



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA

CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

CARACTERIZACION TERMODINAMICA
DE LA ASOCIACION ACTINIDINA-CISTATINA

T E S I S
Q U E P R E S E N T A
Q. MARICELA NERIA RIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN QUIMICA

MEXICO, D. F.

OCTUBRE 1999

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Rafael Zubillaga Luna en el Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

DEDICATORIAS

*A MIS PADRES Y HERMANOS POR SU
COMPRENSIÓN Y PACIENCIA*

*A MI QUERIDISIMA PROFESORA LOURDES ORTIZ ROSAS
POR SU CARINO Y APOYO*

AGRADECIMIENTOS

AL DR. RAFAEL ZUBILLAGA LUNA POR SU COMPRENSIÓN Y APOYO

A LA M. en C. JAQUELINE PADILLA ZUÑIGA POR SU TIEMPO Y AYUDA

A LOS SINODALES POR CONTRIBUIR A TENER MAS CONOCIMIENTOS

A TODAS LAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA MANERA SIEMPRE ESTUVIERON AL PENDIENTE DE MI

EN ESPECIAL AL DR. SALVADOR TELLO Y A LA Q. LOURDES VAZQUEZ POR SU GENEROSA AYUDA EN LA PURIFICACIÓN DE LA ACTINIDINA

AGRADEZCO EL APOYO ECONÓMICO BRINDADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, CONACyT, A TRAVÉS DE LA BECA DE MAESTRÍA CON No. DE REGISTRO 84680.

LISTA DE ABREVIATURAS

K_d	constante de disociación
K_u	constante de unión o asociación
pI	punto isoeléctrico
E_T	concentración total de proteína (o enzima)
I_o	concentración de inhibidor en la solución titulante
I_T	concentración total de ligando (o inhibidor)
F_{TE}	intensidad de fluorescencia de la actinidina libre
F_{TI}	intensidad de fluorescencia de la cistatina libre
F	intensidad de fluorescencia de la mezcla actinidina-cistatina
ΔG_u	energía libre de unión
ΔH_u	entalpía de unión
ΔS_u	entropía de unión
$\Delta C_{p,u}$	cambio en la capacidad calorífica debido a la unión
ASA	área accesible al disolvente
ΔASA	cambio en área accesible al disolvente
ΔASA_{ap}	cambio en área apolar accesible al disolvente

ΔASA_{pol}	cambio en área polar accesible al disolvente
ΔH_{des}	entalpía de desolvatación
ΔH_{EI}	entalpía de interacción enzima-inhibidor
$\Delta H_{des,pol}$	entalpía de desolvatación de áreas polares
$\Delta H_{des,ap}$	entalpía de desolvatación de áreas apolares
$\Delta H_{EI,pol}$	entalpía de interacción de grupos polares en la interfase enzima-inhibidor
$\Delta H_{EI,ap}$	entalpía de interacción de grupos apolares en la interfase enzima-inhibidor
ΔS_{pol}	entropía de desolvatación de área polar
ΔS_{ap}	entropía de desolvatación de área apolar
ΔS_{conf}	entropía conformacional
ΔS_{t-rot}	entropía traslacional-rotacional del complejo
$\lambda_{m\acute{a}x}$	longitud de máxima absorción o emisión
$\epsilon_{m\acute{a}x}$	coeficiente de absorbitividad a $\lambda_{m\acute{a}x}$
Φ_F	rendimiento cuántico
τ_F	tiempo de relajación del proceso de fluorescencia

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Proteasas cisteínicas	1
1.1.1 Inhibidores químicos reversibles	2
1.1.2 Inhibidores biológicos	3
1.2 Descripción termodinámica de la asociación enzima-inhibidor	6
 OBJETIVO	 7
 2. MATERIALES Y MÉTODOS	 8
2.1 Aislamiento y purificación de la actinidina	8
2.2 Ensayo de actividad proteolítica	9
2.3 Concentración de proteínas	10
2.4 Electroforesis	10
2.5 Titulación fluorométrica	11
2.6 Análisis de estructuras moleculares	13
 3. RESULTADOS	 15
 4. DISCUSIÓN	 25
 5. CONCLUSIONES	 32
 6. PERSPECTIVAS	 32
 APÉNDICE I	 33
Fluorescencia	33
Espectros de excitación y de emisión	35
Rendimiento cuántico	36

Procesos de apagamiento específico	37
Fluoróforos naturales	37
Efecto del medio ambiente sobre $\lambda_{\text{máx}}$	38
Efecto del medio ambiente sobre la intensidad de la fluorescencia	39
APÉNDICE II	40
APÉNDICE III	44
REFERENCIAS	46

INTRODUCCIÓN

La actividad proteolítica de todos los seres vivos recae en cuatro clases de proteasas: las aspárticas, las serínicas, las metaloproteasas y las cisteínicas (Avilés, 1993), las cuales poseen un residuo de aspartato, serina, grupo metálico o cisteína en su sitio activo, respectivamente. En nuestro laboratorio estamos particularmente interesados en estudiar una parte de la familia de las proteasas cisteínicas.

1.1 PROTEASAS CISTEÍNICAS.

Entre las proteasas cisteínicas de origen vegetal se encuentran la papaína, la actinidina, la ficina, la bromelaína, la caricaína y la quimopapaína, y dentro del tipo animal se encuentran las catepsinas que se supone tienen un origen común y se consideran como parte de la familia de la papaína. Se conocen ya las estructuras cristalográficas de la papaína (Kamphuis *et al.*, 1984), la actinidina (Baker, 1980), la caricaína (Pickersgill *et al.*, 1991) y la catepsina B humana (Musil *et al.*, 1991); recientemente la estructura de la quimopapaína ha sido resuelta por cristalografía de rayos X (Maes *et al.*, 1996). La comparación de las estructuras cristalográficas de actinidina y papaína revela un alto grado de homología estructural, pues sus cadenas principales son prácticamente superponibles.

El porcentaje de identidad de la actinidina con respecto a la papaína, a la caricaína y a la quimopapaína es 62, 65 y 66 %, respectivamente (programa Maxhom, que pertenece al paquete de programas PHD) (Sander y Schneider, 1991).

La papaína contiene 212 residuos y una masa molecular de 23 400 Da mientras que la actinidina (del fruto de kiwi) está compuesta de 220 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 23 500 Da. Se conocen las estructuras tridimensionales de estas dos proteasas cisteínicas. Estas estructuras han mostrado que las regiones del sitio activo de las dos enzimas son muy similares, la única diferencia significativa es la hidrofobicidad de la cavidad del subsitio S2. Un primer cambio es que el residuo de Ser-205 (al final de este subsitio) en papaína está ocupado por Met-211 en la actinidina, haciendo el hueco notablemente más corto. Otras diferencias son que el residuo Trp-69 en papaína es reemplazado por Tyr-69 en actinidina y que los residuos Pro-6, Phe-207 y Val-133 en papaína son

reemplazados por Ile-70, Ser-213 y Ala-136 respectivamente, en actinidina (Bjork y Ylinenjarvi, 1990).

Las proteasas cisteínicas (o sulfhidríticas) son abundantes en las células y juegan papeles importantes en procesos de proteólisis intracelular tales como el catabolismo de proteínas y péptidos y en el procesamiento de prohormonas y zimógenos o en la degradación extracelular de colágeno. Ahora es bien conocido que una deficiente regulación de la actividad enzimática de estas proteasas causa serias enfermedades tales como distrofia muscular y osteoporosis (Yamamoto *et al.*, 1992).

Una gran variedad de procesos fisiológicos dependen de interacciones de ligandos con macromoléculas, especialmente con proteínas. Las más comunes son interacciones entre enzimas y sus substratos y con otras moléculas reguladoras como los inhibidores, que presenten cierta afinidad por dichas enzimas.

Algunos de estos inhibidores son de tipo biológico, ya que pueden intervenir en procesos fisiológicos como la regulación de la actividad enzimática de muchas proteasas, aunque también existen agentes bloqueadores sintetizados químicamente, que han sido aprovechados en algunas reacciones *in vitro*. De esta manera, los inhibidores pueden clasificarse en biológicos y químicos.

1.1.1 Inhibidores químicos reversibles.

Existen pocos agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo que pueden eliminarse reversiblemente por agentes reductores suaves que contienen grupos –SH, como el ditiotreitól o el β -mercaptoetanol. Dentro de estos bloqueadores se encuentran por ejemplo el 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) (Ellman, 1959), el metilmetanotiosulfonato (MMTS) (Smith *et al.*, 1975) y el tetratiónato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$) (Lundblad, 1991) (ver Tabla 1).

El grupo sulfhidrilo del sitio activo de una proteasa cisteínica participa como nucleófilo en el mecanismo catalítico, por ello, si estos agentes químicos bloquean este sulfhidrilo eliminan la actividad enzimática.

Tabla 1.
Inhibidores Químicos Reversibles de Enzimas Cisteínicas

Nombre del agente	Fórmula del agente bloqueador	Enzima inactiva
5,5'-ditiobis(ácido 2 – nitrobenzoico)	$\text{NO}_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-S-S-C}_6\text{H}_3\text{-NO}_2$ $\begin{array}{cc} & \\ \text{COOH} & \text{COOH} \end{array}$	$\text{Enz-S-S-C}_6\text{H}_3\text{-NO}_2$ $ $ COOH
Metilmetanotio-sulfonato	$\text{CH}_3\text{-S-SO}_2\text{-CH}_3$	Enz-S-S-CH_3
Tetracionato de sodio	$\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$	Enz-S-SO_3^-

1.1.2 Inhibidores biológicos

En los últimos diez años el descubrimiento de nuevos inhibidores proteicos de las proteinasas cisteínicas, llamados cistatinas, reveló otras funciones reguladoras sobre las proteasas. Estos inhibidores pueden proteger a las células contra la acción no controlada de proteasas endógenas y exógenas, debido a que forman uniones reversibles con las proteasas. Las cistatinas forman parte de una superfamilia de proteínas inhibidoras con gran homología en su secuencia de aminoácidos, la cual está subdividida en tres familias: las estefinas, las cistatinas y los quinínógenos (Turk y Bode, 1991).

El nombre cistatina fue primeramente usado por Barrett (Turk y Bode, 1991) para describir un inhibidor que había sido descubierto y parcialmente caracterizado proveniente del huevo de pollo. Posteriormente se obtuvo la cistatina C humana proveniente de plasma seminal, líquido cerebrospinal, saliva y orina.

La principal característica de los inhibidores de la familia de las cistatinas es la presencia de dos enlaces disulfuro localizados cerca del extremo carboxilo-terminal. Estas proteínas están compuestas de alrededor de 115 residuos de aminoácidos con una masa molecular aproximada de 13 000 Da.

La cistatina de pollo, la más conocida, fue aislada como una mezcla de dos formas con diferente carga eléctrica neta y con secuencias de aminoácidos

idénticas; una forma no fosforilarizada con pI de 6.5 y otra fosforilarizada con pI de 5.6 (Turk y Bode, 1991). La cistatina de pollo también ha sido cristalizada y su estructura tridimensional determinada (Bode *et al.*, 1988).

Hay dos regiones en la cadena polipeptídica cuyas secuencias de aminoácidos se repiten en las 3 familias (estefinas, cistatinas y quinínógenos): un residuo de Gly en la región amino-terminal y una secuencia Gln-Val-Val-Ala-Gly (QVVAG) en la región central. Estos sitios parecen ser importantes para la unión a proteasas, a juzgar por los análisis de la estructura cristalográfica de la cistatina y del complejo de papaína con estefina B (Bode *et al.*, 1988; Stubbs *et al.*, 1990)

Las propiedades espectroscópicas del residuo de triptofano 104 de la cistatina (localizado cerca del residuo Gly-9 y la secuencia conservada Gln-Leu-Val-Ser-Gly) y de los residuos Trp-69, Trp-177, Trp-26 y Trp-181 de la papaína, son afectados por la interacción entre ambas proteínas (Lindahl *et al.*, 1988).

El segmento de péptidos Gln-53 a Gly-57 se encuentran dentro de una primera asa y el residuo de Trp-104 esta contenido en la segunda asa (Figura 1). Ambas asas y el amino terminal forman un borde cuneiforme hidrofóbico que es altamente complementario al sitio activo hendido de la papaína. Las dos asas tienen la forma y el tamaño apropiado para ocupar la parte más abierta del sitio activo, que representan los subsitios S1' - S2'. El segmento amino terminal de cistatina (Gly-9, Ala-10) esta demasiado lejos y tiene una conformación inapropiada para ser atacada por el sitio activo Cys-25 de la papaína. El Trp-104 juega un papel importante en la unión de la proteasa (Turk y Bode, 1991).

La estequiometría de unión de la cistatina a la papaína es de 1:1. La afinidad de la cistatina por la papaína es mayor ($K_d \sim 60$ fM) que por la actinidina ($K_d \sim 5$ nM), la diferencia en afinidad corresponde a una diferencia en las energías libres de unión de - 85 a - 57 kJ/mol (Bjork y Ylinenjarvi, 1990). Estudios realizados con una cistatina carente de su octapéptido N-terminal (Abrahamson *et al.*, 1987; Machleidt *et al.*, 1989) parecen indicar que las interacciones entre Leu-8 en cistatina y el subsitio S2 de papaína confieren apreciable estabilidad al complejo papaína-cistatina, mientras que las correspondientes interacciones en el complejo actinidina-cistatina son mucho más débiles.

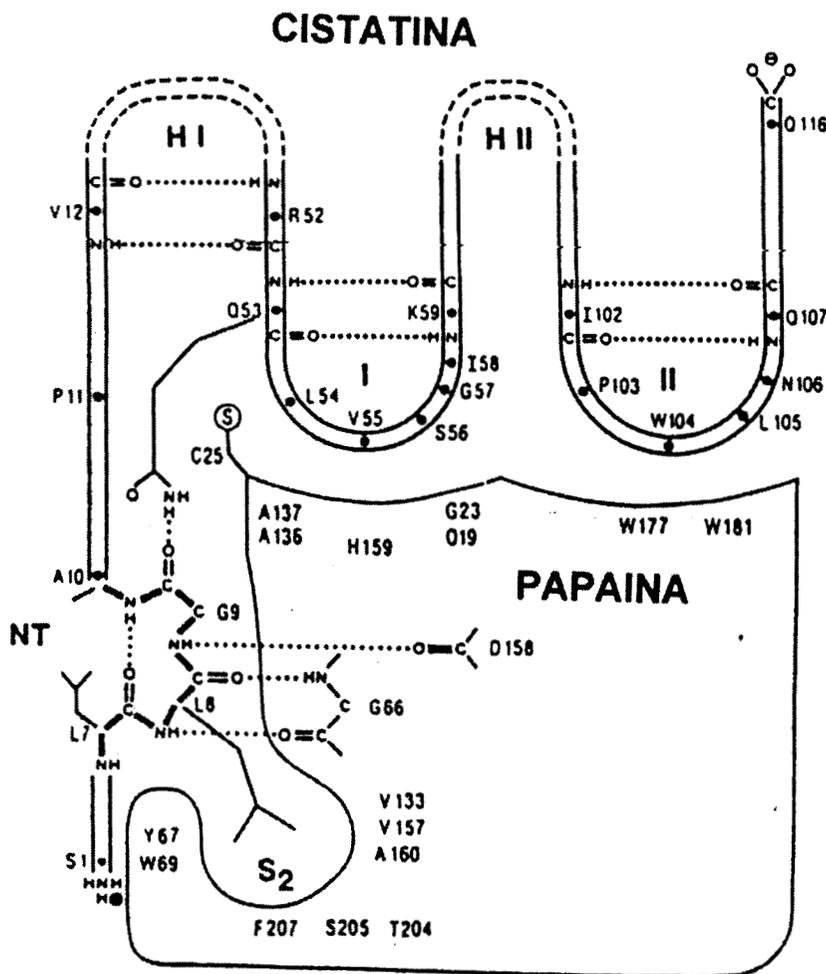


Figura 1. Esquema del modelo propuesto para la interacción de cistatina con papaína. H I, H II, primera y segunda hélice; I, primera asa (secuencia conservada); II, segunda asa; NT, N-terminal "truncada" (contiene el residuo conservado Gly-9); S₂ subsitio de papaína. (Avilés, 1993).

Existen estudios espectroscópicos de la unión de la cistatina a la papaína y a la actinidina, utilizando tanto las formas activas de estas proteasas como formas inactivadas de las mismas, con diferentes grupos químicos bloqueando el tiolato del sitio catalítico. La afinidad de la cistatina hacia las proteasas disminuye con el aumento del tamaño del grupo adicionado (Bjork y Ylinenjarvi, 1989).

El estudio de los complejos proteasa-inhibidor podría tener aplicación en el área farmacológica. Por ejemplo, se ha visto que es un requisito primordial para

algunas drogas terapéuticas que la actividad enzimática de las proteasas esté controlada para que estas drogas puedan cumplir con sus funciones curativas (Yamamoto *et al.*, 1992), por lo que es necesario el estudio y diseño de inhibidores de proteasas de alta afinidad.

1.2 DESCRIPCIÓN TERMODINÁMICA DE LA ASOCIACIÓN ENZIMA-INHIBIDOR.

El proceso de asociación enzima-inhibidor (E-I) puede describirse a través de la siguiente ecuación:



$$K_u = \frac{[EI]}{[E][I]} \quad (1)$$

donde K_u es la constante de unión (asociación).

Los parámetros asociados con este proceso, que permitirían dar una descripción termodinámica completa en función de la temperatura son: la entalpía de unión (ΔH_u), el cambio en la capacidad calorífica debido a la unión ($\Delta C_{p,u}$) y la entropía de unión (ΔS_u) o la energía libre de unión (ΔG_u).

Si se determina la constante de unión (K_u) a una cierta temperatura, el valor de ΔG_u puede obtenerse mediante la relación:

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u \quad (2)$$

Por otro lado, si se mide K_u a diferentes temperaturas es posible determinar el valor de ΔH_u . Para ello es necesario ajustar los datos experimentales (K_u , T) mediante una regresión no lineal, a la ecuación integrada de van't Hoff:

$$\ln (K_u/K_u^*) = \{(\Delta H_u^* - T^* \Delta C_{p,u}) (1/T^* - 1/T)\} / R + \{\Delta C_{p,u} \ln (T/T^*)\} / R \quad (3)$$

En esta ecuación, T^* representa una temperatura arbitraria de referencia, K_u^* y ΔH_u^* son la constante y la entalpía de unión a la temperatura de referencia, respectivamente. En esta ecuación, $\Delta C_{p,u}$ se supone constante en el intervalo térmico analizado (ver Apéndice III).

Por otra parte, el valor del cambio de entropía se obtiene de la relación:

$$\Delta S_u = \frac{\Delta H_u - \Delta G_u}{T} \quad (4)$$

OBJETIVO

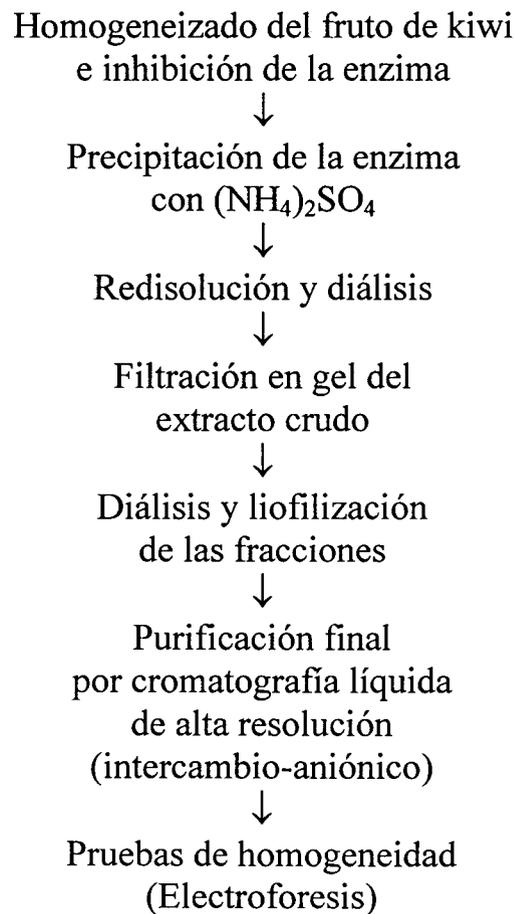
Determinar los Parámetros Termodinámicos del Proceso de Asociación del complejo Actinidina-Cistatina.

La contribución original de este trabajo fue la determinación de los parámetros termodinámicos del proceso de asociación enzima-inhibidor, ΔH_u , ΔS_u y ΔG_u para el sistema actinidina-cistatina y una posible interpretación molecular de la asociación a partir de las contribuciones relativas de la entalpía y entropía de unión.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA ACTINIDINA

La actinidina fue purificada del fruto de kiwi (*Actinidia chinensis*), éste fue obtenido de un supermercado local. El proceso de purificación de la actinidina comprendió las siguientes etapas (Tello Solís *et al.*, 1995):



La actinidina fue inactivada bloqueando su sitio activo (Cys-25) con tetrionato de sodio para prevenir autohidrólisis durante la purificación (Tello Solís *et al.*, 1995). La pulpa de 1.0 kg de fruta fue homogeneizada en 0.50 l de regulador de fosfatos 0.10 M, pH 6.0 (conteniendo tetrionato de sodio 10 mM). La mezcla se centrifugó por 30 minutos a 6000 rpm (4°C) y la enzima fue precipitada del sobrenadante con sulfato de amonio al 75% de saturación durante 48 h a 4°C. Posteriormente se centrifugó para recuperar el precipitado utilizando las mismas condiciones antes mencionadas. El precipitado fue resuspendido en regulador de fosfatos 0.10 M, pH 6.0, y dializado contra agua desionizada por 72 h a 4°C. Después de la diálisis la disolución fue almacenada a -10°C y usando el extracto crudo para purificación posterior. Treinta mililitros del extracto crudo conteniendo aproximadamente 3 mg/ml de proteína, fueron inyectados a una columna de filtración en gel TSK-HWF-50 2.5 x 54 cm (equilibrada con el regulador de fosfatos 0.10 M, pH 6.0). La elución fue realizada con el mismo regulador. A las fracciones colectadas se les hicieron pruebas de actividad proteolítica después de reactivar con cisteína.

Las fracciones que presentaron actividad fueron liofilizadas y dializadas contra regulador de acetatos 0.05 M, pH 4.5. La purificación final fue hecha por cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico (HPLC). Alícuotas de proteína de alrededor de 2 mg/ml fueron inyectadas en una columna Bio-Gel DEAE 5 PW (Bio Rad, USA) (0.75 X 7.5 cm) instalada en un cromatógrafo Varian 9000. Los componentes cromatográficos fueron eluidos de la columna a una velocidad de flujo de 0.7 ml/min, empleando un gradiente lineal de 0 a 1.0 M de NaCl disuelto en el mismo regulador. Se obtuvieron cuatro formas moleculares de actinidina, la última de ellas (A4) fue la más abundante, la de mayor actividad enzimática y fue la que se utilizó para los estudios de caracterización.

Se usó cistatina comercial (aislada del huevo de pollo) de Sigma, Chemical Co., sin ningún paso adicional de purificación. El resto de los reactivos fue al menos de grado analítico, excepto la caseína (Merck)

2.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

La actividad proteolítica fue determinada a pH 5.6 por el método modificado de Kunitz (Robinson, 1975), usando como sustrato caseína al 2% (w/v) en regulador de fosfatos 0.10 M, pH 6.0. La enzima fue activada por la adición de 150 µl de cisteína 10 mM a 600 µl de solución de enzima (0.2 mg/ml) e

incubada durante 1 min a 40°C. Un mililitro de sustrato fue incubado con esta disolución por 10 minutos (40°C). La reacción fue detenida por la adición de 2 ml de ácido tricloroacético al 5% (w/v) y la proteína precipitada fue removida por filtración a través de papel filtro Whatman número 40. La absorbancia del filtrado fue medida a 280 nm.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto, bajo las condiciones del ensayo.

La actividad específica (A_E) se calculó mediante la relación:

$$A_E = \frac{\Delta A_{280}}{C(\text{mg/ml})(10\text{min})(0.6\text{ml})} \quad (5)$$

Donde:

ΔA_{280} es el cambio de absorbancia a 280 nm provocado por acción de la enzima. Esta medición se hizo por duplicado.

2.3 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Durante las diferentes etapas de purificación de la actinidina, la concentración de proteína fue estimada de la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de absorbitividad específico $\epsilon^{(1\%, 1\text{cm})}$ de 21.2 y una masa molecular de 23 500 Da (Bjork y Ylinenjarvi, 1990). En los estudios fluorométricos, se determinó la cantidad de proteína por el mismo método, utilizando para la cistatina un coeficiente de absorbitividad específico $\epsilon^{(1\%, 1\text{cm})}$ de 8.7 y una masa molecular de 13 100 Da (Bjork y Ylinenjarvi, 1990).

2.4 ELECTROFORESIS

Se realizó en un equipo Phast System (Pharmacia LKB). A 20 μl de la fracción A4 de actinidina y a 20 μl de cistatina disueltas en regulador de Tris 10 mM, pH 8.0, se les adicionaron 16 μl de solución digestora (β -mercaptoetanol con SDS) y se calentaron en agua en ebullición por 5 minutos. Las muestras tratadas

se corrieron en un gel al 20% de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Las bandas de proteína se tiñeron con azul de Coomassie R-250

2.5 TITULACIÓN FLUOROMÉTRICA

Se dializaron 2 ml de actinidina disuelta en regulador de acetatos 0.05 M, pH 4.5, contra 500 ml de regulador de fosfatos 50 mM, pH 7.4 (conteniendo 0.1 mM de EDTA y 0.1 M de NaCl). Se hicieron dos cambios del regulador de fosfatos cada 12 h. La diálisis se realizó a 4°C con agitación suave y constante. Después de la diálisis la solución fue filtrada a través de una membrana con poros de 0.45 μm y se determinó su concentración espectrofotométricamente. A partir de esta solución se preparó la enzima a su concentración de trabajo, que fue de 2.0 μM (0.047 mg/ml).

Se disolvió la cistatina en el mismo regulador, la concentración final fue de 45.6 μM (0.597 mg/ml)

Se colocaron 2.5 ml de la disolución de actinidina (2.0 μM) en la celda del fluorómetro, en agitación constante. La temperatura del compartimento de muestra estuvo regulada con un baño de circulación de agua y se midió directamente en la celda con un termopar. Después de esto se añadió la cistatina de acuerdo al programa mostrado en la Tabla 2. Para volúmenes adicionados de inhibidor menores o iguales a 20 μl y mayores o iguales a 27 μl , el tiempo para el equilibrio térmico fue de 3 y 5 minutos, respectivamente. Las titulaciones se realizaron a cuatro diferentes temperaturas (12, 25, 31 y 37°C). Estos estudios fueron realizados en un espectrofluorómetro ISS modelo PC1, (Urbana, USA). Las condiciones de ajuste del equipo fueron: la intensidad de la lámpara se fijó en 18 A, la longitud de onda de excitación utilizada fue 280 nm con un ancho de banda de 4 nm, la emisión se detectó a 350 nm con un ancho de banda de 16 nm y un tiempo de promediado de la fluorescencia de 3 minutos después de cada adición.

Tabla 2.
Programa de adición de cistatina

No. de adición	V _{cist} (μl)	V _{cist} total (μl)
1	13	13
2	13	26
3	14	40
4	16	56
5	17	73
6	20	93
7	27	120
8	43	163
9	112	275

Por otra parte, se realizó el mismo procedimiento anterior con la única diferencia de que se sustituyó la disolución de actinidina por regulador de fosfatos (la concentración final de la cistatina en la celda fue 4.5 μM).

Se obtuvieron los espectros de las proteínas libres y del complejo, corregidos por la fluorescencia del regulador.

Los datos de intensidad de fluorescencia de la actinidina fueron corregidos por efecto de dilución, considerando el aumento de volumen provocado por la adición del ligando (del orden del 10% en el caso extremo). Los datos de fluorescencia fueron expresados como: $Y = (F_{TE} + F_{TI} - F) / F_{TE}$, donde F_{TE} es la fluorescencia de la actinidina libre, F_{TI} la fluorescencia de la cistatina libre (medida en la titulación sin actinidina) y F la fluorescencia de la mezcla actinidina-cistatina después de cada adición de ligando (Bjork y Ylinenjarvi, 1990). A partir del cambio de esta variable (Y) en función de la concentración de cistatina se determinó la constante de disociación para cada temperatura a través de un ajuste no lineal a una ecuación de tres parámetros (ec. 6, pag. 19) (Krause *et al.*, 1974 y Apéndice II). Los parámetros que se dejaron libres durante el ajuste fueron la constante de disociación (b) y el valor al que tiende asintóticamente la curva (a) (Ver Figura 7). El único parámetro fijo fue la concentración total de sitios de unión antes de la titulación (c). Se usó el mismo convenio para cada una de las temperaturas analizadas.

El cambio en la energía libre de unión (ΔG_u) se calculó a partir del recíproco del valor ajustado de la constante de disociación ($K_u = 1/K_d$) utilizando la ec. 2. El valor de ΔH_u se obtuvo a partir del comportamiento de K_u en función de la temperatura, de acuerdo con la ec. 3. Finalmente la entropía de unión (ΔS_u) se obtuvo a partir de los valores de ΔG_u y ΔH_u , de acuerdo con la ec. 4.

2.6 ANÁLISIS DE ESTRUCTURAS MOLECULARES

Las estructuras cristalográficas tanto de la actinidina como de la cistatina libres ya han sido determinadas (Baker, 1980; Bode *et al.*, 1988), sin embargo, la del complejo actinidina-cistatina no ha sido reportada. Debido a que estábamos interesados en determinar algunas características geométricas de este complejo, decidimos modelar su estructura utilizando como plantilla la estructura cristalográfica de otro complejo relacionado: papaína-estefina B (Stubbs *et al.*, 1990). Como se mencionó en la introducción, la papaína y la actinidina son proteínas homólogas y por otro lado, la cistatina y la estefina B también lo son; esto nos permitió sobreponer los carbonos α de las proteasas y de los inhibidores para generar una estructura de partida del complejo actinidina-cistatina. Posteriormente esta estructura se sometió a una dinámica molecular en el vacío, permitiendo que se movieran sólo los átomos de la interfase de unión de ambas proteínas y todos los átomos situados a 9 Å o menos de esta interfase.

Las coordenadas cristalográficas de la actinidina, la cistatina y del complejo papaína-estefina B fueron tomadas del Protein Data Bank, los archivos utilizados fueron 2act, 1cew y 1stf, respectivamente.

El modelado y el cálculo de energía molecular fueron realizados usando el programa BIOGRAF (Molecular Simulations, Inc.), utilizando el campo de fuerza DREIDING II (Mayo *et al.*, 1990), con una constante dieléctrica proporcional a la distancia entre cargas para simular el efecto del disolvente y considerando explícitamente a todos los átomos de hidrógeno unidos a nitrógeno y oxígeno. La dinámica molecular se realizó simulando el equilibrio térmico del sistema con una fuente de calor a 300 K, con un intervalo de tiempo entre etapas de un femtosegundo (fs) y colectando las conformaciones moleculares cada picosegundo (ps). La energía del sistema mostró convergencia después de 80 ps de simulación. La estructura final del modelo se obtuvo mediante la minimización de la conformación promedio de las estructuras de 84 a 122 ps. La simulación consistió

de 300 etapas de minimización de energía hasta lograr fuerzas menores a 0.100 kcal/Å y una dinámica molecular de 122 ps.

Las áreas accesibles al disolvente (ASA) fueron calculadas con el programa NACCESS (Hubbard y Thornton, 1993), usando un radio de prueba de 1.4 Å, un ancho de corte de 0.05 Å y los radios de van der Waals estimados por Chothia (Chothia, 1976), eliminando previamente los átomos de hidrógeno unidos a nitrógeno y oxígeno utilizados en la dinámica molecular.

Los cambios en áreas accesibles al disolvente (Δ ASA) fueron estimados de la diferencia entre las áreas accesibles del complejo ligando-proteína y la suma de las áreas del ligando y la proteína libres. En todos los casos se utilizó el área absoluta accesible al disolvente como parámetro de análisis.

Dos clases de Δ ASA fueron calculados. El cambio en el área no polar (Δ ASAap), a la cual contribuyeron los átomos de carbono y azufre y el cambio en el área polar (Δ ASApol) la cual fue obtenida del cambio en el área accesible al disolvente de átomos de nitrógeno y oxígeno.

RESULTADOS

La fracción más abundante (A4) de actinidina (Figura 2) que se obtuvo después de la cromatografía de alta resolución tuvo también la actividad específica más alta (0.80 unidades / mg de enzima). Esta preparación mostró ser homogénea por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, observándose una sola banda como se muestra en la Figura 3. Dado que se utilizaron no menos de 2.0 μg totales por carril en el gel y puesto que el límite de detección de proteína en la tinción con Coomassie es de 20 ng, podemos afirmar que la muestra de actinidina empleada tenía al menos un 99% de pureza.

La cistatina utilizada (Sigma, Chemical Co., número de catálogo C-8917) mostró también ser homogénea al menos en un 99% al analizarla por electroforesis en presencia de SDS (Figura 3).

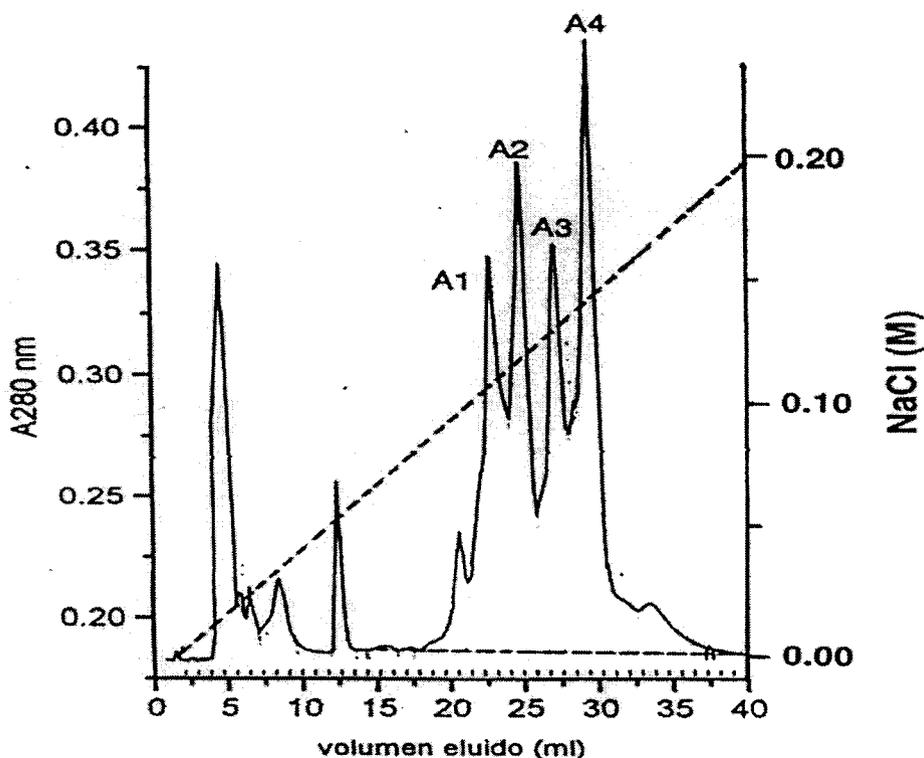


Figura 2. Purificación de la actinidina por cromatografía líquida de alta resolución (intercambio aniónico). Cuatro formas activas fueron resueltas (fracciones A1, A2, A3 y A4). La línea punteada representa el gradiente salino.

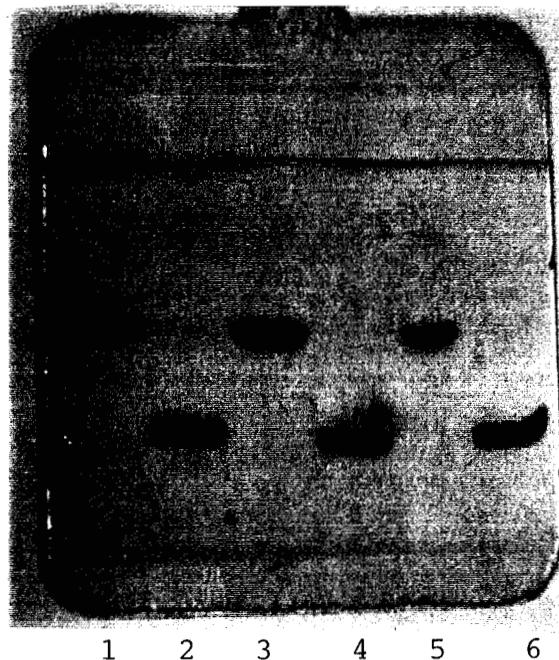


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, de la actinidina (fracción A4) y la cistatina. Carriles 1, 3 y 5, fracción A4 de actinidina y carriles 2, 4 y 6, cistatina.

Los espectros de fluorescencia de la cistatina y de la actinidina muestran una marcada diferencia en la intensidad máxima de fluorescencia, siendo cuatro veces menor el de la cistatina que el de la actinidina, esta comparación está tomada en base a la concentración máxima de cistatina que está presente en el último punto de la titulación. Además el espectro de actinidina está corregido por efecto de dilución (Figura 4). Las longitudes de onda de máxima emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) de la actinidina y de la cistatina son 334 y 336 nm, respectivamente. En cambio, el espectro de fluorescencia de una mezcla de actinidina-cistatina en una relación molar 1:2.25, tiene su $\lambda_{\text{máx}}$ a 330 nm (Figura 4). Es decir, la formación del complejo origina un corrimiento al azul en la fluorescencia de la mezcla con respecto a la combinación de los espectros de los componentes libres, lo que hace pensar que la polaridad alrededor de los fluoróforos en el complejo está disminuyendo.

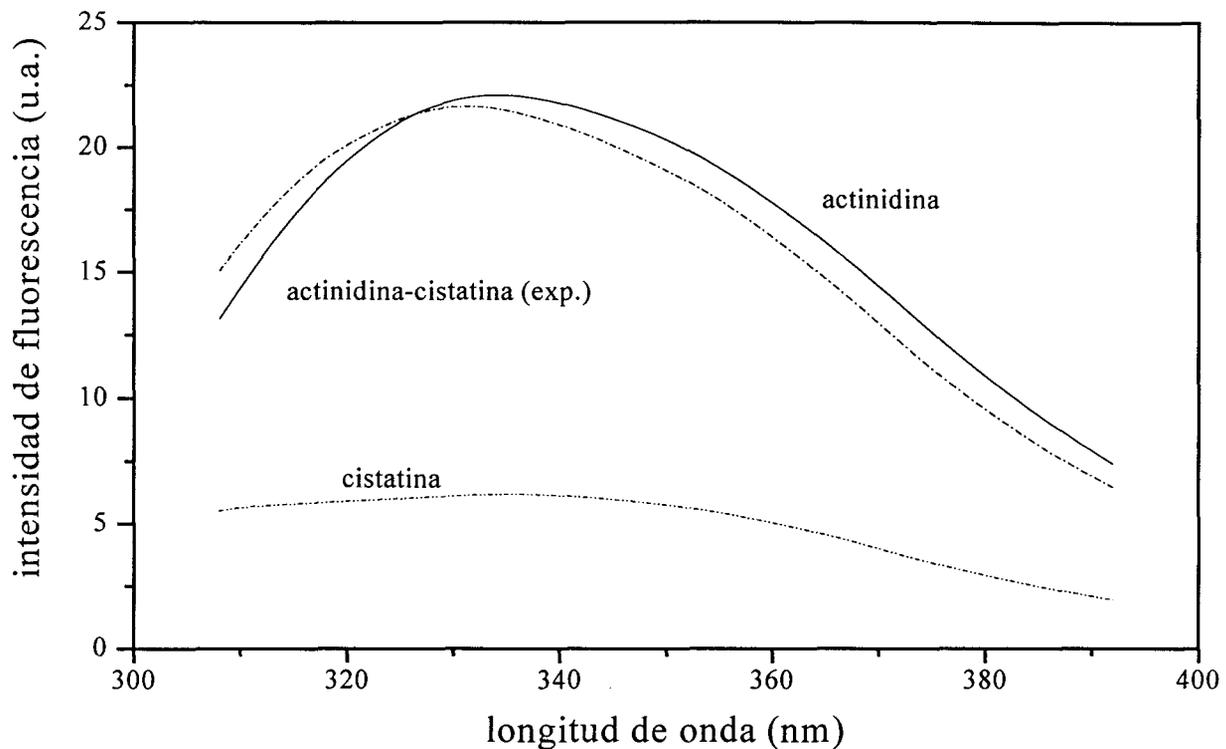


Figura 4. Espectros corregidos de fluorescencia. Los espectros fueron obtenidos a pH 7.4, en la región de 300 a 400 nm, $\lambda_{exc} = 280$ nm, $\lambda_{emi} = 350$ nm y a 25°C. La concentración de actinidina fue de 2.0 μ M y la de cistatina fue 4.5 μ M. El regulador utilizado fue fosfatos 50 mM con 0.10 mM de EDTA y 0.10 M de NaCl. La mezcla actinidina-cistatina se encuentra en una relación molar final de inhibidor/enzima en todos los análisis de 2.25.

Para poder determinar fluorométricamente la constante de unión del complejo actinidina-cistatina necesitamos asumir que el cambio en la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de complejo formado. Por ello, es requisito indispensable trabajar en un intervalo de concentraciones donde la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de ambas proteínas. Para verificar que esta relación fuese lineal en el intervalo de concentraciones a trabajar, se hicieron curvas estándar para la actinidina y la cistatina (Figura 5).

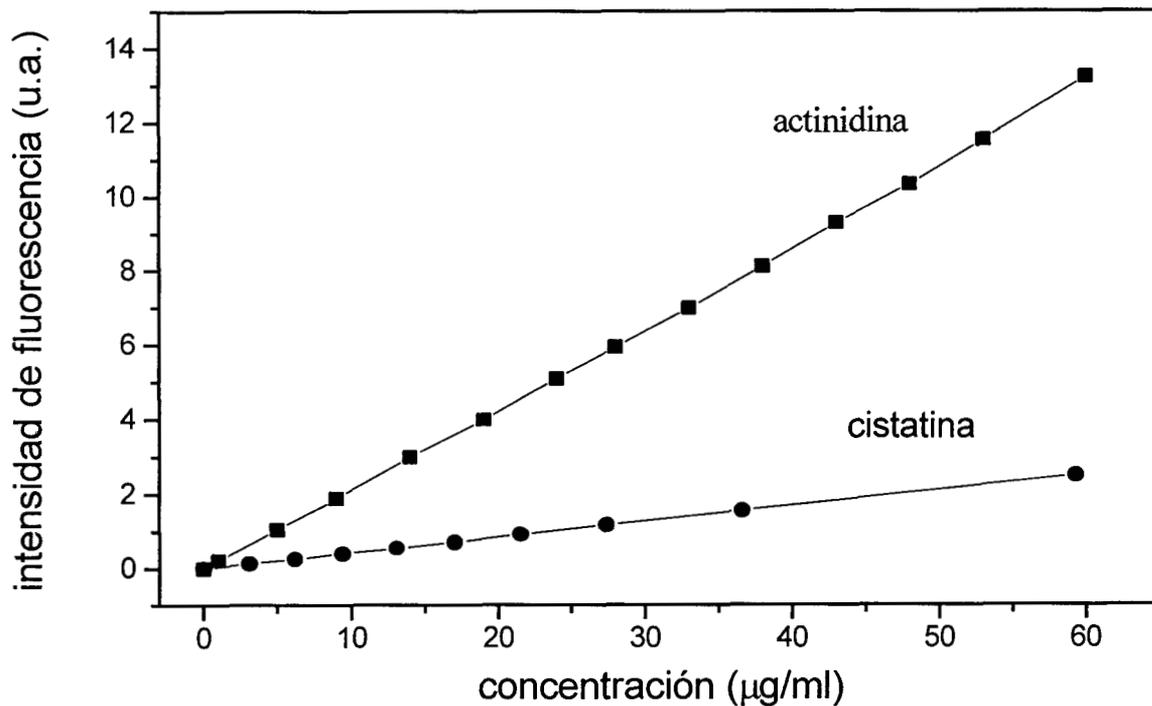


Figura 5. Linealidad de la intensidad de fluorescencia vs concentración. Las condiciones fueron 25°C, pH 7.4, longitud de excitación 280 nm y de emisión 350 nm. El factor de correlación para ambas rectas fue 0.999.

Para seleccionar la longitud de onda óptima a la cual seguir el proceso de asociación, se determinó la diferencia (ΔF) entre el espectro de emisión calculado como la suma de la intensidad de fluorescencia de las proteínas libres y el espectro experimental de la mezcla actinidina-cistatina. La diferencia más grande ocurre alrededor de los 350 nm (Figura 6), por lo que las mediciones se hicieron a esta longitud de onda. El valor de ΔF (apagamiento de la fluorescencia), representa el cambio en la intensidad de fluorescencia debido a la interacción de la actinidina y la cistatina. Esta diferencia permite cuantificar la producción de complejo a diferentes concentraciones de ligando, de acuerdo con la ec. 6 (ver el Apéndice II para la deducción de esta ecuación).

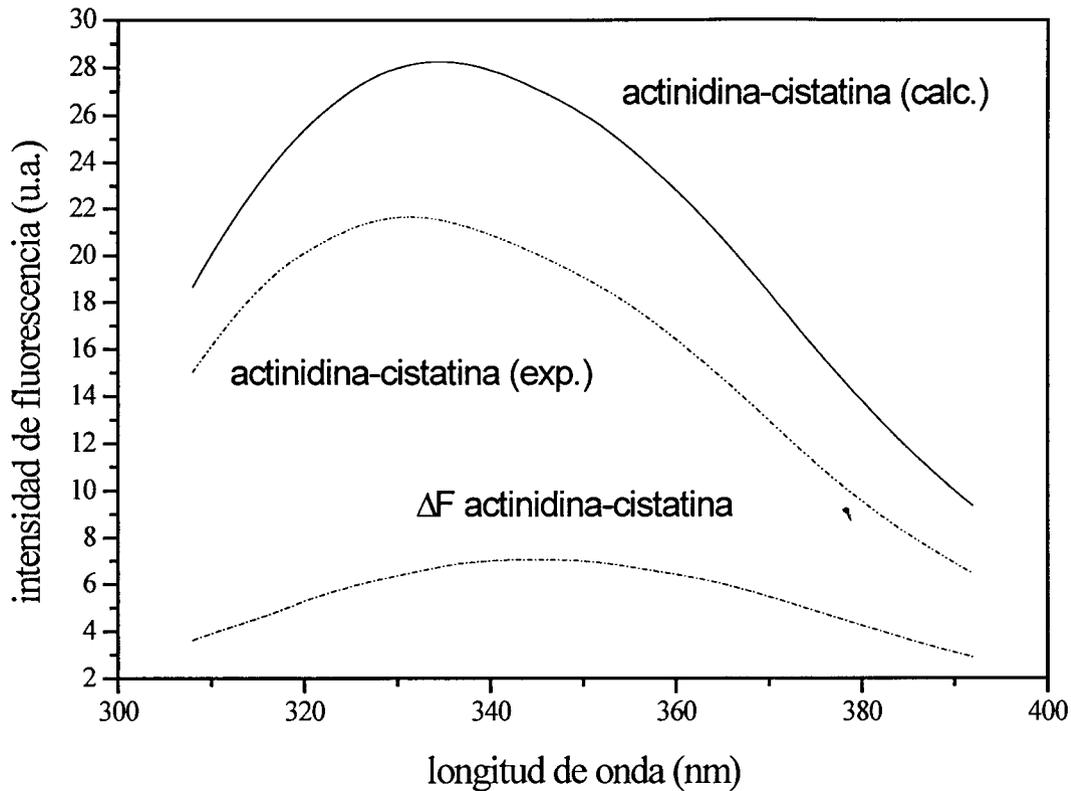


Figura 6. Espectros de fluorescencia calculado, experimental y diferencial para la mezcla actinidina-cistatina. Las condiciones experimentales fueron las mismas de la Figura 4. $F_{EI}(\text{calculado}) = F_{TE} + F_{TI}$ y $\Delta F = F_{EI}(\text{calculado}) - F_{EI}(\text{experimental})$.

La constante de asociación del complejo actinidina-cistatina fue determinada por titulación de la enzima con el inhibidor, siguiendo los cambios en la intensidad de la fluorescencia.

Una curva de titulación fluorométrica típica obtenida se muestra en la Figura 7, esta curva se puede representar a través de una función que relaciona las variables experimentales (intensidad de fluorescencia y concentración total de inhibidor) con la constante de disociación (K_d) (ver Apéndice II):

$$Y = a I_0 / 2c (I_0 - x) \left\{ \left(\frac{c (I_0 - x)}{I_0} + x + b \right) - \left[\left(\frac{c (I_0 - x)}{I_0} + x + b \right)^2 - 4 c x (I_0 - x) / I_0 \right]^{1/2} \right\} \quad (6)$$

Donde:

$$Y = (F_{TE} + F_{TI} - F) / F_{TE}$$

$$a = (F_E + F_I - F_{EI}) / F_E$$

$$b = K_d \text{ (constante de disociación)}$$

$$c = \text{concentración total de sitios de unión antes de la titulación}$$

$$I_0 = \text{concentración de inhibidor en la solución titulante}$$

$$x = I_T \text{ (concentración total de inhibidor)}$$

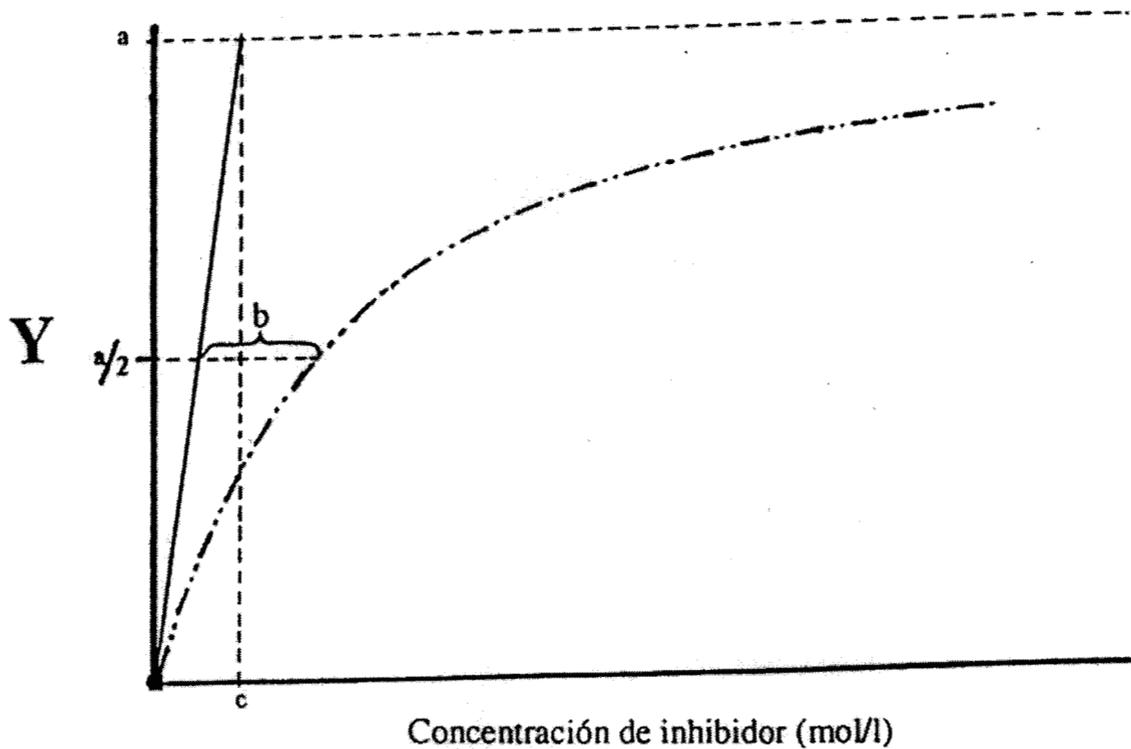


Figura 7. Curva de titulación. Parámetros de ajuste para la ecuación no lineal.

Utilizando el programa comercial Origin, se ajustó esta ecuación no lineal a cada uno de los conjuntos de datos (x_i, Y_i) correspondientes a las diferentes isotermas de unión que se presentan en la Figura 8.

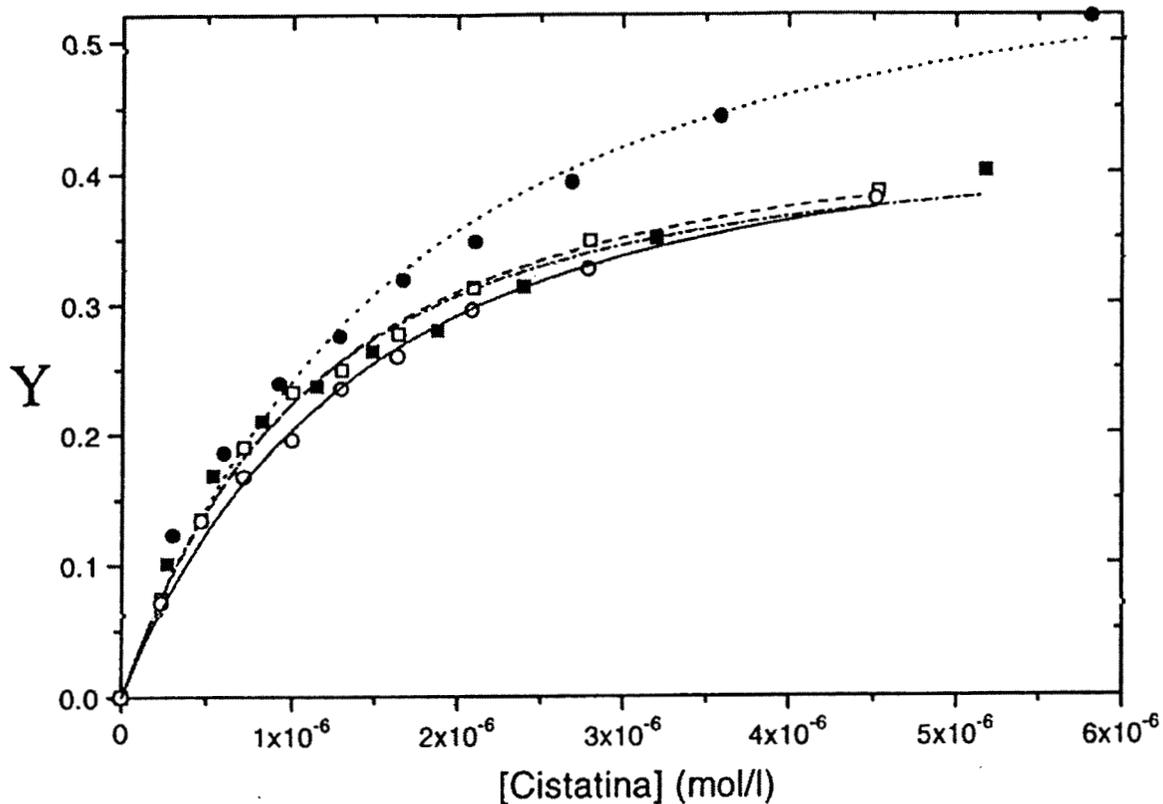


Figura 8. Titulaciones de actinidina con cistatina seguidas por mediciones de fluorescencia a pH de 7.4, la longitud de onda de excitación fue 280 nm y la emisión se detectó a 350 nm, a las diferentes temperaturas:

□)12°C ■)25°C ●)31°C y ○)37°C

Las líneas representan las funciones ajustadas de acuerdo a la ec. 6.

Mediante estos ajustes se obtienen los valores de la constante de disociación (K_d) con las cuales calculamos los valores de la constante de unión ($K_u = 1 / K_d$) del complejo a cada temperatura, mismas que se reportan en la Tabla 3.

Tabla 3.
Constantes de unión del complejo actinidina-cistatina.

T (K)	$K_U \times 10^{-3} (M^{-1})$
285	13.9
298	12.9
304	8.0
310	10.0

Es posible estimar el valor de $\Delta C_{p,u}$ a partir de datos estructurales de las proteínas libres y del complejo, utilizando la siguiente relación empírica (Freire, 1993):

$$\Delta C_{p,u} = \Delta C_{p,ap} \Delta ASA_{ap} + \Delta C_{p,pol} \Delta ASA_{pol} \quad (7)$$

donde pol y ap hacen referencia a las contribuciones polar y apolar, respectivamente. A partir de datos de la transferencia de dipéptidos cíclicos del estado sólido a disolución acuosa, $\Delta C_{p,ap}$ y $\Delta C_{p,pol}$ han sido estimados como 0.45 ± 0.02 y -0.26 ± 0.03 cal/mol K Å², respectivamente (Murphy y Gill, 1991). Las magnitudes encontradas para estas constantes usando hidrocarburos líquidos puros para modelar el núcleo de una proteína son un poco diferentes ; $\Delta C_{p,ap} = 0.32 \pm 0.04$ cal/mol K Å² y $\Delta C_{p,pol} = -0.14 \pm 0.04$ cal/mol K Å² (Spolar *et al.*, 1992).

En la Tabla 4 se muestran valores de ΔC_p calculados y ΔC_p experimentales para algunos complejos proteína-proteína obtenidos de la literatura, incluyendo el del sistema de estudio de este trabajo.

Tabla 4.
Valores de cambio en la capacidad calorífica calculados y experimentales
para sistemas proteína-proteína

Sistema	ΔASA_{ap} (\AA^2)	ΔASA_{po} (\AA^2)	$^a \Delta C_p^{calc}$ (cal/mol K)	$^b \Delta C_p^{calc}$ (cal/mol K)	ΔC_p^{exp} (cal/mol K)	Ref.*
Angiostesina II/anticuerpo	-992.9 57%	-744.8 43%	-253.1 ^a	-213.4 ^b	-240 ± 20	1
Dimero de interleucina 8	-910 ± 90 59%	-640 ± 60 41%	-243.1	-201.6	-185 ± 77	2
Subtilisina/ inhibidor	-985.0 59%	-690.0 41%	-263.8	-218.6	-240 ± 25	3
FK506/ FKBP-12	-650.0 99%	-7.0 61%	-294.3	-209.0	-260 ± 80	4
Actinidina/ Cistatina	-770.6 61%	-500.4 39%	-216.7	-176.5	-	5

^a Murphy y Gill (MG): estimación basada de datos de transferencia de un dipéptido cíclico: $\Delta C_p = 0.45 \Delta ASA_{ap} - 0.26 \Delta ASA_{po}$

^b Spolar (SR): estimación basada en datos de transferencia de hidrocarburos líquidos: $\Delta C_p = 0.32 \Delta ASA_{ap} - 0.14 \Delta ASA_{po}$

*Referencias: (1) Murphy *et al.*, 1993; (2) Burrow *et al.*, 1994; (3) Takahashi y Fukada, 1985; (4) Connelly y Thomson, 1992; (5) Este trabajo

Utilizando los valores de $\Delta C_{p,u}$ calculados que se muestran en la Tabla 4 junto con los valores de K_u de la Tabla 3, determinamos el valor de la entalpía de unión (ΔH_u) del complejo ajustando los datos a la ec. 3. La temperatura de referencia (T^*) fue de 298 K. Se obtuvo el mismo valor de ΔH_u con las dos diferentes estimaciones de $\Delta C_{p,u}$ (MG y SR). La Figura 9 muestra este ajuste.

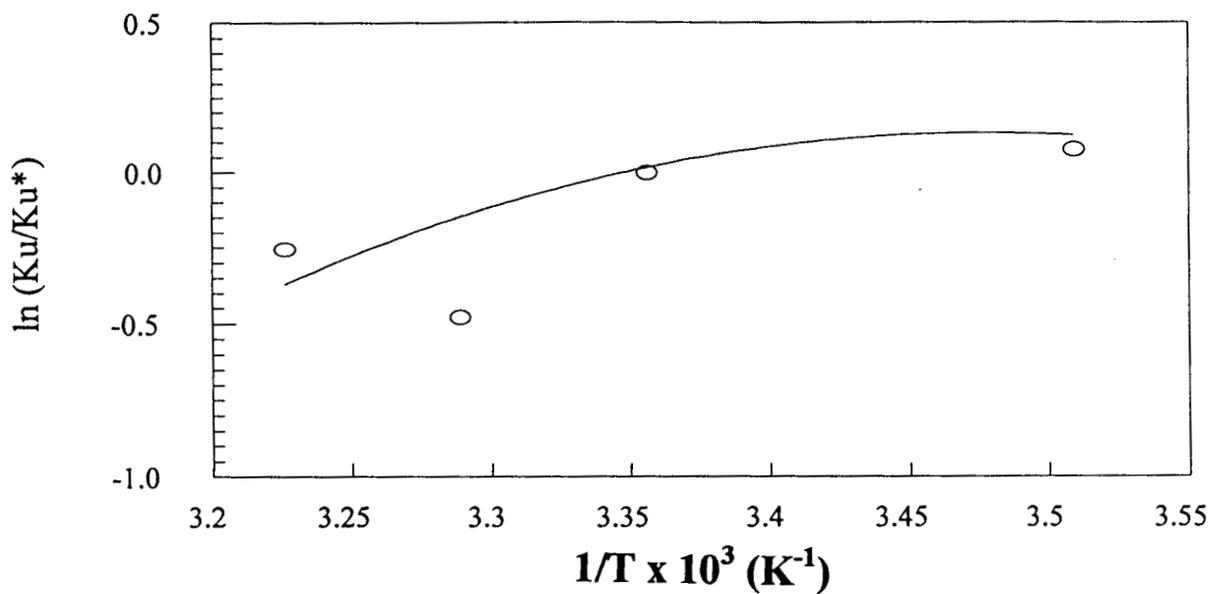


Figura 9. Regresión no lineal de la ecuación de van't Hoff. $T^* = 25^\circ\text{C}$, $K_{u}^* = 1.29 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y $\Delta C_{p,u} = -216.7 \text{ cal/mol K}$.

En la Tabla 5 se muestran los valores obtenidos de los parámetros termodinámicos de la asociación actinidina-cistatina, a la temperatura de referencia (25°C).

Tabla 5.
Parámetros Termodinámicos
de la Asociación Actinidina-Cistatina a 25°C

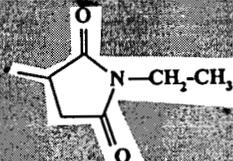
Parámetro	kcal/mol
ΔH_u	-3.6 ± 2.0
ΔG_u	-8.3 ± 0.6
$T\Delta S_u$	4.7 ± 2.6

El error en ΔH_u se obtuvo del ajuste que da el programa Kaleida. El de ΔG_u se obtuvo por propagación de errores usando la siguiente expresión $\delta\Delta G_u = |-RT| (\delta K_u/K_u)$ y para $T\Delta S_u$ utilizando la relación $\delta T\Delta S_u = \delta\Delta G_u + \delta\Delta H_u$.

DISCUSIÓN

La Cys-25 de la actinidina es indispensable para su actividad catalítica. Se ha observado que la oxidación del grupo -SH de esta cisteína produce la inactivación total de la enzima. Bjork y Ylinenjarvi (1990) mostraron que la adición de grupos químicos al átomo de azufre de esta cisteína, disminuye la afinidad de la proteasa por la cistatina en función del volumen del grupo adicionado, como se muestra en la Tabla 6. Al bloquear la enzima con tetrionato, el valor que determinamos de K_u a 25°C fue de $1.29 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, menor al observado con la enzima carboximetilada.

Tabla 6.
Constantes de disociación para complejos cistatina-actinidina inactivada.

Agente Químico	Fórmula del grupo adicionado al átomo de S	$K_u \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	Referencia*
Ninguno		200.00	a
Metilmetanotio-sulfonato	-SCH ₃	83.33	a
Iodoacetamida	-CH ₂ -CONH ₂	28.57	a
Acido iodoacético	-CH ₂ -COO ⁻	5.88	a
Tetrionato	-SO ₃ ⁻	1.29	Este trabajo
N-etilmaleimida		0.10	a

Los análisis fueron hechos a 25°C y pH 7.4

*Referencia : (a) Bjork y Ylinenjarvi, 1990

Entre los grupos adicionados -CH₂-CONH₂ y -CH₂-COO⁻ a la actinidina se observa que la K_u del segundo disminuye aproximadamente 5 veces respecto al primero, y entre los grupos -CH₂-COO⁻ y -SO₃⁻ el valor de K_u del último disminuye aproximadamente 4.5 veces. Esto nos hace pensar que además del tamaño del grupo adicionado también influye la presencia de carga neta en el mismo, como sucede entre los dos primeros grupos. Por otro lado, entre los dos segundos grupos el tamaño es aproximadamente el mismo y no hay diferencia de carga. Sin embargo, la diferencia de electronegatividad entre algunos átomos que son diferentes en los dos segundos grupos (por ejemplo, S/C y O/C) posiblemente

haga que la densidad de carga del $-\text{SO}_3^-$ adquiera una geometría con más impedimento estérico para acomodarse en el sitio de contacto con la cistatina y así la afinidad disminuya más que con el $-\text{CH}_2\text{-COO}^-$.

La actinidina tiene seis residuos de triptofano (7, 26, 122, 178, 184 y 188), de los cuales Trp-7, Trp-122 y Trp-184 están expuestos al disolvente. Por otro lado, la cistatina tiene sólo al Trp-104, el cual se encuentra también en la superficie de la molécula. Al formarse el complejo, se ocultan al disolvente los fluoróforos Trp-184 de la actinidina y Trp-104 de la cistatina, constituyendo parte de la interfase (resultado del modelado molecular). Este ocultamiento podría explicar el corrimiento al azul observado en el espectro de emisión del complejo respecto a la suma de los espectros de las proteínas libres (Figura 6).

Como se puede observar en la Tabla 3, la constante de unión (K_u) tiende a disminuir con la temperatura, implicando que se trata de una reacción exotérmica. El valor de ΔH_u puede determinarse utilizando la ecuación de van't Hoff (ec. 3). En dicha ecuación aparece también $\Delta C_{p,u}$, como otro parámetro a determinar; sin embargo, en caso de disponer de las estructuras tanto de las proteínas libres como del complejo, es posible hacer una estimación confiable de este parámetro utilizando su relación empírica con el cambio en el área accesible al disolvente (ec. 7). Si se comparan los valores calculados de $\Delta C_{p,u}$ con los medidos experimentalmente para diversos complejos proteína-proteína (Tabla 4), se aprecia que hay una buena concordancia entre ellos considerando las incertidumbres en la medición, esto nos permite tomar como una buena aproximación el valor de $\Delta C_{p,u}$ que obtuvimos a partir del análisis de los datos estructurales del complejo actinidina-cistatina modelado.

El cambio de entalpía observado se debe a dos contribuciones opuestas: la formación de nuevas interacciones entre enzima-inhibidor (van der Waals, puentes de hidrógeno, etc.) y la desolvatación de las áreas polares y apolares de grupos que interaccionan en el sitio de unión (Freire, 1993). La entalpía de desolvatación (ΔH_{des}) representa un gasto energético (proceso endotérmico) mientras que la entalpía de interacción (ΔH_{EI}) es una contribución energética favorable (proceso exotérmico).



Figura 10. Esquema de la estructura tridimensional del complejo actinidina-cistatina. La enzima se encuentra en el lado izquierdo y el inhibidor del lado derecho. Los listones rojos representan hélices α , los listones amarillos hojas β y las líneas azules giros β . En café se muestra la cisteína catalítica de la enzima (CYS25P), en negro los triptofanos de la actinidina en la interfase (TRP188P y TRP184P) y en verde el triptofano de la cistatina en la interfase (TRP104I).

García y Hernández (1999) propusieron la siguiente expresión empírica para estimar el valor de ΔH_u a partir de los cambios en las áreas accesibles al disolvente:

$$\Delta H_u = 19.4 \Delta ASA_{pol} - 7.0 \Delta ASA_{ap} \quad (8)$$

Para nuestro complejo actinidina-cistatina, ΔH_u fue de -4.3 kcal/mol, el cual se evaluó usando los valores de ΔASA mostrados en la Tabla 4.

El primer término de la expresión de ΔH_u antes mencionada se podría considerar como la suma de $\Delta H_{des,pol}$ y $\Delta H_{EI,pol}$, es decir, contiene el efecto neto provocado por la desolvatación de los grupos polares que forman la superficie de contacto del complejo y por las nuevas interacciones establecidas entre dichos grupos polares. El segundo término representa análogamente, la contribución de los grupos no polares.

En nuestro caso ΔH_u es negativo (-4.3 kcal/mol), lo que implica que el efecto neto por parte de los grupos polares fue exotérmico ($\Delta H_{des,pol} + \Delta H_{EI,pol} = -9.7$ kcal/mol) y de mayor peso que el de la parte apolar ($\Delta H_{des,ap} + \Delta H_{EI,ap} = 5.4$ kcal/mol).

La Tabla 7 compara los parámetros termodinámicos obtenidos para la asociación del complejo actinidina-cistatina con los reportados para otros complejos. En primer lugar, el valor de ΔG_u cae dentro del intervalo observado para otros sistemas proteasa-inhibidor. En cuanto al origen de una interacción proteína-proteína favorable, estos datos muestran que la estabilidad del complejo formado se basa en una entropía de unión favorable en todos los casos, con una entalpía de unión endotérmica en algunos sistemas y favorable (exotérmica) en otros. En nuestro caso ambas contribuciones son favorables, si bien la entrópica es ligeramente mayor (57 %).

Tabla 7.
Parámetros Termodinámicos de Asociaciones Proteasa-Inhibidor a 25°C

Sistema	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
Tripsina/ inhibidor de semilla de soya*	8.6	20.9	-12.3
α -quimo tripsina/ inhibidor de subtilisina*	4.5	11.6	-7.1
Subtilisina/ inhibidor de subtilisina*	-4.7	9.1	-13.8
Actinidina/ Cistatina	-3.6	4.7	-8.3

*Referencia: Hibbits *et al.*, 1994.

El cambio de entropía de unión puede ser expresado como la suma de cuatro contribuciones (García y Hernández, 1999):

$$\Delta S_u = \Delta S_{pol} + \Delta S_{ap} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{t-rot} \quad (9)$$

Los dos primeros términos del lado derecho de la ec. 9 se refieren al cambio de entropía debido a la desolvatación de área polar y apolar que se ocultan en la interfase del complejo. ΔS_{conf} se origina de enlaces rotables que quedan congelados como consecuencia de la unión, pero que poseen libre rotación tanto en la proteína como en el ligando. Por último, ΔS_{t-rot} es la contribución entrópica debido a la disminución en los grados de libertad por la reducción en el número de especies en disolución, resultado de la formación del complejo.

Es interesante comparar las entropías de unión experimental con aquellas calculadas por la evaluación de cada uno de los términos que aparecen en la ec. 9. Para este propósito, nosotros empleamos una aproximación usada en estudios de plegamiento de proteínas para estimar la entropía de desolvatación (D'Aquino *et al.*, 1996):

$$\Delta S_{pol} = -0.26 \Delta ASA_{pol} \ln(T/335.15) \quad (10)$$

$$\Delta S_{ap} = 0.45 \Delta ASA_{ap} \ln(T/385.15) \quad (11)$$

Ambas entropías estan en cal/mol K.

Un gran número de autores como Searle (Searle *et al.*, 1992), Amzel (1997), Finkelstein y Janin (1989), entre otros, han calculado el valor de ΔS_{t-rot} . En función de sus datos reportados, es razonable esperar que el valor de dicho término podría ir de -10 a -25 cal/mol K.

Por otro lado, Doig y Sternberg (1995) dieron un valor promedio para el cambio de entropía conformacional (ΔS_{conf}), que resulta de la restricción del número de rotameros de la cadena lateral para cada tipo de aminoácido. La pérdida de entropía por enlace rotable es 1.53 cal/mol K en promedio.

Usando el valor de ΔS_u de la Tabla 5, calculando ΔS_{pol} y ΔS_{ap} a 25°C con los datos de la Tabla 4 y las ecs. 10 y 11, considerando un valor para ΔS_{t-rot} de -10 cal/mol K y utilizando la ec. 9 podemos determinar ΔS_{conf} .

Los valores de cada una de las contribuciones al cambio de entropía de unión (ΔS_u) se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8
Contribuciones entrópicas al ΔS_u a 25°C

Parámetro	cal/mol K
ΔS_u	15.77
ΔS_{pol}	-15.22
ΔS_{ap}	88.79
ΔS_{t-rot}	-10.00
ΔS_{conf}	-47.80

Ahora, $\Delta S_{\text{conf}} = (\text{número de enlaces congelados}) (- 1.53 \text{ cal/mol K})$. Entonces, el número de enlaces congelados durante la unión sería aproximadamente igual a treinta y uno.

Los dos últimos términos ($\Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{\text{t-rot}}$) de la ec. 9 son negativos ya que hay una pérdida de grados de libertad al formarse el complejo: disminuye el número de partículas y la movilidad de cadenas laterales en la interfase del complejo.

La suma de los dos primeros términos ($\Delta S_{\text{pol}} + \Delta S_{\text{ap}}$) de la misma expresión, debidos a la desolvatación, es positiva. Esto es debido a la eliminación de varias moléculas de agua ordenadas en el sitio de unión. Los contactos intermoleculares cercanos requieren de la deshidratación, al menos parcial, de las superficies interactuantes. La ganancia entrópica de la transferencia de agua solvatante hacia el disolvente externo es una fuente de energía libre de unión.

Por otra parte, en la formación del complejo actinidina-cistatina se oculta más área apolar (61%) que polar (39%) (ver Tabla 4). Esto, aunado a que la contribución entrópica por la deshidratación de área apolar (ΔS_{ap}) del sitio de unión es la más importante a la constante de unión (ver Tabla 8), nos lleva a proponer que el efecto hidrofóbico juega el papel primordial en la estabilidad de este complejo.

CONCLUSIONES

- El hecho de que el sitio catalítico de la enzima se bloquee con tetrionato, hace que la constante de afinidad (K_u) por la cistatina disminuya alrededor de 150 veces con respecto a la de la actinidina activa. Esto concuerda con que el sitio activo forme parte de la interfase del complejo.
- El efecto hidrofóbico es probablemente la fuente de estabilidad más importante del complejo actinidina-cistatina, a juzgar por la gran contribución entrópica a la energía libre de unión y la proporción mayoritaria de área no polar (61%) que se oculta del disolvente.

PERSPECTIVAS

Hacer experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) nos permitiría medir directamente el valor de ΔH_u y al hacerlo a diferentes temperaturas podríamos determinar el valor de $\Delta C_{p,u}$.

Realizar experimentos de ITC a diferentes valores de pH para ver si existen cadenas laterales que cambien su grado de protonación al formarse el complejo y analizar como se afecta la afinidad entre la enzima y su inhibidor.

APÉNDICE I

FLUORESCENCIA

El término de fotoluminiscencia se aplica al fenómeno de reemisión de luz previamente absorbida desde estados electrónicamente excitados. Los procesos de fotoluminiscencia conocidos son la fluorescencia y la fosforescencia (Lakowicz, 1986).

El proceso de absorción está relacionado con la excitación de una molécula de su estado electrónico basal a un nivel de energía más alto. En muchas instancias, la energía absorbida es cedida como calor al medio ambiente cuando las moléculas regresan al estado basal. Sin embargo, en algunos casos la re-radiación (emisión) ocurre. El proceso en el cual ocurre esta emisión de un estado singulete excitado al basal es llamado fluorescencia. El exceso de energía vibracional en el primer estado excitado es rápidamente transferida al medio ambiente, como calor. Este proceso se denomina conversión interna.

La fosforescencia es la emisión de luz que resulta de la transición entre estados de diferente multiplicidad, generalmente de un estado triplete excitado a un estado singulete basal.

La Figura I.1 resume los procesos antes mencionados con valores típicos de sus constantes de velocidad. Las líneas onduladas indican caminos no radiantes, que son frecuentemente términos de conversión interna.

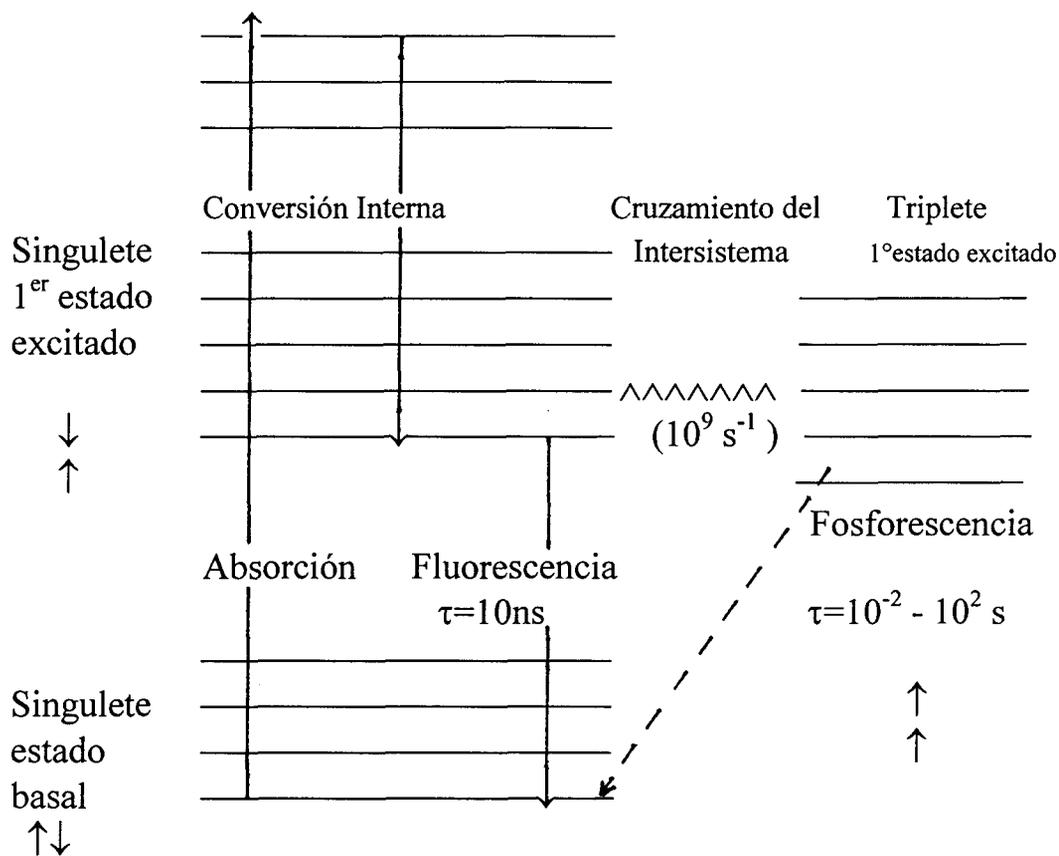


Figura I.1. Algunos caminos de relajación para el estado excitado.

El tiempo de vida media de la molécula en el estado excitado depende de la competición entre la emisión y algún proceso no radiante tal como la transferencia de la energía de excitación al medio ambiente. Este proceso provee un mecanismo alternativo a la molécula excitada para regresar al estado basal y su presencia da como resultado una disminución o un apagamiento (quenching) de la intensidad de la fluorescencia.

Frecuentemente es posible medir la fluorescencia a concentraciones en el orden de 10^{-8} M, que es dos ordenes de magnitud menor que aquellas generalmente usadas para medidas de absorción.

Muchos de los usos de la fluorescencia son muy similares a los empleados en las aplicaciones de absorción UV-visible por ejemplo, mediciones de unión (asociación), monitoreo de cambios conformacionales en proteínas o seguimiento de una reacción.

Además, la fluorescencia es una técnica poderosa particularmente porque hay muchas reacciones, rearrreglos del disolvente y procesos de movimiento molecular que tienen lugar en la misma escala de tiempo que el tiempo de vida media del estado excitado. La sensibilidad resultante de la fluorescencia en esta escala de tiempo y en este medio ambiente es la base de muchas de sus aplicaciones en la bioquímica.

ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y DE EMISIÓN

La dependencia de la intensidad de la fluorescencia a una determinada longitud de onda de emisión, respecto de la longitud de onda de la luz de excitación es referida como el espectro de excitación. Por el contrario, el espectro de emisión describe la variación de la intensidad de la fluorescencia con la longitud de onda de la luz emitida excitando a una determinada longitud de onda. La posición del máximo en el espectro de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) es sensible a la polaridad del medio ambiente y a la movilidad del fluoróforo.

La fluorescencia usualmente ocurre a una longitud de onda más grande que la de la luz incidente porque la energía de la radiación electromagnética emitida es diferente de la absorbida por una cantidad equivalente a la energía vibracional perdida en el medio ambiente. La fluorescencia se origina en moléculas en el nivel vibracional más bajo del estado excitado, la forma del espectro es independiente de la longitud de onda de la luz de excitación. Sin embargo, la intensidad de la fluorescencia en el espectro si depende de la longitud de onda de la luz de excitación.

En la Figura I.2 se muestra el diagrama de un espectrofluorómetro. Este consiste de una fuente con una lámpara de luz ultravioleta-visible, un monocromador de excitación situado entre la fuente y la celda de muestra, un monocromador de emisión colocado entre la muestra y el fotomultiplicador (orientado a 90° del haz de excitación) y por último un registrador. Los monocromadores tienen una rejilla de cierto ancho que se utiliza para seleccionar un intervalo dado de longitudes de onda, estas rejillas se pueden cambiar y escoger así el ancho de banda deseado en la excitación y en la emisión.

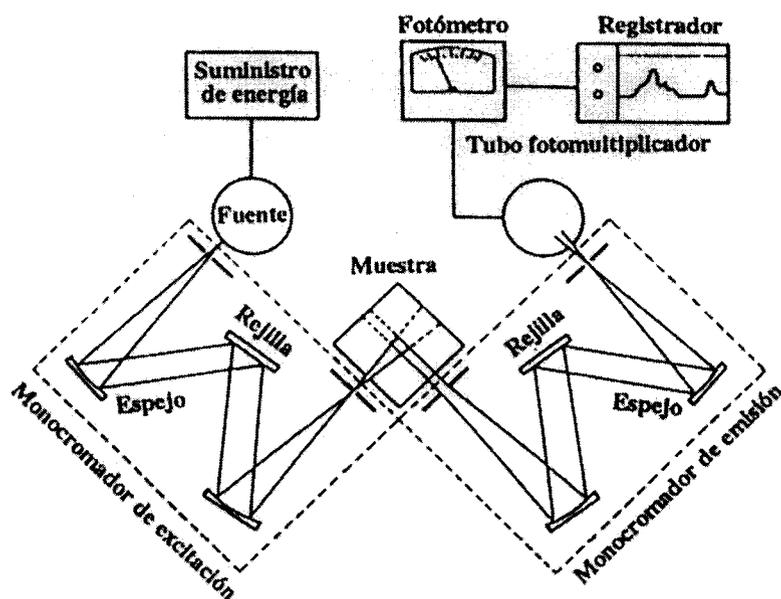


Figura I.2. Representación esquemática de un espectrofluorómetro (Willard *et al.*, 1992)

RENDIMIENTO CUÁNTICO, EFICIENCIA DE LA FLUORESCENCIA, INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA.

Hay otros procesos que pueden competir con la fluorescencia para la despoblación del estado excitado. Este proceso de competición causa una disminución más rápida del número de moléculas excitadas, suponiendo que la fluorescencia fuera considerada el único proceso por el cual las moléculas pueden regresar al estado basal.

La fracción de moléculas excitadas que llegan a desexcitarse por fluorescencia se denomina rendimiento cuántico (Φ_F) (o la eficiencia de la fluorescencia) y esta dada por la ecuación:

$$\Phi_F = \frac{\tau}{\tau_F} \quad \text{AI.1}$$

τ = tiempo de relajación de todos los procesos en competencia

τ_F = tiempo de relajación del proceso de fluorescencia

$$\tau = \frac{1}{k_F + \sum k_i} = \frac{1}{k} \quad \text{AI.2}$$

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad \text{AI.3}$$

k_F = constante de velocidad de la emisión por fluorescencia.
 k = constante de velocidad total para la despoblación del estado excitado.

El rendimiento cuántico es sensible al medio ambiente inmediato del fluoróforo y también a los procesos de apagamiento específico. Cambios en el rendimiento cuántico son acompañados por cambios en la intensidad de la fluorescencia.

PROCESOS DE APAGAMIENTO ESPECÍFICO (QUENCHING)

Hay dos tipos de apagamiento frecuentemente estudiados en sistemas biológicos. El primero es resultado de un proceso no radiante de intervalo largo (distancia de ~5 nm), llamado transferencia de energía de resonancia de un cromóforo a otro. El análisis de este apagamiento permite medir la distancia entre los cromóforos (los cuales no necesariamente deben encontrarse en la misma molécula). El segundo tipo de apagamiento se origina en procesos de colisión.

El apagamiento de la fluorescencia requiere una colisión bimolecular entre el apagador y el fluoróforo. El análisis de este apagamiento permite obtener información sobre la dinámica del proceso de colisión. Los procesos de colisión también han sido usados cualitativamente para probar la “accesibilidad” de un fluoróforo (en una macromolécula) al apagador (quencher).

FLUORÓFOROS NATURALES.

Los fluoróforos utilizados en bioquímica pueden ser clasificados en fluoróforos naturales e indicadores fluorescentes (fluoróforos extrínsecos).

Los fluoróforos naturales incluyen a los aminoácidos aromáticos, las flavinas, la vitamina A, la clorofila y el NADH. Los ácidos nucleicos no tienen apreciable fluorescencia con la excepción de la base Y en t-RNA. Propiedades de

los fluoróforos típicos de proteínas son mostradas en la Tabla. La fluorescencia observada en proteínas generalmente se origina en residuos de triptofano.

Tabla.
Fluoróforos naturales presentes en proteínas

Fluoróforo	Absorción		Fluorescencia			Sensibilidad
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}} \times 10^{-3}$ ($\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Φ_{F}	τ_{F} (ns)	$\epsilon_{\text{máx}} \Phi_{\text{F}} \times 10^{-2}$ ($\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)
Trp	280	5.6	348	0.20	2.6	11.00
Tyr	274	1.4	303	0.10	3.6	1.40
Phe	257	0.2	282	0.04	6.4	0.08

Condiciones: H₂O y pH 7

La intensidad de la fluorescencia esta dada por (Campbell y Dwek, 1984):

$$F_{\lambda} = I_0 (2.3 \epsilon_{\lambda} c l) \Phi_{\text{F}} Z \quad \text{AI.4}$$

$$F_{\lambda} \propto \epsilon_{\lambda}$$

Donde:

Z= factor instrumental

ϵ = coeficiente de extinción ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

c= concentración (mol/l)

l = longitud de la celda (cm)

I₀= intensidad de la luz de excitación

Φ_{F} = rendimiento cuántico

La fluorescencia es muy sensible al medio ambiente, los parámetros que pueden ser afectados son : $\lambda_{\text{máx}}$, Φ_{F} , τ_{F} . Algunos ejemplos de esto son dados a continuación.

EFFECTOS DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE $\lambda_{\text{máx}}$

En general, una molécula en el primer estado electrónico excitado tendrá una distribución de carga diferente de aquella en el estado basal. Pueden ocurrir

interacciones del cromóforo con las moléculas de disolvente de los alrededores antes de la emisión. Estas interacciones alteran la energía del estado excitado y también la frecuencia de la emisión fluorescente.

Esta sensibilidad de la fluorescencia al medio ambiente puede ser usada para estimar la polaridad del mismo. En general, el estado excitado será más polar que el estado basal y las moléculas excitadas tenderán a interactuar con el disolvente acuoso polar, reorganizando los dipolos del solvente. Este alineamiento decrece la energía del estado excitado y causa en el espectro de emisión un corrimiento hacia el rojo.

EFFECTOS DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE LA INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA.

El medio ambiente inmediato de un fluoróforo puede modificar su fluorescencia. Un gran número de aplicaciones de la fluorescencia en bioquímica simplemente involucran el monitoreo en la intensidad de la fluorescencia de un fluoróforo intrínseco o extrínseco.

En general, la intensidad de la fluorescencia se incrementa cuando la polaridad del disolvente decrece. Un mecanismo postulado para esto es que la velocidad de cruce del intersistema (hay transferencia a diferentes estados excitados) es reducido en disolventes no polares. Por el contrario, en el estado excitado se incrementa la probabilidad de la fluorescencia y por lo tanto la intensidad de la fluorescencia.

APÉNDICE II

Determinación fluorométrica de una constante de asociación proteína-ligando

A continuación se presenta la deducción de la ecuación que relaciona los valores de intensidad de fluorescencia y concentración de ligando en una titulación de proteína, con su constante de unión.



El siguiente desarrollo es válido para sistemas donde la intensidad de fluorescencia tanto del ligando como de la proteína son importantes a la longitud de onda de emisión analizada, como podría ser el caso en complejos proteína-proteína. La notación se particulariza para un sistema Enzima (E) – Inhibidor (I).

La fluorescencia experimental observada esta dada por:

$$F = F_E [E] + F_I [I] + F_{EI} [EI] \quad \text{AII.2}$$

Donde: F_E , F_I y F_{EI} son las fluorescencias por unidad de concentración de la enzima, el inhibidor y el complejo, respectivamente.

Las concentraciones totales de enzima e inhibidor están dadas por:

$$[ET] = [E] + [EI] \quad \text{e} \quad [IT] = [I] + [EI] \quad \text{AII.3}$$

Entonces:

$$F = F_E ([ET] - [EI]) + F_I ([IT] - [EI]) + F_{EI} [EI]$$
$$\text{o} \quad F = F_E [ET] + F_I [IT] + (F_{EI} - F_E - F_I) [EI] \quad \text{AII.4}$$

Sea la fluorescencia de la enzima y el inhibidor:

$$F_{TE} = F_E [ET] \quad y \quad F_{TI} = F_I [IT] \quad AII.5$$

Ahora:

$$F - F_{TE} - F_{TI} = (F_{EI} - F_E - F_I) [EI] \quad AII.6$$

$$\therefore [EI] = (F - F_{TE} - F_{TI}) / (F_{EI} - F_E - F_I) = (F_{TE} + F_{TI} - F) / (F_E + F_I - F_{EI}) \quad AII.7$$

Si a la expresión anterior la multiplicamos y dividimos por $1 / F_{TE}$ que es igual $1 / F_E [ET]$, obtenemos la siguiente expresión:

$$[EI] = [ET] \left\{ (F_{TE} + F_{TI} - F) / F_{TE} \right\} / (F_E + F_I - F_{EI}) / F_E \quad AII.8$$

Sean:

$$Y = (F_{TE} + F_{TI} - F) / F_{TE} \quad y \quad a = (F_E + F_I - F_{EI}) / F_E \quad AII.9$$

$$[EI] = \{ [ET] Y \} / a \quad AII.10$$

La constante de disociación del proceso es:

$$K_d = [E] [I] / [EI] \Rightarrow [I] = (K_d [EI]) / [E] = (K_d [EI]) / ([ET] - [EI]) \quad AII.11$$

Rearreglando

$$[I] = K_d / \{ [ET] / [EI] \} - 1 \quad AII.12$$

$$\text{De (AII.10) } [ET]/[EI] = a/Y \Rightarrow [I] = K_d / \{ a/Y \} - 1 = K_d / \{ (a - Y)/Y \} \quad AII.13$$

$$\therefore [I] = (K_d Y) / (a - Y) \quad AII.14$$

Sean:

$$K_d = b \quad \text{y} \quad [ET] = c'$$

Sustituyendo en (AII.10) y (AII.14) :

$$[EI] = c' Y / a \quad \text{y} \quad [I] = bY / (a - Y) \quad \text{AII.15}$$

Sea : $x = [EI] + [I]$; la concentración total de inhibidor

Entonces :

$$x = \{c' Y / a\} + \{b Y / (a - Y)\} \quad \text{AII.16}$$

Realizando el algebra

$$x - \{c' Y / a\} = b Y / (a - Y)$$

$$(a x - c' Y) (a - Y) = a b Y$$

$$a^2 x - a c' Y - a x Y + c' Y^2 = a b Y$$

$$c' Y^2 - a Y (c' + x + b) + a^2 x = 0 \quad \text{AII.17}$$

Por lo tanto:

$$Y = a / 2c' \{ c' + x + b - [(c' + x + b)^2 - 4c'x]^{1/2} \} \quad \text{AII.18}$$

Debido a que la concentración total de enzima (c') en realidad se modifica tras cada adición de inhibidor, y lo que se conserva durante toda la titulación es el *número de moles* de enzima, es necesario hacer la siguiente sustitución:

$$c' = c (I_0 - x) / I_0 \quad \text{AII.19}$$

Donde:

c = concentración inicial de enzima en la celda fluorométrica.

I_0 = concentración de inhibidor en la solución titulante.

Sustituyendo AII.19 en AII.18:

$$Y = a I_0 / 2c(I_0 - x) \left\{ [c (I_0 - x)/I_0] + x + b - \right. \\ \left. - [[c (I_0 - x)/I_0] + x + b)^2 - 4cx (I_0 - x)/I_0]^{1/2} \right\}$$

AII.20

A través de esta ecuación se pueden determinar simultáneamente la K_d (b), la concentración inicial de sitios de unión (c) y la constante de apagamiento C_a ($a = 1 - C_a$). I_0 es una constante de valor conocido para cada titulación.

APÉNDICE III

Deducción de la ecuación integrada de van't Hoff

Partiendo de la ecuación de Gibbs-Helmholtz (Atkins, 1986):

$$\left(\frac{\partial(G/T)}{\partial T}\right)_p = -H/T^2 \quad \text{AIII.1}$$

se sigue que para un proceso dado en equilibrio:

$$\left(\frac{\partial(\Delta G/T)}{\partial T}\right)_p = -\Delta H/T^2 \quad \text{AIII.2}$$

Dado que $\Delta G = -RT \ln K$ AIII.3

Entonces $\Delta G/T = -R \ln K$ AIII.4

Sustituyendo AIII.4 en AIII.2:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \Delta H/RT^2 \quad \text{AIII.5}$$

de manera que a presión constante:

$$d \ln K = (\Delta H/RT^2) dT \quad \text{AIII.6}$$

Utilizando la ley de Kirchhoff (Atkins, 1986):

$$\Delta H(T) = \Delta H(T^*) + \int \Delta C_p(T) dT \quad \text{AIII.7}$$

y considerando que el ΔC_p permanece constante en el intervalo de temperaturas de trabajo:

$$\Delta H(T) = \Delta H(T^*) + \Delta C_p(T - T^*) \quad \text{AIII.8}$$

Podemos reescribir la Ec. AIII.6 como:

$$d \ln K = \{ \Delta H^* + \Delta C_p(T - T^*) / RT^2 \} dT \quad \text{AIII.9}$$

Integrando la ecuación anterior desde la temperatura de referencia (T^*) hasta una temperatura T dada:

$$\int d \ln K = \int \{ \Delta H^* / RT^2 \} dT + \int [\Delta C_p/R] \{ (T - T^*) / T^2 \} dT \quad \text{AIII.10}$$

$$\ln(K_u/K_u^*) = (\Delta H_u^*/R) [1/T^* - 1/T] + \Delta C_p/R \int (1/T - T^*/T^2) dT \quad \text{AIII.11}$$

$$\ln(K_u/K_u^*) = (\Delta H_u^*/R) [1/T^* - 1/T] + \Delta C_p/R \{ \ln(T/T^*) + (T^*/T) - 1 \} \quad \text{AIII.12}$$

$$\ln(K_u/K_u^*) = (\Delta H_u^*/R)[1/T^* - 1/T] + \Delta C_p/R \ln(T/T^*) + \{ T^* \Delta C_p/R \} (1/T - 1/T^*) \quad \text{AIII.13}$$

Finalmente:

$$\ln(K_u / K_u^*) = \{ (\Delta H_u^* - T^* \Delta C_p) [1/T^* - 1/T] \} / R + \{ \Delta C_p \ln(T / T^*) / R \} \quad \text{AIII.14}$$

REFERENCIAS

- Abrahamson, M., Ritonja, A., Brown, M. A., Grubb, A., Machleidt, W. y Barret, A. J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9688-9694
- Amzel, L. M. (1997) *Proteins Struct. Funct. Genet.* 28, 144-149
- Atkins, W. P. *Fisicoquímica*. Fondo Educativo Interamericano. México, 1986. 2da edición. Capítulos 4 y 6
- Avilés, F. X. *Innovations in proteases and their inhibitors*. Walter de Gruyter. Berlín. New York, 1993. Capítulos 6, 9 y 10
- Baker, E. N. (1980) *J. Mol. Biol.* 141, 441-484
- Bjork, I. y Ylinenjarvi, K. (1990) *Biochemistry* 29, 1770-1776
- Bjork, I. y Ylinenjarvi, K. (1989) *Biochem. J.* 260, 61-68
- Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J. y Turk, V. (1988) *EMBO J.* 7, 2593-2599
- Burrows, S. S., Doyle, L. M., Murphy, K. P., Franklin, G. S., White, R. J., Brooks, I., McNulty, E. D., Scott, O. M., Knutson, R. J., Porter, D., Young, R. P. Y Hensley, P. (1994) *Biochemistry* 33, 12741-12745
- Campbell, I. D. y Dwek, R. A. *Biological Spectroscopy*. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. 1984. Menlo Park, California Fluorescence Chapter 5, 91-125
- Chothia, C. (1976) *J. Mol. Biol.* 105, 1-14
- Connelly, P. R. y Thomson, J. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4781

- D'Aquino, J. A., Gómez, J., Hilser, V. J., Lee, K. H., Amzel, L. M. y Freire, E. (1996) *Proteins Struct. Funct. Genet.* 25, 143-156
- Doig, A. J. y Sternberg, M. J. E. (1995) *Protein Science* 4, 2247-2251
- Ellman, G. L. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443-450
- Finkelstein, A. V. y Janin, J. (1989) *Protein Eng.* 3, 1-3
- Freire, E. (1993) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 181-184
- García, H. E. y Hernández, A. A. (1999) *Protein Science* 8, 1-12
- Hibbits, A. K., Gill, S. D. y Willson, C. R. (1994) *Biochemistry* 33, 3584-3590
- Hubbard, S. J. y Thornton, J. M. (1993) 'Naccess', Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London.
- Jelesarov, I. y Bosshard, R. H. (1994) *Biochemistry* 33, 13321-13328
- Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B. A. y Drenth, J. (1984) *J. Mol. Biol.* 179, 233
- Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B. A. y Drenth, J. (1985) *J. Mol. Biol.* 182, 317-329
- Krause, J., Bühner, M. y Sund, H. (1974) *Eur J. Biochem.* 41, 593-60
- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press. New York. 3ra edición, 1986. Introduction to Fluorescence, Capítulo 1, pp. 1-18
- Lindahl, P., Alriksson, E., Jornvall, H. y Bjork, I. (1988) *Biochemistry* 27, 5074-5082

- Lundblad, R. L. *Chemical Reagents for Protein Modification*. CRC Press 1991. Segunda edición. Boca Raton, Fl. The Modification of Cysteine, Capítulo 6
- Machleidt, W., Thiele, U., Laber, B., Assfalg-Machleidt, I., Esterl, A., Wiegand, G., Kos, J., Turk, V. y Bode, W. (1989) *FEBS Letters* 243, 234-238
- Maes, D., Bouckaert, J., Poortmans, F., Wyns, L. y Looze, Y. (1996) *Biochemistry* 35, 16292-16298
- Mayo, S. L., Olafson, B. D. y Goddard, W. A. (1990) *J. Phys. Chem* 94, 8897-8990
- Murphy, K. P. y Gill, S. J. (1991) *J. Mol. Biol.* 222, 699-709
- Murphy, K. P., Xie, D., Garcia, K. C., Amzel, L. M. y Freire, E. (1993) *Proteins* 15, 113-120
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R. A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N. y Bode, W. (1991) *EMBO J.* 10, 2321
- Naghibi, H., Tamura, A. y Sturtevant, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5597-5599
- Pickersgill, R. W., Rizkallah, P., Harris, G. W. y Goodenough (1991) *Acta Crystallogr., Sect. B.* 47, 766
- Robinson, G. W. (1975) *Biochemistry* 14, 3695-3700
- Sander, C. y Schneider, R. (1991) *Proteins* 9, 56-58
- Searle, M. S., Williams, D. H. y Gerhard, U. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10697-10704
- Smith, D. J. , Maggio, E. T. y Kenyon, G. L. (1975) *Biochemistry* 14, 766-771

Spolar, R. S., Livingstone, J. R. y Record, M. T., Jr (1992) *Biochemistry* 31, 3947-3955

Stubbs, M.T., *et al.* (1990) *EMBO J.* 9, 1939-1947

Takahashi, K. y Fukada, H. (1985) *Biochemistry* 24, 297-300

Tello Solís S. R., Valle Guadarrama M. E. y Hernández Arana A. (1995) *Plant Science* 106, 227-232

Turk, V. y Bode, W. (1991) *FEBS Letters* 285, 213-219

Willard, H. H., Merritt, L. L., Dean, A. J. y Settle, A. F. *Métodos Instrumentales de Análisis*. CECSA. 4ta reimpression. México, 1992

Yamamoto, A., Tomoo, K., Mitsunobu, D., Hirofumi, O., Inoue, M., Ishida, T., Yamamoto, D., Tsuboi, S., Okamoto, H. y Okada, Y. (1992) *Biochemistry* 31, 11305-11309