, $[D]^T$. Esta matriz cuadrada es diagonalizada para encontrar la matriz de eigenvectores $[Q]$ y la matriz diagonal de eigenvalores $[\lambda]$:

$$[Q]^T [D]^T [D] [Q] = [\lambda] \quad (13)$$

De ocupar tal cual las matrices de eigenvectores y eigenvalores obtenidas con la resolución de la ecuación (13), reproduciríamos en forma íntegra la matriz de datos originales:

$$[D] = [U][Q]^T \quad (14)$$

en donde

$$[U] = [D][Q] \quad (15)$$

Sin embargo, siendo el propósito reproducir los datos espectroscópicos con el mínimo número de factores posibles, son incluidos exclusivamente los factores de mayor peso (es decir, de mayor eigenvalor) necesarios para obtener una desviación estándar residual (DER) que caiga en el error experimental, la cual es calculada a través de

$$DER = \left[\frac{1}{m(n-f)} \left(\Lambda - \sum_{i=f+1}^n \lambda_i \right) \right]^{1/2} \quad (16)$$

en donde f es el número de factores incluidos en las matrices restringidas, λ_i la magnitud del eigenvalor i y Λ la suma del total de eigenvalores, también llamada traza.

§3.2. Desarrollo Experimental.

Materiales. Al igual que para las determinaciones calorimétricas, la β -lg A utilizada en los estudios espectroscópicos fue obtenida de Sigma Chemical Co., y utilizada sin ulteriores purificaciones.

Todas las determinaciones espectroscópicas fueron efectuadas disolviendo la proteína en una solución amortiguadora de glicina 0.01M pH 1.5 (acidulada con HCl).

Estudios de Desnaturalización Térmica mediante Espectroscopía Diferencial Ultravioleta. Los experimentos por EDUV fueron realizados en un espectrofotómetro VARIAN DMS-850 de doble haz con registrador de escala expandida, usando celdas rectangulares de cuarzo de un centímetro de recorrido óptico.

La celda de referencia fue mantenida a una temperatura de 13°C a lo largo del experimento.

Estudios de Desnaturalización Térmica Mediante Dicroísmo Circular. Los patrones espectroscópicos de desnaturalización térmica seguidos mediante DC fueron registrados en un espectropolarímetro JASCO J-500A calibrado con ácido (+)-10-camforsulfónico.

Para las desnaturalizaciones evaluadas en la región del ultravioleta cercano (250-320nm), el recorrido óptico de la celda fue de un centímetro. La concentración de proteína fue de alrededor de 3 mg/ml. En el caso de la región del ultravioleta lejano, la concentración de proteína fue 10 veces menor (~0.3 mg/ml) y el recorrido de la celda fue de 0.5 mm.

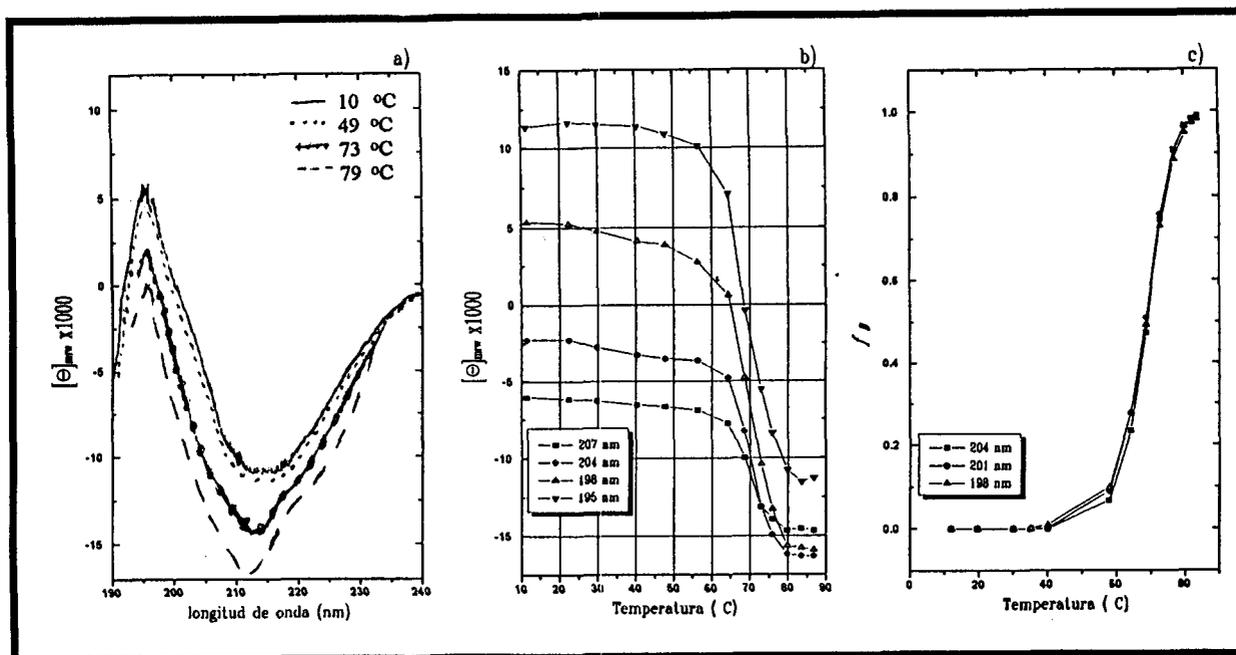


Figura 3.2. Patrones de desnaturalización térmica de la β -lg A obtenidos mediante DC en el ultravioleta lejano. a) Espectros totales. b) Cambios de señal desplegados a diferentes longitudes de onda. c) Evolución de la fracción de población desnaturalizada en función de la temperatura. Las unidades de $[\Theta]_{\text{UV}}$ están expresadas en grado cm^2/mol .

La elipticidad media por residuo, $[\Theta]_{\text{mrw}}$, fue calculada a partir de un peso molecular promedio por residuo de 112.85 g/mol.

Proceso de Calentamiento. Para todas las modalidades espectroscópicas, el calentamiento entre cada punto experimental fue llevado a cabo lentamente ($< 1^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$) utilizando un baño con termostato y bomba recirculadora. La temperatura fue controlada con una precisión de $\pm 0.2^\circ\text{C}$.

Después de alcanzada la temperatura deseada, y antes de proceder con el barrido espectral, la muestra fue incubada durante un intervalo de tiempo equivalente al 50% del requerido en alcanzar la temperatura deseada partiendo de la del punto de determinación anterior. De esta manera, fue asegurado tanto el equilibrio térmico como el conformacional.

El intervalo de temperatura estudiado fue de ~ 10 a $\sim 90^\circ\text{C}$.

§3.3. Resultados y Discusión.

Datos de DC. Los resultados de desnaturalización térmica por DC en el ultravioleta lejano (DC_{lej}) son presentados en la figura 3.2, y en las tablas 3.1 y 3.2. Por lo que respecta a los datos en el ultravioleta cercano (DC_{cer}), son compendiados en la figura 3.3 y en la tabla 3.2.

En la figura 3.2a son mostrados algunos de los espectros tomados a lo largo del experimento de desnaturalización de la β -lg A. El cambio en la intensidad de la señal en algunas longitudes de onda de los espectros totales son mostrados en la figura 3.2b. Resulta evidente de estas figuras, que las formas de las curvas de desnaturalización son similares entre las diferentes longitudes de onda, lo cual podría hablar de que la transición ocurre con la presencia de únicamente dos especies moleculares. Tal indicio es reforzado por la coincidencia en las curvas de fracción de población desnaturalizada (figura 3.2c)

Técnica	λ (nm)	ΔH_m (cal/mol)	T_m (°C)	ΔC_p (cal/°Cmol)
DC _{lej}	204	62360	68.9	1546
	201	57231	68.4	1438
	198	53502	68.6	1330
EDUV	301	82050	72.9	2066
	297	82505	73.3	2055
	285	47558	71.5	1100
	279	32249	65.4	592

Tabla 3.1 Resultados de las evaluaciones termodinámicas de los espectros de desnaturalización térmica para la β -Ig A.

Técnica	# factores	DER (%)
DC _{lej}	2	0.87
DC _{cer}	3	2.10
EDUV	2	2.04

Tabla 3.2. Resultados del análisis de factores. Para el caso de EDUV, es preciso agregar un factor adicional en virtud de que a los espectros totales les fue restada la contribución de la especie nativa. El valor de DER está dado en relación al intervalo de variación de señal.

y por la semejanza en magnitud de los parámetros termodinámicos obtenidos mediante diferentes longitudes de onda (tabla 3.1). Una evidencia adicional de esto la dio el análisis de factores, el cual reveló únicamente a dos especies de características espectroscópicas distinguibles (tabla 3.2).

Sin embargo, un análisis más minucioso de los datos de DC_{lej} parece sugerir la presencia de un intermediario. Por principio, está el hecho de que el ΔH_{vH} (evaluado a la T_m) es, en todos los casos, menor al incremento de entalpía obtenido mediante DSC bajo las mismas condiciones de pH y fuerza iónica, el cual fue de un valor de 78,970 cal/mol (ver capítulo segundo). Como se desprende de la ecuación (11), este hecho puede ser interpretado como la presencia de un intermediario estable. Las circunstancias de que tal especie molecular no haya sido detectada mediante la descomposición

factorial y de que las curvas de desnaturalización sean coincidentes, significan que el intermediario posee propiedades espectroscópicas muy semejantes o a las de la especie nativa o las de la desnaturalizada.

Los valores de T_m obtenidos por DC_{lej} resultaron inferiores al valor obtenido mediante calorimetría (76.9°C). El formalismo termodinámico empleado no predice en ninguna de sus ecuaciones que esta discrepancia pueda ser atribuida a la existencia de un intermediario. Nosotros pensamos que la causa de tal fenómeno puede ser adjudicada al proceso de agregación que sufre la proteína a altas temperaturas. Es probable que el efecto de agregación "enmascare" la parte final del proceso de desplegamiento, por lo que la T_m aparente resulte menor a la real.

Podría argüirse en contra de esta suposición que, de acuerdo a los datos por DSC, para que el efecto de agregación se manifieste en las curvas de desnaturalización se precisa de una concentración de proteína superior a 5 mg/ml, en tanto que en los experimentos por DC_{lej} la concentración no superó ni siquiera los 0.5 mg/ml. Sin embargo, no debemos olvidar que bajo las condiciones en que fueron efectuados los ensayos experimentales, el proceso de agregación de la proteína es irreversible y, por tanto, un fenómeno cinético cuya manifestación depende tanto de la concentración de la proteína como del tiempo de calentamiento. En el caso de los experimentos espectroscópicos, además de que la tasa de calentamiento fue más lenta que la empleada en los calorimétricos (aproximadamente 2.5 veces), la proteína fue incubada por varios minutos en cada una de las temperaturas en donde se realizó un barrido espectroscópico.

Una prueba de que la menor magnitud de T_m no es un artefacto debido a la técnica empleada, es que mediante EDUV también fueron obtenidas T_m aparentes sistemáticamente menores a las observadas por calorimetría.

Por lo que respecta a los resultados mediante DC_{cer} , los patrones desplegados fueron mucho menos simples (figura 3.3). Infortunadamente, la forma de estas curvas es tan compleja, que no fue posible obtener las curvas de f_D vs T y, consecuentemente, las evaluaciones termodinámicas correspondientes. Sin embargo, el análisis de factores hace proponer la existencia de cuando menos tres especies espectroscópicamente diferentes (tabla 3.2), es decir, la ocurrencia de un conformero que difiere en la estructura terciaria de las otras dos especies moleculares.

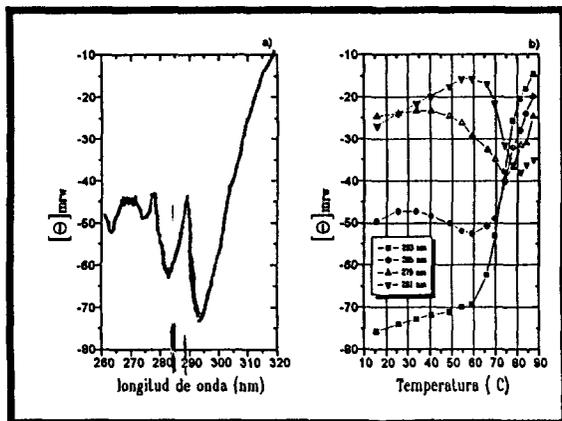


Figura 3.3. Patrones de desnaturalización térmica de la β -lg A obtenidos mediante DC en el ultravioleta cercano. a) Espectros totales. b) Cambios de señal desplegados a diferentes longitudes de onda. Las unidades de $[\Theta]$ mrw están expresadas en grado- cm^2/mol .

Datos de EDUV. En la figura 3.4 y en la tablas 3.1 y 3.2 son presentados los resultados de desnaturalización térmica por EDUV para la β -lg A .

La primera conclusión que salta a la vista de analizar la figura 3.4, es que el proceso de desnaturalización térmica de la

β -lg A es un fenómeno complejo. El seguir el proceso de desnaturalización a través del cambio diferencial en el ultravioleta en diferentes longitudes de onda rinde comportamientos que difieren sensiblemente entre sí. Podemos agrupar estos comportamientos en dos grandes tendencias que corresponden a dos zonas del espectro. En la zona de longitudes de onda corta (279, 285 nm) ocurre una tendencia temprana y gradual hacia la disminución de la absorción por parte de la solución que está siendo calentada (figuras 3.4a y b). En cambio, la zona de longitudes de onda larga (298, 301 nm) observa un comportamiento inicial opuesto, desarrollándose en temperaturas bajas una banda positiva que después da paso a un delta negativo a altas temperaturas.

De acuerdo a lo expuesto en la sección de *Análisis* de este capítulo, el que el comportamiento del parámetro $Y(T)$ dependa de la longitud de onda, lo podemos tomar como un primer indicio de que el comportamiento de desnaturalización de la β -lg A pueda no ser un proceso que consista en una sola transición. Esta idea parece ser reforzada con la figura 3.4c, en donde es evidente que las curvas de fracción de desnaturalizado también difieren de una longitud de onda a otra.

Estudios con compuestos modelo realizados por Donovan [105] han sugerido que el espectro diferencial en el UV de una proteína recibe diferentes contribuciones por parte de los residuos aromáticos dependiendo de la longitud de onda. Donovan encontró que en zonas de longitud de onda larga (alrededor de 296 nm) la señal es debida fundamentalmente a los residuos triptofilo, en tanto que en longitudes más cortas (<285 nm), la

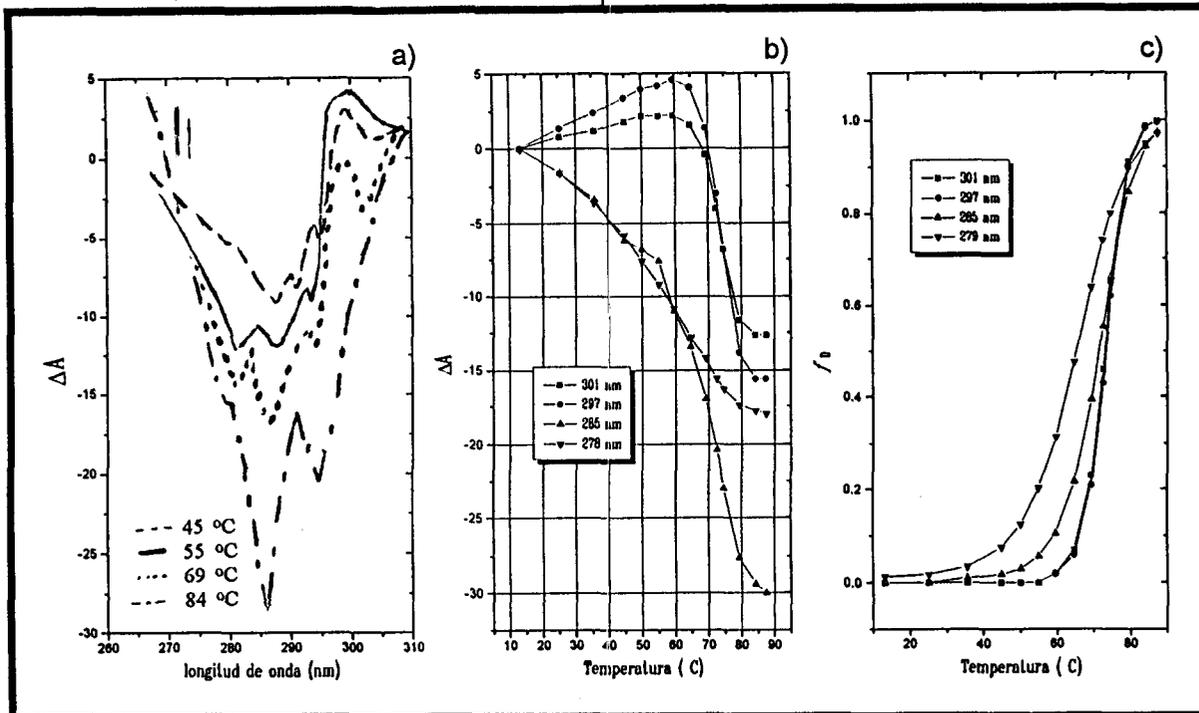


Figura 3.4. Patrones de desnaturalización térmica de la β -lg A obtenidos mediante EDUV. a) Espectros totales. b) Cambios de señal desplegados a diferentes longitudes de onda. c) Evolución de la fracción de población desnaturalizada en función de la temperatura.

contribución la comparten prácticamente todos los residuos aromáticos.

De acuerdo a lo anterior, podría pensarse que el comportamiento desplegado en longitudes de onda corta desde temperatura muy bajas (figura 3.4b) es debido a la exposición al disolvente de todos los residuos aromáticos insertos en el interior de la proteína al producirse la transición de la proteína de una conformación nativa a la desplegada. Sin embargo, esta explicación parece no ser suficiente por dos razones: 1) el intervalo de temperatura en donde ocurren los cambios de absorción es muy grande, imagen que no corresponde ni con la idea de una transición cooperativa ni con los intervalos de temperatura más pequeños detectados por DSC; 2) las curvas no muestran una tendencia monotónica.

Recordando que los experimentos espectroscópicos fueron realizados a un pH de 1.5, y que en tales condiciones la β -

lg es un dímero, una explicación más plausible es que el ΔA exhibido en longitudes de onda corta a bajas temperaturas ($T < 55^\circ\text{C}$) es imputable a la exposición de diversos residuos aromáticos al efectuarse la disociación de los monómeros.

La banda positiva desplegada alrededor de los 300 nm, conocida también como del tipo "anómalo", parece aportar indicios en el nivel molecular más claros sobre los procesos que sufre la β -lg A. A través de estudios modelo [105], ha sido encontrado que en la zona cercana a los 300 nm, los grupos triptofilo son los que absorben con mayor intensidad. La β -lg A posee únicamente dos residuos triptofano (figura 3.5), uno ubicado en el fondo de la cavidad de la molécula (Trp^{19}), en tanto que el otro está dispuesto en la punta de un asa externa (Trp^{61}).

Ha sido postulado que las bandas positivas pueden ser producidas por un

cambio electrostático en el ambiente del cromóforo tal como una disminución de la carga positiva neta local [110]. Es interesante notar el ambiente al cual está sujeto el triptofano exterior cuando la molécula está en su estado nativo (figura 3.5). El cromóforo está rodeado por varios aminoácidos altamente polares: 2 Glu, 1 Lis, 1 Asp, 1 Asn y 1 Gln. Si consideramos el pH al cual los experimentos fueron realizados (pH = 1.5), parece natural concluir que en tal ambiente predomina una carga eléctrica

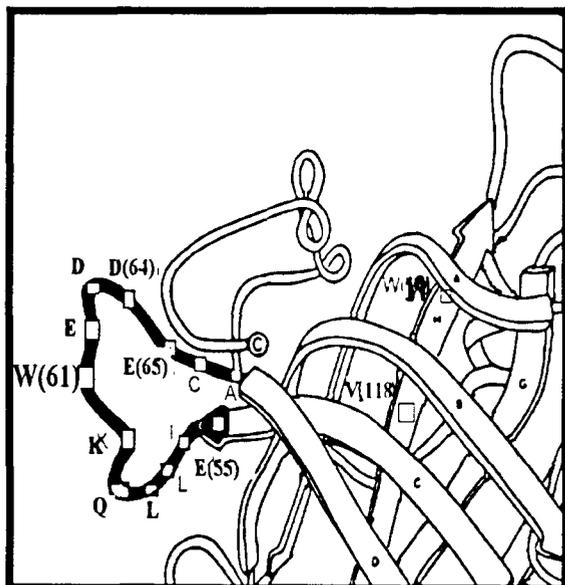


Figura 3.5. Representación esquemática de la estructura tridimensional de la β -lg. Se resalta el asa Glu⁵⁵-Glu⁶⁵. Adaptado de [64].

positiva. De manera que si es correcta la suposición de que la banda positiva, cuyo máximo de intensidad ronda los 60°C, es producida por la absorción de un residuo triptofilo, podemos entonces interpretarla como la pérdida de la conformación nativa en un segmento de la cadena polipeptídica que, probablemente, se extiende del residuo Glu⁵⁵ al Glu⁶⁵ (esto es, ¡cerca del 10% del total de residuos de la proteína!) [111].

Un punto que apoyaría poderosamente la hipótesis anterior, sería el poder modificar de alguna manera el ambiente electrostático del triptofano 61, de tal suerte que fuera de esperarse una intensidad diferente de la banda diferencial anómala. Afortunadamente, esa "alguna manera" la ha proveído la naturaleza, pues la variedad *B* de la β -lg posee una Gli en lugar del Asp⁶⁴ de la variedad *A*. Al estudiar la desnaturalización de la variedad *B*, encontramos que, efectivamente, la banda difiere en intensidad (ver capítulo cuarto) [112].

Como es natural pensarlo, resulta muy probable que el Trp¹⁹ embebido en el fondo del cáliz, en una zona altamente apolar y compacta (figura 3.5), no contribuya en absoluto en la intensidad de la banda positiva. No obstante, es casi cierto el que tal residuo contribuye con la mayor intensidad en el cambio abrupto observado después de los 60°C, pues, como sugieren los datos por DC_{lej}, se trata de la temperatura en la que comienza a perderse el grueso de la estructura secundaria original.

Conjuntando el total de datos espectroscópicos, tenemos que en la ruta de desnaturalización de la β -lg *A* existe un intermediario conformacional estable que es el producto de la pérdida de la conformación nativa del asa Glu⁵⁵-Glu⁶⁵, sin que ello conlleve alguna alteración sensible en la estructura secundaria del resto de la molécula.

Por otro lado, existen motivos para especular que, probablemente, el relajamiento estructural en el asa en que se ubica el triptofano 61 no sea la única zona de la cadena polipeptídica que sufra una transición previa a la desnaturalización global de la molécula. Otras dos regiones estructurales que por su grado de empaquetamiento son candidatos para

sufrir una perturbación térmica temprana, son los segmentos amino y carboxilo terminales (figura 3.5). Con respecto al primero, existen pruebas obtenidas por anticuerpos monoclonales de que, efectivamente, esa zona pierde su conformación nativa, curiosamente, en una temperatura cercana a los 60°C [103]. Aunque para el segmento carboxilo terminal no se cuenta con evidencias directas, resalta el hecho de que este segmento es el equivalente geométrico de aquél detectado en la GPA α_1 como responsable de la banda diferencial positiva en el ultravioleta [45].

En resumen, parece haber elementos suficientes para suponer que la β -lg A sufre cambios estructurales antes de llegar a la zona de transición principal. El asignar a estos cambios la curva endotérmica de bajas temperaturas obtenida por calorimetría, es algo difícil de decidir; no obstante, por la posición del máximo de esta curva y por el número de aminoácidos que podrían estar involucrados, cabría suponer que es debida tanto a la transición estructural de algunas regiones de la cadena polipeptídica como a la disociación del dímero.

CAPÍTULO CUARTO

ESTUDIOS PRACTICADOS A LA VARIEDAD *B* DE LA β -lg

§4.1. El Propósito.

Un "corolario" del objetivo fundamental de la termodinámica de proteínas, es el poder "disecar" una molécula en términos energéticos; esto es, el poder distinguir el peso específico de determinadas porciones de la cadena polipeptídica en los cambios de las propiedades termodinámicas durante el proceso de desnaturalización de la estructura nativa. Aunque aún se está lejos de lograr tal propósito, existen casos afortunados en los cuales ha sido posible describir el papel energético de un aminoácido o un grupo de ellos en la estabilización de la estructura funcional de la proteína. Una de las situaciones más simples para el investigador se ha presentado cuando la naturaleza provee de dos o más variedades de la misma proteína

que se diferencian por un número reducido de sustituciones de aminoácidos, de manera que el efecto de éstas sobre la estabilidad y la cooperatividad de la proteína puede ser discriminado.

Como hemos especificado en la introducción a este trabajo, la β -lg posee al menos cinco variedades naturales, siendo las más abundantes, y a la vez las que están disponibles en el mercado con un alto grado de pureza, las formas *A* y *B*. La diferencia entre estas dos proteínas consiste en un par de mutaciones puntuales: la Val(118) y el Asp (64) en la variedad *A* están reemplazados por Ala y Gli, respectivamente, en la variedad *B*.

En el presente capítulo presentamos de manera compendiada los estudios practicados a la variedad *B* de la β -lg. Los ensayos experimentales y el análisis de los datos espectroscópicos fueron practicados de manera semejante a los de la variedad *A*. En cuanto a los estudios calorimétricos,

fue realizada la caracterización en un valor de pH de 1.5 unidades, es decir, el mismo que el de los ensayos espectroscópicos. En este capítulo discutimos las diferencias termodinámicas entre las dos variedades, y la conexión que puedan tener con las mutaciones en las posiciones 64 y 118 de la cadena polipeptídica.

§4.2. Resultados y Discusión.

Los resultados derivados de la colección de datos espectroscópicos y calorimétricos para la β -lg B fueron, en lo general, muy similares a los obtenidos para la variedad A, por lo que a continuación presentamos de manera sucinta la caracterización termodinámica del proceso de desnaturalización. Para una discusión más detallada del análisis e interpretación de los datos, el lector es referido a los capítulos precedentes referentes a la β -lg A y a reportes publicados previamente [111,112].

1) Las tendencias espectroscópicas por EDUV (figura 4.1), DCcer (figura 4.2) y DClej (figura 4.3) indican que en el proceso de desnaturalización de la β -lg B, aparece un intermediario que es el

Técnica	λ (nm)	ΔH_{vH} (cal)	T_m (°C)
EDUV	301	129,623	72.4
	297	90,287	72.6
	284	65,607	73.5
DClej	201	88,427	70.6
	198	86,208	69.6

Tabla 4.1. Valores de los parámetros de desnaturalización térmica de la β -lg B obtenidos mediante EDUV y DC.

Técnica	No. Factores
EDUV	2
DCcer	3
DClej	2

Tabla 4.2. Resultados arrojados del análisis de factores practicado a los distintos datos espectrales. Recuérdese que para el caso de EDUV, a los espectros totales les es restada la contribución de la especie nativa, por lo que al número de factores se les debe adicionar uno más.

producto de variaciones en la estructura terciaria de la especie nativa. A tal conclusión conduce también el análisis de

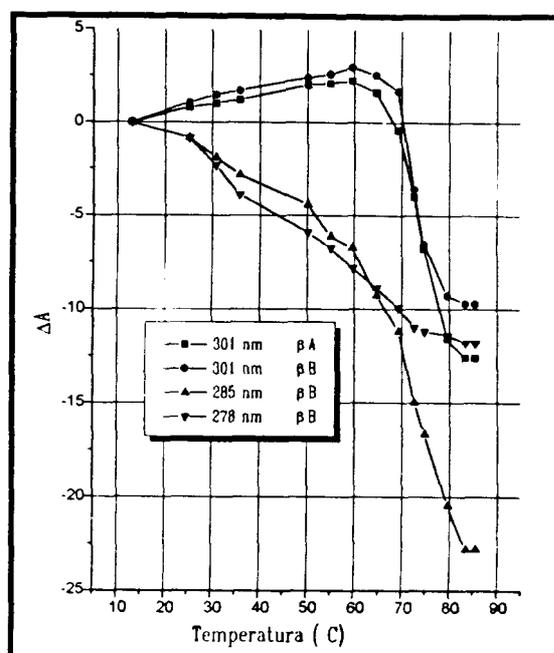


Figura 4.1. Patrones de desnaturalización de la β -lg B obtenidos mediante EDUV. Se presenta también la curva de la variedad A para $\lambda = 301$ nm.

las funciones termodinámicas (tabla 4.1) y la descomposición de los datos espectroscópicos mediante el análisis de factores (tabla 4.2).

2) Si bien es difícil determinar en qué grado la tendencia de disminución de la absorción en la región del ultravioleta a longitudes de onda corta (~280 nm) es

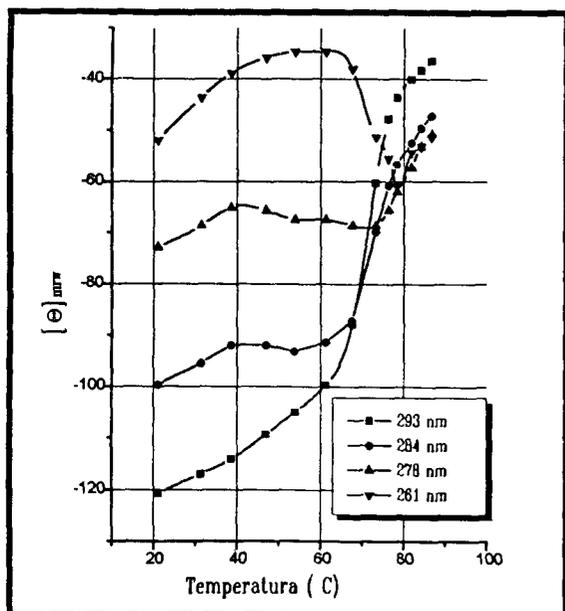


Figura 4.2. Patrones de desnaturalización térmica desplegados por la β -Ig con la técnica de DC en el ultravioleta cercano. Las unidades de elipticidad están dadas en $\text{cm}^2 \cdot \text{grado} / \text{dmol}$.

debida a la disociación del dímero o a cambios estructurales (figura 4.1), la información contenida en longitudes de onda cercanas a los 300 nm parece apuntar en forma específica a la pérdida de la conformación nativa del asa externa Glu(55)-Glu(65) (figura 4.4), fenómeno que toma lugar en una fase previa a la de la transición principal.

3) Los barridos calorimétricos resolvieron dos zonas de transición (figura 4.5). Una prominente, centrada alrededor de los 76°C , la cual, presumiblemente, corresponde al cambio dramático en la estructura secundaria señalado por DClej (figura 4.3). La otra zona de transición, pequeña y desplazada hacia temperaturas menores, podría corresponder conjuntamente a la energía de contacto de los monómeros y a la transición a conformaciones no estructuradas por parte de zonas de la proteína nativa empacadas laxamente.

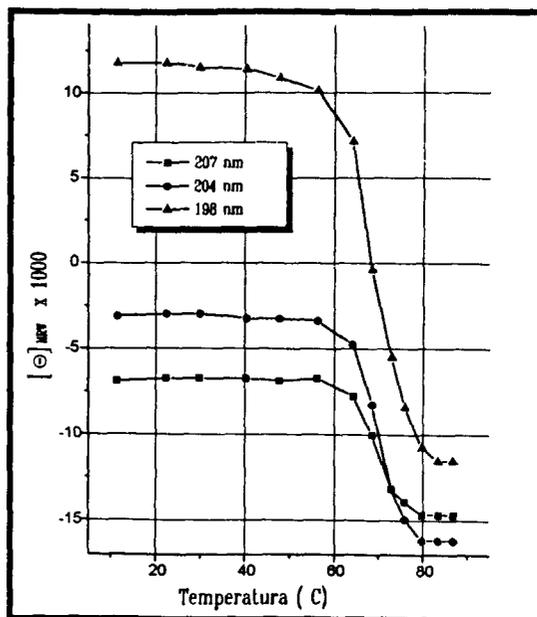


Figura 4.3. Curvas de desnaturalización térmica exhibidas por la variedad B de la β -Ig mediante DC en la región del ultravioleta lejano. Las unidades de elipticidad están dadas en $\text{cm}^2 \cdot \text{grado} / \text{dmol}$.

§4.3. Comparación de las Variedades A y B de la β -Ig.

Si bien, *grosso modo*, el comportamiento de desnaturalización de las dos variedades de la β -Ig resultó muy semejante, en el detalle fino encontramos algunas disimilitudes que fueron útiles

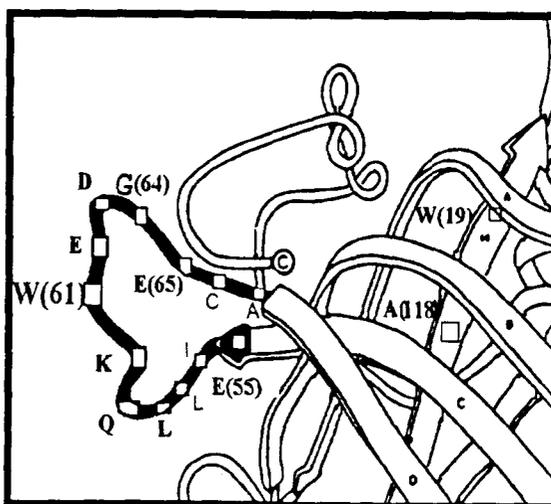


Figura 4.4. Representación esquemática de la estructura tridimensional de la β -Ig B. Es resaltada el asa Glu⁵⁵-Glu⁶⁵. Adaptado de [64].

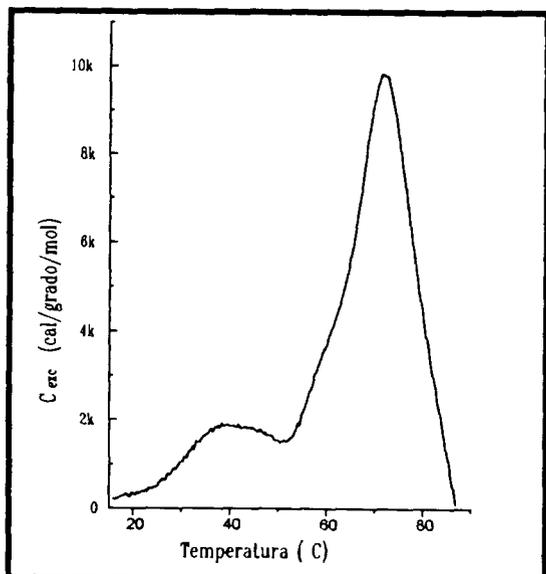


Figura 4.5. Termograma de la β -lg B obtenido mediante un CDB.

tanto en la clarificación de la influencia energética de las mutaciones que separan a las dos variedades, como en la validación de la interpretación molecular que hemos propuesto previamente para el proceso de desnaturalización de la β -lg A.

1) Diferencias de Estabilidad y Cooperatividad. En la figura 4.6 presentamos sobrepuestas las curvas de desnaturalización por CDB de las dos variedades de la β -lg. Los valores obtenidos para la variedad B fueron de 11,111 cal/mol de incremento de entalpía y 75.8 °C de temperatura de transición media. El ajuste a los datos experimentales fue muy satisfactorio, siendo la DER de 88.

Siéndonos al significado tradicional que se le atribuye al área bajo la curva y a la T_m obtenidas de experimentos calorimétricos, resulta evidente que la estructura de la β -lg A es más estable y cooperativa que la de la variedad B.

Estas diferencias energéticas, naturalmente, deben ser el producto de las dos sustituciones de aminoácidos. Por

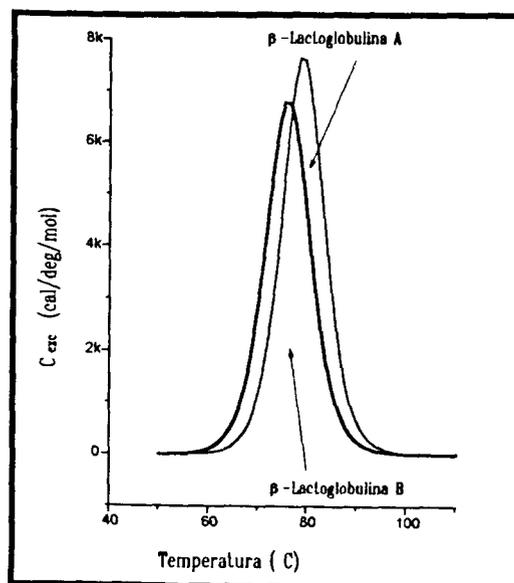


Figura 4.6. Comparación de los termogramas de las dos variedades de la β -lg. Las determinaciones fueron realizadas con un pH de 1.5 unidades. Para la variedad A, $T_m = 76.9$ °C y $\Delta H_D = 76,970$ cal; para la variedad B, $T_m = 75.8$ °C y $\Delta H_D = 81,328$ cal.

encontrarse en un asa exterior el punto en donde ocurre el reemplazo de Asp (A) a Gli (B), es difícil conceder algún peso a esta mutación en las diferencias termodinámicas detectadas (figura 4.4). En cambio, la mutación Val(A) a Ala(B) ocurre en una zona interior de la proteína, en un ambiente altamente hidrofóbico. La Val, un grupo con mayor número de hidrógenos hidrofóbicos que la Ala, provocaría un aumento de la superficie de contactos apolares. Los problemas estéricos que pudiera conllevar el incrustar esta especie de mayor volumen, parecen ser compensados de sobra por el aumento en la hidrofobicidad local. Además, al tratarse de una proteína que posee una cavidad central, sería mucho de esperarse que el grupo mayor pudiera ser acomodado con mayor facilidad que en el centro de una proteína compacta. Es interesante notar que la sustitución de un sólo aminoácido de un total de 162 (~0.6%), conlleva a una variación entálpica de ~7%. Ello habla claramente

de que en el orden energético, la estructura de una proteína está subdividida "jerárquicamente".

2) La Diferencia en la Intensidad de la Banda Anómala. Hemos discutido previamente la posibilidad de que la banda positiva de desnaturalización térmica detectada cerca de los 300 nm para la β -lg A sea debida al cambio de ambiente del Trp⁶¹ al modificarse la conformación del asa Glu⁵⁵-Glu⁶⁵. La sugerencia fue sustentada del ambiente electropositivo al cual está sujeto el Trp⁶¹ a pH de 1.5. De ser cierta tal hipótesis, al ser reemplazado el Asp⁶⁴ por Gli sería de esperarse que la intensidad de la banda variara entre las dos proteínas (aunque tal variación no necesariamente fuera detectable experimentalmente). Como puede ser observado en la figura 4.7, la intensidad de la banda anómala efectivamente varía. Corregido el efecto de la concentración, la banda desplegada por la β -lg B resultó, haciendo la comparación en el máximo, entre 20 y 25% más intensa que la correspondiente a la de la β -lg A. Aunque la incertidumbre experimental es grande, las comparaciones fueron realizadas en longitudes de onda que corresponden a mínimos en el espectro, por lo que la diferencia detectada parece ser significativa.

Ha sido sugerido que las bandas positivas son el producto de la transición de los grupos triptofilo a un ambiente de menor carga electronegativa [110]. El Trp⁶¹ está ubicado en una de las regiones más polares de la β -lg. Como puede ser observado en la figura 4.8, el sustituir Asp por Gli significa un descenso en la polaridad local; mas el aminoácido sustraído es de carga parcial negativa, un residuo que, por tanto, puede ejercer un efecto de "apantallamiento" sobre los

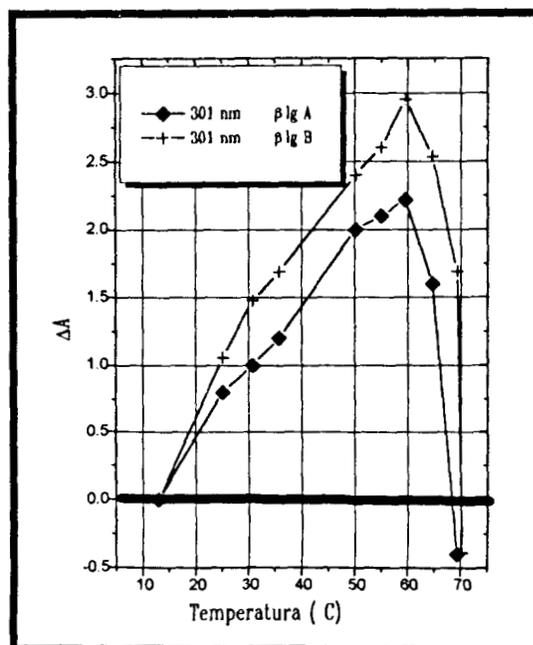


Figura 4.7. Comparación de las bandas positivas exhibidas por las dos variedades de la β -lg.

aminoácidos con densidad de carga positiva. Es quizá este hecho lo que da cuenta de la mayor intensidad de la banda anómala resultante de la β -lg B.

3) La no coincidencia del ΔH_{vH} y el ΔH_{cal} . En los estudios termodinámicos de proteínas, ha sido encontrado que ante un intermediario estable en el proceso de

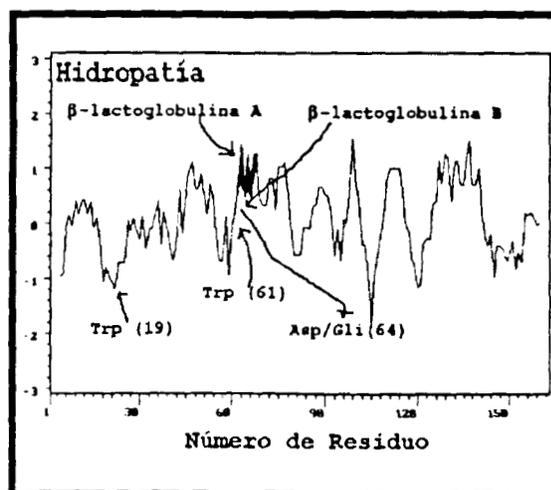


Figura 4.8 Perfil de hidrofobicidad calculado de acuerdo con el método de Hopp y Woods [114]. La ventana utilizada fue de 6 aminoácidos.

desnaturalización, el cambio de entalpía obtenida por métodos indirectos (ΔH_{vH}), tales como los espectroscópicos, es diferente a la medida calorimétricamente (ΔH_{cal}). La relación que conecta ambos cambios de entalpía es [23]:

$$\Delta H_w = \Delta H_D \left(1 - \frac{\sum d(K_i / K_D)(1 - \Delta H_i / \Delta H_D)}{1 + \sum d(K_i / K_D)} - \frac{\sum (1-d)K_i(\Delta H_i / \Delta H_D)}{1 + \sum (1-d)K_i} \right) \quad (1)$$

en donde $d_i(T)$ está definida como:

$$d_i(T) = \frac{Y_i(T) - Y_N(T)}{Y_D(T) - Y_N(T)} \quad (2)$$

Una restricción que, generalmente, observan las proteínas en su desnaturalización, es que

$$0 \leq d_i(T) \leq 1 \quad (3)$$

lo que significa que la propiedad $Y_i(T)$ del estado intermediario i no es menor que Y_N ni mayor que Y_D . De la restricción (3) se desprende que ante la existencia de especies intermedias, aún en los casos límite $d_i(T) = 0$ o $d_i(T) = 1$, el calor de desnaturalización calculado de manera indirecta siempre es menor al medido calorimétricamente.

Para la β -lg B , los datos por EDUV revelaron que, para cualquier longitud de onda, la entalpía de van't Hoff es diferente a la calorimétrica, hecho que tomamos como indicio del carácter complejo del proceso de desnaturalización de esta proteína. Algo que llama poderosamente la atención, es que para $\lambda = 300$ nm, el ΔH_{vH} es superior al ΔH_{cal} , fenómeno muy raramente observado en la interpretación termodinámica de datos espectroscópicos de una proteína. La explicación más plausible del tal "anomalía" radicaría en que el factor $d_i(T)$ no satisface la

condición de la ecuación (3), debido a que la banda positiva es superior tanto a Y_N como a Y_D . Este resultado sugiere que las diferencias de intensidad entre las bandas anómalas de las dos variedades de la β -lg no son un artificio de concentración, sino un fenómeno real debido a la diferencia de ambiente del Trp⁶¹.

CAPÍTULO QUINTO

CONCLUSIONES

§5.1. Desnaturalización de la β -lg.

Los resultados que se desprenden del presente estudio hablan de un modelo complejo de desnaturalización térmica de la β -lg. Esto era previsible, en virtud de que aun cuando han sido practicados un sinnúmero de estudios sobre la estabilidad de esta proteína, la información reportada en la literatura especializada ha distado de brindar un modelo consensual de desplegamiento.

Podemos separar los resultados derivados de nuestra investigación, los podemos separar en dos vertientes: la dependencia, con respecto a la variación de la concentración de protones en el medio, de los cambios de la entalpía de desnaturalización y la temperatura media de transición, y, el patrón de desple-

gamiento de la proteína en un determinado valor de pH.

1. Dependencia de la estabilidad y la cooperatividad con respecto al pH. En el intervalo de pH empleado en los ensayos experimentales ($0.6 < \text{pH} < 3.0$), la β -lg A desplegó tres tipos de tendencias que, al parecer, tienen tres orígenes moleculares diferentes, las cuales las podemos agrupar en los siguientes rubros:

1) El glóbulo fundido. En el intervalo de pH de 0.6 a 1.6 unidades, la β -lg A mostró una clara independencia de la T_m y del ΔH_p con respecto a cambios en el pH, fenómeno debido, aparentemente, a la adquisición de la conformación de glóbulo fundido. Aunque nos proponemos realizar estudios adicionales para corroborar este hallazgo (por ejemplo, el empleo de sondas que fluorescen en ambientes hidrofóbicos), nuestras evidencias actuales de calorimetría y de dicroísmo circular apuntan hacia ese tipo de conformación.

El estado de glóbulo fundido no ha sido reportado para la β -lg por algún otro laboratorio; no obstante, tal conformación ha sido encontrada para otra lipocalina, la RBP, en condiciones muy similares a las que encontramos para la β -lg A [116].

Para la β -lg ha sido encontrado recientemente un tipo de conformación parcialmente plegada como la que nosotros hemos detectado, pero siendo esta conformación perteneciente a un intermediario cinético de plegamiento [114,115].

2) *Evaluación del ΔC_p de desnaturalización.* En el intervalo de pH de 1.6 a 2.3 unidades, la β -lg desplegó una dependencia "canónica" del ΔH hacia la T_m ($\Delta C_p > 0$), posiblemente originada por cambios en la estabilidad y cooperatividad de la molécula al ser modificado el grado de protonación de algunos residuos. El ΔC_p fue de una magnitud pequeña, resultado que es consistente con el tipo de estructura no compacta que poseen las lipocalinas [04,30].

Cabe recordar que el valor específico de este ΔC_p y el número de contactos hidrofóbicos que contabilizamos de la estructura tridimensional de la β -lg A "se ajustan" a la tendencia que describen otras proteínas de naturaleza estructural más compacta [04]. Por otro lado, al efectuar una corrección de la densidad de puentes de hidrógeno para homologar con la densidad de otras proteínas, encontramos que, sin perder de vista las incertidumbres generadas por el conteo de los puentes de hidrógeno, el Δh_p de la β -lg A extrapolado a 110°C converge al mismo punto que el del grupo de proteínas estudiadas por Privalov [30].

Los resultados anteriores nos traen mayor confianza sobre el estudio que hemos practicado. Hacemos este

comentario, en virtud de que han sido realizados intentos de estudios similares al nuestro, pero los autores no han llegado a un resultado consensual. Pensamos que tal ha sido el caso por diferentes razones, que quisiéramos comentar rápidamente.

La β -lg y la α -lactalbúmina constituyen los principales integrantes proteicos de la leche de vaca [57]. Por tanto, estas proteínas han sido del interés de muchos grupos de investigación relacionados con el tratamiento industrial de la leche. La consecuencia de ello, es que los estudios de desnaturalización han sido practicados con concentraciones de proteína "fisiológicas" o incluso mayores [117, 118], valores que resultan muy superiores al umbral que nosotros detectamos para garantizar que no se manifieste el proceso de agregación en las endotermas de desnaturalización de la β -lg A.

Un estudio que llama la atención por el tipo de tendencia obtenida fue realizado con la β -lg mediante EDUV en diferentes valores de pH [57]. La conclusión fue que el pH de mayor estabilidad de la β -lg es de 1.5 unidades; cualquier variación de pH, sea el aumento o disminución de él, lleva a un descenso en la estabilidad y en la cooperatividad de la proteína. Creemos que estos resultados derivaron en un comportamiento contrapuesto al hallado por nosotros debido a: 1) la menor confiabilidad que resulta de determinar indirectamente los parámetros de desnaturalización; 2) la manifestación de agregación las señales de transición en los espectros diferenciales, lo cual puede "enmascarar" de diferente manera los espectros; 3) la simplificación del complejo proceso de desnaturalización de la β -lg a un formalismo de dos estados.

Un trabajo más que es de interés mencionar, fue realizado por Schwarz, en 1990, haciendo uso de un calorímetro

diferencial de barrido [114]. El artículo lleva el pomposo título de "*Biological Thermodynamic Data for the Calibration of Differential Scanning Calorimeters: Heat Capacity Data On the Unfolding Transition of β -lactoglobulin in Solution*". Este autor encontró que en el intervalo de pH de 2.3 a 3.5, la variación del ΔH_p con respecto a la T_m es prácticamente nula. Realizó 85 determinaciones, concluyendo que esta independencia entre los valores termodinámicos se mantiene sin importar la tasa de calentamiento, la concentración de proteína, la composición en variedades, la fuente de extracción o el sistema regulador empleado [114].

En este trabajo, nosotros también encontramos que la concentración *sí* es un factor determinante, que puede distorsionar sensiblemente la forma y el tamaño de los termogramas, lo cual está en concordancia con varios estudios específicos al respecto [115,116].

Una objeción mayor que se le puede encontrar al trabajo de Schwarz es la pureza de proteína que utilizó. De las 85 determinaciones que efectuó, tan sólo 8 (4 para la variedad *A* y cuatro para la *B*) fueron practicados con proteína de alta pureza; en el resto de determinaciones, utilizó proteína con diferente grado de purificación y diferente proporción en la composición de variedades. Debemos recordar que por las propiedades estructurales de la β -lg, es de esperarse pequeños cambios de T_m y de ΔH_p con respecto al pH, por lo que la presencia de contaminantes puede conducir fácilmente a que la tendencia sea enmascarada. Por otro lado, nosotros encontramos que la β -lg *A* y *B* *sí* difieren en cuanto a su estabilidad y cooperatividad, por lo que, si se pretende hacer un estudio fino de una proteína con un patrón de desplegamiento complejo, preparar soluciones con la

mezcla de ambas variedades resulta un desacierto.

Recientemente, Griko y Privalov [119] estudiaron la dependencia de la cooperatividad con respecto a la estabilidad de la β -lg *A*, llegando a un valor de ΔC_p de 1036 cal/°K·mol, magnitud muy cercana a la que nosotros determinamos (1137 cal/°K·mol). Es interesante notar que estos autores lograron cambios en la T_m mediante la variación de la concentración de sales cosmotrópicas, en particular mediante el uso de fosfato de sodio¹ [120].

3) Manifestación de un " ΔC_p aparente" negativo. En el intervalo de pH de 2.3 a 3.0 unidades, observamos el extraño caso de una variación del ΔH_p inversamente proporcional a la T_m , lo cual, en términos de la relación de Kirchoff, indicaría un valor de ΔC_p menor que cero. Este fenómeno, no antes observado en alguna otra proteína, se presenta, al parecer, debido a la contribución que hace al ΔH_p total la energía producida o consumida al protonarse o desprotonarse algún grupo interior de la proteína en tanto ésta se pliega y se despliega.

Infortunadamente, los cambios de tendencias observados para la β -lg *A* ocurrieron en un intervalo de pH muy estrecho y con variaciones de T_m y ΔH_p sutiles, por lo que la incertidumbre al ajustar el modelo no permite validarlo de manera que pudiéramos conjeturar qué tipo de residuo podría estar alterando con su energía de protonación a la entalpía aparente de desnaturalización. Sin embargo, el análisis de los datos parece apuntar claramente a que el grupo químico en cuestión sufre el cambio en el

¹ Una sal cosmotrópica es aquella que estabiliza la estructura nativa o que desestabiliza la conformación desnaturalizada.

estado de protonación sólo cuando la proteína está desplegada. Este resultado es importante, en tanto que indica que la dependencia entre el ΔH_p de *desplegamiento* con respecto a la T_m no se ve afectada (*i.e.*, que no hay un cambio de comportamiento del ΔC_p), sino que se ve "enmascarada" por un fenómeno adicional que no involucra cambios en la relación de cooperatividad y estabilidad de la estructura proteica.

Nuestro resultado de ΔC_p aparente negativo es hasta el momento un caso único en los anales de la Termodinámica de Proteínas, por lo que requiere de una meticulosa y cuidadosa reconfirmación experimental. El tratar de explicar en esta fase de la investigación el por qué este resultado no ha sido detectado para otras proteínas, es sin duda un asunto espinoso. Sin embargo, podemos adelantar dos razones de que la β -lg sí halla exhibido tal comportamiento: en primer lugar, su bajo valor de ΔC_p y su lento aumento de la T_m ante incrementos en el pH, y, en segundo lugar, que su tipo de estructura "laxamente empacada" permite pensar en la posibilidad de cambios locales que no impliquen alteraciones del estado de cooperatividad y organización del resto de la molécula.

De ser cierta nuestra suposición de que después de un pH de 2.4 unidades, al desplegamiento de la molécula se le suma un efecto local, sería de esperarse que si se lograra la variación de la T_m por algún mecanismo diferente al que motiva el cambio en la concentración de protones en el medio, el valor del ΔH_p aparente debería corresponder a la magnitud obtenida por extrapolación usando el ΔC_p desplegado por la β -lg en valores de pH de 1.6 a 2.4 unidades.

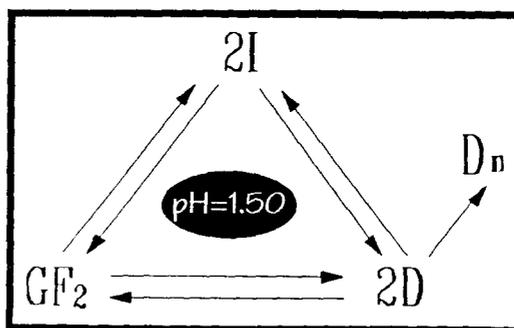
Griko y Privalov [119], usando fosfato de sodio, lograron estabilizar a la β -lg A

obteniendo valores de T_m que corresponden a los que nosotros encontramos en el intervalo de pH de 2.4 a 3.0. Para una solución pH 2.0 0.1M KCl-HCl, y variando la concentración de fosfatos de sodio, estos autores encontraron los siguientes pares de datos T_m - ΔH_p : 78°C/75845cal, 85°C/82125cal, 91.0°C/89372cal.

El ΔH_p que corresponde a la T_m de 78°C es el único valor de Griko y Privalov que podemos comparar directamente con nuestros resultados. Mientras ellos obtienen 75845 cal, el nuestro fue de, aproximadamente, 80000 cal. La diferencia entre estos dos valores los podemos explicar en parte debido a que ellos no emplearon una solución amortiguadora de glicina [04]. Si esta diferencia en el valor de ΔH_p a 78°C fuera eliminada, los ΔH_p obtenidos por Griko y Privalov para T_m mayores coincidirían *notablemente* con los que se obtendrían de extrapolar el comportamiento que desplegó la β -lg A en el intervalo de pH de 1.6 a 2.4 unidades.

II. Modelo de Desplegamiento.

Reuniendo el conjunto de evidencias espectroscópicas y calorimétricas obtenidas a un pH de 1.5, y considerando el estado de agregación de la proteína bajo esas condiciones de pH, proponemos el siguiente mecanismo de desnaturalización para la β -lg:



GF₂ representa a la proteína en el estado de glóbulo fundido, que a pH de 1.5 se encuentra en forma de dímero, **I** al intermediario, ya en forma de monómero, **D** al estado desnaturalizado y **D_n** la forma agregada del estado desnaturalizado.

Parece haber elementos suficientes para sostener el modelo de desnaturalización arriba propuesto. Hemos indicado ya las evidencias espectroscópicas y calorimétricas de que en condiciones de pH muy ácido, la β -lg adopta la organización propia de un glóbulo fundido. La fase final de la alteración térmica que sufre la β -lg consiste en la agregación de la especie desnaturalizada, fenómeno que ha sido estudiado con detalle por otros laboratorios [121], y que muy probablemente es una fuente de incertidumbre en la determinación de los parámetros termodinámicos a través de técnicas espectroscópicas.

La existencia de al menos un intermedio térmico está sustentada en los complejos patrones de desnaturalización exhibidos por técnicas espectroscópicas: 1) comportamientos disímiles de una longitud de onda a otra y de una técnica a otra; 2) no coincidencia en la forma y posición de las curvas que describen la evolución de la población desnaturalizada en función de la temperatura; 3) revelación de tres factores mínimos para reproducir los espectros obtenidos en el ultravioleta cercano (EDUV y DC_{cer}); 4) clara diferencia entre los valores de los parámetros termodinámicos evaluados indirectamente de aquéllos determinados mediante microcalorimetría diferencial de barrido. Y no sólo eso: 5) al parecer, una explicación molecular plausible de los espectros de desnaturalización a partir de la arquitectura de la proteína y de sus características de empaquetamiento, en particular de la asignación de la banda

positiva que aparece a bajas temperaturas al cambio en los niveles energéticos del Trp⁶¹ debido a la pérdida de la conformación nativa del asa externa que comprende los residuos Glu⁵⁵-Glu⁶⁵. Apoyando a esta interpretación molecular, el estudio de las dos variedades de la β -lg parece rendir una prueba sólida: 6) la intensidad de la banda positiva que genera la variedad *A* es diferente a la de la *B* (recuérdese que el ambiente al que está sujeto el Trp⁶¹ en la variedad *A* es de diferente polaridad que el de la *B*, en virtud de la mutación puntual (Asp→Gli)⁶⁴).

Nuestro estudio resulta consistente con los realizados recientemente por otros laboratorios utilizando espectroscopía en el infrarrojo y anticuerpos monoclonales. Kaminogawa *et al.*, a través de anticuerpos monoclonales creados contra la forma nativa y desnaturalizada de la β -lg (reducida y carboximetilada), detectaron que la afinidad de un anticuerpo por la forma nativa se perdía totalmente a los 67-68°C [103]. El epítope de este anticuerpo fue identificado como una zona inmersa en el segmento Lis⁸-Trp¹⁹. Casal *et al.* realizaron un estudio de desnaturalización térmica de la β -lg *B* mediante espectroscopía en el infrarrojo, encontrando que alrededor de los 60°C el espectro cambia de forma debido a la pérdida de hélice α y al aumento de conformación aleatoria [53].

Vale resaltar que la plena manifestación del intermedio detectado por Kaminogawa *et al.* y de Casal *et al.* ocurre en una zona de temperatura en donde se presenta el máximo de la banda positiva.

Conjuntando todos estos estudios, parece como bien establecida la presencia de un intermedio parcialmente plegado en la ruta de desnaturalización térmica de

la β -lg, por lo que resulta natural que las interpretaciones de los resultados obtenidos con diferentes técnicas no calorimétricas hechas bajo la suposición de una sola transición arrojen conclusiones no coincidentes [v. *gr.*, 52, 53, 117, 118].

Al respecto de lo anterior, queremos traer a colación para su aclaración un cuestionamiento. Podría pensarse que la banda positiva no fuera el producto del cambio en la estructura de una zona de la molécula, sino que resulta de la simple separación de los monómeros, los cuales, desde esta perspectiva, tendrían por sitio de unión alguna zona que involucre al asa Glu⁵⁵-Glu⁶⁵. Nuestros datos espectroscópicos, tomados por sí solos, pareciera que son insuficientes para arrojar luz en este respecto. Sin embargo, el hecho de que en ciertas condiciones de pH el dímero de la β -lg *A* sea capaz de tetramerizar, y no así el de la variedad *B*, es un indicio sugerente de que la sola separación de los monómeros no es la causa del cambio de ambiente del Trp⁶¹: la mutación (Asp→Gli)⁶⁴ representa la única diferencia de superficie molecular entre las dos variedades; por tanto, el Asp⁶⁴ debe de ser el residuo que faculta a la variedad *A* para que su dímero tetramerice, lo que significa que la zona próxima a la posición 64 no puede ser el sitio de unión de los monómeros. Por otro lado, estudios mediante espectroscopía en el infrarrojo han indicado que cuando ocurre la formación del dímero, la banda de absorción debida a hoja β plegada "expuesta" disminuye en intensidad, en tanto que la banda que corresponde a la hoja β plegada en conformación antiparalela aumenta [53], lo cual sugiere claramente que el sitio de unión entre los monómeros no es el asa exterior Glu⁵⁵-Glu⁶⁵.

§5.2. Comparación de los patrones de desnaturalización de la β -lg y la GPA α_1 .

Nuestro estudio con la β -lg ha revelado varias "peculiaridades" en cuanto al modelo de desnaturalización y a la dependencia de los parámetros termodinámicos, las cuales distinguen a esta proteína del resto de proteínas. El origen de estas "peculiaridades", al menos de una manera cualitativa, podemos adscribirlo al tipo de geometría que ostenta la β -lg. La interrogante natural que se desprende de esto es saber si este patrón de desnaturalización es exclusivo de la β -lg o es compartido por el resto de miembros de la familia de las lipocalinas. La respuesta a esta pregunta significará el poder tomar o no a este patrón de desnaturalización como un criterio adicional para decidir si una determinada proteína está emparentada estructuralmente con las lipocalinas.

En la figura 5.2 son mostrados los patrones espectroscópicos de desnaturalización térmica de la GPA α_1 obtenidos por Rojo-Domínguez *et al* [45]. En el caso de esta proteína, los experimentos por EDUV también rindieron una banda de absorción diferencial positiva en una zona de temperatura previa a donde ocurre la transición de desplegamiento principal. Esta banda fue adjudicada al cambio de ambiente del Trp¹⁶⁰, ubicado en una zona empacada laxamente cercana al carboxilo terminal, y rodeado por varios residuos altamente polares. En contraste, al parecer la proteína no sufre cambios importantes de estructura secundaria sino hasta que alcanza la temperatura en que la molécula comienza a desplegarse (figura 5.2).

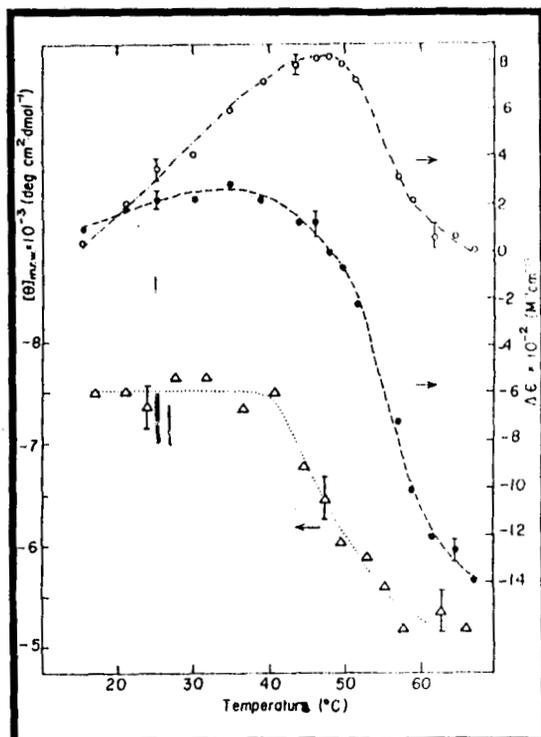


Figura 5.2. Patrones de desnaturalización térmica para la GPA α_1 resueltos por EDUV a 295 nm (o) y a 284 nm (•), y por DC a 220 nm (Δ). Tomado de [45].

Es evidente que los resultados obtenidos de la GPA α_1 son muy semejantes a los de la β -lg. La propiedad principal que se desprende para ambas proteínas, es el poseer segmentos de la cadena polipeptídica que están empaquetadas laxamente, los cuales pierden su conformación nativa en una temperatura inferior a la que ocurre el desplegamiento general de la proteína, originando un intermediario parcialmente plegado que conserva un contenido de estructura secundaria muy semejante al de la estructura nativa.

Una de las características más resaltantes comunes a los patrones espectroscópicos de desnaturalización térmica de ambas proteínas, es la banda diferencial positiva, la cual resultó un indicio directo de la presencia de un intermediario parcialmente plegado. Infortunadamente, no es posible suponer a

esta banda como un fenómeno común al grupo de las lipocalinas, puesto que su manifestación depende de la "afortunada" disposición de algún triptofano en una zona poco compacta y de ambiente muy polar, por lo que no sería de esperarse que *necesariamente* todas las lipocalinas la exhiban.

No obstante, aunque no es de esperarse que todas las lipocalinas desarrollen una banda diferencial positiva debido a un influjo térmico, sí es de esperarse que sus patrones espectroscópicos revelen las siguientes características:

- 1) Patrones de desnaturalización complejos en EDUV, no siendo posible describir los espectros a través de exclusivamente dos especies moleculares espectroscópicamente independientes.
- 2) Obtención de curvas que describen la evolución de la población de estado desnaturalizado que divergen en forma y posición de una longitud de onda a otra. En consecuencia, valores de ΔH_{vH} que dependen de la longitud de onda elegida para realizar el estudio.
- 3) Espectros por DC_{lej} que revelen la presencia de tan sólo dos contribuyentes espectroscópicos. En este caso, es de esperarse que la forma y la posición de las curvas f_D vs T no dependan de la longitud de onda con la que se analice el proceso.
- 4) Alejamiento de un modelo de dos estados al efectuarse la desnaturalización con agentes caotrópicos².
- 5) Independientemente de la técnica experimental empleada, no coincidencia entre el ΔH_{vH} evaluado indirectamente y el determinado mediante calorimetría.

Con respecto al último punto, aunque se cuenta exclusivamente con la evaluación calorimétrica de la β -lg, es de

² Aunque en nuestro trabajo no incluimos estudios por desnaturalización con un agente caotrópico, un resultado semejante al de la GPA α_1 fue obtenido por Pace [xx] con la β -lg haciendo uso de urea e hidrocloreuro de guanidinio.

esperarse, por la presencia del intermediario, que la característica 5 sea cumplida por todas las lipocalinas.

6) Valores de ΔC_p y Δh_p^* inferiores a los que poseen proteínas compactas. Estos dos aspectos podrían significar un valor de Δh_p^* y de temperatura de convergencia T^* exclusivo de las lipocalinas.

Las características anteriores podrán ser confirmadas y refinadas en tanto sean realizados con otros miembros de las lipocalinas más estudios como los efectuados en la presente investigación. En particular, se resiente la falta de datos calorimétricos.

§5.3. Comentarios Finales.

Durante varios años fue fuertemente cuestionada la posibilidad de que una proteína pudiera adquirir una conformación parcialmente plegada que a la vez fuera estable. Con las fehacientes demostraciones que se han hecho sobre la existencia del glóbulo fundido [37,38], esta posición sobre el modelo de dos estados ha tenido que ser flexibilizada, habiendo sido hecho intentos para predecir a través de la termodinámica estadística la presencia, bajo ciertas condiciones particulares, del glóbulo fundido [39].

Sin embargo, aún persiste el debate al respecto de si el comportamiento de dos estados es la norma general que rige el desplegamiento de una proteína, siendo el glóbulo fundido una excepción a la regla [34], o, en realidad, el que en la mayoría de casos la desnaturalización de la proteína haya sido apropiadamente descrita a través de las unidades cooperativas de desplegamiento, se deba a

las particulares condiciones experimentales [119].

Se precisa de mayor acopio de evidencias experimentales para resolver tal cuestión. No obstante, el número de casos reportados de conformación glóbulo fundido va en vertiginoso aumento [21], fenómeno que resulta de que ahora se tenga la atención abierta hacia la posibilidad de que una proteína pueda presentar intermediarios parcialmente plegados.

Para el caso de la β -lg A, aparentemente hemos encontrado condiciones en las cuales la proteína se transforma en un glóbulo fundido (alta acidez y baja concentración de sales). Este hallazgo tiene una importancia doble: 1) la reconfirmación de que una lipocalina si puede configurarse en una estructura parcialmente plegada [116], y 2) el intermediario térmico detectado por medios espectroscópicos surge de cambios en la estructura terciaria de una estructura parcialmente plegada.

Algunos investigadores creen que el glóbulo fundido es un intermediario de plegamiento "universal" [21]. Al respecto de esto, han sido presentadas convincentes pruebas de la equivalencia estructural entre intermediarios cinéticos y glóbulos fundidos [21]. Sin embargo, ¿el glóbulo fundido es el único tipo de intermediario parcialmente plegado que puede adquirir un *statu* de estabilidad? Nuestro trabajo ha mostrado que, al menos para las lipocalinas, es posible derivar distintos intermediarios que surgen de diferentes mecanismos de alteración estructural. Después de cierto valor umbral, la β -lg A, ante un aumento en la concentración de protones en el medio, responde mostrando alteraciones en la estructura terciaria de toda la molécula; ante un incremento en la velocidad promedio de los átomos, la

proteína sufre cambios estructurales locales en zonas laxamente empacadas. Este par de atributos, presumiblemente hacen de la β -lg, y quizá de todo el grupo de las lipocalinas, una fuente muy rica de información para ayudar a desentrañar el enigma del código de plegamiento de las proteínas.

Bibliografía

- [01] Creighton, T. E. (1992) *Mundo Científico* 11(113): 500-509.
- [02] Levinthal, C. (1969) en: *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems* (Debrunner, P., Tsibris, J. C. M. y Münck, E., eds.) University of Illinois Press, Urbana. pp. 22-24.
- [03] Gurd, F. R. N. y Rothgeb, T. M. (1979) *Adv. Protein Chem.* 33: 73-165.
- [04] Privalov, P. L. (1979) *Adv. Protein Chem.* 33: 167-241.
- [05] Zwanzig, R., Szabo, A. y Bagchi, B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 20-22.
- [06] Perutz, M. F. (1980) en: *Protein Folding* (Jaenicke, R., ed.) Elsevier Amsterdam-New York-North Holland
- [07] Anfinsen, C. B. (1973) *Science* 181(4096): 223-230
- [08] Creighton, T. E. (1990) *Biochem J.* 270: 1-16.
- [09] Jeanicke, R. (1991) *Biochemistry* 30: 3147-3161.
- [10] Sander, C., Vriend, G., Bazan, F., Horovitz, A., Nakamura, H., Ribas, L., Finkelstein, A. V., Lockhart, A., Merkl, R., Perry, L. J., Emery, S. C., Gaboriaud, C., Marks, C., Moulton, J., Verlinde, C., Eberhard, M., Elofsson, A., Hubbard, T. J. P., Regan, L., Banks, J., Jappelli, R., Lesk, A. M. y Tramontano, A. (1992). *Proteins* 12: 105-110.
- [11] Tanford, C. (1968) *Adv. Protein Chem.* 23: 121-282.
- [12] Tanford, C. (1968) *Adv. Protein Chem.* 24: 1-95.
- [13] Fasman, G. D. ed. (1989) *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Plenum, New York.
- [14] Doolittle, R. F. (1981) *Science* 214: 149.
- [15] Langone, J. J. (cd.) (1991) **Molecular Design and Modeling** *Methods Enzym.* 222.
- [16] Clore, G. M. y Gronenbom, A. M. (1991) *Science* 25: 1390-1399.
- [17] Jeanicke, R. (1998) *Naturwissenschaften* 75: 604-610.
- [18] Plumm, M., Luchins, J. y Beychok, S. (1986) *Methods Enzym.* 130: 519-534.
- [19] Pace, C. N. (1975) *Critical Rev. Biochem.* 6: 5-41.
- [20] Privalov, P. L. (1989) *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 18: 47-69.
- [21] Ptitsyn, O. B. (1992) en: **Protein Folding** (Creighton, T. E., ed.) Freeman New York pp. 243-300.
- [22] Anson, M. L. y Mirsky, A. E. (1934) *J. Gen. Physiol.* 17: 393-398.
- [23] Cantor, C. R. y Schimmel, P. R. (1980) **Biophysical Chemistry. II.** W. H. Freeman, New York.
- [24] Tanford, C. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* 84: 4240-4247.
- [25] Nosaki, Y. y Tanford, C. (1963) *J. Biol. Chem.* 238(12): 4074-4081.
- [26] Privalov, P. L. y Khechinashvili, N. N. (1974) *J. Mol. Biol.* 86: 665-684.
- [27] Freire, E. y Biltonen, R. L. (1979) *Biopolymers* 17: 463-479.
- [28] Freire, E. (1989) *Comments Mol. Cell. Biophys.* 6: 123-140.
- [29] Privalov, P. L. y Makhatadze, G. I. (1990) *J. Mol. Biol.* 213: 385-391.
- [30] Privalov, P. L. y Gill, S. J. (1988) *Adv. Protein Chem.* 39: 191-234.
- [31] Murphy, K. P. y Freire, E. (1992) *Adv. Protein Chem.* 43: 313-361.
- [31] Privalov, P. L. y Makhatadze, G. I. (1992) *J. Mol. Biol.* 224: 715-723.
- [32] Freire, E. y Murphy, K. P. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 687-698.
- [33] Freire, E., Murphy, K. P., Sanchez-Ruiz, J. M., Galisteo, M. L. y Privalov, P. L. (1992) *Biochemistry* 31: 250-256.
- [34] Freire, E., Haynie, D. T. y Xie, D. (1993) *Proteins* 17: 111-123.
- [35] Murphy, K. P., Bhakuni, V., Xie, D. y Freire, E. (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 293-306.
- [36] Hughson, F. M. y Baldwin, R. L. (1989) *Biochemistry* 28: 4414-4422.
- [37] Ptitsyn, O. B. (1987) *J. Protein Chem.* 6: 272-293.
- [38] Ohgushi, M. y Wada, A. (1983) *FEBS Lett.* 164: 21-24.
- [39] Haynie, D. T. y Freire, E. (1993) *Proteins* 16: 115-140.
- [40] Robbins F. M. y Holms, L. G. (1970) *Biochem. Biophys. Acta* 221: 234-240.
- [41] Zhao J. M. y London, E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2002-2006.
- [42] Griko, Y., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y. y Kutysenko, V. P. *J. Mol. Biol.* (1988) 202: 127-138.
- [43] Herold, M. y Kirschner, K. (1990) *Biochemistry* 29: 1907-1913.

- [44] Rojo-Domínguez, A. (1988) **Determinación de los parámetros termodinámicos de la estabilidad de la glicoproteína α_1 y su implicación en las características estructurales de la molécula.** Tesis de Maestría en Química, U.A.M. Iztapalapa, México, D.F.
- [45] Rojo-Domínguez, A., Zubillaga-Luna, R. A. y Hernández-Arana, A. (1990) *Biochemistry* 29: 8689-8696.
- [47] Sturtevant, J. M. (1987) *Ann. Rev. Phys. Chem.* 38: 463-468.
- [48] Rojo-Domínguez, A. y Hernández-Arana, A. (1993) *Protein Seq. Data Anal.* 5: 349-355.
- [49] Xu, Z., Bermlohr, D. A. y Banaszak, L. (1992) *Biochemistry* 31: 3484-3492.
- [50] Pevsner, J., Reed, R. R., Feinstein, P. G., Snyder, S. H. (1988) *Science* 241: 336-339.
- [51] Schulz, G. E. (1988) *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 17: 1.
- [52] Kella, N. K. y Kinsella, J. E. (1988) *Biochem. J.* 255: 113-120.
- [53] Casal, H., Köhler, U. y Manstch, H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 957: 11-20.
- [54] Chen, A. K. y Woody, R. W. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* 93: 29-37.
- [55] Hennessey, J. P. y Johnson, W. C. (1981) *Biochemistry* 20: 1085-1094.
- [56] Hennessey, J. P. y Johnson, W. C. (1982) *Anal. Biochem.* 125: 177-188.
- [57] McKenzie, H. A. (1971) en *Milk Proteins (Vol. II)* (McKenzie, H. A., ed.), pp. 257-331., Academic Press, Nueva York.
- [58] Bell, K., McKenzie, H. A., Muller, V., Rogers, C. y Shaw, D. C. (1981) *Comp. Biochem. Physiol.* 68B: 225-236.
- [59] Conti, A., Godovac-Zimmerman, J., Pirchner, F., Napolitano, J., y Braunitzer, G. (1986) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369: 171-179.
- [60] Pervaiz, S. y Brew, K. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 846-854.
- [61] Braunitzer, G., Chen, R., Schrank, B. y Stangl, A. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353: 832-834.
- [62] Palmer, A. H. (1934) *J. Biol. Chem.* 104: 359-372.
- [63] Newcomer, M. E., Jones, T. A., Åqvist, J., Sundelin, J., Eriksson, U., Rask, L. y Peterson, P. A. (1984) *EMBO J.* 3: 1451-1454.
- [64] Monaco, H. L., Zanotti, G., Spadon, P., Bolognesi, M., Sawyer, L. y Eliopoulos, E. E. (1987) *J. Mol. Biol.* 197: 695-706.
- [65] Sawyer, L., Papiz, M. Z., North, A. C. T. y Eliopoulos, E. E. (1985) *Biochem. Soc. Trans.* 13(1): 265-266.
- [66] Batt, C. A., Rabson, L. D., Wong, D. W. S. y Kinsella, J. E. (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54(4): 949-955.
- [67] Totsuka, M., Katakura, M., Kumagai, I., Miura, K., Kaminogawa, S. (1990) *Agri. Biol. Chem.* 54(12): 3111-3116.
- [68] Bell, K. (1962) *Nature* 195:705.
- [69] Alexander, S. S. y Pace, C. N. (1971) *Biochemistry* 10(14): 2738-2743.
- [70] Trece, J. M., Sheinson, R. S. y McMeekin, T. L. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 108: 99.
- [71] Tanford, C., Bunville, L. G. y Nozaki, Y. (1959) *J. Am. Chem. Soc.* 81: 4032-4036.
- [72] Timasheff, S. N. y Townend, R. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83: 470-473.
- [73] Timasheff, S. N. y Townend, R. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83: 464-469.
- [74] Bevington, P. R. (1969) **Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences** Mc Graw-Hill U.S.A.
- [75] Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. y Kraulis, P. J. (1986) *Nature* 324: 383-385.
- [76] Fugate, R. D. y Song, P. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* 625: 28-42.
- [77] Pérez, M. D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J. M., Oria, R. y Calvo, M. (1990) *Cell. Mol. Biol.* 36: 205-212.
- [78] Aschaffenburg, R. y Drewry, J. (1957) *Biochem. J.* 65: 273-277.
- [79] Reddy, I. M., Kella, N. K. D., y Kinsella, J. E. (1988) 36: 737-741.
- [80] Chobert, J. M., Dalgalarrodo, M., Dufour, E., Bertrand-Harb, C. y Haertlé, T. (1991) *Biochem. Biophys. Acta* 1077: 31-34.
- [81] Pérez, M. D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J. M., Oria, R. y Calvo, M. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1123: 151-155.
- [82] Godovac-Zimmerman, J. (1988) *Trends Biochem. Sci.* 13: 64-66.
- [83] Cowan, S. W., Newcomer, M. E. y Jones T. A. (1990) *Proteins* 8:44-61.
- [84] Pervaiz, S. y Brew, S. (1987) *FASEB J.* 1: 209-214.
- [85] Åkerström, B. y Logdberg, L. (1990) *TIBS* 15: 240-243.
- [86] Huber, R., Schneider, M., Epp, O., Mayr, I., Messerschmidt, A., Plugraht, J. y Kayser, H. (1987) *J. Mol. Biol.* 195: 423-434.
- [87] Holden, H. M., Rypniewski, W. R., Law, J. H. y Rayment, I. (1987) *EMBO J.* 6: 1565-1570.
- [88] Pervaiz, S. y Brew, K. (1985) *Science* 228: 335-341.

- [89] Townend, R., Kumosinski, T. F. y Timasheff, S. N. (1967) *J. Biol. Chem.* 242(19): 4538-4545.
- [90] Imanaka, T. (1990) en *Enzyme Engineering* (Okada, H., Tanaka, A. y Blanch, H. W., eds.) *Ann. New York Acad. Sci.* 613: 347-351.
- [91] Gachon, A. M. F. (1993) *TIBS* 18: 206-207.
- [92] Böcskei, Z. (1992) *Nature* 360: 186-188.
- [93] Richards, F. M. (1977) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 6: 151-176.
- [94] Murphy, K. P. y Gill, S. J. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 699-709.
- [95] Davis, B. J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404.
- [96] Rojo Domínguez, A., Solís Mendiola, S., Zubillaga Luna, A. y Hernández Arana A. (1990) *Rev. Latinoamer. Quím.* 21: 48-51.
- [97] Sawyer, H. W. (1968) *J. Dairy Sci.* 51: 323-330.
- [98] Freire, E., Haynie, D. T. y Xie, D. *Proteins* 17:111-123.
- [99] Goto, Y. y Fink, A. L. (1989) *Biochemistry* 28: 945-952.
- [100] Goto, Y., Calciano, L. J. y Fink, A. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 573-577.
- [101] Goto, Y., Takahashi, N. y Fink, A. L. (1990) *Biochemistry* 29: 3480-3488.
- [102] Hooker, T. M. y Schellman, J. A. (1970) *Biopolymers* 9: 1319-1348.
- [103] Kaminogawa, S., Shimizu, M., Ametani, A., Hattori, M., Ando, O., Hachimura, S., Kakamura, Y., Totsuka, M. y Yamauchi, K. (1989) *Biochem. Biophys. Acta* 998: 50-58.
- [104] Atkins, P. W. (1991) *Fisicoquímica* Addison Wesley U. S. A.
- [105] Donovan, J. W. (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 1961-1967.
- [106] Wetlaufer, D. B. (1962) *Adv. Protein Chem.* 17: 303-350.
- [107] Schmid, F. X. (1987) en *Protein Structure "A Practical Approach"* (Creighton, T. A. ed.) IRL Press, London.
- [108] Bayley, P. (1980) en *An Introduction to Spectroscopy for Biochemists* (A. Klemzeller, Ed.) Academic Press.
- [109] Japan Spectroscopic Co., LTD. Instruction Manual (1985) Tokio, Japón.
- [110] Andrews, L. J. y Forster, L. S. (1972) *Biochemistry* 11: 1875-1882.
- [111] García Hernández, E., Rojo Domínguez, A., Padilla Zúñiga, J. y Hernández Arana, A. (1993) *Memorias del VII Simposio de Estudiantes de Posgrado en Química "Fernando Romo"* UAM, México, D.F., pp.60-67.
- [112] García Hernández, E., Rojo Domínguez, A., Padilla Zúñiga, J. y Hernández Arana, A. (1993) *Memorias del VII Simposio de Estudiantes de Posgrado en Química "Fernando Romo"* UAM, México, D.F., pp.52-59.
- [113] Hopp, T. P. y Woods, K. R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3824-3828.
- [114] Kuwajima, K., Yamaya, H., Miwa, A., Sugai, S. y Nagamura, T. (1987) *FEBS Lett.* 1: 115-118.
- [115] Ptitsyn, O. B., Pain, P. H., Semisotnov, G. V., Zerovnik, E. Y Razgulyaev, D. I. (1990) *FEBS Lett.* 262: 20-24.
- [116] Bychkova, V. E., Berni, R., Rossi, G. L., Kutushenko, V. P. y Ptitsyn, O. B. (1992) *Biochemistry* 31: 7566-7571.
- [117] Relkin, P. Eynard, L. y Launay, B. (1992) *Thermochimica Acta* 204: 111-121.
- [118] de Wit, J. M. y Swinkels, G. A. M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 624: 40-50.
- [119] Griko, Y. V. y Privalov, P. L. (1992) *Mol. Biol.* 26: 121-126.
- [120] Arakawa, T. y S. N. Timasheff (1984) *Biochemistry* 23: 5924-5929.
- [121] Relkin, P. y Launay, B. (1991) *J. Thermal Analysis* 37: 1887-1895.
- [122] Shakhnovich, E. I. y Finkelstein, A. V. (1989) *Biopolymers* 28: 1667-1680.

EL JURADO DESIGNADO POR EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA,
APROBO EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS EL DIA 12 DE MAYO DE 1994.



DR. ARTURO ROBO DOMINGUEZ



DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA



DR. ALBERTO HAMABATA NISHIMUTA