

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**ESTUDIO CALORIMÉTRICO DE LA INTERACCIÓN DE LA
CONCAVALINA A CON DOS MONOSACÁRIDOS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. JIMENA CELIA SAUCEDA PEÑA



Posgrado
**Ciencias
Químicas**

TUTOR: Dr. Miguel Antonio Costas Basín

AÑO: 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres.

*A mi familia. Lejos o cerca,
siempre en mi corazón.*

A Gerardo.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto CONACyT 41328 – Q y al proyecto PAPIIT-UNAM IN113302 por el apoyo otorgado al desarrollo de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca con número de registro 173064, otorgada del período que comprende septiembre del 2002 a septiembre de 2004.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca complementaria de la cual gocé en el mismo período.

A la Dra. Marieta Tuena de Gómez-Puyou y al Dr. Armando Gómez-Puyou por permitirme generosamente utilizar los recursos de su laboratorio en el Instituto de Fisiología Celular, para llevar a cabo el trabajo previo a la realización de esta tesis de maestría.

Al Dr. Mario Calcagno y a todos los miembros del Laboratorio de Físicoquímica de Proteínas, de la Facultad de Medicina, por recibirme siempre en sus instalaciones con el corazón abierto, por sus magníficos consejos y por toda la invaluable ayuda proporcionada a quien suscribe la presente tesis de maestría.

A la institución que me ha formado, mi querida Facultad de Química.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 102, edificio "B", de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

GRACIAS TAMBIÉN A

Mi asesor Miguel, por enseñarme que ningún experimento está completo si no se ha aprendido a comunicar los resultados.

Enrique García, por la asesoría y las discusiones que dieron forma a este trabajo.

Gerardo Pérez, por toda la asesoría técnica y por su invaluable amistad.

Ismael y Martín muy especialmente, porque este trabajo no estaría completo sin las maravillosas figuras.

Los miembros de este jurado, quienes generosamente revisaron esta tesis en muy poco tiempo.

Mayu Costas y Rodolfo Acevedo, quienes han sido una gran inspiración en el laboratorio de Termodinámica.

Auster Valderrama Cano, Maestro entre los Maestros.

Los miembros del laboratorio de Termofísica y a nuestros vecinos de Química Física de Sólidos, quienes han dado sabor y calidez a la vida en el laboratorio.

Mis antiguos amigos del Liceo Mexicano Japonés. También al Grupo Selecto. Los quiero muchísimo.

Mis amigos de la maestría y de la licenciatura, que están en mi corazón.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 MOTIVACIÓN | 2 |
| 1.2 OBJETIVOS | 6 |
| II. ANTECEDENTES | 7 |
| 2.1 EQUILIBRIO QUÍMICO | 8 |
| 2.2 PARÁMETROS TERMODINÁMICOS (ΔH Y K) EN TÉRMINOS DE OBSERVABLES EXPERIMENTALES | 16 |
| 2.3 FUNCIONAMIENTO DE UN APARATO DE CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA | 22 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| 3.1 ESPECIFICACIONES DE LA CONCAVALINA A | 29 |
| 3.2 MATERIALES | 30 |
| 3.3 ESPECTROFOTOMETRÍA | 30 |
| 3.4 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC) | 31 |
| 3.5 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) | 33 |
| 3.6 CÁLCULO DE ÁREAS SUPERFICIALES ACCESIBLES (ASA) | 33 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 34 |
| 4.1 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 ITC Y OBTENCIÓN DE LOS ΔH Y EL ΔC_p DE UNIÓN PARA EL SISTEMA CONA – MEMAN..... | 36 |
| 4.3 ITC Y OBTENCIÓN DE LAS ΔH Y EL ΔC_p DE UNIÓN PARA EL SISTEMA CONA– MEGLU..... | 41 |
| 4.4 CONTRIBUCIÓN DEL GRUPO HIDROXILO AL ΔC_p..... | 47 |
| 4.5 DESGLOSE DE LAS CONTRIBUCIONES AL ΔG PARA LOS SISTEMAS MEMAN – CONA Y MEGLU– CONA..... | 51 |
| 4.6 ECUACIÓN PARAMÉTRICA PARA ESTIMAR EL ΔC_p DE UNIÓN PARA UN SISTEMA PROTEÍNA – CARBOHIDRATO..... | 53 |
| 4.7 NUEVA ECUACIÓN PARAMÉTRICA..... | 58 |
| V. CONCLUSIONES | 61 |
| VI. TRABAJO A FUTURO..... | 64 |
| VII. ANEXO DE RESULTADOS EXPERIMENTALES..... | 66 |
| VIII. REFERENCIAS | 86 |

I. INTRODUCCIÓN

1.1 MOTIVACIÓN

Las lectinas son una clase de proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran en formas de vida tan diversas como plantas, animales y organismos unicelulares, por mencionar algunos ¹⁻⁵. Aunque aún falta mucho por aprender sobre sus funciones y el papel que juegan en los organismos, se sabe que las lectinas animales están involucradas en procesos biológicos como el transporte y la eliminación de glicoproteínas, mecanismos de adhesión, respuesta inmunológica, procesos malignos y apoptosis ⁶. Se tiene la hipótesis de que las lectinas vegetales son mediadores de la simbiosis entre organismos fijadores de nitrógeno y las leguminosas ^{7, 8}. También se cree que podrían jugar una parte importante en la defensa de las semillas contra ataques micóticos ⁹. Las lectinas, especialmente aquéllas que se pueden obtener de plantas en cantidades grandes, han sido utilizadas de forma sistemática para aislar ciertos receptores de carbohidratos por medio de cromatografía de afinidad. Los complejos lectina – carbohidrato también han sido estudiados en sí mismos, y se cuenta con información estructural y termodinámica para este tipo de interacciones ¹⁰.

Las lectinas son proteínas que unen una gran diversidad de azúcares de forma altamente específica y reversible ⁶. Muchos procesos relacionados con el reconocimiento y comunicación celular dependen de la asociación lectina – carbohidrato ³. Es por eso que elucidar los mecanismos y los parámetros termodinámicos de unión de estos sistemas resulta de interés para comprender sus funciones biológicas. Aunque se han utilizado técnicas de hemoaglutinación y precipitación para determinar la afinidad relativa y especificidad de las lectinas hacia varios azúcares ¹¹, estos métodos no proporcionan información de carácter termodinámico sobre la naturaleza de las interacciones. Algunas otras técnicas como la espectrofotometría, fluorescencia, diálisis de equilibrio, resonancia magnética nuclear (RMN) y resonancia de superficie de plasma proporcionan valores de parámetros termodinámicos de forma indirecta. En comparación, la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés)

permite determinar con alto grado de precisión y de forma directa el valor de parámetros como la entalpía de unión, ΔH , la constante de equilibrio, K , y el cambio en la capacidad calorífica a presión constante, ΔC_p , asociados a la unión lectina – carbohidrato. Se ha encontrado que la energética de los procesos de unión lectina – carbohidrato es significativamente diferente a la de formación de complejos proteína – proteína y proteína – oligopéptido¹²⁻¹⁵.

En el estudio de la formación de complejos proteína – X, donde X es algún ligando, de entre todas las propiedades termodinámicas, el cambio en la capacidad calorífica a presión constante (ΔC_p) es particularmente importante.

Ello se debe a que, como indica la relación termodinámica $\Delta C_p = T \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial T} \right)_p$, el

ΔC_p es una sonda de los cambios estructurales (ΔS) que ocurren en la formación del complejo proteína – X. Además se ha encontrado que el ΔC_p es proporcional al área de contacto entre las moléculas que forman el complejo. Estas áreas pueden estimarse empleando las llamadas áreas superficiales accesibles (ASA). Al formarse un complejo proteína – X, el cambio en el ASA está dado por:

$$\Delta ASA_{\text{complejo}} = ASA_{\text{complejo}} - (ASA_{\text{proteína}} + ASA_X) \quad (1.1)$$

En todos los casos, el ΔASA de la ecuación (1.1) es de signo negativo, ya que siempre se oculta área al agua cuando ocurre la formación del complejo. Los grupos químicos presentes en las zonas de contacto, que podemos llamar *de intercara*, sufren cambios importantes en su entorno. Estos cambios son el resultado de procesos como la deshidratación, la formación y ruptura de puentes de hidrógeno, y las interacciones no específicas con otros grupos químicos, por mencionar algunos. Estos procesos quedan caracterizados por cambios en las propiedades termodinámicas ΔH , ΔG , ΔC_p , etc. Makhatadze y Privalov¹⁶⁻¹⁸ han propuesto que el ΔC_p para la formación de un complejo proteína – X se

puede estimar a partir de las contribuciones de cada grupo químico i de la siguiente forma:

$$\Delta C_p = \sum \Delta C_{p_i} \cdot \Delta ASA_i \quad (1.2)$$

donde ΔC_{p_i} es el cambio en la capacidad calorífica a presión constante para la transferencia de un "grupo químico i " de la fase gas a la fase acuosa (proceso de *hidratación*), normalizado por unidad de área. Los ΔC_{p_i} se calculan utilizando datos experimentales de compuestos modelo; por ejemplo, el ΔC_p de transferencia de un grupo $-\text{CH}_2-$ corresponde al ΔC_p del ciclohexano, dividido entre 6. En la ecuación (1.2) el ΔASA_i es el cambio de área que ocurre cuando el grupo químico i cambia de entorno como consecuencia de la formación del complejo.

El modelo de Makhatadze y Privalov, aunque adecuado para estudiar la formación de complejos proteína – proteína, proteína – oligopéptido y el plegamiento de proteínas, no es capaz de reproducir los valores experimentales para procesos de unión proteína – carbohidrato (P – C) ¹². García-Hernández et al. ¹⁵ han propuesto que para la asociación P – C el ΔC_p se puede describir haciendo uso de un modelo simple energético-estructural, en términos de los cambios en las áreas superficiales polares (ΔASA_p) y no polares (ΔASA_{np}) accesibles de las especies involucradas ^{12,15}:

$$\Delta C_p = \Delta c_{p_{np}} \cdot \Delta ASA_{np} + \Delta c_{p_p} \cdot \Delta ASA_p \quad (1.3)$$

En esta ecuación $\Delta c_{p_{np}}$ y Δc_{p_p} son parámetros ajustables a los valores experimentales de ΔC_p , mientras que los ΔASA son conocidos. Es decir, el empleo de esta ecuación requiere conocer la estructura cristalográfica de P, de C y del complejo P – C para calcular dichas ΔASA . Este tipo de parametrización

se ha empleado también para calcular valores de ΔH de procesos tanto de plegamiento de proteínas como de interacción proteína – proteína con anterioridad.^{19, 20} La conclusión más importante del empleo de la ecuación (1.3) sobre un conjunto de datos de interacción proteína – carbohidrato consiste en que la deshidratación de grupos polares es la causa principal de los valores negativos del ΔC_p , lo cual implica que estos grupos se comportan de manera hidrofóbica para un proceso de asociación P – C¹⁴.

Dado que la base de datos de parámetros termodinámicos para la asociación P – C es aún pequeña, la correlación entre el ΔC_p y el ΔASA_p todavía se puede explorar y, ciertamente, mejorar con la inclusión de nuevas caracterizaciones. Es en este contexto que el trabajo descrito en esta tesis resulta ser de importancia. Al determinar el ΔC_p para la formación de dos complejos proteína – carbohidrato, uno de ellos previamente reportado en la literatura y otro que no se había caracterizado aún, se afinarán los valores de los coeficientes en la ecuación paramétrica (1.3). Para ello se medirá el ΔH de formación de dos complejos, el metil- α -D-manopiranosido – concanavalina A y el metil- α -D-glucopiranosido – concanavalina A a varias temperaturas y se obtendrá el correspondiente ΔC_p para cada uno de ellos. Los dos ligandos, el metil- α -D-manopiranosido (MeMan) y el metil- α -D-glucopiranosido (MeGlu), difieren exclusivamente en la orientación del grupo hidroxilo que se encuentra en C-2. Se aprovechará esta característica estructural para comparar el ΔC_p de formación de estos dos complejos entre sí y obtener un valor numérico de la contribución por interacción de la proteína con un grupo –OH a este parámetro termodinámico.

1.2 OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de investigación son:

- a. contribuir a enriquecer la base de datos para uniones P – C a través de la medición del ΔH de unión a diferentes temperaturas, y con ello obtener el $\Delta C_p (=d\Delta H/dT)$ para la asociación de la lectina concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (ConA) con los monosacáridos metil- α -D-glucopiranosido (MeGlu) y metil- α -D-manopiranosido (MeMan) respectivamente. Como se dijo anteriormente, ambos monosacáridos difieren exclusivamente en la orientación de un grupo hidroxilo, el de C-2, por lo cual la diferencia entre ΔC_p de formación para ambos complejos se debe únicamente a esta característica estructural;
- b. recalcular la parametrización estructural generada por García-Hernández et al.¹⁵ para uniones P – C, con los nuevos datos generados; es decir, obtener nuevos valores para $\Delta c_{p_{np}}$ y Δc_{p_p} ;
- c. para la interacción proteína – carbohidrato en los complejos ConA – MeMan y ConA – MeGlu, evaluar la contribución al ΔC_p total por efecto de la orientación de un grupo hidroxilo. En el complejo ConA – MeMan el grupo –OH en C-2 se encuentra interactuando fuertemente con la proteína, mientras que no lo hace en el complejo ConA – MeGlu;
- d. sugerir una parametrización estructural más detallada del ΔC_p , en la cual se haga explícita la contribución de los grupos polares y no polares provenientes de la proteína y del carbohidrato, respectivamente, en la formación de complejos P – C. Para ello se utilizará la base de datos termodinámicos, que incluya los valores encontrados para los sistemas ConA – MeMan y ConA – MeGlu

II. ANTECEDENTES

2.1 Equilibrio Químico

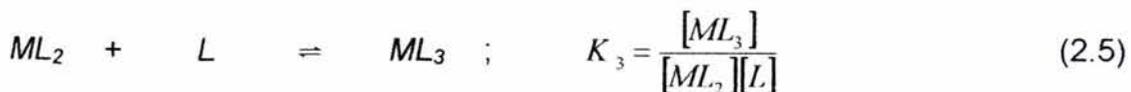
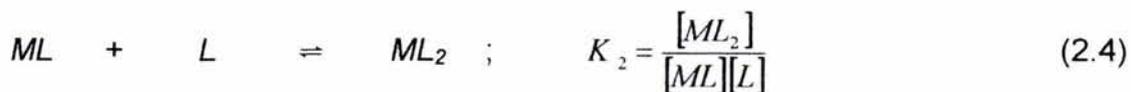
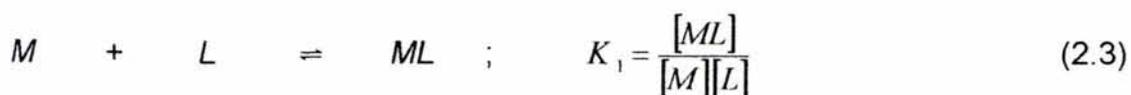
El problema que aborda esta sección es la determinación de la constante de equilibrio asociada a la unión de un carbohidrato a una proteína para un modelo de sitios independientes. Este equilibrio se escribe de la siguiente manera:

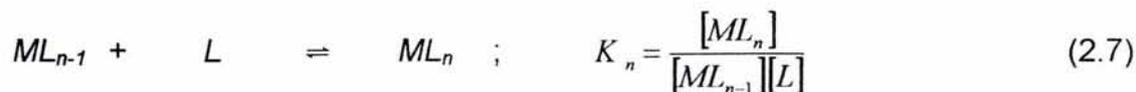
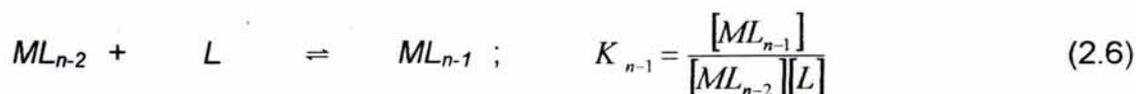


donde M es la macromolécula en disolución, L el ligando, ML_n es el complejo macromolécula – ligando formado y n es el número de sitios de unión disponibles en la macromolécula. La constante de equilibrio GLOBAL asociada a este proceso es por definición:

$$\beta_b = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n} \quad (2.2)$$

En general la unión simultánea de los “n” ligandos a una macromolécula no ocurre, sino que en la mayoría de los casos la unión de cada una de estas moléculas es secuencial. En este último caso, la ecuación (2.1) se transforma en la serie de reacciones:





Para estos equilibrios múltiples, determinar las concentraciones de cada una de las especies involucradas en el equilibrio global resulta, en la mayoría de los casos, muy complicado. Por lo general solamente es posible determinar el *número promedio* de moléculas de ligando L asociadas con cada macromolécula. Este parámetro se define como ²¹:

$$\bar{\nu} = \frac{\text{moles de } L \text{ unidos}}{\text{moles totales de } M} = \frac{[L]_B}{[M]_T} \quad (2.8)$$

Cuando la concentración de ligando en solución, $[L]$, es muy pequeña en relación con la cantidad de macromolécula, $\bar{\nu}$ también será un número pequeño. Asimismo, cuando $[L]$ es mucho mayor que $[M]$, $\bar{\nu}$ se aproximará a n , el número de sitios de unión con el que cuenta la macromolécula. En otras palabras, $\bar{\nu} \rightarrow 0$ cuando $[L] \rightarrow 0$ y $\bar{\nu} \rightarrow n$ cuando $[L] \rightarrow \infty$.

La expresión (2.8) se relaciona directamente con las ecuaciones de equilibrio para cada una de las especies en disolución. Por ejemplo, de la ecuación (2.3) podemos obtener la concentración de ligando que se encuentra en forma de $[ML]$:

$$[L]_{\text{en forma de } [ML]} = [ML] = K_1 [L][M] \quad (2.9)$$

Dado que si $[ML_2]$ se disociara, la concentración de ligando sería el doble de la concentración de macromolécula, la concentración de ligando que se encuentra en forma de $[ML_2]$ debe obtenerse despejando $[ML_2]$ de la ecuación (2.4), y multiplicando por dos:

$$[L]_{\text{en forma de } [ML_2]} = 2[ML_2] = 2K_2 [ML][L] \quad (2.10)$$

Sustituyendo (2.9) en la ecuación (2.10) para el valor de $[ML]$:

$$[L]_{\text{en forma de } [ML_2]} = 2K_2 K_1 [L]^2 [M] \quad (2.11)$$

y así, para cada $[L]$ en forma de $[ML_i]$ tendremos:

$$[L]_{\text{en forma de } [ML_i]} = i[ML_i] = iK_1 K_2 \dots K_i [L]^i [M] \quad (2.12)$$

de manera que la concentración de $[L]$ unido, $[L]_B$, se podrá escribir como:

$$[L]_B = [M] (K_1 [L] + 2K_1 K_2 [L]^2 + \dots + iK_1 K_2 \dots K_i [L]^i + \dots + nK_1 K_2 \dots K_n [L]^n) \quad (2.13)$$

Haciendo un razonamiento similar se llega a la concentración total de M,

$$[M]_T = [M] (1 + K_1 [L] + K_1 K_2 [L]^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_i [L]^i + \dots + K_1 K_2 \dots K_n [L]^n) \quad (2.14)$$

Sustituyendo en la expresión (2.8), obtenemos:

$$\bar{\nu} = \frac{K_1 [L] + 2K_1 K_2 [L]^2 + \dots + iK_1 K_2 \dots K_i [L]^i + \dots + nK_1 K_2 \dots K_n [L]^n}{1 + K_1 [L] + K_1 K_2 [L]^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_i [L]^i + \dots + K_1 K_2 \dots K_n [L]^n} \quad (2.15)$$

La ecuación (2.15) es la expresión más general que podemos obtener para la unión de ligandos a una macromolécula. Para los casos en que la ocupación de uno de los sitios cambia el valor de la afinidad del ligando por otros sitios, el problema de determinar el valor de las constantes puede ser muy complicado. Sin embargo, el caso que nos atañe es mucho más sencillo, ya que consideraremos que cada sitio de unión en la macromolécula es independiente de los sitios restantes, e igual de afín por el ligando; es decir, que *si pudiésemos separar la macromolécula en unidades independientes que preservaran los sitios de unión con el ligando, todos estos tendrían un mismo valor de la constante de unión*.

Para poder resolver la ecuación (2.15) es necesario conocer la relación entre las constantes de equilibrio K_1 a K_n . Parece razonable escribir $K_1 = K_2 = \dots = K_n$ y sustituir en la ecuación (2.15); sin embargo, esto no es correcto. A continuación ejemplificaremos el caso de una macromolécula que puede pegar dos ligandos iguales, en sitios de unión independientes, como se muestra en la figura 2.1:

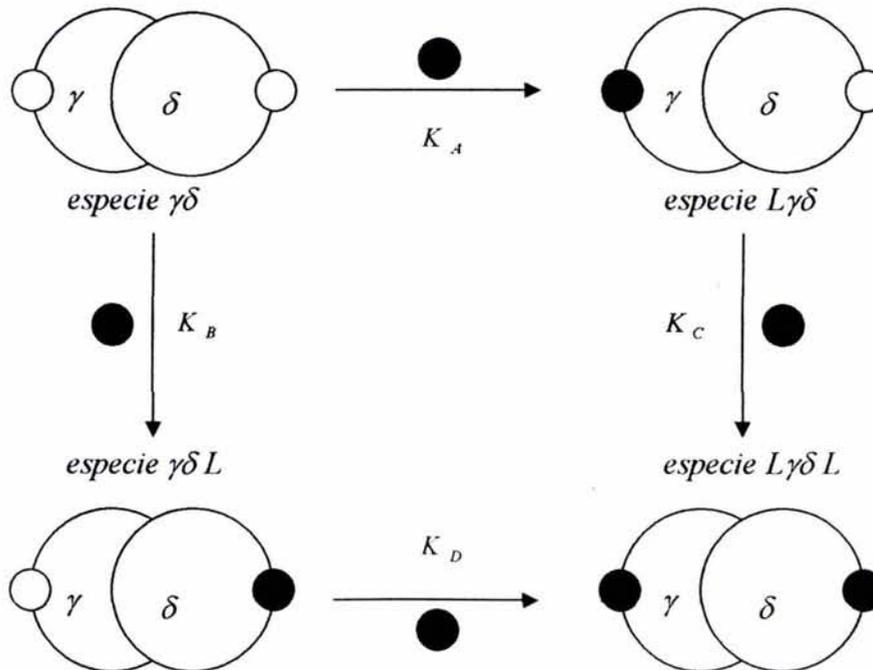


Figura 2.1: Posibles uniones para el ligando en una especie que cuenta con dos sitios independientes de pegado.

Podemos plantear cuatro constantes al considerar todos los equilibrios posibles:

$$K_A = \frac{[L\gamma\delta]}{[L][\gamma\delta]} \quad (2.16)$$

$$K_B = \frac{[\gamma\delta L]}{[L][\gamma\delta]} \quad (2.17)$$

$$K_C = \frac{[L\gamma\delta L]}{[L][L\gamma\delta]} \quad (2.18)$$

$$K_D = \frac{[L\gamma\delta L]}{[L][\gamma\delta L]} \quad (2.19)$$

Estas constantes, sin embargo, no son independientes. Las constantes *termodinámicas* no nos dan información para interpretar los detalles moleculares de la reacción, como por ejemplo qué sitios están involucrados en cada unión ²¹. Las especies $\gamma\delta L$ y $L\gamma\delta$ han sido bautizadas como “isómeros de sitio” por Weber ²², ya que si los sitios de unión en estas especies fueran idénticos, las especies serían estrictamente indistinguibles. Las constantes asociadas a la unión de ligando en estos sitios equivalentes no pueden determinarse por procedimientos convencionales; sin embargo están relacionadas con las constantes *termodinámicas* del sistema, como se muestra a continuación:

$$K_1 = \frac{[L\gamma\delta] + [\gamma\delta L]}{[L][\gamma\delta]} = K_A + K_B \quad (2.20)$$

$$K_2 = \frac{[L\gamma\delta L]}{[L]([L\gamma\delta] + [\gamma\delta L])} = \frac{K_C K_D}{K_C + K_D} \quad (2.21)$$

La constante termodinámica K_1 corresponde a la primera asociación, sin importar el sitio de la molécula en la que ésta ocurra; la constante termodinámica K_2 se refiere al pegado del ligando, una vez que alguno de los dos sitios está ocupado. Volviendo a la figura y recordando que el pegado de ligandos es independiente y proponiendo que la afinidad sea la misma para cada sitio, tendremos que $K_A = K_B = K_C = K_D$. Por lo tanto, las ecuaciones (2.20) y (2.21) se podrán reescribir en términos de K_A como:

$$K_1 = 2K_A, \quad K_2 = \frac{K_A}{2} \quad (2.22)$$

Las dos constantes *termodinámicas* de la reacción están ahora en términos de una sola constante, K_A , que se puede interpretar como la afinidad que tiene un ligando por un sitio de unión, una especie de "afinidad intrínseca".

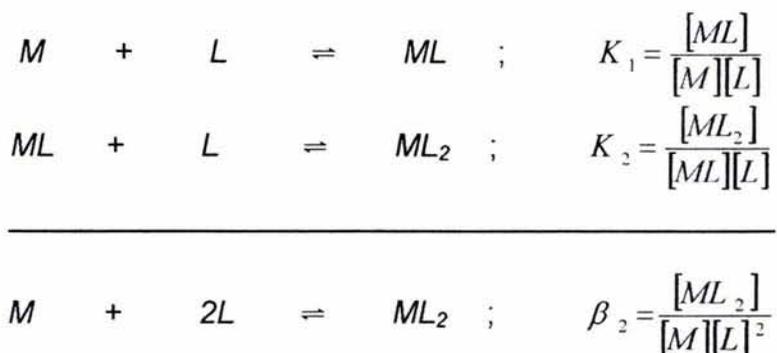
En general, para una macromolécula con "n" sitios de unión idénticos e independientes, la especie $[PL_i]$ se puede formar de $\frac{n!}{i!(n-i)!}$ maneras diferentes. Es decir, la constante de formación global (una constante *termodinámica*) de la especie $[PL_i]$ está dada por:

$$\beta_i = \frac{n!}{i!(n-i)!} K_A^i \quad (2.23)$$

Para obtener la expresión de la constante i-ésima, por ejemplo, K_2 , podemos sustituir en la expresión de la constante de formación, tomando en cuenta que hay "n" maneras diferentes de formar el primer complejo, $[PL]$, y que $K_1 = nK_A$. Para $i=2$ de la ecuación (2.23), tendremos que:

$$\beta_2 = \frac{n!}{2!(n-2)!} K_A^2 = \frac{n(n-1)}{2} K_A^2$$

Como β_2 a su vez es igual al producto $K_1 K_2$ ya que es la constante de formación que resulta de sumar los siguientes equilibrios,



entonces:

$$\beta_2 = K_1 K_2 = n K_A K_2 = \frac{n(n-1)}{2} K_A^2 \quad (2.24)$$

Despejado K_2 de la expresión (2.24) obtendremos la siguiente ecuación:

$$K_2 = \frac{n-1}{2} K_A \quad (2.25)$$

De la misma manera, para obtener K_3 utilizaremos la definición de β_3 :

$$\beta_3 = \frac{n!}{3!(n-3)!} K_A^3 = \frac{n(n-1)(n-2)}{3 \cdot 2} K_A^3 = K_1 K_2 K_3 = n K_A \cdot \frac{n-1}{2} K_A \cdot K_3$$

$$K_3 = \frac{n-2}{3} K_A \quad (2.26)$$

Generalizando, la i -ésima constante de unión estará dada por:

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} K_A \quad (2.27)$$

Utilizando este último resultado en la ecuación (2.15), se encuentra que:

$$\bar{\nu} = \frac{\sum_{i=1}^n i \frac{n!}{i!(n-i)!} (K_A [L])^i}{1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{i!(n-i)!} (K_A [L])^i} \quad (2.27)$$

El denominador de la última expresión corresponde a la expansión binomial de $(1 + K_A [L])^n$. Al derivar el denominador con respecto al producto $K_A [L]$, y multiplicar de nuevo por $K_A [L]$ esta derivada obtendremos el numerador. Por lo cual $\bar{\nu}$ se puede reescribir como:

$$\bar{\nu} = \frac{n K_A [L] (1 + K_A [L])^{n-1}}{(1 + K_A [L])^n}$$

$$\bar{\nu} = \frac{n K_A [L]}{1 + K_A [L]} \quad (2.28)$$

Así, la expresión de $\bar{\nu}$, el número promedio de moléculas de ligando L asociadas con cada macromolécula, se ha simplificado considerablemente, para el caso de sitios de unión iguales e independientes en una macromolécula.

Definiendo ahora un nuevo parámetro, θ , como la fracción de sitios ocupados en el sistema, equivalente también al grado de saturación:

$$\theta = \frac{[L]_B}{n[M]_T} = \frac{1}{n} \bar{\nu} = \frac{K_A [L]}{1 + K_A [L]} \quad (2.29)$$

las ecuaciones (2.28) y (2.29) se pueden reorganizar de la siguiente manera:

$$\frac{\bar{\nu}}{n - \bar{\nu}} = \frac{\theta}{1 - \theta} = K_A [L] \quad (2.30)$$

De acuerdo con van Holde ²³, esta nueva expresión se puede interpretar como:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = \frac{[\text{sitios ocupados}]}{[\text{sitios vacíos}]} ; \frac{[\text{sitios ocupados}]}{[\text{sitios vacíos}][L]} = K_A \quad (2.31)$$

Es decir, podemos modelar el pegado de ligandos a una macromolécula que presente varios sitios de unión iguales e independientes, simplemente considerando una concentración de *sitios disponibles*, y de ligandos capaces de unirse a ellos. Cualquier cantidad termodinámica calculada a partir de la ecuación (2.30) arrojará un valor *por sitio de unión* ²², característica que la hará útil para el tratamiento matemático posterior.

2.2 Parámetros Termodinámicos (ΔH y K) en Términos de Observables Experimentales

Las ecuaciones obtenidas en el apartado anterior sirven de base para evaluar el ΔH y la K de equilibrio (de ahora en adelante referida solamente como " K "), a partir de los datos obtenidos por medio de la técnica de ITC. En este trabajo estamos interesados en determinar el ΔH y el $\Delta Cp = d\Delta H/dT$ para la unión de los ligandos metil- α -D-manopiranosido (MeMan) y metil- α -D-glucopiranosido (MeGlu), respectivamente, a la proteína Concanavalina A (ConA), que se encuentra como tetrámero al pH de trabajo seleccionado de 7.2 ²⁴. Como se justificó en la sección precedente, considerar la concentración de sitios de unión

de la ConA es equivalente a considerar la concentración de tetrámero, ya que los sitios de unión están directamente relacionados con la concentración del monómero, de la forma $[S]_T = n[M]_T$, donde $[S]_T$ es la concentración de sitios disponibles en el sistema. Utilizaremos este primer enfoque, debido a que la formulación matemática resulta más sencilla de esta manera.

La evaluación de datos de ITC en forma de calor liberado o absorbido por el sistema dada una adición de ligando requiere considerar dicho calor como función de la concentración total de ligando agregado. En un experimento tradicional de calorimetría el ligando se añade en pequeños volúmenes y se conoce tanto la concentración total de ligando añadido en cada inyección, $[L]_T$, como la concentración de sitios totales, $[S]_T$ durante todo el transcurso del experimento. Tradicionalmente se considera a $[L]_T$ como la variable independiente. La variable $[S]_T$ se puede considerar constante a lo largo de todo el experimento*. El objetivo es entonces obtener una expresión donde el calor medido quede expresado en términos de la concentración de ligando²⁵.

Dado el equilibrio químico:



Tendremos los siguientes balances de materia:

$$[S]_T = [S] + [SL] \quad (2.32)$$

$$[L]_T = [L] + [SL] \quad (2.33)$$

* Estrictamente la concentración de sitios de unión cambia en cada inyección de ligando. Si el volumen de las inyecciones es muy pequeño, este cambio se puede despreciar. El equipo utilizado en este trabajo realiza automáticamente una corrección por volumen inyectado en la concentración de sitios y el volumen de trabajo se mantiene constante en todo momento, ya que al inyectar ligando en la celda totalmente llena, el volumen inyectado es igual al volumen desplazado.

donde $[S]$ y $[L]$ se refieren a las concentraciones de sitios libres y ligando libre respectivamente, y $[LS]$ a la concentración del complejo formado. Al mezclarse las dos especies después de inyectar el ligando a la macromolécula, el calor generado o absorbido es directamente proporcional a la concentración de ligando que se une a los sitios con respecto a la que había en la celda antes de inyectar, $d[L]_B$, es decir:

$$dq = V dH d[L]_B \quad (2.34)$$

La constante de proporcionalidad está dada por el producto $V dH$ donde V es el volumen de la celda de muestra y dH es la entalpía de reacción por mol de producto formado. Usando la ecuación (2.29), la concentración $[L]_B$ también se puede escribir en términos de la fracción de sitios ocupados en el sistema, de tal forma que:

$$[L]_B = [S]_T \theta = [SL] \quad (2.35)$$

Ahora tendremos la ecuación de calor en términos de $[SL]$:

$$dq = V dH d[SL] \quad (2.36)$$

Dado que con el microcalorímetro de titulación isotérmica se determina el calor generado o absorbido en función de la cantidad de ligando adicionada, es pertinente escribir el calor como función de la concentración total del ligando en la celda:

$$\frac{dq}{d[L]_T} = V dH \frac{d[SL]}{d[L]_T} \quad (2.37)$$

Como $[SL]=[L]_T-[L]$, nuestro objetivo es encontrar una ecuación que proporcione a $[SL]$ en función de la cantidad total de ligando exclusivamente. Es decir, debemos encontrar $[L]=f([L]_T)$. El desarrollo de esta expresión se presenta a continuación. De la definición de constante para este equilibrio químico:

$$[SL]=K[S][L] \quad (2.38)$$

Sustituyendo (2.38) en (2.32) y (2.33) tendremos:

$$[S]_T=[S]+K[S][L] \quad (2.39)$$

$$[L]_T=[L]+K[S][L] \quad (2.40)$$

Despejando $[S]$ de ambas ecuaciones podemos llegar a:

$$[S]=\frac{[S]_T}{1+K[L]}=\frac{[L]_T-[L]}{K[L]} \quad (2.41)$$

La ecuación (2.41) es importante porque permite encontrar los valores de todas las especies en el equilibrio a partir de la resolución del polinomio de segundo grado que resulta de ella:

$$K[L]^2+[L]+K[L][S]_T-K[L][L]_T-[L]_T=0 \quad (2.42)$$

Reordenando, dividiendo entre K y resolviendo para $[L]$:

$$[L]^2+[L]\left(\frac{1}{K}+[S]_T-[L]_T\right)-\frac{[L]_T}{K}=0$$

$$[L] = \frac{[L]_T - [S]_T - 1/K + \sqrt{(1/K + [S]_T - [L]_T)^2 - 4[L]_T/K}}{2} \quad (2.43)$$

Dividiendo ambos lados de la ecuación entre $[S]_T$ y haciendo los cambios de variable $X_R = [L]_T/[S]_T$ y $c = K[S]_T$ (variables convenientes, como explicaremos más adelante), obtendremos la expresión:

$$[L] = \frac{X_R - 1/c - 1 + \sqrt{(X_R + 1/c + 1)^2 - 4X_R}}{2} \cdot [S]_T \quad (2.44)$$

Ahora sólo queda tomar la derivada de esta última expresión con respecto a $[L]_T$. El valor de c no varía considerablemente a lo largo del experimento, porque la concentración de sitios totales, $[S]_T$, sólo se ve modificada por efectos de dilución al inyectar el ligando. Esto no ocurre con el valor de X_R , que aumenta significativamente con cada adición de ligando a la solución de macromolécula. Como $X_R = f([L]_T)$ y $[L] = f(X_R)$, tendremos que:

$$\frac{d[L]}{d[L]_T} = \frac{d[L]}{dX_R} \frac{dX_R}{d[L]_T} ; \text{ con } \frac{dX_R}{d[L]_T} = \frac{1}{[S]_T}, \text{ y}$$

$$\frac{d[L]}{dX_R} = \frac{1}{2} + \left(\frac{1 - 1/c - X_R}{2\sqrt{(X_R + 1/c + 1)^2 - 4X_R}} \right) \quad (2.45)$$

La expresión (2.45) recibe el nombre de "isoterma de Wiseman" ²⁶. Se profundizará en sus características en secciones posteriores. De acuerdo con el balance de materia (2.33), ahora estamos en posibilidad de escribir la ecuación (2.36) en términos de cantidades que son conocidas a lo largo de todo el experimento:

$$dq = V dH \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - 1/c - X_R}{\sqrt{(X_R + 1/c + 1)^2 - 4X_R}} \right) d[L]_T \quad (2.46)$$

La ecuación (2.46) expresa el calor observado experimentalmente en función de la concentración total de ligando, $[L]_T$, de la concentración de los sitios de unión en la celda, $[S]_T$, y de una variable c que depende de K . Durante el experimento, se añade ligando a la celda que contiene la macromolécula en una serie de titulaciones, de tal forma que se cede o se libera calor, dq , a medida que se adiciona L . Al finalizar el experimento contaremos con una serie de puntos, dq vs. X_R , que se ajustarán a la ecuación (2.46) mediante iteraciones sucesivas, utilizando el software del aparato. Reescribiendo la ecuación (2.46) en términos de los parámetros ajustables,

$$dq = V \Delta H \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - (nK[M]_T)^{-1} - ([L]_T/n[M]_T)}{\sqrt{([L]_T/n[M]_T) + (nK[M]_T)^{-1} + 1)^2 - 4[L]_T/n[M]_T}} \right) \quad (2.47)$$

se puede ver que el ajuste arrojará los valores de ΔH , K y n . Esta última expresión consiste en la expresión diferencial de calor liberado o absorbido.

La expresión 2.47 también se puede escribir en forma integral de la siguiente manera:

$$Q = V \Delta H [S]_T \frac{K[L]}{1 + K[L]} = V \Delta H [S]_T \theta \quad (2.48)$$

En este caso, la concentración libre de ligando $[L]$ es la variable independiente. Al encontrar una expresión para $[L]$ en función de variables conocidas, como $[L]_T$, $[S]_T$, c y n , obtendremos la expresión (2.47). La expresión (2.48) no se

puede utilizar de forma directa porque la concentración de $[L]$ se tiene que calcular en cada inyección de ligando a la celda. Sin embargo, esta última expresión está escrita en función de θ , parámetro que se definió en la ecuación (2.29) y permite apreciar que el calor liberado es directamente proporcional a la fracción de sitios ocupados en el sistema y a la concentración total de sitios de unión, por lo cual también es una expresión útil.

2.3 Funcionamiento de un Aparato de Calorimetría de Titulación Isotérmica

La calorimetría ha sido una herramienta muy importante para caracterizar y comprender las fuerzas que gobiernan la interacción de macromoléculas de carácter biológico, ya sea proteínas, DNA o polisacáridos, consigo mismas o con algún tipo de ligando. A continuación se presenta una descripción general de la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

Un instrumento de ITC consiste de dos celdas idénticas de un material altamente conductor, como el oro o el Hasteloy[®], rodeadas de una chaqueta adiabática, como se muestra en la siguiente figura:

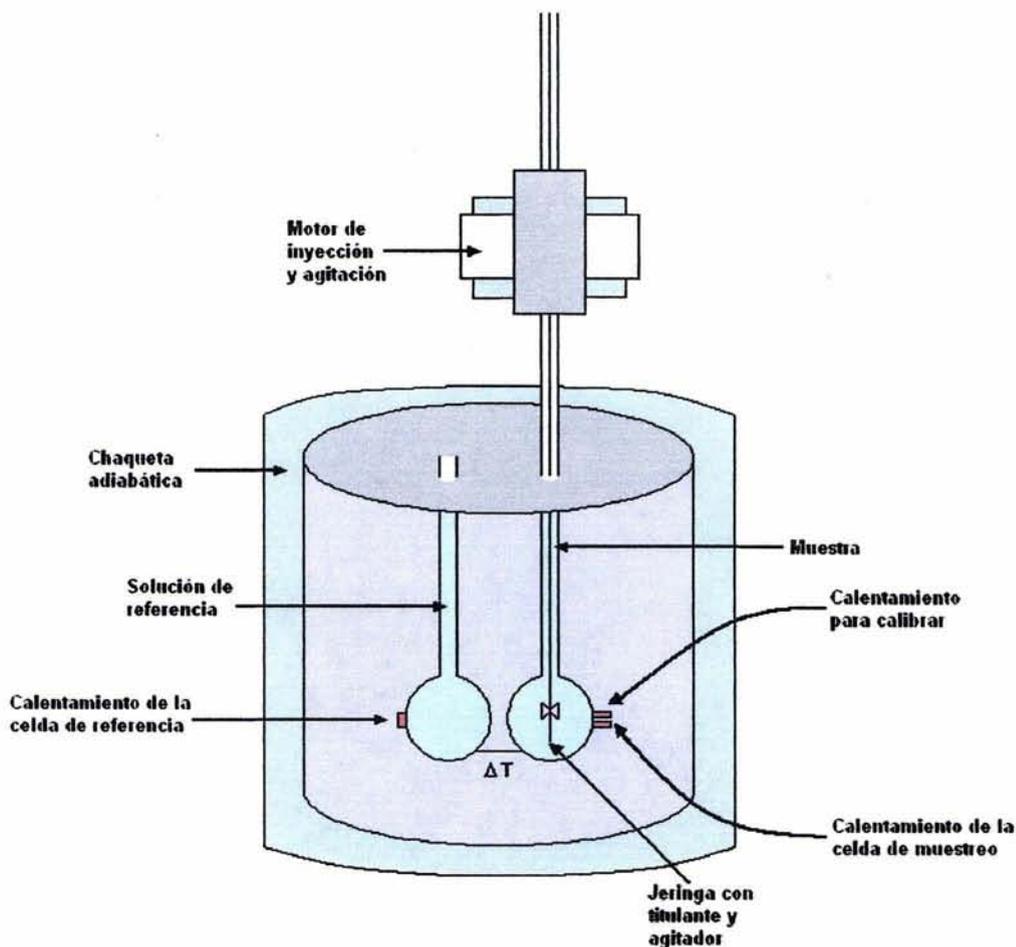


Figura 2.2: Diagrama esquemático de un aparato de calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Las dos celdas se encuentran conectadas por medio de un circuito termopar cuya función es detectar pequeñas diferencias de temperatura entre ellas, y entre las celdas y las paredes adiabáticas. La celda de referencia contiene agua desionizada y filtrada, aunque en algunos casos se puede llenar con amortiguador. La celda de muestra contiene la solución problema. Ambas celdas y las paredes adiabáticas se calientan utilizando elementos resistivos que se activan para mantener temperaturas idénticas entre todos los componentes del arreglo. En caso de requerir enfriamiento, se hace circular algún refrigerante a través de las paredes de la chaqueta.

Por lo general, en un experimento de ITC la celda de muestreo se llena con la solución de macromolécula a estudiar. Una jeringa exterior que se conecta a dicha celda inyecta cantidades de ligando previamente determinadas por el usuario. Antes de que ocurra la primera inyección se aplica una pequeña potencia constante a la celda de referencia. Esto se hace con el fin de que la potencia aplicada a la celda de referencia active la alimentación a la celda de muestreo, y esta última se mantenga bajo un régimen de microcalentamiento, mientras no haya liberación o requerimiento de calor por efecto de una reacción. Dicha señal constituirá la línea base, y es importante que ésta se mantenga constante a lo largo de todo el experimento. Una vez estabilizada la línea base, la inyección del ligando a la solución de macromolécula provocará que la reacción libere o absorba calor, dependiendo de si la asociación es un proceso exotérmico o endotérmico. Para una reacción exotérmica, la temperatura en la celda de muestreo aumentará de forma diferencial, provocando que se desactive su alimentación de potencia, de forma tal que el arreglo mantenga la misma temperatura con respecto a la celda de referencia. En el caso de una reacción endotérmica, la alimentación a la celda de muestreo se incrementará para mantener la temperatura constante. El valor observable en calorimetría de ITC es la potencia que se debe alimentar al arreglo para mantener la misma temperatura entre las celdas de referencia y de muestreo. Es importante mencionar que el equipo permite al usuario elegir la duración y el volumen de cada inyección, así como el espaciamiento entre inyecciones. La relación de potencia como función del tiempo, resultado de un experimento de ITC, se debe integrar con respecto al tiempo para obtener datos de calor generado o absorbido como función de la relación $[L]_T/[S]_T$. Esto es posible ya que se conoce la concentración tanto de ligando total como de sitios de unión totales en la celda de reacción para cada una de las inyecciones de ligando, es decir, en cualquier instante. La integral de la señal observada con respecto al tiempo representa el calor liberado o absorbido a causa de la reacción que se lleva a cabo en la celda. Este calor es a su vez directamente proporcional a la fracción de ligando que se ha unido a la macromolécula, como se describió en la sección

anterior de este trabajo. Es por esto que conocer con precisión estas concentraciones se refleja en la calidad de los ajustes y en la reproducibilidad de un experimento.

Prácticamente todo el ligando adicionado en las primeras inyecciones se une a la macromolécula en solución, por lo que las primeras señales, ya sean endotérmicas o exotérmicas, son las de mayor tamaño del experimento. A lo largo de éste, en cada inyección disminuye la cantidad de macromolécula "libre" en solución, por lo que la señal va decreciendo su tamaño conforme se titula la muestra.

El experimento de titulación de macromolécula con ligando no es el único que se debe llevar a cabo para conocer la entalpía y la constante asociada a cierta reacción. Dado que la solución inyectada debe tener una concentración por lo menos diez veces mayor que la solución en la celda, el titulante se verá diluido al inyectarlo a la celda. Es por eso que se debe realizar un segundo experimento, en donde el titulante se inyecte a la solución amortiguadora preparada igual que en el experimento de unión, pero sin la macromolécula (es decir, un blanco). El resultado de este experimento de dilución se debe restar al primer experimento. En otros casos puede ser necesario inclusive realizar el experimento de dilución de la macromolécula, es decir, inyectar el blanco a la celda que contiene la macromolécula.

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

amortiguadora, o por lo menos preparar ambas muestras con el mismo lote de solución. Una vez restados todos los blancos necesarios a la señal original de la macromolécula titulada con el ligando, la señal de calorimetría integrada con respecto al tiempo recibe el nombre de "Isoterma de Wiseman", como se mencionó en la sección anterior. Dicha isoterma consiste en el calor generado o absorbido por unidad de ligando inyectado, dq/dL_T , como función del cociente entre la concentración total de sitios disponibles y la concentración total de ligando en la celda, $[L]_T/[S]_T$, y se caracteriza mediante el parámetro $c = K[S]_T$. Para un mismo valor del producto $dH \cdot V$, la forma de la isoterma cambia en función de este parámetro, como se puede apreciar en la siguiente figura:

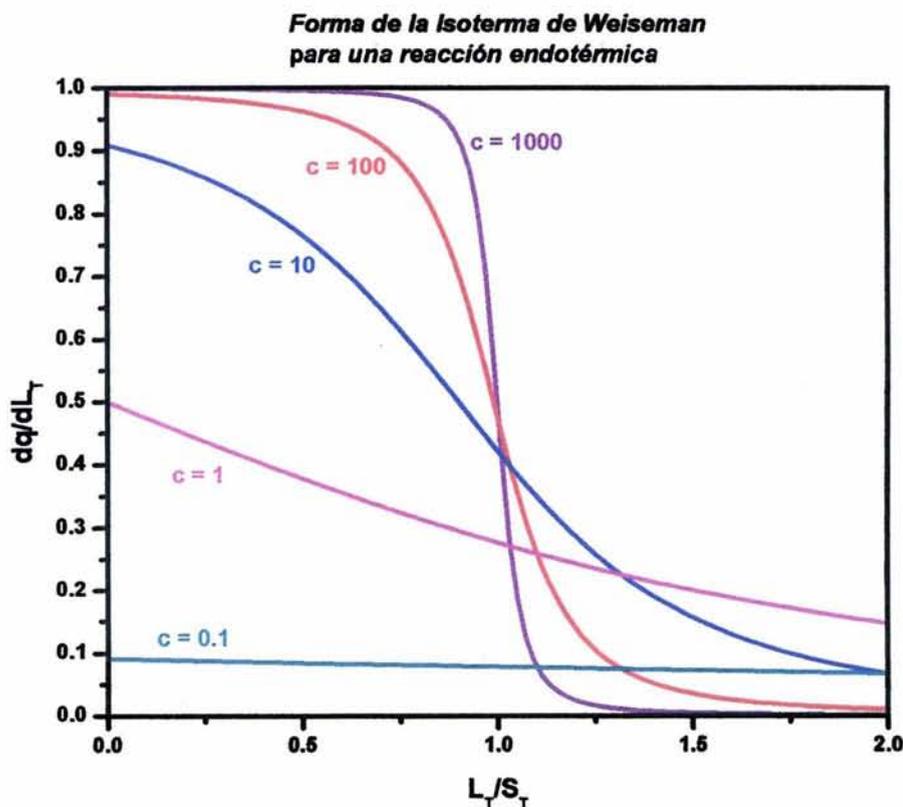


Figura 2.3: Isotermas de Wiseman para diferentes valores de c .

Tradicionalmente se ha recomendado que para obtener buenos resultados en un experimento de ITC, los valores de c deben encontrarse entre 1 y 1000²⁵⁻²⁸, aunque recientemente Tumbull y Daranas²⁹ han cuestionado la validez de esta aseveración y han propuesto que es factible estudiar sistemas con valores de c mucho menores que 1.

Finalmente, una vez obtenida la señal asociada a la unión entre macromolécula y titulante, la isoterma observada se debe ajustar a un modelo de unión. En la sección anterior se ha explicado cómo se obtiene este modelo para un sistema de un solo tipo de sitios independientes. Los métodos de ajuste son variados y en general los calorímetros cuentan con modelos diversos, que el usuario puede seleccionar. En particular, el aparato VP-ITC de Microcal[™] realiza el ajuste utilizando el método de Levenberg-Marquardt³⁰. Las variables a ajustar son el ΔH , la K y el número de sitios de unión por molécula, n . Si la estequiometría de reacción es conocida, como en el caso de que haya sido determinada por otros medios, (cristalografía, resonancia magnética nuclear, o algún otro método espectrofotométrico, por mencionar algunos), el valor de n se puede fijar en el ajuste. Ahora bien, si no se cuenta con esta información, el parámetro n se puede determinar de los datos experimentales. De cualquier forma, se recomienda utilizar las dos formas de ajuste – con n libre e imponiendo un valor a n – a manera de verificación. Se tendrá una forma sencilla de detectar errores experimentales cuando los valores de los parámetros obtenidos con ambos métodos difieran significativamente entre sí. Cabe aclarar que esta comparación sólo es válida cuando los valores de c son suficientemente grandes, para fines prácticos cuando $1 < c < 10^3$ ²⁹.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Especificaciones de la Concanavalina A

La ConA es una proteína ampliamente estudiada y caracterizada, que se encuentra como tetrámero a un pH superior a 7 y como dímero a un pH inferior a 6¹⁰; consiste en una mezcla de subunidades intactas formadas por una sola cadena de 237 aminoácidos y subunidades fragmentadas en donde esta misma cadena polipeptídica se ha truncado en dos segmentos entre los residuos 118 y 119⁴. Cada monómero posee un sitio de unión de carbohidrato, así como un sitio de unión para un ión de metal de transición (S1) y un sitio de unión para un ión Ca^{2+} (S2)¹¹. Se puede obtener de forma comercial con alto grado de pureza (SIGMA, C2010, $\geq 95\%$), aunque aun en esta presentación se observan los fragmentos de masas moleculares correspondientes a 12 y 14 kDa al emplear la técnica de electroforesis en gel SDS-PAGE (TRIS, pH 7.2) y revelar con AgNO_3 , como se muestra en la siguiente figura:

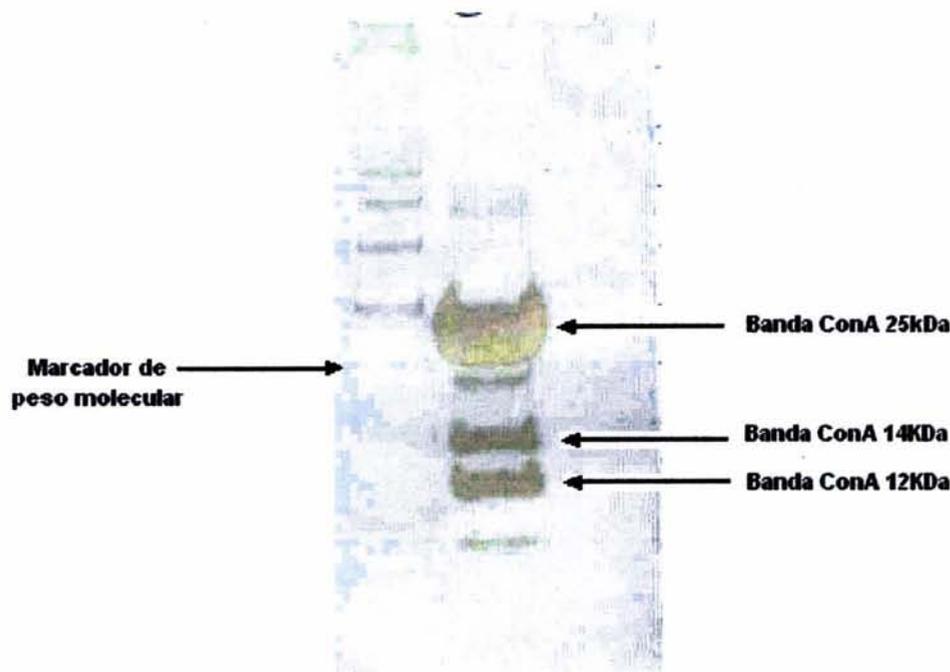


Figura 3.1: Gel de electroforesis (SDS-PAGE) para ConA, revelado con AgNO_3 .

Estos fragmentos forman subunidades competentes para la unión con carbohidratos y se ha encontrado que la proteína exenta de dichos fragmentos

(al purificar por precipitación con NH_4HCO_3) da valores idénticos a los obtenidos con la proteína sin purificar ³⁴, citado por ³².

En este trabajo se ha utilizado a la ConA tal como se obtiene de forma comercial, sin mayor purificación. Fue necesario seleccionar un tipo de solución amortiguadora de entre las que han sido previamente empleadas para estudiar a la ConA: TRIS, fosfatos, ácido dimetil glutárico y HEPES. Se optó por esta última, a un pH de 7.2, ya que la proteína es más estable a los cambios de temperatura y permanece más tiempo en disolución en este sistema. Además, los cationes Ca^{2+} y Mn^{2+} son más solubles en este medio, cosa que no ocurre con la solución de fosfatos al mismo pH, por ejemplo. Dado que se trabajó con altas concentraciones de ConA en solución fue necesario imponer una fuerza iónica de 0.5M de NaCl, ya que se ha reportado que a fuerza iónica elevada la solubilidad de la proteína aumenta ³¹.

3.2 Materiales

Todos los reactivos se compraron a Sigma. Se preparó una disolución amortiguadora filtrada y desgasificada de 0.1 M HEPES, pH 7.2, 0.5 M NaCl, 1 mM CaCl_2 y 1 mM MnCl_2 para disolver tanto a la proteína como a los dos monosacáridos, metil- α -D-manopiranosido (MeMan) y metil- α -D-glucopiranosido (MeGlu). El agua utilizada fue destilada y desionizada previo a la preparación de los reactivos. La concanavalina A (ConA) liofilizada (tipo IV, pureza $\geq 95\%$ No. C2010) así como los monosacáridos MeMan y MeGlu se utilizaron sin purificación posterior.

3.3 Espectrofotometría

Se evaluó la concentración de ConA en las muestras que serían sometidas a ITC por medio de la técnica de espectroscopia de absorción en UV, a $\lambda = 280$ nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman–Coulter DU 7500. Para ello se realizaron diluciones de dichas muestras: se tomaron tres alícuotas de 20 μL .

cada una y se llevaron a un volumen de 1 mL. Se midió absorbancia por triplicado y de forma independiente, utilizando la solución amortiguadora como blanco. El coeficiente de extinción considerado fue $A_{1\%1cm}^{280nm} = 13.7$ a pH 7.2 y la concentración se expresó en términos del monómero ($M_r = 26\ 500$)²⁴.

3.4 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

El trabajo experimental se realizó en un aparato de VP – ITC (Microcal) recién adquirido, por lo cual se llevó a cabo la instalación del equipo y las pruebas indicadas de verificación (titulación metanol–agua) antes de correr los sistemas carbohidrato–ConA. Cabe señalar que se tuvo especial cuidado con la limpieza de las celdas, ya que cualquier impureza acumulada es suficiente para causar alteraciones en la línea base. Las disoluciones de proteína fueron preparadas disolviendo directamente a la proteína liofilizada en el amortiguador, poco antes de medir para asegurar estabilidad, y fueron centrifugadas a 5000 rpm en una centrífuga clínica marca Hettich Universal 30 RF durante 25 minutos antes de realizar los experimentos, con el fin de excluir cualquier partícula suspendida que pudiera alterar la línea base. La concentración se evaluó espectrofotométricamente inmediatamente después de centrifugar. La concentración de proteína en disolución siempre estuvo en un intervalo de 0.39 a 0.32 mM para el sistema titulado con MeGlu y de 0.31 a 0.27 mM para el sistema titulado con MeMan. La disolución de MeGlu utilizada para todas las titulaciones (= 5.38 mM) se preparó pesando directamente el monosacárido y llevando al aforo con solución amortiguadora en matraz volumétrico. Se utilizó la técnica de Karl Fischer para determinar contenido de agua de ambos monosacáridos; los resultados fueron inferiores al 0.3% en ambos casos. En el caso de la disolución de MeMan no se contó con una disolución única, sino que para cada experimento se obtuvo el titulante por diluciones sucesivas de una disolución más concentrada, preparada al momento del experimento. Las concentraciones de MeMan oscilaron entre 4.50 y 4.10 mM para todas las titulaciones, dado que se recomienda que el titulante y la proteína se encuentren en una relación de concentraciones de por lo menos 10:1³⁰. La razón de esta

diferencia en los métodos de preparación del titulante fue histórica; después de haber terminado de medir el sistema ConA–MeMan, el Dr. Bruce Turnbull (Leeds University, UK) sugirió utilizar una técnica para determinar la concentración de monosacárido (espectrofotometría a complejos coloridos de los monosacáridos, determinación por técnica de estándar interno en HPLC,) y así obtener un mejor ajuste de las curvas experimentales. Dado que esto no fue posible, se optó por una preparación de las disoluciones de MeGlu utilizando material volumétrico calibrado, pesando directamente el monosacárido. Los valores del parámetro adimensional c en todos los casos fueron de 0.63 a 1.17 para el caso de la MeGlu y de 1.35 a 4.29 para MeMan. El intervalo de temperaturas evaluadas fue de 15 a 37 °C. Los volúmenes de inyección fueron de 5 y 10 μL en todos los casos y se asignó un tiempo de 4 minutos entre inyección e inyección. Para el caso de ConA titulada con MeMan, las primeras inyecciones consideradas para obtener el ΔH fueron de menor volumen (5 μL), con el objeto de que se obtuvieran más puntos experimentales en condiciones para las cuales todo el ligando se uniera, aunque esto en principio no debe tener consecuencias sobre el ajuste final. Para todos los experimentos (tanto con MeMan como con MeGlu) se realizó una primera inyección de 1 μL , dato que no se tomó en cuenta en el ajuste. En todos los casos, el calor liberado correspondiente a la última inyección fue igual o menor que el 20% del calor liberado en la primera inyección, hecho recomendable en un experimento de ITC ³⁰. Para cada experimento se realizó también el correspondiente experimento de dilución, es decir, la titulación de disolución amortiguadora (sin proteína) con el monosacárido en una concentración idéntica a la empleada para titular la muestra con proteína. Estos blancos se restaron en todos los casos a los experimentos con proteína, antes de obtener los parámetros termodinámicos ΔH y K .

3.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se utilizó el mismo amortiguador que para los experimentos de ITC, es decir HEPES 0.1 M, pH 7.2, 0.5 M NaCl, 1 mM CaCl₂ y 1 mM MnCl₂, aunque en este caso la concentración de proteína fue de 0.040 mM (1.0 mg/mL), ya que este tipo de calorimetría requiere de mucho menos muestra que ITC. El barrido de temperatura fue de 15 a 95 °C y se realizó con una velocidad de barrido de 1 °C/min.

3.6 Cálculo de Áreas Superficiales Accesibles (ASA)

Se determinó el área superficial accesible al agua (*ASA*) para los dos complejos de ConA-monosacárido, haciendo uso del programa NACCESS³⁵ (archivos PDB 1GIC y 5CNA, ConA-MeGlu y ConA-MeMan respectivamente, ambas difractadas a 2.0 Å de resolución). Para ello se utilizó un radio prueba de 1.4 Å y cortes en las moléculas de 0.1 Å. Los cambios totales del *ASA* para el proceso de unión se estimaron como la diferencia entre el complejo formado y la suma de las moléculas libres (ver ecuación 1.1). Los ΔASA_p (cambios polares en *ASA*) se calcularon como el cambio en la accesibilidad de los átomos de nitrógeno y oxígeno en las estructuras analizadas. Los ΔASA_{np} (cambios no polares en *ASA*) se calcularon como el cambio en la accesibilidad de carbono y azufre. Dado que los átomos de hidrógeno típicamente no se resuelven al difractar una muestra con rayos X, áreas de estos átomos no se consideraron en este cálculo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

A continuación se muestra el termograma de DSC que se obtuvo con el fin de encontrar el intervalo de temperatura donde la proteína fuera termoestable, para realizar los experimentos posteriores de ITC.

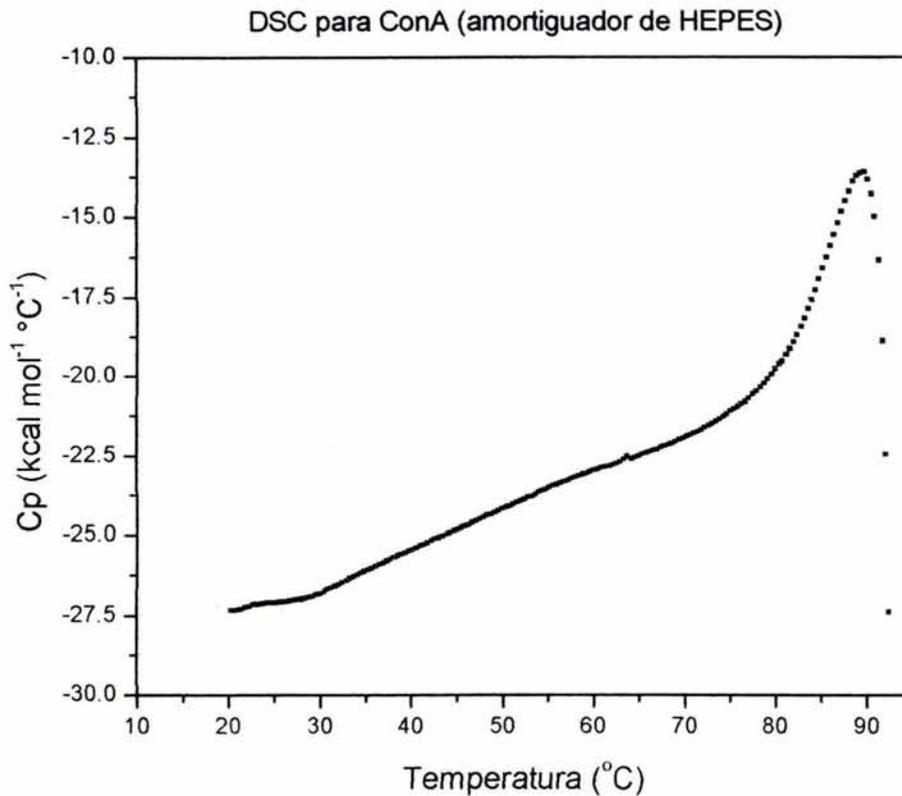


Figura 4.1: Termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la proteína ConA, de 15 a 95 °C (HEPES, 1 °C/min)

Como se puede ver de la figura 4.1, el intervalo de temperatura elegido para trabajar en ITC (de 15 a 37 °C) es adecuado, ya que la proteína se empieza a desnaturalizar a partir de los 76 °C aproximadamente. También es evidente que la ConA sufre una desnaturalización irreversible por efecto de la temperatura, ya que al sacar la muestra de la celda, ésta ve turbia a causa de la agregación. Esto también se hizo evidente al retirar la solución de la celda, una vez concluido

el experimento, ya que ésta tenía un aspecto lechoso, como si gran parte de la proteína se hubiera precipitado.

4.2 ITC y Obtención de los ΔH y el ΔC_p de Unión para el Sistema ConA – MeMan

Se caracterizó la unión de MeMan a la proteína ConA mediante la técnica de ITC. Se obtuvieron los ΔH y K para la formación de un complejo entre la ConA y la MeMan a las temperaturas de 15, 20, 25, 30 y 37 °C, con sus respectivas repeticiones. A continuación mostraremos un experimento típico de ITC para este sistema (datos del experimento No. 6, en el ANEXO de este trabajo):

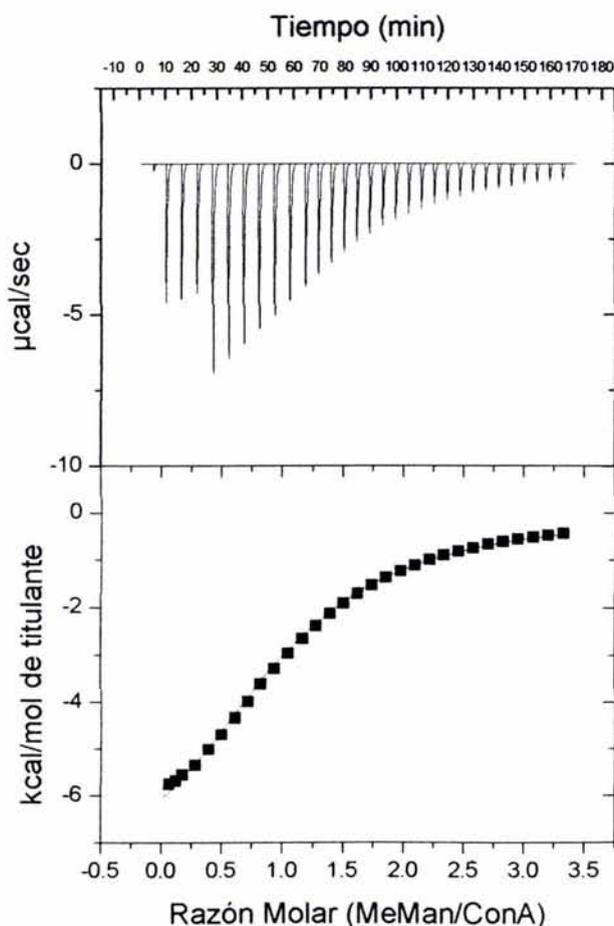


Figura 4.2: Señal de experimento de ITC, potencia como función del tiempo (arriba); señal integrada de ITC, calor como función de la razón molar (abajo), sistema ConA–MeMan, $T = 30^{\circ}\text{C}$. Las primeras 4 inyecciones fueron de menor volumen (ver MÉTODOS).

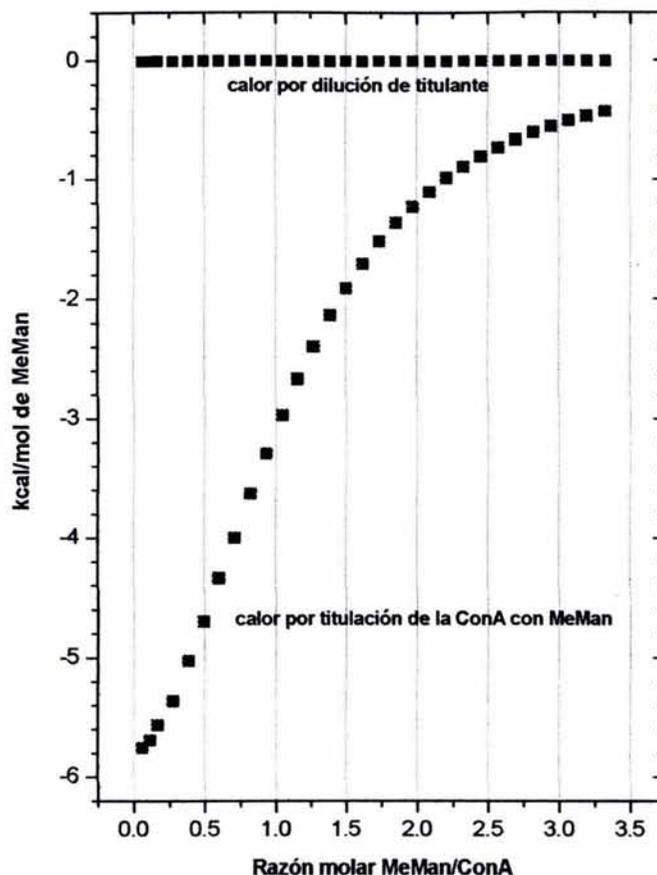


Figura 4.3: Calores de titulación para el sistema ConA – MeMan. Experimento No. 7 en el ANEXO.

Como se puede ver en la figura 4.3, el calor de dilución del ligando en el amortiguador es pequeño en comparación con el calor liberado para la unión de la MeMan a la ConA. Además, este calor de dilución es constante. Se debe reiterar que el calor de dilución se restó siempre al calor de titulación, antes de llevar a cabo los ajustes. La señal integrada de calor de la figura 4.2 corresponde a la resta del calor de titulación menos el calor de dilución.

Los resultados obtenidos para la titulación de ConA con MeMan a las diferentes temperaturas se reportan en la tabla 4.1 (el termograma y la señal sin procesar de cada experimento, así como los parámetros del ajuste se han incluido en los ANEXOS de este trabajo).

| No. | T (°C) | [ConA] (mM) | [MeMan] (mM) | n | K (M^{-1}) | $\pm K$ | ΔH (cal mol $^{-1}$) | $\pm \Delta H$ | ΔS (cal mol $^{-1}$ K $^{-1}$) |
|-----|--------|-------------|--------------|------|------------------|----------|-------------------------------|----------------|---|
| 1 | 15.0 | 0.31 | 4.60 | 1.14 | 1.39E+04 | 1.50E+02 | -7026 | 22 | -5 |
| 2 | 15.0 | 0.29 | 4.37 | 1.09 | 1.43E+04 | 1.20E+02 | -7297 | 18 | -6 |
| 3 | 20.0 | 0.28 | 4.13 | 1.12 | 1.12E+04 | 2.80E+02 | -7393 | 65 | -7 |
| 4 | 20.0 | 0.30 | 4.45 | 1.11 | 1.17E+04 | 1.30E+02 | -7563 | 29 | -7 |
| 5 | 25.0 | 0.28 | 4.45 | 1.13 | 9.26E+03 | 1.00E+02 | -7659 | 33 | -8 |
| 6 | 30.0 | 0.32 | 4.77 | 1.08 | 7.66E+03 | 1.00E+02 | -8151 | 47 | -9 |
| 7 | 30.0 | 0.32 | 4.77 | 1.14 | 7.49E+03 | 1.20E+02 | -7761 | 50 | -8 |
| 8 | 37.0 | 0.27 | 4.10 | 1.08 | 5.84E+03 | 8.40E+01 | -8389 | 69 | -10 |
| 9 | 37.0 | 0.27 | 4.10 | 1.09 | 5.81E+03 | 7.80E+01 | -8386 | 65 | -10 |
| 10 | 37.0 | 0.30 | 4.46 | 1.09 | 5.72E+03 | 6.50E+01 | -8341 | 52 | -10 |

Tabla 4.1: Parámetros termodinámicos obtenidos de los experimentos de ITC, para ConA con MeMan, a diferentes temperaturas. Se dejó el parámetro n como parámetro libre del ajuste.

| No. | T (°C) | [ConA] (mM) | [MeMan] (mM) | n | K (M^{-1}) | $\pm K$ | ΔH (cal mol $^{-1}$) | $\pm \Delta H$ | ΔS (cal mol $^{-1}$ K $^{-1}$) |
|-----|--------|-------------|--------------|-----|------------------|----------|-------------------------------|----------------|---|
| 1 | 15.0 | 0.31 | 4.60 | 1 | 9.86E+03 | 6.50E+02 | -8207 | 148 | -10 |
| 2 | 15.0 | 0.29 | 4.37 | 1 | 1.15E+04 | 5.40E+02 | -8055 | 99 | -9 |
| 3 | 20.0 | 0.28 | 4.13 | 1 | 8.52E+03 | 4.10E+02 | -8525 | 125 | -11 |
| 4 | 20.0 | 0.30 | 4.45 | 1 | 8.96E+03 | 4.80E+02 | -8623 | 130 | -11 |
| 5 | 25.0 | 0.28 | 4.45 | 1 | 6.93E+03 | 3.10E+02 | -8999 | 129 | -13 |
| 6 | 30.0 | 0.32 | 4.77 | 1 | 6.51E+03 | 1.80E+02 | -8961 | 78 | -12 |
| 7 | 30.0 | 0.32 | 4.77 | 1 | 5.58E+03 | 2.40E+02 | -9203 | 131 | -13 |
| 8 | 37.0 | 0.27 | 4.10 | 1 | 5.07E+03 | 9.40E+01 | -9305 | 65 | -13 |
| 9 | 37.0 | 0.27 | 4.10 | 1 | 4.95E+03 | 1.00E+02 | -9430 | 71 | -14 |
| 10 | 37.0 | 0.30 | 4.46 | 1 | 4.90E+03 | 9.90E+01 | -9308 | 69 | -13 |

Tabla 4.2: Parámetros termodinámicos obtenidos de los experimentos de ITC, para ConA con MeMan, a diferentes temperaturas. Se impuso $n = 1$ en el ajuste.

De las tablas 4.1 y 4.2 es claro que las variables termodinámicas toman diferentes valores en los ajustes dependiendo de si se deja libre o se impone el valor del parámetro n , que representa el número de moléculas de ligando unidas por monómero de proteína. Al fijarnos en el valor de ΔH para $T = 25$ °C encontramos valores de -8999 y -7659 cal/mol para $n=1$ y n ajustada, respectivamente. De acuerdo con Turnbull y Daranas²⁹ el ajuste en el que se impone el valor de n debe ser el más adecuado, dado que los valores de c (ver sección de ANTECEDENTES, sección 2.2), inicial para todos los experimentos son del orden de 1. Predeterminar el valor de n en cada ajuste de los datos

calorimétricos para calcular ΔH y K es válido porque se conoce la estequiometría para el sistema (un ligando por monómero de proteína), además de conocer la concentración del titulante y de la muestra con relativa precisión (incertidumbre $\leq 1\%$). A continuación presentamos la gráfica de ΔH como función de T para los datos obtenidos con los dos tipos de ajustes. Dichos datos se han ajustado a su vez a una recta; es decir, se considera que el ΔC_p es independiente de la temperatura:

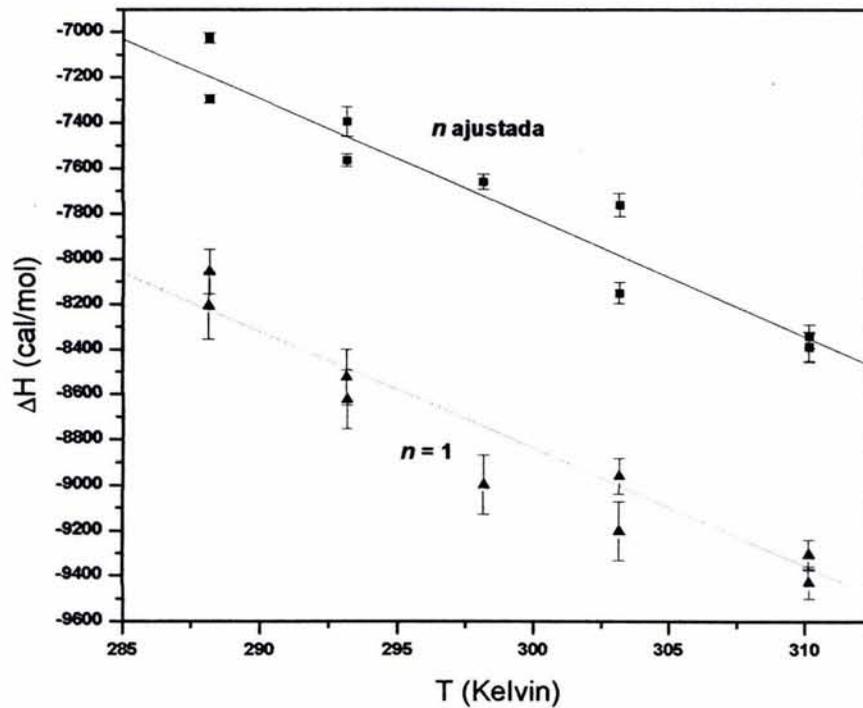


Figura 4.4: Regresión lineal de ΔH vs. T para los dos tipos de ajustes (triángulos ajuste con $n = 1$; cuadrados ajuste con n libre), sistema MeMan-ConA.

Los parámetros de la regresión lineal para los dos tipos de ajustes a los datos de ITC se muestran a continuación:

| $y = mx + b$ | Pendiente (ΔC_p , cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | \pm | Ordenada (cal mol ⁻¹) | \pm | R ² |
|--------------|---|-------|--------------------------------------|-------|----------------|
| n ajustada | -51.7 | 4.6 | 6686 | 1391 | 0.94103 |
| $n = 1$ | -52.5 | 6.1 | 7922 | 1794 | 0.90194 |

Tabla 4.3: Parámetros del ajuste lineal de ΔH Vs. T para el sistema ConA – MeMan.

Como se puede ver, las pendientes son muy similares, no importando si se usan los datos obtenidos por medio de ajustes donde se impuso $n = 1$, o datos en los cuales n se ajustó. Sin embargo, como se puede apreciar en la figura 4.4, las entalpías sí son significativamente diferentes al tomar en cuenta el error que arroja cada ajuste, que está representado por las barras de incertidumbre en cada punto. Aunque el ΔC_p calculado es independiente del tipo de ajuste, se considera que los valores más adecuados del ΔH a cada temperatura son los del ajuste donde se asignó el valor de uno a n . En este caso, los valores para ΔH en el ajuste donde se impuso el valor de $n = 1$ presentan más incertidumbre que para el caso en donde n se ajustó. Creemos que esto puede asociarse con la incertidumbre en la concentración de ligando, que por razones históricas fue preparado para cada experimento utilizando pipetas automáticas, en lugar de material volumétrico. Como se puede ver en la tabla 4.1, el valor de n cuando este parámetro se deja libre no es tan cercano a uno, sino entre 9 y 14 % mayor. Sin embargo, dado que los valores de ΔC_p para ambos tipos de datos ajustados es muy similar, elegimos el criterio de Turnbull y Daranas, es decir, imponer el valor de $n = 1$ para todos los ajustes. Por lo tanto, reportamos el valor del ΔC_p para el sistema ConA titulada con MeMan como:

$$\Delta C_p(\text{MeMan} - \text{ConA}) = -52.5 \pm 6.1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \quad (4.1)$$

Consideramos que el valor de ΔC_p obtenido en este trabajo es consistente con el reportado en la literatura, $\Delta C_p = 48 \pm 8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ³². Chervenak y Toone midieron ΔH de formación para este complejo a diferentes temperaturas³², en un intervalo de 4 a 40 °C, aunque no reportan el número de

determinaciones realizado, ni proporcionan los datos de ΔH que utilizaron para obtener el valor de ΔC_p . El único valor reportado en esta referencia para ΔH se obtuvo a 25 °C y fue de -7.1 ± 0.02 kcal/mol, en comparación con el nuestro, que fue de -7.6 ± 0.03 kcal/mol. Ambos valores han sido obtenidos usando el mismo tipo de ajuste, en el que el valor del parámetro n no se impone. Asimismo, se ha reportado un valor de $\Delta G(25^\circ\text{C}) = -5.0 \pm 0.02$ kcal mol⁻¹, que también es consistente con nuestro valor, $\Delta G(25^\circ\text{C}) = -5.4 \pm 0.02$ kcal mol⁻¹. Comparamos los valores de ΔG ya que Chervenak y Toone tampoco proporcionan el valor de K , lo cual sería adecuado, ya que el ajuste a los datos calorimétricos arroja el valor de K , y ΔG se debe calcular a partir de la relación termodinámica $\Delta G^\circ = -RT \ln K$.

4.3 ITC y Obtención de las ΔH y el ΔC_p de Unión para el Sistema ConA–MeGlu

Al igual que en el sistema anterior, se midió el ΔH y K para el sistema ConA – MeGlu a las temperaturas de 15, 20, 25, 30 y 35 °C. A continuación se presenta un experimento de ITC típico realizado para este sistema (datos de experimento No. 13, en el ANEXO de este trabajo):

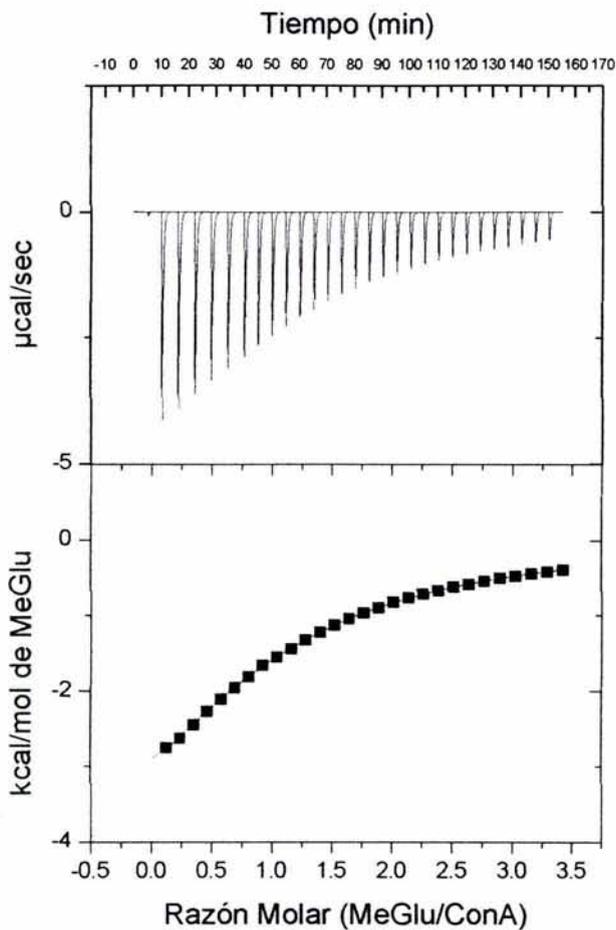


Figura 4.5: Señal de experimento de ITC, potencia como función del tiempo (arriba); señal integrada de ITC, calor como función de la razón molar (abajo), sistema ConA–MeGlu, $T = 20^{\circ}\text{C}$.

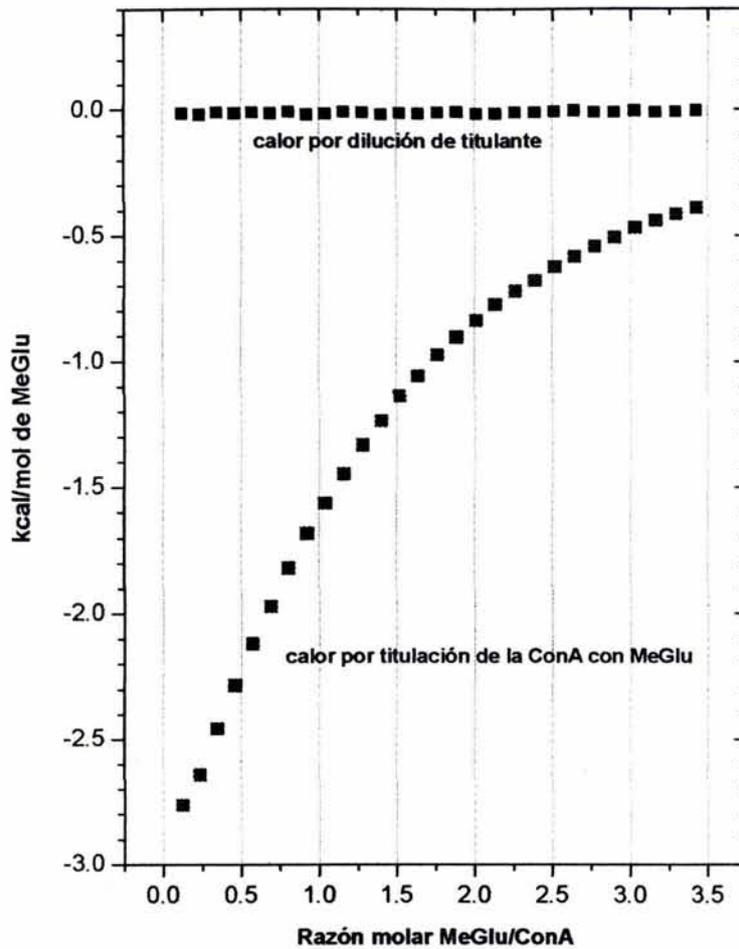


Figura 4.6: Calores de titulación para el sistema ConA – MeGlu. Experimento No. 13 en el ANEXO.

También en este caso se realizaron los ajustes con $n=1$ y con n como parámetro libre del ajuste. Para este sistema, dado que para preparar la solución de MeGlu se utilizó material volumétrico y no se realizaron diluciones sucesivas para llegar a la concentración deseada, se tenía más certidumbre sobre la cantidad de titulante que con respecto a los experimentos de titulación MeMan–ConA. A continuación presentamos los resultados de los dos tipos de ajustes:

| No. | T (°C) | [ConA] (mM) | [MeGlu] (mM) | <i>n</i> | <i>K</i> (M ⁻¹) | ± <i>K</i> | Δ <i>H</i> (cal mol ⁻¹) | ± Δ <i>H</i> | Δ <i>S</i> (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|-----|-----------|----------------|-----------------|----------|--------------------------------|------------|--|--------------|--|
| 11 | 15.00 | 0.34 | 5.38 | 1.02 | 3140 | 39 | -5839 | 62 | -4 |
| 12 | 15.13 | 0.38 | 5.38 | 1.00 | 3020 | 42 | -5945 | 66 | -5 |
| 13 | 20.00 | 0.34 | 5.38 | 1.03 | 2780 | 51 | -5823 | 98 | -4 |
| 14 | 20.00 | 0.37 | 5.38 | 1.03 | 2750 | 36 | -5837 | 67 | -4 |
| 15 | 25.00 | 0.33 | 5.38 | 1.03 | 2240 | 11 | -6204 | 99 | -5 |
| 16 | 25.01 | 0.33 | 5.38 | 1.04 | 2390 | 43 | -5909 | 112 | -4 |
| 17 | 30.00 | 0.38 | 5.38 | 1.02 | 1940 | 33 | -6270 | 112 | 6 |
| 18 | 30.01 | 0.34 | 5.38 | 1.06 | 2010 | 42 | -6118 | 144 | -5 |
| 19 | 35.00 | 0.39 | 5.38 | 1.01 | 1680 | 84 | -6447 | 374 | -6 |

Tabla 4.4: Parámetros termodinámicos obtenidos de los experimentos de ITC, para ConA con MeGlu, a diferentes temperaturas. Se dejó el parámetro *n* como parámetro libre del ajuste.

| No. | T (°C) | [ConA] (mM) | [MeGlu] (mM) | <i>n</i> | <i>K</i> (M ⁻¹) | ± <i>K</i> | Δ <i>H</i> (cal mol ⁻¹) | ± Δ <i>H</i> | Δ <i>S</i> (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|-----|-----------|----------------|-----------------|----------|--------------------------------|------------|--|--------------|--|
| 11 | 15.00 | 0.34 | 5.38 | 1 | 3070 | 18 | -5981 | 14 | -5 |
| 12 | 15.13 | 0.38 | 5.38 | 1 | 3040 | 19 | -5905 | 14 | -5 |
| 13 | 20.00 | 0.34 | 5.38 | 1 | 2680 | 21 | -6053 | 20 | -5 |
| 14 | 20.00 | 0.37 | 5.38 | 1 | 2640 | 17 | -6079 | 16 | -5 |
| 15 | 25.00 | 0.33 | 5.38 | 1 | 2180 | 11 | -6420 | 15 | -6 |
| 16 | 25.01 | 0.33 | 5.38 | 1 | 2280 | 16 | -6238 | 20 | -6 |
| 17 | 30.00 | 0.38 | 5.38 | 1 | 1900 | 11 | -6428 | 17 | -6 |
| 18 | 30.01 | 0.34 | 5.38 | 1 | 1900 | 15 | -6607 | 24 | -7 |
| 19 | 35.00 | 0.39 | 5.38 | 1 | 1660 | 25 | -6551 | 47 | -7 |

Tabla 4.5: Parámetros termodinámicos obtenidos de los experimentos de ITC, para ConA con MeGlu, a diferentes temperaturas. Se impuso *n* = 1 en el ajuste.

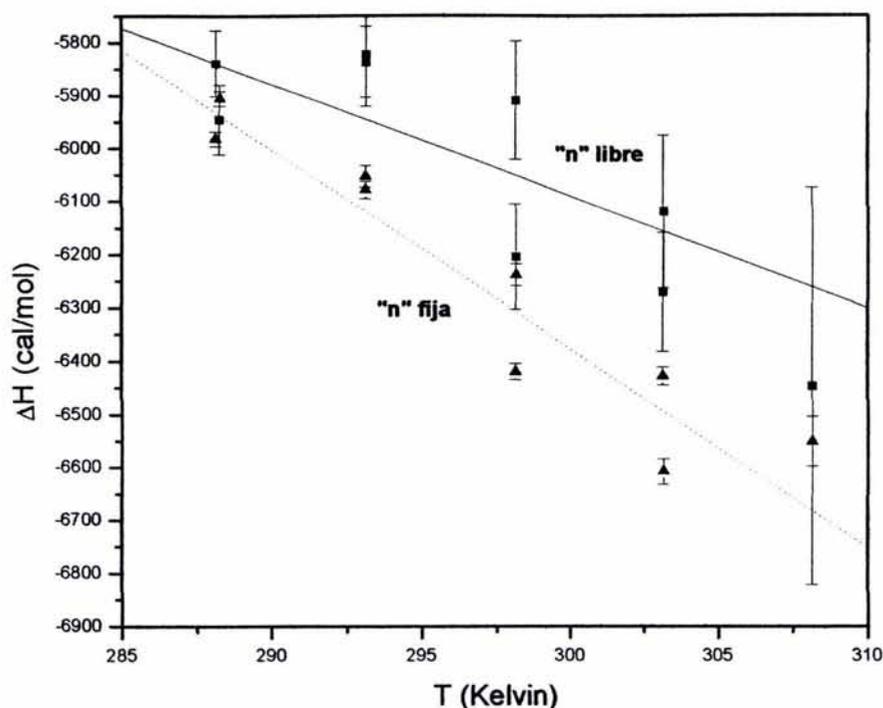


Figura 4.5: Regresión lineal de ΔH vs. T para los dos tipos de ajustes (triángulos ajuste con "n" fija; cuadrados ajuste con "n" libre), sistema MeGlu-ConA.

| $y = mx + b$ | Pendiente (ΔC_p , cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | ± | Ordenada (cal mol ⁻¹) | ± | R ² |
|--------------|---|-----|--------------------------------------|------|----------------|
| n ajustada | -22.4 | 7.6 | 633 | 2216 | 0.5567 |
| n = 1 | -37.0 | 4.6 | 4726 | 1355 | 0.9026 |

Tabla 4.6: Parámetros del ajuste lineal de ΔH vs. T para el sistema ConA-MeGlu.

Como podemos observar de las tablas 4.4 y 4.5, las constantes de unión de la MeGlu-ConA son de dos a tres veces más pequeñas que para el sistema MeMan-ConA. Por ejemplo, comparando datos a la misma temperatura y ajustados imponiendo $n=1$, para la el complejo MeGlu-ConA, $K(25^\circ\text{C}) = 2410 \text{ M}^{-1}$ (promedio de los dos valores obtenidos), mientras que para MeMan-ConA, $K(25^\circ\text{C}) = 6930 \text{ M}^{-1}$. Es decir, el MeGlu es menos afín a la ConA que el MeMan. En el sistema MeGlu-ConA las diferencias entre ajustar con $n=1$ y dejar n libre como parámetro del ajuste, son sustanciales. Esto se debe

precisamente a que la constante de equilibrio es menor que con respecto al sistema MeMan–ConA²⁹, lo cual implica que el valor de c inicial sea menor que uno. Aunque los valores de n obtenidos en el ajuste donde este parámetro se deja libre son muy cercanos a uno, lo cual es recomendable ya que proporciona una prueba independiente para la validez de la concentración tanto del ligando como del receptor, vemos que los intervalos de incertidumbre para ΔH y K son mucho mayores que para el caso en que el valor de n se impone. Cuando el valor de c es de este orden de magnitud, se debe imponer el valor de n en el ajuste de los datos calorimétricos²⁹. Es por eso que para el sistema MeGlu–ConA, las entalpías de reacción que describen mejor el sistema, así como el ΔCp , son los valores obtenidos al utilizar $n = 1$ en la regresión no lineal sobre los datos calorimétricos experimentales.

$$\Delta Cp(\text{MeGlu} - \text{ConA}) = -37.0 \pm 4.6 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \quad (4.2)$$

En este punto del análisis haremos una aclaración sobre la concentración de los reactivos, información indispensable para poder obtener los parámetros termodinámicos ΔH y K a partir de los datos calorimétricos. Las soluciones de titulante (MeMan y MeGlu) fueron preparadas considerando volúmenes de solución (la expresión para expresar concentración es la molaridad), a una temperatura de 25 °C. Algunos de los experimentos fueron realizados a temperaturas superiores e inferiores a ésta, lo cual quiere decir que la concentración a 25 °C no es estrictamente la concentración que se tiene a otras temperaturas, dado que la densidad de la disolución varía con la temperatura. Para contestar a la pregunta de si esta desviación de la concentración de titulante calculada originalmente era significativa, y con la limitante de que no contábamos con los valores de densidad de nuestra solución amortiguadora a diferentes temperaturas, hicimos la siguiente suposición: que la densidad del amortiguador se comportaba igual que la densidad del agua con respecto a la temperatura. Se realizaron nuevos ajustes a los datos experimentales del sistema MeGlu–ConA, considerando una nueva concentración de titulante,

aquella calculada tomando en cuenta el valor de la densidad como función de la temperatura. Los resultados de los ajustes, tanto con n libre como con $n=1$ fueron idénticos. Asimismo, al graficar estos nuevos valores de ΔH contra temperatura, el ΔC_p no fue diferente al obtenido anteriormente. Es por esto que podemos decir con seguridad que en el intervalo de temperaturas estudiado, la concentración molar de ligando se puede considerar como "constante".

4.4 Contribución del Grupo Hidroxilo al ΔC_p

Las estructuras cristalinas de los complejos ConA – MeMan y ConA – MeGlu están reportadas en la literatura ^{35, 36} (archivos PDB: 5CNA y 1GIC, respectivamente). Como se muestra en la siguiente figura, MeMan (*metil- α -D-manopiranosido*) y MeGlu (*metil- α -D-glucopiranosido*) son efímeros, es decir, son dos monosacáridos idénticos, excepto por la configuración del grupo –OH que se encuentra sobre C-2; en el MeMan es axial y en el MeGlu es ecuatorial.



Figura 4.6: Estructura química de *metil- α -D-manopiranosido* en 3 – D.



Figura 4.7: Estructura química de *metil- α -D-glucopiranosido* en 3 – D.

A continuación se presentan las estructuras cristalinas de los complejos MeMan – ConA y MeGlu – ConA. En la figura 4.8 se muestra a la MeMan interactuando con la ConA. El hidroxilo sobre C-2, en configuración axial, se encuentra a 3.66 Å de distancia de la superficie marcada en color azul, que pertenece al nitrógeno de enlace peptídico del residuo 99 (leucina). Dado que la distancia promedio de un puente de hidrógeno O – H – N es de entre 2 y 3.1 Å, es probable que en este caso exista un puente de hidrógeno débil.

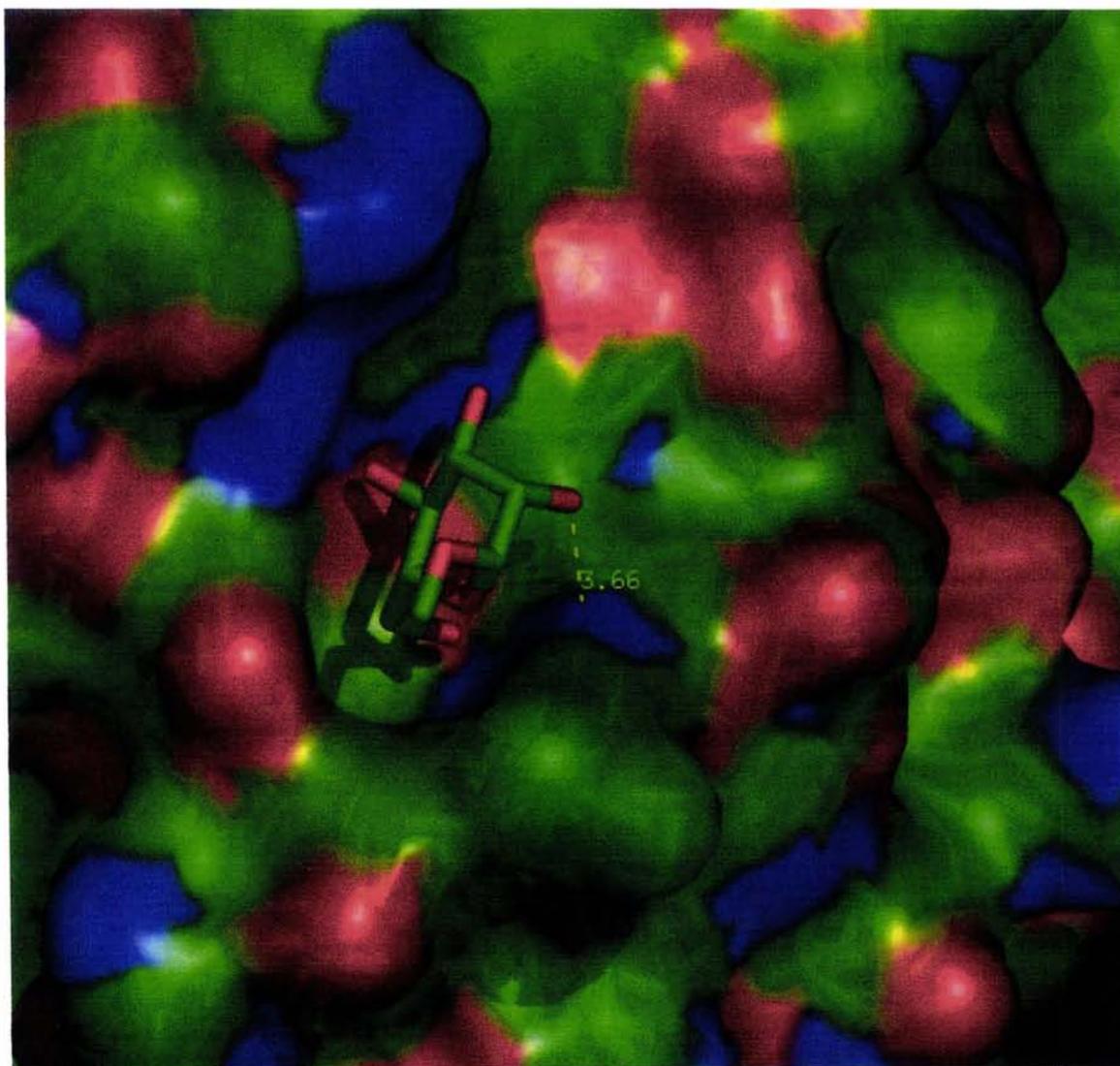


Figura 4.8: Detalle del sitio de interacción de ConA con MeMan. Distancia N-O: 3.66 Å

Para el complejo de MeGlu – ConA, mostrado en la figura 4.9, el mismo hidroxilo, en configuración ecuatorial, ahora se encuentra a 5.52 Å de distancia

del nitrógeno (Leu 99). La distancia entre estos dos grupos es suficientemente grande como para afirmar que no hay interacción tipo puente de hidrógeno entre ellos.

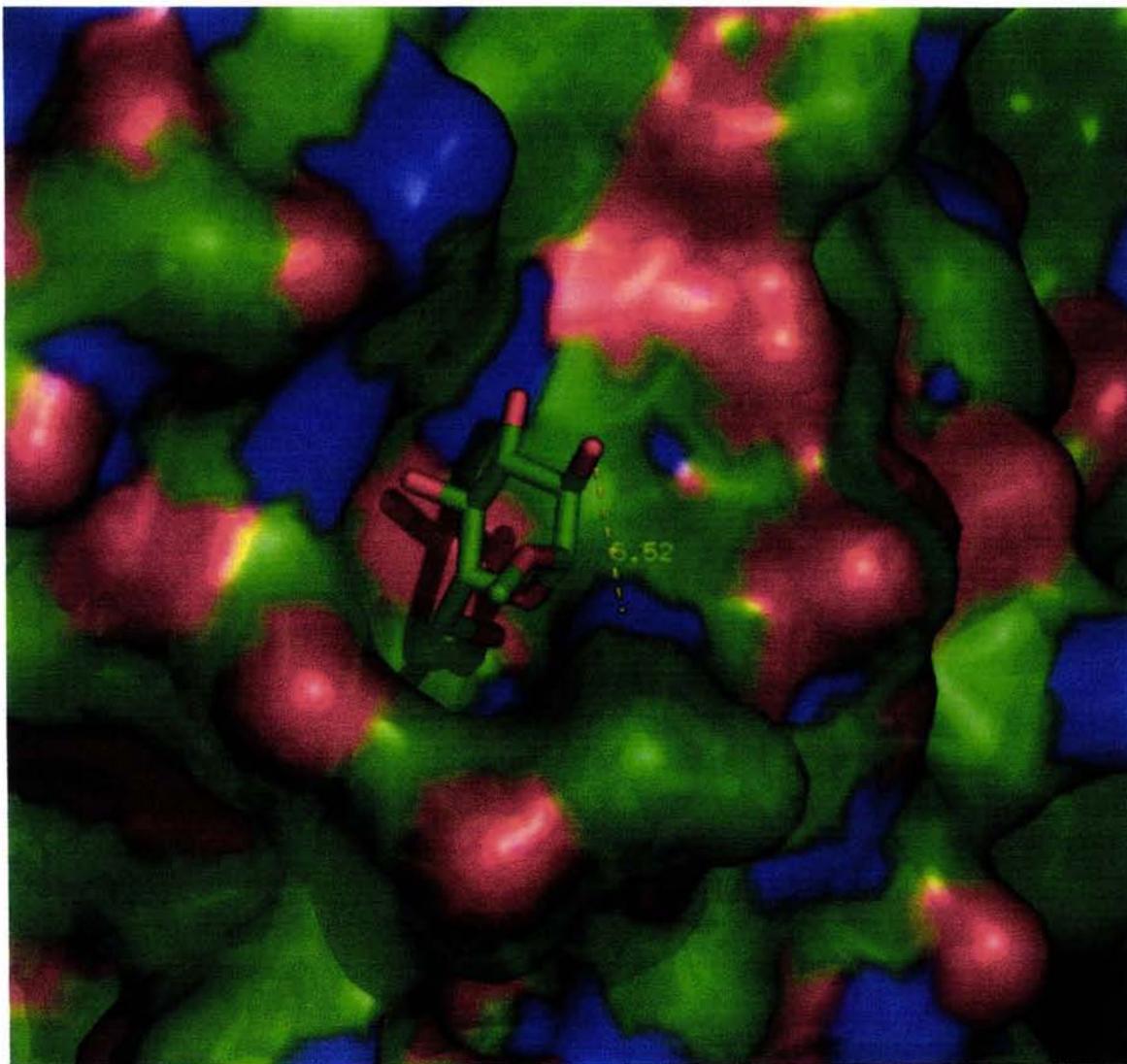


Figura 4.9: Detalle del sitio de interacción de ConA con MeGlu. Distancia N-O: 5.52 Å

En el supuesto de que las dos estructuras cristalinas son idénticas, excepto por la configuración del grupo $-OH$ sobre $C - 2$, la diferencia entre el ΔC_p de unión de ligando para ambos sistemas se puede atribuir únicamente a esta diferencia en la estructura molecular. Esto nos permite concluir que la contribución del grupo $-OH$ al ΔC_p de unión de la MeMan a la ConA es de

$-15.5 \pm 6.1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. El valor se obtiene a partir de la diferencia entre los ΔC_p para los dos sistemas estudiados, es decir:

$$\Delta C_p(-OH) = \Delta C_p^{\text{MeMan-ConA}} - \Delta C_p^{\text{MeGlu-ConA}} = -15.5 \pm 6.1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \quad (4.3)$$

Habermann y Murphy³⁸ han calculado el valor específico de ΔC_p de exposición al agua para el grupo $-OH$, por unidad de área, utilizando compuestos modelo, reportando un valor de $0.17 \pm 0.08 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Para poder comparar nuestro resultado, es necesario dividir la expresión (4.3) entre la diferencia de áreas superficiales accesibles para los dos complejos, debidas exclusivamente al grupo $-OH$. Esta diferencia es de 21 \AA^2 (ver tabla 4.7). Esto nos da un valor de $0.73 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, que se encuentra muy por arriba del valor obtenido por Habermann y Murphy. Esto quiere decir que el grupo $-OH$ que se "esconde" en el complejo MeMan – ConA con respecto al complejo MeGlu – ConA está participando en otra interacción. Dada la evidencia cristalográfica, esta interacción consiste en un puente de hidrógeno.

En resumen, el $\Delta C_p(-OH)$ expresado en la ecuación (4.3) se puede atribuir a dos factores:

- i. la interacción del grupo $-OH$ vía puente de hidrógeno con el nitrógeno peptídico de Leu 99;
- ii. la deshidratación del hidroxilo, ya que este grupo se encuentre muy probablemente deshidratado en el caso de MeMan – ConA, e hidratado en el caso de MeGlu – ConA.

Cabe hacer una aclaración en lo que concierne al punto ii. Como en toda estructura cristalina, las aguas superficiales de la estructura resuelta se han eliminado para el cálculo del ΔASA . Al analizar las estructuras cristalinas de

ambos complejos no encontramos aguas cercanas al –OH de C – 2 en ninguno de los dos casos. Sin embargo, y dado que este grupo no se encuentra totalmente adentrado en la cavidad, podemos suponer que para el complejo MeGlu – ConA esta parte del monosacárido está en contacto directo con el disolvente, suposición que no parece tan probable en el caso de MeMan – ConA.

4.5 Desglose de las Contribuciones al ΔG para los Sistemas MeMan – ConA y MeGlu – ConA

Debido a que la técnica de ITC permite cuantificar directamente el ΔH y la K para la formación de complejos a una cierta temperatura, es posible obtener los valores tanto de ΔG como de ΔS del proceso, a partir de las siguientes relaciones termodinámicas:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4.4)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4.5)$$

A continuación se muestra una gráfica de las contribuciones al ΔG de formación, de ΔH y de $T\Delta S$ para los sistemas MeMan – ConA y MeGlu – ConA, a todas las temperaturas medidas:

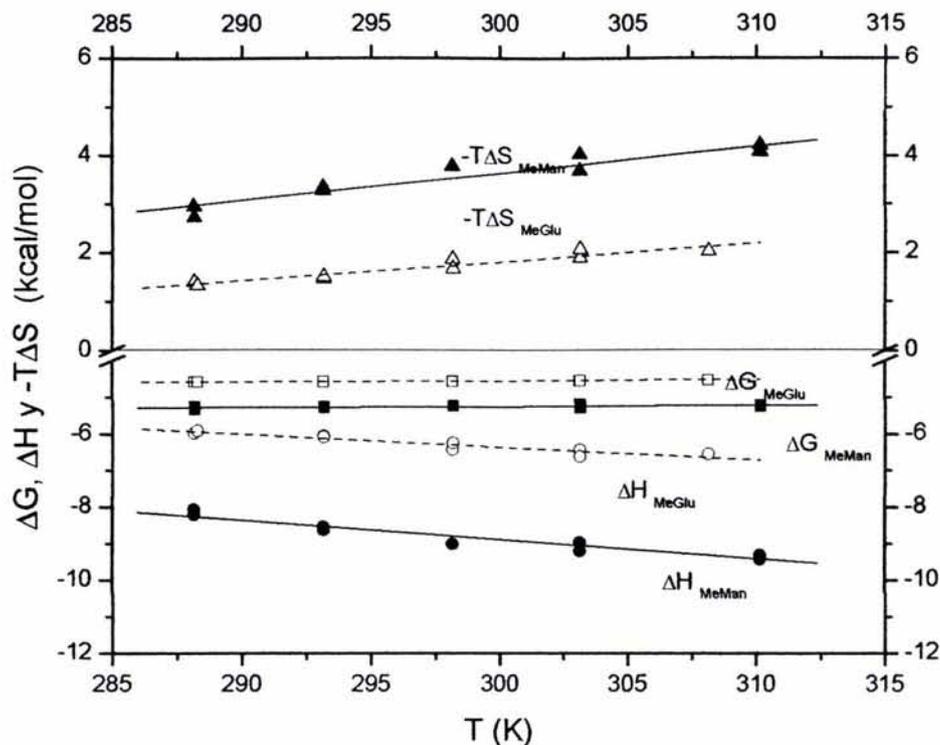


Figura 4.9: Contribuciones al ΔG de las variables termodinámicas ΔH y $-T\Delta S$ para el proceso de formación de los complejos MeMan – ConA (cerrados) y MeGlu – ConA (abiertos)

Se puede observar que para ambos procesos, tanto el ΔH como el ΔS son de signo negativo a todas las temperaturas medidas, razón por la cual la unión de la MeMan y MeGlu a la ConA son procesos favorecidos entálpicamente. También es evidente que, aunque los ΔH cambian visiblemente con la temperatura (razón por la cual fue posible obtener un ΔC_p), $T\Delta S$ lo hace prácticamente en la misma proporción, por lo cual el ΔG es constante con temperatura. Finalmente, la figura 4.9 muestra que la unión de MeMan a ConA es un proceso más favorable que la unión de MeGlu a ConA.

4.6 Ecuación Paramétrica para Estimar el ΔC_p de Unión para un Sistema Proteína – Carbohidrato

García-Hernández et. al. han publicado un modelo sencillo y empírico que permite correlacionar el ΔC_p de unión para un sistema lectina–carbohidrato con el cambio en el área superficial accesible (ΔASA), tanto polar como no polar ¹⁵. Para ello, se utilizó una base de datos en donde se consideró el valor para el ΔC_p del sistema MeMan–ConA de la literatura ³², que nosotros hemos corregido, como se describió en secciones precedentes. Asimismo, en este trabajo hemos obtenido el valor no reportado anteriormente para el ΔC_p de unión del sistema MeGlu–ConA, con lo que la base de datos se ha ampliado y afinado. A continuación se re-evaluará la ecuación paramétrica de ΔC_p en función de ΔASA_p y ΔASA_{np} .

Se han calculado los cambios en las áreas superficiales accesibles, tanto polares como no polares (ΔASA_p , ΔASA_{np}), de los sistemas de proteínas que se utilizaron para generar la parametrización, como se describe en la sección de *Material y Métodos*. Los valores de áreas obtenidos para el conjunto de complejos, así como los ΔC_p para cada uno, se presentan a continuación:

| Complejo | ΔASA_p (Å^2) | ΔASA_{np} (Å^2) | ΔC_p (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | $\pm \Delta C_p$ | $\Delta ASA_p/\Delta A_{np}$ | $\Delta C_p/\Delta ASA_{np}$ |
|------------|------------------------------------|---------------------------------------|---|------------------|------------------------------|------------------------------|
| Hev-Q2 | -158 | -309 | -64 | 6 | 0.511 | 0.207 |
| Hev-Q3 | -223 | -344 | -83 | 8 | 0.648 | 0.241 |
| ConA-MeGlu | -143 | -197 | -37 | 5 | 0.728 | 0.188 |
| CBMxy-Glc2 | -237 | -290 | -67 | 2 | 0.817 | 0.231 |
| ConA-MeMan | -167 | -174 | -53 | 6 | 0.960 | 0.302 |
| Lyso-Q2 | -284 | -284 | -83 | 5 | 1.000 | 0.292 |
| Lyso-Q3 | -376 | -373 | -119 | 3 | 1.008 | 0.319 |
| ConA-Man3 | -354 | -251 | -109 | 5 | 1.410 | 0.434 |
| DGL-Man3 | -348 | -229 | -96 | 5 | 1.520 | 0.419 |

Tabla 4.7: Valores de los cambios en áreas superficiales accesibles polares y no polares) y ΔC_p para sistemas de proteína–carbohidrato. Abreviaturas: **Hev-Q2**: heveina-quitobiosa ¹², **Hev-Q3**: heveina-quitotriosa ¹², **ConA-MeGlu**: concanavalina A-metil glucosa (este trabajo); **CBMxy-Glc2**: módulo de unión de carbohidrato de la xylanasa 10A- celobiosa ³⁶; **ConA-MeMan**: concanavalina A-metil manosa (este trabajo); **Lyso-Q2**: lisozima-quitobiosa ¹⁵, **Lyso-Q3**: lisozima-quitotriosa ¹⁵, **ConA-Man3**: concanavalina A-tri-manósido ¹⁴, **DGL-Man3**: lectina de *Dioclea grandiflora*-tri-manósido

De acuerdo con la referencia 15, se asume que el cambio en la capacidad calorífica de un sistema está dado por la exposición u ocultamiento de dos tipos de átomos: los polares (N, O) y los no polares (C, S). Es decir, recordando la ecuación 1.4,

$$\Delta C_p = \Delta c_{p_{np}} \cdot \Delta ASA_{np} + \Delta c_{p_p} \cdot \Delta ASA_p$$

Para que sea posible representar esta ecuación en un solo plano, es necesario dividir todos los términos entre alguna de las ΔASA . Hemos escogido el ΔASA_{np} , de tal forma que la ecuación 1.4 se reescribe como:

$$\frac{\Delta C_p}{\Delta ASA_{np}} = \Delta c_{p_{np}} + \Delta c_{p_p} \cdot \frac{\Delta ASA_p}{\Delta ASA_{np}} \quad (4.6)$$

A continuación hemos ajustado los datos de la tabla 4.7, de $\Delta C_p / \Delta ASA_{np}$ en función de $\Delta ASA_p / \Delta ASA_{np}$. Como puede observarse de la figura 4.10, es notorio que un cambio pequeño en el área superficial accesible polar para el proceso de formación de complejo proteína – carbohidrato sí modifica el valor observado del ΔC_p , ya que los complejos estudiados, como por ejemplo los de este trabajo, ConA-MeGlu y ConA-MeMan, se parecen mucho estructuralmente; sin embargo sus ΔC_p son bastante diferentes.

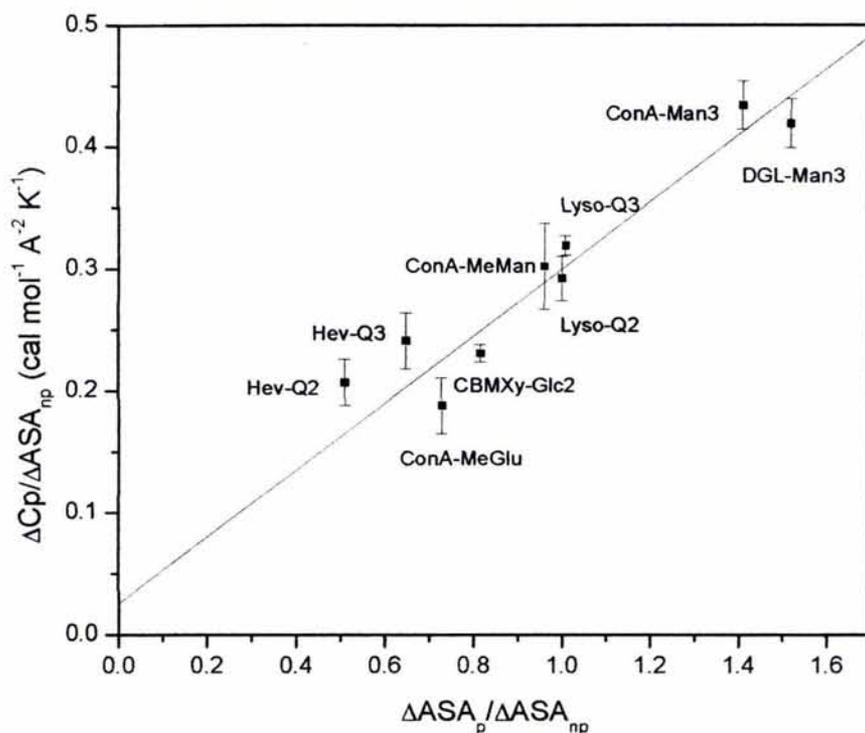


Figura 4.10: Cambios en la capacidad calorífica para sistemas proteína – carbohidrato, como función de los cambios en áreas polares y no polares, debidos a la unión de ligando.

Parámetros del ajuste:

| $y = m \cdot x + b$ | Pendiente ($\text{cal mol}^{-1} \text{Å}^2 \text{K}^{-1}$) | | Ordenada ($\text{cal mol}^{-1} \text{Å}^2 \text{K}^{-1}$) | | R^2 |
|---------------------|---|-------|--|-------|--------|
| | | \pm | | \pm | |
| | 0.27 | 0.04 | 0.03 | 0.04 | 0.8604 |

Tabla 4.8: Parámetros del ajuste lineal de $\Delta C_p / \Delta ASA_{np}$ en función de $\Delta ASA_p / \Delta ASA_{np}$.

Comparando nuestra nueva ecuación paramétrica,

$$\Delta C_p = (0.27 \pm 0.04) \cdot \Delta ASA_p + (0.03 \pm 0.04) \cdot \Delta ASA_{np} \quad (4.7)$$

con la ecuación paramétrica de la referencia 15,

$$\Delta Cp = (0.23 \pm 0.04) \cdot \Delta ASA_p + (0.03 \pm 0.07) \cdot \Delta ASA_{np} \quad (4.8)$$

encontramos que al añadir un nuevo dato (ConA – MeGlu) y corregir uno de los valores de ΔCp (ConA – MeMan) en la base de datos utilizada para generar (4.8), los coeficientes Δcp_p y Δcp_{np} son esencialmente los mismos. Es decir, nuestra parametrización es consistente con la obtenida por García-Hernández et al.

Llama la atención que el coeficiente del término ΔASA_{np} presente una incertidumbre tan grande en los dos ajustes. Debemos recordar que el modelo empleado, una línea recta, es muy sencillo, y sin embargo predice una tendencia general de comportamiento del ΔCp . Aún con la incertidumbre en el coeficiente de ΔASA_{np} , que es del mismo orden de magnitud que el propio coeficiente, y las reservas que esto conlleva, podemos hacer algunas aseveraciones sobre nuestro sistema.

Los coeficientes de ambos ajustes (ecuaciones 4.7 y 4.8) indican que la mayor contribución al ΔCp para un proceso de unión proteína – carbohidrato está dada por los grupos polares de la proteína y del carbohidrato y que los grupos no polares contribuyen poco al ΔCp . Esto se puede entender con ayuda de la siguiente figura:

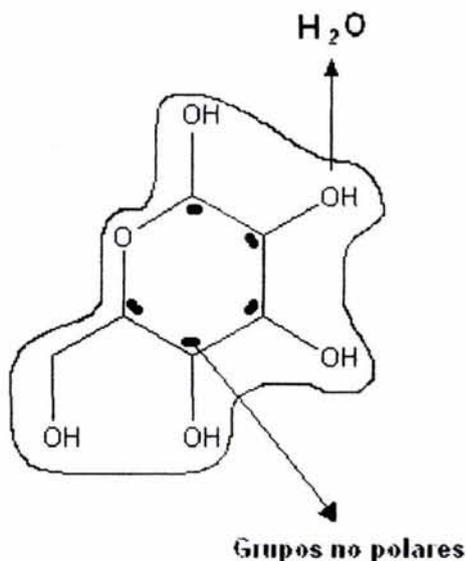


Figura 4.11: Representación de un carbohidrato hidratado.

En general, los carbohidratos presentan una alta densidad de grupos $-OH$ en su superficie. Como estos compuestos suelen ser relativamente pequeños, existen espacios "vacíos", es decir, libres de disolvente y de cualquier grupo que pueda interactuar con ellos, sobre los grupos no polares. Por ejemplo, para la figura 4.11, estos espacios "vacíos" estarían entre los metinos del anillo de piranósido, ya que a los grupos $-CH-$ les está más restringido el contacto con las moléculas de agua, que está formando una especie de "malla" alrededor de los $-OH$. Los grupos no polares del carbohidrato prácticamente no cambian su entorno cuando se forma el complejo. Lo anterior es consistente con la hipótesis de Lemieux ³⁷, que propone que la alta densidad de grupos hidroxilo en los carbohidratos induce a la formación de espacios "vacíos" sobre las superficies apolares, previniendo la hidratación completa, y, por lo tanto, reduciendo la contribución de esos grupos no polares a la capacidad calorífica.

El proceso para la formación de un complejo proteína – carbohidrato se representa de manera esquemática en la siguiente figura.

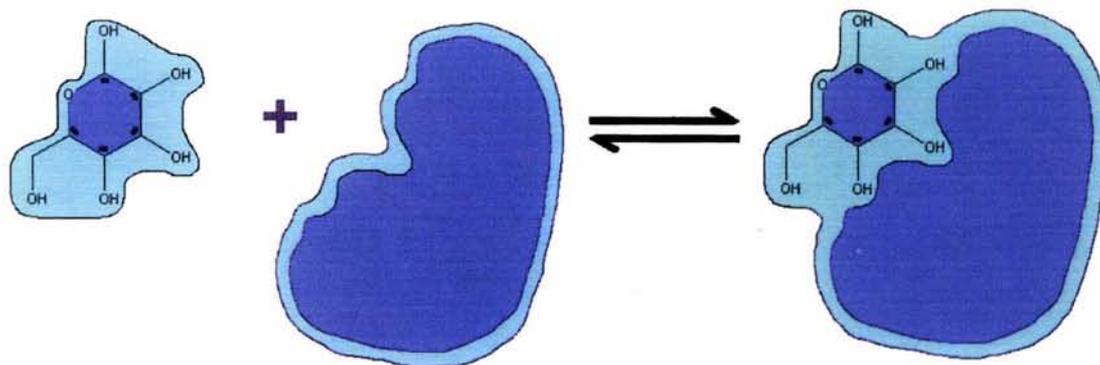


Figura 4.12: Esquema del proceso de unión proteína – carbohidrato.
Los espacios en azul claro representan áreas hidratadas.

En esta figura es claro que el ΔASA es de signo negativo, ya que al unirse el carbohidrato a la proteína se oculta parte del área superficial accesible de las especies involucradas. Formalmente, se define la hidratación como la transferencia de 1 mol de soluto del estado gaseoso (gas ideal) al agua, a dilución infinita. El ΔC_p de hidratación para todos los solutos hidrofóbicos y para muchos solutos anfífilicos como los alcoholes, por ejemplo, es de signo positivo. Por lo tanto, el proceso en sentido contrario, es decir el proceso de deshidratación, tendrá un $\Delta C_p < 0$. Para el sistema proteína – carbohidrato, la deshidratación de los grupos polares (los grupos hidroxilo del carbohidrato y los grupos polares de la proteína), y en menor medida la deshidratación de los grupos no polares, son los responsables de que el ΔC_p de unión sea menor que cero.

4.7 Nueva Ecuación Paramétrica

Con objeto de avanzar un poco más en nuestra comprensión de las interacciones que producen los complejos proteína – carbohidrato, en esta sección se propone una nueva ecuación paramétrica que distingue entre las contribuciones polares y no polares, tanto de la proteína como del carbohidrato. Para ello, se hace la distinción entre el área polar del carbohidrato (ASA^p_{carbo}), el

área polar de la proteína (ASA^p_{prot}), el área no polar del carbohidrato (ASA^{np}_{carbo}) y el área no polar de la proteína (ASA^{np}_{prot}) para el cálculo de los cambios en área superficial accesible (ΔASA). Los datos se presentan en la siguiente tabla:

| Complejo | ΔCp (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | ΔASA^p_{carbo} (Å ²) | ΔASA^p_{prot} (Å ²) | ΔASA^{np}_{carbo} (Å ²) | ΔASA^{np}_{prot} (Å ²) |
|------------|---|---|--|--|---|
| Hev-Q2 | -64 | -92 | -66 | -171 | -138 |
| Hev-Q3 | -83 | -127 | -96 | -182 | -162 |
| CBMXy-Glc2 | -67 | -157 | -80 | -165 | -125 |
| ConA-MeMan | -52 | -128 | -39 | -105 | -69 |
| Lyso-Q2 | -83 | -141 | -144 | -189 | -96 |
| Lyso-Q3 | -119 | -193 | -184 | -227 | -144 |
| ConA-MeGlu | -37 | -107 | -37 | -124 | -73 |
| DGL-Man3 | -96 | -238 | -110 | -141 | -88 |
| ConA-Man3 | -109 | -234 | -120 | -138 | -113 |

Tabla 4.9: ΔCp y cambios en áreas superficiales accesibles (ΔASA) para superficies polares y no polares de proteína y carbohidrato respectivamente

Se realizó un ajuste de estos datos empleando la ecuación:

$$\Delta Cp = \Delta cp^p_{carbo} \cdot \Delta ASA^p_{carbo} + \Delta cp^p_{prot} \cdot \Delta ASA^p_{prot} + \Delta cp^{np}_{carbo} \cdot \Delta ASA^{np}_{carbo} + \Delta cp^{np}_{prot} \cdot \Delta ASA^{np}_{prot}$$

(4.9)

La regresión no lineal produjo los siguientes parámetros:

| Coficiente | (cal mol ⁻¹ K ⁻¹ Å ⁻²) | Error ± |
|--------------------------|---|------------|
| Δcp^p_{carbo} | 0.21 | 0.03 |
| Δcp^p_{prot} | 0.38 | 0.07 |
| Δcp^{np}_{carbo} | -0.18 | 0.09 |
| Δcp^{np}_{prot} | 0.31 | 0.09 |

Tabla 4.10: Coeficientes del ajuste multilineal a ΔCp con incertidumbres.

Tres de los cuatro parámetros del ajuste multilineal son positivos y uno de ellos es negativo. Dado que todos los cambios en ΔASA son negativos, esto quiere

decir que las contribuciones al ΔC_p de los átomos polares del carbohidrato, de los átomos polares de la proteína y de los átomos no polares de la proteína son negativas, mientras que la contribución de los átomos no polares del carbohidrato es positiva. A partir de los valores en la tabla 4.10 puede concluirse que:

- a. la mayor contribución al $\Delta C_p < 0$ se debe a los cambios que sufre la proteína cuando se forma el complejo;
- b. la mayor contribución al $\Delta C_p < 0$ está dada por el cambio en el entorno de los átomos polares ($\Delta c_p^p_{carbo} = 0.21$, $\Delta c_p^p_{prot} = 0.38$), en comparación con los átomos no polares ($\Delta c_p^{np}_{carbo} = -0.18$, $\Delta c_p^{np}_{prot} = 0.31$), para el mismo ΔASA ;
- c. los átomos no polares de la proteína y del carbohidrato contribuyen poco al ΔC_p y tienden a compensarse mutuamente en su aportación al ΔC_p , para valores iguales de ΔASA ;
- d. el ΔC_p experimental se debe a la deshidratación de los grupos que entran en contacto al formarse el complejo: los $-OH$ en el caso de los carbohidratos* y los aminoácidos en el caso de la proteína.

* En el caso de los complejos de lisozima con quitobiosa y quitotriosa, los nitrógenos y oxígenos del grupo N-Acetilo también se hidratan cuando se ven expuestos al disolvente, y contribuyen al ΔC_p .

V. CONCLUSIONES

- ✦ El proceso de unión tanto del metil- α -D-glucopiranosido (MeGlu) como del metil- α -D-manopiranosido (MeMan) a la ConA es un proceso entálpicamente guiado.
- ✦ El ocultamiento el área superficial accesible para la formación de los complejos examinados está acompañado por un valor negativo en el ΔC_p asociado al proceso, lo cual indica que existe deshidratación neta.
- ✦ Al hacer el desglose de las contribuciones al ΔC_p debidas a los cambios en ASA de átomos polares y no polares, encontramos que los primeros son mayormente responsables del valor negativo del ΔC_p .
- ✦ En un desglose más fino, donde se diferencia entre los átomos polares y no polares de la proteína y del carbohidrato respectivamente, las aportaciones al ΔC_p por efecto de los átomos no polares son de magnitudes opuestas y tienden a “autocompensarse” para iguales valores de ΔASA . Asimismo, las mayores contribuciones al valor absoluto del ΔC_p están dadas por los grupos polares, tanto de la proteína como del carbohidrato.
- ✦ El modelo generado por García-Hernández et. al. y revisado en este trabajo es un buen modelo empírico que permite hacer estimados del ΔC_p de un proceso de formación de complejo proteína – carbohidrato, siempre y cuando se conozca la estructura cristalina tanto del complejo como de la proteína y el ligando.

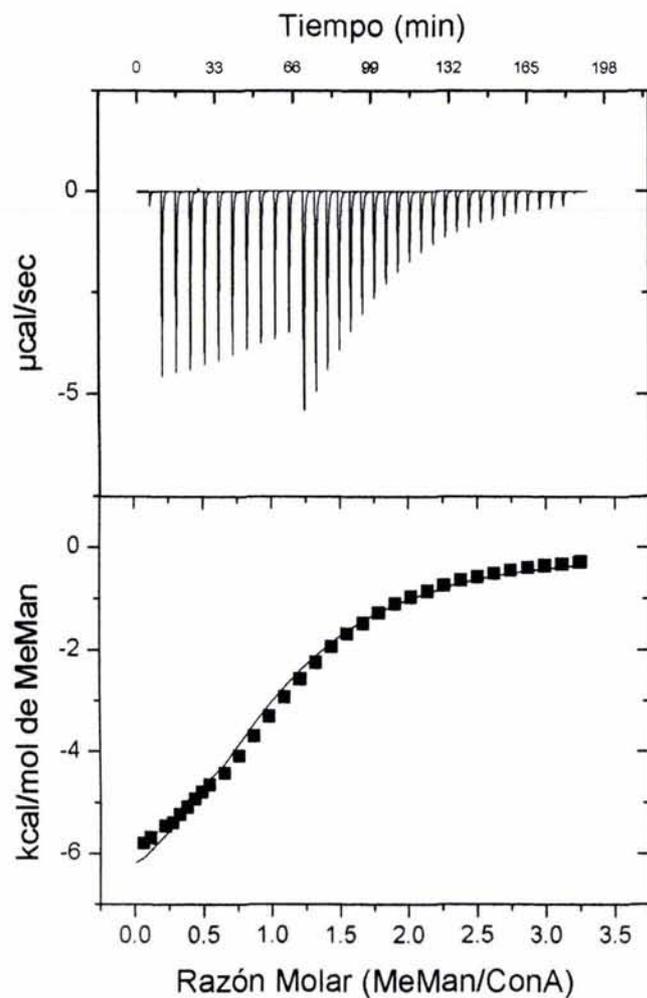
- ✦ El modelo generado en este trabajo en donde se toman en cuenta contribuciones de átomos polares y no polares tanto de la proteína como del carbohidrato da una idea general de la magnitud de las contribuciones individuales. Dado que tiene más parámetros que el modelo anterior, es necesario afinarlo con nuevos datos termodinámicos de sistemas proteína – carbohidrato.

VI. TRABAJO A FUTURO

Es necesario ampliar la base de datos de ΔC_p de formación de complejos proteína – carbohidrato, cuyas estructuras cristalinas sean conocidas, para poder afinar la ecuación paramétrica del ΔC_p en función del ΔASA de grupos polares y no polares pertenecientes a la proteína y al carbohidrato respectivamente. Un primer candidato para determinar ΔH de unión sería el complejo formado por el carbohidrato $\alpha,1\rightarrow2$ -manobiosa y la concanavalina A, ya que se cuenta con la estructura cristalográfica de éste, y se podría realizar una comparación con los sistemas de MeMan – ConA y MeGlu – ConA estudiados en este trabajo.

Para la base de datos de proteínas que unen carbohidrato, cuyo ΔC_p y estructura cristalográfica se conocen, se puede contabilizar el número de grupos hidroxilo que están interactuando en las intercaras de cada complejo. Una vez determinado el número de éstos, resultaría interesante predecir el valor del ΔC_p de unión utilizando la contribución por interacción de grupo –OH obtenida en este trabajo y discutir qué tan adecuada es esta aproximación al valor experimental del ΔC_p .

VII. ANEXO DE RESULTADOS EXPERIMENTALES



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.308
 [MeMan] (mM): 4.597
 [MeMan]/[ConA]: 14.91
 T (°C): 15.0
 C calorímetro
 (C Wiseman,
 considerando ajuste
 con n fija = 1): 3.03

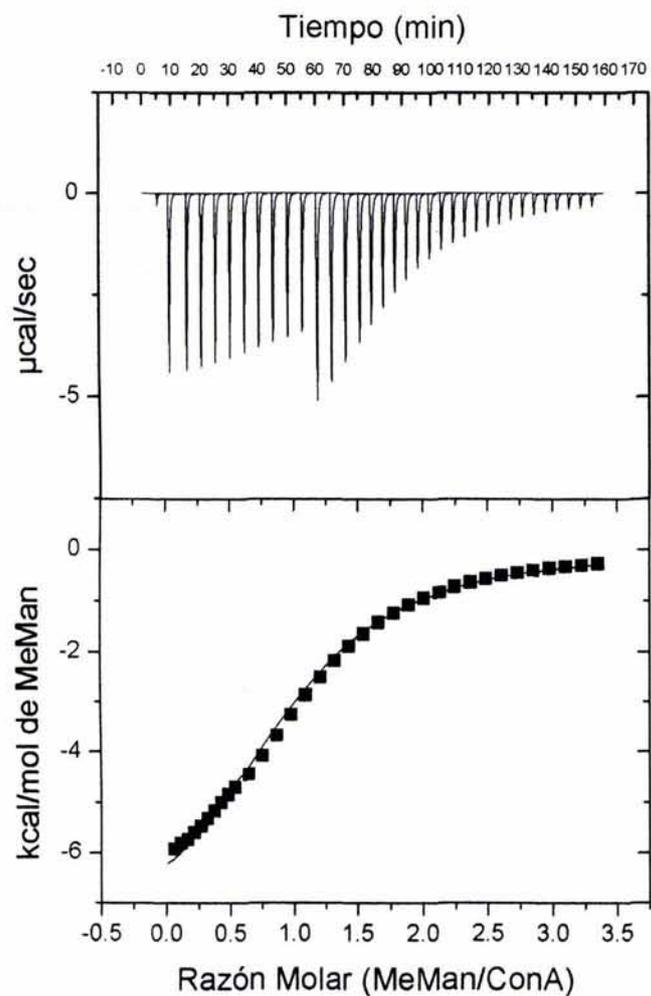
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.14
 K (M⁻¹): 13900 ± 150
 ΔH (cal/mol): -7026 ± 22
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -5.4

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 9860 ± 650
 ΔH (cal/mol): -8207 ± 148
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -10.2

Experimento No. 1: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.294
 [MeMan] (mM): 4.365
 [MeMan]/[ConA]: 14.83
 T (°C): 15.0
 C_{calorímetro}: 3.38

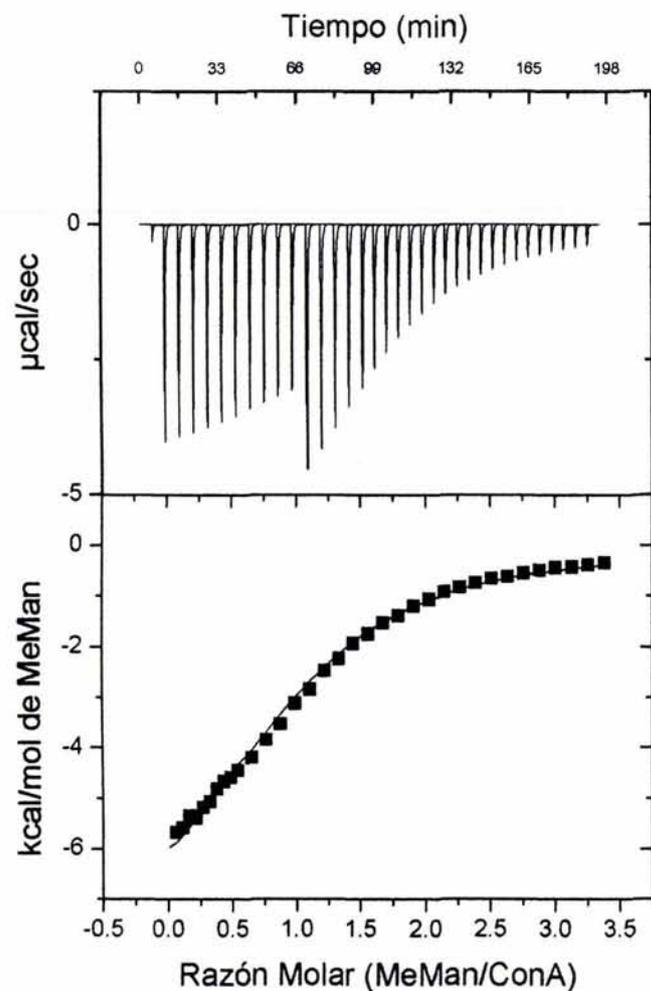
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.09
 K (M⁻¹): 14300 ± 120
 ΔH (cal/mol): -7297 ± 18
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -6.3

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 11500 ± 540
 ΔH (cal/mol): -8055 ± 99
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -9.4

Experimento No. 2: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.276
 [MeMan] (mM): 4.1339
 [MeMan]/[ConA]: 14.98
 T (°C): 20.0
 C_{calorímetro}: 2.35

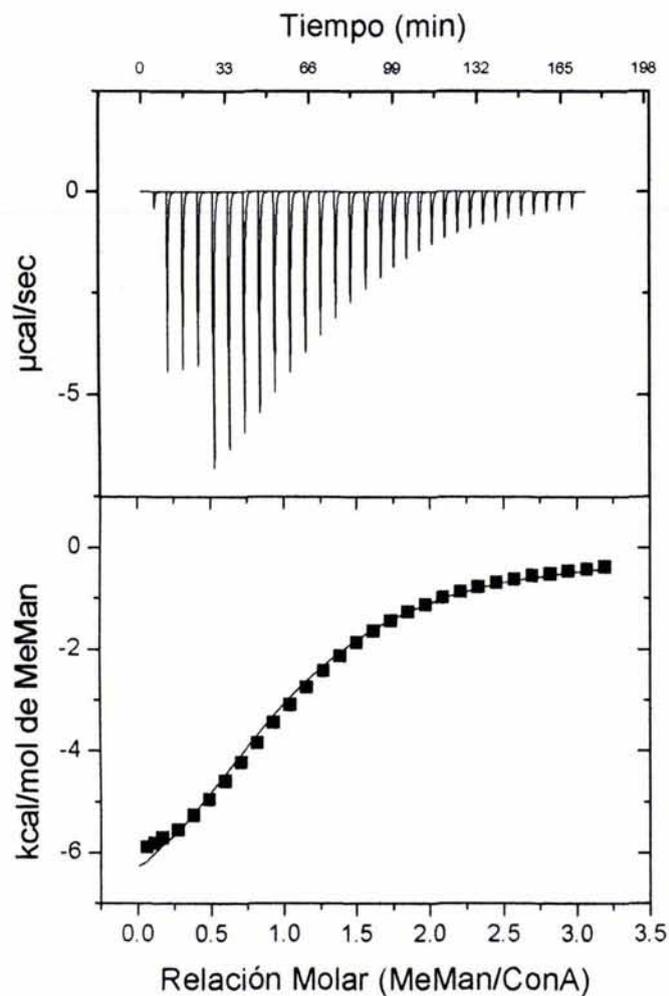
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.12
 K (M⁻¹): 11200 ± 280
 ΔH (cal/mol): -7393 ± 65
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -6.7

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 8520 ± 410
 ΔH (cal/mol): -8525 ± 41
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -11.1

Experimento No. 3: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.297
 [MeMan] (mM): 4.454
 [MeMan]/[ConA]: 14.98
 T (°C): 20.0
 C_{calorímetro}: 2.66

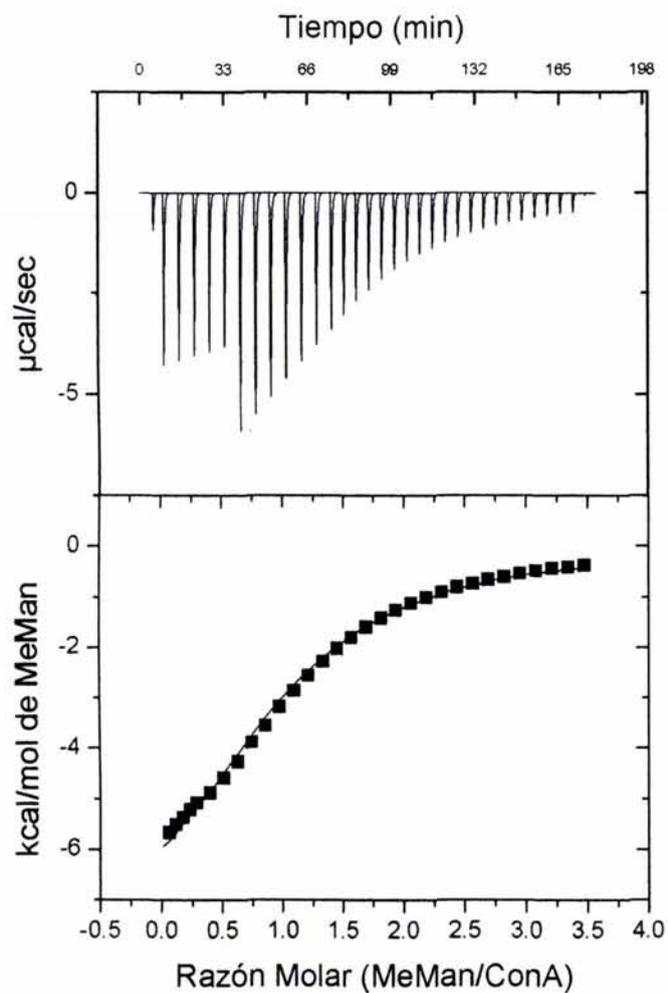
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.11
 K (M⁻¹): 11700 ± 130
 ΔH (cal/mol): -7563 ± 29
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -7.18

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 8960 ± 480
 ΔH (cal/mol): -8623 ± 130
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -11.3

Experimento No. 4: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.284
 [MeMan] (mM): 4.447
 [MeMan]/[ConA]: 15.68
 T (°C): 25.0
 C_{calorímetro}: 1.97

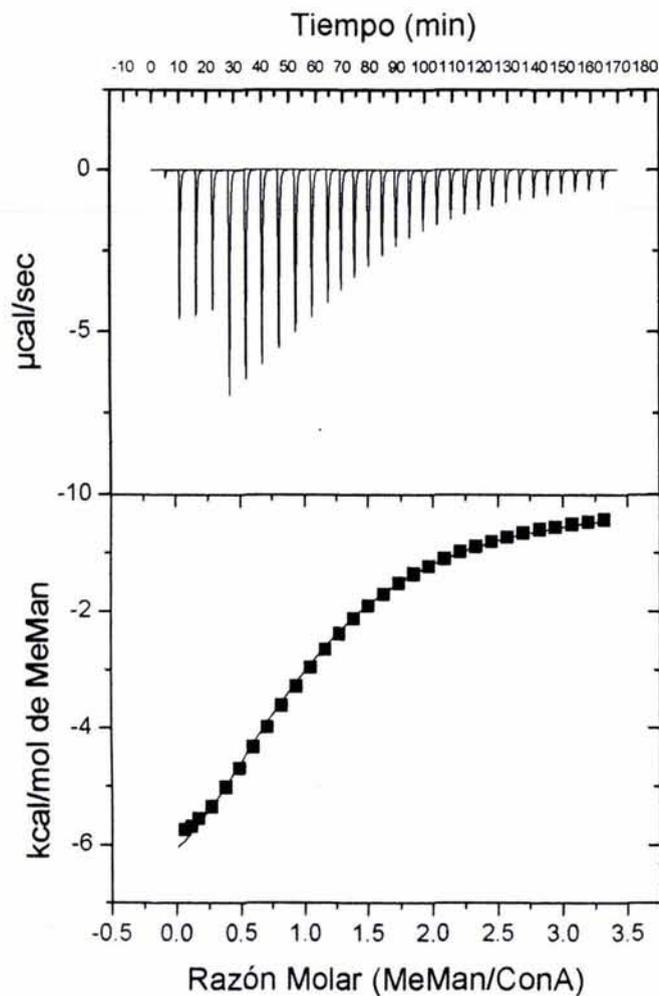
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.13
 K (M⁻¹): 9260 ± 100
 ΔH (cal/mol): -7659 ± 33
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -7.5

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 6930 ± 310
 ΔH (cal/mol): -8999 ± 129
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -12.6

Experimento No. 5: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.318
 [MeMan] (mM): 4.772
 [MeMan]/[ConA]: 14.98
 T (°C): 30.0
 C_{calorímetro}: 2.07

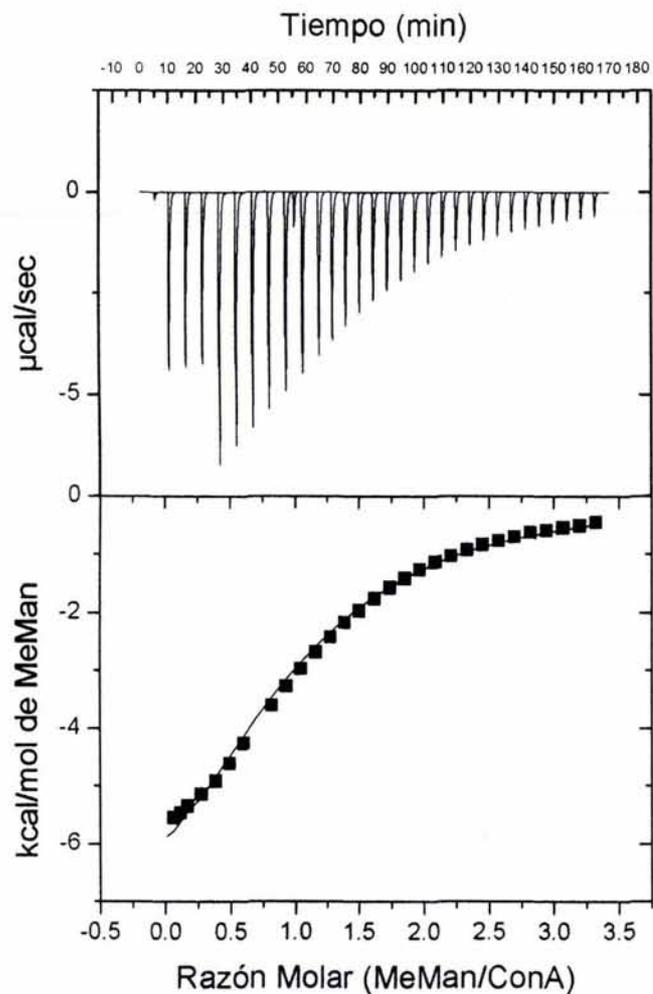
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.08
 K (M⁻¹): 7660 ± 100
 ΔH (cal/mol): -8151 ± 47
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -9.11

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 6510 ± 180
 ΔH (cal/mol): -8961 ± 78
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -12.1

Experimento No. 6: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.318
 [MeMan] (mM): 4.772
 [MeMan]/[ConA]: 14.98
 T (°C): 30.0
 C_{calorímetro}: 1.78

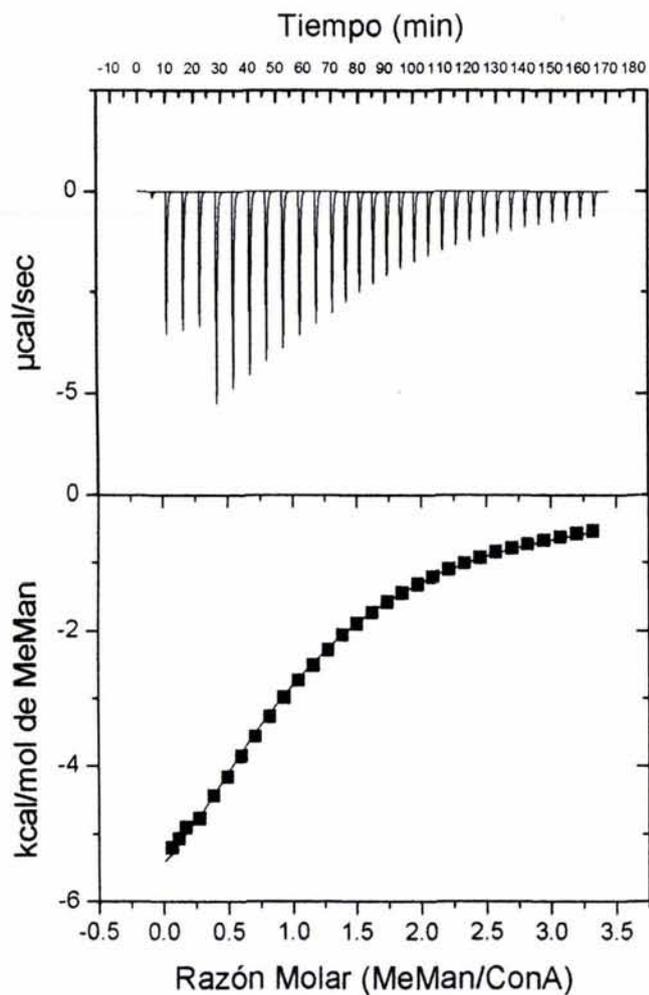
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.14
 K (M⁻¹): 7490 ± 120
 ΔH (cal/mol): -7761 ± 50
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -7.9

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 5580 ± 240
 ΔH (cal/mol): -9203 ± 131
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -13.2

Experimento No. 7: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.274
 [MeMan] (mM): 4.100
 [MeMan]/[ConA]: 14.99
 T (°C): 37.0
 C_{calorímetro}: 1.39

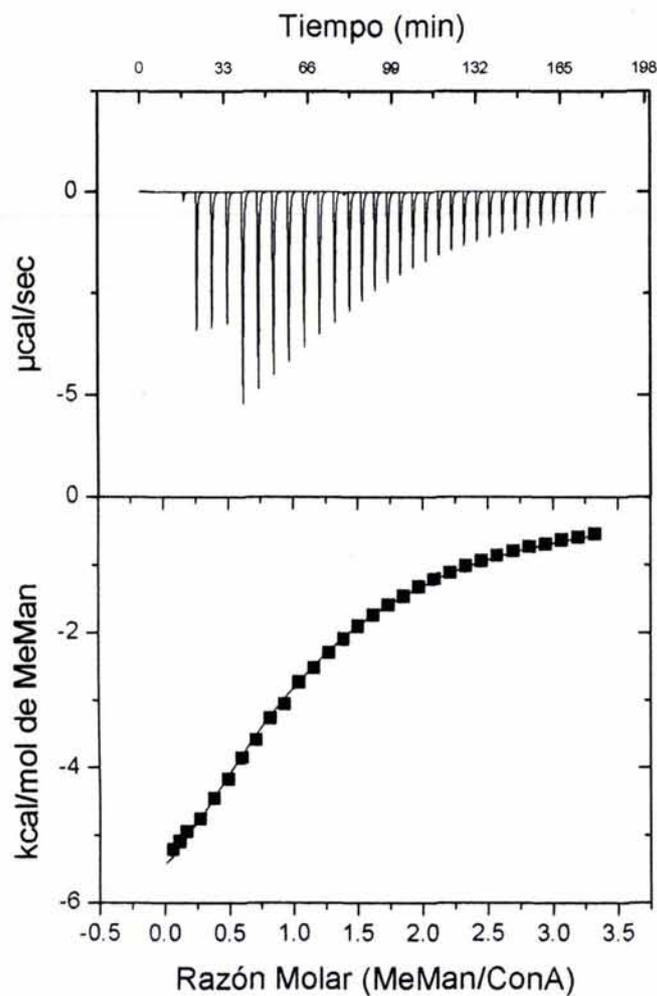
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.08
 K (M⁻¹): 5840 ± 84
 ΔH (cal/mol): -8389 ± 69
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -9.8

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 5070 ± 94
 ΔH (cal/mol): -9305 ± 65
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -13.0

Experimento No. 8: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.274
 [MeMan] (mM): 4.100
 [MeMan]/[ConA]: 14.99
 T (°C): 37.0
 C_{calorímetro}: 1.35

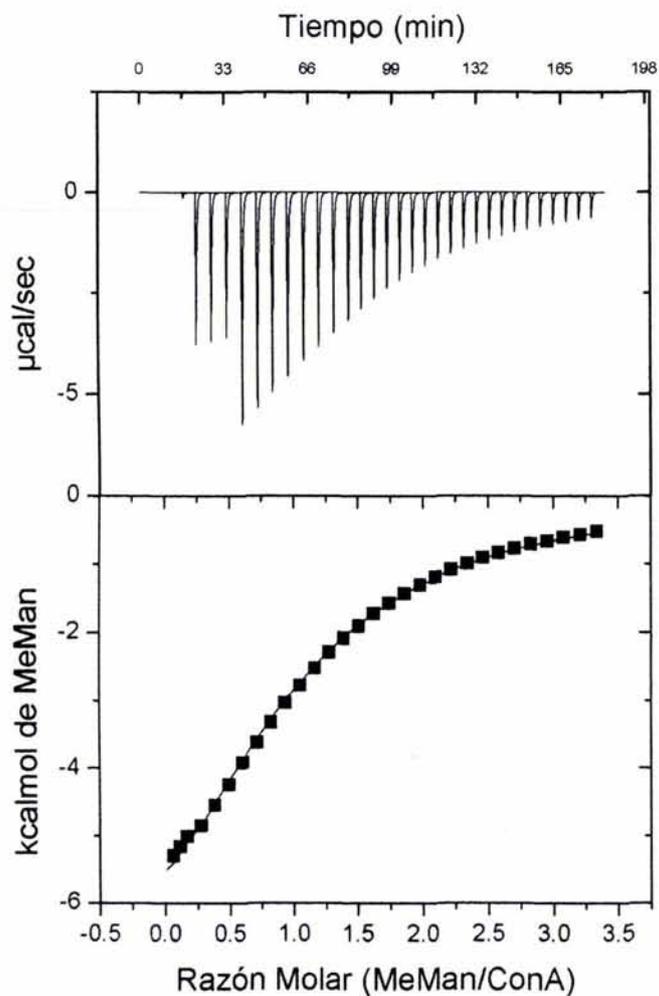
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.09
 K (M⁻¹): 5810 ± 78
 ΔH (cal/mol): -8386 ± 65
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -9.8

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 4950 ± 100
 ΔH (cal/mol): -9430 ± 71
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -13.5

Experimento No. 9: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.297
 [MeMan] (mM): 4.459
 [MeMan]/[ConA]: 15.04
 T (°C): 37.0
 C_{calorímetro}: 1.45

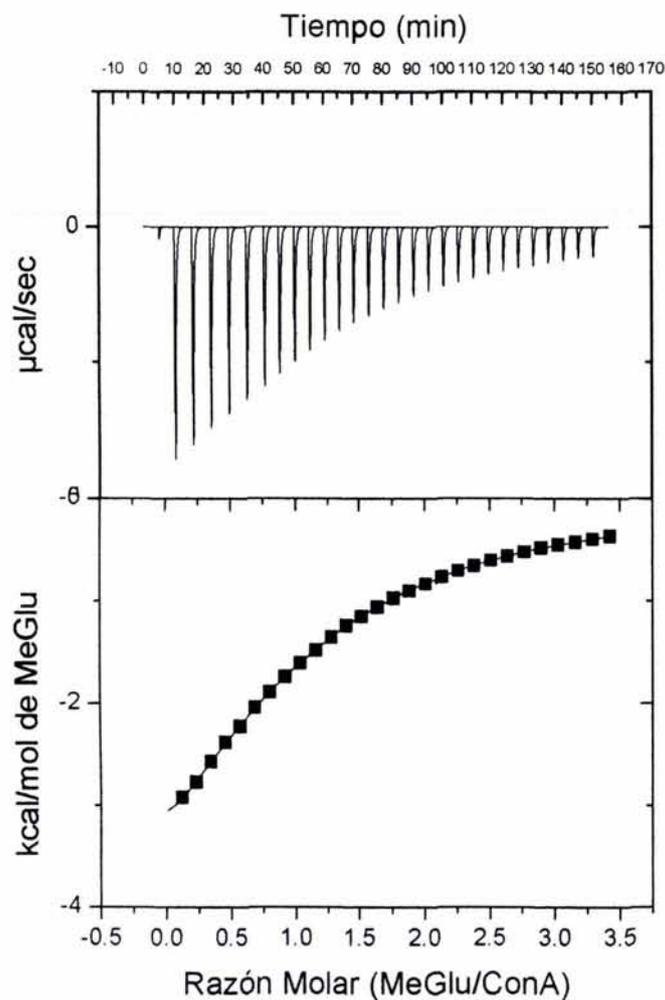
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.09
 K (M⁻¹): 5720 ± 65
 ΔH (cal/mol): -8341 ± 52
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -9.7

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 4900 ± 99
 ΔH (cal/mol): -9308 ± 69
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -13.1

Experimento No. 10: Titulación de ConA con MeMan. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.342
 [MeMan] (mM): 5.378
 [MeMan]/[ConA]: 15.74
 T (°C): 15.0
 C_{calorímetro}: 1.05

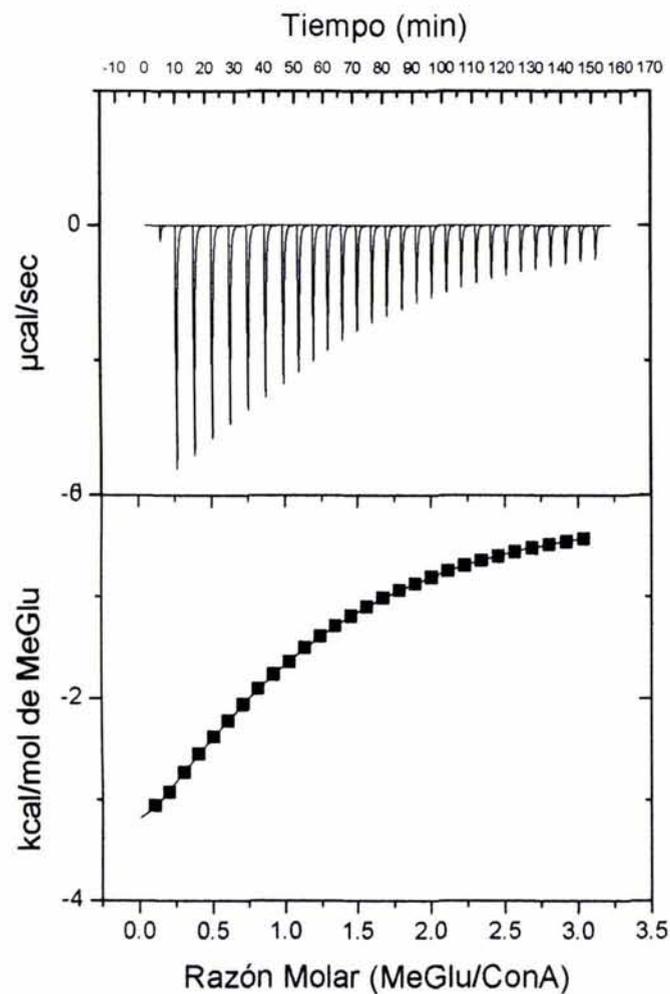
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.02
 K (M⁻¹): 3140 ± 39
 ΔH (cal/mol): -5839 ± 62
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -4.3

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 3070 ± 18
 ΔH (cal/mol): -5981 ± 14
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -4.8

Experimento No. 11: Titulación de ConA con MeGlu. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.385
 [MeMan] (mM): 5.378
 [MeMan]/[ConA]: 13.97
 T (°C): 15.1
 C calorímetro: 1.17

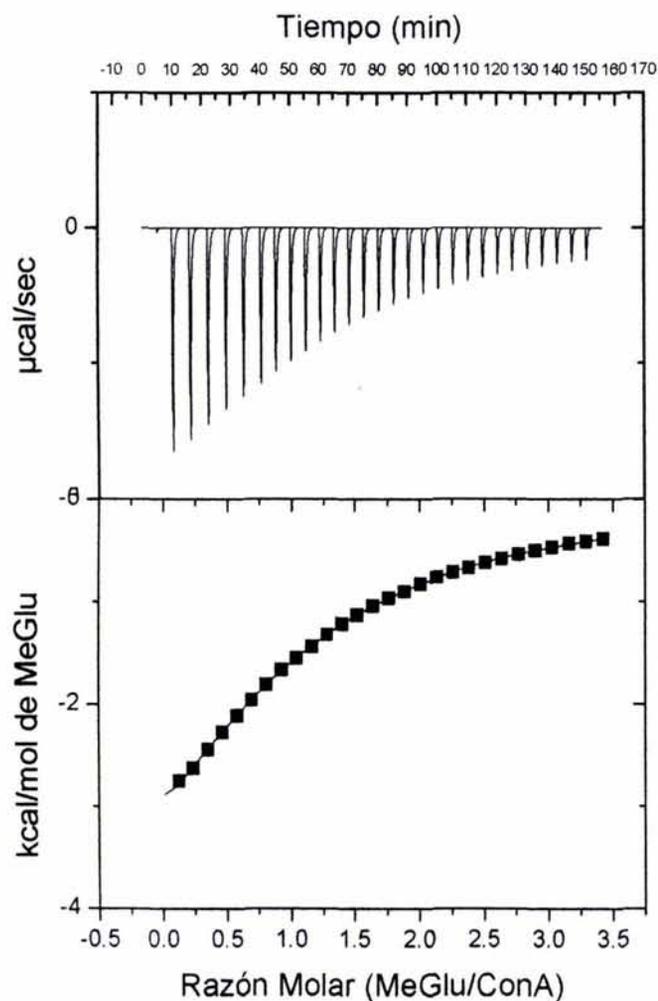
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.00
 K (M⁻¹): 3020 ± 42
 ΔH (cal/mol): -5945 ± 66
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -4.7

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 3040 ± 19
 ΔH (cal/mol): -5905 ± 14
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -4.5

Experimento No. 12: Titulación de ConA con MeGlu. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.342

[MeMan] (mM): 5.378

[MeMan]/[ConA]: 15.74

T (°C): 20.0

C_{calorímetro}: 0.92

Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.03

K (M⁻¹): 2780 ± 51

ΔH (cal/mol): -5823 ± 98

ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -4.1

Ajuste con "n" fija (=1.00)

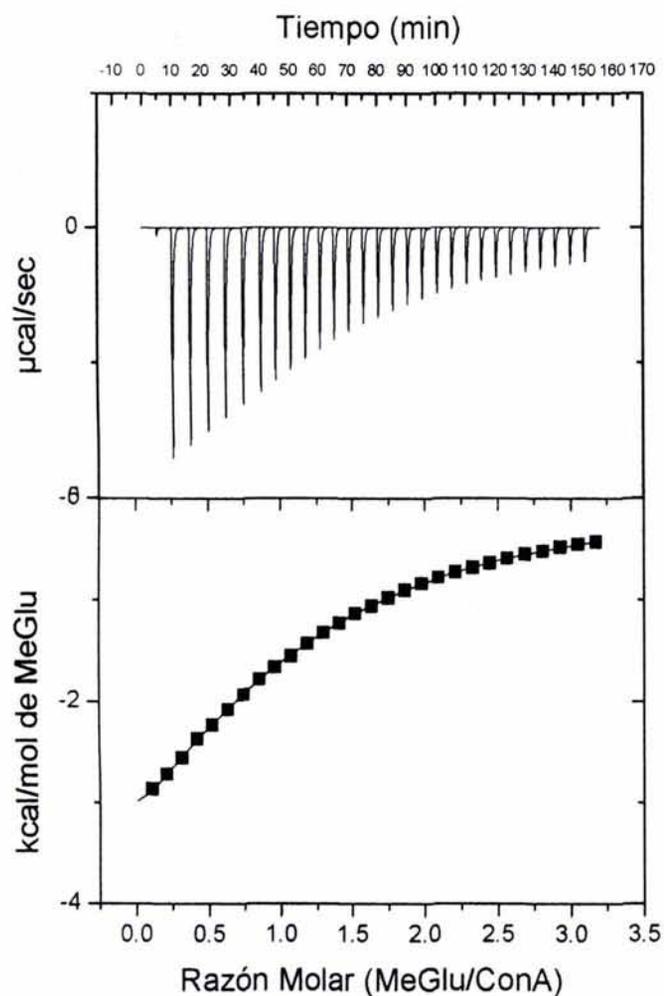
K (M⁻¹): 2680 ± 21

ΔH (cal/mol): -6053 ± 20

ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -5.0

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Experimento No. 13: Titulación de ConA con MeGlu. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.369
 [MeMan] (mM): 5.378
 [MeMan]/[ConA]: 14.60
 T (°C): 20.0
 C_{calorímetro}: 0.58

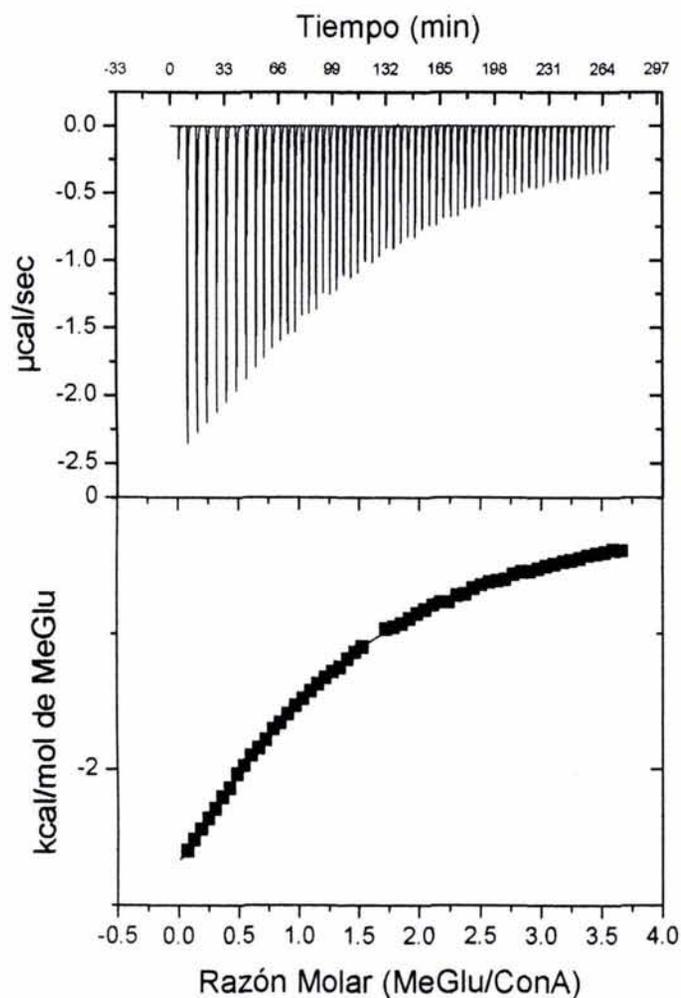
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.03
 K (M⁻¹): 2750 ± 36
 ΔH (cal/mol): -5837 ± 67
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -4.2

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 2640 ± 17
 ΔH (cal/mol): -6079 ± 16
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -5.1

Experimento No. 14: Titulación de ConA con MeGlu. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.326
 [MeMan] (mM): 5.378
 [MeMan]/[ConA]: 16.51
 T (°C): 25.0
 C_{calorímetro}: 0.71

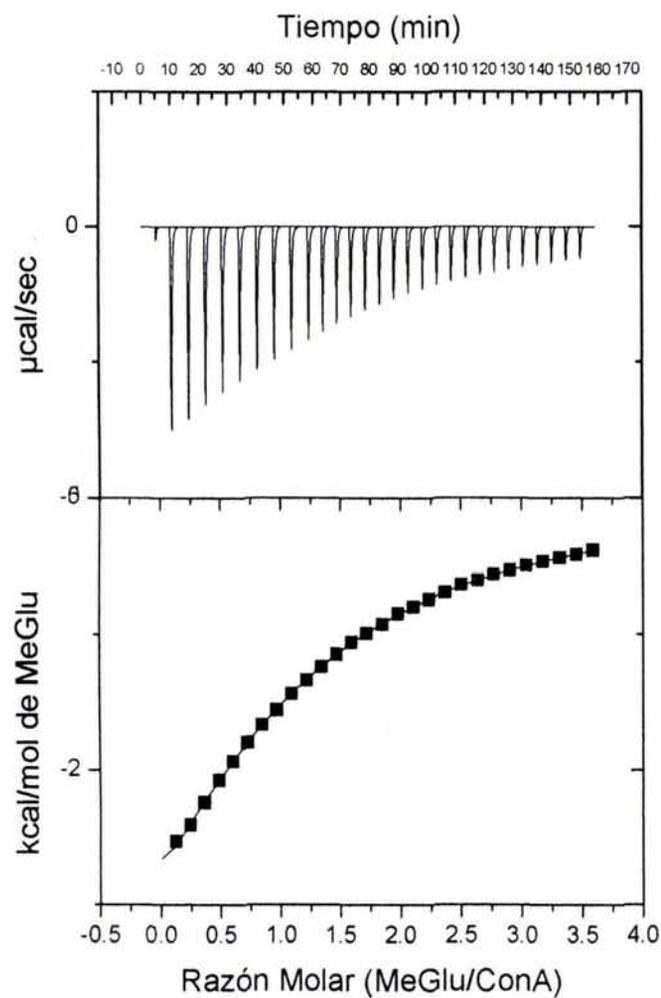
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.03
 K (M⁻¹): 2240 ± 32
 ΔH (cal/mol): -6204 ± 99
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -5.5

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 2180 ± 11
 ΔH (cal/mol): -6420 ± 15
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -6.3

Experimento No. 15: Titulación de ConA con MeGlu. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.326
 [MeMan] (mM): 5.378
 [MeMan]/[ConA]: 16.51
 T (°C): 25.0
 C_{calorímetro}: 0.74

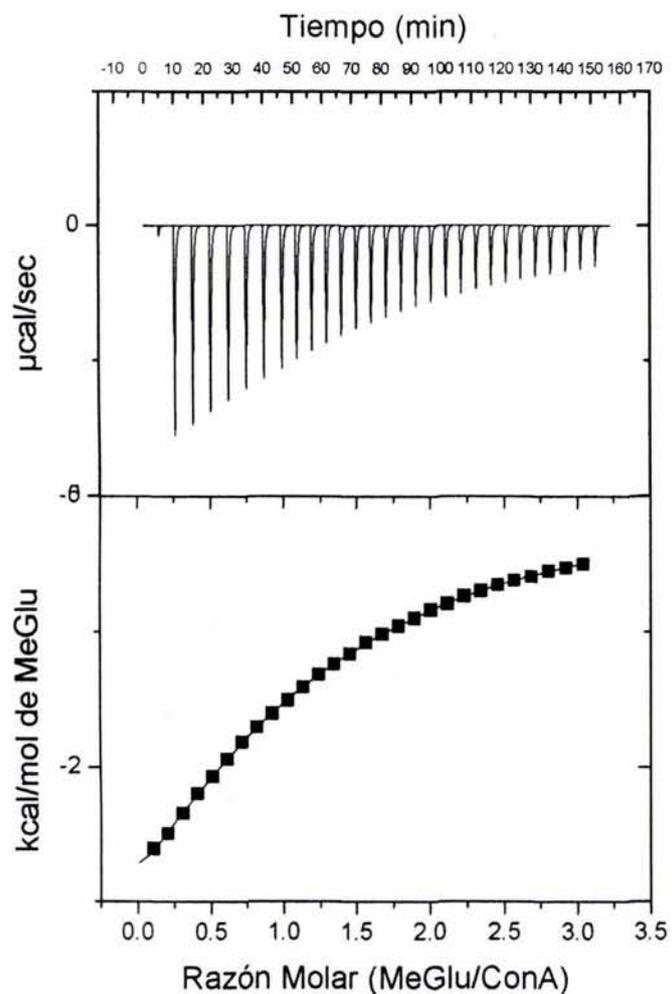
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.04
 K (M⁻¹): 2390 ± 43
 ΔH (cal/mol): -5909 ± 112
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -4.4

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 2280 ± 16
 ΔH (cal/mol): -6238 ± 20
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -5.6

Experimento No. 16: Titulación de ConA con MeGlu. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.385
 [MeMan] (mM): 5.378
 [MeMan]/[ConA]: 13.97
 T (°C): 30.0
 C_{calorímetro}: 0.73

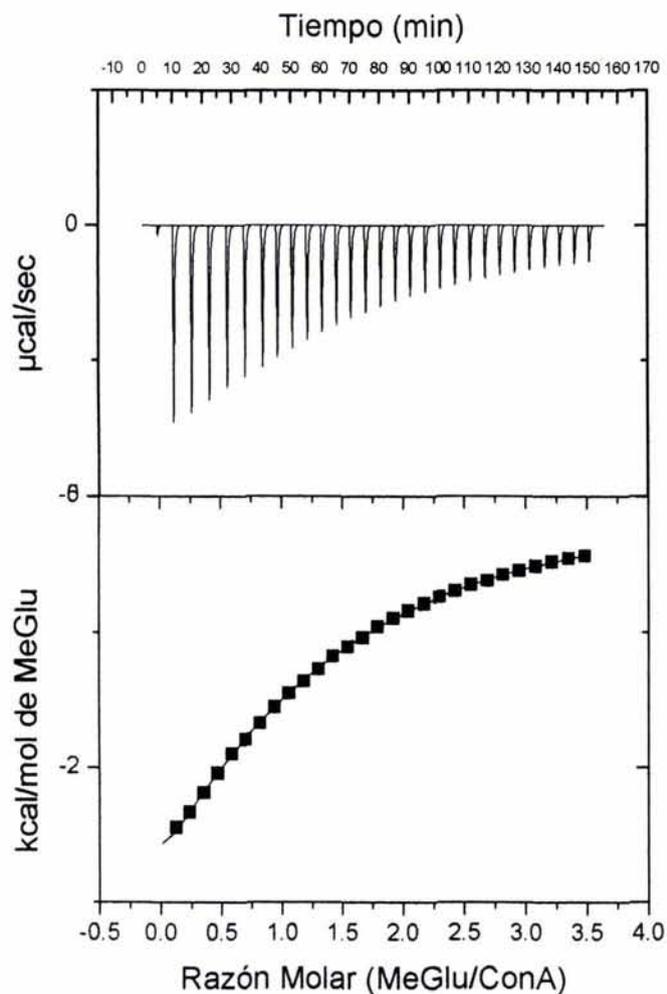
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.02
 K (M⁻¹): 1940 ± 33
 ΔH (cal/mol): -6270 ± 112
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -5.6

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 1900 ± 11
 ΔH (cal/mol): -6428 ± 17
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -6.2

Experimento No. 17: Titulación de ConA con MeGlu. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.336
 [MeMan] (mM): 5.378
 [MeMan]/[ConA]: 16.01
 T (°C): 30.0
 C_{calorímetro}: 0.64

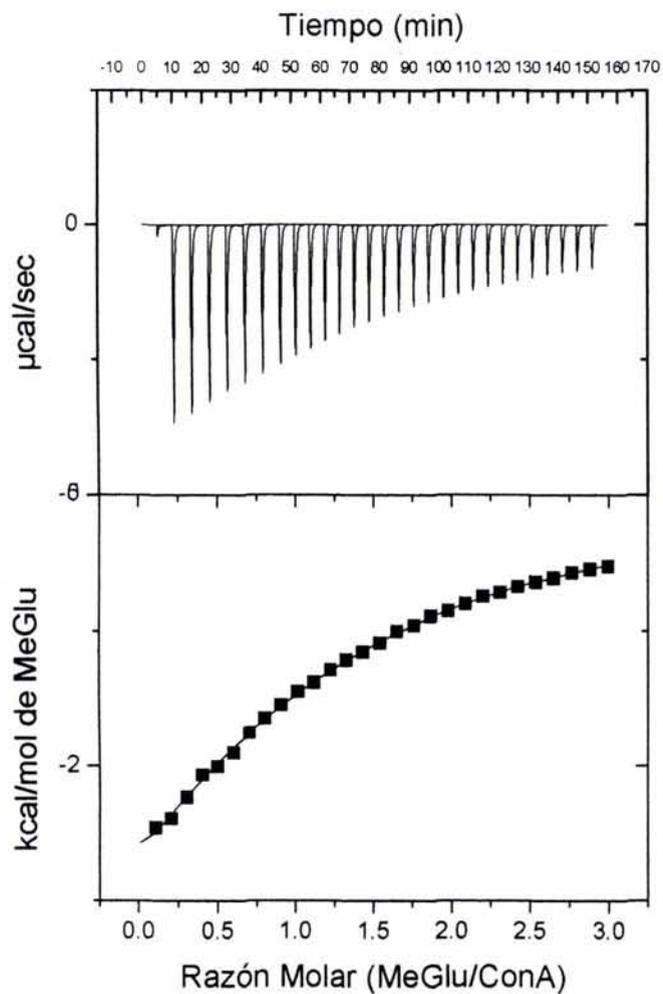
Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.06
 K (M⁻¹): 2010 ± 42
 ΔH (cal/mol): -6118 ± 144
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -5.1

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 1900 ± 15
 ΔH (cal/mol): -6607 ± 24
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -6.8

Experimento No. 18: Titulación de ConA con MeGlu. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)



Parámetros del ajuste

[ConA] (mM): 0.3907
 [MeMan] (mM): 5.378
 [MeMan]/[ConA]: 13.76
 T (°C): 35.0
 C_{calorímetro}: 0.65

Ajuste con "n" libre

valor de "n": 1.01
 K (M⁻¹): 1680 ± 84
 ΔH (cal/mol): -6447 ± 374
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -6.16

Ajuste con "n" fija (=1.00)

K (M⁻¹): 1660 ± 25
 ΔH (cal/mol): -6551 ± 47
 ΔS (cal mol⁻¹ K⁻¹): -6.5

Experimento No. 19: Titulación de ConA con MeGlu. Facultad de Química, Edificio "B", Laboratorio de Termofísica (102)

VIII. REFERENCIAS

1. Liener, I. E., Sharon, N., Goldstein, I. J., eds (1986), *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. 660 pp., Academic Press, Orlando, Fla.
2. Lis, H., Sharon, N. (1986), "Lectins As Molecules and As Tools", *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 35 – 67.
3. Sharon, N., Lis, H. (1989), Lectins. 127 pp., Chapman and Hall, Londres.
4. Sharon, N., Lis, H. (1990), "Legume Lectins – A Large Family of Homologous Proteins", *The FASEB Journal*, **4**, 3199 – 3208.
5. Lis, H., Sharon, N. (1998), "Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that Mediate Cellular Recognition", *Chem. Rev.*, **98**, 637 – 674.
6. Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J., eds (1999), Essentials of Glycobiology. 653 pp., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, EUA.
7. Dazzo, F., B., Hollingsworth, R. I., Philip, S., Sherwood, J. E., Gardiol, A. E., Hrabak, E. M., Smith, D. B., Maya-Flores, J., Welsch, M. A. (1986) Recognition of Rhizobium trifolii by the White Clover Lectin Trifoliin A. En Molecular Biology of Seed Storage, Proteins and Lectins, (Sharon, L. M., Chrispeels, M. J., eds) pp. 45 – 52, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md.
8. Diaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugenberg, B. J. J., Kijne, J. W. (1989), "Root Lectin as a Determinant of Host – Plant Specificity in the *Rhizobium* – Legume Symbiosis", *Nature* (London), **338**, 579 – 581.
9. Broekaert, W. F., Van Parijs, J., Leyns, F., Joss, H., Peumans, W. J. (1989) "A Chitin – Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties", *Science*, **245**, 1100 – 1102.
10. Dam, T. K., Brewer, C. F. (2002), "Thermodynamic Studies of Lectin – Carbohydrate Interactions by Isothermal Titration Calorimetry", *Chem. Rev.*, **102**, 387 – 429.
11. Goldstein, I. J., Poretz, F. D. (1986), en The Lectins (Liener, I. E., Sharon, N., Goldstein, I. J., eds) p. 35, Academic Press, Nueva York, EUA.
12. García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., Rojo-Domínguez, A., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Arana, A. (1997), "New Insights Into the Molecular Basis of Lectin – Carbohydrate Interactions: A Calorimetric and Structural Study of the Association of hevein to Oligomers of N –

- Acetylglucosamine”, *PROTEINS.: Structure, Function and Genetics*, **29**, 467 – 477.
13. García-Hernández, E., Hernández-Arana, A. (1999), “Structural Base of Lectin – Carbohydrate Affinities: Comparison with Protein – Folding Energetics”, *Protein Science*, **8**, 1075 – 1086.
 14. García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Arana, A. (2000), “Stereochemical metrics of Lectin – Carbohydrate Interactions: Comparison with Protein – Protein Interfaces”, *Glycobiology*, **10**, 993 – 1000.
 15. García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., Chavelas-Adame, E. A., Vázquez-Contreras, E., Rojo-Domínguez, A., Costas, M. (2003), “Structural Energetics of Protein – Carbohydrate Interactions: Insights derived from the Study of Lysozyme Binding to its Natural Saccharide inhibitors”, *Protein Science*, **12**, 135 – 142.
 16. Makhatadze, G. I., Privalov, P. L. (1993), “Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics. I. The Enthalpy of Hydration”, *J. Mol. Biol.*, **232**, 639 – 659.
 17. Privalov, P. L., Makhatadze, G. I. (1993), “Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics. II. The Entropy and Gibbs Energy of Hydration”, *J. Mol. Biol.*, **232**, 660 – 679.
 18. Makhatadze, G. I., Privalov, P. L. (1995), “Energetics of Protein Structure”, *Adv. Protein Chem.* **47**, 307 – 425.
 19. Freire, E. (1995), “Thermodynamics of Partly Folded Intermediates in Proteins”, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 141 – 165.
 20. Bardi, J. S., Luque, I., Freire, E. (1997), “Structure – Based Thermodynamic Analysis of HIV–1 Protease Inhibitors”, *Biochemistry*, **36**, 6588 – 6596.
 21. Charles Tanford (1961), Physical Chemistry of Macromolecules, 710 pp., J. Wiley, Nueva York.
 22. G. Weber (1992), Protein Interactions, 293 pp., Chapman & Hall, Nueva York.
 23. K. E. Van Holde (1971), Physical Biochemistry, 246 pp., Prentice Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey.

24. Goldstein, I. J., Poretz, R. D. (1986), *The Lectins*, (Sharon, I. E., Goldstein, I. J., eds.) pp. 35 – 244, Academic Press, Inc., Nueva York.
25. Freire, E., Mayorga, O. L., Traume, M. (1990), "Isothermal Titration", *Analytical Chemistry* **62**, 950 – 959.
26. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., Lin, L. N. (1989), "Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter", *Analytical Biochemistry*, **179**, 131 – 137.
27. Pierce, M. M., Raman, C. S., Nall, B. T. (1999), "Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions", *Methods* **19**, 213 – 221.
28. Indyk, L., Fisher, H. F. (1998), "Theoretical Aspects of Isothermal Titration Calorimetry", *Methods in Enzymology* **295**, 350 – 364.
29. Turnbull, W. B., Daranas, A. H. (2003), "On the Value of c . Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry?", *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14859 – 14866.
30. VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual, MicroCal, LLC
31. SIGMA Product Information Sheet, product number C2010.
32. Chervenac, M. C., Toone, E. J. (1994), "A Direct Measure of the Contribution of Solvent Reorganization to the Enthalpy of Ligand Binding", *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 10533 – 10539.
33. Schwarz, F. P., Puri, K. D., Bhat, R. G., Surolia, A. (1993), "Thermodynamics of Monosaccharide Binding to Concanavalin A, Pea (*Pisum sativum*) Lectin, and Lentil (*Lens culinaris*) Lectin", *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 7668 – 7677.
34. Cunningham, B. A., Wang, J. L., Pflumm, M. N., Edelman, G. M. (1972), "Isolation Proteolytic Cleavage of Intact Subunit of Concanavalin A", *Biochemistry* **11**, 3233 – 3239.
35. Hubbard, S. J., Thornton, J. M (1993), Programa de Cómputo NACCESS. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, University Collage, Londres.
36. Privalov, P.L., Makhatadze, G.I. (1992), "Contribution of Hydration and Non-Covalent Interactions to The Heat Capacity Effect on Protein Unfolding", *J. Mol. Biol.*, **224**, 715-723.

37. Lemieux, R. U. (1989), "The Origin of The Specificity in The Recognition of Oligosaccharides by proteins", *Chem. Soc. Rev.* **18**, 347 – 374.
38. Habermann, S. M., Murphy, K. P. (1996), "Energetics of Hydrogen Bonding in Proteins: A Model Compound Study", *Protein Science*, **5**, 1229 – 1239.
39. Rozwarski, D. A., Swami, B. M., Brewer, C. F., Sacchettini, J. C. (1998), "Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates", *J. Biol. Chem.* **273**, 32818.