



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ÁREA DE BIOFISICOQUÍMICA

**“ESTUDIO TERMODINÁMICO DE LA ASOCIACIÓN DE LA CISTATINA C
HUMANA CON LA QUIMOPAPAÍNA”**

Tesis que presenta:

Q. Tovar Anaya David Octavio

Matricula: 2123803307

Para obtener el grado académico de
Doctor en Ciencias (Química)

Asesor: **Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna**

Jurado:

Presidente: Dr. Andrés Hernández Arana
Secretario: Dra. Alberta Jaqueline Padilla Zúñiga
Vocal: Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez
Vocal: Dr. Hugo Nájera Peña
Vocal: Dr. Enrique García Hernández

Iztapalapa, Ciudad de México, marzo 2020.

La presente investigación con título “**Estudio termodinámico de la asociación de la cistatina C humana con quimopapaína**”, se realizó en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química perteneciente a la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, bajo la asesoría del Dr. Rafael A. Zubillaga Luna.

La realización de este trabajo contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) a través de la beca de doctorado. (Becario:283296).

También se contó con el apoyo económico de Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT, Edo. México) a través de la beca de titulación con número de folio 19BTIID0044.

DEDICATORIAS

A mi familia grande (Miguel, María, Barbara, Román y Jesús), por haberme brindado las bases necesarias para seguir adelante en el cumplimiento de mis metas y aprovecho para darles las gracias por creer en mí.

A mi familia Jennyfer y Santiago, por estar a mi lado en las buenas y en las malas. Gracias Santi por ser mi motor e inyectarme una dosis de amor todos los días.

“Claro es que para trazar un círculo hay que hay que empezar por algún lado, pero una vez cerrado deja de plantearse el problema de su principio.” — Erich von Däniken

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael A. Zubillaga Luna, por aceptarme como su estudiante y sobre todo por brindarme la confianza de desarrollar este proyecto, así mismo le agradezco por todo el conocimiento y experiencia que compartió conmigo. También le agradezco su apoyo personal.

A la Dra. Liliana Irais Vera Robles, por todo el apoyo que me brindo durante el desarrollo de este trabajo, sobre todo su colaboración en la parte de biología molecular.

Al Dr. José Alfonso Arroyo Reyna, por formar parte de mi comité tutorial y orientarme para el mejor desarrollo de este trabajo, en especial le agradezco el apoyo brindado en el análisis de los datos obtenidos por calorimetría.

A la Dra. Georgina Garza Ramos, de la facultad de Medicina de la UNAM, por formar parte de mi comité tutorial y por las facilidades dadas para la realización de los experimentos de cromatografía de líquidos.

A la Dra. María Teresa Vieyra Eusebio, por su colaboración y apoyo en la parte de la calorimetría de titulación isotérmica.

Al Dr. Ponciano García Gutiérrez, por su colaboración en la parte de la simulación de dinámica molecular. También le agradezco su apoyo personal.

Al Dr. Francisco Reyes Espinoza, por su colaboración en la purificación de la cistatina C humana.

Al Dr. Andrés Hernández Arana, por su apoyo en la interpretación de datos experimentales y su constante motivación.

Al Dr. Miguel Costas Basín, de la facultad de Química de la UNAM, por las facilidades que me brindo en el uso del equipo VP-DSC para realizar los experimentos de calorimetría diferencial de barrido.

Al laboratorio divisional de espectroscopia de masas de UAM-I y a la Biol. Mónica Rincón por las facilidades en la obtención de los espectros de cistatina C humana.

Al laboratorio divisional de biología molecular de la UAM-I y a la Dra. Alejandra Serrato por las facilidades brindadas para obtener la secuencia de la cistatina C humana L47C/G69C.

A los miembros de jurado: Dra. A. Jaqueline Padilla Zúñiga, Dra. Georgina Garza Ramos, Dr. Enrique García Hernández, Dr. Hugo Nájera Peña y el Dr. Andrés Hernández Arana, por las valiosas sugerencias y observaciones que contribuyeron al mejoramiento de este trabajo.

A la coordinación del posgrado en Química de la UAM-I y a la Dra. Laura Galicia Luis, por el apoyo y orientación en los procesos administrativos.

A la Mtra. Iseo González asistente de la oficina de posgrado, por el apoyo en los trámites administrativos y ante el CONACyT.

Al Dr. Menandro Camarillo Cadena, por orientarme siempre que se lo solicite. También por iniciarme en el camino de las proteínas.

Quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos del departamento de química, en especial a los del área de Biofísicoquímica, por hacer que los días en la universidad no sólo fueran de ciencia y estudio, sino también fueran de compañerismo, diversión y apoyo mutuo.

Gracias UAM-I

*La vida sigue su curso
un tiempo cruel y extraña
implacable y hermosa,
alargando el pasado
encogiéndolo el presente,
repartiendo futuros inevitables,
juntando y separando gente.*

Evaristo Páramos Pérez

ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ap	Apolar
ARN	Ácido ribonucleico
ASA	Área superficial accesible al solvente
CCE	Cistatina C humana estabilizada
CCH	Cistatina C humana
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
CEM	cromatografía de exclusión molecular
CF	Concentración final
cmQ	Carboximetil-quimopapaína
CTI	Calorimetría de titulación isotérmica
DDL	Dispersión dinámica de luz
DEAE	Dietilaminoetil
DM	Dinámica molecular
DO	Densidad óptica
DTT	DL-ditiotreitol
EC	Enzyme Commission
Ec.	Ecuación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HEPES	N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'-2 ácido etanosulfónico
IPP	Interacciones proteína – proteína
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
K	Kelvin
kbp	kilo pares de bases (kilo base pairs)
K _i	Constante de Inhibición
kDa	kilo Daltons
K _U	Constante de unión proteína – proteína
LB	Luria – Bertani

LDBM	Laboratorio divisional de biología molecular
LDEM	Laboratorio divisional de espectrometría de masas
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight
M _{ALQ}	Masa molecular de la proteína alquilada
M _{CAM}	Incremento en la masa de la proteína por la carbamidometilación
M _{NAT}	Masa molecular de la proteína nativa
M _{RED+ALD}	Masa molar de la proteína reducida y alquilada
NaCl	Cloruro de sodio
N _{Cys}	Número de Cisteínas que participan en un puente disulfuro
NPD	Número de puentes disulfuro
NPT	Moles, Presión y Temperatura constantes
NSH	Número de sulfhidrilos reactivos
OPLS	Optimized Potencial Liquid Simulations
p	Polar
P – L	Complejo proteína – ligando
P – P	Complejo proteína – proteína
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PC	Proteasas cisteínicas
PDB	Protein Data Bank
pI	Punto isoeléctrico
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación acida
P. H.	Puente de hidrógeno
pM	Picomolar
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
R	Constante universal de los gases
Rg	Radio de giro
RMSD	Root mean square deviation
RMSF	Root mean square fluctuation
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
T	Temperatura
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

Uniprot	Universal Protein Resource
VMD	Visual Molecular Dynamics
ΔH_{cal}	Entalpía calorimétrica
ΔH_{vH}	Entalpía van't Hoff
Å	Angström
ΔASA	Cambio en el área superficial accesible al solvente al formarse un complejo
ΔC_p	Capacidad calorífica de unión
ΔG_U	Energía libre de unión proteína – proteína
ΔH_U	Cambio Entalpia de unión proteína – proteína
ΔS_U	Entropía de unión proteína – proteína
°C	Grados celsius

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE	iv
RESUMEN	viii
Capítulo 1	
1.INTRODUCCIÓN	2
1.1 Proteínas	2
1.2 Enzimas	3
1.2.1 Proteasas	5
1.2.2 Proteasas Cisteínicas	6
1.3 Cistatinas	8
Capítulo 2	
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Quimopapaína	11
2.2 Cistatina C humana	12
2.3 Interacciones proteína – proteína	13
2.4 Importancia del estudio de las proteasas cisteínicas y sus inhibidores naturales	14
Capítulo 3	
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	16
3.1 Hipótesis	16
3.2 Objetivo General	16
3.3 Objetivos Particulares	16
Capítulo 4	
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 Mutagénesis de sitio dirigido	18
4.1.1 Mutación puntual L47C	19
4.1.2 Mutación puntual G69C	19

4.1.3	Expresión de la Cistatina C humana silvestre y estabilizada	19
4.2	Purificación de los inhibidores	20
4.2.1	Prueba de la formación del puente disulfuro entre los residuos C47 – C69	21
4.3	Carboximetilación y purificación de la quimopapaína.	22
4.4	Propiedades espectroscópicas de CCH, CCE y cmQ	23
4.4.1	Dicroísmo circular (DC)	23
4.4.2	Fluorescencia (Espectros de Emisión)	23
4.5	Pruebas de resistencia a la formación de oligómeros	24
4.5.1	Cromatografía de exclusión	24
4.5.2	Dispersión dinámica de luz	24
4.6	Estudio calorimétrico	25
4.6.1	Calorimetría diferencial de barrido	25
4.6.2	Calorimetría de titulación isotérmica	25
4.7	Modelado computacional	27
4.7.1	Modelado de la cistatina C humana.	27
4.7.2	Construcción del complejo cistatina C – quimopapaína	27
4.7.3	Simulación de DM de los modelos inhibidor – quimopapaína	29
4.7.4	Estimaciones Teóricas de los Parámetros Termodinámicos de Unión	29
Capítulo 5		
5. RESULTADOS		32
5.1	Construcción de la cistatina C humana estabilizada (L47C/G69C)	32
5.1.1	Expresión de la cistatina C humana estabilizada (CCE)	33
5.2	Purificación de los inhibidores	33
5.2.1	Prueba de la formación del puente disulfuro entre los residuos C47 – C69	35
5.3	Carboximetilación y purificación de la quimopapaína	37
5.4	Propiedades estructurales	38
5.4.1	Propiedades estructurales de los inhibidores CCH y CCE	38

5.4.2	Propiedades estructurales de la cmQ	39
5.4.3	Prueba espectroscópica de la formación del complejo	40
5.5	Estabilidad estructural del monómero de cistatina C humana	41
5.5.1	Pruebas de oligomerización por CEM y DDL	41
5.6	Calorimetría diferencial de barrido	43
5.7	Calorimetría de titulación isotérmica	44
5.8	Modelado computacional	46
5.8.1	Modelado y simulación de DM de los Inhibidores.	46
5.8.2	Construcción del modelo cistatina C humana–quimopapaína por acoplamiento molecular rígido	48
5.8.3	Simulación de DM de los modelos inhibidor – quimopapaína	51
5.9	Estimaciones teóricas de los parámetros termodinámicos ΔH_U y ΔC_p	57
Capítulo 6		
6.	DISCUSIÓN	60
6.1	Construcción, purificación y caracterización de la cistatina C humana y su mutante (L47C/G69C).	61
6.1.1	Carboximetilación, purificación y caracterización de la cmQ	62
6.2	Propiedades Estructurales presentes en la formación del complejo	62
6.3	Estabilidad estructural de la cistatina C humana y de su mutante L47C/G69C	62
6.4	Caracterización termodinámica de los complejos por CTI	63
6.5	Simulación de DM de los inhibidores	65
6.5.1	Simulación de Dinámica Molecular de los complejos	65
6.6	Estimación teórica del ΔC_p y el ΔH_U	66
Capítulo 7		
7.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	69
7.1	CONCLUSIONES	69
7.2	PERSPECTIVAS	70
BIBLIOGRAFÍA		71
APÉNDICES		78

A. Clasificación de los aminoácidos.	78
B. Construcción de la cistatina C Humana.	79
C. Modelo de un sólo sitio de unión	80
D. Estimación de T_m para CCE, a partir de los datos de estabilidad de CCH y la Ec. 9.	82
E. Simulación de dinámica molecular a 350 K.	83
E.1. Simulación de DM de los inhibidores.	74
E.2 Simulación de DM a 350 K de los complejos:	
cmQ – CCH y cmQ – CCE	74
F. Lista de aminoácidos ocultos en la interfaz	85
ARTÍCULO	87

RESUMEN

En la presente tesis se realizó la caracterización termodinámica de la unión de la proteasa cisteínica quimopapaína (carboximetilada en su -SH catalítico) a la cistatina C humana (CCH), la cual es un inhibidor reversible natural de las proteasas cisteínicas. La afinidad de la CCH por proteasas cisteínicas tipo papaína incluidas las catepsinas, oscila de acuerdo con las constantes de unión (K_U) entre 10^6 y 10^{14} M^{-1} . La calorimetría de titulación isotérmica (CTI) es una de las técnicas más útiles para caracterizar la termodinámica de interacción intermolecular, permitiendo separar la energía libre de unión (ΔG_U) en sus componentes entálpico (ΔH_U) y entrópico ($T\Delta S_U$). Esta información, junto con los cambios estructurales que se producen durante la asociación, podría permitirnos comprender mejor las bases moleculares que llevan a esa variación considerable en la afinidad. La CTI requiere concentraciones de proteína de al menos 10-100 μM para obtener datos confiables; sin embargo, es conocido que la CCH es propensa a formar dímeros y oligómeros de orden superior a través de un mecanismo de intercambio de dominios a partir de concentraciones de 16.0 μM , perdiendo su capacidad inhibitoria. Nilsson *y col.*, 2004, mostraron que al introducir un enlace disulfuro en la CCH silvestre mediante las mutaciones puntuales L47C y G69C, se inhibe el reacomodo de los dominios manteniendo el estado monomérico de la proteína. Esta forma de cistatina C estabilizada (CCE), se obtuvo por mutagénesis dirigida del vector que contiene el gen de la CCH madura incluyendo el codón de inicio. Ambas proteínas, CCH y CCE, se purificaron del sobrenadante de lisis en tres etapas cromatográficas, mientras que la quimopapaína se inactivó por carboximetilación de su Cys catalítica, y purificó por cromatografía de intercambio catiónico. Se realizó un estudio comparativo de la termodinámica de unión de la proteasa cmQ con la cistatina C silvestre y su mutante estabilizada, comparando además las propiedades estructurales, estabilidad térmica y oligomerización de ambos inhibidores.

Se efectuó el estudio calorimétrico de la formación de los complejos cmQ-CCH y cmQ-CCE en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0 y fuerza iónica de 0.1 M ajustada con NaCl. Por CTI se determinaron los parámetros termodinámicos asociados a la formación del complejo: K_U , ΔH_U , $T\Delta S_U$ y ΔG_U , así como el número de sitios de unión (n), al ajustar los datos al modelo de sitios de unión idénticos e independientes. El valor del ΔC_p se obtuvo de la dependencia térmica de la entalpía, al realizar titulaciones isotérmicas a distintas temperaturas. Ambos sistemas mostraron afinidades moderadas con una K_U del orden de 10^6 M^{-1} , aunque ligeramente mayor para el complejo cmQ-CCE, y una entalpía de unión exotérmica que se hace más negativa a temperaturas mayores dado que el ΔC_p para ambos sistemas es negativo.

Se construyó un modelo atómico para cada complejo quimopapaína–Inhibidor, por el acoplamiento rígido de las estructuras 3D individuales. Para el caso particular de CCH su estructura 3D se modeló de la estructura 3D de la CCE al cambiar los residuos C47 y C69 por L y G respectivamente. Tanto las estructuras de los inhibidores como de los complejos se sometieron a una simulación de dinámica molecular durante 200 ns en solvente explícito a 350 K y 450 K. La CCE mostró un aumento en la estabilidad estructural en comparación con la CCH, al tardar más del doble de tiempo en perder su conformación de hélice α a 450 K esto concuerda con los resultados de CDB en los que CCE muestra una mayor estabilidad térmica que CCH, con un aumento en la T_m de 11 °C. El análisis de la interfaz de los complejos identificó a un radio de corte de 3.0 Å que estos se mantienen unidos principalmente por la formación de puentes de hidrógeno e interacciones iónicas. Los valores de ΔC_p determinados a través de modelos semiempíricos de área superficial accesible al solvente son menos negativos que los determinados experimentalmente, lo que sugiere la posible fijación de moléculas de agua en la interfaz predominantemente de estos complejos. Asimismo, los valores de ΔH_U calculados con los modelos de área superficial son bastante más exotérmicos que los experimentales, lo que nos hace suponer que los coeficientes de proporcionalidad Δh_p y Δh_{ap} no son del todo adecuados para este tipo de complejos.

Capítulo 1
INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas

Todos los seres vivos están constituidos por células, las cuales deben el 50% de su peso seco a macromoléculas biológicas conocidas como “proteínas”. Las proteínas se forman a partir de un conjunto ubicuo de 20 moléculas orgánicas llamadas aminoácidos (AA), los cuales presentan una estructura común formada por un átomo central de carbono (C_{α}) unido a un grupo amino (NH_2), un ácido carboxílico ($COOH$), un átomo de hidrógeno (H) y a una cadena lateral de grupo variable que le confiere diferentes características fisicoquímicas a cada aminoácido.¹ Los aminoácidos se unen por enlaces peptídicos, formando largas cadenas, donde el conjunto de fuerzas atractivas y repulsivas creadas entre las cadenas laterales de los AA impulsan el plegamiento de la cadena en un espacio tridimensional. El proceso de plegado que equilibra todas las fuerzas generadas entre los AA descansa en una estructura tridimensional compacta que a primera vista parece un caótico amontonamiento de átomos, pero un análisis detallado revela una estructura compleja, organizada de manera jerárquica.^{1,2}

Como primer escalón de esta organización se encuentra la *estructura primaria*, que es la secuencia ordenada de aminoácidos formando una cadena polipeptídica. Esta cadena en ciertas regiones adopta formas simples, tales como hélices α , conformaciones β y giros, tales estructuras se denominan elementos secundarios y constituyen colectivamente la *estructura secundaria* que es el segundo nivel en la organización espacial de las proteínas. Los elementos secundarios que se dan de manera local y a lo largo de la cadena polipeptídica tienden a doblarse generando una estructura tridimensional compacta conocida como *estructura terciaria*, que es la forma biológicamente activa de la proteína y su alteración la vuelve parcial o totalmente inactiva, y a menudo se le conoce como la estructura nativa de la proteína.³

Estos tres niveles de organización estructural existen en todas las proteínas, aunque se pueden observar desviaciones en la estructura terciaria de algunas proteínas. Por ejemplo, las proteínas fibrosas tienden a adquirir una forma alargada, que incluye un arreglo de elementos secundarios, pero carece del pliegue tridimensional complejo característico. Adquirir la estructura terciaria puede ser común a la mayoría de las proteínas, pero no es necesariamente el último nivel de organización de éstas. Algunas proteínas incluyen más de una cadena. En tales casos, cada cadena se pliega por separado en una estructura terciaria, y luego se une a las otras para formar un complejo biológicamente activo. Este tipo de organización constituye el cuarto y último nivel de organización estructural, y se denomina *estructura cuaternaria*. En este sentido, cabe señalar que muchas proteínas tienden a interactuar

físicamente con otros miembros de su vía bioquímica. Sin embargo, estos complejos temporales no se consideran estructuras cuaternarias, ya que las proteínas individuales que los componen también son activas cuando se separan.

Por otro lado, la cadena de aminoácidos es el componente primario y central de la proteína, pero no necesariamente el único componente, algunas proteínas pueden incluir otros átomos o moléculas pequeñas, que son necesarias para su funcionamiento y/o estabilidad.^{2,3}

Las proteínas desempeñan un papel multifuncional por lo que son capaces de formar redes y complejos proteínicos en procesos celulares como la replicación, transcripción y traducción del ADN, el metabolismo del ARN, control del ciclo celular, metabolismo energético, transducción de señales, transporte de metabolitos, macromoléculas y otras sustancias tanto en el interior, como intercambio con el medio externo, desintoxicación, respuesta inmune, funciones estructurales como andamiaje celular (citoesqueleto y estructura de organelos), contracción muscular, ensamblado de membranas, etc.^{1,4}

1.2 Enzimas

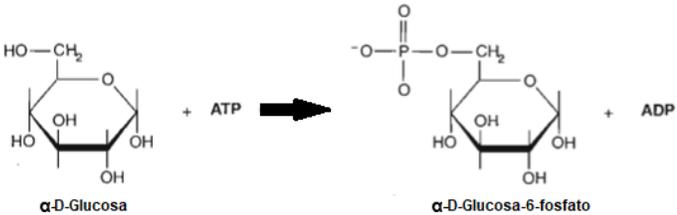
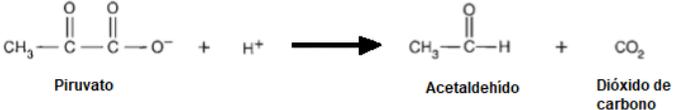
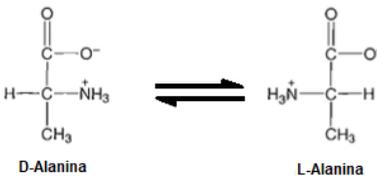
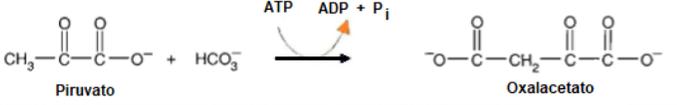
La velocidad con que se efectúan prácticamente todas las reacciones bioquímicas que ocurren en las células se debe a catalizadores proteínicos conocidos como enzimas. Las enzimas ayudan a disminuir la barrera energética requerida para que una reacción se lleve a cabo. Éstas son altamente específicas y la mayoría cataliza una sola reacción. Además, al trabajar a bajas concentraciones, no se altera el equilibrio de las reacciones. A diferencia de los catalizadores inorgánicos, cada clase de enzima cuenta con cavidades únicas donde unen al sustrato, denominada sitio activo. El sitio activo no solo une al sustrato, sino que varias de las cadenas laterales de los AA que se encuentran en este sitio participan de forma activa en el proceso catalítico.^{2,3}

La alta especificidad de las enzimas puede ser explicado por la complementariedad que existe entre las estructuras del sitio activo y el sustrato representado de manera sencilla por el modelo de llave-cerradura propuesto por Emil Fischer en 1894⁶, donde cada enzima se une a un único tipo de sustrato. Daniel Koshland⁷ propuso el modelo de ajuste inducido (1958), que toma en cuenta la flexibilidad de las proteínas, en éste las interacciones no covalentes entre la enzima y el sustrato modifican la estructura tridimensional del sitio activo, generando un rearrreglo del sitio con el sustrato, originando la conformación de un estado de transición.

En algunos casos la actividad catalítica requiere de cofactores para poder catalizar una reacción, estos cofactores pueden ser iones o moléculas orgánicas pequeñas denominadas coenzimas. Una actividad enzimática no regulada puede afectar el funcionamiento de las células y en humanos puede ocasionar afectaciones a la salud, es por eso, que los organismos controlan la actividad enzimática de forma directa, a través de la unión de activadores o inhibidores, o de manera indirecta, regulando la síntesis de la enzima.²

Una clasificación adecuada de las enzimas se dio gracias a la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, IUBMB, por sus siglas en inglés, la cual en 1964 estableció un comité para la nomenclatura de enzimas. Actualmente cada enzima se clasifica y se nombra según la reacción que cataliza de acuerdo con el esquema establecido por la comisión. En este esquema, a cada enzima se le asigna una clasificación de cuatro números precedido por las letras EC (Enzyme Commission) y un nombre con dos partes denominado nombre sistemático. Las enzimas están agrupadas en seis categorías que se resumen en la Tabla 1.1.^{5,8}

Tabla 1.1. Principales tipos de enzimas categorizadas según la reacción que catalizan.

Clase enzimática	Ejemplo	Reacción catalizada
Oxidorreductasa	Deshidrogenasa alcohólica	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{CH}_3\text{-CH=O} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Transferasa	Hexocinasa	 <p style="text-align: center;"> $\alpha\text{-D-Glucosa} + \text{ATP} \longrightarrow \alpha\text{-D-Glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$ </p>
Hidrolasa	Quimiotripsina	$\text{Polipéptido} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Péptidos}$
Liasa	Descarboxilasa de piruvato	 <p style="text-align: center;"> $\text{CH}_3\text{-C(=O)-C(=O)-O}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_3\text{-C(=O)-H} + \text{CO}_2$ </p> <p style="text-align: center;"> Piruvato Acetaldehído Dióxido de carbono </p>
Isomerasa	Racemasa de alanina	 <p style="text-align: center;"> $\text{D-Alanina} \rightleftharpoons \text{L-Alanina}$ </p>
Ligasa	Carboxilasa de piruvato	 <p style="text-align: center;"> $\text{CH}_3\text{-C(=O)-C(=O)-O}^- + \text{HCO}_3^- \xrightarrow{\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i} \text{Oxalacetato}$ </p>

1.2.1 Proteasas

Las proteasas pertenecen a las hidrolasas del grupo 3, subgrupo 4 (EC No. 3.4.). Son enzimas que se encargan de hidrolizar los enlaces peptídicos formados entre los AA, por lo que su actividad catalítica está implicada en varios procesos, como la digestión, activación de proenzimas y la apoptosis entre otros. Las proteasas son indispensables en los organismos vivos para la síntesis de las biomoléculas necesarias, para el control del tamaño, la forma, la rotación y la composición de las proteínas fundamentales, además la hidrólisis por proteasas es originadora de procesos biológicos como la replicación del ADN. En un principio las proteasas eran extraídas de fuentes animales y vegetales, en la actualidad los microbios aportan casi dos tercios de las proteasas comerciales disponibles en el mercado. Las proteasas representan alrededor del 60% de las enzimas utilizadas comercialmente, por lo que estas juegan un papel decisivo en diferentes sectores comerciales como el farmacéutico, analítico, diagnóstico y reducción de efluentes.^{9, 10}

Las proteasas pueden ser exopeptidasas o endopeptidasas dependiendo de su tipo de acción. Las exopeptidasas realizan su actividad enzimática únicamente en los extremos amino y carboxilo de la cadena polipeptídica, por lo que se clasifican en dos grupos, aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Las endopeptidasas causan la escisión en aminoácidos que no están en los extremos terminales y son clasificadas de acuerdo con el tipo de aminoácido encargado de la actividad catalítica, se conocen seis clases de endopeptidasas (i) proteasas cisteínicas, (ii) proteasas serínicas, (iii) treonina proteasas, (iv) glutámico proteasas, (v) proteasas aspárticas y (vi) metaloproteasas (Tabla 1.2).^{11,12}

Tabla 1.2. Principales tipos de proteasas. En la tabla se muestra la clasificación de acuerdo con la Enzyme Commission, así como un ejemplo de estas.

Proteasas	Clasificación	Residuo de AA en el sitio activo	Ejemplo
Proteasas Serínicas	EC 3.4.21	Ser, His	Carboxipeptidasa Y (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Proteasas Cisteínicas	EC 3.4.22	Cys	Papaína (<i>Carica papaya</i>)
Proteasas Aspárticas	EC 3.4.23	Asp, Tyr	Pepsina A (<i>Homo sapiens</i>)
Metaloproteasas	EC 3.4.24	Ion metálico	Termolisina (<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>)
Treonina proteasas	EC 3.4.25	Thr	HopB1 (<i>pseudomonas syringae</i>)
Endoproteasas (mecanismo catalítico desconocido)	EC 3.4.99	----	Colagenasa (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)

1.2.2 Proteasas cisteínicas

Las proteasas cisteínicas (PC) están presentes en todos los organismos vivos. Estas tienen funciones fundamentales en el procesamiento y catabolismo de proteínas, aunque se les ve involucradas en desórdenes metabólicos, el sistema nervioso y al encontrarse en diversos tejidos se piensa que desempeñan otras funciones. Hasta la fecha (consultado mayo 2019) se han descubierto 227 familias¹³ de las cuales casi la mitad pertenecen a virus.¹²

En 1937 se aisló y cristalizó por *Balls y col.*¹⁴ la primera PC, que provenía del látex del arbusto de papaya (*Carica papaya*), a la que se le dio el nombre papaína, razón por la cual a estas proteasas también se les conoce como tipo papaína.¹⁵ La papaína pertenece a la familia C1 de las PC, las cuales

son proteínas con un peso molecular que oscila entre los 21 y 30 kDa. Estas enzimas muestran su actividad hidrolítica más alta en el intervalo de pH 4.0 a pH 7.0. Las proteasas cisteínicas de la familia C1, se encuentran de manera abundante en las células y juegan un papel importante en procesos intracelulares tales como el catabolismo de proteínas y péptidos. Se sabe que una mala regulación de la actividad enzimática de estas proteasas en humanos es la causa de enfermedades como distrofia muscular y osteoporosis.¹⁶⁻¹⁸

El sitio catalítico de las PC está compuesto por una triada catalítica conformada por los residuos de AA: cisteína, histidina y asparagina. El residuo protonado de histidina, presente en el sitio activo funciona como donante de protones para el sustrato y mejora la nucleofilicidad del residuo de cisteína. El ataque nucleofílico del residuo de cisteína al carbono del enlace peptídico reactivo produce como primer intermediario un tioletéster tetraédrico en la reacción con liberación del fragmento amino terminal o amino del sustrato. Este intermediario se estabiliza por el enlace de hidrógeno entre el oxianión y un residuo de glutamina altamente conservado. Posteriormente, el enlace tioéster se hidroliza para producir un ácido carboxílico a partir del fragmento de sustrato restante (Figura 1.1).¹⁸

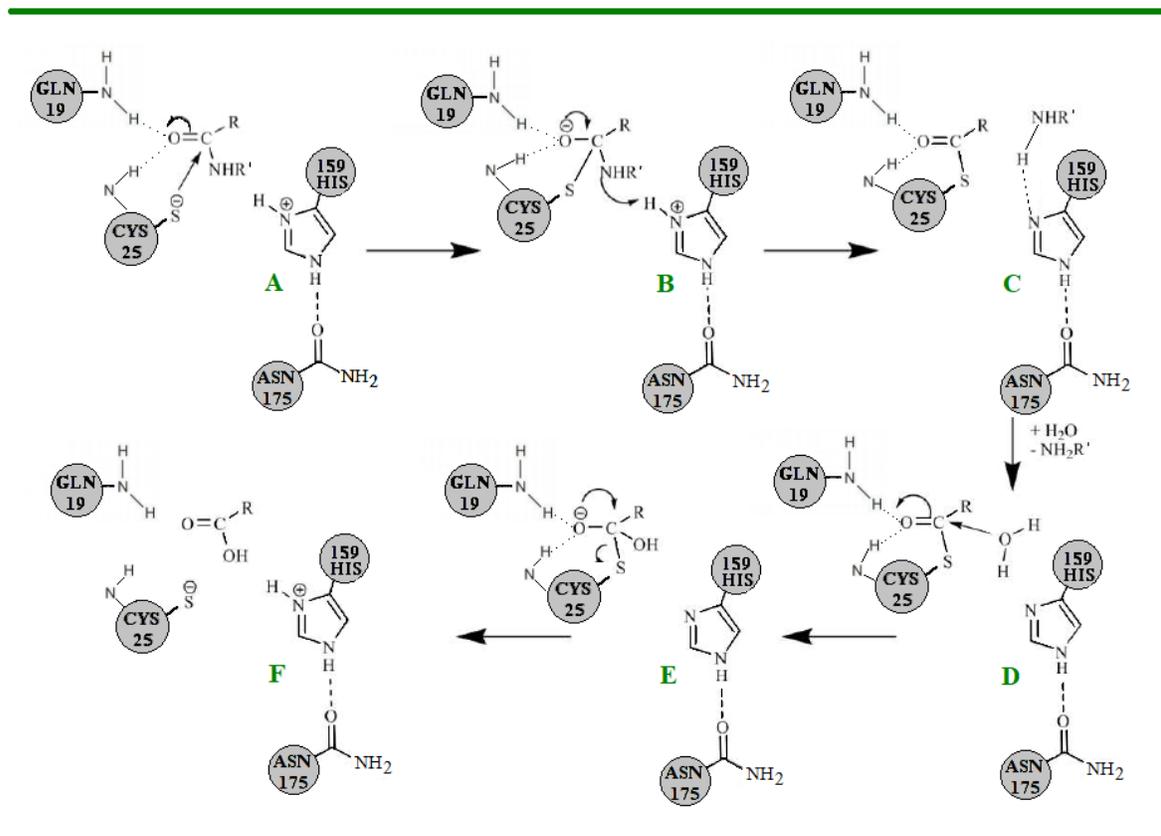


Figura. 1.1. Esquema del mecanismo de reacción de las proteasas cisteínicas utilizando el sitio activo de la papaína como ejemplo.¹⁸

Para prevenir la degradación de proteínas no deseadas, al igual que otras enzimas proteolíticas, las PC también se sintetizan como zimógenos. Los zimógenos de las PC cuentan con un dominio que bloquea el acceso del sustrato al sitio activo. Aunado a esta protección, las células cuentan con un amplio grupo de proteínas endógenas como inhibidores naturales tales como cistatinas, tiropinas y serpinas, entre otros, que se unen reversiblemente a PC.

Por otro lado, el análisis bioinformático del genoma humano revela que éste codifica para las catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, y W. Las catepsinas y otras PC de parásitos y virus pueden llegar a ser buenos objetivos para posibles tratamientos contra enfermedades como la artritis, la osteoporosis, el SIDA, las enfermedades relacionadas con la inmunidad, la aterosclerosis, el cáncer, y para una amplia variedad de enfermedades parasitarias como la malaria.^{19, 20}

1.3 Cistatinas

El primer inhibidor de PC que se caracterizó se aisló de la clara del huevo de pollo, el cual mostró inhibición para ficina, papaína y para catepsina B y C. A dicho inhibidor se le dio el nombre de cistatina. Posteriormente se aislaron inhibidores de varios tejidos y fluidos de humanos y animales, así como de plantas. Hoy en día las cistatinas constituyen el grupo más grande y mejor descrito de inhibidores competitivos reversibles de las proteasas cisteínicas pertenecientes a la familia C1. Estas se encuentran altamente distribuidas tanto en células animales como en células vegetales y su acción inhibitoria se registra intra- y extracelularmente. Las cistatinas protegen a las células de la acción no controlada de proteasas endógenas y exógenas ayudando así al correcto funcionamiento de las células.^{16, 17}

Las cistatinas pertenecen a una superfamilia compuesta por cuatro familias. La división se realizó de acuerdo con la similitud de la secuencia primaria, masas moleculares, el número de enlaces disulfuro y la localización subcelular (Tabla. 1.3).²⁰⁻²²

Tabla. 1.3. Superfamilia de las cistatinas. Como se aprecia en la tabla la superfamilia de las cistatinas se subdivide en cuatro familias diferentes por su masa molecular y la presencia de puentes disulfuro.²¹

Familia	Nombre	Características
1	Estefinas	Proteínas citosólicas que carecen de puentes disulfuros son de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos y tienen un peso aproximado de 11 kDa.
2	Cistatinas	Proteínas glicosiladas, cuentan con dos puentes disulfuro, están formadas por alrededor de 115 residuos de aminoácidos y su peso molecular va de los 11 kDa a los 24 kDa.
3	Cininógenos	Proteínas presentes en el plasma sanguíneo. Las hay de alto peso molecular ~120 kDa y bajo peso molecular ~ 68 kDa.
4	Fitocistatinas	Son inhibidores de PC presentes en las plantas, los cuales se dividen en dos grupos (dominio único y múltiple dominio).

Los inhibidores de PC pertenecientes a las familias 1 y 3 de los cuales se ha dilucidado su secuencia de AA contienen la región Gln-Val-Val-Ala-Gly, mientras para cistatinas de la familia 2 se han encontrado secuencias homólogas (por ejemplo, Gln-X-Val-Y-Gly).

La secuencia, Phe-Ala-Val, localizadas cerca del extremo carboxilo y los AA Phe-Tyr, cerca del amino terminal, se conservan entre la familia-2 pero generalmente están ausentes en las cistatinas de la familia-1 y la familia-3. Se ha encontrado que estas regiones de pentapéptidos y dipéptidos son importantes para la unión a proteasas cisteínicas, en especial la región del amino terminal, la cual se ha reportado contribuye con el 40 % de la energía libre correspondiente a la unión.^{23, 24}

Capítulo 2
ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 Quimopapaína

La papaína junto a la quimopapaína, la caricaína y la glicil-endopeptidasa son PC extracelulares secretadas por el látex del arbusto tropical *Carica papaya L.* Una característica de las endopeptidasas presentes en el látex del árbol de papaya es que cuentan con puntos isoeléctricos diferentes lo que permite separar a estas PC en una cromatografía de intercambio iónico.^{26, 27}

La quimopapaína es el único miembro de la familia C1 que presenta dos formas denominadas A y B, ambas formas son inmunológicamente indistinguibles además de tener secuencias de aminoácidos idénticas. Sin embargo, las dos formas difieren en su reactividad y en sus puntos isoeléctricos; 10.2 para la forma A y 10.4 para la forma B.²⁸ La quimopapaína cuenta con 218 residuos de aminoácidos, tres puentes disulfuros y tiene una masa molecular de 23.7 kDa. La estructura cristalográfica la determinaron por Maes y col.²⁹ en 1996 empleando la difracción de rayos X, se encuentra depositada en el banco de datos de proteínas (PDB: Protein Data Bank) con el código 1YAL.³⁰ La quimopapaína muestra una cadena con dos dominios estructurales, uno compuesto en su mayoría por hélices α y el otro de hebras β antiparalelas (Figura 2.1). La quimopapaína cuenta una triada catalítica de aminoácidos compuesta por la Cys25, His159 y Asn179, los cuales se ubican en la hendidura del interdominio.²⁷⁻²⁹

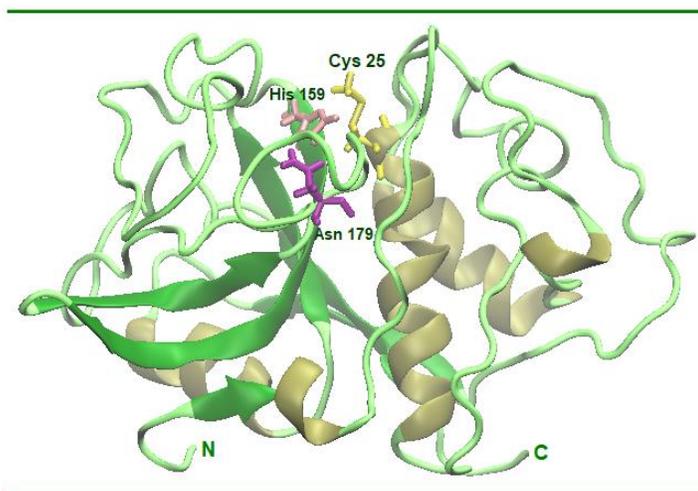


Figura 2.1. Estructura cristalográfica de la quimopapaína (PDB: 1YAL). La representación de la estructura se realizó con el software VMD (*Visual Molecular Dynamics*)³¹.

2.2 Cistatina C humana

La cistatina C humana (CCH) es una proteína de baja masa molar cuyo estudio ha despertado un interés creciente desde que demostraron que su concentración en suero presentaba una correlación negativa con la tasa de filtrado glomerular, además se ha encontrado que en procesos fisiopatológicos la cistatina C se codeposita en placas amiloides relacionadas con la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down. Las propiedades amiloidogénicas de la cistatina C se presentan en mayor intensidad con la variante L68Q, dando como resultado la angiopatía amiloide cerebral en adultos jóvenes.³²⁻³⁴

Hasta la fecha en todas las estructuras cristalinas de la cistatina C humana resueltas para la proteína nativa, se ha encontrado a la CCH formando un dímero a través del mecanismo de intercambio de dominios, sin embargo, Nilsson *et al.* 2004³⁵ diseñaron un monómero resistente a la formación del dímero, introduciendo un puente disulfuro formado por los residuos 47 y 69 de su secuencia de AA, esto al mutar la leucina 47 y la glicina 69, por cisteínas (L47C y G69C). Esta cistatina C humana estabilizada (CCE) redujo drásticamente la formación del dímero, así como de las fibrillas presentes en altas concentraciones de proteína, pero la acción inhibitoria hacia proteasas cisteínicas permanece inalterada. La estructura cristalográfica resuelta para el monómero de la cistatina C humana mutada confirmó el éxito en el diseño del par de mutaciones puntuales para abolir la formación del dímero y en consecuencia la formación de fibrillas.^{35,36}

La cistatina C humana se distingue del resto de las cistatinas por el hecho de sintetizarse en todas las células nucleadas del organismo. La cistatina C humana presenta las regiones características **QICAG** y **PW**, localizadas en las asas A1 y A2 respectivamente (Figura 2.2), mientras que su masa molecular es de 13.4 kDa. La CCH consta de una sola cadena polipeptídica, producto de un gen de 7.3 kbp situado en el cromosoma 20 y se sintetiza como un segmento peptídico adicional. En su estado maduro y funcional tiene 120 residuos de AA, no está glicosilada y contiene dos puentes disulfuro entre los residuos 73 – 83 y 97 – 117.^{17,37}

La estructura tridimensional estabilizada mediante un puente disulfuro a través de las mutaciones puntuales **L47C** y **G69C**, se determinó por difracción de rayos X en 2010 por R. Kolodziejck y *col.*³⁸ Esta consiste básicamente de cinco hebras que forman una hoja β antiparalela, la cual se tuerce al abrazar una hélice α de cinco giros (Figura 2.2).

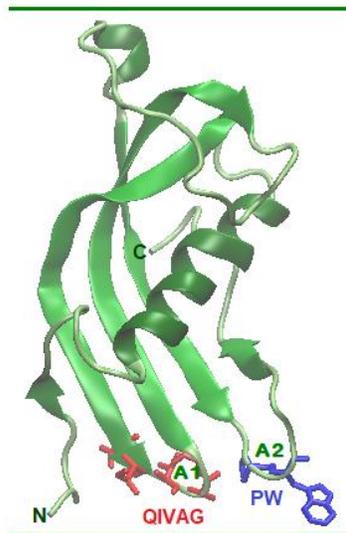


Figura 2.2. Visualización de la estructura cristalográfica de la cistatina C humana estabilizada (PDB: 3GAX), generada en VMD. Los residuos de aminoácidos característicos del asa A1 se encuentran resaltados en rojo, mientras que los aminoácidos característicos del asa A2 se resaltan en azul. El conjunto de estos residuos junto con el extremo N- son las regiones importantes en la inhibición de la PC de la familia C1.

2.3 Interacciones proteína – proteína

Las interacciones proteína-proteína (IPP) desempeñan un papel fundamental para que el funcionamiento biológico de las células sea óptimo. El avance en la genómica ha hecho más evidente la importancia de dichas interacciones, se ha encontrado que la mayoría de las vías catalíticas y de regulación funcionan como redes, con una frecuente y extensa participación de proteínas en las vías de señalización, retroalimentación y diafonía. Por otro lado, procesos como la replicación, transcripción, traducción, la transducción de señales, el tráfico de proteínas y su degradación están hechos por complejos proteicos los cuales se pueden ensamblar, o separar, según lo requieran. A menudo estas interacciones se dan por el reconocimiento de dominios entre las proteínas que los constituyen. El mal funcionamiento en el reconocimiento molecular de IPP está relacionado a condiciones patológicas como el cáncer, la inflamación, enfermedades autoinmunes, diabetes, osteoporosis e infecciones, generando así blancos definidos para el desarrollo de fármacos.^{39, 40}

La afinidad del reconocimiento entre proteínas presenta una amplia gama de valores, con constantes de disociación que van del orden picomolar a micromolar, esta variación también se da en la entalpía y entropía asociadas a la unión, lo que refleja la magnitud y naturaleza de los cambios estructurales, que se dan en la formación de un complejo. Por ejemplo, la unión de proteínas con dominios

intrínsecamente desordenados se asocia generalmente a entalpías favorables de unión y por igual a entropías desfavorables de unión, esto debido a los cambios en el plegamiento y estructuración de los dominios desordenados.^{41, 42}

2.4 Importancia del estudio de las proteasas cisteínicas y sus inhibidores naturales.

El conocimiento detallado del mecanismo de inhibición, así como de las interacciones generadas al formarse un complejo **PC – cistatina** es muy importante debido a las implicaciones que esto puede llegar a tener en aplicaciones en las áreas de medicina y biotecnología. En la literatura especializada existen un sin número de evidencias que involucran tanto a las PC como a las cistatinas con diversas afectaciones a la salud, así como en procesos industriales. Muchos estudios han señalado que las PC lisosomales como las catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V y W se ven reguladas principalmente por cistatinas. Estos estudios sitúan a los inhibidores de las proteasas cisteínicas en el tratamiento de artritis, arteriosclerosis, Alzheimer, diabetes, inflamación, pancreatitis, cáncer y metástasis, así como en trastornos del hígado, pulmón, corazón, riñón y músculos.^{43, 44}

La cistatina C humana inhibe a las proteasas cisteínicas tipo papaína, así como a las catepsinas que son algunos de sus blancos naturales. La unión a éstas, muestra un amplio rango de afinidades, con constantes de unión K_U que oscilan entre 10^6 y 10^{14} M^{-1} .^{23, 50} La calorimetría de titulación isotérmica (CTI) ha sido poco empleada y esta podría aportar valores para los parámetros termodinámicos de unión (ΔH_U , ΔS_U , ΔG_U , K_U) de manera directa en un solo experimento. Mas aún la disección de la energía libre de unión ΔG_U en sus componentes entálpicos y entrópicos, junto con los cambios estructurales producidos durante la asociación, podría permitirnos comprender mejor las bases moleculares de la afinidad. Cabe mencionar que no es posible medir la termodinámica de unión de complejos de alta afinidad ($K_U > 10^8 \text{ M}^{-1}$) mediante titulación directa. Así mismo, la caracterización de la unión de CCH a una proteasa cuya afinidad podría determinarse por titulación directa es un primer paso necesario.

Capítulo 3
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La cistatina C humana silvestre y su versión estabilizada por las mutaciones puntuales L47C y G69C se unirán a la quimopapaína (carboximetilada en su -SH catalítico), con una afinidad moderada presentando $K_U < 10^8 \text{ M}^{-1}$, por lo que se podrán obtener los parámetros termodinámicos de unión: K_U , ΔH_U , $T\Delta S_U$ y ΔG_U , así como el número de sitios de unión (n), de forma directa por calorimetría de titulación isotérmica (CTI) convencional.

3.2 Objetivo General

Determinar las propiedades termodinámicas de la unión de la quimopapaína carboximetilada con la cistatina C humana, en su versión silvestre y su mutante L47C/G69C, y correlacionarlas con los rearrreglos estructurales producidos durante la asociación.

3.3 Objetivos Particulares

- Construir y purificar la cistatina C humana L47C/G69C.
- Evaluar la estabilidad estructural de la cistatina C humana y de la mutante L47C/G69C
- Determinar las funciones termodinámicas de la formación de los complejos cmQ-CCH y cmQ-CCE: ΔG_U , ΔH_U , ΔS_U y ΔC_p a pH 7.0 a través de calorimetría de titulación isotérmica (CTI).
- Obtener un modelo estructural del complejo cistatina C humana - quimopapaína, a partir de las estructuras individuales, utilizando herramientas computacionales.
- Aportar nuevos datos para los modelos que correlacionan la extensión de las áreas superficiales del contacto bimolecular con la energética de unión.

Capítulo 4
MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Mutagénesis de sitio dirigido

La mutagénesis de sitio dirigido es una poderosa herramienta de biología molecular que permite crear mutaciones puntuales en una cadena de ADN, teniendo como requisito indispensable el conocimiento previo de la secuencia de ADN que se piensa mutar. El proceso, en primer lugar, requiere de un oligonucleótido complementario al ADN uncatenario que contenga el gen de interés y empleando una ADN polimerasa, se elonga la cadena incorporando la mutación al ADN y formando una molécula de ADN completa bicatenaria. Dicha doble cadena de ADN puede ser introducida en una célula hospedadora y ser clonada.⁴⁵

Para abatir la propensión de la CCH a formar oligómeros se construyó la mutante L47C/G69C de acuerdo con el trabajo de *Nilsson y col. 2004*.³⁵ Basándose en el gen que codifica para CCH se mandaron construir los oligonucleótidos (5'-CCATTCTCGTGC GTGCAGGTGGTTCG-3') y (5'-GGACGTCGAACTGTGTCGTACCACGTGC-3') con los codones convenientes para generar las mutaciones puntuales L47C y G69C mismas que se efectuaron en el vector de expresión pET-24a(+)-HCC. Las mutaciones se llevaron a cabo en dos etapas, descritas más adelante.

4.1.1 Mutación puntual L47C

La mutación puntual L47C se obtuvo por mutagénesis dirigida, empleando el kit comercial “*QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*”,⁴⁶ y el oligonucleótido correspondiente. Este proceso se llevó a cabo en un termociclador marca GeneAmp PCR system 9690 programado con 16 ciclos según las temperaturas de la Tabla 4.1, más 7.0 min. extras de extensión. El producto de la mutagénesis se digirió con la enzima de restricción Dpn I a 37 °C durante 1 hora para eliminar el DNA súper enrollado y el no mutado.

Posterior a esto se transformaron células competentes de la cepa comercial XL1-blue de *Escherichia coli*, con el plásmido pET-24a(+)-L47C proveniente de la mutagénesis. Para esto se utilizó el kit comercial “*Transform & Grow™ Bacterial Transformation Kit*”.⁴⁷ Las células transformadas se inocularon en agar con medio de cultivo Luria – Bertani (LB) y un contenido de tetraciclina de 10 µg/mL y 25 µg/mL de kanamicina. Las bacterias se dejaron crecer durante la noche a 37 °C. Se seleccionaron 5 clones una vez que crecieron las colonias, los cuales se incubaron en 1mL de medio LB y un contenido 25 µg/mL de kanamicina; estas se dejaron crecer durante 16 horas a 37 °C con una agitación constante de 220 rpm.

El pET-24a(+)-L47C se extrajo de los cinco clones estudiados mediante el método de lisis alcalina (miniprep), empleando el kit comercial “QIAprep Spin Miniprep Kit Protocolo”,⁴⁸ de los cuales se obtuvo la secuencia de nucleótidos por el Laboratorio Divisional de Biología Molecular (LDBM) perteneciente a la división de CBS de UAM-I, para asegurar el éxito de la mutación L47C y así poder continuar con la segunda etapa.

4.1.2 Mutación puntual G69C

La mutación puntual G69C se introdujo en el vector pET-24a(+)-L47C, utilizando los oligonucleótidos destinados para este fin. Las etapas experimentales se realizaron en el mismo orden y bajo las mismas condiciones que sus equivalentes en la mutación L47C. Se obtuvo la secuencia de nucleótidos del plásmido pET-24a(+)-CCE recuperado de 5 clones estudiados en esta etapa para verificar el éxito en las mutaciones deseadas.

Tabla 4.1. Programa de temperaturas y duración de cada etapa en un ciclo de mutagénesis, empleado en la construcción de la cistatina C estabilizada. Los experimentos de mutagénesis se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR system 9700.

TEMPERATURA (° C)	TIEMPO (min)	ETAPA
95	0.5	Desnaturalización Preparativa
95	0.5	Desnaturalización
55	0.5	Alineamiento
68	6.0	Extensión
68	7.0	Extensión Final
Número de ciclos		16

4.1.3 Expresión de la Cistatina C humana silvestre y estabilizada

El crecimiento exponencial de las bacterias (*E. coli*) hace que su uso en la recombinación de genes sea muy atractivo para la expresión a gran escala de proteínas ajenas a estos organismos. La producción de proteínas en bacteria sigue básicamente 3 etapas: crecimiento, extracción y purificación. En el presente trabajo se construyeron las proteínas recombinantes a partir del gen que codifica para la cistatina C humana. Para esto células de la cepa *SHuffle T7 Express lysY C3030H* de

Escherichia coli se transformaron con el vector de expresión pET-24a(+)-CCE, seguido a esto se crecieron en agar con medio LB y 30 µg/mL de kanamicina de concentración final (CF). Las colonias de células se dejaron crecer durante 16 horas a 30 °C; una vez que las colonias alcanzaron un tamaño de aproximadamente 2 mm, se escogieron 5, las cuales se picaron con la técnica de palillo para su crecimiento por separado durante 16 horas en 5mL de medio LB con una concentración de 30 µg/mL de kanamicina a 30 °C con una agitación constante de 220 rpm, la su densidad óptica (DO) se monitoreo a una longitud de onda de 600 nm hasta que esta estuvo en el intervalo de 0.4–0.8 UA para inducir la sobreexpresión con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.4 mM de CF. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 5600 rpm por 20 min. a 4 °C, el precipitado se resuspendió en amortiguador de Tris 40 mM, NaCl 0.05 M, EDTA 1 mM, a pH 8.0, agregando fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, seguido a esto se lisaron las células al sonicar 2 min por 1 min de descanso, repitiendo el procedimiento tres veces en un equipo Branson Ultrasonics SONIFIER 450. El lisado se centrifugó a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante.

4.2 Purificación de los inhibidores

Para el cultivo bacteriano se realizó un escalamiento de 1 a 100, para esto 300 mL de medio LB colocados en matraces de 2 L, con kanamicina 30 µg/mL de CF, se inocularon con 3 mL de un primer crecimiento. A dichos escalamientos se le siguió su DO a una longitud de onda de 600 nm. Una vez que se alcanzó la DO deseada se indujo la sobreexpresión con IPTG 0.4 mM de CF, manteniendo el cultivo a las mismas condiciones de temperatura y agitación por cuatro horas más.

Los inhibidores CCH y CCE se purificaron del caldo integro producido en este proceso, el cual se centrifugó a 5600 rpm por 20 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en amortiguador Tris 40 mM, NaCl 0.05 M, EDTA 1 mM a pH 8.0. A las células se les agregó PMSF 1 mM de CF fresco para proteger las proteínas de su digestión por proteasas. Enseguida se realizó el lisado celular según lo mencionado en la sección anterior.

Ambas proteínas se purificaron del sobrenadante correspondiente, en tres etapas de cromatografía; la primera de filtración en gel a pH 9.3 en una columna preparativa Superdex 200 HiLoad 16/60 GE con amortiguador de glicina 50 mM y 30 mM de NaCl, (Figura 5.3). La fracción recolectada en la primera etapa de cromatografía se sometió a una diálisis contra amortiguador Tris 40 mM pH 8.8 en membrana de celulosa con un corte molecular de 6-8 kDa realizando un cambio de amortiguador, dejando equilibrar al menos 5 horas. A la muestra ya equilibrada se le realizó una cromatografía de intercambio aniónico empleando un amortiguador Tris 40 mM, pH 8.8, en una columna DEAE sephadex A-50.

En esta cromatografía se recolectó la fracción que no interacciona con la matriz de la columna (Figura 5.4). Por otro lado, las proteínas atrapadas en la matriz se eluyeron en amortiguador Tris 40 mM con 0.6 M NaCl a pH 8.8. Por último, la fracción recolectada en la segunda etapa se sometió a una cromatografía de exclusión molecular (CEM), eluyendo la muestra por una columna empacada con resina Sephacryl S-200 y repitiendo las condiciones empleadas en la primera cromatografía (Figura 5.5). Todas las columnas se montaron en un equipo FPLC ÄKTA prime plus (*Fast Protein Liquid Chromatography*), marca GE. Las fracciones recolectadas en cada etapa se concentraron por ultrafiltración en un sistema AMICON empleando una membrana de corte molecular de 5 kDa, y previo a cada cromatografía las muestras se filtraron con acrodiscos de 0.2 μm .

4.2.1 Prueba de la formación del puente disulfuro entre los residuos C47 – C69

Para verificar que se está formando el enlace disulfuro entre los residuos de cisteína C47 y C69 introducidos, se empleó la espectrometría de masas que es una técnica ampliamente utilizada para determinar la masa molecular de diversas sustancias químicas por medio de la obtención de iones a partir de la sustancia problema en fase gaseosa los cuales se separan de acuerdo con su masa y carga. En este trabajo, se utilizaron tres alícuotas equivalentes de la proteína recombinante CCE y una alícuota de CCH. Todas las muestras se secaron por centrifugación a vacío y redisueltas en 10 μl de HEPES 50 mM, pH9.0, con cloruro de guanidinio 5M y 1mM de EDTA para ser desnaturalizadas a 85 °C durante 15 min en un agitador con temperatura controlada. La muestra de CCH y una alícuota de CCE se utilizaron para determinar su masa molecular (M_{CCH} y M_{CCE}), por lo que no se sometieron a tratamientos posteriores. A una de las muestras restantes se le adiciono un grupo alquilo al añadirsele iodoacetamida alcanzando una CF de 10 mM, la reacción se llevó acabo a 25°C y en oscuridad durante 1 hora. Con la muestra alquilada (M_{ALQ}) se determinó si la proteína tiene cisteínas libres, por último, la alícuota restante se redujo con 10 mM de DL-ditiotreitol (DTT) durante 15 min. a 80°C, mientras que los grupos sulfhidrilos se bloquearon con iodoacetamida 25 mM de concentración final, esto durante 1 hora a temperatura ambiente. De esta muestra se obtuvo la masa de la proteína reducida y alquilada, ($M_{\text{RED+ALQ}}$). Una vez obtenidas las tres muestras estas se purificaron utilizando pipetas Zip-Tip C18 previamente activadas y equilibradas, las proteínas libres de sales se eluyeron en una mezcla de acetonitrilo al 70 % y ácido trifluoroacético 0.1 %. La masa de las alícuotas se determinó en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas (LDEM) empleando la técnica *MALDI-TOF* (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*) en un espectrómetro marca Bruker, modelo AutoFlex Speed TOF/TOF.

El cálculo de los grupos sulfhidrilos reactivos, así como el número de puentes disulfuro se realizó según lo reportado por *Calvete y col.* en 2007.⁴⁹ El número de grupos sulfhidrilos reactivos se calculó empleando la ecuación 1.

$$N_{SH} = \left(\frac{M_{ALQ} - M_{CCE}}{M_{CAM}} \right) \quad (\text{Ec.1})$$

Donde N_{SH} representa el número de sulfhidrilos reactivos, M_{ALQ} la masa de la CCE no reducida en presencia de reactivo alquilante, M_{CCE} masa de la CCE y $M_{CAM} = 57.1$ Da, que representa el incremento en la masa por la carbamidometilación de un -SH con iodoacetamida.

Por otro lado, el número total de cisteínas se determinó de acuerdo con la ecuación 2.

$$N_{Cys} = \left[\frac{(M_{RED+ALQ}) - M_{ALQ}}{(M_{CAM} + 1)} \right] + N_{SH} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde N_{Cys} representa el número total de cisteínas y $M_{RED+ALQ}$ es la masa de la CCE reducida y carbamidometilada. El número de puentes disulfuro se determinó por la ecuación 3.

$$N_{PD} = \frac{N_{Cys} - N_{SH}}{2} \quad (\text{Ec.3})$$

Donde N_{PD} representa el número de puentes disulfuro presentes en la proteína.

4.3 Carboximetilación y purificación de la quimopapaína.

La quimopapaína se purificó a partir de un extracto comercial de la marca SIGMA S452815 (Lot. 124F80751). Para esto se pesaron 100 mg los cuales se disolvieron en 50 mL de amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM pH 7.0 en presencia de cisteína 20 mM para activar la enzima, la mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Mientras que la autohidrólisis de la proteasa se evitó por el bloqueo de su sitio catalítico al agregar ácido iodoacético hasta alcanzar una CF de 30 mM, lo que inactivó a la proteasa al formar el derivado carboximetilado de la cisteína catalítica (Cys 25) y de la Cys 117. La reacción se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Para eliminar el exceso de ácido iodoacético la muestra se dializó en una membrana de celulosa con un corte molecular de 14 kDa contra amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM pH 7.0, realizando dos cambios de amortiguador.^{26, 27}

La carboximetil-Quimopapaína (cmQ) libre de sales se filtró con acrodiscos de 0.2 μm y se le aplicó una cromatografía de intercambio catiónico en una columna Mono S 5/50 GL(GE) montada en el equipo FPLC ÄKTA prime plus. La muestra se eluyó con amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM

pH 7.0 estableciendo un gradiente lineal de 0 a 60 % con amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM con NaCl 1.0 M a pH 7.0 para despegar la muestra de la matriz de la columna. La muestra de cmQ recolectada en la primera cromatografía se dializó contra amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.0 y se sometió a una segunda cromatografía bajo las mismas condiciones que la primera.

La concentración de proteína se determinó al medir la señal de absorbancia a 280 nm en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando un coeficiente de absortividad molar extinción (ϵ) de $11100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tanto para CCE como para CCH, mientras que para cmQ se utilizó un ϵ de $51000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para alimentar el software implementado en el equipo.

4.4 Propiedades Espectroscópicas de CCH, CCE y cmQ

4.4.1 Dicroísmo Circular (DC)

Para evaluar la estructura terciaria de las proteínas recombinantes CCH y CCE, así como de la cmQ, se obtuvieron sus espectros de dicroísmo circular (DC) en la región ultravioleta (UV) de 190 a 250 nm. Esta es una técnica espectroscópica basada en la diferencia de absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y la derecha que nos da información sobre la estructura secundaria de proteínas. En proteínas la actividad óptica es debida a los enlaces peptídicos en el ultravioleta (UV) lejano (180 – 250 nm) y por la asimetría en la densidad electrónica de los aminoácidos aromáticos en el UV cercano (250 – 300 nm). Los espectros de DC se obtuvieron a 25 °C en un espectropolarímetro Jasco J715 utilizando una celda de 0.10 cm, mientras que el espectro correspondiente al amortiguador se utilizó como blanco. Para esto, las muestras de CCH y CCE se dializaron contra un tampón de fosfato 10 mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 7.0, y sus concentraciones se ajustaron a 0.10 mg/mL; la muestra correspondiente a cmQ se trató de igual forma previo a la obtención de su espectro de dicroísmo circular.

4.4.2 Fluorescencia (espectros de emisión)

La fluorescencia es un método espectroscópico extensamente utilizado en el estudio de la estructura, actividad y función de las proteínas debido a la fluorescencia intrínseca, la cual se debe principalmente por los aminoácidos aromáticos en especial los triptófanos presentes en la cadena de aminoácidos.

Previo a obtener los espectros de emisión, las proteínas se dializaron contra amortiguador de fosfatos de sodio 10 mM a pH 7.0, en una membrana de celulosa con un corte molecular de 6-8 kDa en el caso de CCH y CCE, mientras que para cmQ se utilizó un corte de 12-14 kDa. Todas las muestras se

filtraron a través de membranas con un poro de 0.22 μm . Los espectros de emisión de fluorescencia se determinaron en un espectrofluorómetro ISS K2 (Urbana USA) equipado con un sistema de control de temperatura tipo peltier en una celda de 1 cm de paso óptico a 25 °C, excitando a una longitud de onda (λ) de 280 nm mientras que la emisión se registró de 300 a 400 nm. Las muestras se prepararon a una concentración de 0.10 mg/mL.

4.5 Pruebas de resistencia a la formación de oligómeros

4.5.1 Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se empleó para evaluar el estado de oligomerización de la CCH. Para esto, tanto la solución de CCH como las de CCE se dializaron en membranas con un corte molecular de 6-8 kDa frente a un tampón de fosfato de 20 mM con 100 mM de NaCl, pH 7.0 y se filtraron a través de membranas con un tamaño de poro de 0.22 μm . Se prepararon soluciones con dos concentraciones de proteínas, 0.20 y 0.40 mg/mL, para ambos inhibidores. Las alícuotas de ambas proteínas a 0.40 mg/mL se incubaron a 65 °C durante 45 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Las muestras se cargaron en una columna Superdex 75 HR 10/30 previamente equilibrada con un tampón de fosfato de 20 mM con 100 mM NaCl, pH 7.0, con un caudal de 0.75 ml/min utilizando un sistema FPLC ÄKTA.

4.5.2 Dispersión dinámica de luz

Para evaluar si las proteínas recombinantes CCH y CCE presentaban la formación de oligómeros, las muestras de ambas proteínas se analizaron por dispersión dinámica de luz (DDL), que es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y distribución de tamaños de partículas en suspensión, o macromoléculas en solución, tales como proteínas y polímeros. Esta técnica se basa en el movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión que hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein.

El análisis por dispersión dinámica de luz (DDL) de soluciones de CCH y CCE se realizó a 25, 35, 50 y 65 °C utilizando un equipo Zetasizer NANO (Malvern, Reino Unido) equipado con control de temperatura. Las proteínas se dializaron previamente contra un tampón de fosfato 20 mM con NaCl

56 mM, pH 7.0 y se filtraron a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.1 μm . Las muestras se ajustaron a una concentración de 0.40 mg/mL. Antes de las mediciones de DDL, las muestras se equilibraron durante 3 minutos a cada temperatura deseada. Se realizaron al menos tres réplicas de cada muestra con múltiples adquisiciones de datos (≥ 10).

4.6 Estudio calorimétrico

4.6.1 Calorimetría diferencial de barrido

La desnaturalización térmica de la CCH y la CCE se siguió por calorimetría diferencial de barrido (CDB) que es una técnica que nos permite caracterizar la estabilidad de una proteína directamente en su forma nativa, a través del análisis del primer calentamiento. Para esto ambas proteínas se dializaron contra amortiguador de fosfatos de sodio 20 mM más NaCl 60 mM a pH 7.0, en membranas de celulosa con un corte molecular de 6-8 kDa realizando un cambio de amortiguador a las 5 h. Una vez equilibradas las muestras en el amortiguador de trabajo, estas se filtraron a través de una membrana de 0.2 μm y se llevaron a una concentración de 0.40 mg/mL. Las soluciones de proteína se desgasificaron con agitación al vacío, al igual que el amortiguador de fin de diálisis que se usó como referencia. Para el experimento tanto la celda de muestra como la de referencia se llenaron con 0.1 mL de solución. Mientras que el barrido térmico se realizó a una velocidad de calentamiento de 90 K/h en el intervalo de 15 $^{\circ}\text{C}$ a 110 $^{\circ}\text{C}$ en un calorímetro capilar VP-DSC (GE Healthcare) automatizado. Los datos obtenidos se analizaron empleando el software desarrollado por Microcal implementado en Origin 7 (OriginLab, Northampton, MA). Se utilizó el "non 2 state model", que es un modelo de dos estados que diferencia la entalpía calorimétrica (ΔH_{cal}) de la entalpía de van't Hoff (ΔH_{vH}), para el análisis de los datos.⁵¹

4.6.2 Calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica (CTI), es la técnica idónea para caracterizar termodinámicamente la formación de cualquier complejo molecular. En los experimentos de CTI se puede medir de manera directa el calor involucrado de una interacción intermolecular, por lo que se obtienen los parámetros termodinámicos K_U , ΔH_U , así como el número de sitios de unión (n) en un mismo experimento, mientras que el $T\Delta S_U$ y ΔG_U los podemos calcular a partir de la K_U con la siguiente ecuación.⁵²

$$\Delta G_U = -RT \ln K_U = \Delta H_U - T\Delta S_U \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde R representa la constante universal de los gases igual a 8.314 J/ K mol y T es la temperatura expresada en kelvin a la cual se realizó la titulación.

Previamente a los experimentos de CTI los componentes (CCH/CCE y la cmQ) se equilibraron al mismo tiempo en amortiguador de fosfatos de sodio 10 mM más NaCl 78 mM para fijar una fuerza iónica constante a 0.1 M, mediante una diálisis contra 200 volúmenes de amortiguador en membrana de celulosa con un corte molecular de 6-8 kDa, realizando un cambio de amortiguador a las 5 hrs. Una vez equilibradas las muestras se filtraron con acrodiscos de 0.2 µm y se llevaron a la concentración de 0.135 mM y 0.025 mM respectivamente en tubos tipo Amicon de 0.5 mL con un corte molecular de 10 kDa. Las muestras ya en la concentración deseada se desgasificaron con agitación al vacío.

Para las titulaciones isotérmicas la celda de muestra del calorímetro (MicroCal ITC₂₀₀ marca GE) se cargó con 200 µL de CCH o cmQ mientras que la jeringa se llenó con 40 µL de cmQ o CCE, según el caso, la titulación se realizó siguiendo el programa de inyecciones de acuerdo con la distribución de la Tabla 4.2 de las cuales la primera es para tener solución fresca en la punta de la jeringa. Las inyecciones tuvieron un intervalo de 210 s entre cada una, mientras que la agitación se mantuvo constante a 300 rpm. Las isotermas se analizaron por medio de una regresión no lineal empleando el modelo de un sitio de unión de Wiseman *et. al.* 1989,⁵³ adecuado al modelo de sitios de unión idénticos e independientes,⁵⁴ mostrado en la ecuación 5. Dicha regresión se realizó con los datos normalizados, en el software Wolfram Mathematica 10 (www.wolfram.com). Para determinar el ΔC_P se realizaron experimentos a distintas temperaturas (10 °C, 15 °C, 25 °C y 35 °C) dado que éste se puede obtener al derivar la entalpia respecto la temperatura.

$$\frac{1}{V_0} \left(\frac{dQ}{dX_{tot}} \right) = \Delta H_u \left[\frac{1}{2n} + \frac{n - ((n+r)/2 - (X_r/2))}{((X_r^2 - 2X_r(n-r) + (n+r)^2)^{1/2}} \right] \quad (\text{Ec.5})$$

dónde $X_r = [I_{tot}]/[E_{tot}]$ y $r = 1/[E_{tot}] \cdot K_U$, aquí I_{tot} es la concentración total de inhibidor, E_{tot} es la concentración total de la enzima, mientras V_0 es el volumen de la celda de reacción, Q el calor absorbido o liberado y n es número de sitios de unión.

Tabla 4.2. Programa de volumen de inyección establecido para los experimentos de CTI. La tabla expone la distribución de los volúmenes de inyección empleado en cada sistema.

cmQ – CCE		cmQ – CCH	
Núm. de inyección	Vol. de inyección (µL)	Núm. de inyección	Vol. de inyección (µL)
1	0.2	1	0.3
2-8	1.4	2-5	1.0
9-15	2.0	6-10	2.5
16-21	2.5	11-18	3.0

4.7 Modelado computacional

4.7.1 Modelado de la cistatina C humana.

Partiendo de la estructura cristalográfica del monómero estabilizado de cistatina C humana cuyo archivo PDB es 3GAX³⁸, se modeló a la cistatina C humana silvestre, al cambiar la Cys47 y Cys69 por Leu y Gly, respectivamente. Además, al obtener experimentalmente ambos inhibidores truncados en su extremo amino terminal en la arginina 8, y siendo que la estructura cristalográfica depositada en el PDB se encuentra truncada en la Gly11, es necesario añadir los aminoácidos Val10 y Leu9, tanto en el modelo estructural de CCH como en la estructura de la cistatina C estabilizada. Los cambios en la estructura se realizaron con ayuda del software MOE 2014 (Molecular Operating Environment, www.chemcomp.com). Las estructuras de ambos inhibidores se relajaron por simulación de dinámica molecular (DM), que es una técnica computacional basada en la mecánica clásica y constituye uno de los métodos más utilizados para la simulación de macromoléculas biológicas como las proteínas. Previo a las simulaciones, los estados de ionización de la cadena lateral tanto en la CCH como en la CCE a pH 7.0 se establecieron utilizando los valores de pKa estimados utilizando la subrutina PROPKA en el servidor PDB2PQR.⁵⁵ Las simulaciones de DM se realizaron utilizando el software GROMACS 5.0.7⁵⁶ con el campo de fuerzas OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations).⁵⁷ Cada uno de los inhibidores se colocó por separado en el centro de una caja cúbica con su borde más cercano a 12 Å de la proteína. Aproximadamente 20,500 moléculas de agua de carga simple extendida (SPC/E) se requirieron para llenar la caja, y un ion de cloruro se utilizó para neutralizar la carga neta de cada proteína. La minimización de la energía se realizó utilizando el algoritmo de descenso más pronunciado para 1000 pasos, seguido de equilibrio térmico (100 ps), restringiendo la posición de los

átomos pesados de las proteínas al fijar una constante de fuerza armónica de $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. La simulación DM se realizó en un conjunto de NPT con paso de tiempo de 2 fs a una temperatura de 350 K o 450 K, a 1.0 bar durante 200 ns, utilizando un termostato de escalamiento de velocidades y un barostato Parrinello-Rahman. Se aplicó el algoritmo LINCS⁵⁸ para limitar la longitud de los enlaces covalentes. Se aplicó un límite de 1.0 nm para las interacciones electrostáticas de corto alcance y van der Waals; mientras que las fuerzas electrostáticas de largo alcance se trataron con el método de malla de partícula de Ewald.⁵⁹ Se realizaron dos réplicas para cada sistema.

4.7.2 Construcción del complejo cistatina C – quimopapaína

El modelo estructural del complejo cistatina C humana – Quimopapaína se obtuvo por acoplamiento molecular de las estructuras separadas, procedimiento conocido como *Docking*. En primer lugar, se eligió una estructura conocida de un complejo homólogo que se utilizó como guía para establecer los aminoácidos que probablemente formarían la interfaz. Para esto se alinearon las secuencias de AA (en código *fasta*) de las proteínas libres involucradas en 5 complejos homólogos cuya estructura cristalográfica ya ha sido resuelta, junto con las secuencias de CCE y quimopapaína según el caso. Esto se hizo en el servidor Uniprot (Universal Protein Resource)⁶⁰ empleando su herramienta *Clustalo*, que nos da el porcentaje de identidad que hay entre secuencias alineadas de aminoácidos. Basados en las alineaciones con mayor porcentaje de identidad y en la estructura del modelo plantilla se estableció una lista de posibles AA que podrían participar en la formación del complejo Quimopapaína–Inhibidor, dichos contactos se establecieron como guía para generar el modelo por acoplamiento molecular rígido (Tabla.5.5).

Con los archivos de coordenadas espaciales generados en las simulaciones de dinámica molecular a 350K de los inhibidores y el PBD: 1YAL correspondiente a quimopapaína, se construyeron los modelos por acoplamiento molecular rígido empleando el servidor *pyDockweb*⁶¹⁻⁶² en su versión *RST*⁶³ el cual nos permite establecer restricciones para acotar la búsqueda de un mejor modelo inicial. Los modelados con mayor puntaje obtenidos en *pyDockweb* se superpusieron a la estructura cristalográfica del complejo homólogo estefina B – papaína, cuyo código PDB es 1STF,⁶⁴ para discriminar las estructuras se calculó la desviación del valor cuadrático medio (RMSD) respecto a la posición de los carbonos alfa (C_α) tomando en cuenta las coincidencias en la estructura secundaria, eligiendo el modelo con el menor RMSD.

4.7.3 Simulación de DM del modelo 3D de los complejos

Una vez elegidos los modelos estos se evaluaron mediante una simulación de dinámica molecular.⁶⁵ La simulación se realizó en disolvente explícito usando el campo de fuerza OPLS⁵⁷, con el software *GROMACS*⁵⁶ en su versión 5.0.7.

Previo a la simulación de DM el estado de ionización a pH 7.0 de los grupos protonables en las proteínas acomplejadas se establecieron utilizando el valor de pKa estimado por PROPKA, que es una subrutina del servidor PDB2PQR.⁵⁵

Las estructuras elegidas de los sistemas CCH–quimopapaína y CCE–quimopapaína se colocaron por separado en el centro de una caja cúbica con 12 Å de separación entre el modelo y las caras de la caja, mientras que para llenar la caja se emplearon 30,800 moléculas de agua tipo SPCE y se agregaron 13 iones cloruro para neutralizar la carga del complejo. Previo a la simulación de DM, la energía del sistema se minimizó para su relajación, además el sistema se equilibró térmicamente restringiendo la posición de los átomos pesados del complejo con una constante de fuerza armónica de 1000 kJ mol⁻¹ cm⁻¹, esto en un conjunto NVT; por último, la presión del sistema se equilibró a 1.0 bar en un conjunto NPT. Las simulaciones de DM se realizaron con los sistemas equilibrados en un ensamble NPT a 350 K, 450 K y 1.0 bar por 200 ns utilizando el termostato de escalamiento de velocidades y el baróstato de Parrinello-Rhman. La longitud de los enlaces covalentes se restringió por el algoritmo LINCS.⁵⁸ Se aplicó un corte de 1.0 nm a las interacciones electrostáticas e interacciones van der Waals de corto alcance, mientras que las fuerzas electrostáticas de largo alcance se trataron con el método de malla de partícula de Ewald.⁵⁹

4.7.4 Estimaciones teóricas de los parámetros termodinámicos de unión

Para realizar la estimación teórica del valor de ΔH_U y ΔC_p del complejo cistatina C humana – quimopapaína, se emplearon modelos semiempíricos que correlacionan estas variables con la magnitud de las áreas superficiales ocultas en la interfaz del complejo formado, determinadas como cambios en el área superficial accesible a la solvente denominada como ASA por sus siglas en inglés (Accessible Surface Area).⁶⁶ El área oculta al solvente está descrito por la siguiente relación:

$$\Delta ASA = ASA_{complejo} - (ASA_{cm-Q} + ASA_{Inh}) \quad (\text{Ec.6})$$

Por otro lado, las distintas parametrizaciones del ΔASA están divididas en sus contribuciones polar, a la que contribuyen los átomos de oxígeno y nitrógeno, mientras que la contribución apolar está dada

por los átomos de carbono y azufre. Denotando las áreas correspondientes como ΔASA_p y ΔASA_{ap} , respectivamente, y la estimación teórica de ΔH_U y ΔC_P está dada por las siguientes ecuaciones:

$$\Delta H_U = \Delta H_p + \Delta H_{ap} = \Delta h_p \Delta ASA_p + \Delta h_{ap} \Delta ASA_{ap} \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\Delta C_P = \Delta C_{P,p} + \Delta C_{P,ap} = \Delta c_{P,p} \Delta ASA_p + \Delta c_{P,ap} \Delta ASA_{ap} \quad (\text{Ec. 8})$$

dónde Δh_p y Δh_{ap} representan los coeficientes de proporcionalidad para el ΔH_U , mientras que $\Delta c_{p,p}$ y $\Delta c_{p,ap}$ son los coeficientes de proporcionalidad para el ΔC_P . Los coeficientes de proporcionalidad obtenidos para diferentes bases de datos de interacciones proteína–proteína se muestran en la Tabla 4.3. Para calcular el valor de las ASA se empleó el programa *NACCESS*^{72, 73}, basado en el algoritmo de Lee y Richards⁶⁶, utilizando un radio de prueba de 1.4 Å, así como las coordenadas espaciales del complejo y de las proteínas libres obtenidas de la minimización de energía por DM.⁷²⁻⁷⁴

Tabla 4.3. Coeficientes de proporcionalidad para el ΔH_U y el ΔC_P separados por su contribución polar y apolar.

ΔH_U	Δh_p (cal/mol Å ²)	Δh_{ap} (cal/mol Å ²)
García & Hernández ⁶⁷	19.4	-7.0
Luque & Freire ⁶⁸	31.4	-8.44
ΔC_P	$\Delta C_{P,p}$ (cal/mol Å ² K)	$\Delta C_{P,ap}$ (cal/mol Å ² K)
Murphy & Freire ⁶⁹	-0.26	0.45
Myers et al. ⁷⁰	-0.09	0.28
Makhatadze & Privalov ⁷¹	-0.21	0.51

Capítulo 5
RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Construcción de la cistatina C humana estabilizada (L47C/G69C)

El tamaño de los plásmidos pET-24a(+)-CC(L47C) y pET-24a(+)-CCE extraídos a los clones estudiados en cada etapa, se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, (Figura 5.1A). Las secuencias de nucleótidos obtenidas, correspondientes a los vectores generados en los experimentos de mutagénesis presentados en la Figura 5.1B y B', contienen el codón TGT en las posiciones planeadas. Con el plásmido pET-24a(+)-CCE recuperado de la segunda etapa de mutagénesis, se transformaron células de la cepa *SHuffle T7 Express lysY C3030H* de *Escherichia coli* para sobreexpresar la CCE.

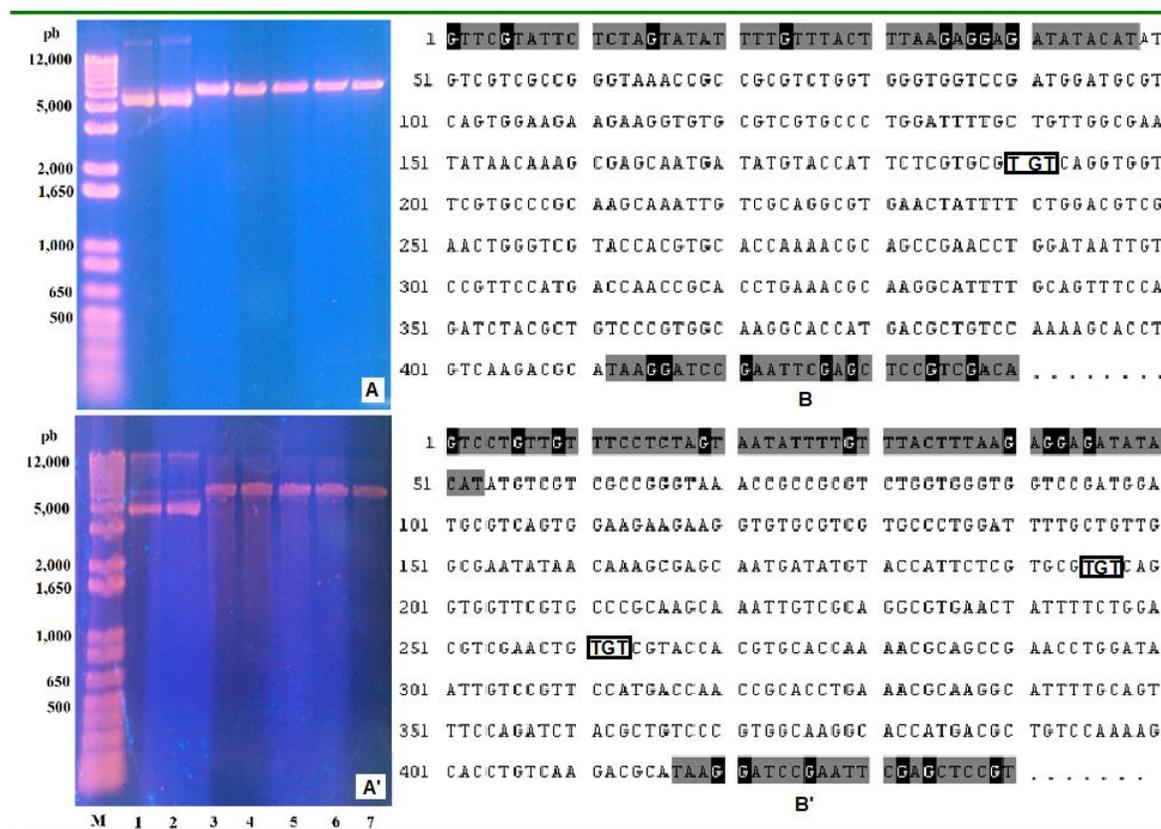


Figura 5.1. Electroforesis en gel de agarosa. (A) Las bandas observadas en los carriles 1 y 2 pertenecen a pET-24a(+)-CC(L47C) circular, mientras que del carril 3 al 7 se muestran las bandas del plásmido digerido (Etapa 1). En el panel (A') las bandas observadas corresponden al pET-24a(+)-CCE, obtenido en la segunda etapa de mutagénesis. Ambos plásmidos se digirieron por la enzima de restricción EcoR I para generar ADN lineal. Las bandas muestran un tamaño acorde al número de pb que contienen los plásmidos estudiados. Secuencia de nucleótidos. En el panel (B) se muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente al pET-24a(+)-CC(L47C), la cual contiene al codón TGT que codifica para CYS en la posición 47 respecto a la secuencia de aminoácidos de CCH, en (B') se

muestra la secuencia de nucleótidos del pET-24a(+)-CCE, en la cual se puede apreciar el codón TGT en las posiciones 47 y 69 según su secuencia de AA.

5.1.1 Expresión de la cistatina C humana estabilizada (CCE)

La expresión de CCE en la cepa SHuffle *T7 Express lysY C3030H*, transformada con el pET-24a(+)-CCE, se analizó del cultivo en medio LB de cinco clones por separado. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al del sobrenadante obtenido al centrifugar el producto de lisis de los clones. Las muestras cargadas en el gel de poliacrilamida correspondientes a los clones analizados de la cistatina C estabilizada (Figura 5.2, carriles 4-8), presentaron una banda a la altura del estándar correspondiente a 14.4 kDa, además, el sobrenadante correspondiente al cultivo de CCH, así como una muestra pura de CCH (Figura 5.2, carriles 1 y 2) presentaron bandas similares.

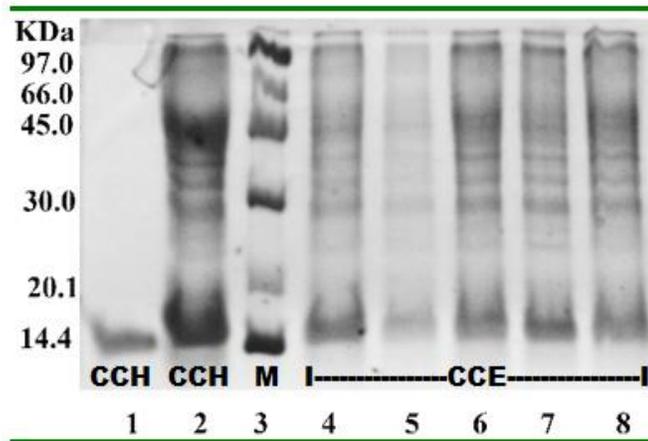


Figura 5.2. Electroforesis SDS-PAGE: carril 1 pertenece a una muestra homogénea de CCH. Carril 2 sobrenadante de la lisis de un crecimiento bacteriano de la cepa C3030H-CCH. Del carril 4 al 8 se muestra el sobrenadante de la lisis del crecimiento bacteriano de la cepa C3030H-CCE correspondiente a cada uno de los cinco clones estudiados. El carril 3 corresponde a los marcadores de peso molecular.

5.2 Purificación de los inhibidores

Los inhibidores CCH y CCE se purificaron por separado en tres etapas cromatográficas, del sobrenadante correspondiente, obtenido en la lisis del crecimiento bacteriano de las cepas C3030H-CCH y C3030H-CCE. Las Figuras 5.3, 5.4 y 5.5 muestran los cromatogramas correspondientes a la purificación de la CCE, de los cuales se resalta en color gris la fracción recuperada de inhibidor en cada una de las cromatografías. Las cromatografías de exclusión molecular se realizaron a pH 9.3, mientras que la cromatografía de intercambio aniónico se hizo a pH 8.8. El cromatograma obtenido

en la tercera etapa mostró un pico de elución simétrico, correspondiente al inhibidor, el cual se recuperó y fracciono para su almacenamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso en la experimentación requerida.

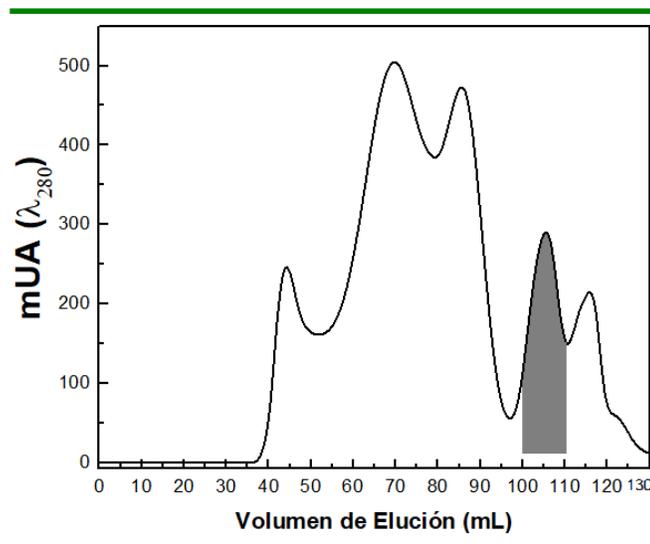


Figura 5.3. Cromatograma de exclusión molecular preparativa. La cromatografía se realizó en una columna Superdex 200 HiLoad 16/60 GE, equilibrada con amortiguador de Glicina 50 mM, NaCl 30 mM, pH 9.3. La parte sombreada corresponde a la zona de elución del inhibidor. En etapa se eliminaron proteínas de alto peso molecular.

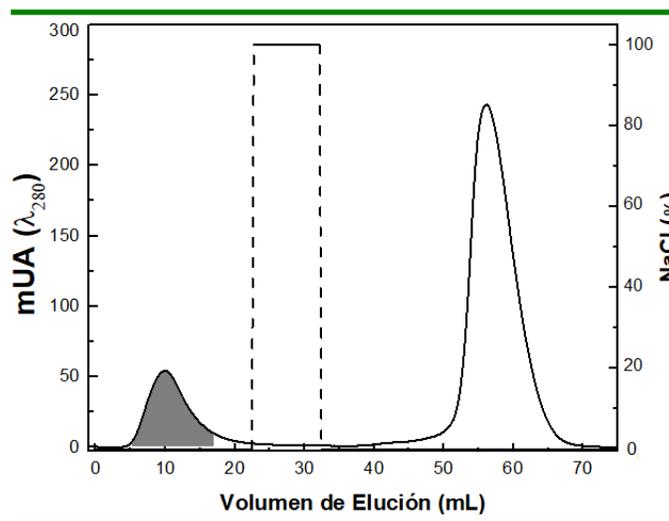


Figura 5.4. Cromatograma de intercambio aniónico. Se empleó una columna Sephadex A-50 DEAE previamente equilibrada con Tris 40 mM, pH 8.8, la fracción atrapada por la columna se eluyó en Tris 40 mM con 0.6 M NaCl a pH 8.8. La zona en color gris corresponde a la fracción recuperada de inhibidor, la línea punteada representa la concentración de NaCl. En esta etapa se eliminaron proteínas de masa molecular similar a la cistatina C, pero cargadas negativamente a las condiciones de trabajo.

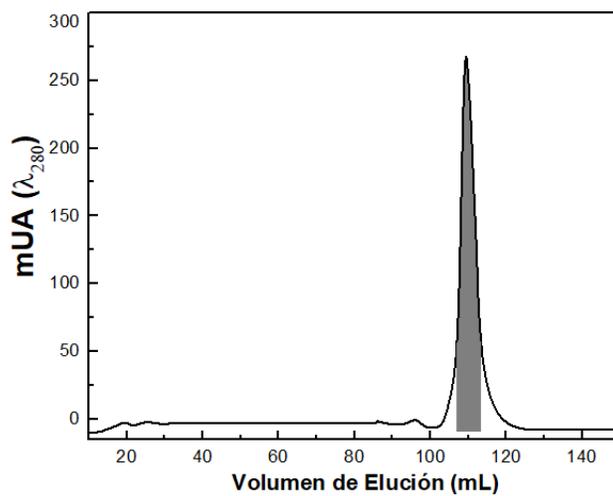


Figura 5.5. Cromatograma de exclusión molecular. Se utilizó una columna empacada con resina Sephacryl S-200, previamente equilibrada con amortiguador de Glicina 50 mM, NaCl 30 mM, pH 9.3. La parte sombreada representa la zona de elución del inhibidor.

5.2.1 Prueba de la formación del puente disulfuro entre los residuos C47 – C69

Con los valores de las masas obtenidas a partir de los espectros de masas MALDI-TOF correspondientes a las muestras M_{CCH} , M_{NAT} , M_{ALQ} , y $M_{RED+ALQ}$ (Figura 5.6). Se verificó la formación del puente disulfuro introducido por las mutaciones puntuales L47C/G69C. Asimismo, los espectros de masas obtenidas para los inhibidores sin tratamientos químicos extras, presentados en la Figura 5.6 (A) y (B), son prueba de la pureza lograda durante el proceso de purificación.

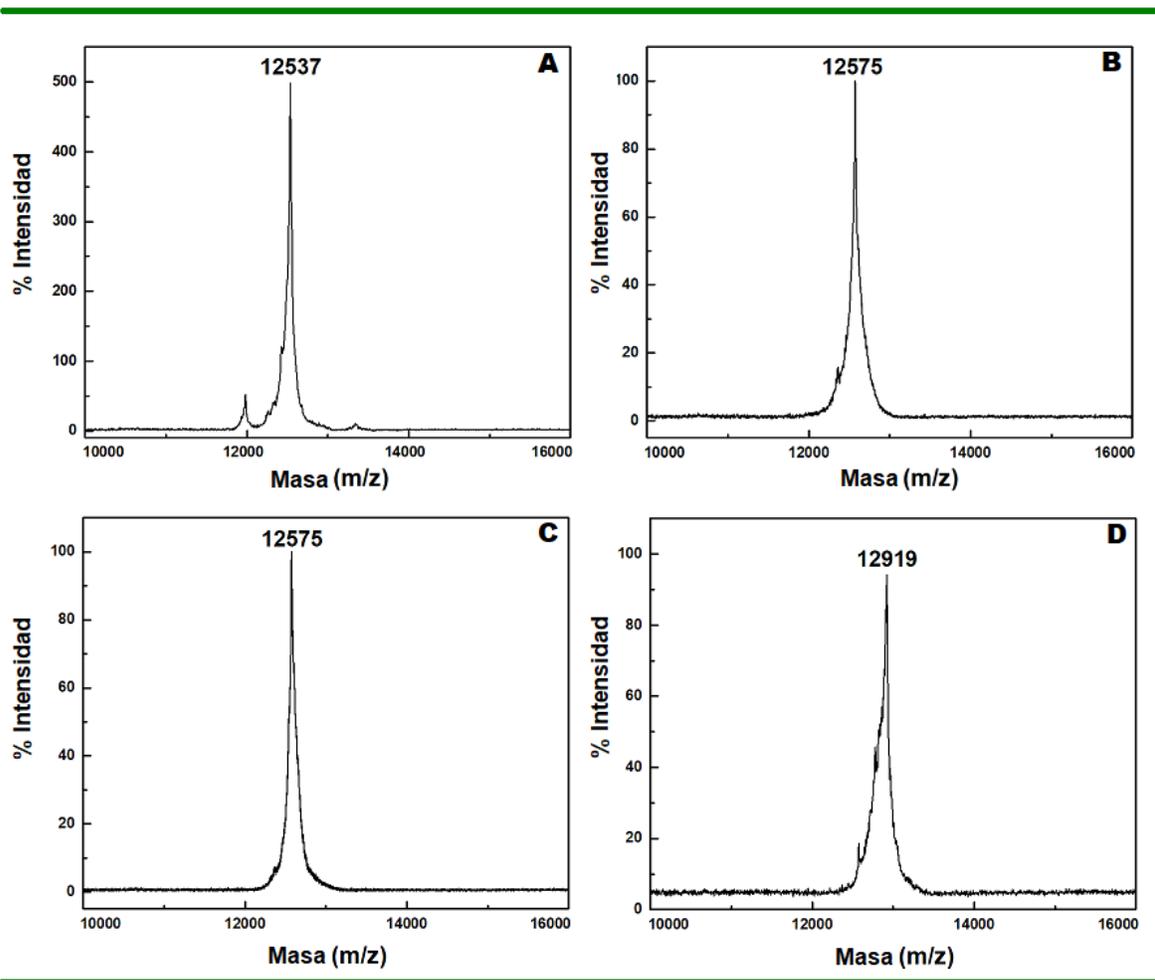


Figura 5.6. Espectros de masas *MALDI-TOF*. Los espectros se obtuvieron en modo iónico positivo y lineal con una tensión de aceleración de 20 kV, empleando una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico preparado como una solución saturada en 0.1% de TFA en agua/acetonitrilo (1/1, v/v). **A.** Espectro de masas obtenido para CCH (M_{CCH}) **B.** Espectro de masas correspondiente a CCE (M_{CCE}) **C.** Espectro de masas de CCE alquilada con iodoacetamida 10 mM (M_{ALQ}). **D.** Espectro de masas obtenido para la CCE desnaturalizada y reducida con DTT 10 mM y alquilada con iodoacetamida 25 mM ($M_{RED+ALQ}$).

Con los datos obtenidos de los espectros de masas correspondientes a las diferentes alícuotas de CCE, se determinó el número de sulfhidrilos reactivos y el número de puentes disulfuro a partir de las ecuaciones 1, 2 y 3 presentadas en la metodología.⁴⁹

$$N_{SH} = \left(\frac{M_{ALQ} - M_{CCE}}{M_{CAM}} \right) = \left(\frac{12575 \text{ Da} - 12575 \text{ Da}}{57.1} \right) = 0$$

Dado que N_{SH} es cero se puede asegurar que nuestra proteína no cuenta con sulfhidrilos reactivos.

$$N_{Cys} = \left[\frac{(M_{RED+ALQ} - M_{ALQ})}{(M_{CAM} + 1)} \right] + N_{SH} = \left[\frac{12919 \text{ Da} - 12575 \text{ Da}}{57.1 \text{ Da} + 1} \right] + 0 = 6.0$$

El número de cisteínas presentes en la cistatina C estabilizada es 6, lo que concuerda con lo esperado.

$$N_{PD} = \frac{N_{Cys} - N_{SH}}{2} = \frac{6.0 - 0}{2} = 3$$

El valor obtenido para N_{PD} , es determinante y asegura la formación del puente adicional introducido en la CCH con las mutaciones puntuales L47C y G69C.

5.3 Carboximetilación y Purificación de la Quimopapaína (cmQ)

La cmQ se purificó en dos etapas cromatográficas según lo presentado en la metodología. Previo a la cromatografía se eliminó el exceso de sales al dializar contra amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0.²⁶⁻²⁷ El cromatograma mostrado en el panel A de la Figura 5.7, correspondiente a la primera cromatografía de intercambio catiónico, exhibe varias zonas de elución que corresponde a las diversas PC secretadas en el látex del arbusto tropical *Carica papaya L.* Este cromatograma muestra en color gris la fracción recolectada de quimopapaína carboximetilada. Una vez libre de sales, la fracción recolectada en la etapa anterior se sometió a una segunda cromatografía de intercambio catiónico. Dicho cromatograma se muestra en el panel B de la Figura 5.7. La fracción recolectada de cmQ se muestra en color gris. La muestra recuperada en la segunda cromatografía se utilizó en todos los experimentos posteriores.

La homogeneidad de las muestras, recuperadas de su última etapa cromatográfica, se analizó por electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (Figura 5.8). Los carriles 2 y 3 se cargaron con muestras de CCH y CCE respectivamente, mientras que en el carril 4 se cargó con muestra de cmQ. Las bandas correspondientes a los inhibidores se aproximaron a la altura del estándar correspondiente a 14.4 kDa mientras que la cmQ mostró una banda difusa.

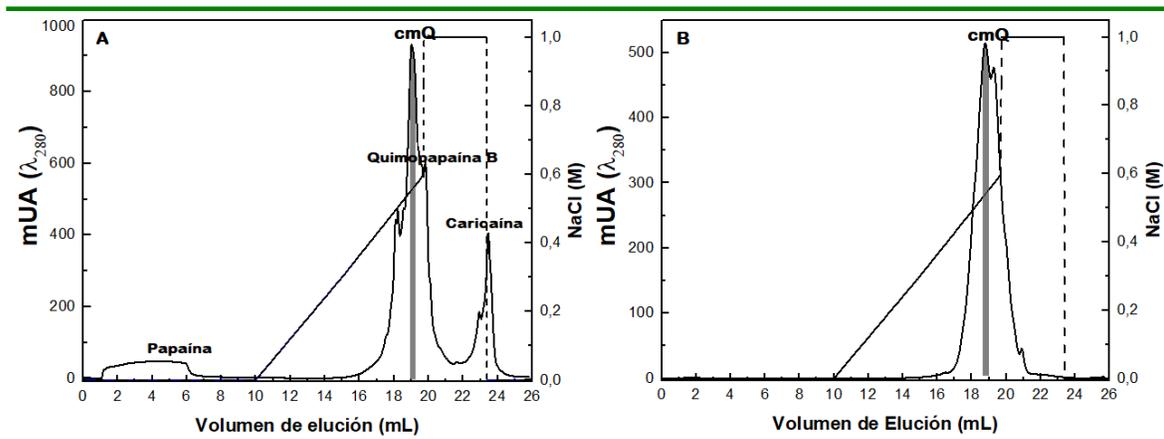


Figura 5.7. Cromatogramas de intercambio catiónico. La muestra de cmQ se eluyó con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 con un gradiente bifásico de NaCl 1 M, en una columna Mono S 5/50 GL (GE). El panel A presenta distintas zonas de elución que corresponden a las PC presentes en el extracto comercial, la fracción recupera de cmQ se muestra en color gris (panel A). El cromatograma del panel B muestra en color gris la fracción recolectada de la recromatografía de cmQ.

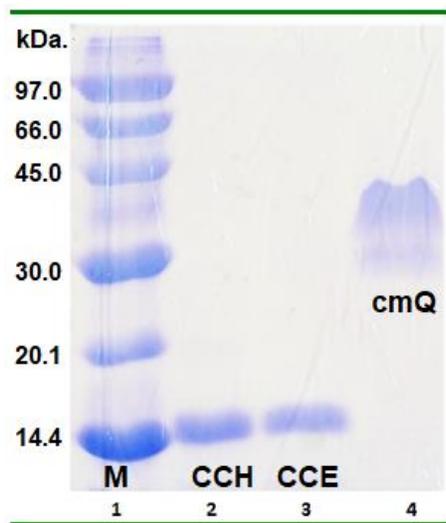


Figura 5.8. Electroforesis SDS-PAGE. Los carriles 2 y 3 corresponden a muestras homogéneas de CCH y CCE respectivamente, mientras que el carril 4 corresponde a una muestra de cmQ.

5.4 Propiedades estructurales

5.4.1 Propiedades estructurales de los inhibidores CCH y CCE

Para evaluar la estructura secundaria se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de ambos inhibidores a pH 7.0 y a 25 °C. Ambos espectros muestran un mínimo de elipticidad a la

altura de los 208 nm y un leve hombro cercano a los 223 nm, dichos espectros coinciden con los ya reportados de cistatina C humana, Figura 5.9 panel A.³⁶⁻³⁷ Por otro lado, los espectros de emisión correspondientes a la CCH y CCE que se muestran en el panel B de la Figura 5.9, exhiben un máximo en 325 nm. El centro de masa espectral (CME), calculado de los espectros de emisión de fluorescencia correspondientes a CCH y CCE, es el mismo para ambos inhibidores, el valor del CME se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Centro de masa espectral correspondiente a los espectros de fluorescencia intrínseca de CCH y CCE.

Inhibidor	CME (nm)
CCH	336
CCE	336

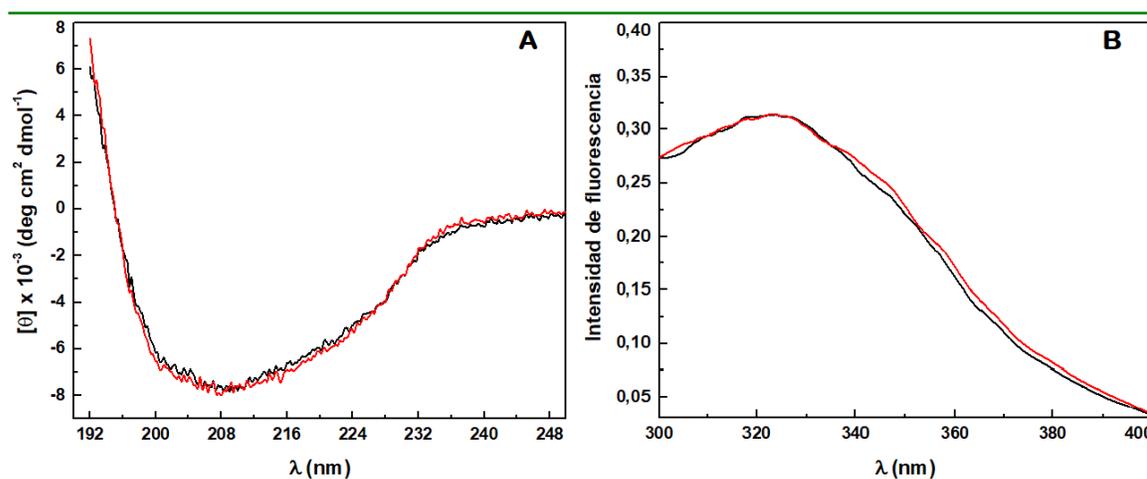


Figura 5.9. Panel A. Espectros de dicroísmo circular. Los espectros de DC se realizaron a pH 7.0 y 25 °C. En línea negra se muestra el espectro de cistatina C humana silvestre mientras que el espectro presentado en línea roja pertenece a la cistatina C estabilizada. Las muestras de ambas cistatinas se trabajaron a una concentración de 0.1 mg/mL. **Panel B.** Emisión de fluorescencia. Los espectros de emisión se midieron a pH 7.0 y 25 °C. La emisión de CCH se muestra en línea negra, mientras que la emisión de CCE se muestra en línea roja. Ambos espectros se obtuvieron excitando a 280 nm, mientras que la emisión se colectó de 300 a 400 nm. En este caso ambos inhibidores se trabajaron a 0.1 μ M (1.2×10^{-3} mg/mL).

5.4.2 Propiedades estructurales de la cmQ

El espectro de DC en el UV lejano de la cmQ se obtuvo a pH 7.0 y a 25 °C, exhibe dos mínimos, el primero cercano a los 210 nm y un segundo mínimo más acentuado en aproximadamente 222 nm. El

espectro obtenido es consistente con lo reportado previamente por Solís-Mendiola y *col.* 1989.²⁶ (Figura 5.10 panel A).

El panel B de la Figura 5.10 presenta el espectro de emisión normalizado de la quimopapaína carboximetilada, que cuenta con cuatro triptófanos (trp7, trp26, trp181 y trp185). El espectro de emisión de fluorescencia presentó un CME a los 340 nm, mientras que el máximo del espectro se encontró cercano a los 329 nm.

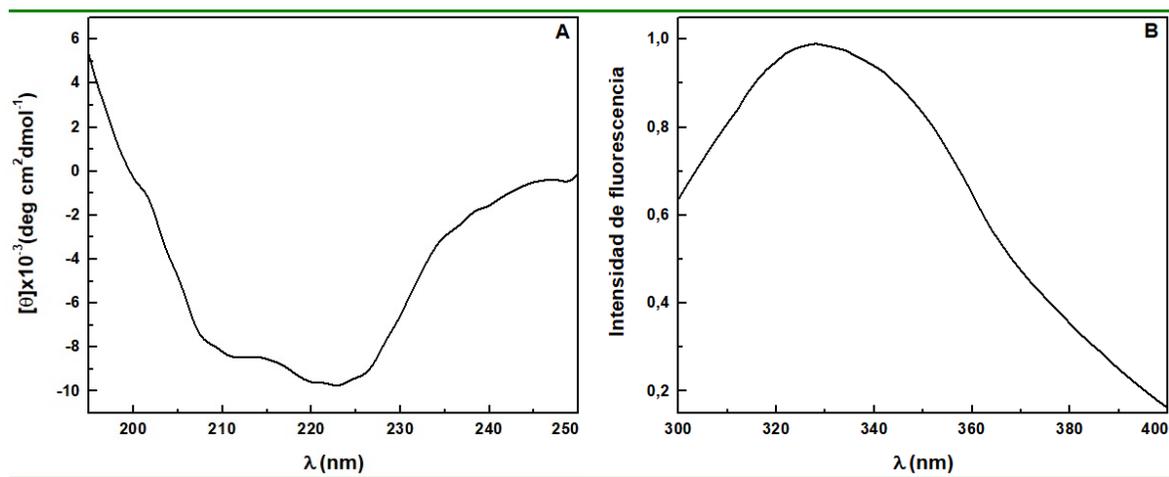


Figura 5.10. Panel A. Espectro de dicroísmo circular. El espectro de DC se midió a pH 7.0 y a 25 °C, con una concentración de cmQ de 0.1 mg/mL (4.2 μM). **Panel B.** Espectro de emisión de fluorescencia obtenido en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0, a 25 °C correspondiente a la quimopapaína carboximetilada. El espectro se obtuvo al excitar la muestra de cmQ a 280 nm, mientras que la emisión se registró de 300 a 400 nm. La cmQ se trabajó a 0.10 μM .

5.4.3 Prueba espectroscópica de la formación del complejo

Para evaluar si el complejo Inhibidor – cmQ se estaba formando, se compararon los espectros de emisión a pH 7.0 correspondientes a los inhibidores libres, la cmQ y la mezcla de inhibidor con cmQ. Los espectros de emisión correspondientes a las mezclas cmQ con CCH y cmQ con CCE, presentaron una clara disminución en la intensidad de fluorescencia en comparación con un espectro calculado como la suma de la IF de las proteínas libres (Figura 5.11). Los espectros de las mezclas presentaron el mayor cambio a los 337 nm con respecto al espectro calculado. El CME calculado es de 333 nm para el sistema cmQ – CCH y 331 nm para cmQ – CCE. Los espectros de emisión correspondientes a la mezcla mostraron un corrimiento en su máximo hacia longitudes de onda más cortas.

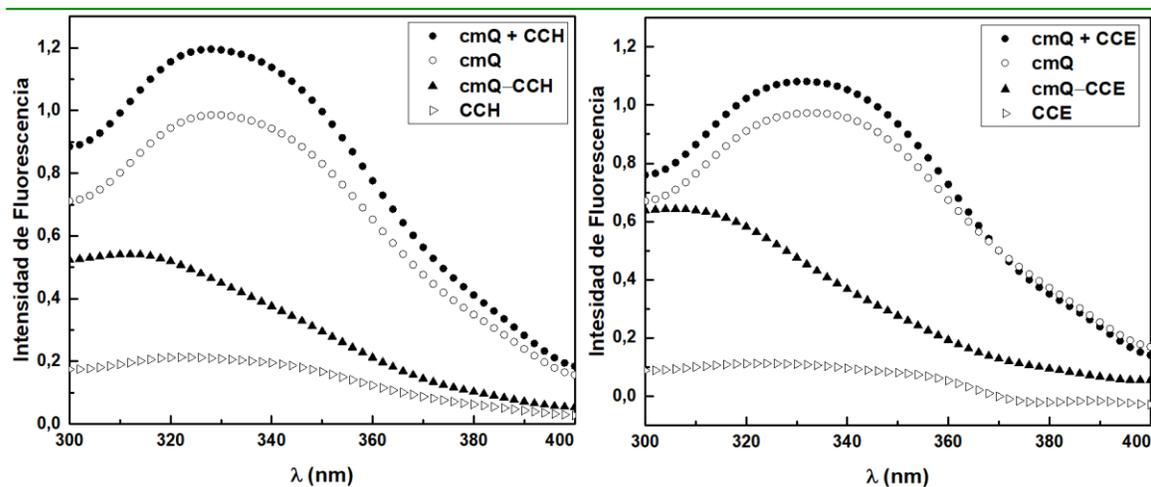


Figura 5.11. Emisión de Fluorescencia. Los espectros de emisión se registraron de 300 a 400 nm, con una longitud de onda de excitación de 280 nm. El panel A muestra los espectros de emisión de las proteínas cmQ y CCH libres, una mezcla de estas y un espectro calculado a partir de la emisión de las proteínas libres, mientras que el panel B corresponde al sistema cmQ – CCE. En ambas Figuras los (●) corresponden a la IF calculada como la suma de la IF de las proteínas libres, los (○) representan la IF de la cmQ libre, (▲) es la mezcla de inhibidor con cmQ, mientras que los (Δ) corresponden a la IF de la CCH ó CCE. Los espectros se midieron a una razón de concentración de la mezcla enzima-inhibidor de 1.2 para esto se utilizó la cmQ a 0.10 μM y el inhibidor a 0.12 μM .

5.5 Estabilidad estructural del monómero de cistatina C humana

5.5.1 Pruebas de oligomerización por CEM y DDL

Para verificar la capacidad que tienen la CCH de formar dímeros, y por otro lado corroborar la eliminación de este fenómeno en la cistatina C estabilizada,³⁵ se realizaron experimentos de cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75 HR 10/30 previamente calibrada y equilibrada (Figura. 5.12). El cromatograma de la prueba realizada para CCH a 0.20 mg/mL y 25 °C, mostró un pico principal asociado al monómero y un pico más pequeño relacionado con el dímero (Azul claro). El ensayo donde se duplicó la concentración de CCH (0.40 mg/mL) provocó un aumento en la proporción del pico relacionado con el dímero (línea azul). Además, el calentamiento de esta alícuota durante 40 minutos a 65 °C y el posterior enfriamiento a 25 °C condujeron a una mayor formación de dímeros (curva roja). Por otro lado, una muestra concentrada (0.40 mg/mL) y calentada de CCE se eluyó como un solo pico en la zona correspondiente al monómero (línea negra). Pruebas realizadas por dispersión dinámica de luz (DDL) a soluciones de CCH a 0.40 mg/mL calentadas a 65 °C mostraron la formación oligómeros de orden superior al calentarse a 65 °C, mientras que, bajo las mismas condiciones, el CCE siguió siendo un monómero (Figura. 5.13).

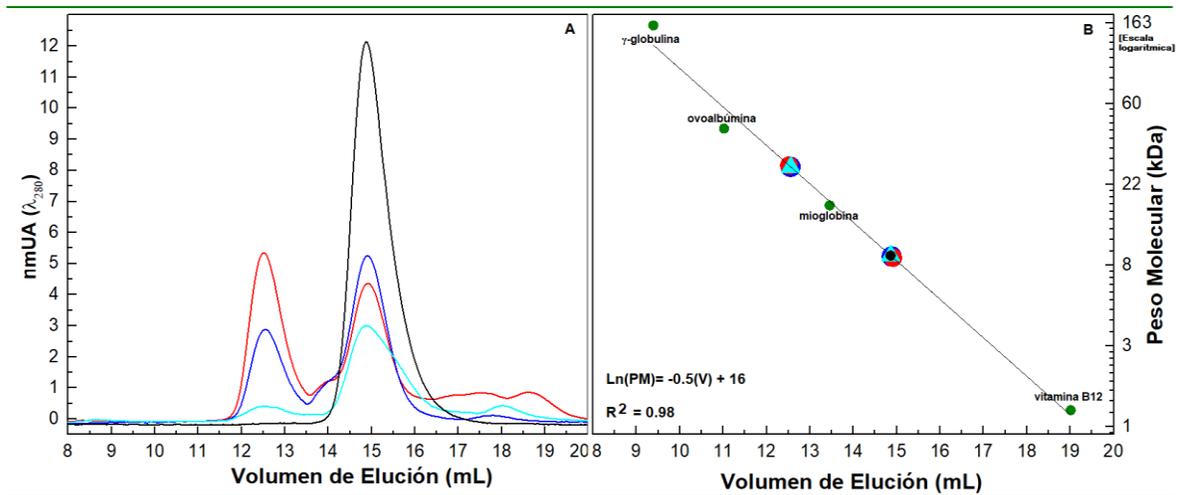


Figura 5.12. Evaluación de la formación de oligómeros por cromatografía de exclusión molecular. La cromatografía se realizó en una columna Superdex 75 HR 10/30 con un tampón de fosfato de 20 mM, 100 mM NaCl a pH 7.0, en un sistema FPLC ÄKTA. **Panel A:** La línea azul claro corresponde a la muestra de CCH a 0.20 mg/mL, la CCH con concentración de 0.40 mg/mL, se muestra en línea azul, la línea roja corresponde a la muestra de CCH concentrada a 0.40 mg/mL y calentada a 65 °C, por último, la muestra de CCE concentrada a 0.40 mg/mL y calentada a 65 °C, corresponde a la línea negra. **Panel B:** En triángulos color azul claro se muestra la CCH concentrada a 0.20 mg/mL, la CCH concentrada a 0.40 mg/mL corresponde a los círculos azules, los círculos rojos pertenecen a la CCH (0.40 mg/mL) calentada a 65 °C, por último, la muestra de CCE concentrada a 0.40 mg/mL y calentada a 65 °C corresponde a el círculo negro. La línea continua en el panel B representa la regresión lineal correspondiente a los datos de los estándares (puntos verdes). Los pesos moleculares de dichos estándares son: γ -globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina (17 kDa), y vitamina B12 (1.35 kDa). Los pesos moleculares están representados en escala logarítmica.

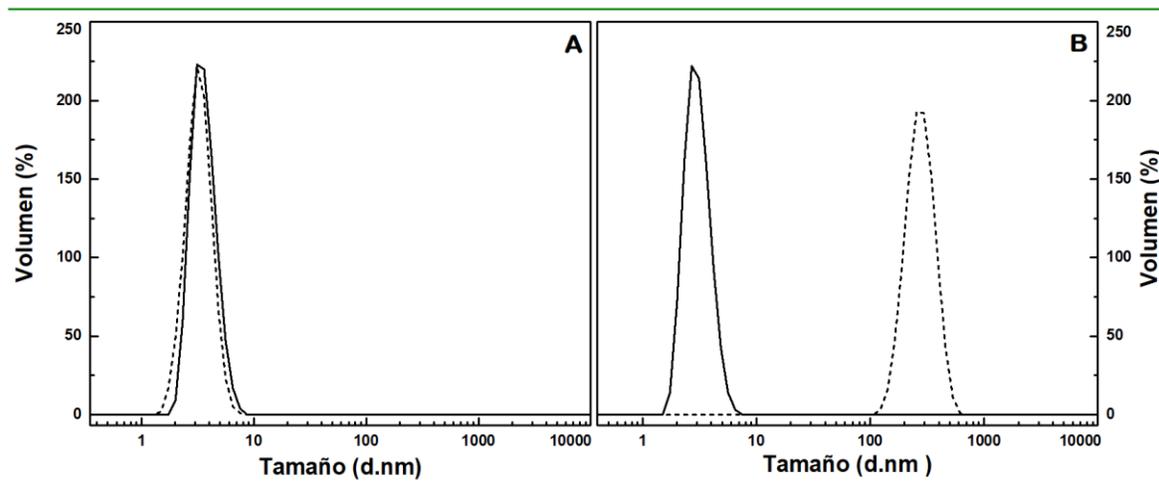


Figura 5.13. Dispersión dinámica de luz. Se muestra la distribución en el tamaño de partícula de las soluciones CCH (línea discontinua) y CCE (línea sólida) a 25 °C (A) y 65 °C (B). Ambos inhibidores se prepararon a una concentración de 0.4 mg/mL en fosfatos 20 mM, 56 mM NaCl.

5.6 Calorimetría diferencial de barrido

El termograma obtenido para CCH es similar al reportado anteriormente por Žerovnik E. y col.⁵¹, mientras que el termograma correspondiente a la CCE presento un desplazamiento en su T_m de aproximadamente 10 °C (Figura 5.14), así mismo un segundo calentamiento de ambos inhibidores sugiere que el desplegamiento térmico de estos es irreversible. El análisis del termograma dio los valores de T_m y $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ correspondientes a CCH los cuales fueron 78.6 °C y 2.92 respectivamente, estos valores son comparables con los valores de 82.0 °C y 2.67 obtenidos anteriormente para CCH concentrada a 1.0 mg/mL y truncada en el amino terminal.⁵¹ En el caso de la CCE los valores obtenidos para T_m y $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ son 89.5 °C y 1.86 respectivamente (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Análisis de los termogramas obtenidas por CDB. Las trazas calorimétricas fueron analizadas usando un modelo de equilibrio de dos estados.

Inhibidor	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kJ/mol)	ΔH_{vH} (kJ/mol)	r^2	$\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$
CCH	78.6 ± 0.2	139.4 ± 11.4	405.5 ± 7.3	0.99	2.92 ± 0.19
CCE	89.5 ± 0.2	194.1 ± 19.6	358.8 ± 1.4	0.99	1.86 ± 0.20

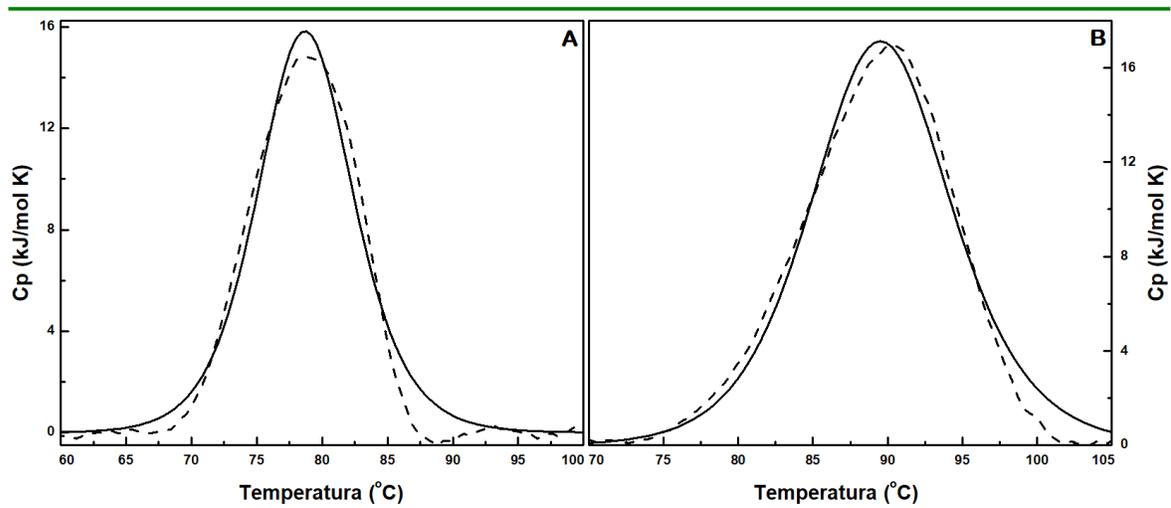


Figura. 5.14. Calorimetría diferencial de barrido. Los barridos se obtuvieron a 90 K/h en tampón de fosfatos 20 mM, pH 7.0, con 56 mM de NaCl. En el panel A se muestra el termograma de CCH en línea discontinua, mientras que el panel B exhibe el termograma correspondiente a CCE en línea discontinua. En ambos paneles las líneas continuas representan el ajuste a un modelo reversible de dos estados de los datos experimentales. La concentración de ambos inhibidores es de 0.40 mg/mL (~32.0 μM).

5.7 Calorimetría de Titulación Isotérmica

Los experimentos de CTI se realizaron a pH 7.0 en amortiguador de fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 10 mM con 78 mM de NaCl para fijar la fuerza iónica a 0.1 M. Las isotermas se obtuvieron por duplicado a las temperaturas de 10 °C, 15 °C, 25 °C y 35 °C para el sistema cmQ–CCE, mientras que para el sistema cmQ–CCH se obtuvieron a 15 °C, 25 °C y 35 °C. La Figura 5.15 muestra las isotermas obtenidas de tres temperaturas para ambos sistemas. Los parámetros n , ΔH_U y K_U se obtuvieron al ajustar los datos integrados y corregidos mediante la sustracción del calor de dilución al modelo de sitios de unión idénticos e independientes (Ec. 5), mientras que el valor de $T\Delta S_U$ y ΔG_U se obtuvo según la ecuación 4. El promedio de los parámetros n , ΔH_U , K_U , $T\Delta S_U$ y ΔG_U calculados a las distintas temperaturas de trabajo se exponen en la Tabla 5.3

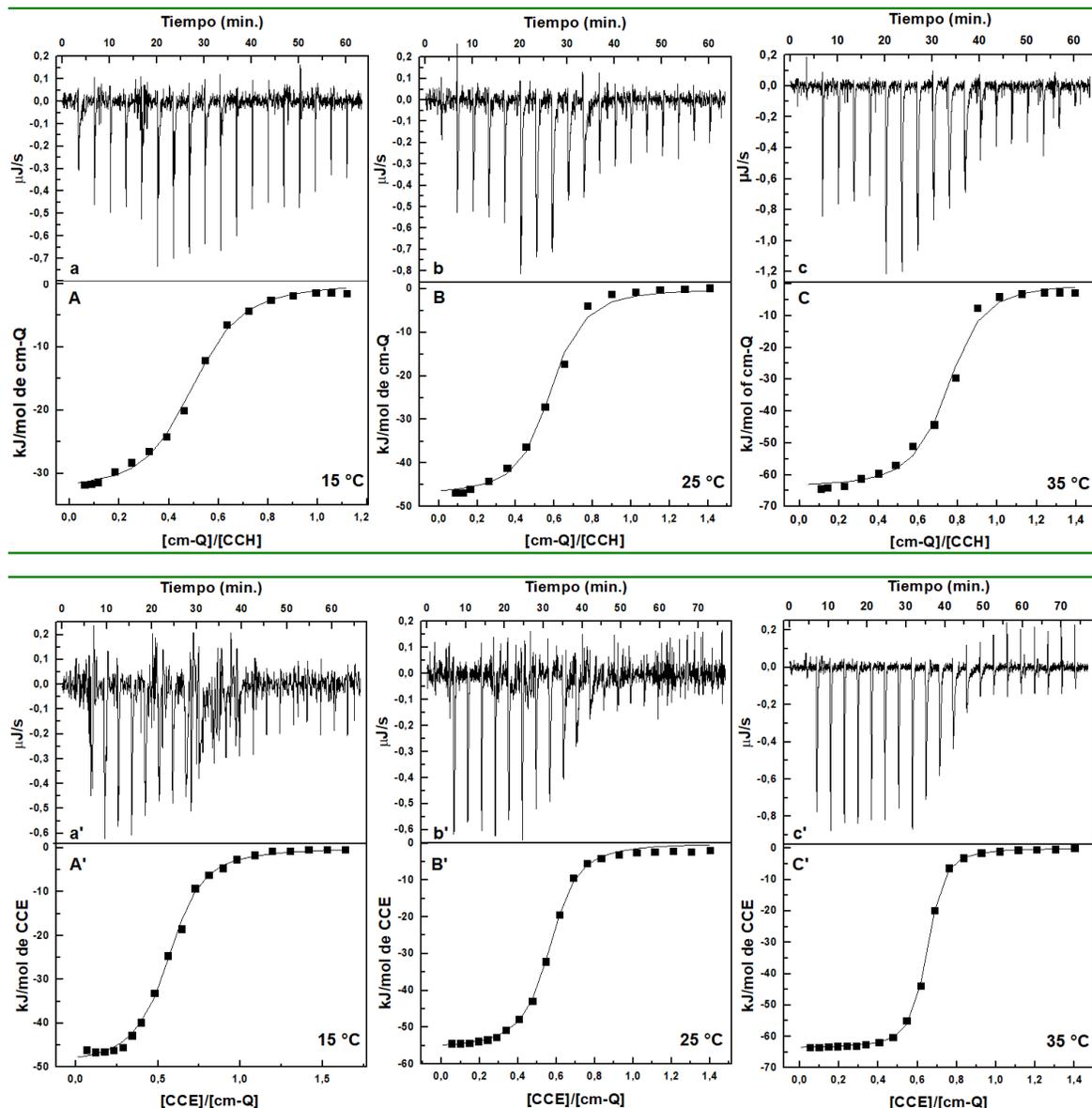


Figura 5.15. Isotermas obtenidas a 15 °C, 25 °C y 35 °C. El panel superior de las figuras (a, a', b, b', c y c') muestra los datos crudos obtenidos para cada titulación en $\mu\text{J/s}$. El panel inferior de las figuras (A, A', B, B', C y C') muestra en cuadros negros los datos integrados y corregidos mediante la sustracción del calor de dilución, mientras que la línea continua corresponde al ajuste, con regresión no lineal de las isotermas, al modelo de sitios de unión idénticos e independientes. Los experimentos se realizaron a pH 7.0 en amortiguador de fosfatos 10 mM y 78 mM de NaCl para fijar la fuerza iónica a 0.1 M.

Tabla 5.3. Parámetros termodinámicos (n , ΔH_U , K_U , $T\Delta S_U$ y ΔG_U) obtenidos a distintas temperaturas por CTI de los sistemas cmQ – CCE y CCH – cmQ.

T (°C)	Sistema (celda/jeringa)	K_U ($\times 10^6$) (M^{-1})	ΔG_U (kJ/mol)	ΔH_U (kJ/mol)	$T\Delta S_U$ (kJ/mol)	n
10	cmQ – CCE	2.9 ± 0.4	-34.3 ± 0.3	-23.9 ± 0.3	11.0 ± 0.5	0.81 ± 0.01
	CCH – cmQ	---	---	---	---	---
15	cmQ – CCE	2.9 ± 0.5	-35.7 ± 0.4	-29.0 ± 0.5	19.7 ± 0.4	0.60 ± 0.01
	CCH – cmQ	2.3 ± 0.4	-35.1 ± 0.5	-17.0 ± 0.4	18.2 ± 0.6	0.51 ± 0.01
25	cmQ – CCE	9.0 ± 1.6	-39.6 ± 0.4	-32.6 ± 0.4	7.0 ± 0.6	0.67 ± 0.01
	CCH – cmQ	3.5 ± 1.4	-37.4 ± 1.0	-28.2 ± 1.0	9.2 ± 1.4	0.59 ± 0.02
35	cmQ – CCE	12.0 ± 2.5	-41.7 ± 0.5	-46.1 ± 0.6	-4.4 ± 0.8	0.75 ± 0.01
	CCH – cmQ	4.0 ± 1.7	-38.7 ± 1.4	-48.3 ± 1.5	-10.0 ± 1.8	0.73 ± 0.02

El valor del ΔC_p se calculó a partir del gráfico de ΔH_U vs T mostrado en la Figura 5.16 a través de la regresión lineal de los datos de ΔH_U , dado que el cambio en la capacidad calorífica está dado por la relación: $\Delta C_p = \frac{d\Delta H_U}{dT}$. El cambio en la entalpía de unión ΔH_U para los sistemas cmQ – CCE y cmQ – CCH, se determinó por CTI a distintas temperaturas (Tabla 5.3).

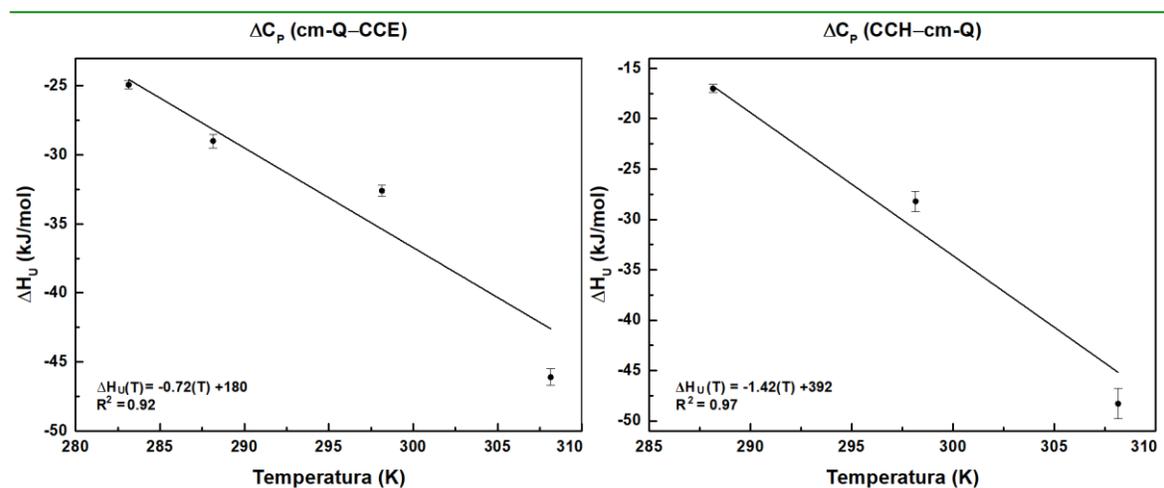


Figura 5.16. Cambio en la capacidad calorífica ΔC_p . El ΔC_p para el sistema cmQ – CCE se determinó a partir de los valores de ΔH_U a 10 °C, 15 °C, 25 °C y 35 °C, mientras que para el sistema cmQ – CCH, se evaluó el ΔH_U a 15 °C, 25 °C y 35 °C. Ambos gráficos presentan los valores de la regresión lineal.

Tabla 5.4. Valor del ΔC_p obtenido para los sistemas cmQ – CCE y CmQ – CCH a pH 7.0 en amortiguador de fosfatos 10 mM y 78 mM de NaCl, fijando la fuerza iónica en 0.1 M.

Sistema	ΔC_p . (kJ/mol K)
cmQ – CCE	-0.72 ± 0.15
CCH – cmQ	-1.42 ± 0.20

5.8 Modelado Computacional

5.8.1 Modelado y simulación de DM de los Inhibidores.

Los cambios efectuados en la estructura 3D de la cistatina C humana estabilizada, para generar un modelo de la cistatina C silvestre monomérica se muestran en la Figura 5.17, también se resaltan los residuos de aminoácidos añadidos al extremo amino, con el fin de lograr modelos con las características de los inhibidores obtenidos experimentalmente. Para evaluar la estabilidad térmica de los inhibidores, se corrieron simulaciones de DM a 350 y 450 K en solvente explícito de los modelos 3D de ambos inhibidores, con un tiempo de simulación de 200 ns. La simulación de DM, realizada a 350 K de CCH y CCE, mostró que ambas proteínas son estables y que poseen movilidad similar, según los perfiles de la desviación cuadrática media (RMSD) y de fluctuación cuadrática media (RMSF) mostrados en la Figura E1 del Apéndice E. La Figura 5.18 presenta un diagrama en colores

de cómo evoluciona la estructura secundaria durante los 200 ns de simulación de DM a 450 K, tiempo durante el cual se observó la pérdida de estructura terciaria tanto en CCH como en CCE, siendo más evidente en la cistatina C humana silvestre.

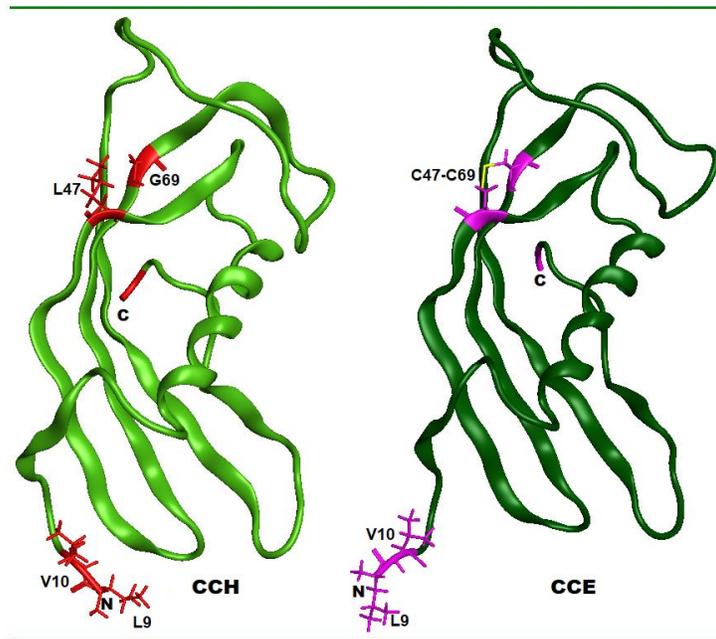


Figura 5.17. Modelos 3D de los inhibidores. A la izquierda se muestra la estructura de la cistatina C humana silvestre, en color rojo se exponen los aminoácidos L47 y G69 modelados y los AA L9 y V10 añadidos. El lado derecho de figura muestra la estructura tridimensional de la cistatina C estabilizada, resaltando en color amarillo el puente disulfuro formado entre las posiciones C47-C69 y los aminoácidos añadidos L9 y V10 en color magenta. Los cambios se realizaron en el software MOE 2014 (Molecular Operating Environment, www.chemcomp.com).

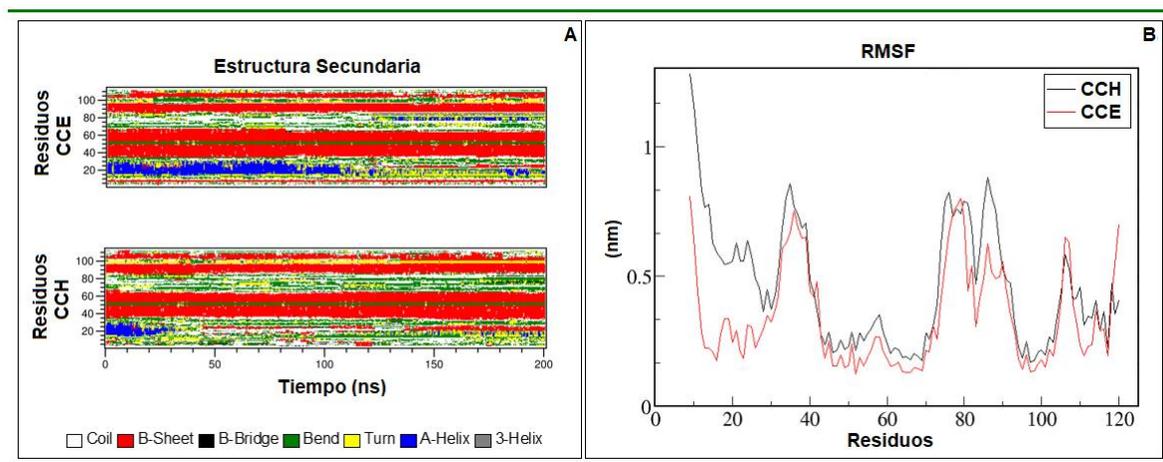


Figura. 5.18 Simulación de dinámica molecular en solvente explícito a 450 K durante 200 ns, en un conjunto NPT. En el panel A se exhibe en un diagrama de colores de los cambios en la estructura

secundaria, mientras que en el panel B se muestran los perfiles de RMSF de los carbonos- α , donde la línea negra corresponde a la CCH y la línea roja a la CCE.

5.8.2 Construcción del modelo cistatina C humana – quimopapaína por acoplamiento molecular rígido

Del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de cistatina C estabilizada y quimopapaína, con secuencias de aminoácidos de proteínas involucradas en complejos homólogos de PC–inhibidor de los cuales ya se conoce su estructura 3D, se obtuvo que el mayor porcentaje de identidad se dio entre cistatina C humana y estefina B (PDB:2OCT) y entre quimopapaína (PDB:1YAL) con papaína (PDB:9PAP), Tabla 5.4.⁶⁰

Tabla 5.4. Porcentaje de identidad obtenidos al comparar la secuencia de AA de la CCE y la quimopapaína con la secuencia de AA de proteínas involucradas en complejos homólogos con estructuras 3D conocidas.

Proteínas	Porcentaje de identidad	Posiciones Idénticas	Posiciones Similares
Cistatina C/Estefina B	17.97	23	33
Cistatina C/Estefina A	14.73	19	37
Quimopapaína/Papaína	56.42	123	51
Quimopapaína/Catepsina B	20.61	54	74
Quimopapaína/Catepsina H	36.12	82	75
Quimopapaína/Catepsina L	37.88	86	68
Quimopapaína/Catepsina V	39.91	91	67

En las Figuras 5.19 y 5.20 se muestra el alineamiento de las secuencias de AA con el mayor porcentaje de identidad, registrando un 56.42 % de identidad la comparación entre las secuencias de AA de quimopapaína y papaína, mientras que la comparación entre las secuencias de AA de cistatina C estabilizada con estefina B se obtuvo un porcentaje del 17.97%.

```

1YAL: YPQSIDWRAKGAVTPVKNQGACGSCWAFSTIATVEGINKIVTGNLLELSEQELVDCDKHS 60
9PAP: IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGSGSCWAFSAVVTIEGIKIRTGNLNQYSEQELLDCCRRS 60
      *: :*** *****:*****:.*:*** ** **** : *****:***:.*

1YAL: YGCKGGYQTTSLQYVANNGVHTSKVYPYQAKQYKCRATDKPGPKVKITGYKRVPSNCETS 120
9PAP: YGCNGGYPWSALQLVAQYGIHYRNTYPYEGVQRYCRSREKGPYAAKTGVQRVQPYNQGA 120
      ***:***  :.* ** :.* :.* :.*:.* * ** :.* .* * :.* : :

1YAL: FLGALANQPLSVLVEAGGKPFQLYKSGVFDGPGCKLDHAVTAVGYGTSDGKNYIIKNS 180
9PAP: LLYSIANQPVSVVLQAAGKDFQLYRGGIFVGPCKVDHAVAAGVYG----PNYILIKNS 176
      .* :.*:***:***:.*:.* ** *****:.*:.* **** .*:***:***** *****:*****

1YAL: WGPNWGEKGYMRLKRQSGNSQGTCGVYKSSYYPFKGFA 218
9PAP: WGTGWGENGYIRIKRGTGNSYGVCGLYTSSFYPVKN-- 212
      ** *****:***:.*:.* :*** *.**:*.*:***:***.*

```

Figura 5.19. Alineamiento de las secuencias de AA de quimopapaína (PDB:1YAL) con papaína (PDB:9PAP). Se obtuvo un porcentaje de identidad de 56.42%, 123 posiciones idénticas (*) y 51 posiciones similares (:). En negritas se resaltan las regiones conservadas.

```

2OCT: -----MMSGAPSATQPATAETQHIADQVRSQLE---EKYNK-----FPVFKAVSFK 44
3GAX: SSPGKPPRLVGGPMDASV---E-----EEGVRRALDFAVGEYNKASNDMYHSRACQVVRAR 53
      : *. * :. * : ** * : *** . :.* :

2OCT: SQVVAGTNYFIKVHVGDEDEFVHLR-----VFQSLPHENKSLTLSNYQTNKAKHD-ELTY 97
3GAX: KQIVAGVNYFLDVELCRTTCTKTQPNLDNCPFHDQPHLKRKA-FCSFQIYAVPWQTMTL 112
      .*:***.***:.*:.* :. : *:. ** :.: :...* . : :.*

2OCT: F----- 98
3GAX: SKSTCQDA 120

```

Figura 5.20. Alineamiento de las secuencias de AA de estefina B (PDB:2OCT) y CCE (3GAX), del cual se obtuvo un porcentaje de identidad de 17.97%, 23 posiciones idénticas (*) y 33 posiciones similares (:).

La estructura tridimensional del complejo papaína–estefina B se utilizó como plantilla para generar un modelo preliminar del complejo cistatina C humana – quimopapaína. El acoplamiento molecular rígido realizado en el servidor *pyDockweb* el cual en su versión *RST* nos permite establecer restricciones para acotar la zona de prueba para generar el complejo. La Tabla 5.5 muestra la lista de los posibles contactos generados con la unión de cistatina C humana a quimopapaína, establecidos a partir de la plantilla, los cuales se establecieron como restricción.

Tabla 5.5. Posibles aminoácidos involucrados en la formación del complejo cistatina C humana–quimopapaína. Los contactos entre estos residuos fueron alimentados como restricción en el servidor *pyDockweb* versión *RST*.⁶²

PROTEINA	AMINOÁCIDO CON INTERACCIÓN
CISTATINA C	L9 G11 A25 I56 V57 A58 V60 W106
QUIMOPAPAÍNA	Q19 G20 A21 K64 G65 G66 D158 W181

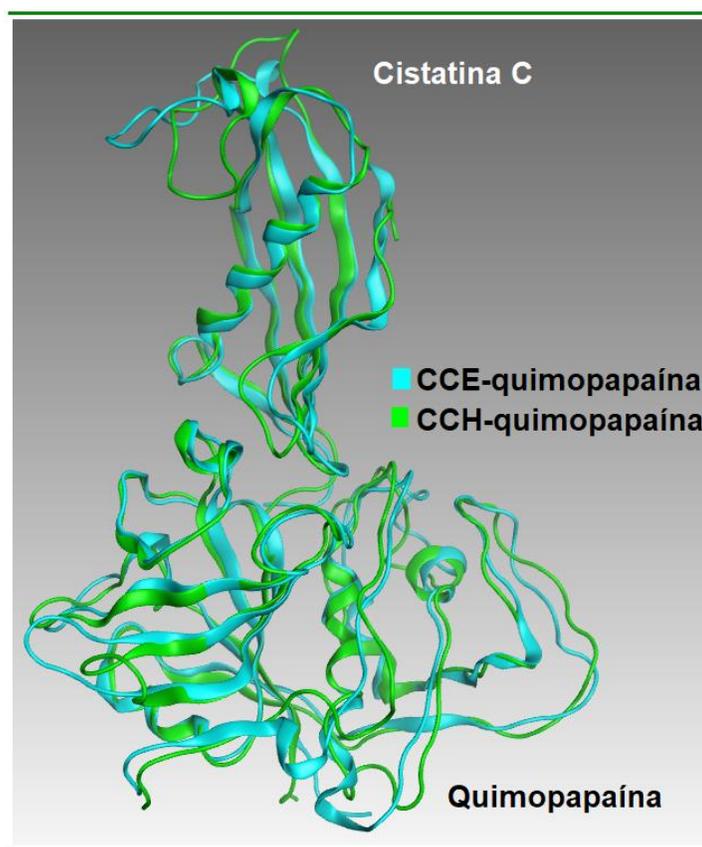


Figura 5.21. Estructura tridimensional de complejo cistatina C humana – quimopapaína. Aquí se muestra la sobreposición de los complejos CCH – quimopapaína y CCE – quimopapaína, la cual dio un RMSD de 1.9 Å respecto a los carbonos α . La figura se realizó en MOE 2014 (Molecular Operating Environment, www.chemcomp.com).

5.8.3 Simulación de DM de los modelos inhibidor – quimopapaína

La estabilidad estructural de los modelos, cistatina C humana – quimopapaína y cistatina C estabilizada – quimopapaína, obtenidos por acoplamiento molecular rígido, se evaluó por simulación de DM en solvente explícito a 350 y 450 K en un conjunto NPT durante 200 ns. La simulación de DM a 350 K de los complejos mostró que ambos complejos son estables durante el tiempo de simulación, según los perfiles de RMSD y radio de giro (Rg), presentados en la Figura 5.22. Además, la evolución del RMSF refleja poca movilidad de los carbonos- α , durante el tiempo de simulación (Figura 5.23). Por otro lado, la simulación de DM realizada a 450 K mostró un aumento paulatino en el RMSD del complejo CCH – quimopapaína, mientras que el perfil del RMSD correspondiente al complejo CCE – quimopapaína se muestra constante de los 40 – 115 ns (Apéndice E.2). Los perfiles obtenidos del Rg para ambos complejos mostraron fluctuaciones en su valor durante el tiempo de simulación sin

llegar a aumentar considerablemente (Apéndice E.2). La variación en el Rg de ambos complejos es debida a la redistribución de masa, generadas por cambios conformacionales, lo que evidencia que los complejos a 450 K no se mantienen compactos durante el tiempo de simulación (Figura E3).

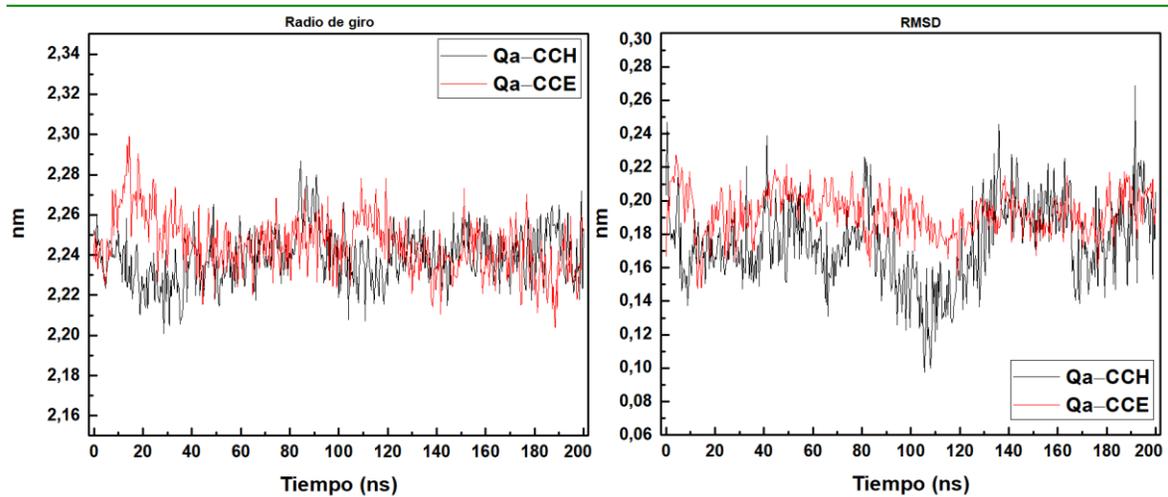


Figura 5.22. Perfiles del Rg y el RMSD obtenidos de la simulación de DM a 350 K. En el gráfico de la izquierda se muestra la evolución del radio de giro, mientras que el gráfico derecho corresponde al perfil de RMSD. En línea roja se muestra al complejo CCE – quimopapaína y los perfiles línea negra corresponde al CCH – quimopapaína.

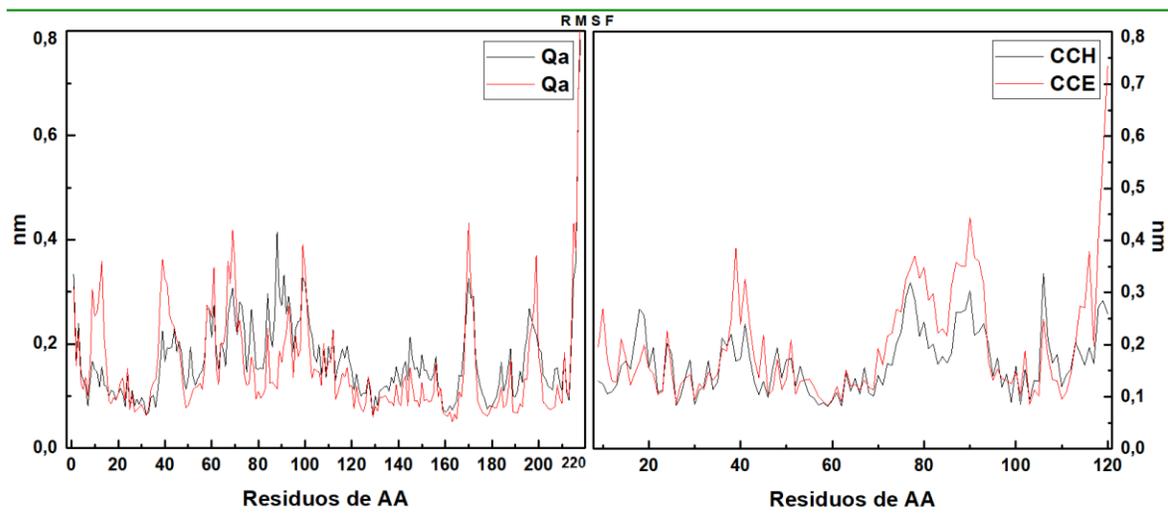


Figura 5.23. Perfiles obtenidos de RMSF para los complejos, dichos perfiles corresponden a la evolución de los sistemas durante los 200 ns de simulación de dinámica molecular a 350 K. El sistema CCE – quimopapaína se muestra en línea roja mientras que la línea negra corresponde al sistema CCH – quimopapaína.

La evolución de fluctuación cuadrática media obtenida de la simulación de dinámica molecular a 450 K de ambos complejos, mostró una mayor fluctuación en los residuos de AA correspondientes al complejo CCH – quimopapaína, sobre todo en el extremo carboxilo de la quimopapaína. Los perfiles de RMSF se muestran en el Apéndice E.

El análisis de la interfaz de los complejos inhibidor – quimopapaína, se realizó a partir de los modelos simulados por DM a 350 K. Al establecer un radio de corte $< 3.0 \text{ \AA}$ se encontraron un total de 7 interacciones para el complejo CCH – quimopapaína, de las cuales 5 eran de puentes de hidrógeno y 2 interacciones iónicas, mientras que el complejo CCE – quimopapaína presento 10 interacciones, de las cuales 8 son puentes de hidrógeno y 2 son interacciones iónicas. Las Figuras 5.24 y 5.25 muestra la distancia a la cual se encuentran los átomos y los residuos de aminoácidos involucrados. En la tabla 5.6 presenta un listado de las interacciones encontradas para ambos complejos, dentro de un radio de corte $< 3.0 \text{ \AA}$.

El complejo CCH – quimopapaína cuenta con un total de 56 residuos ocultos en la interfaz, de los cuales 31 son de quimopapaína y 25 de CCH, mientras el complejo CCE – quimopapaína tiene un total de 57 residuos en la interfaz de los cuales 32 pertenecen a quimopapaína y 25 a CCE, las listas de aminoácidos ocultos en la interfaz se muestran en el apéndice F.

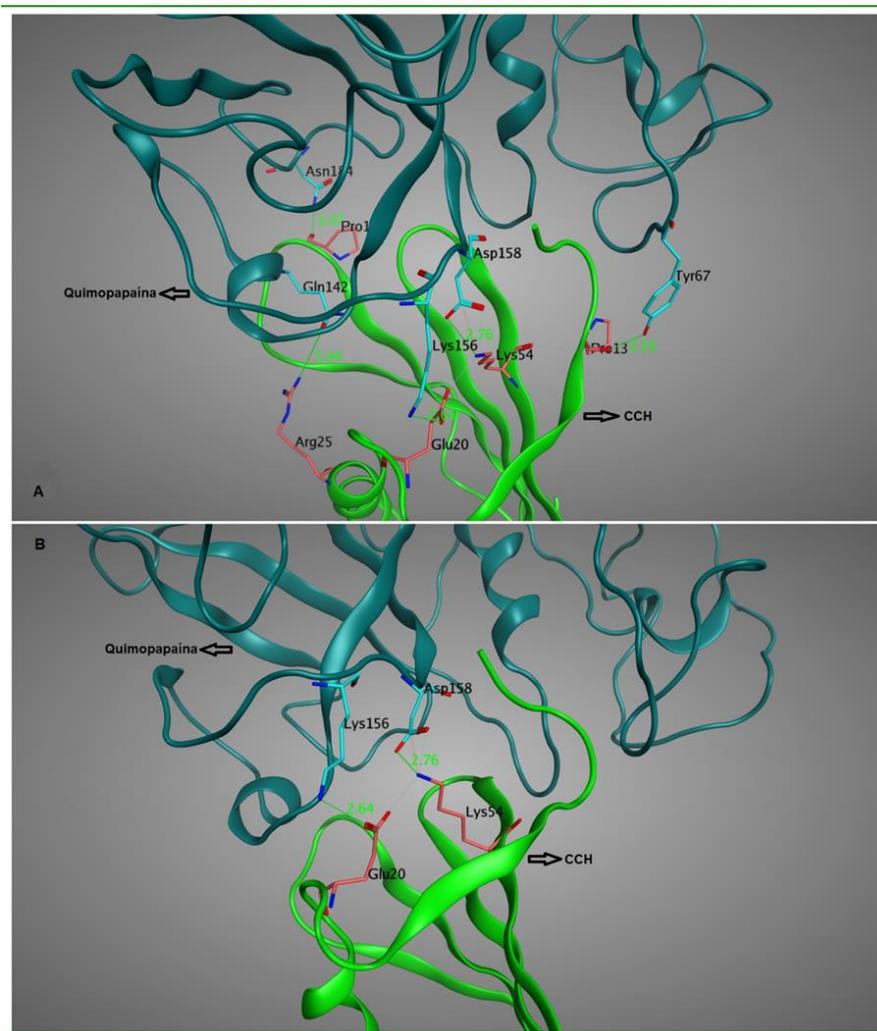


Figura 5.24. Interfaz del complejo CCH – quimopapaína. Se empleó un radio de corte de 3.0 Å. Aquí se muestra la localización de los 5 puentes de hidrógeno (panel A), así como los 2 pares iónicos (panel B) creados en la formación del complejo. Las cadenas laterales de los residuos de AA involucrados se resaltan en color rosa para CCH y en azul claro para quimopapaína. El nombre de los aminoácidos se muestra en color negro y las distancias en color verde. La figura se realizó en MOE 2014 (Molecular Operating Environment, www.chemcomp.com).

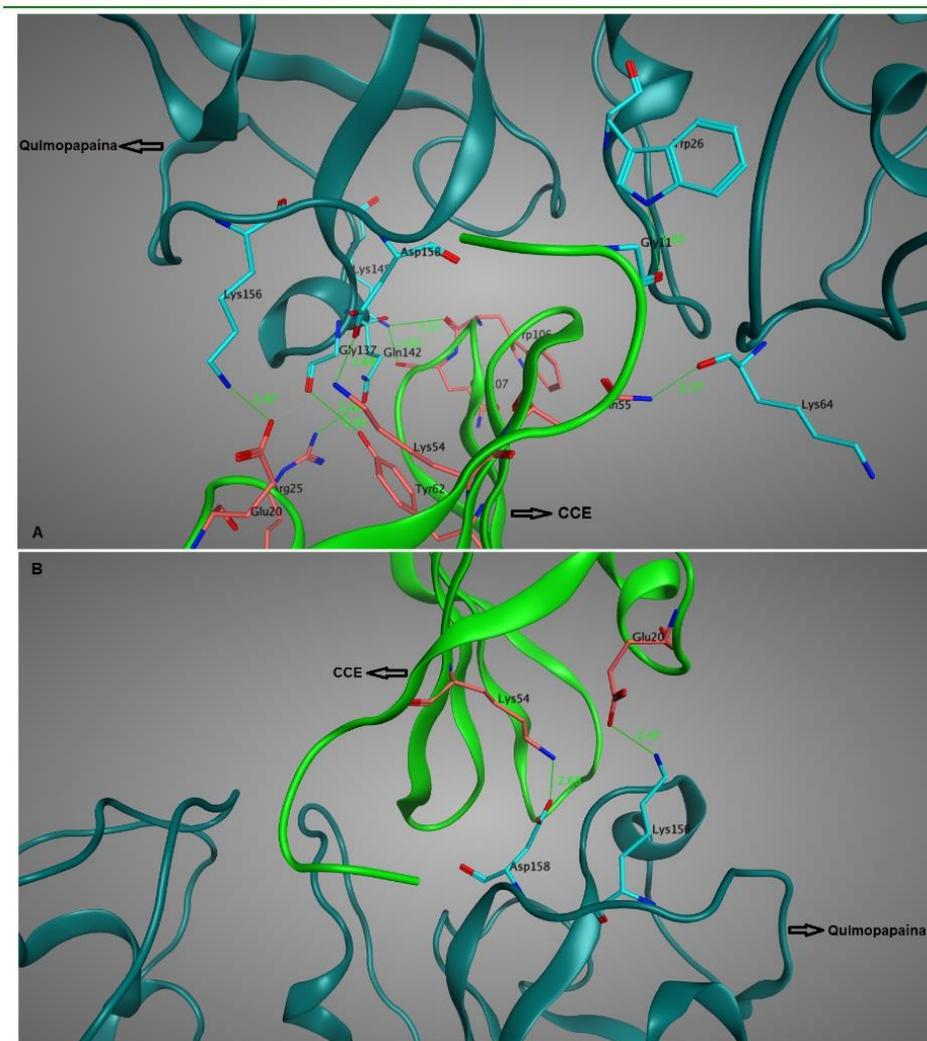


Figura 5.25. Interfaz del complejo CCE – quimopapaína. Aquí se muestra la localización de los 8 puentes de hidrógeno (panel A), así como los 2 pares iónicos (panel B) creados en la formación del complejo. Las cadenas laterales de los residuos de AA involucrados se resaltan en color rosa para CCE y en azul claro para quimopapaína, además el nombre de los aminoácidos involucrados se muestra en color negro y las distancias en color verde. Se fijó un radio de corte de 3.0 Å. La figura se realizó en MOE 2014 (Molecular Operating Environment, www.chemcomp.com).

Tabla 5.6. Lista de contactos presentes en la interfaz del complejo **CCH – quimopapaína** a un radio de corte $< 3 \text{ \AA}$. Aquí se enlistan 5 puentes de hidrógeno y 2 interacciones de tipo iónico.

Tipo de interacción	Quimopapaína	CCH
	AA (átomo)	AA (átomo)
PH	Tyr67 (OH)	Pro13 (O)
PH	Gln142 (OE1)	Arg25 (NH1)
PH	Lys156 (NZ)	Glu20 (OE1)
PH	Asp158 (OD2)	Lys54 (NZ)
PH	Asn184 (ND2)	Pro105 (O)
Iónica	Lys156 (NZ)	Glu20 (OE1)
Iónica	Asp158 (OD2)	Lys54 (NZ)

Tabla 5.7. Lista de contactos generados en la formación del complejo **CCE – quimopapaína** a un radio de corte $< 3 \text{ \AA}$. Dentro de este radio de corte se encuentran 8 puentes de hidrógeno y 2 interacciones de tipo iónico.

Tipo de interacción	Quimopapaína	CCE
	AA (átomo)	AA (átomo)
PH	Trp26 (NE1)	Gly11 (O)
PH	Lys64 (O)	Gln55 (NE2)
PH	Gly137 (O)	Tyr62 (OH)
PH	Gln142 (OE1)	Arg25 (NH1)
PH	Lys145 (NZ)	Trp106 (O)
PH	Lys145 (NZ)	Gln107 (O)
PH	Lys156 (NZ)	Glu20 (OE2)
PH	Asp158 (OD1)	Lys54 (NZ)
Iónica	Lys156 (NZ)	Glu20 (OE2)
Iónica	Asp158 (OD1)	Lys54 (NZ)

5.9 Estimaciones Teóricas de los Parámetros Termodinámicos de Unión

La estimación teórica del ΔH_U y ΔC_p para los complejos CCH–quimopapaína y CCE–quimopapaína, se realizó a partir de modelos semiempíricos presentados en las ecuaciones 6 y 7 que correlacionan estas variables con la magnitud de las áreas superficiales ΔASA ocultas en la interfaz, misma que se divide en sus contribuciones polar (ΔASA_p) y apolar (ΔASA_{ap}). Para calcular el valor de las ASA se empleó el programa *NACCESS*⁷¹, basado en el algoritmo de Lee y Richards⁶⁶, utilizando un radio de prueba de 1.4 Å, así como las coordenadas espaciales de los complejos y de las proteínas libres. Los valores de los cambios de áreas se muestran en la Tabla 5.8, mientras que el valor de los coeficientes de proporcionalidad Δh_p , Δh_{ap} , $\Delta C_{p,p}$ y $\Delta C_{p,ap}$ se presentan en la Tabla 4.3.⁷¹⁻⁷²

Tabla 5.8. Valor del área superficial accesible al solvente oculta en la interfaz del complejo PC – Inhibidor, así como el valor de sus contribuciones polar y apolar. Dichos valores se determinaron en el programa *NACCESS*.⁷¹

Complejo	ΔASA (Å ²)	ΔASA_p (Å ²)	ΔASA_{ap} (Å ²)
CCH – Qa	-2072.8	-1370.9	-701.9
CCE – Qa	-2008.3	-1249.5	-758.7

Los valores estimados para el ΔH_U de los complejos se presentan en la Tabla 5.9. El ΔH_U calculado con los coeficientes propuestos por García y Hernández⁶⁷ fueron los más próximos a los valores de ΔH_U obtenidos experimentalmente. El cambio en la capacidad calorífica estimado por los modelos semiempírico se subestimo, para el complejo CCH – quimopapaína el valor más próximo lo estimo el modelo de Myers y col.⁷⁰, mientras que para el complejo CCE – quimopapaína, el valor estimado de ΔC_p por el modelo Makhatadze & Privalov⁷¹ es el más próximo al ΔC_p obtenido experimentalmente.

Tabla 5.9. Valores de ΔH_U estimados por los modelos empíricos de área superficial accesible al solvente. Los valores se calcularon con los coeficientes de presentados en la Tabla 4.3.

Complejo	Modelo	ΔH_U (kJ/mol)
CCH – Qa	García & Hernández ⁶⁷	-90.80
CCE – Qa		-79.30
CCH – Qa	Luque & Freire ⁶⁸	-155.40
CCE – Qa		-137.50

Tabla 5.10. Valores de ΔC_p determinados a través de modelos de área superficial accesible al solvente. En la obtención de estos valores se utilizaron los coeficientes de correlación ($\Delta c_{p,p}$ y $\Delta c_{p,ap}$) presentados en la Tabla 4.3.

Complejo	Modelo	ΔC_p (kJ/mol K)
CCH – Qa	Murphy & Freire ⁶⁹	0.17
CCE – Qa		-0.07
CCH – Qa	Myers y col. ⁷⁰	-0.31
CCE – Qa		-0.42
CCH – Qa	Makhatadze & Privalov ⁷¹	-0.29
CCE – Qa		-0.52

Capítulo 6
DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 Construcción, purificación y caracterización de la cistatina C humana y su mutante (L47C/G69C).

El análisis de la secuencia de nucleótidos del pET-24a(+)-CCE aseguró el éxito del experimento de mutagénesis, ya que dicha secuencia contiene al codón TGT que codifica para cisteína, en las posiciones 47 y 69 correspondientes a la secuencia de AA de la cistatina C humana. Por otro lado, la cepa C3030H-CCE expresó la cistatina C estabilizada, dado que la electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida presentó una banda intensa, localizada a la altura de una muestra homogénea de CCH, además ambas muestras migraron de manera similar al estándar correspondiente a una masa molecular de 14.4 kDa (Figura 5.2).

Se obtuvieron soluciones homogéneas de CCH y CCE a partir de la metodología implementada para la purificación. En la etapa intermedia correspondiente a la cromatografía de intercambio aniónico (Figura 5.4) la cistatina C humana no interacciona con la matriz de la columna, este uso atípico de la cromatografía es debido a que la cistatina C humana en su forma completa tiene un pI de 9.2, lo que hace que un alto porcentaje de la proteína se encuentra sin carga neta o ligeramente positiva en las condiciones de trabajo pH 8.8. Sin embargo las proteínas con un pI por debajo del pH de trabajo son atrapadas en la matriz de la columna ya que adquieren carga negativa.²³⁻²⁴ En investigaciones previas donde se purificó la cistatina C humana recombinante, realizaron dos etapas cromatográficas, una de intercambio aniónico a pH 9.0 para aprovechar la basicidad de la proteína, seguida de una cromatografía de exclusión molecular en una columna superdex 75.^{35, 36} En el presente estudio se introdujo un paso preparativo de cromatografía en gel para eliminar las proteínas grandes, dado que en la cromatografía de intercambio aniónico se empleó una columna DEAE (Dietilaminoetil-celulosa) que proporciona una interacción débil, y se podrían arrastrar proteínas con una pI similar al de la cistatina C.

El análisis de las muestras finales de CCH y CCE por electroforesis SDS-PAGE, mostró para ambos inhibidores una sola banda a la altura del marcador de 14.4 kDa (Figura. 5.6, carril 2 y 3). Por otro lado, los espectros de masas de CCH y CCE mostraron un solo pico, con valores de 12537 Da y 12575 Da, respectivamente. Estas masas corresponden a la cistatina C humana truncada en su extremo amino a la altura de la leucina 9. El protocolo de purificación nos permite obtener un rendimiento de aproximadamente 8 mg por litro de cultivo para ambos inhibidores.

Los espectros de dicroísmo circular obtenidos a pH 7.0, sugieren que en estas condiciones las proteínas no sufren cambios en su estructura secundaria, ya que son comparables con espectros reportados en otros trabajos.³⁷ El espectro de DC en el ultravioleta lejano de ambos inhibidores muestra que estos se pliegan de manera similar, lo que indica que el puente disulfuro introducido por las mutaciones puntuales L47C/G69C no afecta la estructura secundaria de la cistatina C humana. El análisis de los espectros de DC con el programa K2D2,⁷⁵ predijo un contenido del 34% en la estructura hoja β y un 9% de hélice α , la predicción del contenido de estructura secundaria va de acuerdo con los porcentajes obtenidas a partir de la estructura cristalográfica de la CCE³⁸, que son del 47% en hoja β y del 13% en hélice α . Los espectros de fluorescencia intrínseca de CCH y CCE muestran que las mutaciones en CCH no provocaron alteraciones significativas en la estructura terciaria de esta ya que el centro de masa espectral de ambas proteínas es el mismo (Tabla 5.2).

Se determinó, que el número de puentes disulfuro presentes en la CCE son 3 y están formados por los pares C73-C83, C97-C117 y C47-C69. Este resultado es determinante y asegura la formación del nuevo puente disulfuro, introducido para estabilizar la estructura respecto a la formación de dímeros u oligómeros más grandes.

La obtención de ambos inhibidores escindidos en su extremo amino terminal ya ha sido reportado, en diversos trabajos mencionan el truncamiento del extremo amino, aunque no está claro que es lo que lo promueve. Los valores de la K_i (constante de inhibición o constante de disociación) presentados en la Tabla 6.1^{24, 25} muestran una variación con la pérdida del extremo amino. Para algunas proteasas cisteínicas (Ej. catepsina B y L) esta variación es muy alta mientras que en otras no genera cambios significativos (Ej. catepsina H).²⁴

Tabla 6.1. Constantes de inhibición K_i en nM para sistemas donde participa la cistatina C nativa, así como la cistatina C escindida en su N-terminal.^{24, 35}

Inhibidor	K_i (nM)		
	Catepsina B	Catepsina L	Catepsina H
Cistatina C nativa	0.148 \pm 0.011	< 0.005	0.35 \pm 0.03
Cistatina C trunca	101 \pm 4	2.11 \pm 0.29	2.15 \pm 0.27

6.1.1 Carboximetilación, purificación y caracterización de la cmQ.

El espectro de dicroísmo circular en el UV lejano obtenido para cmQ, corresponde con espectros de DC reportados previamente^{26, 83}, esto indica que la estructura secundaria no se ve afectada por la modificación química hecha en la cisteína 25 y cisteína 117. El espectro se analizó con el programa K2D2,⁷³ el cual estimó un contenido del 10% de hélice α contra un 44.5% de conformación β , estos porcentajes discrepan del contenido de estructura secundaria basado en la estructura 3D de la quimopapaína²⁹ (48.6 % en hoja β y un 49.5 % de hélice α) sobre todo la estimación del porcentaje de hélice α .

6.2. Propiedades Estructurales presentes en la formación del complejo

Los espectros de emisión correspondientes a las mezclas de cmQ 0.1 μ M con CCH ó CCE 0.12 μ M (Figura 5.11), muestran un considerable decaimiento a los 337 nm en la señal de fluorescencia en comparación con el espectro calculado como la suma de la IF de las proteínas libres (IF-cmQ + IF-Inhibidor), el abatimiento en la señal es evidencia de que se está formando el complejo. Por otro lado, el apagamiento sugiere la participación de residuos aromáticos en la formación del complejo, los cuales quedan ocultos en la interfaz de este y que en sus formas libres están expuestas al solvente. Este resultado es congruente con otros trabajos, donde reportan la participación de triptófanos en la formación de complejos PC – inhibidor, los cuales quedarían ocultos en la interfaz.^{64, 84}

6.3 Estabilidad estructural de la cistatina C humana y de la mutante L47C/G69C

El análisis por CEM y DDL realizados a la CCH y CCE muestran claramente que la CCH a concentraciones ≥ 0.20 mg/mL forma dímeros (Figura 5.12). Además, el calentamiento de las soluciones de CCH a 65 °C aumentó la concentración de dímeros y promovió la formación de agregados de alta masa molecular (Figura. 5.13).⁷⁷ Sin embargo, la cistatina C estabilizada se mantuvo como monómero incluso a altas concentraciones y temperaturas debido a que el enlace de disulfuro (C47-C69) adicional, funciona como una grapa que impide la separación de sus dominios.^{35-36, 76} Por otro lado, el análisis de la estabilidad térmica de ambos inhibidores hecho por calorimetría diferencial de barrido (CDB) muestra que la desnaturalización térmica de ambas cistatinas es irreversible, ya que estas no presentaron un cambio significativo en la capacidad calorífica de la solución en un segundo barrido térmico, realizado enseguida que las muestras se enfriaron. En la Tabla 5.2 se presenta los valores de ΔH_{cal} y ΔH_{vH} obtenidos al analizar las trazas calorimétricas, suponiendo un modelo de equilibrio de dos estados, correspondientes a los barridos independientes de cada inhibidor (Figura

5.14). Aunque las ecuaciones de equilibrio no son aplicables bajo estas condiciones, el cálculo del cambio en la entalpía de van't Hoff y su comparación con el cambio en la entalpía calorimétrica, por la relación $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$, puede ayudar a comparar la molecularidad de los procesos, en el caso de la CCH esta relación es de 2.92 lo que indica que previo a la desnaturalización térmica la CCH, esta se encuentra en forma de dímero u oligómero.^{51, 78}

La CDB mostró que el puente disulfuro adicional confirió un aumento en la estabilidad térmica de la proteína, desplazando la T_m desde 78.6 °C a 89.5 °C y disminuyendo la relación $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ a 1.86 (Tabla 5.2). El efecto estabilizador del puente C47-C69 resulta de una disminución de la entropía conformacional de la cadena desplegada, que ha sido estimada por la ecuación 9.⁷⁹

$$\Delta S = -8.8 - (3/2)R \cdot \ln n \quad (\text{Ec. 9})$$

donde n representa el número de residuos que forman el lazo del enlace disulfuro, siendo este 23 para el puente disulfuro C47-C69 de CCE. Por lo tanto, la disminución de la entropía causada por este enlace (ΔS) calculada usando la Ecuación 9 es de 48 J/K mol. Sólo como referencia, si asumimos que ambas desnaturalizaciones son reversibles y que la estabilización energética del nuevo puente disulfuro se debe enteramente a este efecto entrópico, es decir, $\Delta \Delta H = 0$, esperaríamos una T_m con un valor de 93.9 °C para la CCE (Apéndice D). Más aun, la mayor relación $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ de 2,92 para el CCH en comparación con 1,86 para el CCE revela la mayor naturaleza oligomérica de las especies que sufren desnaturalización térmica en el caso del CCH.^{51, 78}

6.4 Caracterización termodinámica de los complejos por CTI.

En los experimentos de CTI se requieren muestras concentradas de proteína, sobre todo si se emplea como titulante, en este sentido la propensión de CCH a formar dímeros limita su uso a concentraciones superiores a los 0.20 mg/mL. Para el sistema cmQ – CCH, la CCH se colocó en la celda de calorímetro mientras que la jeringa se cargó con cmQ. En contraste, para el complejo cmQ – CCE, la celda del calorímetro se llenó con la cmQ mientras que la CCE se utilizó como titulante.

Los parámetros termodinámicos ΔH_U , ΔG_U obtenidos en las titulaciones calorimétricas se hicieron más negativos conforme aumentó la temperatura, mientras que el factor entrópico $T\Delta S_U$ disminuyó pasando de positivo a negativo. Las afinidades medidas de la cmQ por ambos inhibidores es muy

similar en este intervalo de temperatura y cuentan con un valor medio de K_U de $6.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (cmQ – CCE) y $3.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (cmQ – CCH), la afinidad ligeramente mayor de la proteasa por CCE en comparación con la CCH ya ha sido reportada anteriormente para catepsina B, mostrando valores para K_i de 0.23 nM (K_U de $4.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) y 0.37 nM (K_U de $2.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) respectivamente.³⁵

El valor promedio de K_U del sistema cmQ – CCH comparado con el valor de K_U del complejo Q-activa – CCH ($3.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$),⁸⁰ da una disminución en la afinidad de 22.9 kJ/mol a 300 K ($\Delta\Delta G_U = RT \ln K_{U1}/K_{U2}$). Esta reducción podría ser causada principalmente por el grupo carboximetilo, introducido en el átomo de azufre de la cisteína catalítica de la quimopapaína, que obstaculiza la interacción con el inhibidor. Ya se ha reportado la K_U para los complejos de CCH con actinidina y con cm-actinidina, los valores respectivos de K_U son $5.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $8.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$,⁵⁰ lo que da un valor de 10,4 kJ/mol para $\Delta\Delta G_U$, que es sólo la mitad de la disminución de la energía obtenida con los complejos de cmQ. La descomposición de la energía en sus componentes entálpicos y entrópicos mediante la calorimetría de titulación isotérmica ayudará a comprender mejor las bases moleculares que acompañan estos procesos. El valor promedio de ΔG_U para el complejo de cmQ–CCE es sólo un 2.0 % más negativo que el de CCH (Tabla 5.3), y esta diferencia se debió principalmente al componente entrópico ΔS_U , que, a las temperaturas de 10 °C, 15 °C, y 25 °C es favorable mientras que a 35 °C es desfavorable. En todas las temperaturas de estudio la contribución favorable o desfavorable de la entropía es mayor para la unión de cmQ a CCH como se aprecia en la Figura 6.1. La disminución en la contribución entrópica puede ser explicada por las restricciones impuestas por el nuevo disulfuro en la CCE libre. Asumiendo que el estado final de la unión en ambos complejos está igualmente restringido, la rotación de los enlaces ya restringidos previamente por el nuevo puente disulfuro en la CCE libre no contribuirán en la disminución de la entropía de unión.

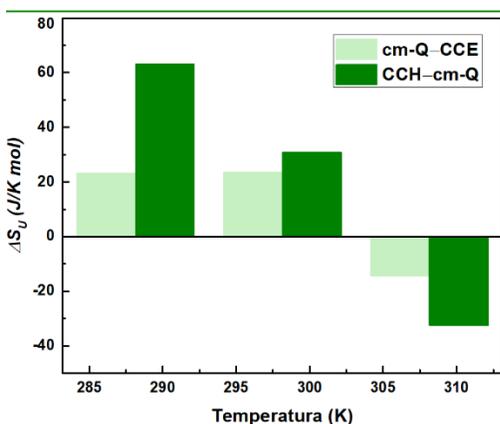


Figura 6.1. Contribución entrópica. Aquí se muestra la variación de ΔS_U con la temperatura de la unión de cmQ a CCE y CCH representadas en color verde claro y verde oscuro respectivamente.

El valor n referente a la estequiometría del sistema es < 1 en todas las titulaciones calorimétricas realizadas para ambos sistemas. Esta estequiometría fraccionaria se puede deber a diferentes factores, los cuales pueden ser: que el receptor no cuente con el 100 % de sitios disponibles, que la determinación de la concentración de CCH incluya tanto su forma monomérica como su forma dimerica y también se puede ver afectada por una sobre o subestimaciones en las concentraciones de los componentes del sistema.

La dependencia térmica de la ΔH_U mostró valores negativos para el ΔC_p de los complejos, sin embargo, el ΔC_p de la unión de CCH a cmQ presento un valor de 2 veces mayor (-1.42 kJ/mol K) obtenido para el complejo CCE – quimopapaína (-0.72 kJ/mol K). El ΔASA_p es mayor para el complejo CCH – quimopapaína, lo que contribuye al valor más negativo de ΔC_p , esta diferencia también podría deberse a que durante la formación del complejo se estén atrapando un mayor número de moléculas de agua que las atrapadas en el complejo CCE – quimopapaína, considerando que cada molécula de agua inmovilizada puede contribuir en un rango de -34 J/K mol a -130 J/K mol.^{82, 85}

6.5 Simulación de DM de los inhibidores

El análisis de simulación por DM realizado a 350 K mostró que la movilidad de los carbonos α en ambas cadenas es muy similar, esto lo observamos en los perfiles de RMSD presentados en el Apéndice E. Figura E1. Los perfiles obtenidos de RMSF resultaron ser casi superponibles, mostrando la mayor diferencia en los aminoácidos correspondiente a las regiones carentes de estructura (Figura E1). La simulación de DM a 450 K mostró el despliegue de la cadena polipeptídica en ambas proteínas. Sin embargo, mientras que la cistatina C silvestre perdió parte de su estructura secundaria (hélice α) en los primeros 15-30 ns, la cistatina C estabilizada perdió dicha estructura hasta los 100 ns (Figura. 5.18 A). A 450 K, la movilidad es sólo ligeramente mayor para CCH, incluso cerca de la ubicación donde se introdujo el nuevo puente de disulfuro en la CCE. Sin embargo, una excepción importante se dio en el extremo amino y la región de la hélice α que mostraron mucho mayor movilidad en la CCH como se aprecia en los perfiles de RMSF expuestos en la Figura 5.18 B. Este resultado es acorde a lo mostrado por la CDB donde el desplegamiento térmico de ambos inhibidores reflejó mayor estabilidad en la CCE.

6.5.1 Simulación de Dinámica Molecular de los complejos

La estabilidad de los complejos CCH – quimopapaína y CCE – quimopapaína se vio reflejada en la simulación de DM a 350 K realizada a las estructuras 3D modeladas. Durante el tiempo de simulación

los perfiles obtenidos para el RMSD registraron mínimas variaciones respecto a los carbonos α de la estructura inicial, además la estructura 3D se mantuvo compacta ya que perfil del Rg se mantuvo casi constante (Figura 5.22). Los perfiles de RMSF también reflejaron la estabilidad de los complejos al mostrar una movilidad casi idéntica en los carbonos α de los residuos (Figura 5.23). Sin embargo, las estructuras 3D de los complejos simuladas por DM a 450 K, mostraron pérdida de estructura secundaria, los perfiles de RMSD obtenidos revelan una variación importante a partir de los 40 ns, (Figura E2), dicho aumento se debe principalmente a la pérdida de estructura secundaria tanto en quimopapaína como en ambos inhibidores. Aunque los componentes de ambos complejos se mantuvieron unidos, el Rg de las estructuras 3D refleja una redistribución de masa, generada por cambios conformacionales, las estructuras 3D no se mantuvieron compactas (Figura E2). Los perfiles de RMSF presentan una movilidad considerablemente mayor para el complejo de CCH – quimopapaína, sobre todo en la región del carboxilo terminal tanto de quimopapaína como de CCH (Figura E3).

El análisis de la interfaz muestra que las interacciones presentes a un radio de corte de 3 Å, son de tipo puente de hidrógeno y puente salino. El complejo CCE – quimopapaína formo 3 puentes de hidrógeno más que el complejo CCH – quimopapaína (Tabla 5.7). Este mayor número de puentes de hidrógeno podría ser una de las causas de un ΔH_U más negativo para CCE que origina una mayor afinidad por cmQ respecto a CCH.

6.6 Estimación teórica del ΔC_p y el ΔH_U

Los valores de ΔH_U obtenidos a partir de los modelos semiempíricos basado en cambios en el área superficial, aunque predicen el carácter exotérmico de la formación del complejo, están sobreestimados. Además, dichos modelos predicen un cambio de entalpia de unión más exotérmica para la unión de cmQ a CCH que para CCE, lo que no coincide con lo observado experimentalmente a 25 °C.

El cambio en la capacidad calorífica, ΔC_p , estimado por el modelo semiempírico de ASA predice el ΔC_p más negativo para el complejo CCE – quimopapaína lo que coincide con lo observado experimentalmente. Por otro lado, el ΔC_p estimado es menos negativo para ambos complejos que el determinado experimentalmente; esto puede deberse a varios factores como lo son; los rearrreglos estructurales que acompañan la formación del complejo, cambios en el estado de protonación de grupos ionizables, el alojamiento de moléculas de agua en la interfaz y al intercambio de contraiones que no se consideran en la determinación de los coeficientes de proporcionalidad.⁸²

El área polar oculta (en promedio 1310 \AA^2) de ambos complejos es casi el doble del área no polar (en promedio 729 \AA^2) lo que podría favorecer la presencia de moléculas de agua en la interfaz. Mejores predicciones de los parámetros ΔH_U y ΔC_p podrían lograrse al determinar nuevos coeficientes de proporcionalidad a partir de datos experimentales de la energética de unión de la CCE a distintas proteasas cisteínicas y sus cambios en el área superficial oculta en la formación del complejo.

En cuanto al último objetivo particular, no podemos aún aportar nuevos datos para los modelos de área superficial. Sin antes descartar otras posibles contribuciones a los inusuales valores de ΔH_U y ΔC_p , como cambios de protonación ó atrapamiento de moléculas de agua.

Capítulo 7.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 CONCLUSIONES

El enlace disulfuro adicional introducido en la CCE le confiere mayor estabilidad térmica, aumentando en 11 °C la T_m respecto a la CCH. El efecto estabilizador del puente C47-C69 puede explicarse en gran medida por una disminución de la entropía conformacional de la cadena desplegada.

La mutante CCE es resistente a la formación dímeros y oligómeros superiores lo que hace que esta variante sea un mejor modelo para estudiar la afinidad hacia diferentes proteasas cisteínicas que el inhibidor silvestre, CCH.

La afinidad de la cmQ por la cistatina C estabilizada es sólo ligeramente mayor (entre 2 y 8 %) que por la cistatina C silvestre, en términos de ΔG_U .

Las simulaciones de dinámica molecular a 350 K en solvente explícito de los complejos inhibidor – quimopapaína, mostraron que ambos complejos son estables y los componentes se mantienen unidos por interacciones tipo puente de hidrógeno y puentes salinos.

Las simulaciones de dinámica molecular a 450 K en solvente explícito de ambos inhibidores, CCH y CCE, mostraron que la hélice α se pierde más rápidamente en la cistatina C silvestre (de 15 a 30 ns) que en la estabilizada (100 ns).

7.2 PERSPECTIVAS

- Resolver la estructura cristalográfica del complejo cmQ – CCE por difracción de rayos X.
- Discernir si el valor anómalo de ΔC_p es debido a la captura de moléculas de agua en la interfase u otro efecto.
- Caracterizar la termodinámica de unión de CCE a diferentes proteasas cisteínicas (PC) y comparar las relaciones energético-estructurales de los complejos formados.
- Revisar los coeficientes de proporcionalidad Δh_p , Δh_{ap} , $\Delta C_{p,p}$ y $\Delta C_{p,ap}$ para sistemas proteína–proteína, con nuevos datos experimentales de complejos PC–CCE.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amit Kessel, Nir Ben-Tal. (2011) **Introduction to proteins: structure, function, and motion**. Boca Raton, FL: CRC Press
2. Lehninger, A. L., Nelson D. L. y Cox M. M. (2005) **Principios de Bioquímica**, cuarta edición, Ed. Omega, Barcelona, España.
3. Christopher K. Mathews, K. E. Van Holde, Dean R. Appling y Spencer J. Anthony-Cahill. (2013). **Bioquímica**. Cuarta edición, Ed. PEARSON EDUCACIÓN
4. David Balchin, Manajit Hayer-Hartl, F. Ulrich Hartl. (2016). **In vivo aspects of protein folding and quality control**. Science. 353, Issue 6294, aac4354.
5. Huihua Sun, Hongfang Zang, Ea Lui Ang, Huimin Zhao. **Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates**. Bioorganic and Medical Chemistry. 26: 1275-1284
6. E. Fischer, Ber. Dtsch. Chem. (Ges. 1894) 27. 2985.
7. Daniel E. Koshland, Jr. (1994) **The key-Lock theory and the induced fit theory**. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2375-2378
8. Sinead Boyce, Keith F Tipton. (2001). **Enzyme classification and Nomenclature**. Encyclopedia of life sciences/ Nature publishing group.
9. Feijoo-siota L, Villa T. G. (2011). **Native and biotechnologically engineered plant protease with industrial applications**. Food Bioprocess Technology. 4: 1066-1088
10. Poorani Gurumalles, Kamalini Alagu, Baskar Ramakrishnan, Shanmugaprasanth Muthusamy. (2019). **A systematic reconsideration on proteases**. Biological Macromolecules. 128: 254-267
11. Joel D. A. Tyndall, Tessa Nall, David P. Fairlie. (2005). **Proteases universally recognize beta strands in their active sites**. Chemical Reviews. 105: 973-999
12. Rawlings, N. D., Barret Alan J., Thomas Paul D., Huang Xiaosong, Bateman Alex y Finn Robert D. (2018). **The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitor in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database**. Nucleic Acids Research. 46: D624-D632
13. <http://www.ebi.ac.uk/merops/>
14. A. K. Balls, Hans Lineweaver y R. R. Thompson. (1937). **Crystalline Papain**. Science 86: 3794.

15. Baldev S. Baines y Keith Brocklehurst. (1981). **Isolation and characterization of the four major cysteine-proteinase components of the latex of Carica Papaya L. Reactivity characteristics towards 2,2'-Dipyridyl disulfide of the thiol groups of papain, chymopapains A and B, and papaya peptidase A.** Journal of Protein Chemistry. 1: 119-139
16. Zbigniew Grzonka, Elzbieta Jankowska, Franciszek Kasprzykowski, Regina Kasprzykowska, Leszek Lankiewicz, Wieslaw Wicz, Ewa Wieczerzak, Jerzy Ciarkowski, Piotr Drabik, Robert Janowski, Maciej Kozak, Mariusz Jaskólski and Anders Grubb (2001). **Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors.** Acta Biochimica Polonica 48(1): 1-20
17. Adelina S. Oliveira, José Xavier-Filho y Maurício P. Sales. (2003). **Cysteine Proteinases and Cystatins.** Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal 46(1):91 – 104
18. Malgorzata Rzychon, Dorota Chmiel and Justyna Stec-Niemczyk. (2004). **Modes of inhibition of cysteine proteases.** Acta Biochimica Polonica. 51(4):861-873
19. Sonia Verma, Rajnikant Dixit and Kailash C. P. **Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets.** (2016). Frontiers in Pharmacology 7:107
20. Otto, Hans-Hartwing and Schirmeister, Tanja. (1997). **Cystatin, proteases and their inhibitors.** Chemical Reviews. 7(1): 133-172
21. Josiah, O. y Gautam C. (2010). **Cystatin Superfamily.** Journal of Health Care for the Poor and Underserved 21(1): 51-70
22. Aijiang Guo. (2015). **Comparative analysis of cystatin superfamily in platyhelminths.** Plos One. DOI:10.1371
23. Björk I, Pol E, Raub-Segall E, Abrahamsn M, Rowan AD, Mort JS. (1994). **Differential changes in the association and dissociation rate constants for binding of cystatins to target proteinases occurring on N-terminal truncation of the inhibitors indicate that the interaction mechanism varies with different enzymes.** Biochem. J. 299: 219-225
24. M. Abrahamson, R. W. Mason, H. Hansson, David J. Buttle, A. Grubb y Kjell Ohlsson. (1991). **Human cystatin C: Role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and in its inactivation by leucocyte elastase.** Biochem. J. 273: 621-626
25. Klemenčič I, Carmona A. K., Cezari M. H. S., Juliano M, A. Juliano L., Gunčarg, G., Turk D., Krizčaj, Turk V., Turk B. (2000). **Biochemical characterization of human cathepsin X**

- revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *European Journal of Biochemistry*. 267: 5404-5412.
26. Silvia Solís Mendiola, Rafael Zubillaga Luna, Arturo Rojo Domínguez y Andrés Hernández Arana. (1989). **Structural similarity of chymopapain forms as indicated by circular dichroism.** *Biochemical Journal* 257: 183-186
 27. David J. Buttle y Alan J. Barrett, (1894). **Chymopapain. Chromatographic purification and immunological characterization.** *Biochemical Journal* 223: 81-88
 28. Baldev S. Baines y Keith Brocklehurst. (1982). **Isolation and Characterization of the Major Cysteine-Proteinase Components of the Latex of Carica Papaya L. Reactivity Characteristics Towards 2,2'-Dipyridyl Disulfide of the Thiol Groups of Papain, Chymopapains A and B, and Papaya Peptidase A.** *Journal of Chemistry* 1(2): 119-139
 29. Maes Dominique, Julie Bouckaert, Poortmans Freddy, Wyns Lode y Ivan Looze. (1996). **Structure of chymopapain at 1.7 Å resolution.** *Biochemistry* 35(50): 16292-16298.
 30. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
 31. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
 32. Abrahamson M. (1996). Molecular basis for amyloidosis related to hereditary brain hemorrhage. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 226: 47-56
 33. Levy, E. (2008). **Cystatin C: a potential target for Alzheimer's treatment.** *Expert Reviews of Neurotherapeutics* 8: 687-689.
 34. M. Sastre, M. Calero, M. Pawlik, PM. Mathews, A. Kumar, V. Danilov, SD. Schmidt, RA. Nixon, B. Frangione y E. Levy. (2004). **Binding of cystatin C to Alzheimer's amyloid beta inhibits in vitro amyloid fibril formation.** *Neurobiol Aging*. 25: 1033-1043
 35. Maria Nilsson, Xin Wang, Sylwia Rodziewicz-Motowidlo, Robert Janowski, Veronica Lindström, Patrik Önerfjord, Gunilla Westermarck, Zbigniew Grzonka, Mariusz Jaskolski y Anders Grubb. (2004). **Prevention of Domain Swapping Inhibits Dimerization and AmyloidFibril Formation of Cystatin C.** *The Journal of Biological Chemistry* 279(23): 24236-24245.
 36. Gustav Ranheimer Östher, Veronica Lindström, Per Hjort Christensen, Maciej Kozak, Magnus Abrahamson y Anders Grubb. (2013). **Stabilization, Characterization and Selective Removal of Cystatin C Amyloid Oligomers.** *The Journal of Biological Chemistry* 288(23): 16438-50
 37. Yongjun Zhou, Yan Zhou, Jun Li, Jian Chen, Yuquin Yao, Lin Yu, Desheng Peng, Mingrong Wang, Dan Su, Yong He y Lantu Gou. (2015). **Efficient expression, purification and**

- characterization of native human cystatin C in Escherichia coli periplasm.** Protein Expression and Purification. 111: 18-22
38. Robert Kolodziejczyk, Karolina Michalska, Alejandra Hernandez-Santoyo, Maria Wahlbom, Anders Grubb y Mariusz Jaskolski. (2010). **Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation.** The FEBS Journal 277(7): 1726–1737.
39. Cheryl L. Meyerkord, Haiyan Fu. (2015). **Protein – Protein Interactions Methods and Applications.** Segunda edición. Ed. Springer. Cap. 2.
40. Susan Jones y Janet M. Thornton. (1996). **Principles of Protein – Protein Interactions.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93:13-20.
41. Cheryl L. Meyerkord, Haiyan Fu. (2015). **Protein – Protein Interactions Methods and Applications.** Segunda edición. Ed. Springer. Cap. 11.
42. Irene M.A. Nooren y Janet M. Thornton. (2003). **Diversity of protein – protein interactions.** The EMBO journal. 22(14):3486-3492.
43. Kuckiń, P.; Nielsen, J.E. (2010). **Electrostatic in proteins and protein-ligand complexes.** Future Medical Chemistry. 2(4): 647-66.
44. Bode, B., Huber R. (2000). **Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction.** Biochimica et Biophysica Acta. 1477: 241-252.
45. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky y Darnell. **Biología Celular y Molecular.** 5ª Edición. Editorial Medica Panamericana. 2005.
46. Agilent Technologies: *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*
47. MP Biomedicals: *Transform & Grow™ Bacterial Transformation Kit*
48. QIAGEN: *QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol*
49. Juan José Calvete. (2007). **Determinación del número de grupos sulfhidrilo y de enlaces disulfuro mediante espectrometría de masas.** PROTEÓMICA. 0: 21-28.
50. Lindahl P, Abrahamson M, Björk I. (1992). **Interaction of recombinant human cystatin C with the cysteine proteinases papain and actinidin.** Biochem J. 281: 49-55.
51. Žerovnik E, Cimerman N, Kos J, Turk V., Lohner K. (1997). **Thermal denaturation of human cystatin C and two of its variants; comparison to chicken cystatin.** Biol Chem 378:1199-1203.
52. Michael L Doyle. (1997). **Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry.** Analytical biotechnology. 8: 31-35

53. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin L-N. (1989). **Rapid measurement of binding using a new titration calorimeter.** *Anal. Biochem.* 179: 131-137
54. Irving M. Klotz. (1997). **Ligand-Receptor Energetics a guide for the perplexed.** Northwestern University. John Wiley & Sons. Pag. 16-21
55. Dolinsky TJ., Nielsen JE., McCammon JA., Baker NA. (2004) **PDB-2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations.** *Nucleic Acids Res.* 32: W665-W667.
56. Abraham MJ., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith JC., Hess B., Lindhal E. (2015) **GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers.** *SoftwareX* 1-2:19.25
57. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J (1996) **Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids.** *J Am Chem Soc* 118:11225–11236
58. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM (1997) **LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations.** *J Comput Chem* 18:1463–1472
59. Darden T, York D, Pedersen L (1993) **Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems.** *J Chem Phys* 98:10089–10092
60. <http://www.uniprot.org>
61. <http://life.bsc.es/servlet/pydock/home>
62. Jimenez-García, B., Pons, C., Fernández-Recio, J. (2013). **pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring.** *Bioinformatics.* 29: 1698-1699.
63. Vijayalakshmi Chellian, Tom L. Blundell and Juan Fernández-Recio. (2006). **Efficient Restraints for Protein–Protein Docking by Comparison of Observed Amino Acid Substitution Patterns with those Predicted from Local Environment.** *Journal of Molecular Biology* 357, 1669-1682.
64. Stubbs M. T., Laber B., Bode W., Huber R., Jerala R., Lenarcic B., Turk V. **The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor.** *The EMBO journal*, 1990, 9(6), 1939-1947.
65. Fan, H.; Mark, A.E. (2004). **Refinement of homology-based protein structure by molecular dynamics simulation techniques.** *Protein Science* 13, 211-220.

66. Lee, B. y Richards, F. M. (1971). **The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility.** *Journal of Molecular Biology* 55(3): 379–400.
67. García-Hernández, E. y Hernández-Arana, A. (1999). **Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: Comparison with protein-folding energetics.** *Protein Science* 8(5): 1075-1086.
68. Luque I. and Freire E. (2002). **Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands.** *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 49: 181-190 *Science* 12(1): 135-142.
69. Murphy, K.P, y Freire, E. (1992). **Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins.** *Advances in Protein Chemistry.* 43(1): 313-361.
70. Myers J. K., Pace C. N. and Scholtz J. M. (1995). **Denaturant *m* values heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding.** *Protein Sci.* 4: 2138-2148
71. Makhatazde G. I. and Privolov P. L. (1995). **Energetics of protein structure.** *Adv. Protein Chem.* 47: 307-425
72. <http://wolf.bms.umist.ac.uk/naccess/>
73. Hubbard S.J, Thornton J.M. (1993). **‘NACCES’, Computer program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London.**
74. Anna Vangone, Raffaele Spinelli, Vittorio Scarano, Luigi Cavallo, and Romina Oliva. (2011). **COCOMAPS: a web application to analyze visualize contacts at the interface of biomolecular complexes.** *BIOINFORMATICS.* 27(20): 2915-2916.
75. Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA. (2008). **K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra.** *BMC Struct Biol* 8:25
76. Janowsky R, Kozak M, Jankowska E, Grzonka Z, Grubb A, Abrahamson M, Jaskolski M. (2001). **Human Cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping.** *Nat Struct Biol.* 8:316-320
77. Perlenfein TJ, Murphy RM. (2016). **Expression, purification, and characterization of human cystatin C monomers and oligomers.** *Protein Expr Purif.* 117: 35-43
78. Marky LA, Brelauer KJ. (1987). **Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves.** *Biopolymers* 26:1601-1620.
79. Pace CN, Grimsley GR. Thomson JA, Barnet BJ (1988). **Conformational stability and activity of ribonuclease T₁ with zero, one, and two intact disulfide bonds.** *J Biol Chem.* 263: 11820-11825.
80. Buttle DJ, Abrahamson M, Barret AJ. (1986). **The biochemistry of the action of chymopapain in the relief of sciatica.** *Spine.* 11: 688-694.

81. Jöel Janin. (1995). **Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics.** *Biochimie.* 77. 497-505
82. Serratos IN, Millán-Pacheco C, Garza-Ramos G, Pérez-Hernández G. Zubillaga RA. (2018). **Exploring interfacial water trapping in protein-ligand with multithermal titration calorimetry.** *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 1866(3): 488-495
83. Atiyatul Qadeer, Gulam Rabbani, Nida Zaidi, Ejaz Ahmad, Javed M. Khan, Rizwan H. Khan. (2012). **1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate (ANS) is not a desirable probe for determining the molten globule state of chymopapain.** *PLoS ONE* 7(11): e50633.
84. Francisco Reyes-Espinosa, Alfonso Arroyo-Reyna, Ponciano García-Gutiérrez, Iris N. Serratos and Rafael A. Zubillaga. (2015). **Effects of pH on the association between the inhibitor cystatin and the proteinase chymopapain.** *Protein & Peptide Letters.* 22: 239 – 247
85. Martiniano Bello, Gerardo Pérez-Hernández, D. Alejandro Fernández-Velasco, Roberto Arreguín-Espinosa y Enrique García-Hernández. (2007). **Energetics of protein homodimerization: Effects of water sequestering on the formation of β -lactoglobulin dimer.** *Proteins:* 70:1475-1487.

APÉNDICES

A. Clasificación de los aminoácidos

Los aminoácidos se diferencian entre sí por el grupo R, también llamado “grupo sustituyente ó cadena lateral”. Las características estructurales y químicas de los grupos R son las que le adjudican diferentes propiedades a cada uno de los aminoácidos y, por lo tanto, determinan su función dentro de una proteína ya constituida.

Los aminoácidos han sido clasificados de diversas maneras; sin embargo, todas las formas de organizarlos, a pesar de sus diferencias, se basan en las características particulares y diferenciales de los grupos R. El Esquema A.1 muestra la clasificación que presentan Nelson y Cox en su libro *Lehninger Principles of Biochemistry*, que agrupa a los aminoácidos en cinco categorías:

- Aminoácidos alifáticos cuyo grupo R es no polar. Se denominan alifáticos no polares.
- Aminoácidos alifáticos cuyo grupo R es polar pero no tiene carga. Se denominan alifáticos polares sin carga.
- Aminoácidos cuyo grupo R es polar y se encuentra en estado de ion negativo. Se denominan alifáticos polares cargados negativamente.
- Aminoácidos aromáticos, que poseen anillos aromáticos.

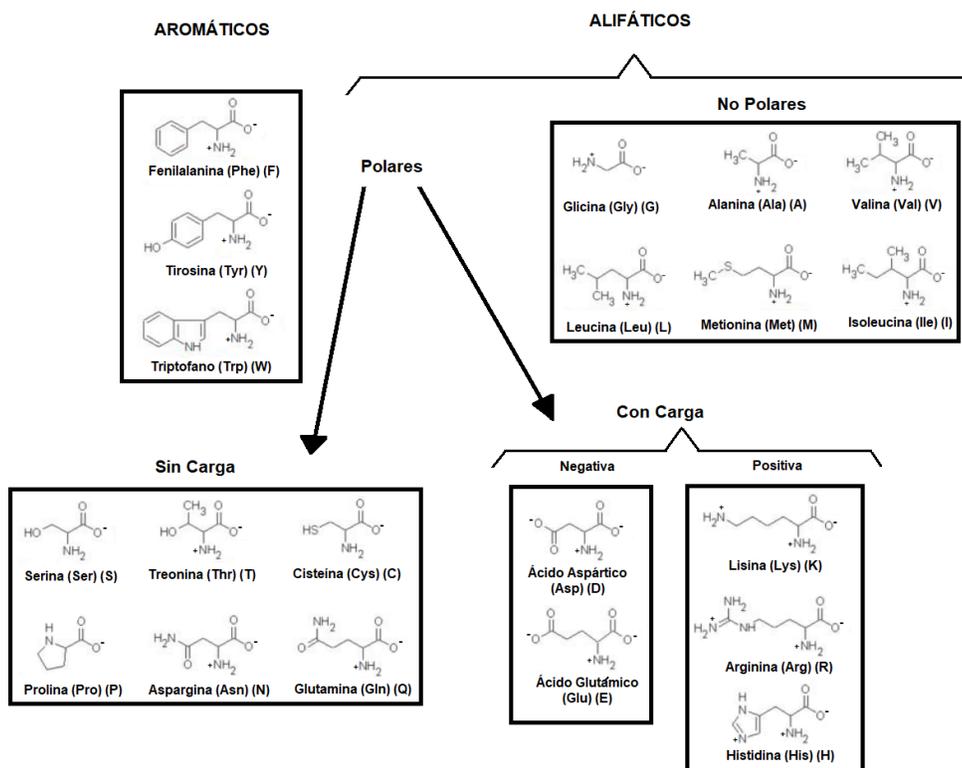


Figura A1. Clasificación y estructura de los aminoácidos de los 20 aminoácidos. El esquema incluye los códigos de tres y una letra de los AA.

B. Construcción de la Cistatina C Humana

A partir de la secuencia de aminoácidos de la cistatina C humana se diseñó el gen que codifica para esta, el cual ha sido clonado en el vector pUC57-Kan entre los sitios Nde I y BamH I por Gen Script. Posteriormente, el gen se clonó en el plásmido pet24a(+) en su sitio de clonación múltiple siendo flanqueado por los sitios Nde I y BamH I (Figura B.1). El gen insertado en el plásmido pet24a(+)-CCH se transformó en Top 10F' y se sembraron en agar con medio LB, kanamicina 25 µg/mL y tetraciclina 10 µg/mL siendo incubadas durante la noche a 37 °C. Al día siguiente se seleccionó una colonia bien aislada y se creció en medio líquido LB con kanamicina 25 µg/mL. A partir de este cultivo, se purificó el plásmido y su integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa. Un subclon para la expresión de la proteína recombinante CCH se realizó con el vector pet24a(+)-CCH en *E. coli* al transformar la cepa *SHuffle T7 Express lysY C3030H* de *Escherichia coli* deficiente en proteasas y eficiente en el plegamiento adecuado de la proteína en cuestión.

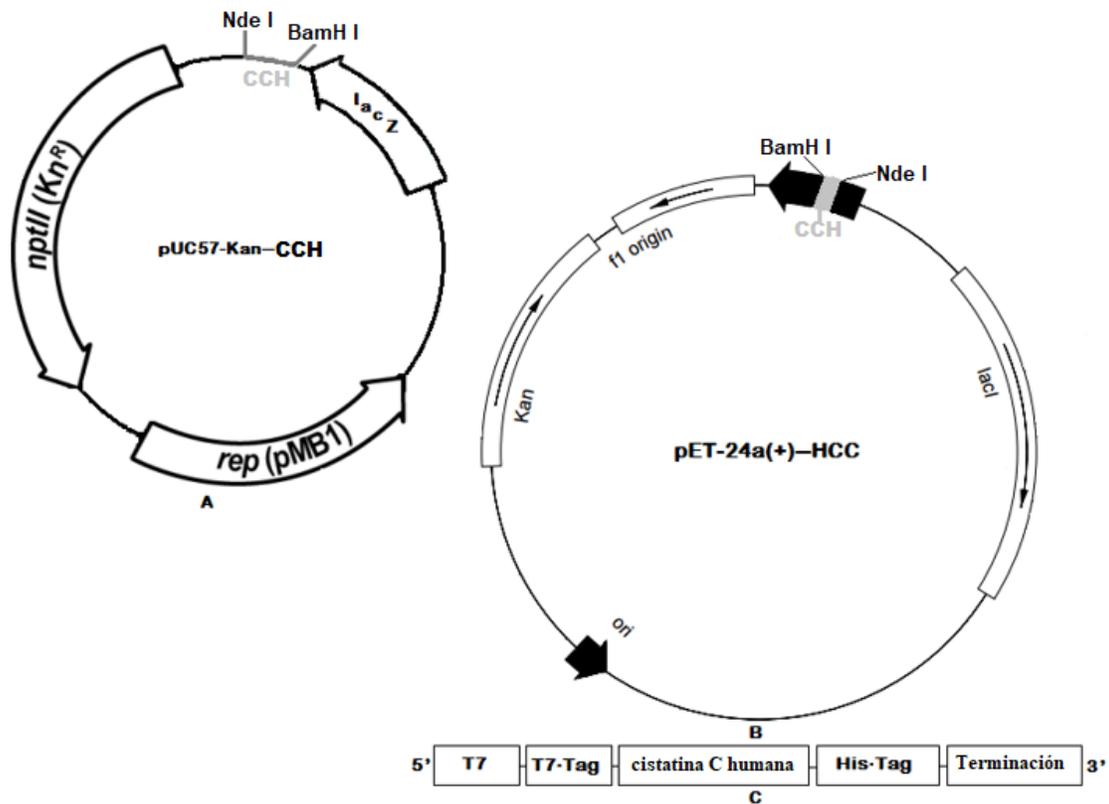


Figura B.1. Representación de los vectores pUC57-CCH y pET24a(+)-CCH. En (A) se muestra al vector de clonación pUC57-CCH con los sitios BamH I y Nde I que flanquean el gen de CCH. (B) Vector pET24a(+)-CCH donde se resalta en color gris la ubicación del gen de CCH. (C) Esquema simplificado del pET24a(+)-CCH que muestra los elementos esenciales de construcción para la expresión en *Escherichia coli*.

C. Modelo de un sólo sitio de unión

Una reacción enzima (E) inhibidor (I) con estequiometría 1:1, tiene un equilibrio de unión descrito por la siguiente ecuación



$$[I_{tot}] = [I] + [EI] \quad (\text{ii})$$

$$[E_{tot}] = [EI] + [E] \quad (\text{iii})$$

Si despejamos [E] e [I] de las ecuaciones (i) y (ii) respectivamente tenemos:

$$[I] = [I_{tot}] - [EI] \quad ; \quad [E] = \frac{[EI]}{K[I]} \quad (\text{iv})$$

Ahora bien, si sustituimos las ecuaciones (iv) en (iii) y reordenamos el resultado llegamos a la siguiente ecuación cuadrática:

$$[EI]^2 + [EI] \left(-[E_{tot}] - [I_{tot}] - \frac{1}{K} \right) + [E_{tot}][I_{tot}] \quad (\text{v})$$

De la ecuación (v) utilizamos su solución real presentada en la ecuación (vi).

$$[EI] = \frac{-b - (b^2 - 4c)^{1/2}}{2} \quad (\text{vi})$$

dónde

$$b = -[I_{tot}] - [E_{tot}] - 1/K \quad (\text{vii})$$

$$C = [E_{tot}][I_{tot}] \quad (\text{viii})$$

Si derivamos la ecuación (vi) respecto $[I_{tot}]$ y la reordenamos tenemos:

$$\frac{d[EI]}{d[I_{tot}]} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{(1+r)}{2} - \frac{X_r}{2}}{(X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2)^{1/2}} \quad (\text{ix})$$

dónde

$$r = \frac{1}{K \cdot [E_{tot}]} \quad \text{y} \quad X_r = \frac{[I_{tot}]}{[E_{tot}]}$$

El cambio en la concentración de $[EI]$ se puede relacionar con el cambio de calor dQ , según la siguiente ecuación

$$dQ = d[EI] \cdot \Delta H_U \cdot V_0 \quad (\text{x})$$

dónde el ΔH_U es la entalpia molar de unión y V_0 corresponde al volumen de la celda de muestra del calorímetro. Por último, si sustituimos la ecuación (x) en la parte izquierda de la ecuación (ix) nos da como resultado la Ec. 5 correspondiente al modelo de un sito de unión.

D. Estimación de T_m para CCE, a partir de los datos de estabilidad de CCH y la Ec. 9.

Si consideramos un proceso reversible de dos estados (xi), en una desnaturalización térmica



dónde N representa al estado nativo y D al estado desnaturalizado.

Debe cumplirse

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

$$\text{En } T = T_m: \Delta G_D(T) = 0$$

Además

$$\Delta H_D(T_m) - T_m\Delta S_D(T_m) = 0$$

Para que T_{m1} y T_{m2} sean la T_m de CCH y CCE, respectivamente. Debe cumplirse que:

$$\Delta H_{D1}(T_{m1}) - T_{m1}\Delta S_{D1}(T_{m1}) = \Delta H_{D2}(T_{m2}) - T_{m2}\Delta S_{D2}(T_{m2})$$

Si suponemos que el cambio inducido por el nuevo enlace disulfuro es puramente entrópico, ($\Delta H_{D1} = \Delta H_{D2}$), tenemos:

$$T_{m2} = \frac{T_{m1}\Delta S_{D1}(T_{m1})}{\Delta S_{D2}(T_{m2})}$$

De acuerdo con la Ec. 9 de cap. 6 y n=23, $\Delta S_{D2} = \Delta S_{D1} - 48(\text{J/mol K})$, sustituimos

$$T_{m2} = \frac{T_{m1}\Delta S_{D1}(T_{m1})}{\Delta S_{D1} - 48} = T_{m1} \frac{\Delta S_{D1}(T_{m1})}{\Delta S_{D1}(T_{m1}) - 48}$$

Por otro lado

$$\Delta H_{D1}(T_{m1}) = T_{m1}\Delta S_{D1}(T_{m1}) \Rightarrow \Delta S_{D1} = \frac{\Delta H_{D1}}{T_{m1}}$$

Sustituyendo los datos de la desnaturalización térmica de CCH tenemos:

$$\Delta S_{D1} = \frac{405.5 \times 10^3 \frac{J}{mol \cdot K}}{351.8 K} = 1153 \frac{J}{mol \cdot K}$$

$$T_{m2} = 351.8 K \frac{1153}{1153 - 48} = 367.1 K \Rightarrow 93.9 \text{ } ^\circ\text{C}$$

E. Simulación de dinámica molecular a 350 K.

E.1. Simulación de DM de los inhibidores.

Las simulaciones de DM realizadas en solvente explícito a 350 K y pH 7.0 de los inhibidores CCH y CCE, mostró que ambos son estables y que poseen movilidad similar, según se aprecia en los perfiles de RMSD y RMSF mostrados en la Figura E1.

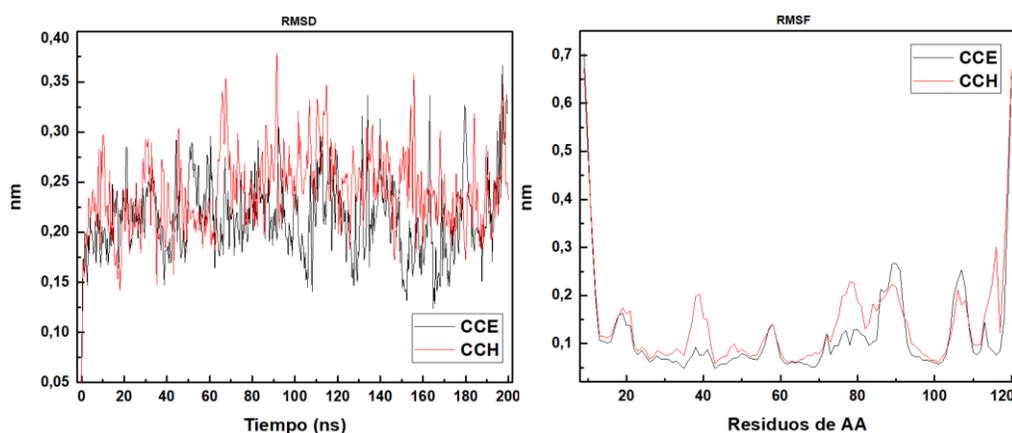


Figura E1. Perfiles de RMSD (izquierda) y RMSF (derecha) obtenidos de la simulación de DM realizada a 350 K en un conjunto NPT para los inhibidores. CCH (línea roja) y CCE (línea negra).

E.2 Simulación de DM a 450 K de los complejos: cmQ – CCH y cmQ – CCE

La estabilidad de los complejos se estudió por simulación de DM en solvente explícito a 450 K en un conjunto NPT y a un pH 7.0. A partir de los perfiles de RMSD y RMSF (**Figuras E2 y E3**) podemos establecer que ambos complejos son muy estables durante el tiempo de simulación, sin embargo, la evolución del radio de giro refleja una redistribución de masa, generada por cambios conformacionales, aun así los complejos no se disociaron durante el tiempo de simulación (200 ns).

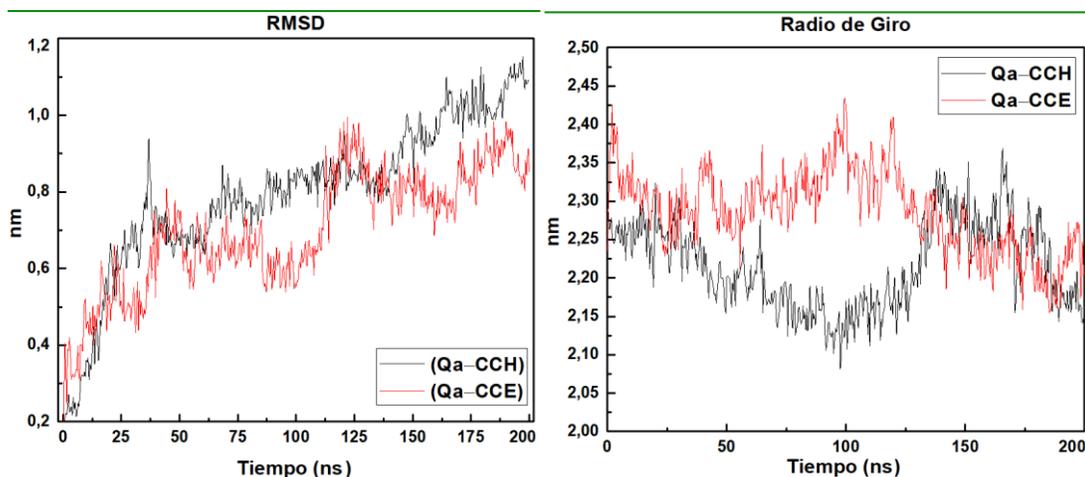


Figura E2. Evolución del RMSD respecto al tiempo. Aquí se muestran los perfiles de RMSD obtenidos en las simulaciones de DM realizadas a 450 K. El perfil en color negro corresponde al complejo cistatina C humana – quimopapaína, mientras que el perfil de RMSD mostrado en rojo corresponde al complejo cistatina C estabilizada – quimopapaína.

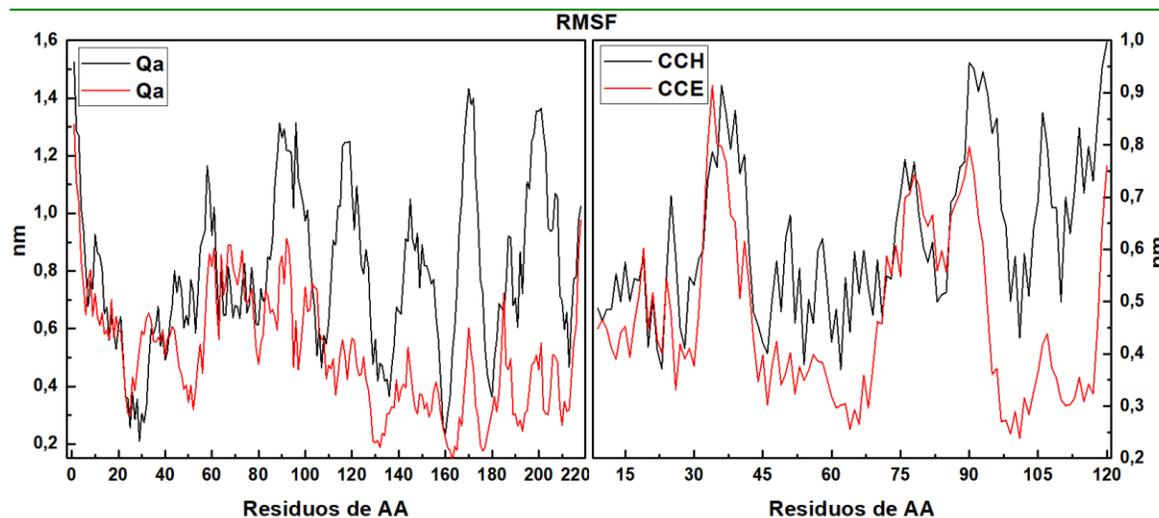


Figura E3. Evolución del RMSF a 450 K de ambos complejos. En color negro se muestra la evolución del RMSF del complejo CCH – quimopapaína, y en color rojo se muestra el perfil de RMSF correspondiente al complejo CCE – quimopapaína.

F. Lista de aminoácidos ocultos en la interfaz.

Tabla F1. Lista de aminoácidos ocultos en la interfaz del complejo **CCH – quimopapaína**. En total se ocultan 56 AA, de los cuales 31 pertenecen a la quimopapaína y 25 a la cistatina C humana silvestre. En la interfaz existen 23 aminoácidos polares, 14 pertenecen a quimopapaína y 9 a CCH, dichos AA están resaltados en color gris.

Quimopapaína		CCH	
AA	Num.	AA	Num.
ASN	18	LEU	9
GLN	19	VAL	10
GLY	20	GLY	11
ALA	21	GLY	12
CYS	22	PRO	13
GLY	23	MET	14
CYS	25	GLU	19
TRP	26	GLU	20
LYS	64	GLU	21
GLY	65	GLY	22
GLY	66	ARG	25
TYR	67	LYS	54
THR	69	GLN	55
LEU	133	ILE	56
GLU	135	VAL	57
ALA	136	ALA	58
GLY	137	GLY	59
GLY	138	VAL	60
LYS	139	TYR	62
GLN	142	ALA	103
LEU	143	VAL	104
TYR	144	PRO	105
LYS	145	TRP	106
LYS	156	GLN	107
LEU	157	GLY	108
ASP	158		
HIS	159		
ALA	160		
TRP	181		
ASN	184		
TRP	185		

Tabla F2. Lista de aminoácidos ocultos en la interfaz del complejo **CCE – quimopapaína**. En total se ocultan 57 AA, de los cuales 32 pertenecen a la quimopapaína y 25 a la cistatina C estabilizada. En la interfaz existen 24 aminoácidos polares, 15 pertenecen a quimopapaína y 9 a CCE, dichos AA están resaltados en color gris.

Quimopapaína		CCE	
AA	Num.	AA	Num.
ASN	18	LEU	9
GLN	19	VAL	10
GLY	20	GLY	11
ALA	21	GLY	12
CYS	22	PRO	13
GLY	23	MET	14
SER	24	GLU	20
CYS	25	GLU	21
TRP	26	GLY	22
TYR	61	ARG	25
LYS	64	LYS	54
GLY	65	GLN	55
GLY	66	ILE	56
TYR	67	VAL	57
GLN	68	ALA	58
LEU	133	GLY	59
GLU	135	VAL	60
ALA	136	TYR	62
GLY	137	ALA	103
GLY	138	VAL	104
LYS	139	PRO	105
GLN	142	TRP	106
LEU	143	GLN	107
TYR	144	GLY	108
LYS	145	THR	109
LYS	156		
LEU	157		
ASP	158		
HIS	159		
TRP	181		
ASN	184		
TRP	185		



Stabilized Human Cystatin C Variant L47C/G69C Is a Better Reporter Than the Wild-Type Inhibitor for Characterizing the Thermodynamics of Binding to Cysteine Proteases

David O. Tovar-Anaya¹ · L. Irais Vera-Robles¹ · M. Teresa Vieyra-Eusebio¹ · Ponciano García-Gutiérrez¹ · Francisco Reyes-Espinosa¹ · Andrés Hernández-Arana¹ · J. Alfonso Arroyo-Reyna¹ · Rafael A. Zubillaga¹

Published online: 22 May 2019

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019, corrected publication 2019

Abstract

Human cystatin C (HCC) binds and inhibits all types of cysteine proteases from the papain family, including cathepsins (a group of enzymes that participate in a variety of physiological processes), which are some of its natural targets. The affinities of diverse proteases for HCC, expressed as equilibrium binding constants (K_b), range from 10^6 to 10^{14} M^{-1} . Isothermal titration calorimetry (ITC) is one of the most useful techniques to characterize the thermodynamics of molecular associations, making it possible to dissect the binding free energy into its enthalpic and entropic components. This information, together with the structural changes that occur during the different associations, could enable better understanding of the molecular basis of affinity. Notwithstanding the high sensitivity of modern calorimeters, ITC requires protein concentrations in at least the 10–100 μM range to obtain reliable data, and it is known that HCC forms oligomers in this concentration range. We present herein a comparative study of the structural, thermal stability, and oligomerization properties of HCC and its stabilized variant (sHCC) L47C/G69C (which possesses an additional disulfide bridge) as well as their binding thermodynamics to the protease chymopapain, analyzed by ITC. The results show that, because sHCC remains monomeric, it is a better reporter than wild-type HCC to characterize the thermodynamics of binding to cysteine proteases.

Keywords Stabilizing disulfide · Molecular dynamics simulations · Dynamic light scattering · Differential scanning calorimetry · Dimerization

1 Introduction

Cystatin C is an extracellular protein consisting of 120 amino acid residues that is ubiquitous in human body fluids, initially identified as an endogenous cysteine protease inhibitor [1]. In recent decades, it has been found that human cystatin C (HCC) participates in a variety of processes, such as bone resorption [2], antigen presentation [3], modulation of inflammatory responses, and fibroblast proliferation [4].

Likewise, it is associated with brain development processes such as neuropeptide activation and degradation, neurite proliferation, and neuronal survival [5, 6]. HCC is prone to form dimers and higher oligomers via a domain swapping mechanism [7]; this process is more favored in the naturally occurring L68Q HCC mutant, the major constituent of amyloid deposits in patients with hereditary amyloid angiopathy [8]. In addition, HCC has been found to colocalize with amyloid β -protein in amyloid deposits in the brain of patients with Alzheimer's disease [9]. Domain swapping in the formation of dimers and other oligomers of cystatin C, including amyloid aggregates, totally disrupts the binding epitope, rendering all these species inactive as inhibitors of proteases of the papain family. Nilsson et al. [10] produced two variants of HCC with one additional disulfide bridge that prevents the domain swapping process; one of these monomeric variants is the double mutant L47C/G69C, hereinafter called stabilized HCC (sHCC), whose three-dimensional (3D) structure (3GAX, PDB) [11] is compared with the dimeric

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10930-019-09839-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rafael A. Zubillaga
zra@xanum.uam.mx

¹ Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, Ciudad De México 09340, Mexico

Springer

one (1G96, PDB) [7] obtained from wild-type HCC single crystals grown from protein solutions at concentration of 10 mg mL⁻¹ [12] in Fig. 1. When sHCC is incubated in the presence of the reducing agent dithiothreitol (DTT) under conditions that produce oligomers from HCC, dimers and higher oligomers are also formed [13, 14]. sHCC shows the canonical structure of the cystatin family: a large α 1 helix that runs across a five-stranded antiparallel β -sheet, with connectivity (N)- β 1- α 1- β 2-L1- β 3-(AS)- β 4-L2- β 5-(C), where AS is a large “appending structure” outside the core of the molecule, located on the opposite side of the binding epitope to papain family proteases, the wedge-like structure constituted by the loops L1 and L2 and the N-terminal region. Residues at this end that have been identified as main contributors to the affinity and selectivity for different proteases are L9, V10, and the evolutionarily conserved G11 [15, 16].

The affinity of HCC for proteases from the papain family varies, with equilibrium binding constants (K_b) between 10⁶ and 10¹⁴ M⁻¹ [16–19]. This difference in affinity represents a change in the free energy of binding (ΔG_b) of 46 kJ mol⁻¹ at 300 K. One question that arises is which contributions to the binding energetics in this group of HCC–protease complexes explain this difference, the answer to which can be explored by determining the enthalpic and entropic components of ΔG_b for the binding of HCC to different proteases of known structures using isothermal titration calorimetry (ITC) [20]. It is worth mentioning that it is not possible to measure the binding thermodynamics of high-affinity complexes ($K_b > 10^8$ M⁻¹) through direct titration, even with the most sensitive microcalorimeters. However, strongly binding complexes can be characterized by displacement ITC [21]; in this mode of ITC, the receptor is first titrated with a weak ligand, then this bound ligand is displaced by titration with the high-affinity ligand. Analysis of both titrations

gives the thermodynamic parameters for both binding processes [21, 22]. Thus, the characterization of the binding of HCC to a protease whose affinity could be determined by direct titration ($K_b < 10^8$ M⁻¹) is a necessary first step. The K_b value reported for HCC and active chymopapain (CP) is 3.2×10^{10} M⁻¹ [23]. Based on previous studies on the binding of chicken cystatin with active CP [24] and with CP blocked with iodoacetic acid [25], we decided to use CP in its carboxymethylated form to ensure that its K_b with HCC was $< 10^8$ M⁻¹. ITC experiments require protein concentrations much higher than those previously used in fluorimetric measurements. HCC binds cysteine proteinases as a monomer; however, at concentrations higher than 0.20 mg mL⁻¹, it forms dimers and higher oligomers. In this work, the binding thermodynamics of wild-type HCC and its stabilized monomer sHCC is studied and compared, and the use of the latter variant is proposed as a suitable substitute to characterize the binding thermodynamics of HCC to cysteine proteases.

2 Materials and Methods

2.1 Protein Expression and Purification

The gene encoding mature HCC [26], including the initiation codon, was synthesized and codon-optimized by GenScript. This synthetic gene was cloned between the *Nde*I and *Bam*HI sites of the pET-24a vector. Plasmid construction was transformed into competent cell Top 10F' (Invitrogen) for DNA manipulation and SHuffle® T7 Express lysY (New England Biolabs) for protein expression according to the manufacturer's protocol. Variant L47C/G69C HCC (sHCC), which possesses a new disulfide that prevents the domain swapping process [10], was obtained by sequentially

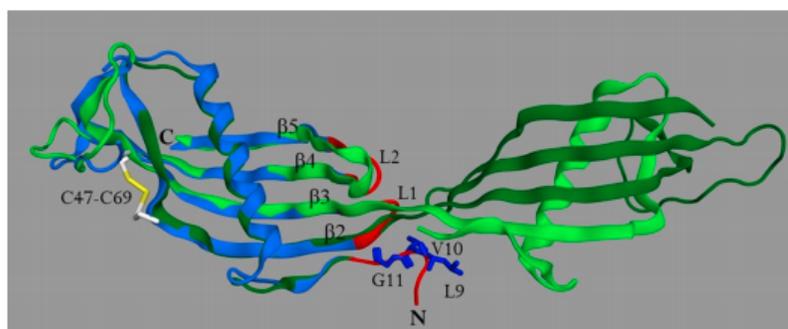


Fig. 1 Domain-swapped dimer of human cystatin C (HCC) in green, superposed on the stabilized monomer sHCC in blue. Loops and β -strands are labeled, as well as the additional disulfide of sHCC shown in yellow. The three elements that constitute the inhibitor's

binding site to cysteine proteases, viz. two loops and the N-terminus, are highlighted in red on the sHCC backbone. Residues at this end, identified as main contributors to the affinity, are highlighted in dark blue (Color figure online)

mutating residues Leu47 and Gly69 to cysteine. Mutagenesis was performed using the QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Agilent). The mutagenic oligonucleotides were as follows: 5'-CCATTCTCGTGCCTGTCAGGTG GTTCG-3' (L47C forward) and 5'-CGAACCACTGACA CGCACGAGAATGG-3' (L47C reverse); 5'-GGACGTGCA ACTGTGTCGTACCACGTGC-3' (G69C forward) and 5'-GCACGTGGTACGACACAGTTCGACGTCC-3' (G69C reverse). Codon substitutions were verified by sequencing the complete genes. HCC and sHCC were expressed from a single colony, which was incubated at 30 °C in lysogeny broth (LB) medium supplemented with 25 µg mL⁻¹ kanamycin until the OD₆₀₀ reached ~0.6. Protein expression was induced with a final concentration of 0.4 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h. Cells were recovered by centrifugation at 3800 × g and resuspended in buffer [40 mM Tris, 50 mM NaCl, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0]. Cells were then lysed by ultrasonication (Sonifier 450; Branson Ultrasonics) employing 1.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) as protease inhibitor. The soluble fraction was obtained by centrifugation at 12,000 × g for 20 min at 4 °C. From these fractions, HCC and sHCC were purified by three chromatographic steps by fast protein liquid chromatograph (FPLC) using an ÄKTAprime plus. In the first stage, both samples were loaded onto a size-exclusion Superdex 200 column equilibrated with 50 mM glycine, 30 mM NaCl, pH 9.3; in the second stage, the samples were subjected to anion exchange chromatography using a HiPrep DEAE FF 16/60 column (40 mM Tris, pH 8.8), collecting the fractions that were not trapped (loaded) in the matrix. Finally, the proteins were obtained by size-exclusion chromatography performed on a Sephacryl 200 column (50 mM glycine, 30 mM NaCl; pH 9.3). The proteins were concentrated by ultrafiltration between each stage, while for the second stage, they were dialyzed against 40 mM Tris, pH 8.8. Proteins were stored at -70 °C.

Chymopapain (CP) was purified from a commercial extract (Sigma C-9007). One hundred milligrams of extract was dissolved in 50 mL phosphate-buffered saline (PBS) buffer (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄; pH 7.0) in the presence of 20 mM cysteine; this mixture was stirred for 10 min at room temperature. To block the active-site cysteine of the protease, iodoacetic acid at final concentration of 30 mM was added to the solution; this reaction was left for 1 h with agitation in the dark, then the excess acid was removed by dialysis against PBS buffer. Finally, *S*-carboxymethyl-chymopapain (cmCP) was obtained in pure form by cation exchange chromatography using a Mono S 5/50 GL column (GE) with a NaCl gradient from 0 to 1.0 M.

The protein concentration was determined at 280 nm with a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) using extinction coefficients (ϵ) of 11,100 M⁻¹ cm⁻¹ for both HCC and sHCC

[17] and 51,000 M⁻¹ cm⁻¹ for cmCP [27]. The homogeneity of the proteins was verified by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry.

2.2 Mass Spectrometry

Molecular weight measurements were performed using a MALDI-TOF mass spectrometer (AutoFlex Speed MALDI-TOF/TOF) equipped with a nitrogen ultraviolet (UV) laser (337 nm). Mass spectra were obtained in positive ion and linear mode with an accelerating voltage of 20 kV. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) was prepared as a saturated solution in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water/acetonitrile (1/1, v/v) and employed as a matrix for the analysis.

2.2.1 Molecular Weight of Recombinant HCC and sHCC

Both 1 µL CHCA matrix solution and 1 µL pure protein sample (HCC or sHCC, 1 mg mL⁻¹) were applied onto a stainless-steel plate, mixed, and air-dried.

2.2.2 Confirmation of Formation of New Disulfide Bridge

Two aliquots of sHCC were dried by vacuum centrifugation and dissolved in 10 µL 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 5.0 M guanidinium chloride, and 1.0 mM EDTA pH 9.0 buffer. Samples were denatured at 85 °C for 15 min. One aliquot was used to determine the presence of free cysteines, for which the alkylating agent iodoacetamide was added to final concentration of 10 mM and incubated for 1 h at room temperature in the dark. The other aliquot was used to obtain the mass of the reduced and alkylated protein; in this case, the sample was first treated with 10 mM DTT for 15 min at 80 °C, then sulfhydryl groups were alkylated with iodoacetamide at final concentration of 25 mM and incubated for 1 h at room temperature in the dark. This last sample was loaded onto Zip-Tip C18 tips that had been previously activated and equilibrated and eluted in a mixture of 70% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid. HCCA was also used as the matrix.

2.3 Circular Dichroism

To evaluate the structural integrity of the recombinant proteins, their circular dichroism (CD) spectra in the far-UV region were obtained. Previously, HCC and sHCC samples were dialyzed against 10 mM phosphate buffer (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), pH 7.0, and their concentrations were adjusted to 0.10 mg mL⁻¹. CD spectra were obtained at 25 °C in a Jasco

J715 spectropolarimeter using a 0.10-cm cell. The spectrum corresponding to the buffer was used as a blank.

2.4 Dynamic Light Scattering

Dynamic light scattering (DLS) analysis of HCC and sHCC solutions was performed at 25, 35, 50, and 65 °C using a Zetasizer NANO (Malvern, UK) equipped with temperature control. Proteins were dialyzed against 20 mM phosphate buffer with NaCl (56 mM, pH 7.0) and filtered through a membrane with pore size of 0.1 µm. The samples were analyzed at concentration of 0.40 mg mL⁻¹. Prior to DLS measurements, the samples were equilibrated for 3 min at each desired temperature. At least three replicates of each sample were performed with multiple (≥ 10) data acquisitions.

2.5 Size-Exclusion Chromatography

Both HCC and sHCC solutions were dialyzed in membranes with a molecular cutoff of 6–8 kDa against 20 mM phosphate buffer with 100 mM NaCl, pH 7.0 and filtered through a pore size of 0.22 µm. Solutions with two protein concentrations, viz. 0.20 and 0.40 mg mL⁻¹, were prepared for both incubated at 65 °C for 45 min, then cooled to room temperature. The samples were loaded into a Superdex 75 HR 10/30 column previously equilibrated with 20 mM phosphate buffer with 100 mM NaCl, pH 7.0, with a flow rate of 0.75 ml min⁻¹ using an ÄKTA FPLC system.

2.6 Differential Scanning Calorimetry

Protein denaturation is a process that can be thermally activated and can be followed by differential scanning calorimetry (DSC) by analysis of the first heating. The thermal denaturation of HCC and sHCC was followed by DSC by heating at a rate of 90 K h⁻¹ in a VP-DSC capillary (GE Healthcare) automated with a 0.1-mL cell volume. Sweeps were obtained from 15 to 110 °C. For these experiments, the samples were dialyzed in a cellulose membrane with a molecular cutoff of 6–8 kDa against 20 mM phosphate buffer, with 60 mM NaCl, pH 7.0, then filtered through a membrane with pore size of 0.22 µm. Both samples were taken at concentration of 0.40 mg mL⁻¹. Protein solutions were degassed with vacuum agitation, as was the end-of-dialysis buffer, which was used as a reference. The data obtained were analyzed using software developed by MicroCal implemented in Origin 7 (OriginLab, Northampton, MA). The “non-2-state model,” which is a two-state model that differentiates the calorimetric enthalpy (ΔH_{cal}) from the van't Hoff enthalpy (ΔH_{vH}), was used for the analysis of the data.

2.7 Isothermal Titration Calorimetry

To evaluate the activity of the HCC and sHCC inhibitors, their binding to cmCP at 35 °C was studied using a MicroCal iTTC200 calorimeter. Samples of HCC, sHCC, and cmCP were simultaneously dialyzed against 10 mM phosphate buffer (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), pH 7.0, with 78 mM NaCl to give an ionic strength of 0.10 M. The solutions were filtered through a membrane with pore size of 0.22 µm and degassed under vacuum with mild agitation before each experiment. For the HCC/cmCP system (cell/syringe), the concentrations of the samples were 0.020 mM and 0.135 mM, respectively, while for the cmCP/sHCC system, the concentrations were 0.020 mM and 0.140 mM, respectively. The calorimeter cell was filled with 200 µL HCC or cmCP, while the syringe was filled with 40 µL cmCP or sHCC as appropriate. The titration consisted of 21 injections of variable volume with constant agitation at 300 rpm. The data obtained were analyzed using Origin software with the model of one binding site. Prior to analysis, the data were corrected by subtracting the heats of dilution of the injectant into the buffer solution in the cell using the same injection program.

2.8 Molecular Dynamics Simulation

The 3D structure of monomeric HCC was constructed from the sHCC PDB file (3GAX) [11], changing Cys47 and 69 to Leu and Gly, respectively, followed by an energy-minimization protocol. Prior to molecular dynamics (MD) simulations, the side-chain ionization states in both HCC and sHCC at pH 7.0 were established using the pK_a values as estimated using the PROPKA subroutine in the PDB-2PQR server [28]. MD simulations were performed using GROMACS 5.0.7 software [29] with the optimized potential for liquid simulations (OPLS) force field [30]. Both proteins were placed at the center of a cubic box with its nearest edge 12 Å away from the protein. Approximately 20,500 extended simple point-charge (SPC/E) water molecules were required to fill the box, and one chloride ion was used to neutralize the net charge of each protein. The total number of atoms was 63,232 and 63,229 for the HCC and sHCC systems, respectively. Energy minimization was performed using the steepest-descent algorithm for 1000 steps followed by thermal equilibration (100 ps), restricting the position of the heavy atoms of the proteins by fixing a harmonic force constant of 1000 kJ mol⁻¹. MD simulation was performed in an *NPT* ensemble with time step of 2 fs at temperature of 350 K or 450 K at 1.0 bar for 200 ns, using a *V*-rescale thermostat and Parrinello–Rahman barostat. A linear constraint solver (LINCS) [31] algorithm was applied to limit the length of all covalent bonds. A cutoff of 1.0 nm was applied for short-range electrostatic and van der Waals interactions, while long-range electrostatic forces were treated

with the particle mesh Ewald method [32]. Two replicates were performed for each system.

3 Results

3.1 Structural Analysis of HCC and sHCC

The molecular mass of the recombinant inhibitors, wild-type cystatin C (HCC) and its disulfide-stabilized double mutant L47C/G69C (sHCC), determined by MALDI-TOF mass spectrometry, was 12,537 Da and 12,575 Da, respectively (Fig. S1, Online Resource 1), consistent with the

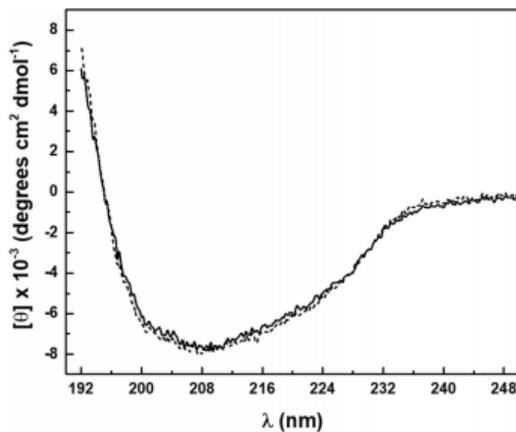


Fig. 2 Far-UV CD spectra of human cystatin C (solid line) and stabilized cystatin C (dotted line) at 0.10 mg mL⁻¹ in 0.010 M sodium phosphate, pH 7.0 at 25 °C

backbones of both proteins being cleaved at their N-termini, losing their first eight amino acids. This unexpected cleavage of HCC has been reported previously [33, 34], although the full-length protein has also been obtained [10, 16–19]. Both inhibitors folded with identical secondary structures as judged from their far-UV CD spectra (Fig. 2). Using this spectrum and the K2D2 program [35], a content of 34% β structure and 9% α was predicted, while that reported for the crystallographic structure of sHCC (3GAX, PDB) [11] is 47% β and 13% α .

The presence of the additional disulfide introduced into sHCC, in addition to the two present in the wild-type HCC, was verified by mass spectrometry, as shown in Fig. 3. After confirming the absence of free cysteines in the nonreduced protein, the mass increment due to the reaction of iodoacetamide with the denatured and reduced protein corresponds to the carbamidomethylation of six cysteines, indicating the presence of three disulfides in sHCC [36].

3.2 Oligomerization of HCC

To test the capacity of HCC to dimerize and to confirm the elimination of this phenomenon in sHCC [10], size-exclusion chromatography (SEC) experiments were performed in a previously calibrated Superdex 75 column (Fig. 4). At 25 °C and protein concentration of 0.20 mg mL⁻¹, the chromatogram of HCC showed a main peak associated with the monomer and a smaller peak related to the dimer (cyan curve). Doubling the concentration of HCC to 0.40 mg mL⁻¹ caused a rise in the proportion of the dimer peak (blue line). In addition, heating an aliquot of this last sample for 40 min at 65.0 °C and cooling to 25 °C led to further dimer formation (red curve). On the other hand, a concentrated (0.40 mg mL⁻¹) and

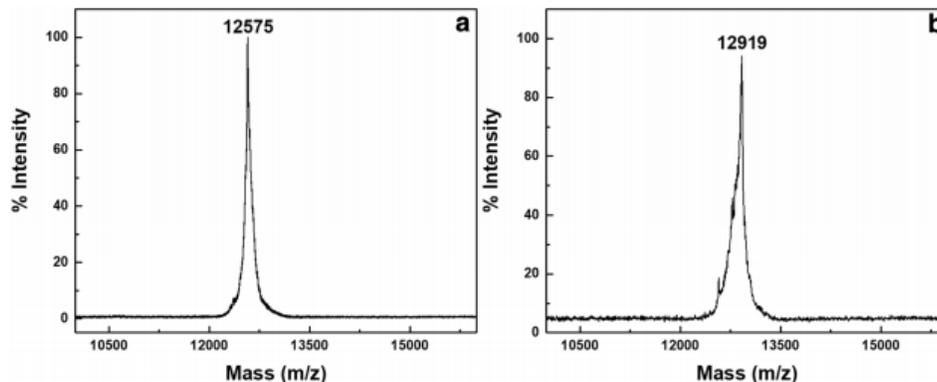


Fig. 3 Quantification of disulfide bonds in sHCC by MALDI-TOF mass spectrometry. **a** Mass spectrum of the native protein, which was identical to that of the denatured and nonreduced protein after treat-

ment with iodoacetamide. **b** Mass spectrum of the totally reduced and carbamidomethylated protein

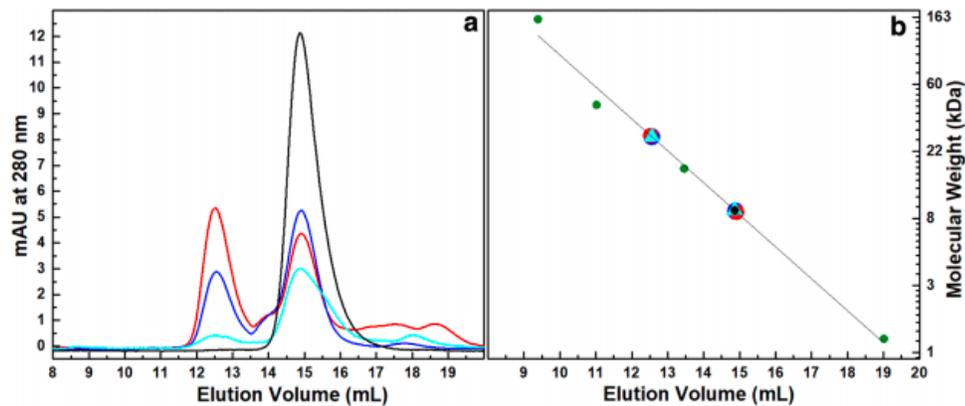


Fig. 4 Size-exclusion chromatograms of HCC and sHCC in a Superdex 75 column: HCC at 0.20 mg mL^{-1} (cyan line and triangles), HCC at 0.40 mg mL^{-1} (blue line and circles), HCC at 0.40 mg mL^{-1} heated at $65 \text{ }^\circ\text{C}$ and cooled (red line and circles), and sHCC at 0.40 mg mL^{-1} heated at $65 \text{ }^\circ\text{C}$ and cooled (black line and circle).

The continuous line in panel B is the linear regression of the green data points, representing the peak positions and molecular weights of γ -globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa), and vitamin B12 (1.35 kDa) (Color figure online)

heated sample of sHCC was eluted as a single peak in the zone corresponding to the monomer (black line), the same peak observed for a dilute (0.20 mg mL^{-1}) and nonheated sample (not shown). Solutions of HCC at 0.40 mg mL^{-1} formed higher-order oligomers upon heating at $65 \text{ }^\circ\text{C}$, according to DLS experiments, while under the same conditions, sHCC remained a monomer (Fig. S2, Online Resource 1).

3.3 Thermal Stability of HCC and sHCC

The thermal stability of both inhibitors was analyzed by DSC. Endotherms obtained at the same protein concentration and solvent conditions as used in the SEC and DLS experiments are shown in Fig. 5. The thermal denaturation of both inhibitors was irreversible; i.e., after the first heating scanning, no significant change in the heat capacity of the solution was observed upon cooling and reheating. Even though equilibrium equations are not applicable under these

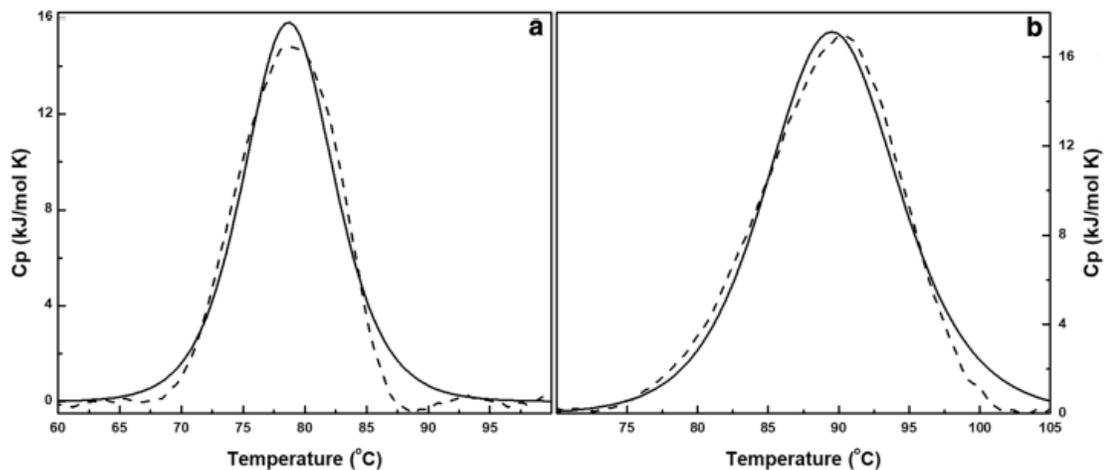


Fig. 5 DSC thermograms of HCC (a) and sHCC (b). The protein concentration for both samples was 0.40 mg mL^{-1} in 20 mM phosphate buffer, pH 7.0, with 56 mM NaCl. Scans were obtained at

90 K h^{-1} . Continuous lines are fits to the experimental data (dashes) using a reversible two-state model

conditions, the calculation of the van't Hoff enthalpy (ΔH_{vH}) and its comparison with the calorimetric enthalpy (ΔH_{cal}) can help to compare the molecularity of the processes [37]. Table 1 presents the values of ΔH_{cal} and ΔH_{vH} obtained from the analysis of two independent scans, such as those in Fig. 5, assuming an equilibrium two-state model. The last column presents the factor by which ΔH_{vH} is greater than ΔH_{cal} .

3.4 Molecular Dynamics Simulations of Thermal Unfolding of the Inhibitors

During the 200-ns MD simulations of both proteins in explicit solvent at 450 K, unfolding of both polypeptides was observed. However, while HCC lost the α -helix in the first 15–30 ns, sHCC took more than 100 ns (Fig. 6a). The mobility of both chains was very similar at 350 K, as indicated by their almost superimposable root-mean-square fluctuation (RMSF) profiles (Fig. S3, Online Resource 1), which are directly related to the profiles of B -factors according to the equation $B_i = \frac{8\pi^2}{3} \text{RMSF}_i^2$ [38]; at 450 K, the mobility was only slightly greater in HCC, even near the location where the new disulfide bridge was introduced in sHCC. A notable exception was the N-terminus, including the α -helix, which was much more mobile in the wild-type cystatin C (Fig. 6b).

3.5 Protease–Inhibitor Binding Thermodynamics

The binding thermodynamics of the protease cmCP to both HCC and sHCC was studied by means of ITC. To obtain reliable ITC measurements with this protein–protein system, we found the minimum concentration of protein in the cell to be approximately 0.020 mM and the minimum concentration of protein in the syringe to be approximately 0.140 mM. Figure 7 presents the binding isotherms for the HCC/cmCP and cmCP/sHCC systems (cell/syringe) at 35 °C and pH 7.0.

The thermodynamic parameters for the formation of both complexes, viz. cmCP–CCH and cmCP–sCCH, are presented in Table 2. The equilibrium binding constant (K_b) of the protease was three times larger for sHCC than for HCC. The binding enthalpies for both complexes were very similar, so the moderately higher affinity of chymopain for sHCC was mainly due to a lower entropy diminution in the binding reaction. It is worth mentioning the low and similar value of n obtained for both complexes, which we cannot explain but which could be due to a fraction of chymopain molecules that lost their ability to bind to the inhibitors.

Table 1 Analysis of DSC thermograms

	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kJ mol ⁻¹)	ΔH_{vH} (kJ mol ⁻¹)	r^2	Ratio ^a
[HCC]	78.6 ± 0.2	139.4 ± 11.4	405.5 ± 7.3	0.99	2.92 ± 0.19
[sHCC]	89.5 ± 0.2	194.1 ± 19.6	358.8 ± 1.4	0.99	1.86 ± 0.20

^a $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ ratio

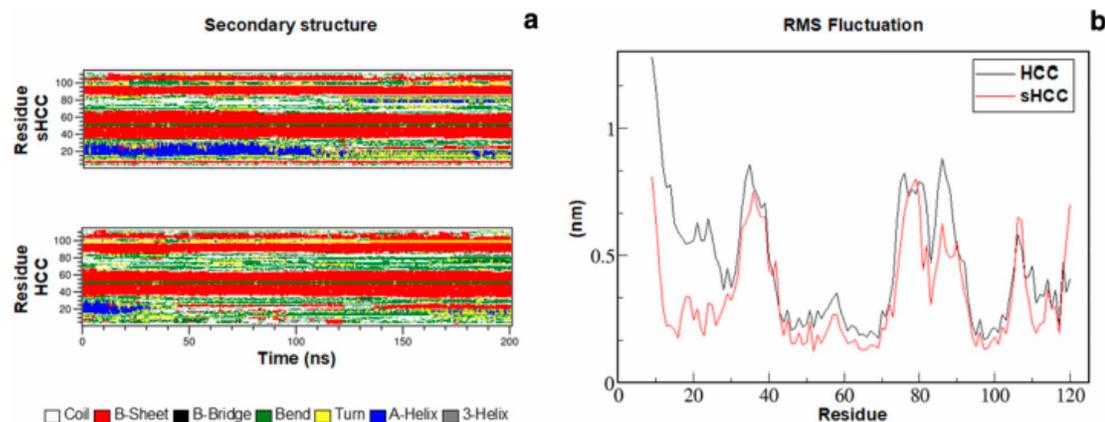


Fig. 6 Molecular dynamics simulation results for calculated trajectories of HCC and sHCC in explicit water solvent at 450 K during 200 ns in NPT ensemble. **a** Changes in secondary structure and **b**

mobility of the polypeptide chains as root-mean-square fluctuation of α -carbons (Color figure online)

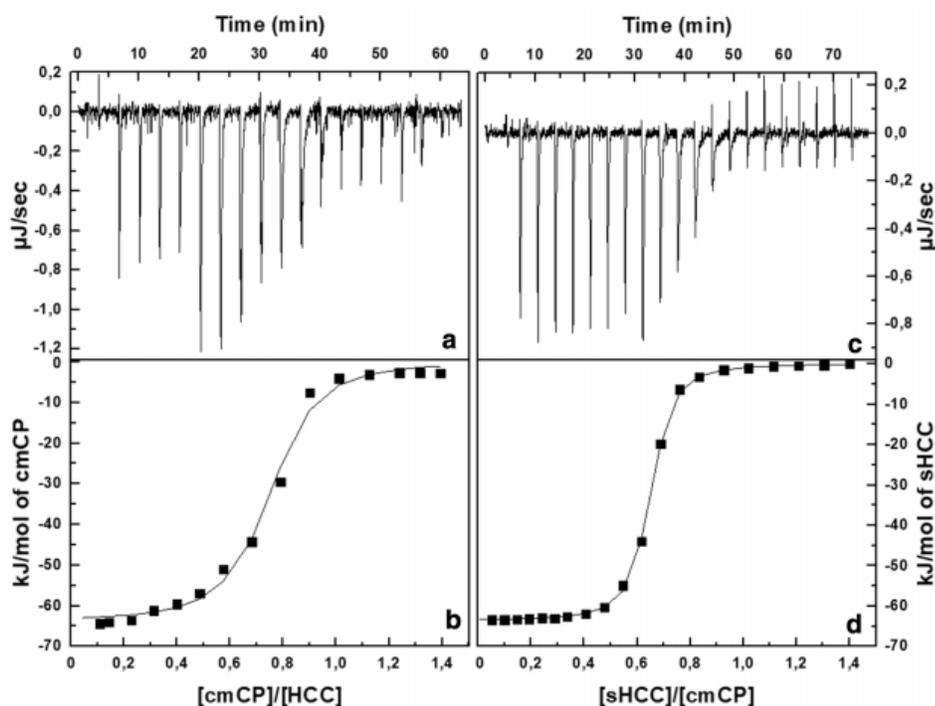


Fig. 7 Calorimetric isothermal titration for binding of cmCP to CCH (a, b) and sHCC to cmCP (c, d). Titrations performed at 35 °C in 10 mM phosphate buffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 7.0. Ionic strength adjusted to 0.10 M with NaCl

Table 2 Binding thermodynamics of *S*-carboxymethyl-chymopapain (cmCP) to wild-type human cystatin C (HCC) and to its mutant L47C/G69C (sHCC), at 35 °C and pH 7.0

System (cell/syringe)	K_b (M^{-1}) $\times 10^{-6}$	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$T\Delta S$ (kJ/mol)	n
HCC/cmCP	4.0 ± 1.7	-48.3 ± 1.5	-38.7 ± 1.4	-10.0 ± 1.8	0.73 ± 0.02
cmCP/sHCC	12.0 ± 2.5	-46.1 ± 0.6	-41.7 ± 0.5	-4.4 ± 0.8	0.75 ± 0.01

4 Discussion

Recombinant human cystatin C (HCC) and its variant L47C/G69C with a new disulfide bridge (sHCC) were obtained in their folded and active conformations, both able to bind the cysteine protease *S*-carboxymethyl-chymopapain (cmCP). As eventually happens for HCC [33, 34], both proteins were cleaved at the peptide bond between R8 and L9, losing their first eight amino acids; their CD spectra were identical (Fig. 2) and quite similar to that previously reported for HCC [39].

Monomeric wild-type HCC forms dimers [7] and higher oligomers [10] through a domain swapping mechanism. Here, we clearly observed the formation of dimers at HCC

concentrations $\geq 0.20 \text{ mg mL}^{-1}$ (Fig. 4). Additionally, heating HCC solutions to 65 °C increased the formation of dimers (Fig. 4) and promoted the generation of high-molar-mass aggregates (Fig. S2), as also observed previously [39]. However, sHCC maintained its monomeric state even at high concentrations and temperatures (Figs. 4 and S2) due to its additional disulfide link that precludes dissociation of domains.

The thermal unfolding of both inhibitors was irreversible. The DSC thermogram obtained for HCC was similar to that previously reported [40]. Using a concentration of 0.40 mg mL^{-1} , we determined values for T_m and for the ratio ($\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$) of 78.6 °C and 2.92, respectively, comparable to the values of 82.0 °C and 2.67 obtained previously with equally truncated HCC at 1.0 mg mL^{-1} [40].

The new disulfide bond in sHCC increased the conformational stability of the protein, shifting the T_m to 89.5 °C and decreasing the ratio $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ to 1.86 (Table 1). The stabilizing effect of the S–S crosslink results from a decrease in the conformational entropy of the unfolded chain, which has been estimated by the equation [41]

$$\Delta S \text{ (JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}) = -8.8 - (3/2)R \ln n, \quad (1)$$

where n is the number of residues in the loop forming the disulfide bond, equal to 23 for the C47–C69 disulfide in sHCC. Thus, the entropy diminution caused by this bond ($\Delta\Delta S$) calculated using Eq. 1 is 48 J K⁻¹ mol⁻¹. As a reference, assuming that both denaturations were reversible and the energetic stabilization of the new disulfide was entirely due to this entropic effect (i.e., $\Delta\Delta H = 0$), a T_m value of 93.9 °C would be expected for sHCC (see Online Resource 1). On the other hand, the higher $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ ratio of 2.92 for HCC compared with 1.86 for sHCC reveals the higher-oligomeric nature of the species undergoing thermal denaturation in the case of HCC [37].

Molecular dynamics simulations of the thermal unfolding of both inhibitors also reflected the higher stability of sHCC, particularly of the helix region, which took approximately five times longer to unfold than in HCC (Fig. 6a).

Regarding ITC experiments, note that the propensity of HCC to dimerize limits its use at concentrations above 0.20 mg mL⁻¹, hindering its application as a titrant; thus, it was necessary to place it in the calorimetric cell and add the protease cmCP. In contrast, for the complex with sHCC, we filled the syringe with inhibitor at 1.76 mg mL⁻¹ and titrated it with the cmCP solution within the cell. The measured affinities of cmCP for both inhibitors were very similar, with K_b values of 4.0×10^6 and 12×10^6 M⁻¹ for HCC and sHCC, respectively; this slightly greater affinity of the protease for sHCC compared with HCC was also observed previously with cathepsin B, with K_i values of 0.23 nM and 0.37 nM, respectively [10].

The mean value of K_b for the complexes cmCP–HCC and cmCP–sHCC is 8.0×10^6 M⁻¹, which, compared with the K_b of the active-CP–HCC complex of 3.2×10^{10} M⁻¹ [23], gives a decrease in affinity of 20.7 kJ mol⁻¹ at 300 K ($\Delta\Delta G_b = RT \ln K_{b1}/K_{b2}$). This reduction is mainly caused by the carboxymethyl group introduced at the sulfur atom of the catalytic Cys of CP, which hinders the interaction with HCC. In the case of the complexes of HCC with actinidin and with carboxymethyl-actinidin, the respective K_b values are 5.3×10^7 M⁻¹ and 8.3×10^5 M⁻¹ [17], giving a $\Delta\Delta G_b$ value of 10.4 kJ mol⁻¹, which is only half the decrease in energy obtained with the chymopapain complexes. This dissection of the binding free energy of these complexes into their enthalpic and entropic components

using ITC analysis will help to improve understanding of the molecular basis of these processes.

The ΔG_b value for the complex of cmCP with sHCC was only 7.8% more negative than that with HCC (Table 2), and this difference was mainly due to the entropic component ΔS_b , which was -32.4 J K⁻¹ mol⁻¹ for HCC and -14.3 J K⁻¹ mol⁻¹ for sHCC. This lesser entropic decrease can be explained by restrictions imposed by the new disulfide in the free sHCC. Assuming that the final bound state in both complexes is equally restricted, those bond rotations already restrained by the new link in the free sHCC will not contribute to the diminution of the binding entropy.

In conclusion, because stabilized human cystatin C (sHCC) cannot form dimers or higher oligomers, it represents a better model than the wild-type inhibitor for studying the wide variation in affinity for different cysteine proteases. Characterization of the binding thermodynamics of sHCC to diverse cysteine proteases of the papain family could shed new light on the structural basis that determines the protein–protein affinities.

Acknowledgments This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACyT, México) by grants no. 181049 and 237256, by scholarship no. 283296 to D.O. Tovar-Anaya, and by a postdoctoral scholarship to M.T. Vieyra-Eusebio. The authors thank the Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo and the Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa for the use of their facilities. We are grateful to Miguel Costas from the Facultad de Química, UNAM for providing the VP-DSC capillary facility to perform the differential scanning calorimetry experiments. We also thank Georgina Garza-Ramos from the Facultad de Medicina, UNAM for her expert help and facilitating our use of the FPLC for SEC experiments.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest All the authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

1. Turk B, Turk D, Turk V (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1477:98–111
2. Lerner UH, Grubb A (1992) Human cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor, inhibits bone resorption in vitro stimulated by parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide of malignancy. *J Bone Miner Res* 7:433–440
3. Kopitar-Jerala N (2006) The role of cystatins in cells of the immune system. *FEBS Lett* 580:6295–6301
4. Sun Q (1989) Growth stimulation of 3T3 fibroblasts by cystatin. *Exp Cell Res* 180:150–160
5. Sastre M, Calero M, Pawlik M, Mathews PM, Kumar A, Danilov V, Schmidt SD, Nixon RA, Frangione B, Levy E (2004) Binding

- of cystatin C to Alzheimer's amyloid beta inhibits in vitro amyloid fibril formation. *Neurobiol Aging* 25:1033–1043
6. Palm DE, Knuckey NW, Primiano MJ, Spangenberg AG, Johanson CE (1995) Cystatin C, a protease inhibitor, in degenerating rat hippocampal neurons following transient forebrain ischemia. *Brain Res* 691:1–8
 7. Janowsky R, Kozak M, Jankowska E, Grzonka Z, Grubb A, Abrahamson M, Jaskolski M (2001) Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat Struct Biol* 8:316–320
 8. Abrahamson M (1996) Molecular basis for amyloidosis related to hereditary brain hemorrhage. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 226:47–56
 9. Levy E, Sastre M, Kumar A, Gallo G, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F (2001) Codeposition of cystatin C with amyloid- β protein in the brain of Alzheimer disease patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:94–104
 10. Nilsson M, Wang X, Rodziewicz-Motowidlo S, Janowski R, Lindström V, Önerfjord P, Westermark G, Grzonka Z, Jaskolski M, Grubb A (2004) Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C. *J Biol Chem* 279:24236–24245
 11. Kolodziejczyk R, Michalska K, Hernandez-Santoyo A, Wahlbom M, Grubb A, Jaskolski M (2010) Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS J* 277:1726–1737
 12. Kozak M, Jankowska E, Janowski R, Grzonka Z, Grubb A, Alvarez Fernandez M, Abrahamson M, Jaskolski M (1999) Expression of a selenomethionyl derivative and preliminary crystallographic studies of human cystatin C. *Acta Crystallogr D* 55:1939–1942
 13. Wahlbom M, Wang X, Lindström V, Carlemalm E, Jaskolski M, Grubb A (2007) Fibrillogenic oligomers of human cystatin C are formed by propagated domain swapping. *J Biol Chem* 282:18218–18326
 14. Östner G, Lindström V, Christensen PH, Kozak M, Abrahamson M, Grubb A (2013) Stabilization, characterization, and selective removal of cystatin C amyloid oligomers. *J Biol Chem* 288:16438–16450
 15. Hall A, Håkansson K, Mason RW, Grubb A, Abrahamson M (1995) Structural basis for the biological specificity of cystatin C. *J Biol Chem* 270:5115–5121
 16. Björk I, Pol E, Raub-Segall E, Abrahamson M, Rowan AD, Mort JS (1994) Differential changes in the association and dissociation rate constants for binding of cystatins to target proteinases occurring on N-terminal truncation of the inhibitors indicate that the interaction mechanism varies with different enzymes. *Biochem J* 299:219–225
 17. Lindahl P, Abrahamson M, Björk I (1992) Interaction of recombinant human cystatin C with the cysteine proteinases papain and actinidin. *Biochem J* 281:49–55
 18. Brieditis I, Raub-Segall E, Pol E, Hakansson K, Abrahamson M (1996) The importance of the second hairpin loop of cystatin C for proteinase binding. Characterization of the interaction of Trp-106 variants on the inhibitor with cysteine proteinases. *Biochemistry* 35:10720–10726
 19. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D (2012) Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* 1824:68–88
 20. Wiseman T, Williston S, Brands JF, Lin L-N (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 179:131–137
 21. Sigurskjold BW (2000) Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem* 277:260–266
 22. Velazquez-Campoy A, Freire E (2006) Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nat Protoc* 1:186–191
 23. Buttle DJ, Abrahamson M, Barret AJ (1986) The biochemistry of the action of chymopapain in relief of sciatica. *Spine* 11:688–694
 24. Björk I, Ylinenjarvi K (1990) Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinases actinidin, chymopapain A, and ficin. *Biochemistry* 29:1770–1776
 25. Reyes-Espinosa F, Arroyo-Reyna A, García-Gutiérrez P, Serratos IN, Zubillaga RA (2015) Effects of pH on the association between the inhibitor cystatin and the proteinase chymopapain. *Protein Pept Lett* 22:239–247
 26. Abrahamson M, Grubb A, Olafsson I, Lundwall Å (1987) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS Lett* 216:229–233
 27. Buttle DJ, Barret AJ (1984) Chymopapain. Chromatographic purification and immunological characterization. *Biochem J* 223:81–88
 28. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA (2004) PDB-2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 32:W665–W667
 29. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindhal E (2015) GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25
 30. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J (1996) Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc* 118:11225–11236
 31. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM (1997) LINC: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem* 18:1463–1472
 32. Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald: an N -log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98:10089–10092
 33. Carrette O, Burkhard PR, Hughes S, Hochstrasser DF, Sanchez JC (2005) Truncated cystatin C in cerebrospinal fluid: technical artefact or biological process? *Proteomics* 5:3060–3065
 34. Del Boccio P, Pieragostino D, Lugaresi A, Di Ioia M, Pavone B, Travaglini D, D'Aguzzo S, Bernardini S, Sacchetta P, Federici G, Di Ilio C, Gambi D, Urbani A (2007) Cleavage of cystatin C is not associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 62:201–204
 35. Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA (2008) K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct Biol* 8:25
 36. Calvete JJ (2007) Determinación del número de grupos sulfidrilo y de enlaces disulfuro mediante espectrometría de masas. *Proteómica* 0:21–28. <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/8926/pro4.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 37. Marky LA, Breslauer KJ (1987) Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers* 26:1601–1620
 38. Kuzmanic A, Zagrovic B (2010) Determination of ensemble-average pairwise root mean-square deviation from experimental B-factors. *Biophys J* 98:861–871
 39. Perlenfein TJ, Murphy RM (2016) Expression, purification, and characterization of human cystatin C monomers and oligomers. *Protein Expr Purif* 117:35–43
 40. Žerovnik E, Cimerman N, Kos J, Turk V, Lohner K (1997) Thermal denaturation of human cystatin C and two of its variants; comparison to chicken cystatin. *Biol Chem* 378:1199–1203
 41. Pace CN, Grimsley GR, Thomson JA, Barnet BJ (1988) Conformational stability and activity of ribonuclease T₁ with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J Biol Chem* 263:11820–11825

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00168

Matrícula: 2122803307

Estudio termodinámico de la asociación de la cistatina C humana con la quimopapaína



DAVID OCTAVIO TOVAR ANAYA
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALBA BERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. ANDRES HERNADEZ ARANA

VOCAL

CANCELADO

DR. ENRIQUE GARCIA HERNANDEZ

VOCAL

DR. HUGO NAJERA PEÑA

VOCAL

DRA. GEORGINA REGINA GARZA RAMOS MARTINEZ

SECRETARIA

DRA. ALBERTA JAQUELINE PADILLA ZUÑIGA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 26 del mes de marzo del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ANDRES HERNADEZ ARANA
- DR. ENRIQUE GARCIA HERNANDEZ
- DR. HUGO NAJERA PEÑA
- DRA. GEORGINA REGINA GARZA RAMOS MARTINEZ
- DRA. ALBERTA JAQUELINE PADILLA ZUÑIGA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: DAVID OCTAVIO TOVAR ANAYA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

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