



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**“Evaluación de las interacciones electrostáticas en
complejos enzima-inhibidor: la triosafosfato
isomerasa con inhibidores fosforilados”**

Tesis que presenta:
I.Q. Iris Natzielly Serratos Álvarez

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

Área de Biofisiocoquímica

Posgrado en Ciencias (Química)

Doctorado Directo.

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna.

Asesor del Departamento de Química de la UAM-Iztapalapa.

Dr. Gerardo Pérez Hernández.

Co-asesor del Departamento de Ciencias Naturales UAM-Cuajimalpa.

México, D.F., enero de 2011.



**“Evaluación de las interacciones electrostáticas en
complejos enzima-inhibidor: la triosafosfato
isomerasa con inhibidores fosforilados”**

Tesis que presenta:

I.Q. Iris Natzielly Serratos Álvarez

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

Área de Biofísicoquímica

Posgrado en Ciencias (Química)

Doctorado Directo.

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna.

Asesor del Departamento de Química de la UAM-Iztapalapa.

Dr. Gerardo Pérez Hernández.

Co-asesor del Departamento de Ciencias Naturales UAM-Cuajimalpa.

México, D.F., enero de 2011.

El Trabajo de Investigación titulado “**Evaluación de las Interacciones Electroestáticas en Complejos Enzima-Inhibidor: La Triosafosfato Isomerasa con Inhibidores Fosforilados**” se realizó en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa bajo la asesoría del **Dr. Rafael Zubillaga Luna** y la co-asesoría del **Dr. Gerardo Pérez Hernández** del Departamento de Ciencias Naturales, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa.

Durante los estudios de Doctorado se me otorgó una beca por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro: 193744.

Este proyecto se pudo realizar en gran medida gracias al apoyo financiero otorgado por el CONACyT a los doctores Rafael Zubillaga Luna y Gerardo Pérez Hernández a través de los convenios 46166 y 61044, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a los doctores Rafael Zubillaga Luna y Gerardo Pérez Hernández por el apoyo, la asesoría y las enseñanzas que me brindaron durante este proyecto incondicionalmente.

También quiero agradecer especialmente a los miembros del jurado por la revisión, comentarios y sugerencias al presente trabajo.

Presidente: Dr. Andrés Hernández Arana. Área de Biofisiocoquímica, Departamento de Química, UAM-Iztapalapa. E-mail: aha@xanum.uam.mx

Secretario: Dr. Hugo Nájera Peña. Departamento de Ciencias Naturales, UAM-Cuajimalpa.
E-mail: hnajera@correo.cua.uam.mx

Vocal: Dra. Claudia G. Benitez Cardoza. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN.
E-mail: beni1972uk@yahoo.com.mx

Vocal: Dr. Enrique García Hernández. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química. UNAM.
E-mail: egarciah@servidor.unam.mx

Vocal: Dr. Edgar Vázquez Contreras. Departamento de Ciencias Naturales, UAM-Cuajimalpa.
E-mail: evazquez@correo.cua.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce la colaboración de la Dra. Georgina Garza Ramos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, por su gran apoyo al permitirnos el uso del sistema de cromatografía FPLC para la purificación de la proteína triosafosfato isomerasa de levadura (ScTIM) así como la donación del inhibidor fosfoglicolohidroxamato (PGH), para la realización de los experimentos en este trabajo.

Se agradece al Dr. Enrique García Hernández del Departamento de Bioquímica, Instituto de Química de la UNAM, por su apoyo y discusión de este trabajo.

Se agradece a la Dra. Adela Rodríguez del Instituto de Química, UNAM, por permitirnos el uso del calorímetro de titulación isotérmica VP-ITC.

Se agradece a la Dra. Claudia Benítez Cardoza y al Dr. César Augusto Sandino Reyes López de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN, por el apoyo que nos brindaron al permitirnos realizar la primera expresión y purificación de la ScTIM en su laboratorio.

Se reconoce a la Bióloga Nallely Cabrera González por la asesoría técnica en la expresión de la proteína triosafosfato isomerasa de levadura.

Se agradece a la M. en C. Alma Jessica Díaz Salazar del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM por el apoyo en la purificación de la TIM en el FPLC y en la cuantificación de concentración del inhibidor PGH.

Al Dr. Andrés Hernández Arana quiero agradecer especialmente por el apoyo brindado y por sus comentarios que contribuyeron a enriquecer el trabajo.

Se agradece al Dr. Arturo Rojo Domínguez por todo su apoyo brindado, por sus comentarios y por las evaluaciones que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Quiero agradecer muy especialmente a:

Mi asesor, el **Dr. Rafael Zubillaga Luna** gracias por haber confiado en mí, por aceptar que trabajará con usted, se lo agradezco mucho, creo que nunca se lo dije. Me siento muy contenta de haber trabajado con usted, me enseñó con mucha paciencia desde como entender un cálculo básico hasta escribir una tesis, un artículo. Con todo respeto le digo que lo admiro mucho, considero que es el mejor asesor y un gran ser humano!!

A **Gerardo Pérez Hernández** gracias por preocuparte por mí, no sólo en el ambiente académico sino también en lo personal. Estoy muy agradecida por todo tu apoyo que me has brindado incondicionalmente y también por la paciencia que me has tenido para comprender las cosas con tus consejos. Fue un gusto haber trabajado contigo.

A **mis padres** gracias por todo el apoyo que me has brindado incondicionalmente, siempre han estado conmigo en los momentos buenos y en los momentos difíciles. Los quiero mucho!!

A mi mejor amiga, confidente y compañera **María Ofelia Orduña Guzmán**, gracias por todo tu apoyo que me has brindado desde que nos conocemos, por todas tus muestras de cariño, gracias por permitirme entrar en tu familia y formar parte de ella, ¡o ti voglio.

A mi amigo y hermano **Luis Franco Pérez**, no hay palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí en todos los aspectos, soy muy afortunada por tener un amigo como tú, te quiero, te adoro. Tu amistad es un tesoro para mí. Hemos convivido muchas cosas y espero que sigamos así por el resto de nuestras vidas.

A mis hermanitas: **Ariana Labastida Pólito, Francisca Plaza Rosas, Inés Reyes Ocampo, Jazmín Reyes Ocampo y Rosa Iris Núñez Serna**, que les puedo decir nos conocemos desde hace 10 años, son mis grandes amigas, hemos compartido infinidad de cosas juntas, sólo les puedo decir gracias por su amistad y por su cariño, las quiero mucho. Por supuesto a mi amigo **José Manuel Islas** gracias por tu amistad, cariño y por apoyarme en mis ocurrencias jajaja, también por ser mi compadre. Somos una gran familia!!

Al **Dr. Arturo Rojo** que le puedo decir, es una persona increíble gracias por el apoyo que siempre me ha brindado y a mi familia también. Sabe que lo admiro, lo quiero mucho y siempre estaré muy agradecida con usted, nunca olvidaré lo que hizo por nosotros.

Gracias **Dra. Jacqueline Padilla Zúñiga** por haberme permitido trabajar con usted al inicio del Doctorado y por apoyarme siempre en mis decisiones, lo valoré mucho y aprovecho para decirle que la estimo mucho.

Quiero agradecer especialmente a las chicas de la Coordinación de Planeación e Información: **Enedina Arenas, Araceli Ostos, María de la Paz Díaz y Patricia Vázquez**, no tengo palabras para agradecerles su amistad y su apoyo incondicional en todos los aspectos, gracias en verdad por apoyarme tanto, no creo merecerlo. Son grandes mujeres que las admiro mucho!!.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Biofísicoquímica del Departamento de Química. Muchas gracias en verdad por todo lo que me ayudaron cada uno de ustedes, aprendí mucho de sus comentarios, sugerencias y en algunos casos por ayudarme hacer mis experimentos:

- A mi hermanito académico Menandro Camarillo por su apoyo en todo momento.
- A María Eugenia Cruces Ángeles por su amistad y apoyo en todo momento.
- A Ponciano García, Citlali Toledo, Juan Carlos Martínez, Francisco Reyes y Arnulfo Vídrio gracias por su amistad, compañerismo y apoyo.

A mis amigos del laboratorio de la UNAM gracias por su amistad y por el apoyo brindado en su laboratorio me hacían sentir como si fuera el mío:

- A Jessica Díaz, Valeria Guzmán, Luis Téllez, Luis Blancas, Laura Álvarez e Isabel Velásquez.

Al Dr. Jaime Ortega López y M. en C. Iztel Quintas. A ambos les agradezco su apoyo incondicional y por hacerme sentir parte de su laboratorio durante la colaboración del proyecto en el CINVESTAV.

Al Dr. Tomás Viveros no hay palabras para agradecerle todo la ayuda que siempre me ha brindado desde que lo conozco. Muchas gracias por su cariño, por su amistad. Con todo respeto quiero decirle que lo admiro y lo quiero mucho!!

A Miguel Ángel García tampoco hay palabras para decirte cuanto te admiro y para decirte gracias por todo tu cariño y apoyo que me has brindado estos años, eres una persona muy valiosa e importante para mí, eres mi amigo que tanto adoro y respeto.

A Ana María Soto la profesora más alegre y divertida de Química, siento mucho que en él último año perdimos un poco el contacto por nuestras actividades, pero eso no impide seguir divirtiéndonos y disfrutar de un buen vino. Gracias por su amistad y cariño.

A Rosa María Luna te considero una excelente amiga, gracias por tus consejos que han sido muy importantes en mi vida y por apoyarme, te quiero.

A Pilar Castellanos gracias por tu cariño y amistad que me has brindado en estos años, lo valoro mucho, te quiero.

A Mildred Quintana Ruiz no me alcanzarían las palabras para decirte que eres una chica increíble, no he conocido a nadie con ese espíritu tan genuino que te caracteriza, eres una motivación importante en mi vida.

Al Dr. Fernando Rojas le debo mi beca, gracias a usted la conserve durante el Posgrado. Gracias también por brindarme siempre su apoyo y amistad.

A Joaquín Delgado te agradezco todo el apoyo que me has brindado, estoy contenta por haber convivido contigo en los últimos meses y por ayudarme hacer las gráficas para el artículo sin ti esto habría sido muy difícil. Eres a todo dar!

A mi tía Lila Luna te agradezco todo el cariño y la amistad que me has brindado en estos años, gracias por tus consejos siempre me han ayudado mucho para solucionar mis problemas. Te quiero mucho!!

A mamá Irene Velásquez muchas gracias por tu cariño y amistad. También muchas gracias por el apoyo que siempre me has brindado a mí y a mi familia. Te quiero mucho!!

A Roberto López Rendón muchas gracias por apoyarme incondicionalmente hasta el último momento, lo valoro y te admiro mucho.

A José Luis Hernández Pozos gracias por tu amistad y apoyo incondicional. Eres a todo dar!

A la Lic. Maricela Rojo Sánchez gracias por el gran apoyo que me has brindado desde que llegaste a la División, nunca olvidaré lo que hiciste por mí.

A las chicas de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería: Sandra, Paty, Lupita, Lulú, Bety, Ernestina gracias por su amistad y compañerismo de estos 9 años que trabajé en la División.

Gracias a los Directores de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería por el apoyo y comprensión que me han brindado al permitirme trabajar con ustedes y al mismo tiempo cumplir con el Doctorado: Dr. Tomás Viveros García, Dra. Verónica Medina Bañuelos y Dr. José Antonio De los Reyes Heredia.

Finalmente quiero agradecer al Dr. Javier Velázquez por el apoyo que me ha brindado y admiro mucho esa gran sencillez que lo caracteriza.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	5
1.1. Generalidades de las interacciones en el reconocimiento molecular proteína-inhibidor.....	5
1.2. Propiedades termodinámicas en el reconocimiento molecular proteína-inhibidor.....	8
1.3. Efecto de los iones en la interacción proteína-inhibidor.....	10
1.4. Aplicación del proyecto.....	11
CAPÍTULO II: ANTECEDENTES	12
2.1. Triosafosfato isomerasa.....	12
2.2. Estructura.....	13
2.3. Mecanismo de reacción de la TIM.....	15
2.3.1. Mecanismo clásico.....	16
2.3.2. Mecanismo cruzado.....	17
2.4. Inhibidores de la TIM.....	17
2.4.1. 2-fosfoglicolato (2PG).....	18
2.4.2. Fosfoglicolohidroxamato (PGH).....	19
2.5. Complejos TIM-2PG y TIM-PGH.....	20
CAPÍTULO III: OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	25
3.1. Objetivo general.....	25
3.2. Objetivos particulares.....	25

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS..... 26

Enfoque experimental.

4.1. *Expresión y purificación de la ScTIM..... 26*

 4.1.1. Determinación de la concentración de la ScTIM..... 26

 4.1.2. Parámetros cinéticos de la ScTIM..... 27

 4.1.3. Determinación de la concentración de los inhibidores fosforilados
 2PG y PGH..... 27

4.2. *Titulación fluorimétrica de ScTIM-2PG y ScTIM-PGH..... 28*

 4.2.1. Determinación de la constante de unión (K_u)..... 28

 4.2.2. Determinación del ΔH_u y el ΔC_p por el método de van't Hoff..... 30

4.3. *Calorimetría de Titulación..... 30*

 4.3.1. Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)..... 30

 4.3.2. Calorimetría de Titulación Multitérmica (CTM)..... 31

 4.3.3. Validación del método MTC para TIM-2PG..... 33

 4.3.4. Efectos de cambios de protonación ligados a la asociación..... 33

4.4. *Determinación del ΔH_u y ΔC_p a través de los modelos de área superficial
 accesible al solvente..... 33*

4.5. *Estabilidad de la TIM por Dicroísmo Circular (DC)..... 34*

Enfoque computacional

4.6. *Cálculos de la energía libre de unión ScTIM-inhibidor..... 35*

 4.6.1. Contribución electrostática a la energía libre de unión
 ScTIM-inhibidor..... 35

 4.6.1.1. Preparación de las estructuras cristalográficas para
 los cálculos de la energía electrostática de solvatación
 en un medio continuo..... 35

 4.6.1.2. Análisis de la contribución de la energía electrostática
 de solvatación en la unión ScTIM-inhibidor a
 diferentes fuerzas iónicas..... 36

4.6.2. Contribución no electrostática o no polar a la energía libre de unión ScTIM-inhibidor.....	38
4.6.2.1. Análisis no polar a la energía de unión ScTIM-inhibidor.....	38
4.6.3. Efecto de las cargas en la energía de unión ScTIM-inhibidor.....	38
4.6.4. Contribución electrostática a la estabilidad de la ScTIM en el estado nativo.....	39
CAPÍTULO V: RESULTADOS.....	40
<u>Enfoque experimental</u>	
5.1. Determinación de los parámetros catalíticos de la ScTIM recombinante.....	40
5.2. Efecto de los iones en la estabilidad de la ScTIM.....	40
5.2.1. Cálculos teóricos.....	40
5.2.2. Transiciones térmicas de desplegamiento de la ScTIM por DC variando la concentración de sal.....	41
5.3. Estudios Fluorimétricos.....	42
5.3.1. Determinación de la (K_u).....	42
5.3.2. Efecto de la fuerza iónica en la K_u	43
5.3.3. Determinación del ΔH_u y el ΔC_p por el método de van't Hoff.....	45
5.4. Estudios Calorimétricos.....	46
5.4.1. Calorimetría de titulación isotérmica (CTI).....	46
5.4.1.1. Cambios de protonación en la unión.....	47
5.4.2. Calorimetría de titulación multitérmica (CTM).....	47
5.4.2.1. Determinación del ΔC_p por CTM.....	47
5.4.2.2. Validación del método CTM para el sistema ScTIM-inhibidor.....	50
5.5. Integración de los parámetros termodinámicos para TIM-2PG y TIM-PGH obtenidos por las técnicas fluorimétricas y calorimétricas.....	52

5.6. <i>Termodinámica estructural</i>	53
5.6.1. Cálculos de energética de unión basada en modelos de área superficial...	53
<u>Enfoque computacional</u>	
5.7. <i>Determinación de la energía de unión para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH</i>	55
5.7.1. Importancia de grupos cargados en la asociación de la ScTIM con sus inhibidores.....	58
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN	60
<u>Enfoque experimental</u>	
6.1. <i>Efecto de las sales en la estabilidad de la ScTIM</i>	60
6.2. <i>Análisis de la termodinámica de unión en la interacción ScTIM-2PG y ScTIM-PGH</i>	60
6.2.1. El ΔH_u , ΔS_u y ΔG_u para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH a fuerza iónica de 0.06 M.....	63
6.2.2. El ΔH_u , ΔS_u y ΔG_u para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH bajo el efecto de la fuerza iónica.....	64
6.3. <i>Termodinámica estructural</i>	65
6.3.1. Entalpía de unión (ΔH_u).....	65
6.3.2. Capacidad calorífica (ΔCp).....	67
<u>Enfoque computacional</u>	
6.4. <i>Energía libre de unión (ΔG_u)</i>	67
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	70
7.1. Conclusiones.....	70
7.2. Perspectivas.....	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

APÉNDICE A. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE LA CONSTANTE DE UNIÓN PROTEÍNA-LIGANDO.....	79
APÉNDICE B. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN.....	83
APÉNDICE C. CICLO TERMODINÁMICO DE LA ENERGÍA ELECTROSTÁTICA.....	85
APÉNDICE D. PERFILES DE DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA POR DC.....	87
APÉNDICE E. ANÁLISIS DE CONTACTO TIM-INHIBIDOR OBTENIDOS POR LPC.....	89
APÉNDICE F. ENERGÍAS DE UNIÓN EXPERIMENTALES Y TEÓRICAS.....	93
APÉNDICE G. DEDUCCIÓN DE LA ECUACIÓN 6.2.....	98

ABREVIATURAS

APBS	Adaptive Solver Poisson-Boltzmann
α -GP	α -glicerofosfato
α -GDH	α -glicerofosfato deshidrogenasa
ASA	Área de superficie accesible al solvente
ΔASA	Diferencia de área de superficie accesible al solvente
ΔASA_{pol}	Diferencia de área de superficie accesible al solvente tipo polar
ΔASA_{apol}	Diferencia de área de superficie accesible al solvente tipo no polar
CTI	Calorimetría de titulación isotérmica
CTM	Calorimetría de titulación multitérmica
ΔC_p	Capacidad calorífica de la unión proteína-inhibidor
DC	Dicroísmo circular
DGAP	D-gliceraldehído-3- fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTT	Ditiotreitol
2PG	2-fosfoglicolato
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
Ec.	Ecuación
ϵ	Constante dieléctrica
f_D	Fracción de desnaturalización
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
γ	Tensión superficial
ΔG_u	Energía libre de Gibbs de la unión proteína-inhibidor
ΔG_{u-coul}	Energía libre de Gibbs coulombica de la unión proteína-inhibidor
$\Delta G_{u,elec}$	Energía libre de Gibbs electrostática de la unión proteína-inhibidor
$\Delta G_{u,apol}$	Energía libre de Gibbs no polar de la unión proteína-inhibidor
$\Delta G_{u,sol}$	Energía libre de Gibbs de solvatación de la unión proteína-inhibidor
HPO_4^{2-}	Fosfato de hidrógeno
ΔH_{ioniz}	Entalpía de ionización
ΔH_u	Entalpía de unión proteína-inhibidor

IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
k_{cat}	Número de recambio
k_{cat}/K_M	Eficiencia catalítica
K_I	Constante de inhibición
K_M	Constante de Michaelis
K_u	Constante de unión proteína-inhibidor
LB	Luria Bertani
LPC	Ligand-protein contacts
n	Número de sitios de unión
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Pipes	Piperazina-1,4-bis (2-etanosulfónico)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
P-C	Proteína-Carbohidrato
P-L	Proteína-Ligando
P-P	Proteína-Proteína
PDB	Protein Data Bank
PGH	Fosfoglicolohidroxamato
ΔS_u	Entropía de unión proteína-inhibidor
θ_N	Elipticidades en el estado nativo
θ_D	Elipticidades en el estado desnaturalizado
TF	Titulaciones Fluorimétricas
TE	Trietanolamina, EDTA
TED	Trietanolamina, EDTA y Ditiotreitól
T_m	Temperatura media de transición
TIM	Triosafosfato Isomerasa
ScTIM	Triosafosfato Isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminoetano.
V_{max}	Velocidad máxima
VMD	Visual Molecular Dynamics

RESUMEN

En este trabajo se caracterizó la energética de unión de la enzima triosafosfato isomerasa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM) a diferentes fuerzas iónicas y temperaturas, con dos de sus inhibidores más afines: el 2-fosfoglicolato (2PG) y fosfoglicolohidroxamato (PGH). Se determinaron los parámetros termodinámicos del proceso de unión: K_u , ΔG_u , ΔH_u , ΔS_u y ΔCp en presencia de concentraciones crecientes de NaCl por titulaciones fluorimétricas (TF) y calorimétricas. La titulación calorimétrica fue a través del método convencional (CTI) y por un nuevo método llamado *calorimetría de titulación multitérmica* (CTM), el cual permite medir el ΔCp en un sólo experimento. Se descartó una posible interacción específica de los iones Na^+ y Cl^- con la enzima nativa, considerando que al aumentar la concentración de NaCl las transiciones térmicas de desplegamiento se desplazaron a temperaturas más bajas. Al aumentar la fuerza iónica (I) los parámetros termodinámicos K_u , ΔG_u y ΔH_u , se hacen menos favorables y ΔS_u menos desfavorable, lo que indica que las interacciones carga-carga son importantes en la asociación. De la variación de K_u con I , se determinó la contribución electrostática al ΔG_u , siendo el 36% y 26% para la formación del complejo ScTIM-2PG y ScTIM-PGH respectivamente, a $I = 0.06$ M y 25°C . La afinidad de unión de PGH para ScTIM es mayor y se debe a un ΔH_u más favorable comparado con la unión de 2PG (por $19\text{-}24$ kJ mol^{-1} , a 25°C), de acuerdo al análisis de las estructuras cristalográficas de ambos complejos hay una diferencia de cinco puentes de hidrógeno entre 2PG y PGH que podría explicar parte de la energética de unión. Las entalpías de unión de la ScTIM con ambos inhibidores (ΔH_u) fueron las mismas medidas en presencia de trietanolamina y en PIPES, por lo que se descartaron cambios netos de protonación en el medio debido a la unión de los inhibidores. La interacción ScTIM-inhibidor esta acompañada por un ΔCp negativo, el cual se hace menos negativo al aumentar la fuerza iónica. Los valores de ΔCp determinados a $I = 0.06$ M fueron mucho más negativos que los valores predichos por los modelos de área superficial. Como se ha demostrado en otros sistemas, este ΔCp negativo puede explicarse por moléculas de agua secuestradas en la interfase cuando los inhibidores se unen a la proteína. Los parámetros termodinámicos de unión para el complejo ScTIM-2PG cambiaron más bajo el efecto de la fuerza iónica, en comparación con los valores obtenidos para el complejo ScTIM-PGH. Esta mayor dependencia es consistente con los equilibrios acoplados de protonación necesarios para producir la especie dianiónica de 2PG que se une a la TIM, procesos no requeridos para la unión de PGH.

En términos de ΔG_u , los valores obtenidos experimentalmente se compararon con las energías calculadas teóricamente a partir de las contribuciones electrostática (energía de solvatación y energía coulombica) y no electrostática. Los valores de ΔG_u experimentales y teóricos no corresponden de manera exacta, sin embargo, se observó que en ambas evaluaciones la afinidad de los complejos ScTIM-inhibidor disminuyó al aumentar la fuerza iónica del medio. Además en el ΔG_u teórico no se consideran los efectos entrópicos rotacionales y traslacionales. Para el complejo ScTIM-2PG se realizó una aproximación considerando la entropía rotacional y traslacional, determinando un $T\Delta S = -31.5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Este efecto se le adicionó al ΔG_u teórico a $I = 0.06 \text{ M}$ y se obtuvo un valor de -79 kJ mol^{-1} , el cual es más cercano al $\Delta G_{u, \text{intr.}} = -41.05 \text{ kJ mol}^{-1}$ determinado a partir de los equilibrios de acoplados de protonación. Por otro lado, se realizó un análisis sobre el efecto de las cargas de algunos residuos en la asociación ScTIM-inhibidor y su impacto en la contribución electrostática a la energía de unión. Al cambiar la carga de algunos átomos de la Lys12 y del Glu165 de la ScTIM, así como las cargas del grupo fosfato de los inhibidores, el ΔG_u siempre fue desfavorable, por lo que las interacciones electrostáticas que se establecen entre la proteína y los inhibidores parecen ser indispensables para la unión.

ABSTRACT

In this work, we characterized the binding energetics of yeast triosephosphate isomerase (ScTIM) with two phosphorylated inhibitors: 2-phosphoglycollate (2PG) and phosphoglycolohydroxamate (PGH) at different ionic strengths and temperatures. We determined the thermodynamic parameters of the binding process: K_b , ΔG_b , ΔH_b , ΔS_b and ΔC_p in presence of different concentrations of NaCl, through fluorimetric titrations and calorimetric ones in the conventional mode of ITC, and using a novel method called multithermal titration calorimetry, MTC, which allows to measure ΔC_p in a single experiment. Considering that increasing concentrations of NaCl shifted the circular dichroism (CD) thermal scans of ScTIM to lower temperatures, we ruled out a possible specific interaction of ions Na^+ and Cl^- with the native enzyme. Increasing the ionic strength (I) causes K_b , ΔG_b and ΔH_b became less favorable while ΔS_b turned less unfavorable, indicating that charge-charge interactions are important in the association. From the variation of K_b with I , we determined the electrostatic contribution to ΔG_b , being 36% and 26% for ScTIM–2PG and ScTIM–PGH, respectively, at $I = 0.06$ M and 25 °C. The greater affinity of PGH for ScTIM is due to a more favorable ΔH_b as compared with 2PG (by 19–24 kJ mol⁻¹, at 25 °C). This difference is compatible with up to five more hydrogen bonds PGH establishes with ScTIM. Binding enthalpy of ScTIM for both inhibitors (ΔH_b) were the same when measured in triethanolamine and in PIPES, hence linked protonation effects were discarded. Both binding ΔC_p were negative, becoming less negative with increasing ionic strength. ΔC_p at $I = 0.06$ M were much more negative than values predicted by surface area models. This highly negative ΔC_p could be explained by water molecules trapped in the interface when ligands bind to protein. Thermodynamic binding functions for the ScTIM–2PG complex changed more with ionic strength, as compared with those from the ScTIM–PGH couple. This greater dependence is consistent with linked, but compensated, protonation equilibriums to yield the dianionic species of 2PG that binds to ScTIM, processes not required in the case of PGH. The ΔG_u values were compared with the sum of calculated energies as electrostatic (solvation and coulombic energy) and non-electrostatic contributions. These values were not similar; however, in both ScTIM-inhibitor complexes the affinity became less favorable with increasing ionic strength.

Theoretical ΔG_u did not consider rotational and translational entropic effects. For ScTIM-2PG complex an approach was made considering the rotational and translational entropy, determining a $T\Delta S = -31.5$ kJ mol⁻¹. This effect was added to theoretical ΔG_u at $I = 0.06$ M being -79 kJ mol⁻¹, which is closer to $\Delta G_{u, intr} = -41.05$ kJ mol⁻¹ determined by considering protonation equilibriums.

On the other hand, the calculated binding energy became unfavorable when Lys12 and Glu165 charges of ScTIM were turned off, as well as with charges of the phosphate group of the inhibitors, evidencing the essential role these charges play in the binding process.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de las interacciones en el reconocimiento proteína-inhibidor.

Las interacciones electrostáticas juegan un papel crucial en muchos procesos biomoleculares y son parte fundamental en el reconocimiento molecular, así como en la unión de sustratos o inhibidores cargados a macromoléculas [Honig, B. y Nicholls, A., 1995].

Entre los tipos más comunes de interacción se encuentra el de las enzimas y sus sustratos o algunas otras moléculas que tienen influencia sobre su actividad. La actividad de una proteína puede ser modificada e incluso eliminada por diversas sustancias que se unen a ella, por ejemplo, los inhibidores. Cualquier sustancia que reduzca la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente puede ser considerada como un inhibidor. Éstos pueden ocupar temporalmente el sitio activo por semejanza estructural con el sustrato original (inhibidor competitivo) o bien alterar la conformación de la proteína, impidiendo su unión al sustrato (inhibidor no competitivo). Se sabe que la inhibición de la actividad de una proteína es uno de los mecanismos de regulación más importantes de las células y muchos inhibidores son utilizados como fármacos, drogas, venenos y toxinas, por lo que existe una gran cantidad de investigaciones sobre el reconocimiento molecular proteína-inhibidor.

El reconocimiento específico de inhibidores por proteínas es la base para el diseño de fármacos. Diversas investigaciones sobre los fármacos empleados en las últimas décadas han revelado que la acción terapéutica de éstos incide principalmente en las proteínas, ya sea como receptores moleculares o como enzimas. Otros ejemplos son la interacción entre hormonas y sus receptores, antígeno-anticuerpo, drogas-receptores, proteína-proteína, proteína-carbohidratos, etc.

La unión de una proteína con un inhibidor involucra la ruptura y formación de interacciones no covalentes, como: interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Fig. 1.1).

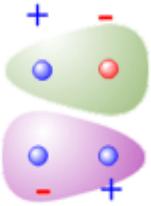
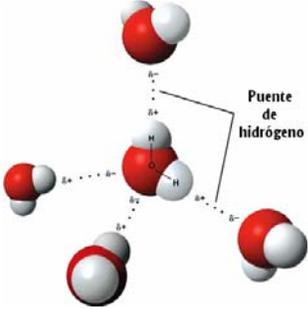
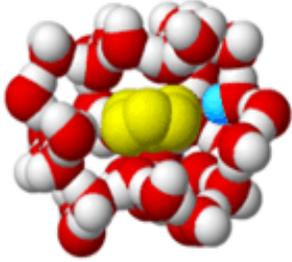
a) interacciones electrostáticas	b) interacciones de van der Waals	c) puentes de hidrógeno	d) interacciones hidrofóbicas
			
entre grupos cargados	atracción o repulsión entre dipolos eléctricos.	interacción atractiva de un átomo de hidrógeno con un átomo electronegativo	no pueden interactuar muy favorablemente con el agua

Figura 1.1. Interacciones no covalentes: a) interacciones electrostáticas, b) interacciones intermoleculares de van der Waals, c) puentes de hidrógeno y d) interacciones hidrofóbicas, las cuales están involucradas en la unión de una proteína con un inhibidor.

Una breve descripción de estas interacciones se da a continuación:

a) Interacciones electrostáticas. Estas interacciones dependen de la magnitud de las cargas, la distancia entre los grupos cargados y la constante dieléctrica del medio en el que tiene lugar la reacción. Esta unión es descrita de manera adecuada por la ecuación de Coulomb [Dill, K.A. y Bromberg, S., 2003]. Las interacciones electrostáticas son muy importantes en los sistemas biológicos, por ejemplo, un sustrato cargado negativamente que interactúa con una enzima a menudo lo hace con un aminoácido cargado positivamente [Dell'Orco, D. *et al.*, 2005].

b) Interacciones intermoleculares de van der Waals. Este tipo de interacciones estabilizan a las moléculas, en el que participan dos tipos de energía; la energía de atracción y la energía de repulsión que se forman entre átomos contiguos. La energía es cero hasta que la distancia se reduce dependiendo del volumen del átomo, así la energía de atracción aumenta cuando los átomos se van acercando y la energía de repulsión incrementa a distancias menores de 3.0 Å. El punto en el cual la energía de repulsión y atracción están en balance es usado para definir el radio de van der Waals característico de cada átomo, el cual permite establecer una medida del límite al que puede acercarse un átomo con otro.

Es una propiedad muy útil, de la cual se puede obtener información estructural de las interacciones de las proteínas [Kyte, J., 2005].

c) Puentes de hidrógeno. Las interacciones por puentes de hidrógeno son enlaces débiles (menos de 5 kcal mol⁻¹) que dependen de la geometría y de las moléculas a su alrededor, pero son más fuertes que una interacción van der Waals. Su energía puede ser descrita por interacciones electrostáticas (Coulómbicas) entre la carga parcial atómica del átomo del hidrógeno donador y el átomo del aceptor [Matthews, B., 2001]. Los puentes de hidrógeno son el resultado de una atracción electrostática de un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo con otro átomo electronegativo. Por ejemplo, un puente de hidrógeno se puede formar entre una amida y un grupo carboxilo, N-H...O=C, en este caso el grupo NH es llamado grupo donador y el aceptor es el grupo O=C. En proteínas las interacciones por puentes de hidrógeno tienen un papel importante en las propiedades biológicas de las macromoléculas, especialmente en el mantenimiento de las estructuras, de unión, catálisis y cambios conformacionales [Kyte, J., 2005].

Interacciones hidrofóbicas. El papel biológico del agua como solvente es disolver una importante variedad de moléculas pequeñas desde sales, azúcares y moléculas más grandes como proteínas y ácidos nucleicos. Algunas moléculas tienen mejor solubilidad en el agua que otras. Los iones y aminoácidos cargados pertenecen a esta categoría y son llamados hidrofílicos. Las moléculas de baja solubilidad son aminoácidos hidrofóbicos, por ejemplo la leucina, aminoácidos aromáticos y las colas de hidrocarburos de los lípidos [Matthews, B., 2001]. El interés biológico de la hidrofobicidad radica en el papel que juegan en las asociaciones de biomoléculas y sus conformaciones funcionales. Un ejemplo son las proteínas, en las que algunas cadenas laterales tienen ambos grupos polares y no polares. Cuando se pliegan las proteínas los grupos no polares tienden a repeler el agua y esta parte no polar generalmente queda inmersa en el interior de la proteína [Kyte, J., 2005].

En resumen, las interacciones electrostáticas y contactos de van der Waals son de naturaleza puramente electrostática (atracción o repulsión de cargas eléctricas), aunque en las últimas pueden participar moléculas neutras, interactuando bien con otras moléculas neutras o con iones. Las interacciones de puentes de hidrógeno tienen también naturaleza electrostática, pero presenta simultáneamente un cierto carácter covalente. Por último, las interacciones hidrofóbicas son características de aquellas moléculas que no pueden interactuar muy favorablemente con el agua y tienden a segregarse formando regiones

de baja polaridad. Estas interacciones son las responsables de la estabilidad al formarse el complejo proteína-inhibidor.

1.2. Propiedades termodinámicas en el reconocimiento molecular proteína-inhibidor.

La afinidad de unión o constante de unión (K_u) refleja los efectos de las interacciones no covalentes entre proteína e inhibidor ($P + I \rightleftharpoons PI$) puede describirse mediante la siguiente ecuación:

$$K_u = \frac{[PI]}{[P][I]} \quad \text{Ec.(1.1)}$$

La necesidad de calcular con precisión la constante de unión o su equivalente, la energía libre de unión (ΔG_u) de inhibidores a proteínas puede tener aspectos prácticos en la identificación de nuevas moléculas que pueden unirse a proteínas dianas y actuar como drogas terapéuticas [Hyung-June y Benoit, R., 2005]. Se sabe que la constante de unión es una medida de la energía de interacción proteína-inhibidor según la relación:

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u \quad \text{Ec.(1.2)}$$

El ΔG_u tiene dos componentes, el entálpico (ΔH_u) y el entrópico (ΔS_u), los cuales dan información sobre la naturaleza de las interacciones involucradas.

$$\Delta G_u = \Delta H_u - T\Delta S_u \quad \text{Ec.(1.3)}$$

La unión es un proceso controlado por la termodinámica, donde el ΔG_u con sus dos componentes (ΔH_u y ΔS_u), son esenciales para abordar el problema del diseño de fármacos. Es sabido que un fármaco o inhibidor debería unirse a su diana con alta afinidad y selectividad, ya que la afinidad es una función combinada de la entalpía y entropía de unión, para obtener dicha afinidad se requiere que ambos términos contribuyan favorablemente a la unión. El ΔH_u y ΔS_u de unión reflejan diferentes tipos de interacciones por ejemplo interacciones atractivas como los puentes de hidrógeno, contactos van der Waals que se establecen entre el inhibidor y la proteína e interacciones segregativas como el efecto hidrofóbico. Estas interacciones contribuyen de manera diferente al ΔH_u y ΔS_u , es decir, poseen diferentes “**firmas termodinámicas**”.

El ΔH_u asociado en la interacción proteína-inhibidor es difícil optimizar, ya que se compone de dos contribuciones importantes: a) la entalpía favorable que está asociada con la formación de puentes de

hidrógenos, interacciones electrostáticas y contactos de van der Waals y b) la entalpía desfavorable, asociada con la desolvatación de las superficies de contacto. El ΔS_u es más fácil optimizar, se compone de tres contribuciones importantes: a) La entropía de desolvatación, que es favorable en el caso de superficies no polares y se origina por la liberación de moléculas de agua ordenadas alrededor de estos grupos, b) La pérdida de entropía conformacional por el congelamiento de enlaces rotables en la superficie de contacto y c) la pérdida de grados de libertad debido a la unión del inhibidor con la proteína [Freire, E., 2008].

Además, en la caracterización termodinámica de la unión molecular, el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) es otra función importante a considerar. El ΔC_p es indispensable para cuantificar la dependencia térmica del ΔH_u y ΔS_u , y también se considera un sensor importante de la reorganización de las interacciones moleculares provocado por los cambios en el área expuesta al disolvente de los solutos interactuantes [Sturtevant, J.M., 1977; Gómez, J. et al., 1995; Cooper, A., 2005]; de manera que el ΔC_p puede utilizarse para obtener información de la solvatación aislada de otros efectos [Gallagher, K. y Sharp, K., 1998].

Desde hace dos décadas, varios estudios han abordado el problema de relacionar los parámetros termodinámicos de unión con características de la estructura atómica de las moléculas involucradas en la formación del complejo y del complejo mismo [Janin, J., 1997]. Para estimar el ΔH_u y el ΔC_p estructural, algunos modelos se basan en parametrizaciones empíricas que correlacionan la magnitud del área superficial accesible al solvente (ASA) que se oculta en la interfase del complejo, determinado como $\Delta ASA = ASA_{complejo} - ASA_{proteina} - ASA_{inhibidor}$. Estas parametrizaciones están divididas en dos contribuciones, polar (O, N, P) y no polar (C, S). Las áreas correspondientes se denotan como ΔASA_{pol} y ΔASA_{apol} respectivamente, y los coeficientes de proporcionalidad como Δh_{pol} , Δh_{apol} para el ΔH_u y $\Delta c_{p,pol}$, $\Delta c_{p,apol}$ para el ΔC_p [Murphy, K. P. y Freire, E., 1992; Luque, I. y Freire, E., 1998]. Dichos coeficientes han sido obtenidos a través del análisis de complejos proteína-ligando (P-L) [Luque, I. & Freire, E., 2002], complejos proteína-proteína (P-P) y de desplegamiento de proteínas y de complejos proteína-carbohidratos (P-C) [García-Hernández, E. & Hernández-Arana, A., 1999].

$$\Delta H_u = \Delta h_{pol} * \Delta ASA_{pol} + \Delta h_{apol} * \Delta ASA_{apol} \quad \text{Ec. (1.4)}$$

$$\Delta C_p = \Delta c_{p,pol} * \Delta ASA_{pol} + \Delta c_{p,apol} * \Delta ASA_{apol} \quad \text{Ec. (1.5)}$$

Sin embargo, algunos estudios han reportado discrepancias entre valores experimentales termodinámicos y cálculos de área superficial [Holdgate, G.A. *et al.*, 1997; Stites, W. E., 1997; Katragadda, M. *et al.*, 2004; Milev, S. *et al.*, 2007]. Esto indica que algunos aspectos de los mecanismos moleculares implicados en la unión no son muy claros, debido a la diversidad de factores físicos que participan en el reconocimiento macromolecular [Bjelić, S. y Jelesarov, I., 2008].

1.3. Efectos de los iones en la interacción proteína-inhibidor.

La disminución de la afinidad debido a iones disueltos suele atribuirse a un debilitamiento de las interacciones carga-carga a través de un mecanismo de apantallamiento. En condiciones fisiológicas, un gran número de iones positivos y negativos están siempre presentes y se sabe que la fuerza iónica del medio afecta las propiedades termodinámicas de un sistema, como la afinidad de unión [Lambeir, A. M. *et al.*, 1987; Fedosova, N. U. *et al.*, 2002] y la estabilidad térmica [Goto, Y. y Fink, A. L., 1990]. Sin embargo, en algunos casos la variación de la energética de unión de un complejo con la concentración de sales puede deberse más bien a una unión específica de los iones a la proteína [Waldron, T. T. *et al.*, 2005].

En el presente trabajo se evaluó el papel de las interacciones electrostáticas en complejos proteína-inhibidor cuantificando las propiedades termodinámicas: K_u , ΔG_u , ΔH_u , ΔS_u y ΔCp a diferentes fuerzas iónicas. Para este fin, se estudió la triosafosfato isomerasa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM), con dos de sus inhibidores fosforilados más afines: el 2-fosfoglicolato (2PG) y el fosfoglicolohidroxamato (PGH), a través de técnicas fluorimétricas y calorimétricas. En el sitio catalítico de la ScTIM participa el residuo de Lys12, cuya carga es positiva y determinante para la afinidad de unión de los sustratos naturales fosfodianiónicos como dihidroxioacetona fosfato (DHAP) y D-gliceraldehído-3- fosfato (DGAP) e inhibidores fosforilados.

Por otro lado, se cuenta con herramientas computacionales para estimar el ΔG_u de ambos complejos, determinando la contribución electrostática a partir de la solución numérica de la ecuación de Poisson-Boltzmann, para las moléculas involucradas y cuantificando por separado la contribución no electrostática [Baker, N. A., 2004]. Esto permitirá realizar una comparación con los valores experimentales que se obtuvieron a través de las diferentes técnicas de titulación.

1.4. Aplicación del Proyecto.

Los conocimientos estructurales y funcionales de la triosafosfato isomerasa (TIM) han sido utilizados en el diseño de fármacos contra protozoarios patógenos que dependen de la glucólisis para obtener la energía necesaria para crecer y proliferar causando enfermedades, tales como la malaria y la tripanosomiasis [Gómez-Puyou *et al.*, 1995; Ray *et al.*, 1999; Tellez-Valencia, *et al.*, 2002]. Además de esclarecer los principios básicos de las interacciones electrostáticas que se establecen entre la TIM con sus inhibidores, la evaluación de la contribución electrostática a la energía de unión de ligandos con potencial farmacológico podría ayudar a optimizar la afinidad y especificidad de dichos inhibidores, no sólo en el sitio catalítico. También se han utilizado otro tipo de inhibidores que se unen en un sitio de la TIM, desestabilizando el contacto entre subunidades y provocando de esta forma la pérdida de actividad catalítica y finalmente su desnaturalización.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

2.1. Triosafosfato isomerasa.

La TIM es una enzima glucolítica que cataliza con una alta eficiencia la isomerización reversible de las triosas DHAP y DGAP a través de un intermediario enodiol (Fig. 2.1). [Knowles, J. R., 1991]. Esta reacción es la quinta de la glucólisis y la última en la primera etapa de este proceso. La velocidad de la isomerización es controlada únicamente por la difusión de los sustratos [Knowles, J. R., 1991]; por una parte, las variaciones en la viscosidad del disolvente influyen sobre el valor que adquiere la velocidad de transformación de sustrato en producto, de manera inversamente proporcional [Blacklow, S.C. *et al.*, 1988], y por otra, la relación k_{cat}/K_M por el DGAP como sustrato es del orden de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, siendo un valor comparable al calculado para reacciones bimoleculares en solución controladas por difusión ($10^8\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Knowles, J. R. y Alberly, W.J., 1977]. De ambas triosas, solo el DGAP puede continuar la ruta de transformación de la glucosa hasta piruvato, la TIM asegura la producción neta de ATP en la glucólisis, por ello la TIM ha sido considerada como un blanco atractivo en el diseño de fármacos que puedan actuar contra la enzima de parásitos que tienen por hábitat la sangre de mamíferos, donde consumen la glucosa presente causando enfermedades tales como la malaria y la tripanosomiasis [Gómez-Puyou *et al.*, 1995; Ray *et al.*, 1999; Tellez-Valencia, *et al.*, 2002]. También esta reacción es esencial *in vivo*, porque se ha encontrado que la deficiencia de TIM en humanos causa anemia crónica hemolítica, trastornos neurológicos y un progresivo deterioro neuromuscular, provocando la muerte dentro de los primeros 5 años de edad. [Rodríguez-Almazan, C. *et al.*, 2008; Alahuhta, M.y Wierenga, R.K., 2010].

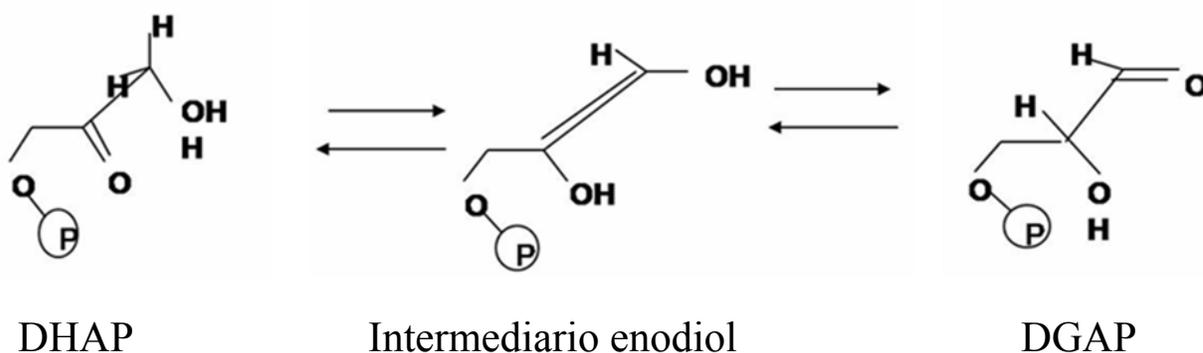


Figura 2.1. La TIM cataliza la interconversión de DHAP a DGAP. Ésta es la última reacción de la primera etapa de la ruta glucolítica.

2.2. Estructura.

La ScTIM es una enzima formada por dos subunidades idénticas de 26.7 kDa con 248 residuos cada una, asociadas por interacciones no covalentes. Cada monómero adopta un patrón de plegamiento de barril (β/α)₈ en la que ocho hebras β paralelas constituyen la parte interna de un barril rodeado por ocho hélices α , conectados entre sí por asas (Fig. 2.2) [Lolis *et al.*, 1990].

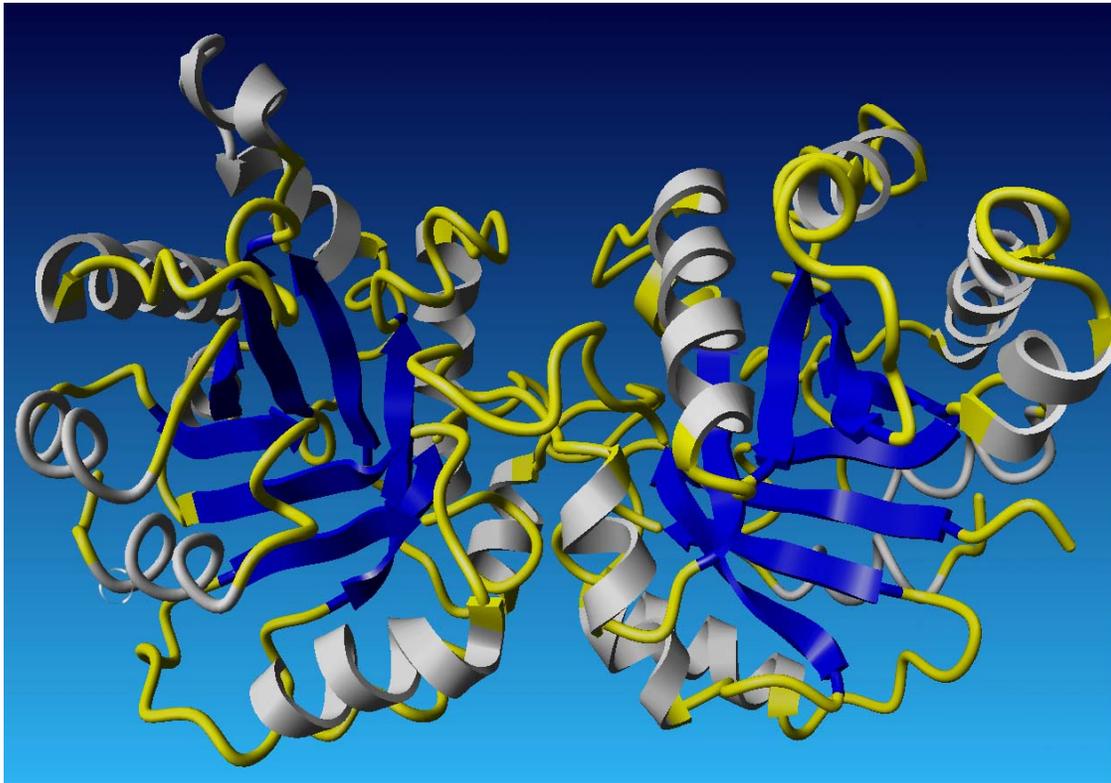


Figura 2.2. **Estructura tridimensional de la ScTIM sin inhibidor.** Se muestran las hebras β paralelas (azul), las hélices α (blanco) que rodean al barril de hebras β , las asas que son los conectores entre hebras β y hélices α (amarillo). Se utilizó el programa YASARA (<http://www.yasara.org>) para visualizar la estructura tridimensional (ID PDB 2YPI).

La base datos del European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), tiene registrados a 2241 secuencias de la familia TIM; de las cuales 1322 secuencias pertenecen al reino monera, 848 al protista y 69 Arqueobacterias. Los residuos que participan en la catálisis están estrictamente conservados: Lys12, His95 y Glu165, en la numeración de la ScTIM. (Fig. 2.3).

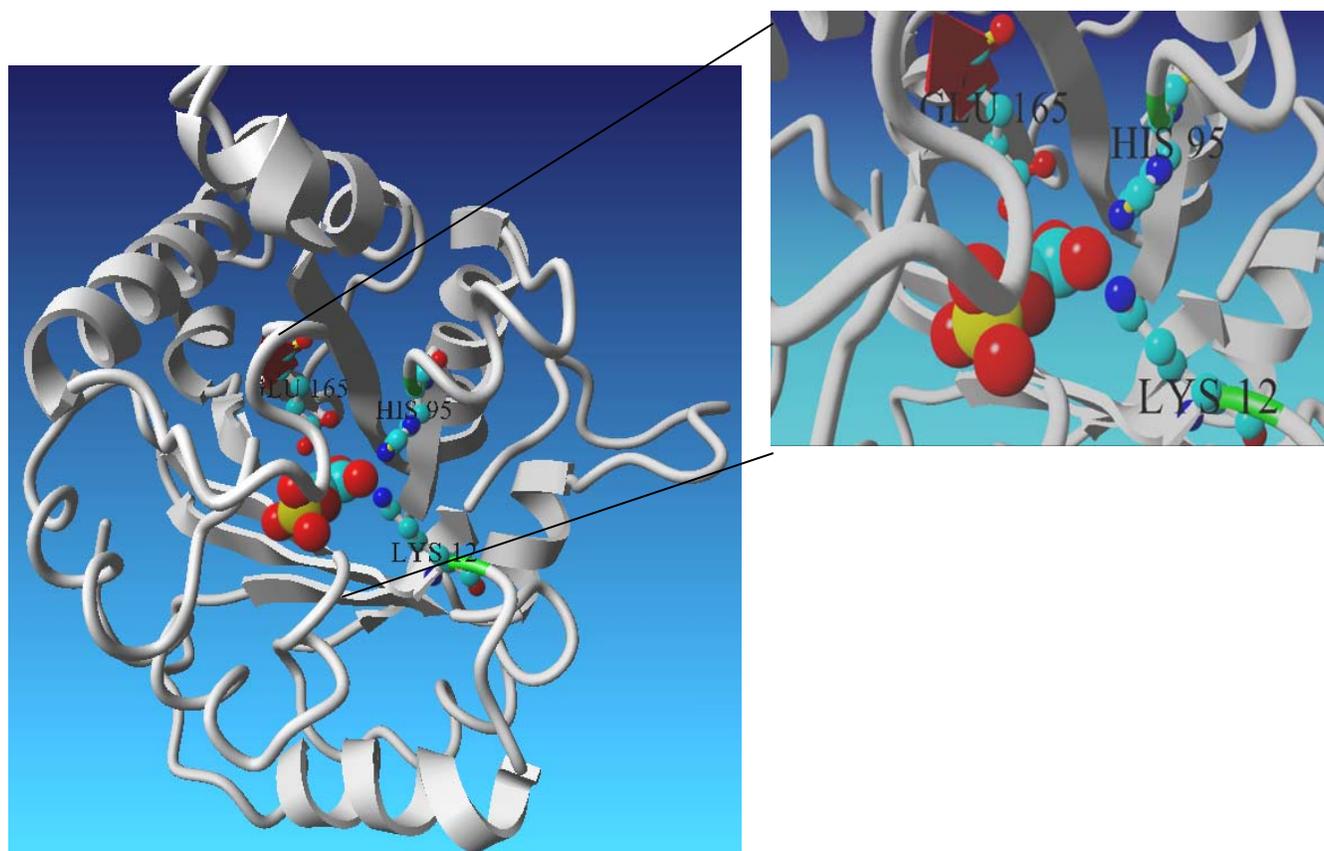


Figura 2.3. **Estructura tridimensional de una de las subunidades de la ScTIM.** Se destacan los tres residuos catalíticos (Lys 12, His 95 y Glu 165) interactuando con un análogo de sustrato, el 2-fosfoglicolato (ID PDB 2YPI). Se utilizó el programa YASARA (<http://www.yasara.org>) para visualizar las estructura tridimensional.

No hay evidencia de que exista cooperatividad catalítica entre las dos subunidades de la TIM, sin embargo, la enzima es solamente activa como dímero [Waley, S.G., 1973; Casal, J.I. *et al.*, 1987; Zhang, Z. *et al.*, 1994]. Otra característica importante de esta enzima es la flexibilidad que tiene el asa 6 localizada en el sitio catalítico (residuos del 166 al 177) seguido inmediatamente después del residuo catalítico Glu165 (en la secuencia de la ScTIM). Esta subestructura presenta un movimiento de cierre y apertura correlacionada con el movimiento de la cadena lateral del Glu165 sobre el sitio activo [Sampson, N.S. y Knowles, J.R., 1992; Lolis, E. y Petsko, G.A., 1990; Casteleijn, M.G. *et al.*, 2006] e interactúa con los sustratos o inhibidores que se unen en él, manteniendo un núcleo hidrofóbico para proteger al sitio activo del contacto con el agua durante la isomerización, de esta forma se previene la eliminación del grupo fosfato del intermediario enodiol y se evita la formación del subproducto tóxico metilglioxal, que se genera cuando la reacción se lleva a cabo en un ambiente acuoso [Pompliano *et al.*, 1990]. Sin embargo, estudios por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) sugieren que el movimiento

de la asa catalítica no depende de la unión de sustrato o inhibidor [Williams, J. C. y McDermott, A. E., 1995]; sino que es una propiedad característica de la TIM ya que la velocidad de cierre/apertura del asa es independiente de la unión [Xiang, J., *et al.*, 2004]. Otra asa importante es la 3 o asa de “interdigitación” de las subunidades, ya que penetra en una cavidad que se encuentra cerca del sitio activo de la otra subunidad. Muchos de los contactos entre los dos monómeros se encuentran en esta asa, cuya secuencia de aminoácidos es altamente conservada en todas las especies (residuos 67 a 79 en la secuencia de la ScTIM) (Fig. 2.4).

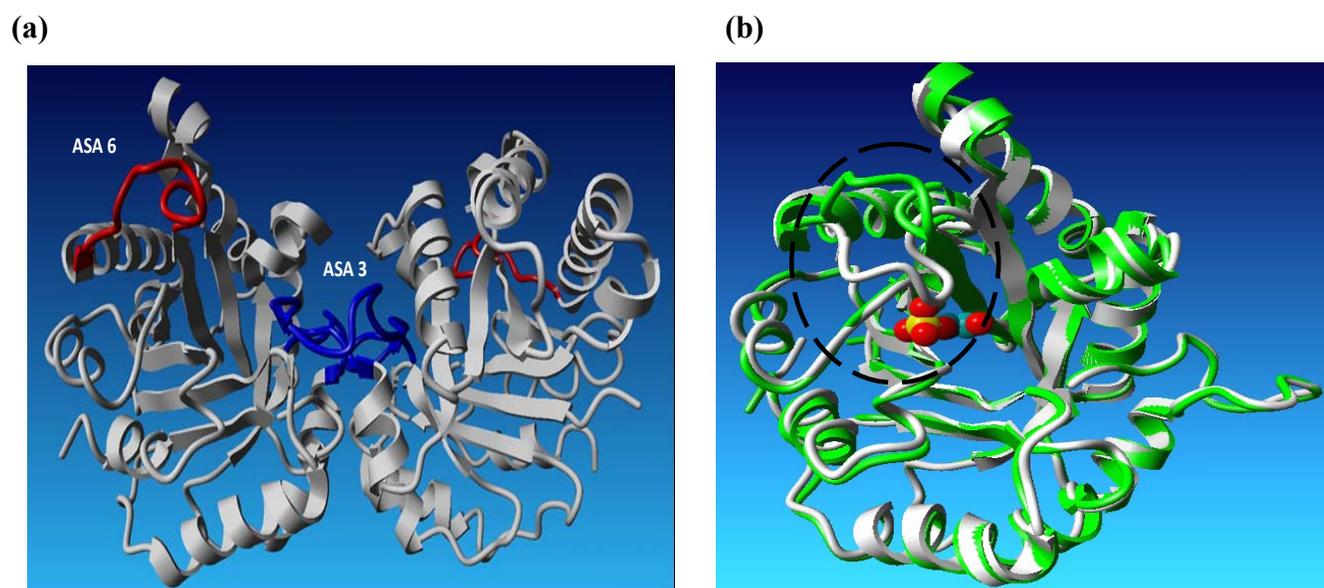


Figura 2.4. (a) Estructura tridimensional del dímero de la ScTIM (ID PDB 1YPI) sin inhibidor resaltando el asa 6 o “asa catalítica” (color rojo) esta se abre o se cierra sobre el sitio activo y esta constituida por 10 u 11 residuos, mientras que, el asa 3 o asa de “interdigitación” (color azul) se encuentra en la interfase para unir a la otra subunidad. (b) Se ilustra el traslape de una de las subunidades de la ScTIM sin inhibidor (subunidad verde) y en su forma ScTIM-inhibidor (subunidad blanca), se observa en el círculo negro como el asa 6 interacciona con el análogo de sustrato (asa en blanco) cuando se une al sitio activo. Se utilizó el programa YASARA (<http://www.yasara.org>) para visualizar las estructuras tridimensionales.

2.3. Mecanismo de reacción de la TIM.

La reacción catalizada por las TIM involucra transferencias de protones para la formación del enodiol y ha sido ampliamente estudiada por medio de cristalografía de rayos-X, RMN, espectroscopía de infrarrojo, mutagénesis y enzimología [Kursula, I. y Wierenga, K., 2003]. Estudios experimentales de RMN y cálculos teóricos han establecido que después del paso inicial del mecanismo de reacción, existen dos vías de transferencia de protones: el mecanismo “clásico” y el mecanismo “cruzado” y ambos podrían contribuir a la interconversión de DHAP y DGAP [Harris, T.K. *et al.*, 1998; Kursula, I. *et al.*, 2001].

2.3.1. Mecanismo clásico.

El mecanismo clásico fue propuesto originalmente por Knowles y colaboradores [Herlihy, J.M. *et al.*, 1976; Nickbarg, E.B. y Knowles, J.R., 1988; Knowles, J.R., 1991]. El primer paso para iniciar la catálisis involucra la transferencia del protón del C1 de DHAP al grupo carboxilato del Glu165 (en la numeración de la ScTIM), generando el intermediario enodiolato, éste a su vez es protonado en el O2 por el imidazol de la His95 generando un enodiol. Esta especie transfiere un protón del O1 al imidazol de la His95 formando otra vez un enodiolato [Guallar, V. *et al.*, 2004]. El paso final involucra la transferencia de un protón del Glu165 al C2 del enodiolato formando el producto DGAP [Zhang, Z. *et al.*, 1994] (ver Figura 2.5). La carga positiva de la cadena lateral de la Lys12 contrarresta la carga negativa del Glu165 y además participa en la catálisis por estabilización electrostática del enodiolato como estado de transición para la transferencia de protones y proporciona una carga positiva en el sitio activo para la unión de sustrato aniónico [Joseph-McCarthy, D. *et al.*, 1994]. Se sabe también que la Lys12 así como la Asn10 son importantes para la estabilización de las cargas negativas en los átomos O1 y O2 del sustrato o inhibidor que se desarrollan durante este mecanismo de reacción [Kursula, I., *et al.*, 2001].

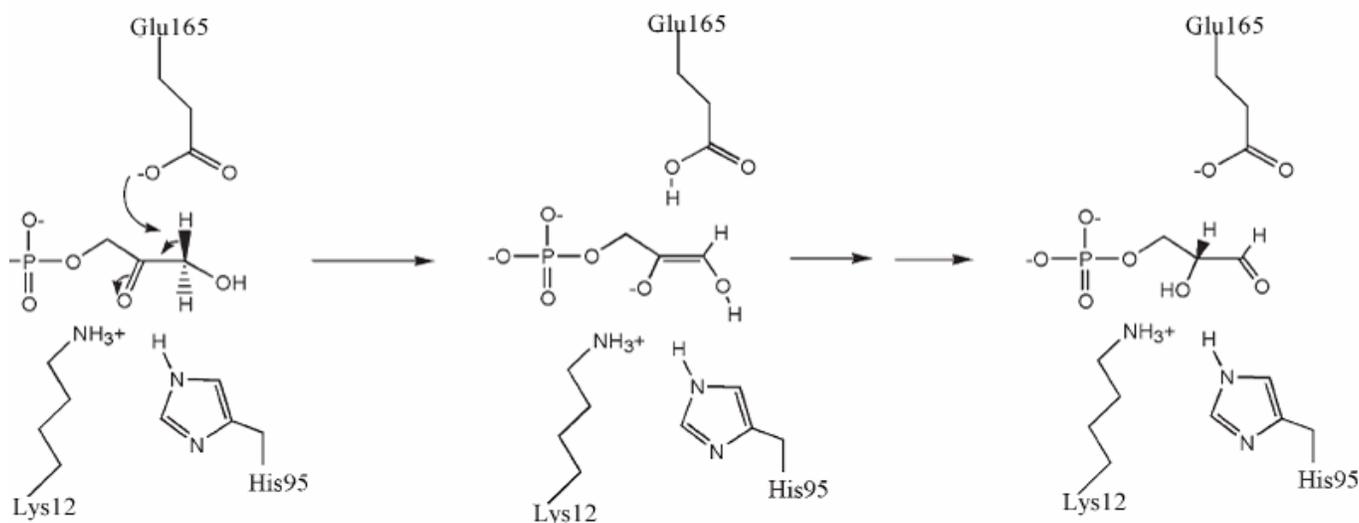


Figura 2.5. Reacción catalizada por la ScTIM. El DHAP transfiere un protón al Glu165 permitiendo un intermediario enodiol/enodiolato. La His95 actúa como un ácido donador de protones. Imagen tomada y modificada de Alahuhta, M. & Wierenga, R. K. (2010).

2.3.2. Mecanismo cruzado.

También el primer paso es la transferencia del protón del átomo de carbono C1 del DHAP al Glu165, enseguida este protón se transfiere al O2 del sustrato. Nuevamente, al Glu165 se le transfiere un protón del O1 del sustrato y finalmente este protón es transferido al C2 generando el producto DGAP (Fig 2.6). La cadena lateral de la His95 no está involucrada directamente en los pasos de la transferencia de protones, por lo que en este mecanismo se cruzan y solamente se lleva a cabo por la cadena lateral del Glu165. [Harris, T.K. et al., 1998].

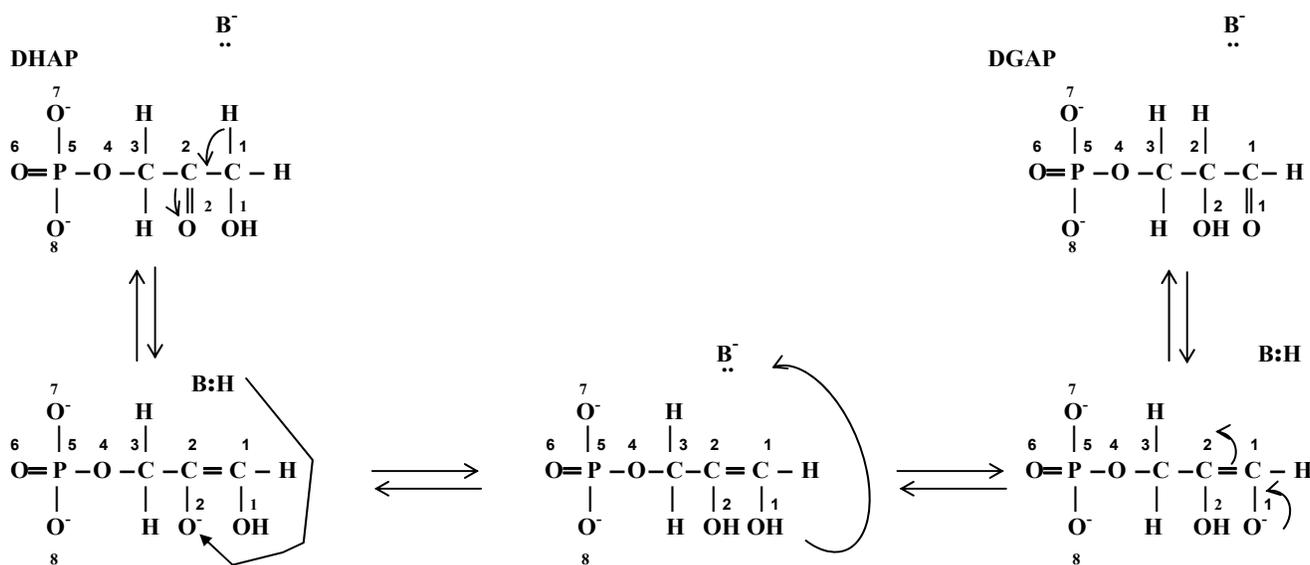


Fig. 2.6. Mecanismo de reacción "cruzado". La base catalítica "B" es el Glu165. Imagen modificada de Kursula, I., *et al* 2001.

Cálculos teóricos sugieren que en el mecanismo de reacción, todos los pasos de transferencia de protones son catalizados por la cadena lateral del Glu165 [Peräkylä, M. y Pakkanen, T.A., 1996]. Además de los tres residuos involucrados en la catálisis (Lys12, His95 y Glu165), hay otros residuos altamente conservados en el sitio activo, como Asn11 y Cys126. Se sabe que la Cys126 es requerida tanto para la estabilidad como para el plegamiento eficiente de la TIM, más que para su actividad catalítica [González-Mondragón, E. *et al.*, 2004].

2.4. Inhibidores de la TIM.

Los inhibidores pueden proporcionar información acerca de los pasos del mecanismo de reacción que sigue una enzima. Se dividen en análogos del sustrato (semejantes al sustrato o al producto de la

reacción) y análogos del estado de transición. Existen investigaciones acerca del mecanismo de reacción de la TIM y esto ha facilitado estudiar la unión de dos análogos de los intermediarios de la reacción de la TIM, los cuales también son conocidos como análogos del estado de transición: el 2-fosfoglicolato (2PG) [Woldefen, R. 1969] y el fosfoglicolohidroxamato (PGH) [Collins, K.D., 1974] cuyas estructuras son mostradas en la Fig. 2.7. Estas dos moléculas son los inhibidores competitivos de la TIM, que tienen una constante de inhibición de ~ 10 y $30 \mu\text{M}$ para PGH y 2PG, respectivamente [Schliebs, W. *et al.* 1996]. La geometría del sitio activo con el inhibidor asociado ha sido estudiada a gran detalle a partir de las estructuras de los complejos de TIM-inhibidor con el 2PG y PGH.

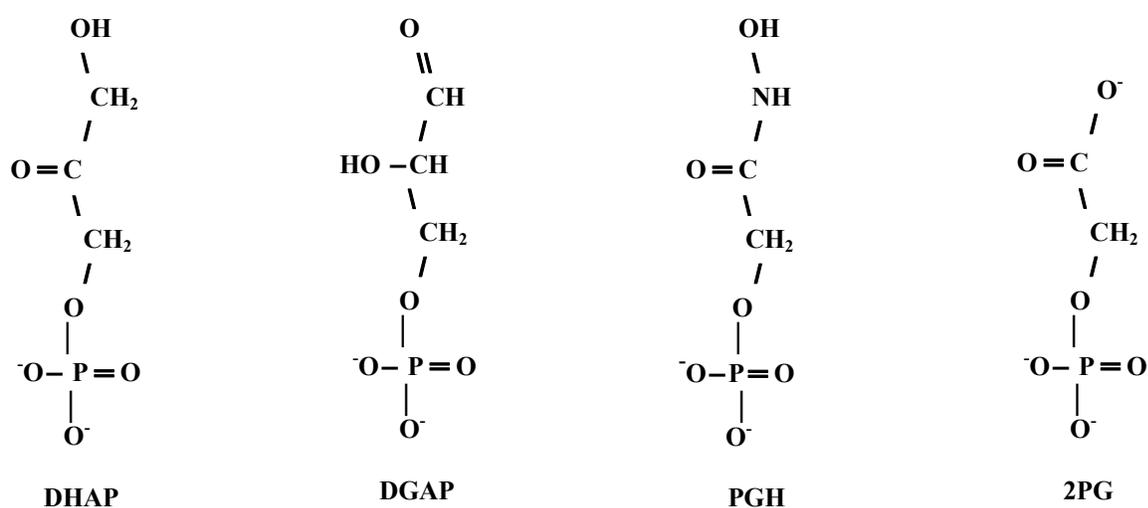


Figura 2.7. Estructuras de DHAP, DGAP y los análogos del estado de transición PGH y 2PG. Figura tomada y modificada de Alahuhta, M. y Wierenga, R.K., 2010.

2.4.1. 2-fosfoglicolato (2PG).

Estudios de RMN han mostrado que el 2PG queda unido a la ScTIM como trianión, con dos cargas negativas en el grupo fosfato y la otra en el grupo carboxilo [Campell, I. D. *et al.*, 1979; Kursula, I. y Wierenga, R.K., 2003]. La estructura cristalográfica del complejo ScTIM-2PG de levadura se determinó a 2.5 \AA de resolución. En esta estructura se mostró que el 2PG se une a la ScTIM estableciendo interacciones electrostáticas con el Glu165 protonado y la cadena lateral neutral de la His95. La Lys12 tiene el papel de crear un ambiente cargado positivamente para atraer al sustrato o inhibidor cargado negativamente hacia el sitio activo. [Lolis, E. & Petsko, G.A., 1990].

Kursula y Wierenga (2003) reportaron la estructura del complejo TIM-2PG de *Leishmania mexicana* a 0.83 \AA de resolución, la estructura mostró que este análogo del estado de transición se une en dos

conformaciones: en ambas el O11 del grupo carboxilo del 2PG se une al Oε2 del grupo carboxilo del Glu167 por puente de hidrógeno a una distancia de 2.61 Å para la conformación predominante y a 2.55Å para la conformación menos abundante. En cuanto a la parte del fosfato, éste se une en una sola conformación. Esto debido a que se presenta una rotación en el enlace C1-C2 del inhibidor. La cadena lateral del Glu167 también presenta cambios en la posición de Oε1, mientras que el Oε2 adopta siempre la misma posición. Existe un puente de hidrógeno entre Oε1 del Glu167 y una red de moléculas de agua que conecta su cadena lateral con el disolvente.

El 2PG es un análogo del estado de transición, porque tiene la misma planaridad y carga que el intermediario formado a partir de la transferencia del protón del sustrato por el Glu167 catalítico. El complejo TIM-2PG simula la geometría del sitio activo del complejo enzima-sustrato, ya que muestra la primera transferencia del protón a la base catalítica. El sustrato difiere del 2PG de manera que el metanol del sustrato (DHAP) es remplazado por un grupo hidroxilo en el inhibidor. El átomo de O12 simula el grupo cetona, mientras que el átomo O11 (H) es el grupo C1 (H)-OH en el sustrato (DHAP) a partir del cual el Glu167 extrae un protón. El puente de hidrógeno entre el O11 del 2PG y el Glu167 indica que la geometría del sitio activo favorece la estabilización del estado de transición a través de la transferencia del protón del C1 (H)-OH de DHAP al Glu167, lo que facilita una catálisis eficiente en los pasos de transferencia de protones.

Por otro lado, Donnini *et al.* (2009) realizaron cálculos computacionales para determinar la energía libre de unión del 2PG y el 3-fosfonopropionato (3PP) a la TIM, donde consideraron los equilibrios de ionización de los inhibidores. Estos autores utilizaron un método que proporciona una corrección a la constante de unión que se basa en la concentración total del inhibidor (la suma de todas las diferentes formas y grados de ionización del inhibidor en solución) para explicar la asociación del complejo.

2.4.2. Fosfoglicohidroxiato (PGH).

En los primeros estudios que se realizaron con este inhibidor, se determinó una K_i de 4.0 μM para la TIM de músculo de conejo, lo cual indica que la enzima tiene una mayor afinidad por el inhibidor que por el sustrato. Se encontró que el valor de la K_i no varía entre pH 7.5 y 8.5, a partir de lo cual se concluyó que el grupo hidroxámico del inhibidor se une en su forma neutra a la enzima, debido a que su pK_a es de 9.5 [Collins, K. D. 1974]. La estructura cristalográfica de TIM-PGH de pollo se determinó a una resolución de 1.8 Å [Zhang, Z., *et al.*, 1994] y la de levadura a 1.9 Å [Davenport, R.C., *et al.*, 1991], ambas mostraron la importancia de la estructura planar cis-enodiol(ato), sin embargo, con la resolución cristalográfica a la que fueron reportadas estas estructuras no fue posible determinar el

preciso estado de protonación en el sitio activo. Ahora se sabe, gracias a la estructura cristalográfica del complejo TIM-PGH de *Leishmania mexicana* a 0.82 Å de resolución, que el PGH unido al sitio catalítico transfiere el protón de N1 al carboxilato del Glu167, lo que indica que el grupo hidroxámico del PGH en el complejo tiene carga negativa y dicha carga esta concentrada en el átomo O2. (Fig. 2.8) [Alahuhta, M. & Wierenga, R. K. 2010].

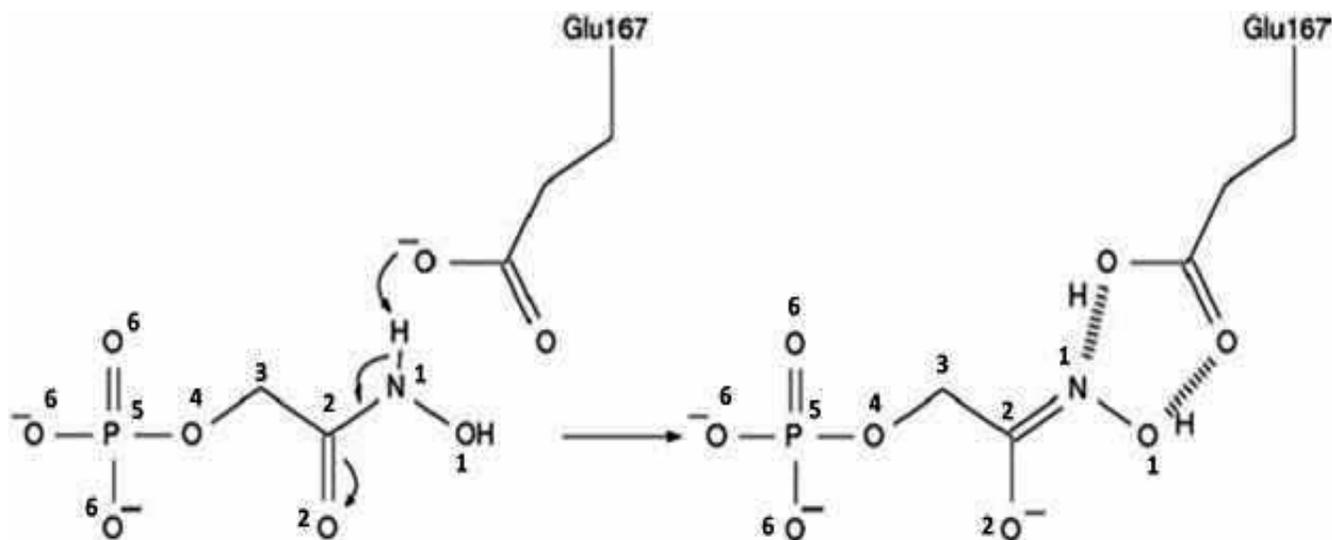


Figura 2.8. Transferencia del protón de PGH a la cadena lateral del Glu167. Donde el PGH con carga (-2) pasa a PGH con carga (-3) cuando se une al sitio activo. Imagen tomada y modificada de Alahuhta, M. & Wierenga, R. K. (2010).

2.5. Complejos TIM-2PG y TIM-PGH

En los complejos TIM-PGH y TIM-2PG, el grupo hidroxamato y el grupo carboxilato tienen carga negativa, simulando el intermediario enodiolato. Esta observación concuerda con cálculos teóricos, que han demostrado la importancia de la estabilización electrostática del intermediario enodiolato por el sitio activo de la TIM [Bash, P.A., *et al.*, 1991; Cui, Q. & Karplus, M., 2001]. La principal función del sitio activo de la TIM es estabilizar la forma enodiolato, y así disminuir la barrera de energía libre en la reacción, que es la desprotonación del sustrato DHAP [Cui, Q. & Karplus, M., 2001]. En ambos complejos, TIM-PGH y TIM-2PG, el grupo fosfato de los inhibidores es unido en su forma dianiónica (Fig. 2.9), de acuerdo con estudios de RMN [Campell, I. D. *et al.*, 1978; Campell, I. D. *et al.*, 1979] y estudios de rayos-X [Kursula, I. y Wierenga, R.K., 2003].

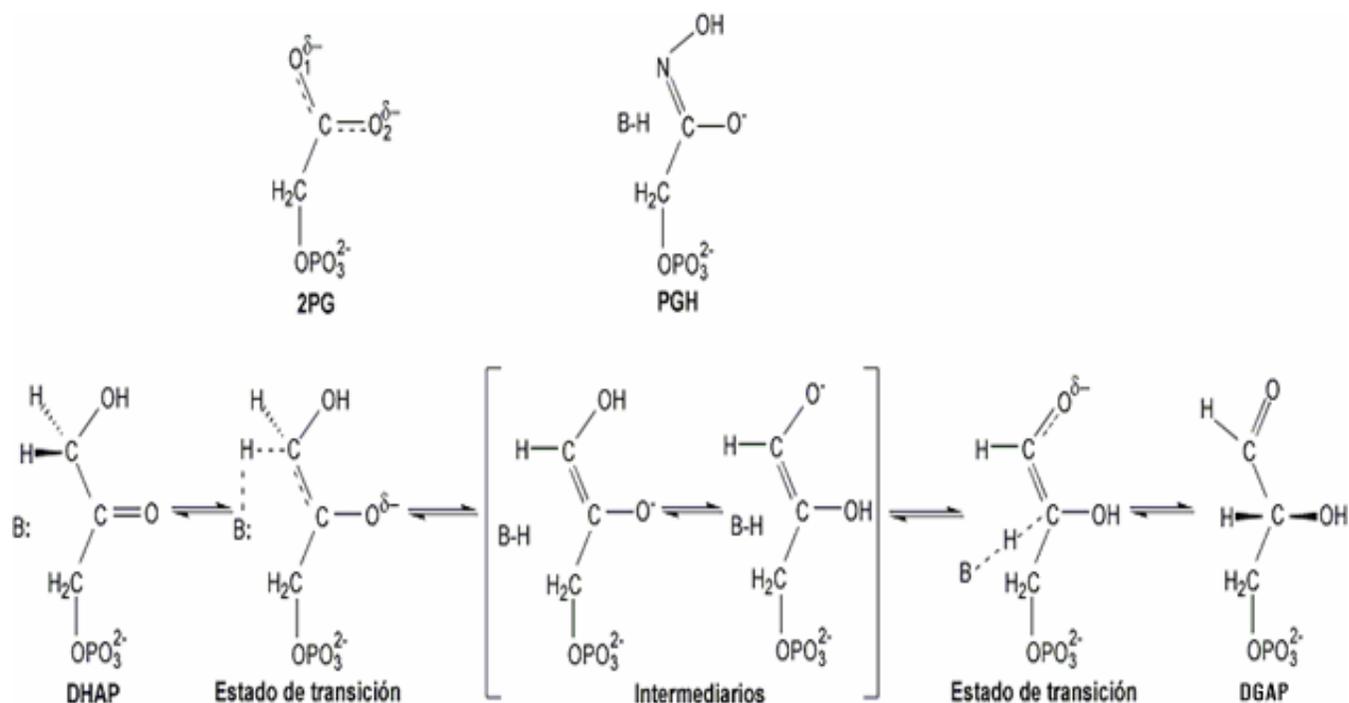
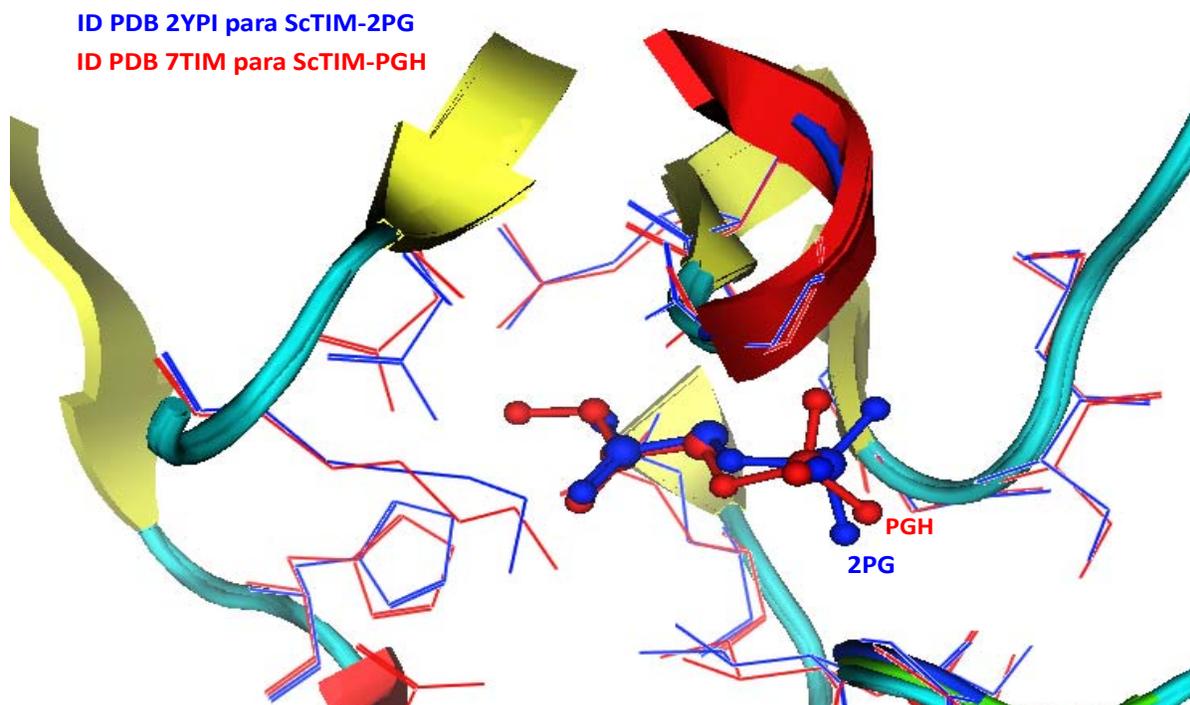


Figura 2.10. Mecanismo catalítico de la triosafosfato isomerasa. Se comparan los inhibidores análogos 2PG y PGH sobre los estados de transición durante la transferencia de protones en la catálisis (imagen obtenida por Díaz, A.J., 2005).

Para evaluar las interacciones electrostáticas que se establecen entre la ScTIM con sus inhibidores se cuenta con las estructuras cristalográficas de los complejos ScTIM-2PG y ScTIM-PGH depositadas en el Protein Data Bank (PDB) (Fig. 2.11a), lo que ha permitido dar interpretaciones a nivel atómico a la gran variedad de resultados experimentales que se han obtenido en los últimos años.

La Fig. 2.11b ilustra la orientación de los inhibidores 2PG y PGH, comparándose con la estructura del sustrato DHAP en el sitio activo.

(a)



(b)

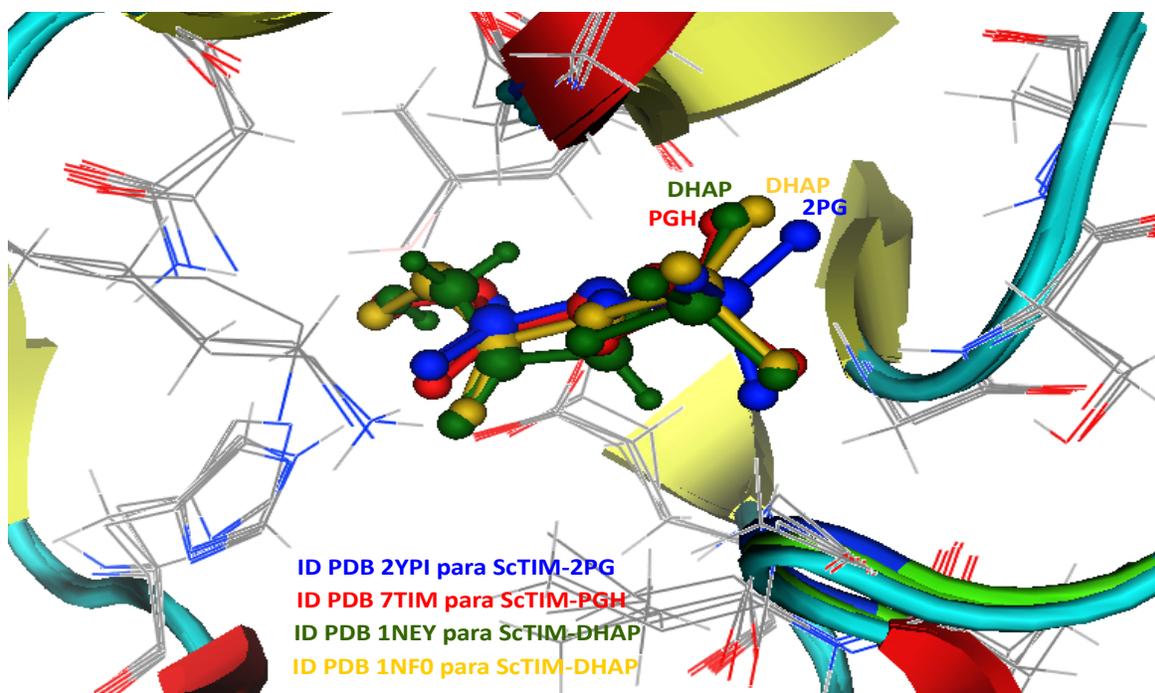


Figura 2.11. Sobreposición del sitio activo de las estructuras cristalográficas de la ScTIM con sus inhibidores más afines. (a) ScTIM-2PG (ID PDB 2YPI a una resolución de 2.5 Å) y ScTIM-PGH (ID PDB 7TIM a una resolución de 1.9 Å). (b) Se compara la orientación de los inhibidores en el sitio activo con el sustrato ScTIM-DHAP (ID PDB 1NEY a una resolución de 1.2 Å y ID PDB 1NF0 a una resolución de 1.6 Å).

Evidencias experimentales sugieren que el grupo fosfato de los sustratos o de los inhibidores iónicos impone la fuerza motriz a través de la parte electrostática para favorecer la conformación cerrada del sitio activo de la TIM en presencia del inhibidor frente a la conformación abierta en ausencia de éste [Alahuhta, M. & Wierenga, R. K., 2010].

En resumen, el estudio de las interacciones proteína-inhibidor provee datos que arrojan luz sobre la función proteica. El conocimiento de los eventos que gobiernan tales procesos es de enorme utilidad, puesto que a partir de la información obtenida de la caracterización del sitio de reconocimiento, es posible, por un lado, determinar las relaciones existentes entre la estructura y la función, y por otro, desarrollar estrategias para interferir o facilitar la unión de la proteína y el inhibidor.

CAPÍTULO III: OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

3.1. Objetivo general.

Caracterizar termodinámicamente el papel de las interacciones electrostáticas en la asociación de la ScTIM con los inhibidores iónicos 2PG y PGH, a través de un enfoque experimental y teórico.

3.2. Objetivos Particulares.

- Caracterizar la energética de la asociación de la ScTIM con los inhibidores fosforilados 2PG y PGH a diferentes fuerzas iónicas y temperaturas, a pH 7.4, determinando las funciones termodinámicas de la unión: $K_u/\Delta G_u$, ΔH_u , ΔS_u y ΔC_p a través de titulaciones fluorimétricas y calorimétricas.
- Determinar el ΔG_u del complejo ScTIM-inhibidor a diferentes fuerzas iónicas por cálculos computacionales a través de la resolución numérica de la ecuación de Poisson-Boltzmann y de estimaciones de la energía de unión no electrostática utilizando el área superficial accesible al solvente que se oculta debido a la asociación.
- Comparar el valor de ΔG_u del complejo ScTIM-inhibidor por técnicas experimentales y cálculos computacionales con la finalidad de obtener una interpretación molecular más completa del fenómeno de reconocimiento proteína-inhibidor.

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

Enfoque experimental.

4.1. Expresión y purificación de la ScTIM.

Las células de *E. coli* (cepa JM103) que contienen al plásmido pKK223-3 para expresar a la ScTIM se crecieron en 1.0 L de medio Luria Bertani (LB) en presencia de ampicilina (100 µg/mL) incubando a 37 °C con agitación orbital a 220 rpm. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.8 (a 600 nm) se realizó la inducción de la expresión con isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) a 0.40 mM. El tiempo total de incubación y expresión fue de 12 h. Las células fueron concentradas por centrifugación a 5000 rpm por 10 min. El paquete celular se resuspendió en una solución de Tris 10 mM, pH 8.0 con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.20 mM. Las células se lisaron por sonicación. El lisado se centrifugó a 45 000 rpm y 4 °C por una hora. El sobrenadante que contiene a ScTIM se separó por dos pasos de precipitación diferencial con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) 0-64% y 64-90% a 4 °C. El precipitado a 90 % de (NH₄)₂SO₄ que contiene a la enzima se resuspendió y dializó en el amortiguador Trietanolamina 10 mM, EDTA 1 mM y Ditiotreitól (DTT) 1 mM (TED 10/1/1) a pH 7.6. La muestra dializada se filtró a través de membranas de 0.45 µm de poro se inyectó a una columna de exclusión molecular (Superdex 200 16/60) previamente equilibrada con el amortiguador TED 10/1/1 a pH 7.6. Todo el procedimiento de purificación fue controlado por un equipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de Amersham Pharmacia Biotech. Las fracciones que presentaron mayor actividad específica de ScTIM se juntaron e inyectaron a una columna de intercambio aniónico MonoQ 5/50, equilibrada con el mismo amortiguador TED 10/1/1 a pH 7.6. La muestra se eluyó con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 100 mM disuelto en TED 10/1/1 a pH 7.6. Las fracciones con mayor actividad se dializaron en el amortiguador Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM y DTT 1 mM (TED 100/10/1) a pH 7.4. En cada etapa de purificación se tomó una muestra para evaluar el contenido y pureza de TIM mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

4.1.1. Determinación de la concentración de la ScTIM.

Para la determinación de la concentración de la enzima ScTIM se realizaron diluciones 1:1000 en el amortiguador TED 100/10/1 a pH 7.4 y se midió su absorbencia a 280 nm a 25° C. Se utilizó un coeficiente de absortividad de ($A_{1cm}^{1\%} = 10.0$) [Norton, I. L. & Hartman, F.C., 1972].

4.1.2. Parámetros cinéticos de la ScTIM.

La actividad catalítica de la ScTIM se determinó espectrofotométricamente siguiendo la oxidación del dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (NADH), la cual se mide por disminución de la absorbencia a 340nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un ensayo acoplado [Rozacky, E. E. *et al.*, 1971]. Este ensayo se basa en la medición de la velocidad de conversión del DGAP en DHAP por la ScTIM, que se convierte a su vez en α -glicerofosfato (α -GP) debido a la presencia de un exceso de la enzima acoplante α -glicerofosfato deshidrogenasa (α -GDH). La reacción acoplada consume un mol de NADH por mol de DHAP que reacciona. Con un exceso de α -GDH, la velocidad de producción de DHAP es equivalente a la oxidación del NADH, de acuerdo con el siguiente esquema:



La actividad enzimática se expresó en μmoles de sustrato transformado por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{moles}/\text{mg min}$). El volumen total de reacción fue de 1.0 mL, conteniendo 0.20 mM de NADH y 10 μg de α -GDH en amortiguador Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM (TE 100/10) a pH 7.4. Los valores de actividad específica obtenidos a diferentes concentraciones de DGAP, fueron ajustados empleando la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{[S]V_{\max}}{K_M + [S]} \quad \text{Ec. (4.1)}$$

donde v es la velocidad inicial, V_{\max} la velocidad máxima, K_M la constante de Michaelis y $[S]$ la concentración de sustrato. Para determinar la K_M y el número de recambio (k_{cat}), la concentración de sustrato (DGAP) se varió en un intervalo de 0.05 a 4.0 mM. La reacción se inició con la adición de 3.0 ng de ScTIM. El equipo empleado fue un espectrofotómetro ultravioleta visible HP 8453. Los experimentos se realizaron a 25 °C regulando la temperatura mediante un sistema Peltier.

4.1.3. Determinación de la concentración de los inhibidores fosforilados 2PG y PGH.

La determinación de concentración de inhibidor se realizó mediante un método espectrofotométrico que cuantifica el fosfato hidrolizado del inhibidor [Ames, B. N., 1966]. Se forma un complejo fosfatomolibdato que se redujo por la acción del ácido ascórbico. La curva estándar se construyó a partir de disoluciones de ácido fosfórico (H_3PO_4) teniendo las siguientes concentraciones: 0, 0.025, 0.035, 0.05,

0.075 y 0.10 mM, que se llevaron a un volumen de 0.3 mL con amortiguador Tris-HCl. A cada una de las soluciones se le agregó 0.7 mL de mezcla de ácido ascórbico con molibdato de amonio y se incubaron 20 minutos a 45 °C. Posteriormente se determinó la absorbencia de las soluciones a 660 nm. Se trazó la gráfica de absorbencia respecto a la concentración obteniéndose una línea recta. De la solución que se preparó de inhibidor (2PG o PGH) se tomaron alícuotas de 5 y 10 µL (por duplicado), a las que se les adicionó 2.0 µL de fosfatasa alcalina, se llevaron a 0.3 mL con amortiguador Tris-HCl. Estas soluciones se incubaron por una hora a 37 °C. Posteriormente se les agregó también 0.7 mL de la mezcla de ácido ascórbico con molibdato de amonio y se incubaron 20 minutos a 45 °C, midiéndolo su absorbencia a 660 nm. Se realizaron también los blancos respectivos, utilizando solución amortiguadora en lugar del inhibidor. Finalmente los datos de absorbencia obtenidos se interpolan en la curva estándar para determinar su concentración. Se cuantificó tanto la concentración de proteína como la concentración de los ligando antes y después de cada experimento.

4.2. Titulación fluorimétrica de ScTIM-2PG y ScTIM-PGH.

4.2.1. Determinación de la constante de unión (K_u).

Este método se basa en la disminución que sufre la fluorescencia intrínseca de la enzima al unir un inhibidor fosforilado en el sitio catalítico. El apagamiento de la fluorescencia de la ScTIM se debe principalmente al Trp 168, ubicado en el asa 6 del sitio catalítico, que se aproxima al inhibidor cargado y unido durante el movimiento de cierre que sufre esta asa [Sampson, N. S. y Knowles, J.R., 1992]. Debido a la diferencia en rendimiento cuántico que muestra la enzima en su estado asociado respecto a su forma libre, es posible titular a la ScTIM con inhibidor y cuantificar la población de moléculas de enzima libre, enzima asociada e inhibidor no unido, y con ello determinar la constante de equilibrio de unión (K_u) de acuerdo a la Ec. (1.1). A partir de esta definición y asumiendo que las intensidades de fluorescencia de la enzima libre (F_E) y del complejo enzima-inhibidor (F_{EI}) son aditivas, es posible relacionar la fracción de la fluorescencia intrínseca de la enzima que es apagada (Y) por la adición de inhibidor con la concentración total de inhibidor (x) a través de la siguiente ecuación (ver Apéndice A):

$$Y = \left(\frac{a}{2E_t} \right) \left[(E_t + x + K_I) - \sqrt{(E_t + x + K_I)^2 - 4xE_t} \right] \quad \text{Ec. (4.2)}$$

Donde $Y = 1 - F/F_0$, siendo F la fluorescencia de la solución de enzima en presencia de inhibidor a una concentración total x ; F_0 la fluorescencia de la proteína a la misma concentración pero sin inhibidor; a

$=1-F/F_t$, la constante de apagamiento (valor asintótico al cual tiende Y a altos valores de x); K_d es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor ($K_d = 1/K_u$); E_t es la concentración total de sitios de unión de la enzima. El ajuste de la Ec. 4.2 a los datos experimentales mediante una regresión no lineal, permitió determinar el valor de K_d y a simultáneamente [González-Mondragón, E. *et al.*, 2004], para ello se utilizó el programa Origin (MicroCal Inc. Northampton, MA, USA).

Los experimentos se realizaron con un espectrofluorómetro K2 de ISS (Champaign, IL, USA), equipado con un sistema Peltier para el control de temperatura. La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C, midiendo con un termopar la temperatura directamente en la solución contenida en la celda. La titulación se inició con 2.00 mL de TIM a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en la celda del fluorómetro, en un amortiguador de Trietanolamina 50 mM, EDTA 5.0 mM (TE 50/5), pH 7.4, fuerza iónica de 0.06 M, previamente filtrado. Posteriormente se hicieron pequeñas adiciones preestablecidas de una solución concentrada de inhibidor 2PG o PGH, ambos disueltos en el mismo regulador que la enzima. Para el caso ScTIM-2PG se utilizaron dos concentraciones iniciales diferentes: 5.0 mM para las primeras adiciones y 50 mM para las últimas. Para el complejo ScTIM-PGH, se utilizó una concentración de inhibidor de 2.0 mM para las primeras adiciones y 13.0 mM para las últimas. Para estudiar el efecto de la fuerza iónica en la constante de unión (K_u) de la ScTIM con el inhibidor (2PG o PGH) se realizaron experimentos entre 0.06 y 1.06 M, utilizando el mismo procedimiento. A partir de 0.66 M y hasta 1.06 M de fuerza iónica, se utilizó una concentración de proteína de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y de 30 mM de 2PG para las primeras adiciones y 300 mM para las últimas. Por otra parte, para el complejo ScTIM-PGH se realizaron titulaciones a 0.30 M de NaCl, utilizando una concentración de inhibidor de 2.0 mM para las primeras adiciones y 13.0 mM para las últimas. Al aumentar la fuerza iónica a 0.66, 0.86 y 1.06 M, se utilizó una concentración de inhibidor de 3.5 mM para las primeras adiciones y 35 mM para las últimas. Después de cada adición de inhibidor (2PG o PGH) se determinó la intensidad de fluorescencia de la solución a 320 nm registrando puntos cada segundo durante 3 min para luego obtener un valor promedio, las intensidades de fluorescencia medidas fueron corregidas restando la intensidad de fluorescencia de la solución amortiguadora. La excitación se mantuvo a 280 nm. En todos los casos se usó una celda de cuarzo de 1.0 cm de recorrido óptico y capacidad de 3 mL.

4.2.2. Determinación del ΔH_u y el ΔCp por el método de van't Hoff.

Se midió fluorimétricamente la K_u de los complejos ScTIM-2PG y ScTIM-PGH a diferentes temperaturas entre 10 °C y 50 °C (en intervalos de 4 °C) para determinar el ΔH_u y el ΔCp . La ecuación integrada de van't Hoff:

$$\ln \frac{K_u}{K_u^*} = \left(\frac{\Delta H_u^* - T^* \Delta Cp}{R} \right) \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta Cp}{R} \ln \frac{T}{T^*} \quad \text{Ec. (4.3)}$$

se ajustó a los datos experimentales, donde ΔH_u^* y K_u^* representan los valores obtenidos a la temperatura de referencia (T^*) de 298 K, R es la constante de los gases. El valor de la K_u se determinó en el amortiguador TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica de 0.06 M. La regresión no lineal, permitió determinar el valor de ΔH_u , y ΔCp simultáneamente, así como el ΔG_u y el ΔS_u calculados a partir de las Ecs 1.2 y 1.3.

4.3. Calorimetría de titulación.

La calorimetría es el detector preciso para el estudio de las interacciones biomoleculares, pues prácticamente en todos los eventos de asociación molecular se absorbe o libera calor. Todos los experimentos se realizaron mediante un calorímetro de titulación de alta precisión ITC₂₀₀ (Microcal, Inc). Los experimentos se realizaron en el amortiguador de TE 50/5 a pH 7.4 y a diferentes concentraciones de NaCl. Las soluciones de ScTIM se dializaron contra el amortiguador de trabajo, se filtraron y se desgasificaron por agitación al vacío; posteriormente se les cuantificó la concentración de proteína por su absorbencia a 280 nm. La concentración final de ScTIM en la celda del calorímetro varió entre 0.094 y 0.28 mM de monómeros para los diferentes experimentos. Los inhibidores se disolvieron en el amortiguador contra el que se dializó la TIM, con el fin de minimizar los calores de dilución; la concentración de los inhibidores en la jeringa varió entre 3.0 y 14 mM para 2PG y 2.0 a 6.8 mM para PGH.

4.3.1. Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI).

El método convencional de CTI involucra la determinación de los parámetros de unión: K_u , ΔH_u , ΔS_u y el número de sitios (n) en un sólo experimento. El ΔCp determinado por CTI involucra la realización de isothermas a diferentes temperaturas, dado que el ΔCp puede ser evaluado a partir de la derivada de la entalpía con respecto a la temperatura.

Todas estas titulaciones se realizaron a 25 °C. Para la formación del complejo ScTIM-2PG la concentración final de la proteína en la celda del calorímetro fue de 0.094 mM. La titulación se realizó empleando una solución concentrada de 2PG (3.0 mM) y una secuencia automatizada de 23 a 25 inyecciones consecutivas: la primera de 0.2 μL (de ajuste, para dejar solución fresca en la punta de la jeringa de inyección) y las restantes de 0.8 μL (24 × 0.8 μL) con un intervalo de 4 min entre cada inyección. En el caso de ScTIM-PGH, la concentración de proteína fue de 0.094 mM y de PGH fue de 2.0 mM con 25 inyecciones consecutivas siguiendo el mismo procedimiento. Para determinar el calor de dilución de ambos inhibidores, se tituló el respectivo inhibidor 2PG o PGH en el amortiguador TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica de 0.06 M bajo las mismas condiciones que para las soluciones de TIM, los calores resultantes fueron restados de los calores medidos para la unión de la ScTIM con el inhibidor. Los valores de K_u , ΔH_u , ΔS_u y n fueron determinados por una regresión no lineal de los datos de titulación normalizados usando la expresión que corresponde al modelo de sitios de unión idénticos e independientes [Wiseman, T., *et al.*, 1989].

De igual manera para estudiar el efecto de la fuerza iónica en los parámetros termodinámicos de unión a 25 °C, se realizaron experimentos calorimétricos a 0.36 y 0.66 M (ver Apéndice B para más detalles sobre la metodología). Los parámetros obtenidos por CTI permitieron diseñar experimentos a través de un nuevo método llamado “Calorimetría de Titulación Multitérmica” (CTM), el cual permite determinar el ΔCp en un sólo experimento. El procedimiento se detalla a continuación.

4.3.2. Calorimetría de Titulación Multitérmica (CTM).

Esta técnica es una “extensión” de la CTI, que permite determinar en un solo experimento el valor de ΔCp además de K_u , ΔG_u , ΔH_u , ΔS_u y n a través de una titulación realizada en un cierto intervalo de temperaturas. Estos experimentos se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Chavelas, E. A. *et al.*, 2006. El experimento comenzó equilibrando la muestra cargada en el equipo a 25 °C con la enzima en la celda de muestra y la jeringa de inyección con el inhibidor ya colocada en el interior de la celda. Después se empleó un programa de inyecciones con 7 adiciones de inhibidor consecutivas: una de 0.2 μL (de ajuste, para dejar solución fresca en la punta de la jeringa de inyección) y las seis restantes de 0.8 μL (6 × 0.8 μL) con un intervalo de 4 min para cada inyección. Al término de estas adiciones el calorímetro se reajustó a la nueva temperatura, 32 °C durante 1h. Posteriormente se realizaron 8 inyecciones de inhibidor: una inyección de 0.2 μL (de ajuste) y 7 × 1.0 μL. Finalmente este procedimiento se repitió para la última temperatura de 40 °C realizando 8 inyecciones: una de 0.2

μL (de ajuste), $4 \times 1.5 \mu\text{L}$ y $3 \times 3.0 \mu\text{L}$. Para determinar el calor de dilución de los inhibidores, se realizó un segundo experimento con el mismo programa de inyecciones y a las mismas temperaturas, pero ahora el inhibidor se adicionó sobre el regulador. Estos calores de dilución obtenidos de la solución amortiguadora con el inhibidor fueron restados a los calores resultantes de la solución ScTIM-inhibidor para obtener los calores de unión reales. Al final se obtuvo entonces una curva de titulación a partir del gráfico de los calores reales para cada inyección durante los tres segmentos de temperaturas: 25, 30 y 42 °C en función de la concentración de inhibidor en la celda, expresada en relación a la concentración de enzima como cociente molar [inhibidor/enzima]. A partir de esta curva experimental fue posible determinar simultáneamente los valores de ΔC_p , ΔH_u , K_u y n por lo que también pudo calcularse ΔG_u y ΔS_u . Para analizar la multiterma de unión del complejo ScTIM-inhibidor, los parámetros fueron determinados a través del modelo de sitios de unión idénticos e independientes [Wiseman, T., *et al*, 1989; García-Hernández, E., *et al*, 2003; Chavelas, E, A. *et al.*, 2006]:

$$\frac{\partial Q_p(T)}{\partial [L]_T} \frac{1}{V_o} = \Delta H_u(T) \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{X_T}{n} - \frac{1}{K_u(T)n[R]_T}}{2 \sqrt{\left(1 + \frac{X_T}{n} + \frac{1}{K_u(T)n[R]_T}\right)^2 - 4 \frac{X_T}{n}}} \right] \quad \text{Ec. (4.4)}$$

Donde $Q_p(T)$ es el calor absorbido o liberado, $[L]_T$ es la concentración total de inhibidor, V_o es el volumen de la celda de reacción, $\Delta H_u(T)$ el calor molar de unión, $X_T = [L]_T/[R]_T$ es la relación molar inhibidor/proteína, n es el número de sitios de unión, $K_u(T)$ es la constante de unión y $[R]_T$ es la concentración total de proteína. La variación de $K_u(T)$ y $\Delta H_u(T)$ con la temperatura se modeló a través de la relación de van't Hoff y Kirchoff, respectivamente, considerando el ΔC_p como una constante [Chavelas, E, A. *et al.*, 2006]:

$$K_u(T) = K_u(T^*) \exp \left[\frac{1}{R} \left((\Delta H_u(T^*) - T^* \Delta C_p) \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) + \Delta C_p \ln \frac{T}{T^*} \right) \right] \quad \text{Ec. (4.5)}$$

$$\Delta H_u(T) = \Delta H_u(T^*) + \Delta C_p (T - T^*) \quad \text{Ec. (4.6)}$$

Para estudiar nuevamente el efecto de la fuerza iónica en la afinidad de la enzima ScTIM se realizó el mismo procedimiento a 0.30 y 0.60 M de NaCl. Las concentraciones de 2PG y PGH variaron, así como el número de inyecciones y el volumen inyectado a la solución de la enzima ScTIM (para más detalles ver Apéndice B).

4.3.3. Validación del método CTM para ScTIM-2PG.

El valor de ΔC_p determinado por CTM para el complejo ScTIM-2PG se comparó con el obtenido a través del método convencional de CTI a partir de titulaciones isotérmicas a diferentes temperaturas (18, 25, 32 y 40°C), donde el ΔC_p se determinó como la primera derivada de la entalpía con respecto a la temperatura. Los experimentos de CTI y CTM se realizaron en el mismo amortiguador TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica de 0.06 M.

4.3.4. Efectos de cambios de protonación ligados a la asociación.

Se realizaron experimentos de CTI a 25 °C y pH 7.4 en ausencia de NaCl para los dos complejos (ScTIM-2PG y ScTIM PGH) en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero cambiando el amortiguador de TE 50/5 ($\Delta H_{ionización} = 33.59 \text{ kJ mol}^{-1}$), por Pipes 50 mM (Piperazina-1,4-bis (2-etanosulfónico)), ($\Delta H_{ionización} = 11.45 \text{ kJ mol}^{-1}$) [Fukada, H. & Takahashi, K., 1998], con la finalidad de evidenciar posibles cambios de protonación en la unión, que se reflejarían en diferentes calores aparentes de unión.

4.4. Determinación del ΔH_u y ΔC_p a través de los modelos de área superficial accesible al solvente.

Para estimar el ΔH_u y el ΔC_p de los complejos ScTIM-2PG y ScTIM-PGH se utilizaron los modelos de área superficial descritos por las Ecs. 1.4 y 1.5, con los parámetros mostrados en la Tabla 4.1. Las ASA fueron calculadas con el programa NACCESS [Hubbard, S. J. y Thornton, J. M., 1993], basado en el algoritmo de Lee y Richards [Lee, B. y Richards, F. M., 1971], el cual se alimentó con las coordenadas atómicas de los archivos PBD: 2YPI para ScTIM-2PG, 7TIM para ScTIM-PGH y 1YPI para la ScTIM libre. El cálculo considera una esfera de radio finito (generalmente se usa un radio igual al del agua 1.4 Å), que se hace rodar sobre la superficie de las macromoléculas. Las áreas accesibles en estas estructuras de proteínas fueron diferentes para las subunidades A y B de ScTIM, por lo que se realizó un promedio de los valores para los cálculos. Ambos complejos ScTIM-2PG y ScTIM-PGH se analizaron también a través del programa LPC (ligand-protein contacts) [Sobolev, V. *et al.*, 1999].

Tabla 4.1. Coeficientes de proporcionalidad basados en cambios de área superficial para la contribución polar y no polar.

ΔH_u	Δh_{pol} cal (mol Å ²) ⁻¹	Δh_{no-pol} cal (mol Å ²) ⁻¹
Luque & Freire P-L (2002)	31.4	-8.44
García & Hernández P-P (1999)	19.4	-7.0
García & Hernández P-C (1999)	46.1	-5.8
ΔCp	Δcp_{pol} cal (mol Å ² K) ⁻¹	Δcp_{no-pol} cal (mol Å ² K) ⁻¹
Murphy & Freire (1992)	-0.26	0.45
Spolar et al. (1994)	-0.14	0.32
Myers et al. (1995)	-0.09	0.28
Makhatadze & Privalov (1995)	-0.21	0.51
García-Hernández et al.(2003)	0.07	0.23

P-L: complejo proteína-ligando, P-P: complejo proteína-proteína y P-C: complejo proteína-carbohidrato.

4.5. Estabilidad de la ScTIM por Dicroísmo Circular (DC).

Se realizaron estudios de desplegamiento térmico de la ScTIM a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) o fosfatos de sodio (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) (0.0-1.0 M) por dicroísmo circular, para evaluar directamente si se establecía una interacción específica proteína-ion a través del desplazamiento de la temperatura media de transición (T_m) al incrementar la concentración de sales en la solución. Se utilizó un espectropolarímetro JASCO J-175 (Jasco Inc. Easton, MD) equipado con un controlador de temperatura Peltier y un porta celdas con agitación magnética. Estas transiciones térmicas fueron seguidas registrando los cambios de elipticidad a 220 nm, mientras que la temperatura aumentaba a razón de 2°C min⁻¹. En todos los experimentos la concentración de la ScTIM fue de 0.015 mg/mL en un amortiguador Tris 50 mM a pH de 7.4, contenida en una celda de 1.0 cm de recorrido óptico con agitación continua. Las fracciones de enzima desnaturalizada (f_D) a cada registro de temperatura fueron calculadas con la expresión:

$$f_D = \frac{\theta_T - \theta_N}{\theta_D - \theta_N} \quad \text{Ec. (4.7)}$$

donde θ_T es la elipticidad medida a cada temperatura, θ_N y θ_D son las elipticidades en el estado nativo y en el estado desnaturalizado de la ScTIM respectivamente. Se realizaron ajustes lineales de los datos antes de la transición para estimar θ_N y después de la transición para estimar θ_D en todo el intervalo de temperaturas.

Enfoque computacional

4.6. Cálculos de la energía libre de unión ScTIM-inhibidor.

En este trabajo se realizaron cálculos computacionales para evaluar la energía libre de unión para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH. Para ello se determinaron separadamente las contribuciones de tipo electrostático y no polar. Estas contribuciones están involucradas en la formación del complejo ScTIM-inhibidor, como se muestra a continuación:

$$\Delta G_u = \Delta G_{u,elec} + \Delta G_{u,apol} \quad \text{Ec. (4.8)}$$

y a su vez

$$\Delta G_{u,elec} = \Delta G_{u,sol} + \Delta G_{u,coul} \quad \text{Ec. (4.9)}$$

Donde el ΔG_u es la energía de unión y está en función de la energía electrostática, $\Delta G_{u,elec}$, y de la energía no electrostática o no polar, $\Delta G_{u,apol}$. A su vez el $\Delta G_{u,elec}$ está en función de la energía de solvatación $\Delta G_{u,sol}$ (que es la energía necesaria para retirar el solvente del sitio activo para que se una el ligando a la proteína) y de la energía coulombica, $\Delta G_{u,coul}$ (la energía de interacción entre las cargas de la proteína y las cargas del inhibidor).

4.6.1. Contribución electrostática a la energía libre de unión ScTIM-inhibidor.

4.6.1.1. Preparación de las estructuras cristalográficas para los cálculos de la energía electrostática de solvatación en un medio continuo.

Para el análisis de las estructuras cristalográficas en la asociación de ScTIM-inhibidor se utilizaron las coordenadas atómicas de las moléculas involucradas (enzima, inhibidor y complejo enzima-inhibidor). Las estructuras de los complejos de la enzima ScTIM con los dos inhibidores (2PG y PGH) se obtuvieron del Protein Data Bank con los códigos de archivo **2YPI.pdb** y **7TIM.pdb**, respectivamente. A estos archivos se les realizó una evaluación de las coordenadas estructurales de las cadenas laterales de los residuos mediante los protocolos del programa WHATIF, posteriormente se utilizó el programa PDB2PQR, el cual prepara los archivos cristalográficos para cálculos electrostáticos en un medio continuo. Este programa desarrollado en lenguaje Phyton, utiliza como entrada un archivo PDB y realiza una serie de tareas: i) adiciona un número limitado de átomos pesados faltantes, ii) asigna cargas de acuerdo a valores de pK_a de las cadenas laterales ionizables, iii) adiciona hidrógenos, iv) optimiza puentes de hidrógeno favorables de la proteína, v) asigna la carga y el radio de cada uno de

los átomos a partir de los parámetros de un campo de fuerzas particular (CHARMM, AMBER, PARSE, PEOEPB o TYL06). Para los cálculos teóricos se utilizaron los potenciales de PARSE [Sitkoff, D. et al., 1994]. Mediante el algoritmo PROPKA [Li, H., *et al.*, 2005] se asignó un estado de protonación para la proteína correspondiente a pH de 7.0. El archivo de salida tiene un formato similar al PDB e incorpora los datos de carga y radio atómicos, el archivo de salida se denomina PQR [Dolinsky, T. J. et al., 2004]. En el caso de las moléculas de los inhibidores, fue necesario determinar las cargas parciales de sus átomos mediante métodos *Ab initio* (MP2 con la base de 6-311G**(3df,2pd)).

4.6.1.2. Análisis de la contribución de la energía electrostática en la unión ScTIM-inhibidor a diferentes fuerzas iónicas.

El programa con el que se calculó la energía electrostática a la unión de ScTIM-2PG y ScTIM-PGH, fue el Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) utilizando la función no lineal de Poisson-Boltzmann [Baker, N. A., 2004], el cual considera la contribución del agua de manera implícita sobre las biomoléculas con base al valor de su constante dieléctrica (ϵ) que es muy diferente al valor asignado para la proteína. Los valores que se utilizaron fueron $\epsilon = 78.2$ para el solvente y para la ScTIM $\epsilon = 4$ a 25 °C. Adicionalmente el programa APBS incluye el efecto electrostático de la fuerza iónica considerando una acumulación de contraiones en la vecindad de la ScTIM, para este estudio se consideró el NaCl como principal contribuyente de la fuerza iónica del medio. Se tomaron los radios iónicos de Pauling para $\text{Na}^+ = 0.95 \text{ \AA}$ y para $\text{Cl}^- = 1.81 \text{ \AA}$. A partir de estos cálculos se visualizó el potencial electrostático a través del programa VMD 1.8.6 (Visual Molecular Dynamics) en función de la fuerza iónica.

La contribución de electrostática a la energía libre de unión de ScTIM-inhibidor se determinó a través de un ciclo termodinámico de unión en términos de la transferencia de energía libre de las moléculas que se encuentran en un medio dieléctrico homogéneo a un entorno heterogéneo. En el medio homogéneo, las constantes dieléctricas tanto del complejo y las especies libres como en el solvente son iguales. En el entorno heterogéneo, las constantes dieléctricas del complejo y las especies libres tienen un valor de constante dieléctrica diferente respecto a la constante dieléctrica del solvente (Fig. 4.1).

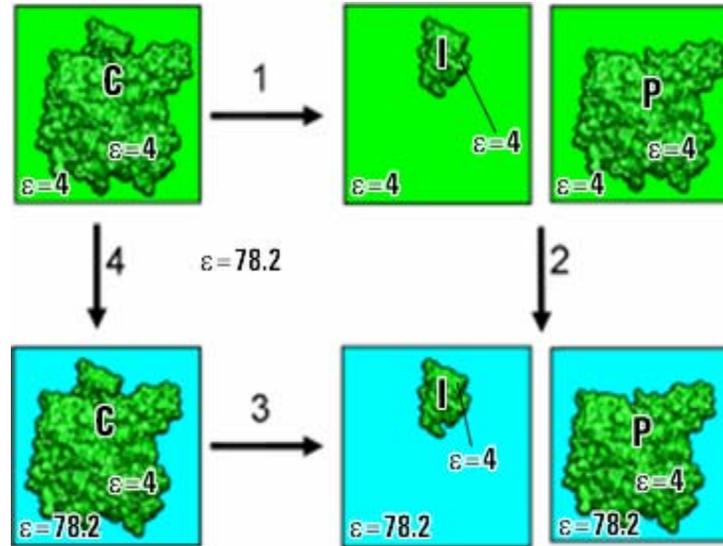


Figura 4.1. Ciclo termodinámico para determinar la contribución electrostática al ΔG_u de una proteína (P) y un inhibidor (I) para formar el complejo (C) en solución acuosa por APBS.

La energía electrostática está en función de la energía de solvatación y la energía coulombica de acuerdo a la Ec 4.9. La energía de solvatación se determina cuando se transfieren las moléculas (complejo y las especies libres) de un medio dieléctricamente homogéneo a un entorno heterogéneo. La energía coulombica es la energía de interacción de las cargas entre proteína e inhibidor en un medio homogéneo.

De acuerdo a la Fig. 4.1 la energía electrostática esta dada por:

$$\Delta G_{elec} = -\Delta G_3 = \Delta G_4 - \Delta G_1 - \Delta G_2 \quad \text{Ec.(4.10)}$$

En el Apéndice C se detalla la deducción del ΔG_{elec} a partir del ciclo termodinámico de energía electrostática.

La energía electrostática de solvatación está dada por:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_4 - \Delta G_2 = \Delta G_{sol-ScTIM-inhibidor} - \Delta G_{sol-ScTIM} - \Delta G_{sol-inhibidor} \quad \text{Ec.(4.11)}$$

Para completar el ciclo de energía electrostática, se debe añadir las contribuciones coulombicas al cambio de energía de solvatación sobre la unión y así obtener la contribución total electrostática a la energía libre de unión. La energía coulombica de la unión está dada por:

$$\Delta G_{\text{coul}} = -\Delta G_1 = \Delta G_{\text{coul-ScTIM-inhibidor}} - \Delta G_{\text{coul-ScTIM}} - \Delta G_{\text{coul-inhibidor}} \quad \text{Ec.(4.12)}$$

4.6.2. Contribución no electrostática o no polar a la energía libre de unión ScTIM-inhibidor.

4.6.2.1. Análisis no polar a la energía de unión ScTIM-inhibidor.

A partir de los resultados del cálculo que realiza el programa APBS fue posible determinar el ΔG_{u_elec} en la unión ScTIM-inhibidor. La contribución al ΔG_u por parte de las interacciones no polares (ΔG_{u_nopol}) se evaluó como la energía liberada al ocultar el área de la interfase al solvente cuando se forma el complejo, dicha energía es proporcional al cambio en el área accesible al solvente y un parámetro semejante a la tensión superficial (γ) con un valor de $0.021 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ para el agua: $\Delta G_{u_nopol} = \gamma \Delta ASA_{\text{interfase}}$ [Friedman, R.A. y Honing, B., 1995]. Se empleó el programa NACCESS para calcular el área de la interfase que queda oculta del solvente en el complejo, a partir de los archivos PDB del complejo y de las moléculas aisladas:

$$\Delta G_{u_nopol} = \gamma(ASA_{\text{ScTIM-inhibidor}} - ASA_{\text{ScTIM}} - ASA_{\text{inhibidor}}) \quad \text{Ec.(4.13)}$$

Por lo que fue posible entonces estimar el valor de la energía libre de unión mediante la Ec. 4.8.

4.6.3. Efecto de las cargas en la energía de unión ScTIM-inhibidor.

Para estudiar el efecto de las cargas eléctricas en el ΔG_u teórico para ambos complejos se realizó un apagamiento de cargas de los átomos que contribuyen significativamente a la unión a través de APBS. El efecto de cargas se realizó principalmente en algunos átomos de los residuos catalíticos de la TIM y en los átomos del grupo fosfato de ambos inhibidores, por ejemplo: H ζ 1, H ζ 2, H ζ 3 de la Lys12, el grupo carboxilato (COO⁻) del Glu165 en la ScTIM sin inhibidor y en el grupo PO₄⁻² de los inhibidores.

4.6.4. Contribución electrostática a la estabilidad de la ScTIM en el estado nativo.

Se realizaron cálculos para determinar la energía electrostática de la ScTIM en el estado nativo variando el pH a diferentes fuerzas iónicas (0.06, 0.36, 0.66 y 1.06M), resolviendo la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann implementado en el programa APBS. Se utilizó el archivo cristalográfico de la enzima con el código **1YPI** depositado en el PDB. Siguiendo la misma metodología del apartado 4.6.1. Las constantes dieléctricas asignadas para el agua y la proteína fueron 4 y 78.2, respectivamente.

CAPÍTULO V: RESULTADOS

Enfoque experimental**5.1. Determinación de los parámetros catalíticos de la ScTIM recombinante.**

El rendimiento obtenido en el aislamiento de la ScTIM recombinante fue de 13 mg por litro de cultivo. A fin de verificar el estado funcional de la ScTIM, se determinaron los parámetros catalíticos de la enzima a 25 °C. Se utilizó un intervalo de concentraciones del sustrato DGAP de 0.050 a 6.0 mM y las mediciones se hicieron por duplicado. Los valores obtenidos para los parámetros se compararon con los reportados en la literatura (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Parámetros catalíticos de la ScTIM con DGAP como sustrato, medidos por duplicado, a 25°C y en un amortiguador de Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM (TE 100 /10), a pH 7.4. Estos valores se compararon con los reportados en la literatura.

	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	Condiciones
En este trabajo	0.81(0.09)	5.6(0.2)x10³	6.9x10⁶	Temperatura 25 °C TE 100/10, pH 7.4
Sampson, N. S. y Knowles, J.R. 1992	1.3 (0.1)	8.0(0.4)x10³	6.15 x10⁶	Temperatura 30 °C TE 100/10, pH 7.6
Lodi, P.J. et al., 1994	1.5	8.7x10³	5.80 x10⁶	Temperatura 30 °C TE 200/20, pH 7.4
González-Mondragón, E. et al., 2004	1.1 (0.4)	4.7(0.7)x10³	3.13 x10⁶	Temperatura 25 °C TE 100/10, pH 7.4

Los números en paréntesis indican la desviación estándar.

En la Tabla 5.1 se muestran los parámetros catalíticos obtenidos con DGAP como sustrato. En este trabajo la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) a 25 °C fue similar a la obtenida por González-Mondragón y a 30 °C por Sampson y Lodi a pesar de que las condiciones experimentales varían un poco.

5.2. Efecto de los iones en la estabilidad de la ScTIM.**5.2.1. Cálculos teóricos.**

Se realizaron cálculos teóricos para determinar la energía de Gibbs electrostática de la ScTIM en el estado nativo como una función del pH y de la fuerza iónica. Los estados de protonación de la proteína

se asignaron con PROPKA y la energía electrostática total se tomó como la suma de la contribución coulombica más la contribución electrostática de solvatación (ver Apéndice F, apartado F.4).

Las estimaciones teóricas se calcularon utilizando la aproximación de solvente continuo, considerando la contribución del medio iónico a través de la solución de la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann implementada en el programa APBS (ver sección Métodos). Esto se realizó cada 0.5 unidades de pH entre pH 3.5 y 9.0, a 298.15 K y a cuatro diferentes fuerzas iónicas: 0.06, 0.36, 0.66 y 1.06 M. Los resultados son presentados en la Fig. 5.1a. En el intervalo de pH analizado se observa que la contribución electrostática de la enzima es más favorable a bajas fuerza iónica y conforme aumenta la fuerza iónica del medio el valor de la energía electrostática es menos negativo.

5.2.2. Transiciones térmicas de desplegamiento de la ScTIM por DC variando la concentración de sal.

Para evaluar una posible unión específica de los iones de Na^+ y Cl^- a la proteína se realizaron experimentos de estabilidad térmica y como control se realizaron experimentos similares en amortiguador de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, el cual se sabe que interacciona en el sitio activo de la enzima estabilizando la estructura. Se obtuvieron los perfiles de desnaturalización térmica de la ScTIM a diferentes concentraciones (0-1.0 M) de NaCl y $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ en un amortiguador 50 mM Tris, pH 7.4. A partir de estos perfiles y para cada una de las condiciones de concentración de sal en la solución, se determinó la temperatura media de desnaturalización (T_m). En la Fig. 5.1b se muestra como el efecto producido por cada sal es claramente diferente, la adición de NaCl desestabiliza a la enzima moviendo el perfil hacia temperaturas más bajas, mientras que al adicionar $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ la transición térmica se desplaza a temperaturas más altas, es decir, estabiliza a la ScTIM. En el recuadro de la Fig. 5.1b se comparan los perfiles de desnaturalización térmica de la ScTIM a las concentraciones más altas de sal 1.0M de NaCl y 1.0 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ con el perfil de desnaturalización en ausencia de sales. En el Apéndice D se pueden observar los perfiles de desnaturalización a las diferentes concentraciones de NaCl y de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$.

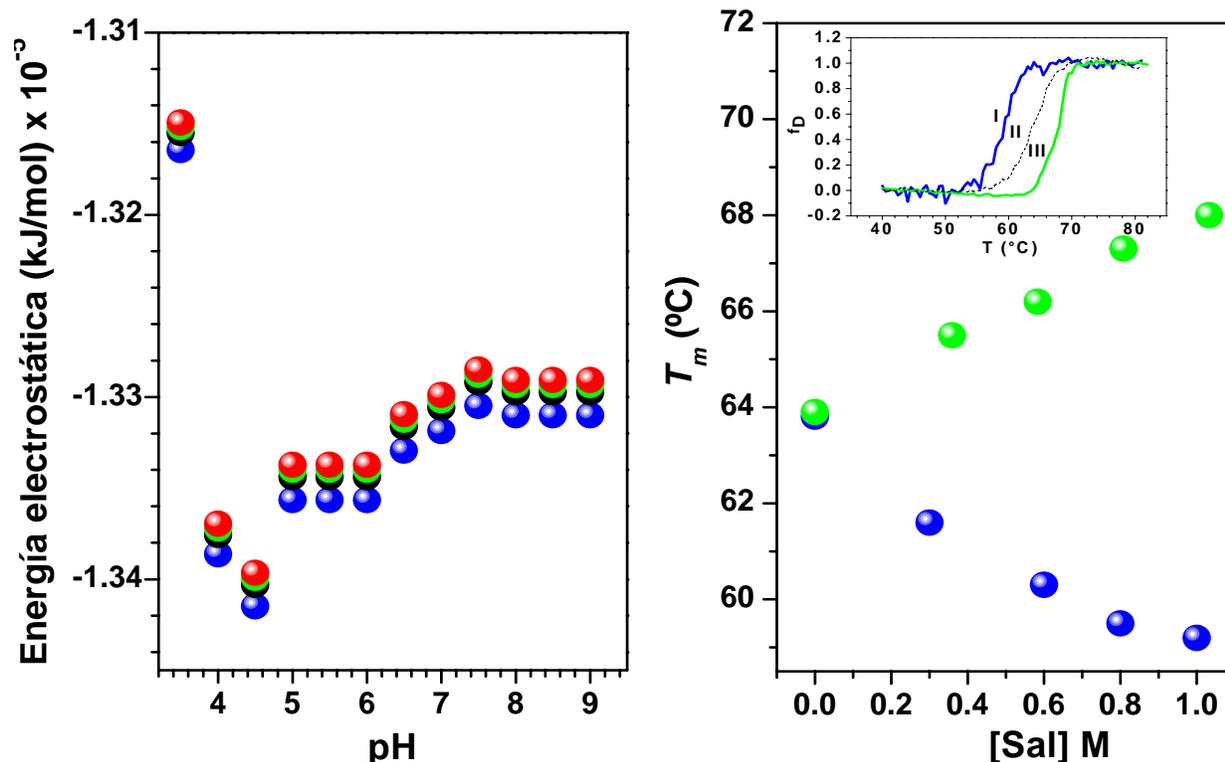


Figura 5.1. **Efecto de los iones en la estabilidad de la ScTIM.** (a) Energía libre electrostática total de la ScTIM como función del pH y la fuerza iónica. Las estimaciones teóricas fueron obtenidas por la solución de la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann a 298.15 K y a diferentes fuerzas iónicas: 0.06 (●), 0.36 (●), 0.66 (●) y 1.06 M (●) utilizando el programa APBS [Baker, N.A. *et al.*, 2001]. (b) Efecto de desplazamiento de los perfiles de desnaturalización térmica por las sales. Variación de la T_m de ScTIM en Tris 50mM pH 7.4, determinada por DC como una función de la adición de NaCl (●) o NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (●), estas determinaciones se hicieron a través de mediciones de θ_{220} . El recuadro muestra las transiciones térmicas a: (I) 1.0 M de NaCl, (II) ScTIM en ausencia de sal y (III) 1.0M de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄.

5.3. Estudios Fluorimétricos.

5.3.1. Determinación de la K_d .

La Fig. 5.2 muestra algunos de los datos obtenidos en las titulaciones fluorimétricas para determinar la K_d de los complejos ScTIM-2PG y ScTIM-PGH. Ambos experimentos se realizaron a 25 °C, en el amortiguador de TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica de 0.06 M. La curva continua representa el ajuste de la Ec. 4.2 a los datos. En ambos experimentos, la concentración inicial de la enzima fue de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

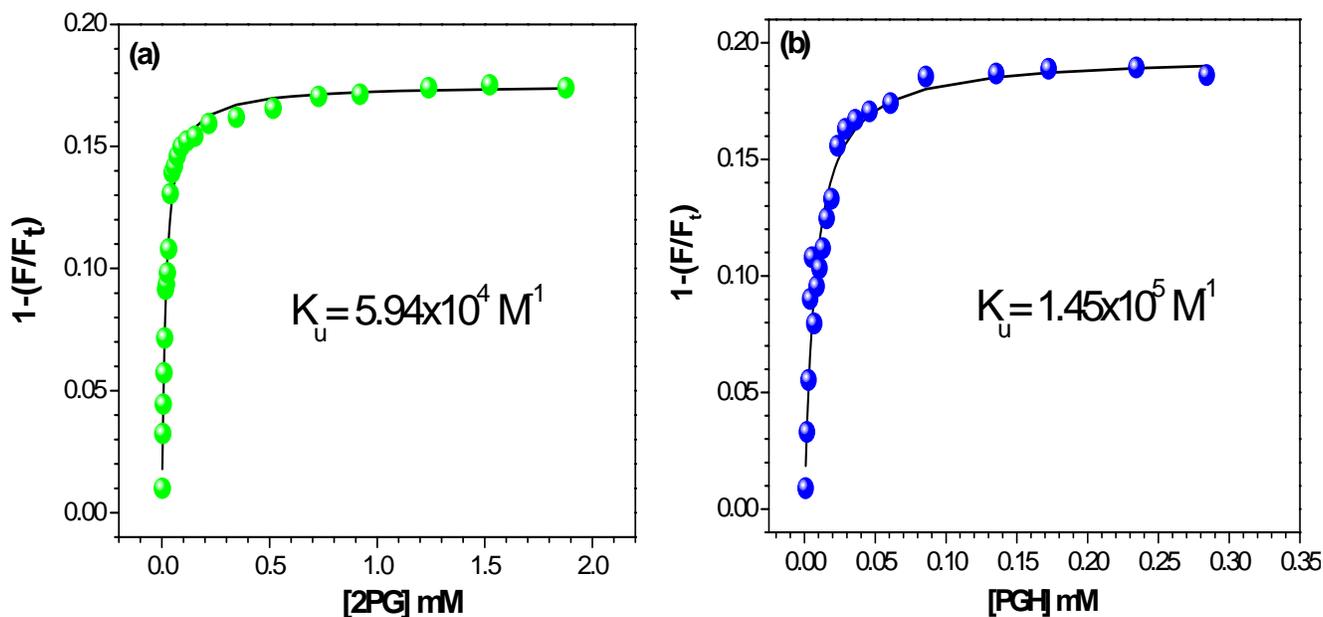


Figura 5.2. **Curvas de titulación fluorimétricas de la ScTIM con sus inhibidores.** (a) ScTIM-2PG (●) y (b) ScTIM-PGH (●). El valor asintótico al cual tiende Y para ambas curvas se calculó a partir de la fluorescencia de la enzima libre (F_t) y en presencia del inhibidor (F) ($\alpha = 1-F/F_t$). La longitud de onda de excitación fue de 280 nm y la emisión se registró a 320 nm. Ambas curvas de titulación representan una de las tres replicas realizadas para cada complejo respectivamente.

5.3.2. Efecto de la fuerza iónica en la K_u .

Para estudiar el efecto de la sal sobre la K_u de ScTIM-2PG y ScTIM-PGH, se realizaron titulaciones fluorimétricas a 25 °C en el amortiguador de TE 50/5, pH 7.4 a diferentes fuerzas iónicas (0.06 - 1.06 M). Las curvas de titulación obtenidas se presentan en la Fig. 5.3.

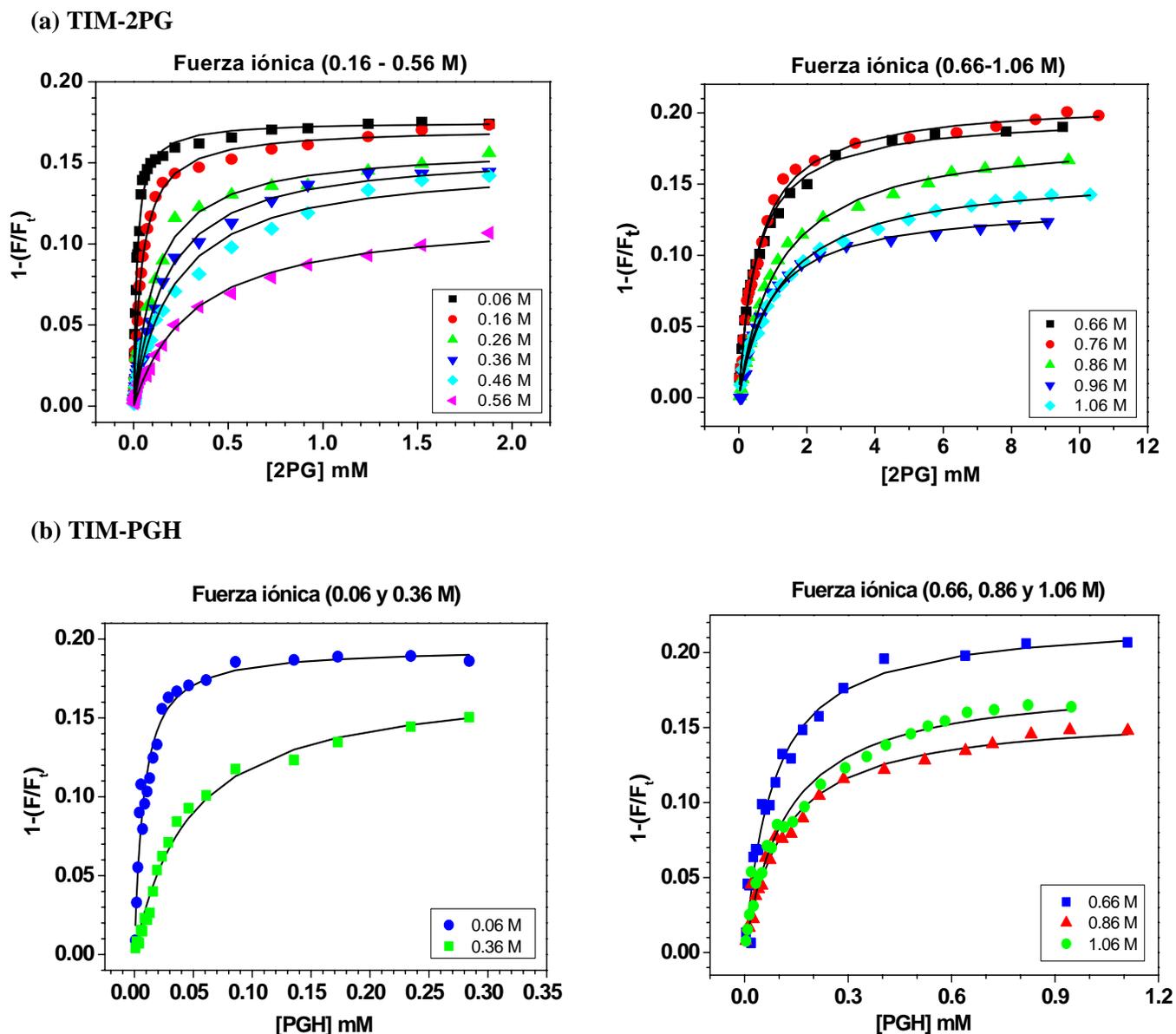


Figura 5.3. **Titulaciones fluorimétricas de la ScTIM con sus inhibidores 2PG y PGH variando la concentración de la sal.** Los experimentos se realizaron a 25°C y en el amortiguador TE 50/5, pH 7.4 y a diferentes fuerzas iónicas, mismas que se indican en las figuras. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm y la emisión se registró a 320 nm. (a) ScTIM-2PG. (b) ScTIM-PGH. En ambos complejos la concentración inicial de la enzima fue de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0.06 – 0.56 M) y de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0.66 - 1.06 M). Las curvas de titulación representan una de las dos o tres replicas realizadas para cada condición.

Con los valores de K_u obtenidos en los ajustes mostrados arriba, se construyó la Fig. 5.4. En ella se puede observar que las constantes de unión para ambos inhibidores disminuyen con el aumento de la fuerza iónica, la disminución es más abrupta para la asociación con 2PG. Asimismo, la afinidad de la ScTIM por PGH siempre es más alta respecto a 2PG.

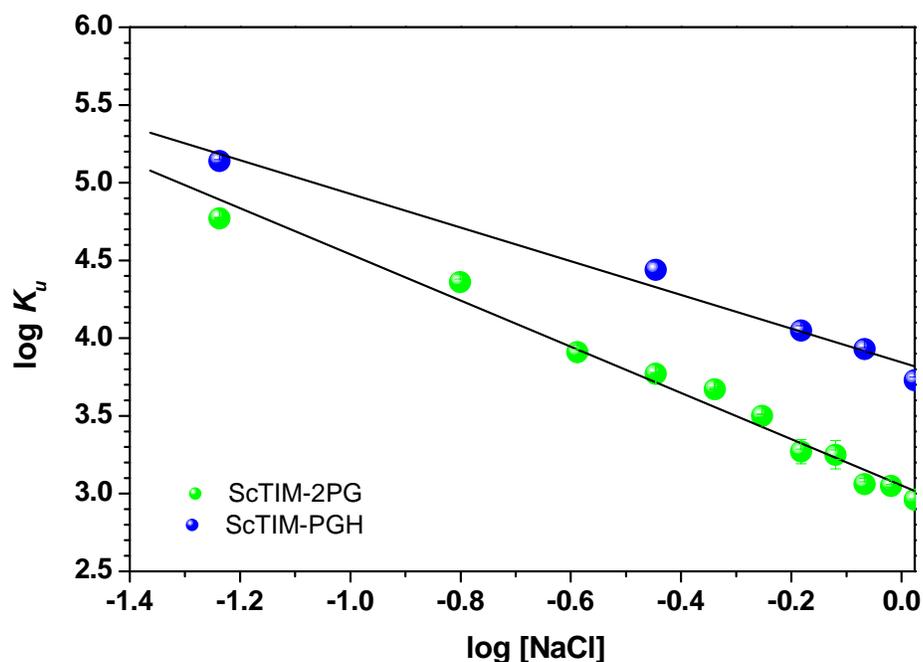


Figura 5.4. **Dependencia de la fuerza iónica de la afinidad de ScTIM con sus inhibidores.** Dependencia lineal del $\log K_u$ respecto al $\log [\text{NaCl}]$ en la interacción de la ScTIM con 2PG y PGH. Los valores de K_u se obtuvieron por las titulaciones fluorimétricas mostradas en la Fig. 5.3 a 25 °C en un amortiguador de TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica de 0.06 M.

En la Fig. 5.4, los valores de las pendientes para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH son: -1.45 y -1.08 respectivamente. Estos valores indican la liberación de aniones (Cl^-) al solvente al formarse el complejo TIM-inhibidor. Esto se discutirá más adelante.

5.3.3. Determinación del ΔH_u y el ΔC_p por el método de van't Hoff.

Se analizó fluorimétricamente la dependencia térmica en la afinidad de la ScTIM para ambos inhibidores. La Fig. 5.5 muestra la variación de la K_u con la temperatura para ambos complejos ScTIM-2PG y ScTIM-PGH en un amortiguador de TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica de 0.06 M. Solamente para el complejo TIM-2PG se realizó también a fuerza iónica de 0.36 M, debido a la escasez de inhibidor tanto de 2PG como de PGH.

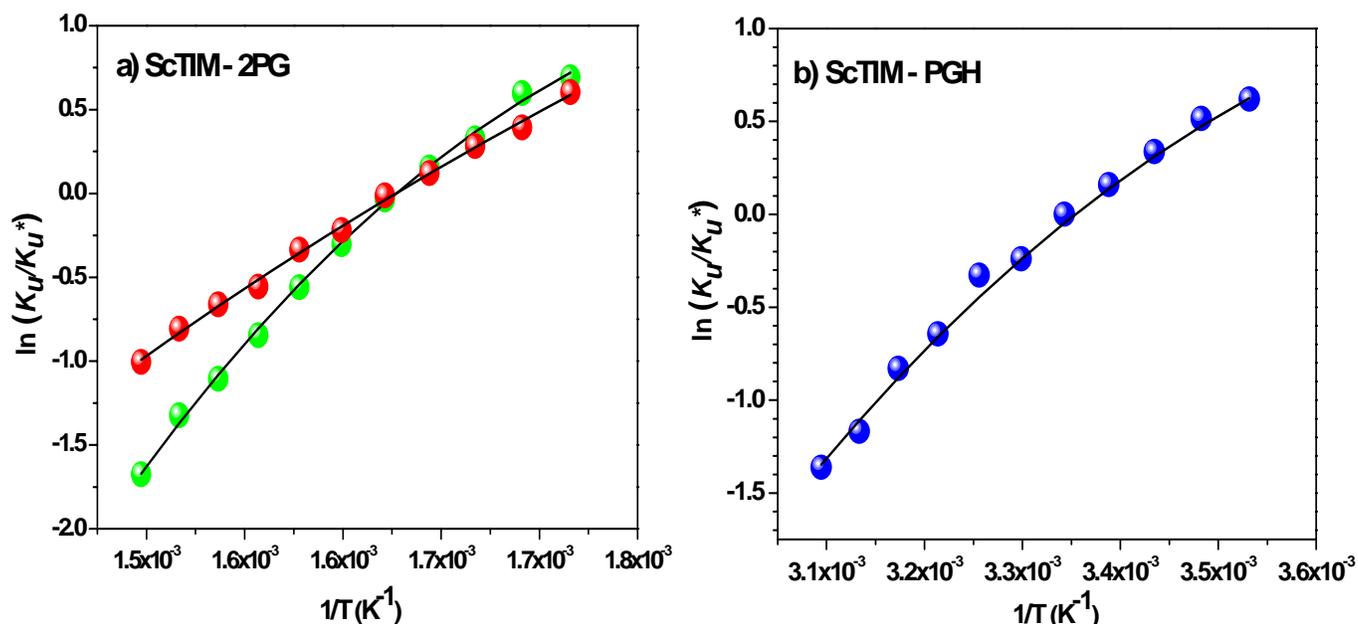


Figura 5.5. **Dependencia térmica de la unión de la ScTIM con sus inhibidores.** Variación de la K_u con la temperatura en TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica 0.06 M. Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación integrada de van't Hoff, Ec. (4.3) a los datos experimentales. (a) Complejo ScTIM-2PG en ausencia de NaCl (●) y a 0.3 M de NaCl (●). (b) Complejo ScTIM-PGH en ausencia de NaCl (●).

En la Tabla 5.3 se muestran los valores de ΔH_u y ΔC_p obtenidos de los ajustes anteriores para ambos complejos.

5.4. Estudios Calorimétricos.

5.4.1. Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI).

Se determinaron por CTI las funciones termodinámicas K_u y ΔH_u para la unión de ambos inhibidores a la ScTIM a 25 °C y pH 7.4. En la Fig. 5.6 se presentan las curvas de titulación calorimétricas para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH realizadas a diferentes fuerzas iónicas: 0.06, 0.36 y 0.66 M. Los parámetros termodinámicos de unión determinados a través de estas curvas de titulaciones se muestran en la Tabla 5.3.

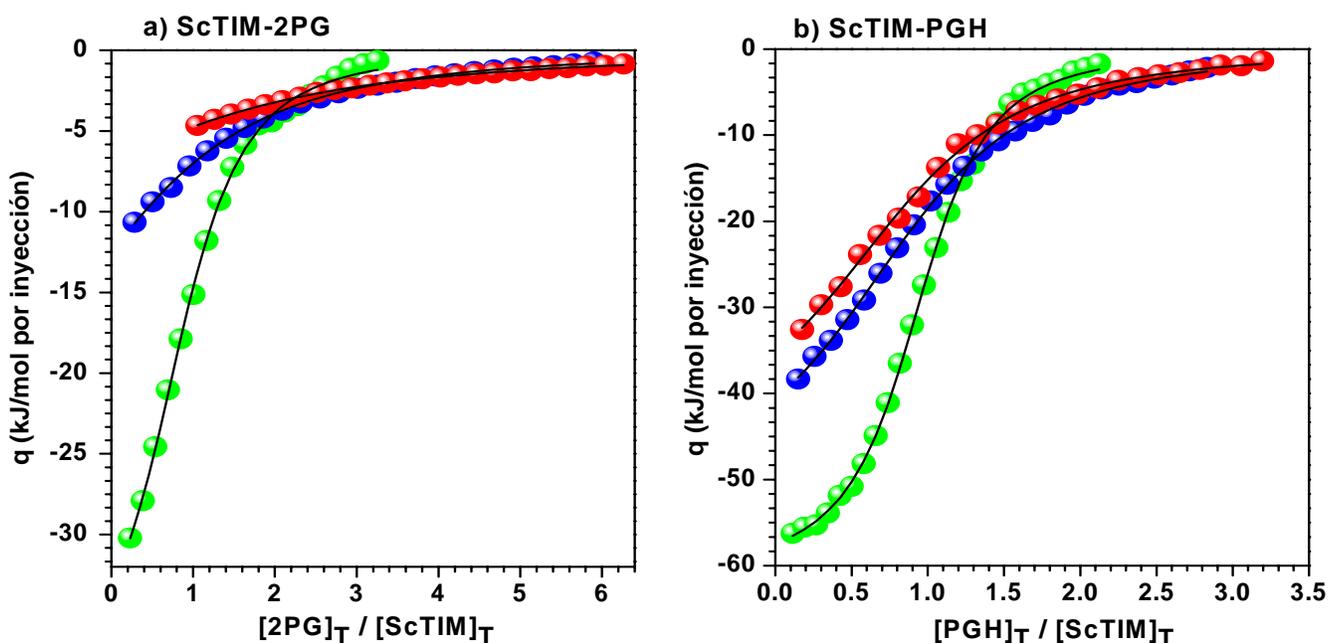


Figura 5.6. **Curvas de titulación calorimétricas de la ScTIM con los inhibidores 2PG y PGH a diferentes fuerzas iónicas.** Los experimentos por CTI se realizaron a 25°C en un amortiguador de TE 50/5, pH 7.4 y a diversas fuerzas iónicas: 0.06 M (●), 0.36 M (●) y 0.66 M (●). (a) Complejo ScTIM-2PG (b) Complejo ScTIM-PGH. Los símbolos representan los calores liberados durante cada adición de inhibidor, normalizado por la cantidad adicionada de 2PG y PGH. Las líneas continuas representan los ajustes con la Ec. 4.4. [Wiseman, T., *et al.*, 1989]. El ajuste de los datos es realizado por monómero de proteína.

5.4.1.1. Cambios de protonación en la unión.

Se consideró la posible existencia de efectos de protonación acoplados a los equilibrios de unión, es decir, cambios en el grado de protonación de residuos ionizables en el ligando o en la proteína debido a la asociación, lo que podría afectar la medición de las entalpías de unión. Por ello se realizaron experimentos de CTI, en ausencia de NaCl para ambos complejos, cambiando el amortiguador de TE 50/5 ($\Delta H_{ioniz} = 33.59 \text{ kJ mol}^{-1}$) por Pipes ($\Delta H_{ioniz} = 11.45 \text{ kJ mol}^{-1}$) como sistema de amortiguamiento [Fukada, H. & Takahashi, K., 1998]. Las entalpías de unión determinadas en Pipes fueron -40.2 ± 0.6 y $-59.2 \pm 0.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH, respectivamente, prácticamente las mismas que las obtenidas en TE 50/5 (-40.5 ± 1.0 y $-60.9 \pm 0.3 \text{ kJ mol}^{-1}$).

5.4.2. Calorimetría de titulación multitérmica (CTM).

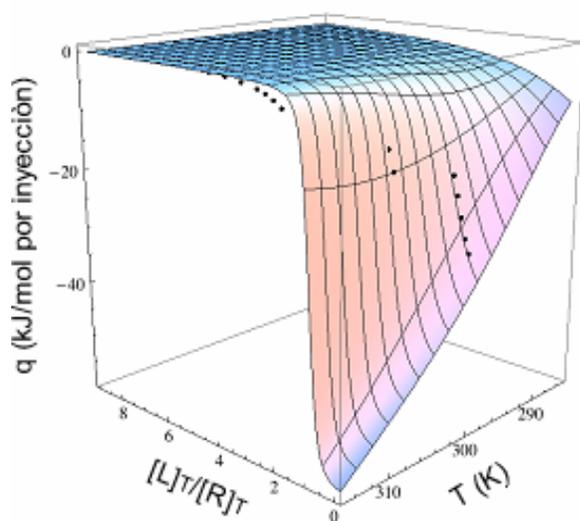
5.4.2.1. Determinación del ΔC_p por CTM.

Para la medición del ΔC_p a diferentes fuerzas iónicas, se utilizó el método de CTM [Chavelas, E.A. *et al.*, 2006], éste permite obtener la capacidad calorífica de unión, además de K_u y ΔH_u , en un solo

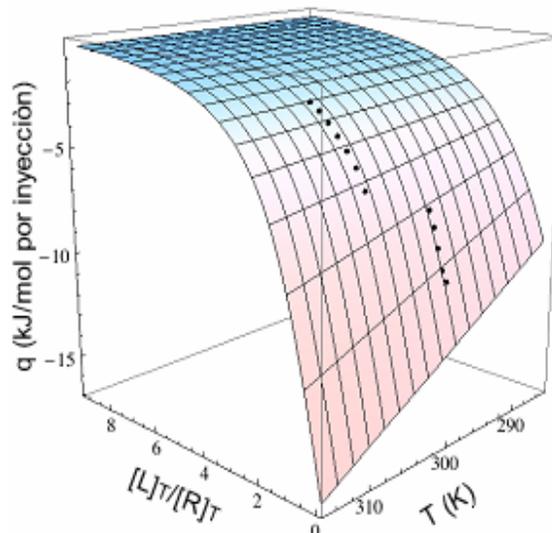
experimento de titulación. La Fig. 5.7 y 5.8 muestran los ajustes obtenidos por CTM a las diferentes fuerzas iónicas para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH respectivamente. Las superficies representan el ajuste simultáneo de las Ecs. 4.4, 4.5 y 4.6. Estas superficies ilustran como la fuerza iónica modula la variación del calor liberado durante el proceso de unión como una función de la temperatura. También se ilustra la sobreposición de los datos experimentales que se obtuvieron por CTM (puntos negros) sobre las superficies de unión observándose que concuerdan. Los valores obtenidos de los parámetros termodinámicos se reportan en la Tabla 5.3 para ambos complejos.

Complejo ScTIM-2PG

a) $I = 0.06 \text{ M}$



b) $I = 0.36 \text{ M}$



c) $I = 0.66 \text{ M}$

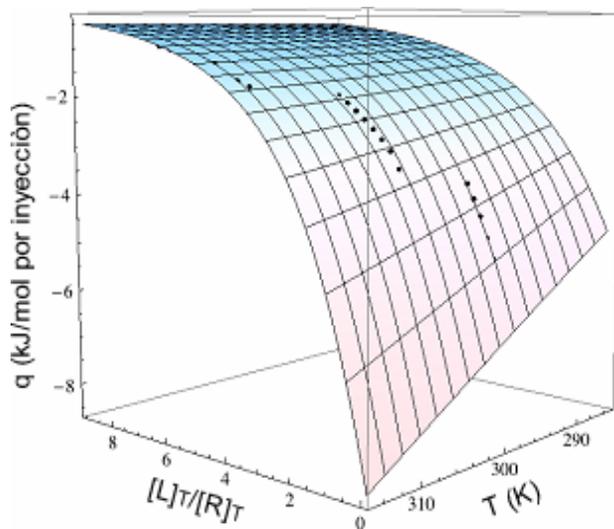


Figura 5.7. Las superficies ilustran como I modula la variación del calor liberado durante el proceso de unión como una función de la temperatura de acuerdo a la Ecs. 4.4, 4.5 y 4.6 para el complejo ScTIM-2PG: a) 0.06 M, b) 0.36 M y c) 0.66 M. Las superficies se generaron en el programa *Mathematica 7*.

Complejo ScTIM-PGH.

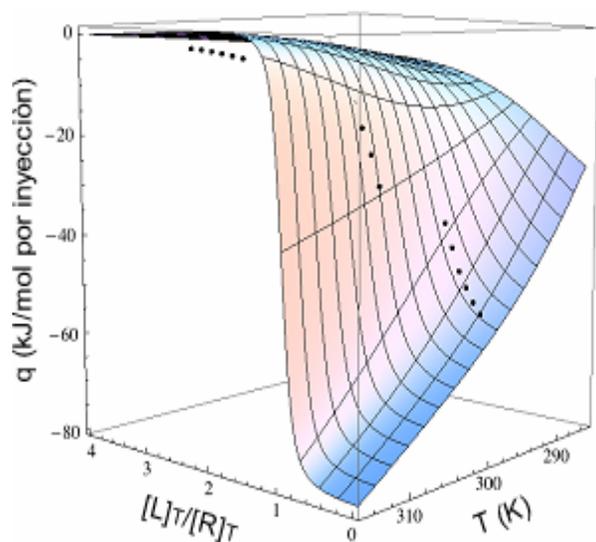
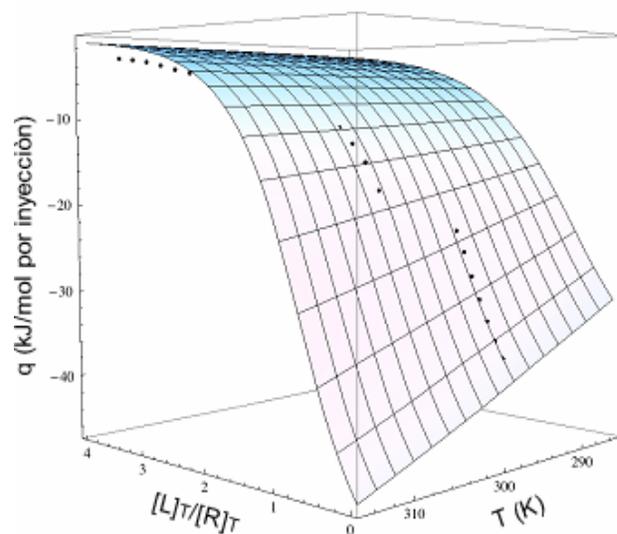
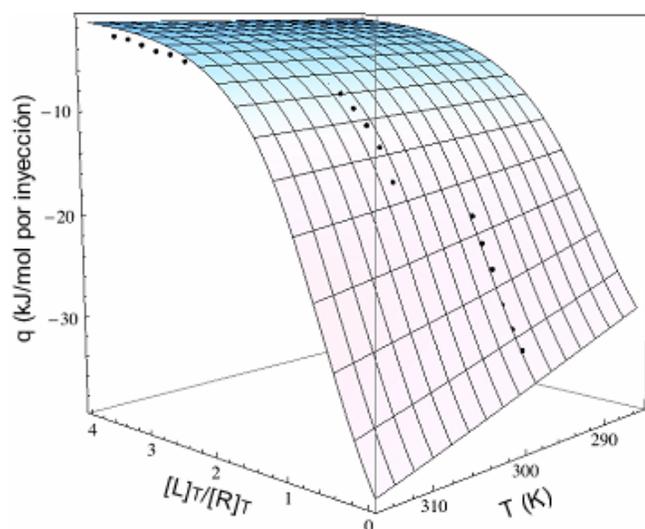
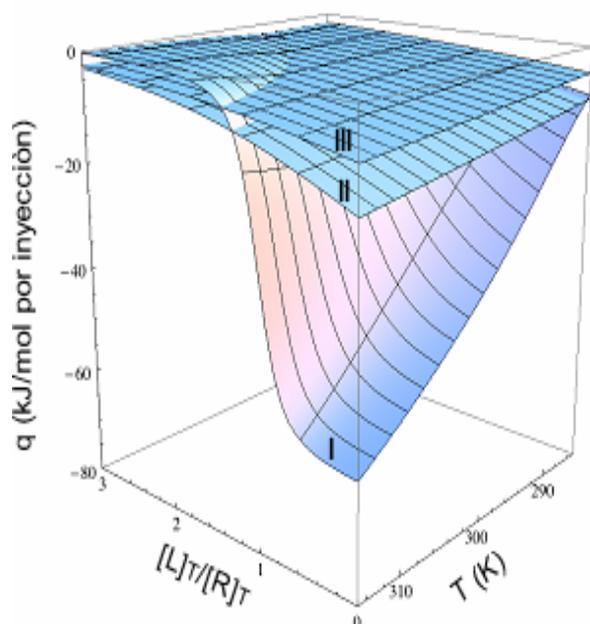
a) $I = 0.06 \text{ M}$ b) $I = 0.36 \text{ M}$ c) $I = 0.66 \text{ M}$ 

Figura 5.8. Las superficies ilustran como I modula la variación del calor liberado durante el proceso de unión como una función de la temperatura de acuerdo a la Ecs. 4.4, 4.5 y 4.6 para el complejo ScTIM-PGH: a) 0.06 M, b) 0.36 M y c) 0.66 M. Las superficies se generaron en el programa *Mathematica 7*.

En resumen, la Fig. 5.9 muestra la sobreposición de las superficies a las diferentes fuerzas iónicas para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH.

a) ScTIM-2PG



b) ScTIM-PGH

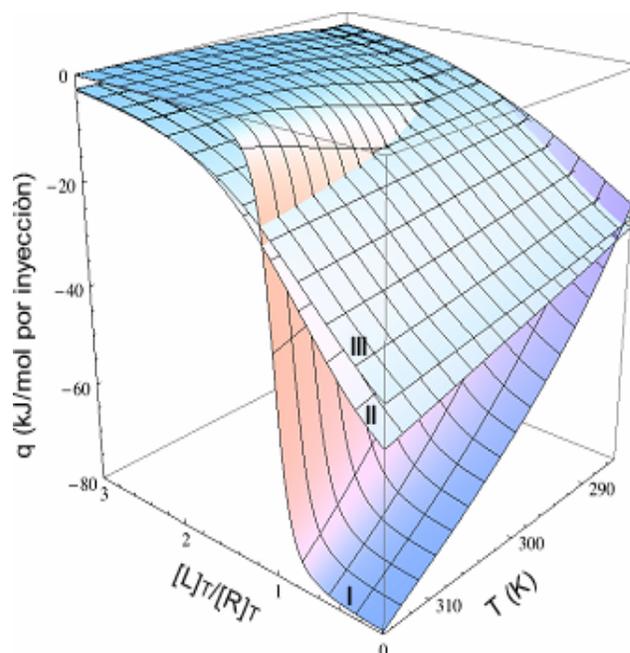


Figura 5.9. **Superficies de unión multitérmicas de la ScTIM con sus inhibidores (a) 2PG y (b) PGH a diferentes fuerzas iónicas.** Estas superficies se puede ver como la superposición de isoterma de unión en un intervalo de temperaturas, las cuales se construyeron con las ecuaciones paramétricas 4.4, 4.5 y 4.6, con valores de K_u , ΔH_u y ΔC_p obtenidos de la regresión lineal múltiple del conjunto de datos obtenidos por MTC para cada condición. La temperatura de referencia fue de 25 °C. Las titulaciones multitérmicas se realizaron en el amortiguador TE 50/5, pH 7.4 y a diferentes fuerzas iónicas: I) 0.06 M, II) 0.36 M y III) 0.66 M.

En la figura anterior se puede observar que el efecto de la fuerza iónica es más abrupta en el complejo ScTIM-2PG que en ScTIM-PGH.

5.4.2.2. Validación del método CTM para el sistema ScTIM-Inhibidor.

Dado que CTM es un nuevo método, se realizó una validación para el sistema ScTIM-2PG, comparando el ΔC_p obtenido con esta metodología contra el valor obtenido por el método tradicional de CTI a partir de las mediciones de ΔH_u a diferentes temperaturas (Fig. 5.10).

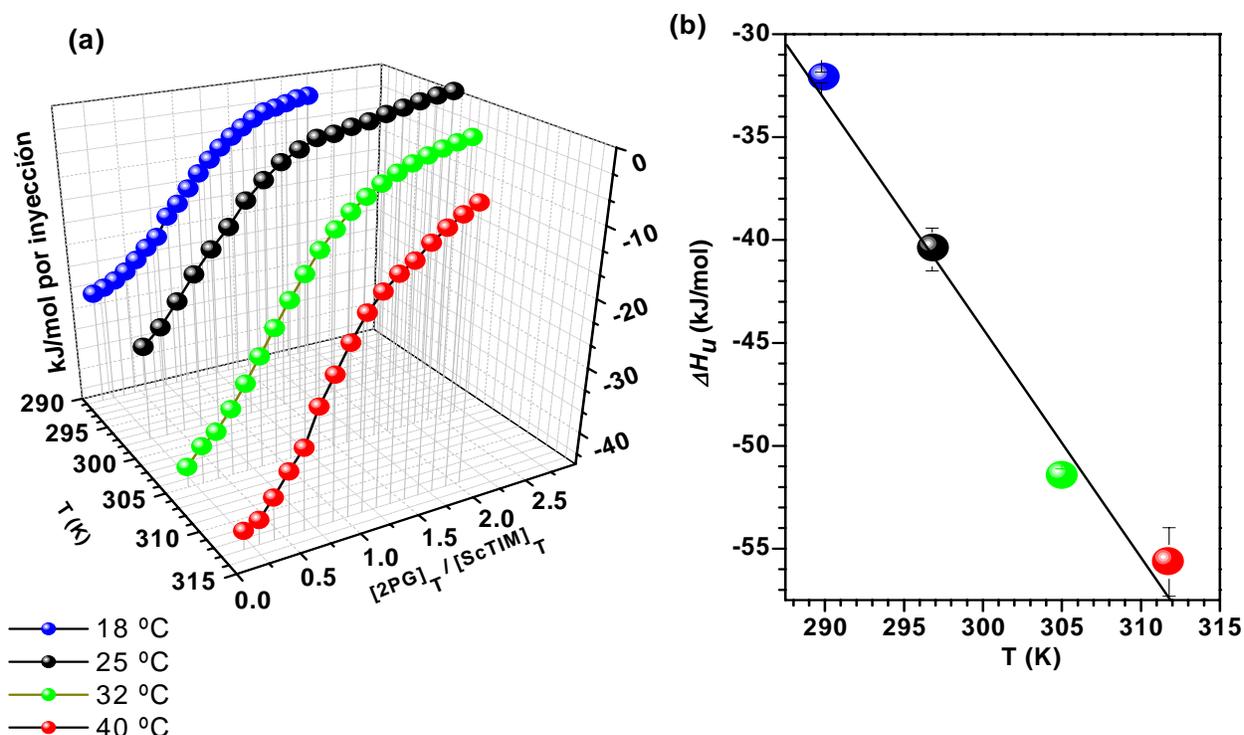


Figura 5.10. **Determinación del ΔC_p de unión por el método tradicional de CTI para el complejo ScTIM-2PG.** a) Isotermas de unión a diferentes temperaturas (18, 25, 32 y 40 °C) en el amortiguador TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica de 0.06 M. Los símbolos representan los calores liberados durante cada adición de 2PG, normalizado por la cantidad de inhibidor adicionado. Las líneas continuas representan los ajustes obtenidos a un modelo de sitios de unión independientes e idénticos Ec. (4.4), donde ΔH_u es obtenido como uno de los parámetros ajustados. (b) Determinación del ΔC_p como la pendiente de la variación lineal de ΔH_u con la temperatura ($-1.11 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

En la Fig. 5.10b, cada punto representa la entalpía de unión (ΔH_u) obtenida a una temperatura diferente (18, 25, 32 y 40°C), y la pendiente de la recta ajustada es el valor de ΔC_p dado que $\Delta C_p = \partial \Delta H_u / \partial T$. En la Tabla 5.2 se muestran los valores de los parámetros termodinámicos obtenidos por CTI a las diferentes temperaturas y el valor obtenido de ΔC_p ($-1.11 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), el cual se compara muy bien con el valor obtenido por MTC ($-1.12 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) a la misma fuerza iónica (ver Tabla 5.3).

Tabla 5.2. Parámetros termodinámicos obtenidos por CTI a diferentes temperaturas para ScTIM-2PG en el amortiguador TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica de 0.06 M.

	Temperatura (K)	K_u (M^{-1})	ΔG_u (kJ mol^{-1})	ΔH_u (kJ mol^{-1})	$T\Delta S_u$ (kJ mol^{-1})	ΔC_p ($\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)	n
CTI	291.15	$8.6 (0.3) \times 10^4$	-28.17 (0.07)	-32.09 (0.25)	-3.92 (0.18)	$\Delta C_p = \partial \Delta H_u / \partial T$ -1.11 (0.15)	1.05 (0.01)
	298.15	$6.3 (0.4) \times 10^4$	-27.38 (0.16)	-40.45 (1.04)	-13.07 (0.88)		0.90 (0.02)
	305.15	$4.9 (0.1) \times 10^4$	-26.76 (0.05)	-51.63 (0.29)	-24.87 (0.24)		1.06 (0.04)
	313.15	$2.7 (0.2) \times 10^4$	-25.27 (0.22)	-55.56 (1.67)	-30.30 (1.45)		0.96 (0.02)

Los números en paréntesis indican el error experimental.

5.5. Integración de los parámetros termodinámicos para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH obtenidos por las técnicas fluorimétricas y calorimétricas.

En la Tabla 5.3 se comparan los parámetros termodinámicos de unión a 25 °C, obtenidos por titulaciones fluorimétricas (ΔH_u y ΔC_p se determinaron por el método de van't Hoff), CTI y CTM a diferentes fuerzas iónicas: 0.06, 0.36 y 0.66 M.

Tabla 5.3. Parámetros termodinámicos de unión de inhibidores fosforilados a ScTIM empleando tres diferentes métodos de titulación.

(a) ScTIM-2PG

Fuerza iónica (mol L ⁻¹)	Método	K_u (M ⁻¹)	ΔG_u (kJ/mol)	ΔH_u (kJ/mol)	$T\Delta S_u$ (kJ/mol)	ΔC_p (kJ/K mol)	N
0.06	TF	5.9 (0.04) × 10 ⁴	-27.3 (0.02)	-41.4 (0.7) ^a	-14.1 (0.7)	-1.00 (0.08) ^b	---
	CTI	6.3 (0.4) × 10 ⁴	-27.4 (0.2)	-40.5 (1.0)	-13.1 (0.9)	-1.11 (0.15)	0.90 (0.02)
	CTM	6.3 (0.2) × 10 ⁴	-27.4 (0.1)	-40.4 (0.4)	-13.0 (0.3)	-1.12 (0.10)	0.89 (0.01)
	promedio	6.2 (0.2) × 10⁴	-27.4 (0.05)	-40.8 (0.5)	-13.4 (0.5)	-1.08 (0.05)	0.90 (0.02)
0.36	TF	5.9 (0.1) × 10 ³	-21.5 (0.04)	-29.1 (0.6) ^a	-7.6 (0.5)	-0.22 (0.06) ^b	---
	CTI	5.0 (0.2) × 10 ³	-21.1 (0.1)	-29.3 (1.6)	-8.2 (1.5)	---	0.91 (0.04)
	CTM	5.8 (0.3) × 10 ³	-21.5 (0.1)	-29.5 (1.9)	-8.1 (1.7)	-0.28 (0.09)	0.92 (0.06)
	promedio	5.6 (0.4) × 10³	-21.4 (0.2)	-29.3 (0.2)	-8.0 (0.3)	-0.25 (0.03)	0.92(0.05)
0.66	TF	1.7 (0.2) × 10 ³	-18.4 (0.3)	---	---	---	---
	CTI	1.3 (0.04) × 10 ³	-17.8 (0.1)	-22.3 (1.7)	-4.5 (1.6)	---	1.06 (0.07)
	CTM	1.0 (0.04) × 10 ³	-17.2 (0.1)	-22.7 (1.5)	-5.5 (1.4)	-0.22 (0.04)	0.97 (0.05)
	promedio	1.3 (0.3) × 10³	-17.8 (0.5)	-22.5 (0.2)	-5.5 (0.5)	-0.22 (0.04)	1.02(0.06)

(b) ScTIM-PGH

Fuerza iónica (mol L ⁻¹)	Método	K_u (M ⁻¹)	ΔG_u (kJ/mol)	ΔH_u (kJ/mol)	$T\Delta S_u$ (kJ/mol)	ΔC_p (kJ/K mol)	N
0.06	TF	1.5 (0.04) × 10 ⁵	-29.5 (0.1)	-60.0 (1.8) ^a	-30.5 (1.7)	-1.11 (0.20) ^b	---
	CTI	1.7 (0.05) × 10 ⁵	-29.8 (0.1)	-60.9 (0.3)	-31.1 (0.3)	---	0.96 (0.02)
	CTM	1.7 (0.1) × 10 ⁵	-29.9 (0.2)	-59.2 (0.7)	-29.3 (0.5)	-1.22 (0.37)	0.86 (0.01)
	promedio	1.6 (0.09) × 10⁵	-29.7 (0.1)	-60.0 (0.7)	-30.3 (0.8)	-1.17 (0.05)	0.91(0.02)
0.36	TF	2.1 (0.04) × 10 ⁴	-24.8 (0.1)	---	---	---	---
	CTI	2.3 (0.1) × 10 ⁴	-24.9 (0.1)	-52.2 (0.9)	-27.3 (0.8)	---	0.93 (0.01)
	CTM	1.8 (0.1) × 10 ⁴	-24.3 (0.1)	-51.1 (1.1)	-26.7 (0.9)	-0.44 (0.15)	0.95 (0.02)
	promedio	2.1 (0.2) × 10⁴	-24.7 (0.3)	-51.7 (0.6)	-27.0 (0.3)	-0.44 (0.15)	0.94(0.02)
0.66	TF	1.1 (0.06) × 10 ⁴	-23.1 (0.1)	---	---	---	---
	CTI	1.5 (0.1) × 10 ⁴	-23.8 (0.2)	-46.8 (1.4)	-23.0 (1.3)	---	0.87 (0.02)
	CTM	1.0 (0.1) × 10 ⁴	-22.8 (0.2)	-46.7 (1.2)	-23.9 (1.0)	-0.35 (0.15)	0.95 (0.02)
	promedio	1.2 (0.2) × 10⁴	-23.2 (0.4)	-46.8 (0.1)	-23.5 (0.5)	-0.35 (0.15)	0.91(0.02)

^{a,b} ΔH_u y ΔC_p se obtuvieron por el método de van't Hoff, determinando la K_u a diferentes temperaturas por titulaciones fluorimétricas.

--- significa que no fueron determinados.

Los números en paréntesis indican la desviación estándar.

Empleando tres diferentes métodos de titulación, se caracterizó la termodinámica de unión de ambos complejos a tres diferentes fuerzas iónicas (0.06, 0.36 y 0.66 M), cuantificando: ΔG_u , ΔH_u , ΔS_u y ΔC_p , que son los parámetros necesarios para dar una descripción más completa y detallada del proceso de unión. Los resultados obtenidos con las diferentes metodologías utilizadas, concuerdan; particularmente la similitud de las entalpías calorimétricas y de van't Hoff (fluorimétrica) es indicativo de un modelado correcto de los datos [Horn, J.R., et al., 2001].

5.6. Termodinámica estructural.

5.6.1. Cálculos de energética de unión basada en modelos de área superficial.

Como se detalló en el Capítulo II de Antecedentes, el sitio catalítico de la ScTIM, es cubierto por un asa móvil que mantiene un ambiente hidrofóbico, y evita de esta manera la pérdida del fosfato del sustrato o inhibidor. Sin embargo, estudios por RMN sugieren que el movimiento de la asa catalítica es de la propia enzima abriendo/cerrando independientemente de la unión del sustrato o inhibidor [Xiang, J. *et al.*, 2004]. Por lo tanto, no está claro cuál debe ser la conformación de referencia para la enzima libre en el proceso de unión, ya que para el cálculo con APBS y de ΔASA se considera un reconocimiento de cuerpo rígido Proteína-inhibidor. A fin de calcular el ΔASA durante la unión en ambos complejos de ScTIM, se decidió tomar dos conformaciones de referencia para la enzima sin inhibidor: i) la estructura cristalográfica de la ScTIM de levadura sin inhibidor en su conformación "abierta" (1YPI.pdb) y ii) la estructura de la ScTIM tal como existe en sus respectivos complejos (2YPI.pdb o 7TIM.pdb), es decir, considerando una unión de "cuerpo rígido". Se decidió tomar en cuenta dos posibilidades más, considerar las moléculas de agua cristalográficas para determinar el área superficial accesible al solvente y no considerarlas. Debido a esto, se realizaron cuatro tipos de cálculos de ΔASA para cada complejo:

- C1: ASA del complejo incluyendo moléculas de agua - (ASA de la enzima como cuerpo rígido + ASA del inhibidor con moléculas de agua asociadas)
- C2: ASA del complejo en ausencia de moléculas de agua - (ASA de la enzima como cuerpo rígido + ASA del inhibidor en ausencia de moléculas de agua)
- C3: ASA del complejo en ausencia de moléculas de agua - (ASA de la enzima en su conformación abierta y sin inhibidor + ASA del inhibidor en ausencia de moléculas de agua)
- C4: ASA del complejo incluyendo moléculas de agua - (ASA de la enzima en su conformación abierta y sin inhibidor + ASA del inhibidor con moléculas de agua asociadas)

Los resultados de estos cálculos se muestran en la Tabla 5.4, así como los resultados del análisis de contactos proteína-inhibidor obtenidos por LPC [Sobolev, V., *et al.*, 1999] (ver Apéndice E). Los valores mostrados representan los promedios obtenidos para ambas subunidades de la enzima.

Tabla 5.4. Cálculos de ΔASA sobre la unión de ambos complejos obtenidos por NACCESS y el análisis de contacto proteína-ligando obtenidos por LPC (ver Apéndice E).

ScTIM-2PG (resolución 2.5Å)					ScTIM-PGH (resolución 1.9Å)			
Puentes de hidrógeno ^a	21.5				26.0			
Contactos ^b	55.5				63.0			
H ₂ O ^c	1.0				3.0			
	ΔASA_{apol}	ΔASA_{pol}	ΔASA_{tot}	%polar	ΔASA_{apol}	ΔASA_{pol}	ΔASA_{tot}	%polar
C1	-106.6	-304.5	-411.1	74.1	-138.3	-390.7	-529.0	73.8
C2	-99.7	-261.5	-361.1	72.4	-87.6	-296.9	-384.5	77.2
C3	-50.4	-484.2	-534.7	90.6	-200.5	-329.8	-530.2	62.2
C4	-57.4	-527.2	-584.7	90.2	-251.2	-423.6	-674.8	62.8

^a Número de puentes de hidrógeno entre el inhibidor y la ScTIM o moléculas de aguas en el sitio de unión. ^b Número de contactos atómicos establecidos por el inhibidor en el sitio de unión. ^c Número de moléculas de agua en contacto con el ligando.

En la Tabla 5.5 se muestran los valores de ΔH_u y ΔC_p calculados en función del ΔASA_{pol} y ΔASA_{apol} , a través de las parametrizaciones empíricas reportadas en la literatura por diferentes autores (ver Tabla 4.1), de acuerdo a la Ec. 1.4 y Ec. 1.5 respectivamente.

Tabla 5.5. Comparación de los valores de ΔH_u y ΔC_p de los complejos ScTIM-2PG y ScTIM-PGH calculados a través de modelos de área superficial accesible al solvente y los cuatro cálculos de ASA (C1-C4) de la Tabla 5.4.

ΔH_u (kJ mol ⁻¹)	ScTIM-2PG				ScTIM-PGH			
	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4
Luque y Freire P-L (2002)	-36.3	-30.9	-61.4	-66.8	-46.5	-35.9	-36.7	-47.3
García-Hernández y Hernández-Arana P-P (1999)	-21.6	-18.3	-37.8	-41.1	-27.3	-21.3	-20.6	-26.7
García-Hernández y Hernández-Arana P-C (1999)	-56.1	-48.0	-92.2	-100.3	-72.0	-55.1	-58.7	-75.6
ΔC_p (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4
Murphy y Freire (1992)	0.13	0.10	0.43	0.47	0.17	0.16	-0.02	-0.01
Spolar <i>et al.</i> (1994)	0.04	0.02	0.22	0.23	0.04	0.06	-0.08	-0.09
Myers <i>et al.</i> (1995)	-0.01	-0.02	0.12	0.13	-0.02	0.01	-0.11	-0.14
Makhatadze y Privalov (1995)	0.04	0.02	0.32	0.34	0.05	0.07	-0.14	-0.16
García <i>et al.</i> (2003)	-0.19	-0.17	-0.19	-0.21	-0.25	-0.17	-0.29	-0.37

A través de estas parametrizaciones, los valores correspondientes para ΔH_u considerando una unión de “cuerpo rígido” (C1 y C2), se observa que los tres modelos predijeron valores de ΔH_u más exotérmicos para ScTIM-PGH que para ScTIM-2PG. Los valores experimentales de ΔH_u para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH son **-40.8** y **-60.0** kJ mol⁻¹ respectivamente, a fuerza iónica de 0.06 M (ver Tabla 5.3), los cuales están dentro del intervalo de los valores previstos por estos modelos de área, principalmente con el modelo de García-Hernández y Hernández-Arana, P-C (1999), considerando el cálculo con C2. Sin embargo, se observó lo contrario, para los cálculos C3 y C4 realizados con la estructura abierta, los tres modelos predijeron valores de ΔH_u más exotérmicos para ScTIM-2PG que para ScTIM-PGH. Aunque con el modelo de García-Hernández y Hernández-Arana, P-C (1999), en el cálculo con C3 el valor obtenido es cercano al obtenido experimentalmente. En el caso del ΔCp se emplearon cinco modelos de área superficial, los cuales no reproducen los valores experimentales de ambos complejos a fuerza iónica de 0.06 M. Sin embargo, se observó que los valores obtenidos por estos modelos son apenas similares a los medidos a altas fuerzas iónicas.

Enfoque computacional

5.7. Determinación de la energía de unión para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH.

En la Fig. 5.11 se comparan los valores de las energías calculadas computacionalmente de acuerdo a la Ec. 4.8 a partir de una contribución electrostática y otra no electrostática con las energías de unión obtenidas experimentalmente por las titulaciones fluorimétricas a partir de la determinación de la K_u a diferentes fuerzas iónicas. Los valores de las energías de unión se reportan en el Apéndice F (apartado F.1 y F.2).

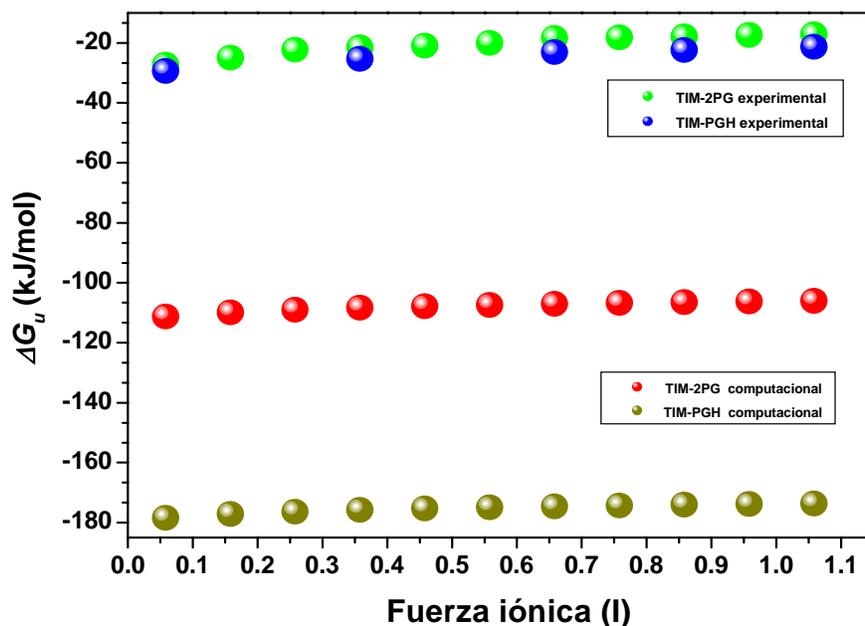


Figura 5.11. Comparación de los valores de las energías de unión obtenidas por titulaciones fluorimétricas con las energías de unión obtenidas por cálculos computacionales a diferentes fuerzas iónicas en el solvente, utilizando los potenciales de PARSE. Las energías calculadas son la suma de la contribución electrostática y no electrostática para el ScTIM-2PG y ScTIM-PGH.

Los valores de ΔG_u obtenidos experimental y computacionalmente son muy diferentes, siendo siempre más negativos los calculados que los medidos. Para el complejo ScTIM-2PG los valores teóricos son alrededor de 85 kJ mol^{-1} más negativos mientras que para ScTIM-PGH la diferencia es alrededor de -165 kJ mol^{-1} . En lo que coinciden ambas evaluaciones es que al aumentar la fuerza iónica disminuye la afinidad del complejo ScTIM-inhibidor.

Por otro lado, con los cálculos obtenidos del ΔG_u bajo el efecto de la fuerza iónica se representaron los potenciales electrostáticos para la ScTIM sin inhibidor, ScTIM-2PG y ScTIM-PGH a 0.06 y 1.06 M a través del programa VMD. Para ScTIM sin inhibidor se observa que el sitio activo aparece de color azul por el residuo de Lys12 que genera un ambiente positivo principalmente, sin embargo, cuando se visualizó el potencial electrostático de ScTIM-2PG y ScTIM-PGH el sitio activo se observa de color rojo por la carga negativa de los inhibidores. Para la ScTIM sin inhibidor y ambos complejos también se observa como los potenciales electrostáticos disminuyen conforme aumenta fuerza iónica del medio, lo que concuerda con lo que se ha observado experimentalmente en este trabajo.

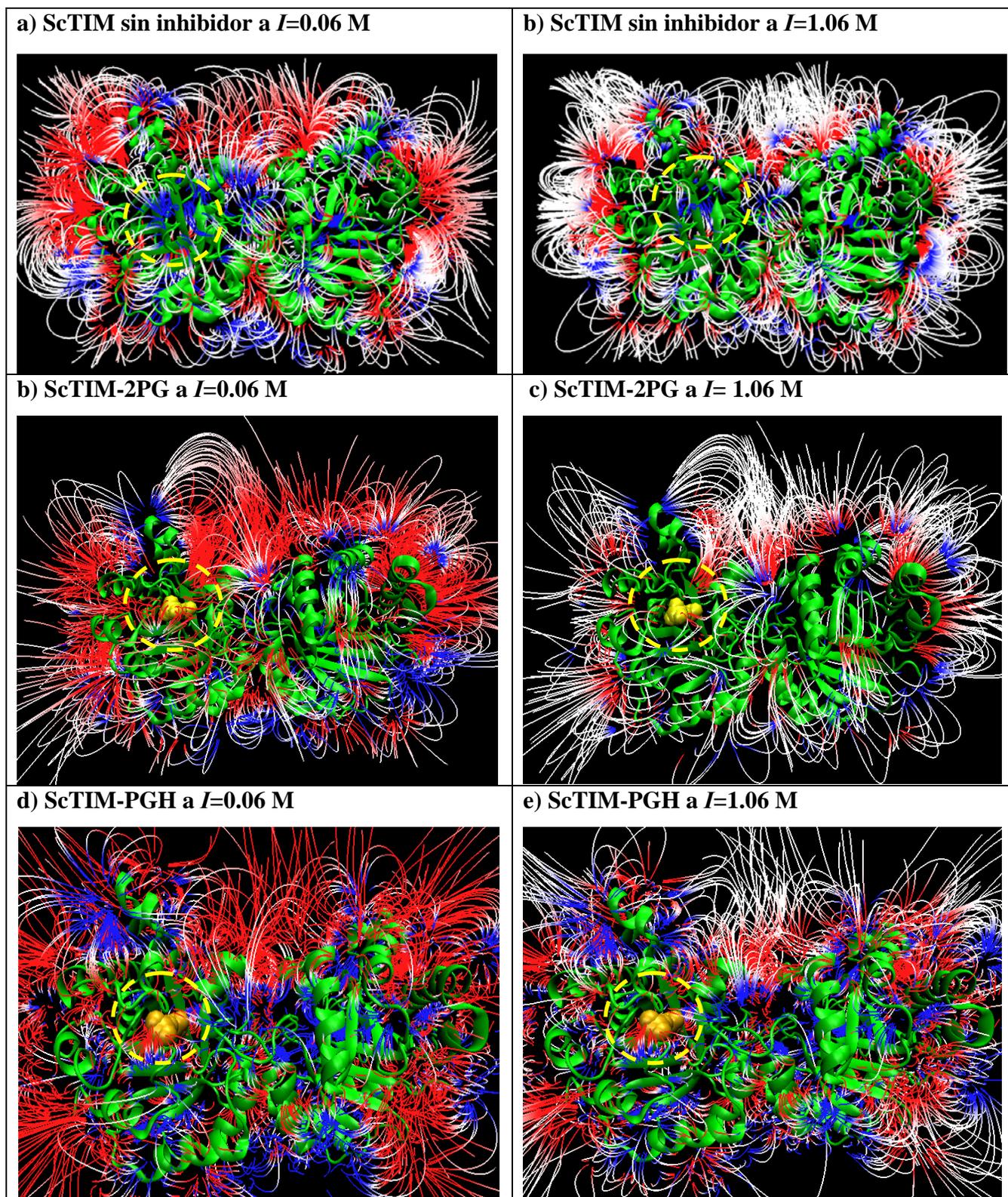


Figura 5.12. Representación del potencial electrostático obtenidos por APBS para la ScTIM sin inhibidor, ScTIM-2PG y ScTIM-PGH a 0.06 y 1.06 M. El círculo amarillo indica el sitio activo para ScTIM sin inhibidor la carga es positiva (azul) y para ambos complejos la carga es negativa (rojo)

5.7.1. Importancia de grupos cargados en la asociación de la ScTIM con sus inhibidores.

Se realizó un análisis sobre el efecto de apagar cargas de algunos residuos del sitio de unión de la ScTIM y de los inhibidores (2PG y PGH) sobre el ΔG_u . En el Apéndice F se muestran los valores de cada contribución al ΔG_u (apartado F.3). En la Tabla 5.6 se muestran los residuos que se modificaron a carga cero para ambos complejos.

Tabla 5.6. Efecto de las cargas de algunos átomos de la Lys12 y Glu165 de la ScTIM, así como los átomos del grupo PO_4^{2-} de los inhibidores en el ΔG_u teórico.

(a) ScTIM-2PG, $\Delta G_u = -111.24 \text{ kJ mol}^{-1}$ a $I = 0.06 \text{ M}$.

Grupo Funcional	Carga modificada	ΔG_u (kJ/mol)
Hζ1, Hζ2, Hζ3, de la Lys12 tanto en la proteína sin inhibidor como en el complejo	H ζ 1, H ζ 2, H ζ 3, 0.33 \rightarrow 0.00	81.26
Grupo COO$^-$ del Glu165 C δ , O ϵ 1, O ϵ 2, en la proteína sin inhibidor	C δ , 0.55 \rightarrow 0.00, O ϵ 1, -0.50 \rightarrow 0.00, O ϵ 2, -0.49 \rightarrow 0.00	-37.97
Grupo PO$_4$ de 2PG P, O3, O4, O5, O6 del 2PG en el inhibidor libre/como en el complejo	P, 1.64/1.45 \rightarrow 0.00, O3, -0.71/-0.56 \rightarrow 0.00, O4, O5, O6, -0.99/-1.00 \rightarrow 0.00	84.16

(b) ScTIM-PGH $\Delta G_u = -178.38 \text{ kJ mol}^{-1}$ a $I = 0.06 \text{ M}$.

Grupo Funcional	Carga modificada	ΔG_u (kJ/mol)
Hζ1, Hζ2, Hζ3, de la Lys 12 tanto en la proteína sin inhibidor como en el complejo	H ζ 1, H ζ 2, H ζ 3, 0.33 \rightarrow 0.00	25.32
Grupo COO$^-$ del Glu165 C δ , O ϵ 1, O ϵ 2, en la proteína sin inhibidor	C δ , 0.55 \rightarrow 0.00, O ϵ 1, -0.50 \rightarrow 0.00, O ϵ 2, -0.49 \rightarrow 0.00	-92.79
Grupo PO$_4$ de PGH P, O1, O2, O3, O4 del PGH en el inhibidor libre/como en el complejo	P, 1.83/1.43 \rightarrow 0.00, O1, -0.74/-0.49 \rightarrow 0.00, O2, O3 -0.92/-0.98 \rightarrow 0.00, O4, -0.98/-1.02 \rightarrow 0.00	198.42

Es importante mencionar que de acuerdo con evidencias experimentales, en los complejos se consideró protonado al Glu165 y a los inhibidores con carga de -3. En la ScTIM sin inhibidor se consideró el Glu165 desprotonado (con carga de -1) y la carga de los inhibidores libres de -2. En la Tabla 5.6 se determinó ΔG_u para ambos sistemas realizando un apagamiento de cargas de algunos átomos de residuos de la proteína y átomos de los inhibidores. En ambos complejos se puede observar el efecto de las cargas positivas de los átomos H ζ 1, H ζ 2, H ζ 3, de la Lys 12 el ΔG_u se hizo muy desfavorable debido a que se debilita la interacción con el inhibidor cargado negativamente y la mayor carga positiva se distribuye principalmente en los H ζ 's de la Lys 12. También se puede observar que el efecto del grupo carboxilato de la ScTIM sin inhibidor C δ , O ϵ 1, O ϵ 2 del Glu165 el valor de ΔG_u se hace desfavorable como es de esperarse debido a que al apagar las cargas de grupo COO⁻ (en la proteína libre) del Glu165 no se establece una interacción con los átomos del inhibidor en la unión (NO para PGH y CO para 2PG). Al apagar la carga del grupo del PO₄²⁻, el ΔG_u se hace muy desfavorable, principalmente en PGH, lo que indica que el grupo fosfato de los sustratos o inhibidores son indispensables para la unión.

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

Enfoque experimental

6.1. Efecto de las sales en la estabilidad de la ScTIM.

Se han descrito dos tipos principales de efectos de las sales disueltas sobre las proteínas: aquellos relacionados con la unión específica de algunos iones y otros relacionados a un efecto general de apantallamiento, que está asociado más bien con la concentración de cargas y no con iones particulares. El tratamiento electrostático a través de Poisson-Boltzmann solamente involucra un efecto no específico, pues se basa en un modelo de solvente continuo. Este modelo aplicado a la ScTIM predice que la estabilidad del estado nativo se ve favorecida por las interacciones electrostáticas a baja fuerza iónica, por otro lado conforme aumenta la fuerza iónica en el intervalo de pH analizado (3.5 a 9.0) el valor de la energía electrostática se hace menos negativo (Fig. 5.1a). Experimentalmente, esto concuerda con la disminución de la temperatura media de transición (T_m) observado en las desnaturalizaciones térmicas de la ScTIM al aumentar la concentración de NaCl (Fig. 5.1b, curva I en el recuadro). La desestabilización provocada por esta sal, considerada como neutra en la serie de Hofmeister [Zhang & Cremer 2006], sugiere que las interacciones electrostáticas contribuyen favorable y significativamente a mantener la estructura nativa de la ScTIM. El incremento de la fuerza iónica obstaculiza estas interacciones favorables y produce un efecto desestabilizador. Por otra parte, la adición de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$ al medio induce una estabilización en la ScTIM (Fig.5.1b), lo que es consistente con que el ion hidrógeno fosfato HPO_4^{2-} actúa como inhibidor competitivo de la enzima [Lambeir, A. M., *et al.*, 1987]. Este anión se une al sitio activo de la enzima estabilizando su estado nativo, éste efecto estabilizante sobre la ScTIM ha sido ya estudiado con el inhibidor 2PG [González-Mondragón, E., *et al.*, 2007]. En general, estos resultados indican que el efecto producido por el NaCl en la solución sobre la ScTIM está asociado a un efecto de apantallamiento y no a una unión específica de dichos iones con la enzima nativa, por lo que representa un electrolito apropiado para estudiar el efecto de la fuerza iónica en la unión de los inhibidores a la ScTIM.

6.2. Análisis de la termodinámica de unión en la interacción ScTIM-2PG y ScTIM-PGH.

La afinidad de la ScTIM por ambos inhibidores fosforilados disminuye a medida que se incrementa la fuerza iónica (Fig. 5.4), evidenciando una importante contribución favorable de las interacciones electrostáticas en la unión. La carga positiva del grupo ϵ -amino de la Lys12 tiene el papel de crear un potencial electrostático que atrae a los sustratos aniónicos hacia el sitio catalítico [Lodi, P. J., *et al.*,

1994], atrayendo también a 2PG y PGH negativamente cargados. Análisis previos mostraron que ambos inhibidores, 2PG y PGH, se unen a la TIM en su forma dianiónica con dos oxígenos del grupo fosfato cargados y su tercer grupo ionizable protonado [Collins, K. D. 1974; Hartman, F. C., *et al.*, 1975; Donnini, S. *et al.*, 2008]. Una vez que el inhibidor se encuentra en el sitio catalítico, este último protón es transferido al grupo carboxilo del Glu165, por lo que la forma completamente ionizada de los inhibidores es la especie finalmente unida [Campbell, I. D., *et al.*, 1978; Alahuhta, M. & Wierenga, R. 2010]. Considerando que ambos inhibidores se encuentran igualmente en forma trianiónica en sus respectivos complejos con la ScTIM, es difícil explicar la mayor sensibilidad del complejo ScTIM-2PG a la fuerza iónica del medio (Figuras 5.4 y 6.3). El grupo carboxílico de 2PG e hidroxámico de PGH tienen diferentes valores de pKa, 5.2 para 2PG [Donnini, S. *et al.*, 2008] y 9.5 para PGH [Collins, K. D. 1974], lo que origina que estos inhibidores tengan diferentes grados de protonación a pH 7.4; para 2PG la forma trianiónica (${}^{-2}\text{O}_3\text{PO-CH}_2\text{-CO}_2^{-}$) sería la más abundante, mientras que para PGH lo sería la forma dianiónica (${}^{-2}\text{O}_3\text{PO-CH}_2\text{-CO-NH-OH}$). Estudios por RMN han mostrado que a pH neutro las especies más pobladas para 2PG son (${}^{-}\text{O}_2\text{C-CH}_2\text{-OPO}_3{}^{-2}$) en primer lugar, y (${}^{-}\text{O}_2\text{C-CH}_2\text{-OPO}_3\text{H}^{-}$) en menor grado [Campbell, I. D., *et al.*, 1978; Alahuhta, M. & Wierenga, R. 2010]. Por lo tanto, la unión de 2PG a la ScTIM a pH 7.4, a diferencia de PGH, involucra dos intercambios de protones previos (Fig. 6.1): i) de la solución amortiguadora ($\text{AmortiguadorH}^+/\text{Amortiguador}$) al grupo carboxilo del 2PG^{-3} ($\text{AmortiguadorH}^+ + \text{B} \rightarrow \text{Amortiguador} + \text{C}$) y ii) del fosfato $-\text{OH}$ del fosfato a la solución amortiguadora para regenerar el 2PG^{-3} ($\text{A} + \text{Amortiguador} \rightarrow \text{B} + \text{AmortiguadorH}^+$).

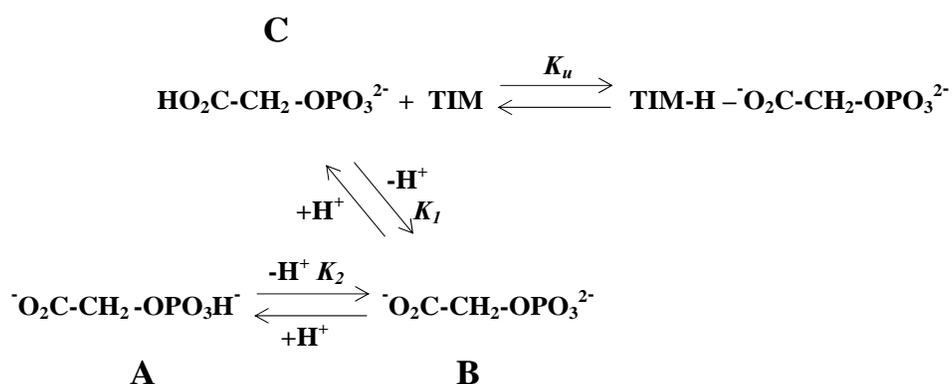


Figura. 6.1. Equilibrios de protonación/desprotonación implicados en la unión de 2-fosfoglicolato (2PG) a la ScTIM a pH 7.4

De acuerdo con los equilibrios representados en la Fig. 6.1, la constante de unión intrínseca ($K_{u,intr}$) para la formación del complejo ScTIM-2PG sólo debe involucrar la concentración de la forma dianiónica de 2PG, con su grupo carboxilo protonado (especie marcada como C en la Fig. 6.1):

$$K_{u,intr} = \frac{[TIM - 2PG]}{[TIM][C]} \quad \text{Ec. (6.1)}$$

Sin embargo, considerando los tres equilibrios que se muestran en la Fig. 6.1, se puede deducir que la constante de unión medida experimentalmente (K_u), que se obtiene considerando la concentración total de inhibidor ($[A] + [B] + [C]$), se relaciona con K_u y las constantes de ionización de K_1 y K_2 a través de la expresión (ver Apéndice G).

$$K_u = K_{u,intr} \frac{K_2[H^+]}{K_1[H^+] + K_2 + [K_1 + [H^+]]} \quad \text{Ec. (6.2)}$$

Este análisis implica que las funciones termodinámicas obtenidas y reportadas en este trabajo para la unión de 2PG a ScTIM, deben ser considerados como parámetros aparentes.

Por otro lado, la similitud de los calores de unión, independientemente de la entalpía de ionización del amortiguador utilizado, sugiere que no existen efectos de protonación acoplados [Baker, N.A., *et al.*, 2001]. Tal como se ha discutido antes, este parece ser el caso para el complejo ScTIM-PGH. Sin embargo, la unión de 2PG a la ScTIM involucra dos intercambios de protones previos. Esta aparente discrepancia puede aclararse notando que, como se ilustra en la Fig. 6.1, la conversión de un mol de A a un mol de C no produce un cambio neto de protonación en el amortiguador, esto es, el protón capturado por B del amortiguador es compensado por el protón liberado por A hacia el medio. Así no habría efectos calóricos asociados con esta conversión ($A \rightarrow B \rightarrow C$).

El equilibrio de disociación de los ácidos se ve afectado por la fuerza iónica del medio [MacInnes D. A. y Shedlovsky, T. 1932], al igual que las reacciones de asociación de moléculas con carga eléctrica como es la unión de 2PG y PGH a la ScTIM. Por lo tanto, la unión de 2PG podría estar más afectada por la fuerza iónica debido a que existen otros dos equilibrios acoplados además de la K_u , que involucran especies cargadas cuyas constantes (K_1 , K_2) se verán afectados por el NaCl.

Si se considera que la unión de los inhibidores aniónicos a ScTIM involucra la liberación de aniones (Cl^-) al solvente, puede aplicarse la teoría de interacciones proteína-poli-electrolito [Manning, G. S.

1978; Lohman, T. M., *et al.*, 1980] y utilizar la siguiente ecuación que relaciona la variación de K_u con la concentración de NaCl:

$$\log K_u = \log (K_{no-elect}) - Z\psi \log[\text{NaCl}] \quad \text{Ec.(6.3)}$$

Donde el primer término del lado derecho proviene de las interacciones no electrostáticas y el segundo término resulta de los efectos electrostáticos asociados con la liberación de contraiones y de apantallamiento mientras que $Z\psi$ representa una medida sobre el número de contraiones liberados debido a la unión del inhibidor. Cuando la concentración de sal llega a 1.0 M, el término electrostático desaparece y $-RT\ln K_u$ representa la parte no electrostática de la energía de Gibbs de la formación del complejo: $-RT\ln K_{u,no-ele}$, que puede ser evaluado a partir del ajuste lineal que se muestra en la Fig. 5.4. Entonces es posible cuantificar la contribución electrostática a la afinidad:

$$\Delta G_u = \Delta G_{u,elec} + \Delta G_{u,no-ele} \quad \text{Ec. (6.4)}$$

De las regresiones lineales mostradas en la Fig. 5.4, se obtuvieron los valores del $\Delta G_{u,no-elec}$ de -17.4 kJ/mol y -21.9 kJ/mol para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH, respectivamente. Entonces, utilizando el promedio de los valores de ΔG_u de la Tabla 5.3, a $I = 0.06$ M, se calculó que a 25° C, el $\Delta G_{u,elec}$ representa el 36% y el 26% de la energía libre de unión para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH, respectivamente.

6.2.1. El ΔH_u , ΔS_u y ΔG_u para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH a fuerza iónica de 0.06 M.

Como se puede observar en la Fig 6.2, la contribución entálpica ΔH_u dirige la unión en ambos procesos de la ScTIM con sus inhibidores. Sin embargo, el ΔH_u del PGH es más favorable respecto a 2PG por -20 kJ mol⁻¹ a 25 ° C. Esta diferencia energética podría explicarse a partir de los resultados obtenidos del análisis de contactos proteína–ligando (LPC) de ambos complejos: PGH establece un 14% más de contactos atómicos con la ScTIM y hasta 5 puentes de hidrógeno más en el sitio catalítico de la enzima, en comparación con 2PG (ver Tabla 5.4). La contribución entrópica ΔS_u no favorece a la unión de los complejos y es menos favorable para PGH. El término de la energía libre de unión ΔG_u para ambos complejos es favorable, siendo más favorable para PGH.

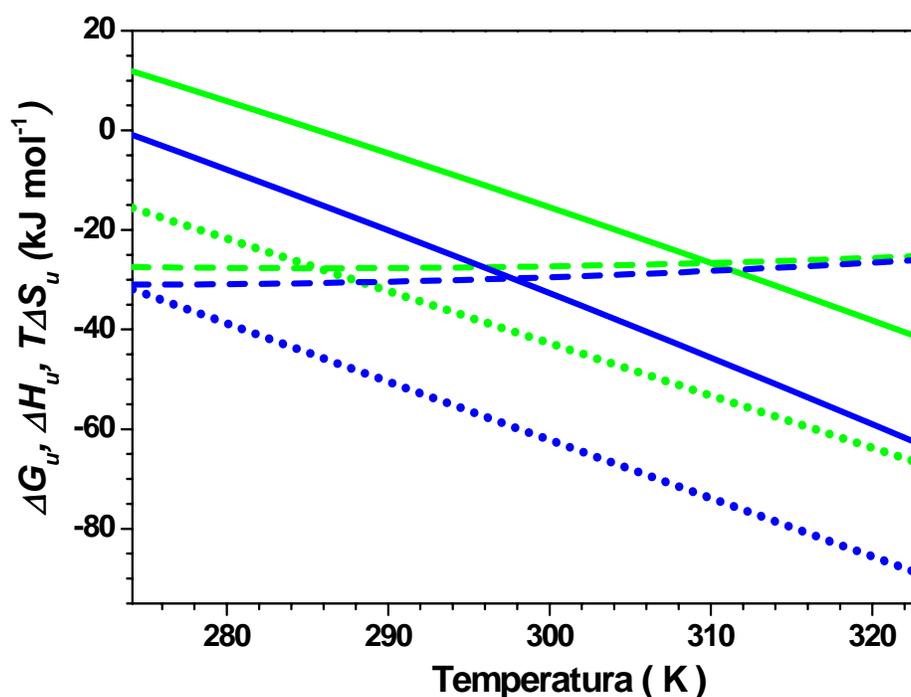


Figura 6.2. Variación térmica de los parámetros termodinámicos de unión para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH. Estos valores fueron construidos con los valores promedios reportados en la Tabla 5.3 para ambos complejos en TE 50/5, pH 7.4, fuerza iónica 0.06 M: ΔG_u (líneas en trazos), ΔH_u (líneas punteadas), $T\Delta S_u$ (líneas continuas).

6.2.2 El ΔH_u , ΔS_u y ΔG_u para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH bajo el efecto de la fuerza iónica.

Al aumentar la fuerza iónica, la K_u disminuye y el ΔG_u se hace menos favorable a la unión. A 25 °C, la K_u para el complejo disminuyó 10 veces a 0.3 M de NaCl respecto a un medio sin NaCl y en el caso de ScTIM-PGH la K_u disminuyó 7 veces. La disminución de afinidad se debe a un ΔH_u menos favorable (Fig. 6.3). Esta disminución entálpica con concentraciones iónicas crecientes puede explicarse por un efecto de apantallamiento de Debye de los iones disueltos. 2PG reduce su entalpía unión a la ScTIM de forma más abrupta al aumentar la concentración de sal respecto a PGH. Aumentando la fuerza iónica de 0.06 a 0.36 (0.66) a 25 °C, el ΔH_u por 2PG se reduce en alrededor de 28% (45%), mientras que para PGH se reduce en 14% (22%) (Tabla 5.3). Estas diferencias indican que la entalpía de unión para PGH posee otras contribuciones importantes, además de las interacciones carga-carga que no se ven muy afectadas por la concentración de sal. Probablemente se trate de los puentes de hidrógeno (ver Apéndice E). En lo que respecta al ΔS_u , siempre fue desfavorable para ambos inhibidores y menos favorable para PGH. Concentraciones más altas de sal producen un ΔS_u menos desfavorable.

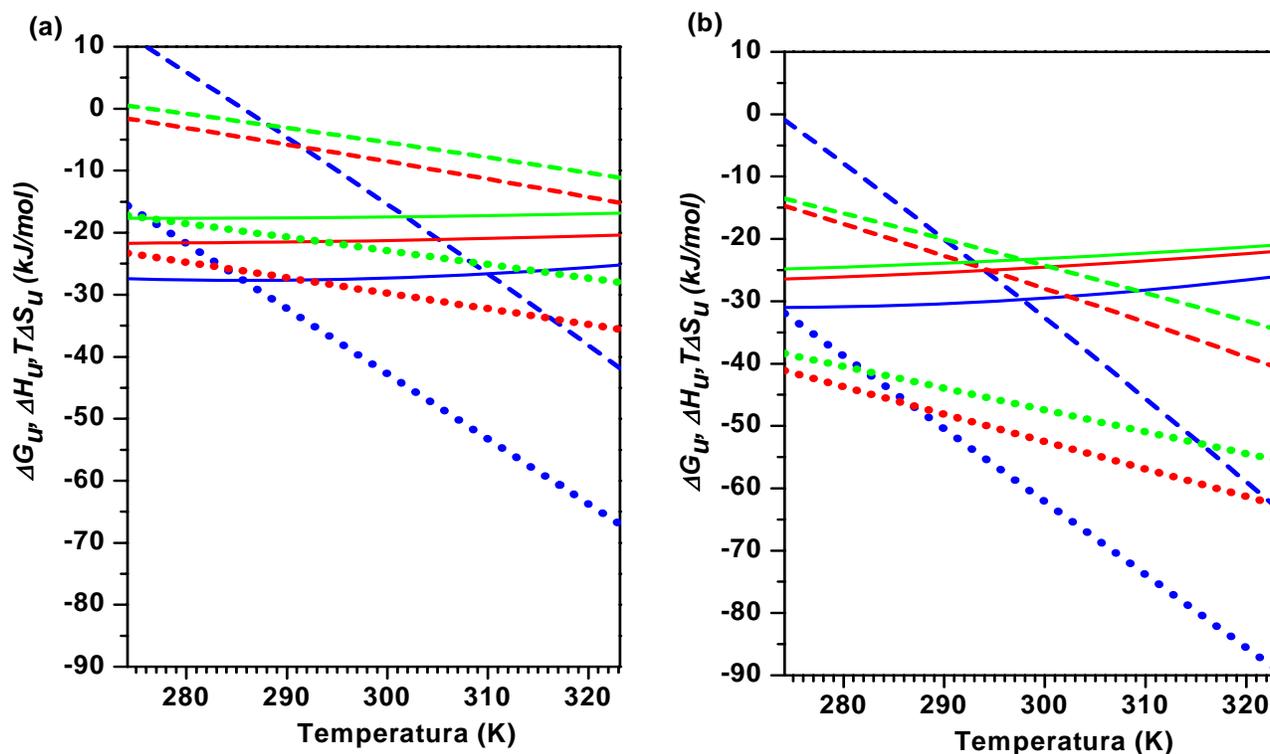


Figura 6.3. Efecto de la temperatura y fuerza iónica en los parámetros termodinámicos de unión para (a) ScTIM-2PG y (b) ScTIM-PGH. ΔG_u (líneas continuas), ΔH_u (líneas punteadas), $T\Delta S_u$ (líneas en trazos). Estas funciones fueron construidas con los valores promedios reportados en la Tabla 5.3 para fuerzas iónicas de: 0.06 (azul), 0.36 (rojo) y 0.66 (verde).

6.3. Termodinámica estructural.

6.3.1. Entalpía de unión (ΔH_u)

De acuerdo con los modelos de área superficial que correlacionan ΔH_u con ΔASA , el ocultamiento de superficie polar es exotérmica mientras que el de no polar es endotérmica (ver Ec. 1.4 y Tabla 4.1), por lo tanto, ocultar mayores áreas polares y menores áreas no polares produce entalpías de unión más favorables. Tomando en cuenta que PGH tiene un átomo polar (N) más que 2PG y sabiendo que la unión de ScTIM con PGH es más exotérmica que con 2PG en todas las condiciones experimentales (Tabla 5.3), se esperaba que el ΔASA polar fuera más grande para el complejo ScTIM-PGH respecto al complejo ScTIM-2PG. Sin embargo, se observó todo lo contrario para los cálculos de ΔASA realizados con la estructura abierta de ScTIM como conformación de referencia para la enzima sin inhibidor (ver Tabla 5.4, C3 y C4). Esta inconsistencia sugiere que los cálculos de ΔASA que

involucran las estructuras 1YPI, 2YPI y 7TIM, no son confiables para este propósito, por lo tanto no se consideran los resultados obtenidos con estos cálculos en lo sucesivo. Cabe notar que aún cuando el medio de cristalización reportado para 7TIM fue el mismo que para 1YPI (Tris 50 mM, pH 7.5), en el caso de 2YPI fue ligeramente diferente (Tris 200 mM, pH 6.8), lo que pudo ocasionar algunos cambios en el empaquetamiento de los cristales.

Por otra parte, los cálculos realizados considerando una unión de “cuerpo rígido” (C1 y C2), fueron consistentes en este sentido: el área polar oculta aumentó de ScTIM-2PG a ScTIM-PGH y el área no polar oculta disminuyó (C2) o al menos aumentó en una proporción similar al área polar oculta (C1), ver Tabla 5.4. Por lo tanto, para los cálculos C1 y C2, los tres modelos predijeron valores de ΔH_u más exotérmicos para ScTIM-PGH que para ScTIM-2PG (Tabla 5.5). El modelo P-L de Luque y Freire (2002) toma en cuenta las aguas estructurales dentro de 7 Å alrededor del ligando, para cuantificar el área superficial accesible de modo que el cálculo más adecuado para este modelo es C1. Por el contrario, los modelos P-P y P-C no consideran las moléculas de agua estructurales en los cálculos de ASA [García-Hernández, E. y Hernández-Arana, A., 1999], por lo que C2 es más apropiado para estos métodos.

La existencia de diferentes modelos de área superficial refleja la necesidad de desarrollar nuevos parámetros para sistemas que contienen grupos funcionales que o bien no están o están subrepresentados en las base de datos disponibles. En los sistemas Proteína-Carbohidrato la contribución de las áreas polares resultó más ponderada que en otros modelos, lo cual parece deberse a un mayor número de puentes de hidrógenos en la interfase de los complejos Proteína-Carbohidrato en comparación con las interfases Proteína-Proteína [García-Hernández, E. *et al.*, 2000]. En este trabajo, el modelo Proteína-Carbohidrato es el que mejor correlaciona con los valores experimentales de ΔH_u (a 25 ° C y fuerza iónica 0,06): -48,0 kJ mol⁻¹ para ScTIM-2PG ($\Delta H_{u,exp} = -40,8$ kJ mol⁻¹) y -55.1 kJ mol⁻¹ para ScTIM-PGH ($\Delta H_{u,exp} = -60,0$ kJ mol⁻¹). Los otros dos modelos, Proteína-Proteína y Proteína-Ligando, subestiman el ΔH_u y sus predicciones son similares a los valores experimentales obtenidos a fuerzas iónicas altas. En conjunto, estos resultados sugieren que en el contexto de los modelos de área superficial, la unión de 2PG y PGH a la ScTIM se describe mejor por modelos que involucran interacciones polares intensificadas, como los complejos Proteína-Carbohidrato, y que a mayor fuerza iónica, donde las interacciones carga-carga disminuyen, la entalpía de unión se describe mejor por modelos provenientes de interacciones proteína-proteína.

6.3.2. El cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p).

Respecto a los cálculos del ΔC_p , de los cinco modelos de área superficial empleados, sólo con el que se basa en los complejos Proteína-Carbohidrato de García-Hernández, E. *et al.*, 2003 se obtuvieron valores comparables a los determinados experimentalmente. Sin embargo, estos valores (cerca de -0.2 kJ mol^{-1}), son apenas similares a los medidos a altas fuerzas iónicas y no en ausencia de NaCl donde el $\Delta C_{p_{exp}}$ fue alrededor de -1.1 kJ mol^{-1} para ambos complejos. Como se ha demostrado para otros complejos, un ΔC_p muy negativo podría explicarse por las moléculas de agua secuestradas en la interfase cuando el inhibidor se une a la proteína [Guinto E. R. y Di Cera, E., 1996; Holdgate, G.A., et al., 1997; Katragadda, M., et al., 2004; Bergqvist, S., et al., 2004]. Se han localizado moléculas de agua en el sitio de unión del complejo TIM-PGH por cristalografía de rayos X [Davenport, R.C., et al., 1991] e inclusive se ha evaluado la influencia de algunas aguas sobre la actividad enzimática de un conjunto de TIMs [Zhang, Z., et al., 1999]. Además, en la estructura cristalográfica del complejo de TIM-2PG de *Leishmania mexicana* a 0.83 \AA de resolución, varias moléculas de agua se encontraron en el sitio de unión [Kursula, I. y Wierenga, R. K., 2003]. En ambos complejos se observa que el ΔC_p a mayor fuerza iónica se hace menos negativo, lo cual es compatible con la liberación de algunas de estas moléculas de agua al medio circundante [Li, Z. & Lazaridis, T., 2007] ya que la disminución de la actividad del solvente puede inducir esta deshidratación.

A pesar de tener estructuras muy similares y poseen la misma carga neta, la contribución de las interacciones electrostáticas a la afinidad de 2PG y PGH a ScTIM es muy diferente. Probablemente un análisis a nivel de estructura electrónica de los sitios de unión de estos sistemas sea necesario para determinar el origen de estas diferencias.

Enfoque computacional

6.4. Energía libre de unión (ΔG_u).

Los valores de energía libre de unión (ΔG_u) obtenidos a través de cálculos teóricos son mucho más favorables que los obtenidos experimentalmente (ver Apéndice F apartado F.1 y F.2). Sin embargo, la tendencia a hacerse menos favorable al aumentar la fuerza iónica del medio va en el mismo sentido que lo observado experimentalmente para estos complejos ScTIM-inhibidor (Tabla 5.3). Esta diferencia puede deberse en parte a la pérdida de entropía traslacional (ΔS_t) y rotacional (ΔS_r) asociada al proceso de unión, la cual no fue considerada en estos cálculos. Asimismo, para el caso del complejo TIM-2PG, al corregir el valor de $K_{u,intr}$ de acuerdo con la Ec. 6.2, se obtuvo un $\Delta G_{u,intr}$ de -41.05 kJ/mol , el cual es

más negativo que el obtenido experimentalmente, pero aún muy diferente al calculado teóricamente $\Delta G_u = -111.24 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Por otro lado, si se considerarán los cambios entrópicos asociados al proceso de unión se puede expresar como la suma de cuatro contribuciones:

$$\Delta S_u = \Delta S_{\text{pol}} + \Delta S_{\text{apol}} + \Delta S_{\text{rot}} + \Delta S_t \quad \text{Ec. (6.5)}$$

Los primeros dos términos de la Ec. 6.5 se refieren a los cambios entrópicos debido a la desolvatación de las superficies polares y no polares que se ocultan en la unión (ΔS_{pol} y ΔS_{apol}). El término de entropía rotacional (ΔS_{rot}) se origina de enlaces simples rotables que quedan congelados cuando se forma el complejo. Finalmente, la entropía traslacional (ΔS_t), resulta de la restricción en movimientos traslacionales y rotacionales de las moléculas cuando se forma el complejo.

Para tener un cálculo aproximado de las contribuciones entrópicas no contempladas en el cálculo teórico de ΔG_u , ($-T\Delta S_{\text{rot}} - T\Delta S_t$), se realizaron las siguientes consideraciones. Para la contribución del $T\Delta S_{\text{rot}}$, Doig y Sternberg calcularon un promedio de la variación de entropía del número de rotámeros para cada tipo de cadena lateral de los aminoácidos [Doig, A.J. y Sternberg, M.J., 1995]. Debido a esto se estimó la contribución de enlaces rotables congelados entre ScTIM-inhibidor en la unión con base a los resultados que se obtuvieron en el análisis de contactos atómicos por LPC, obteniendo un $T\Delta S_{\text{rot}} = -9.15 \text{ kJ mol}^{-1}$. Para la pérdida de entropía de seis enlaces rotables para el 2PG se obtuvo un valor de -11 kJ mol^{-1} , ya que el valor por enlace rotable es $1.53 \text{ cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ [García-Hernández, E. y Hernández-Arana, A., 1999]. Así mismo el valor de $T\Delta S_t = -10.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ se tomó de García-Hernández, E. y Hernández-Arana, A. 1999 basado en el cálculo de Proteína-Carbohidrato. Finalmente, al ΔG_u teórico se le restaron los valores aproximados de $T\Delta S_{\text{rot}}$ y $T\Delta S_t$ y esto permitió obtener un valor de -79 kJ mol^{-1} , el cual se acerca al $\Delta G_{u,\text{intr}}$ a pesar de ser un cálculo “sobrestimado” por las consideraciones realizadas.

Por otro lado, el poder visualizar el potencial electrostático de la ScTIM en su forma libre y en su forma acomplejada permite identificar el efecto del ambiente de cargas en el sitio activo, como se observó en la Fig. 5.12. La carga en el sitio activo es positiva por la Lys12 principalmente por lo que el potencial se representa de color azul, cuando 2PG o PGH se unen a la ScTIM el potencial electrostático en el sitio activo se observó de color rojo, lo que implica una influencia de la carga negativa de estos inhibidores fosforilados. La dependencia salina en el potencial electrostático permitió

observar como los contactos electrostáticos se fueron apagando o debilitando al aumentar la fuerza iónica, lo que correlaciona con lo que sucede experimentalmente para este sistema por un efecto de apantallamiento de los iones en el medio.

Respecto al apagamiento de las cargas de algunos átomos de los residuos catalíticos y algunos átomos de los inhibidores, se observó el efecto de la contribución electrostática en la energía de unión respecto a la contribución no polar (ver Apéndice F apartado F.3.). El ΔG_u en ambos complejos se hizo desfavorable al apagar cargas de los átomos de: Lys12, Glu165 de la ScTIM y las cargas del grupo fosfato en los inhibidores, por lo que las interacciones carga-carga que se establecen entre la proteína y los inhibidores son indispensables para la unión.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1. Conclusiones.

Las interacciones electrostáticas contribuyen favorable y significativamente a mantener la estructura nativa de la ScTIM. El incremento de la fuerza iónica obstaculiza estas interacciones favorables y produce un efecto desestabilizador. El efecto que tienen en la ScTIM los iones utilizados como electrolito (Na^+ y Cl^-) para modificar la fuerza iónica de la solución está asociado a un efecto de apantallamiento y no a una unión específica con la enzima.

La unión de 2PG y PGH a la ScTIM está entálpicamente dirigida. A 25 °C, ΔH_u para PGH es más exotérmico que para 2PG por -20 kJ mol^{-1} , diferencia que podría explicarse por los cinco puentes de hidrógeno adicionales que establece PGH con la ScTIM.

Al aumentar la fuerza iónica, K_u , ΔG_u y ΔH_u , se hacen menos favorables y ΔS_u menos desfavorable. ΔH_u para ScTIM-2PG disminuyó un 45% al aumentar una fuerza iónica de 0.06 a 0.66 M, mientras que para ScTIM-PGH disminuyó un 22% a 25 °C. La contribución electrostática al ΔG_u es del 36% para la asociación con 2PG y del 26% con PGH a 25 °C con fuerza iónica de 0.06 M.

Las entalpías de unión de la ScTIM con ambos inhibidores (ΔH_u) fueron las mismas usando dos amortiguadores con $\Delta H_{\text{ionización}}$ muy diferentes (casi en relación 3:1, trietanolamina:PIPES), por lo que se descartaron cambios netos de protonación en el medio regulador acoplados a la asociación.

Las funciones termodinámicas de unión para el complejo ScTIM-2PG cambiaron más, por efecto de la fuerza iónica, en comparación con los valores obtenidos para el complejo ScTIM-PGH. Esta dependencia es consistente con los equilibrios acoplados de protonación aunque compensados con el amortiguador, que produce la especie dianiónica de 2PG que se unen a la ScTIM, lo cual no sucede con PGH.

En cuanto a los modelos de área superficial, el modelo Proteína-Carbohidrato es el que reproduce mejor los valores experimentales de ΔH_u a baja fuerza iónica.

La unión ScTIM-inhibidor está acompañada por un ΔC_p el cual se hace menos negativo al aumentar la fuerza iónica. Ninguno de los modelos de área superficial pudo reproducir los valores experimentales a baja fuerza iónica. El gran ΔC_p negativo de ambos procesos de unión podría explicarse por las moléculas de agua secuestrada en la interfase cuando los inhibidores se unen a la proteína.

Los términos de energía libre de unión (ΔG_u) teórico y experimental no concordaron de manera exacta, sin embargo, en ambos tipos de evaluación existe una tendencia de unión desfavorable en la formación del complejo ScTIM-inhibidor al aumentar la fuerza iónica del medio.

El ΔG_u calculado se hizo desfavorable al apagar las cargas eléctricas de la Lys12, Glu165 de la ScTIM o las cargas del grupo fosfato de los inhibidores, lo cual sugiere que son indispensables para la unión.

7.2. *Perspectivas.*

Caracterizar la energética de la asociación de la enzima ScTIM con los inhibidores fosforilados 2PG y PGH a diferentes valores de pH determinando las funciones termodinámicas de la unión: $K_u/\Delta G_u$, ΔH_u , ΔS_u y ΔC_p a través de titulaciones fluorimétricas y calorimétricas.

Construir modelos de sitio de unión de la enzima con 2PG y PGH para estudiarlos a nivel de estructura electrónica y tratar de entender mejor las diferencias en su energética de unión.

Determinar las moléculas de agua que se encuentran en la interfase ScTIM-inhibidor a través de experimentos de estrés osmótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alahuhta, M. & Wierenga, R.K. (2010). Atomic resolution crystallography of a complex of triosephosphate isomerase with a reaction-intermediate analog: New insight in the proton transfer reaction mechanism. *Proteins* **78**, 1878–1888.
- Ames, B. N. (1966). Assay of inorganic phosphates, total phosphate and phosphatase. *Methods Enzymol.* **8**, 115-118.
- Baker, N.A., Sept D., Joseph S., Holst M. J. & McCammon J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10037-10041.
- Baker, N. A. (2004). Poisson-Boltzmann methods for biomolecular electrostatics. *Methods Enzymol.* **383**, 94-118.
- Bergqvist, S., Williams, M. A., O'Brien, R. & Ladbury, J. E. (2004). Heat capacity effects of water molecules and ions at a protein-DNA interface. *J. Mol. Biol.*, **336**, 829-842.
- Bjelić, S. & Jelesarov, I. (2008). A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry. *J. Mol. Recogn.* **21**, 289–311.
- Blacklow, S.C., Raines, R.T., Lim, W.A., Zamore, P.D. & Knowles JR. (1988). Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: Analysis of triose phosphate equilibria in aqueous solution by ³¹P NMR. *Biochemistry* **27**, 1158-1167.
- Campbell, I. D., Jones, R. B., Kiener, P. A., Richards, E., Waley, S. G. & Wolfenden, R. (1978). The form of 2-phosphoglycollic acid bound by triosephosphate isomerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 347-352.
- Campbell, I. D., Jones, R. B., Kiener, P.A. & Waley, S.G. (1979). Enzyme-substrate and enzyme-inhibitor complexes of triose phosphate isomerase studied by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Biochem. J.* **179**, 607-621.
- Casal, J.I., Ahern, T.J., Davenport, R.C., Petsko, G.A. & Klibanov, A.M. (1987). Subunit interface of triosephosphate isomerase: site-directed mutagenesis and characterization of the altered enzyme. *Biochemistry* **26**, 1258-1264.
- Casteleijn, M.G., Alahuhta, M., Groebel, K., El-Sayed, I., Augustyns, K., Lambeir, A.M., Neubauer, P. & Wierenga, R.K. (2006). Functional role of the conserved active site proline of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **45**, 15483-15494.
- Collins, K.D. (1974). An activated intermediate analogue. The use of phosphoglycolohydroxamate as a stable analogue of a transiently occurring dihydroxyacetone phosphate-derived enolate in enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.* **249**, 136-142.
- Cooper, A. (2005). Heat capacity effects in protein folding and ligand binding: a re-evaluation of the role of water in biomolecular thermodynamics. *Biophys. Chem.* **115**, 89– 97.

- Chavelas, E. A., Zubillaga, R. A., Pulido, N. O. & García-Hernández, E. (2006). Multithermal titration calorimetry: a rapid method to determine binding heat capacities. *Biophys. Chem.* **120**, 10 – 14.
- Cui, Q. & Karplus, M. (2001). Triosephosphate isomerase: a theoretical comparison of alternative pathways. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2284-2290
- Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A. & Ringe, D. (1991). Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolhydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry*, **30**, 5821-5826.
- Dell'Orco, D., Xue, W., Thulin, E. & Linse, S. (2005). Electrostatic contributions to the Kinetics and Thermodynamics of Protein Assembly. *Biophysical Journal*. **88**, 1991-2002
- Dill, K.A. & Bromberg, S. (2003). Molecular Driving Forces: Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology. *Garland Science. New York, U.S.A.*
- Díaz Salazar Alma Jessica (2005). Estudio del efecto cinético producido por el reemplazo de una cisteína evolutivamente conservada en la Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei*. Tesis de Maestría. Facultad de estudios superiores Zaragoza.UNAM.
- Doig, A.J. & Sternberg, M.J.(1995). Side-chain conformational entropy in protein folding. *Protein Sci.* **4**, 2247-2251.
- Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A. & Baker, N.A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **1**, W665-W667.
- Dong, F., Olsen, B. & Baker, N. A. (2008). Computational methods for biomolecular electrostatics. *Methods Cell Biol.* **84**, 843-870.
- Donnini, S., Villa, A., Groenhof, G., Mark, A.E., Wierenga, R.K. & Juffer, A.H. (2009). Inclusion of ionization states of ligands in affinity calculations. *Proteins.* **76**,138-150.
- Fedosova, N. U., Champeil, P. & Esmann, M. (2002). Nucleotide Binding to Na,K-ATPase: The Role of Electrostatic Interactions. *Biochemistry*, **41**,1267-1273.
- Freire, E. (2008). Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? *Drug Discov Today.* **13**, 869-874.
- Friedman, R.A. & Honing, B. (1995). A free energy analysis of nucleic acid base stacking in aqueous solution. *Biophys.* **69**, 1528-1535.
- Fukada, H. & Takahashi, K. (1998). Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **33**, 159–166.
- Gallagher, K. & Sharp, K. (1998). Electrostatic contributions to heat capacity changes of DNA–ligand binding. *Biophys. J.* **75**, 769-776.

- García-Hernández, E. & Hernández-Arana, A. (1999). Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: comparison with protein-folding energetics. *Protein Sci.* **8**, 1075–1086.
- García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., Rodríguez-Romero, A. & Hernández-Arana (2000). A stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology*, **10**, 993-1000.
- García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., Chavelas-Adame, E. A., Vázquez-Contreras, E., Rojo-Domínguez, A. & Costas, M. (2003). Structural energetics of protein-carbohydrate interactions: insights derived from the study of lysozyme binding to its natural saccharide inhibitors. *Protein Sci.* **12**, 135–142.
- Gómez, J., Hilser, V.J., Xie, D. & Freire, E. (1995). The heat capacity of proteins. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **22**, 404– 412.
- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A. & Pérez-Montfort, R. (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol.* **2**, 847-855
- González-Mondragón, E. Zubillaga, R. A., Saavedra, E., Chánez-Cárdenas, M. E., Pérez-Montfort, R. & Hernández-Arana, A. (2004). Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry*, **43**, 3255-3263.
- González-Mondragón, E.G. (2004). Papel del residuo conservado Cys126 en la catálisis y estabilidad de la Triosafosfato Isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral. . Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México D.F
- González-Mondragón, E., Zubillaga, R. A. & Hernández-Arana, A. (2007). Effect of a specific inhibitor on the unfolding and refolding kinetics of dimeric triosephosphate isomerase: establishing the dimeric and similarly structured nature of the main transition states on the forward and backward reactions. *Biophys. Chem.* **125**, 172–178.
- Goto, Y. & Fink, A. L. (1990). Conformational states of beta-lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *J. Mol. Biol.* **28**, 945–952.
- Guallar, V., Jacobson, M., McDermott, A. & Friesner, R.A. (2004). Computational modeling of the catalytic reaction in triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **337**, 227-239
- Guinto E. R. & Di Cera, E. (1996). Large heat capacity change in a protein-monovalent cation interaction. *Biochemistry*, **35**, 8800-8804.
- Harris, T.K., Cole, R.N., Comer, F.I. & Mildvan, A.S. (1998). Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **37**, 16828-16838.
- Hartman, F. C., LaMuraglia, G. M., Tomozawa, Y. & Wolfenden, R. (1975). The influence of pH on the interactions of inhibitors with triosephosphate isomerase and determination of the pKa of the active-site carboxyl group. *Biochemistry*, **14**, 5274-5279.

- Herlihy, J. M., Maister, S. G., Albery, W. J. & Knowles, J. R. (1976). Energetics of Triosephosphate Isomerase: The Fate of the 1(R)-3H Label of Tritiated Dihydroxyacetone Phosphate in the Isomerase Reaction. *Biochemistry* **15**, 5601-5607.
- Holdgate, G.A, Tunnicliffe, A., Ward, W.H., Weston, S.A., Rosenbrock, G., Barth, P.T., Taylor, I.W., Pauptit, R. A. & Timms, D. (1997). The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry*, **36**, 9663-9673.
- Honig, B. & Nicholls, A. (1995). Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science*, **268**, 1144-1149.
- Horn, J.R., Russell, D., Lewis, E.A. & Murphy, K.P.(2001). Van't Hoff and calorimetric enthalpies from isothermal titration calorimetry: are there significant discrepancies?. *Biochemistry*. 40, 1774-1778.
- Hubbard, S. J. & Thornton, J. M. (1993). NACCESS. Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College, London.
- Janin, J. (1997). Ångströms and calories. *Structure* **5**, 473-479.
- Joseph-McCarthy, D., Lolis, E., Komives, E. A. & Petsko, G. A. (1994). Crystal structure of the K12M/G15A triosephosphate isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site. *Biochemistry*, **33**, 2815-2823.
- Katragadda, M., Morikis, D. & Lambris, J. D. (2004). Thermodynamic studies on the interaction of the third complement component and its inhibitor, compstatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 54987-54995.
- Knowles, J.R. & Albery, W.J. (1977). Perfection in enzyme catalysis: The energetics of triosephosphate isomerase. *Acc. Chem. Res.* **10**, 105-111.
- Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, **350**, 121-124.
- Kursula, I., Partanen, S., Lambeir, A.M., Antonov, D.M., Augustyns, K. & Wierenga, R.K. (2001). Structural determinants for ligand binding and catalysis of triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem.* **268**, 5189-5196.
- Kursula, I. & Wierenga, R. K. (2003). Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **278**, 9544-9551.
- Kyte, J. (1995). *Structure in Protein Chemistry*. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Lambeir, A. M., Opperdoes, F. R. & Wierenga, R. K. (1987). Kinetic properties of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* **168**, 69-74.

- Lee, B. & Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* **55**, 379–400.
- Li, H., Robertson, A. D. & Jensen J. H. (2005). Very fast empirical prediction and interpretation of protein pKa values. *Proteins*, **61**, 704-721.
- Li, Z. & Lazaridis, T. (2007). Water at biomolecular binding interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 573-581.
- Lodi, P. J., Chang, L. C., Knowles, J. R. & Komives, E. A. (1994). Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of lysine-12. *Biochemistry*, **33**, 2809-2814.
- Lohman, T. M., deHaseth, P. L. & Record, M. T. (1980). Pentalysine-deoxyribonucleic acid interactions: a model for the general effects of ion concentrations on the interactions of proteins with nucleic acids. *Biochemistry*, **19**, 3522-3530.
- Lolis, E., Albert, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C. & Petsko, A.G. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **29**, 6609-6618.
- Lolis, E. & Petsko, G.A. (1990). Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5-Å resolution: implications for catalysis. *Biochemistry* **29**, 6619-6625.
- Luque, I. & Freire, E. (1998). Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods Enzymol.* **295**, 100–127.
- Luque, I. & Freire, E. (2002). Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **49**, 181–190.
- MacInnes D. A. & Shedlovsky, T. (1932). The determination of the ionization constant of acetic acid, at 25°, from conductance measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **54**, 1429-1438.
- Makhatadze, G. I. & Privalov, P. L. (1995). Energetics of protein structure. *Advan. Protein Chem.* **47**, 307–425.
- Manning, G. S. (1978). The molecular theory of electrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Quart. Rev. Biophys.* **11**, 179-246.
- Matthews, B. (2001). Hydrophobic Interactions in Proteins. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group.
- Milev, S., Bjelić, S., Georgiev, O. & Jelesarov, I. (2007). Energetics of peptide recognition by the second PDZ domain of human protein tyrosine phosphatase 1E. *Biochemistry*, **46**, 1064-1078.
- Murphy, K. P. & Freire, E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Advan. Protein Chem.* **43**, 313–361.

- Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* **4**, 2138–2148.
- Nickbarg, E. B. & Knowles, J. R. (1988) Triosephosphate Isomerase: Energetics of the Reaction Catalyzed by the Yeast Enzyme Expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **27**, 5939-5947.
- Norton, I. L. & Hartman, F.C. (1972). Haloacetyl phosphates. A comparative study of the active sites of yeast and muscle triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **11**, 4435-4441.
- Pompliano, D.L. Peyman, A. & Knowles, J.R. (1990). Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **29**,3186-3194.
- Rodríguez-Almazán, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-López, B., Gómez-Puyou, M.T., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Gómez-Puyou, A. & Torres-Larios A. (2008). Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *J. Biol. Chem.* **283**, 23254–23263.
- Rozacky, E.E., Sawyer, T.H., Barton, R.A. & Gracy, R.W. (1971). Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch Biochem Biophys.* **146**, 312-20.
- Sampson, N. S. & Knowles, J.R. (1992). Segmental movement: definition of the structural requirements for loop closure in catalysis by triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **31**, 8482-8487.
- Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R. & Wierenga, R. (1996). Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci.* **5**, 229-239.
- Sitkoff, D., Sharp, K. A. & Honig, B. (1994). Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. *J. Phys. Chem.* **98**, 1978-1988.
- Sobolev, V., Sorokine, A., Prilusky, J., Abola, E. E. & Edelman, M. (1999). Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics*, **15**, 327-332.
- Spolar, R. S. & Record, M. T. Jr (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science*, **263**, 777–784.
- Stites, W. E. (1997). Protein-protein interactions: interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis. *Chem. Rev.* **97**, 1233–1250.
- Sturtevant, J.M. (1977). Heat capacity and entropy in processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 2236– 2240.
- Téllez-Valencia, A., Avila-Ríos, S., Pérez-Montfort, R., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., López-Calahorra, F. & Gómez-Puyou, A. (2002). Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* **295**, 958-963.

- Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R. A., Mendoza-Hernández, G., Costas, M. & Fernández-Velasco, D. A. (2000). Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in Guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept. Lett.* **7**, 57-64.
- Waldron, T.T., Schift, G.L. & Murphy, K.P. (2005). The salt-dependence of a protein-ligand interaction: ion-protein binding energetics *J. Mol. Biol.* **346**, 895-905.
- Waley, S.G. (1973). Refolding of triose phosphate isomerase. *Biochem. J.* **135**, 165-175.
- Williams, J. C. & McDermott, A. E. (1995). Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated. *Biochemistry*, **34**, 8309-8319.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131– 137.
- Wolfenden, R. (1969). Transition state analogues for enzyme catalysis. *Nature* **223**, 704-705.
- Xiang, J., Jung, J. Y. & Sampson, N. S. (2004). Entropy effects on protein hinges: the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **43**, 11436-11445
- Zhang, Z., Sugio, S., Komives, E.A., Liu, K.D., Knowles, J.R., Petsko, G.A. & Ringe, D. (1994). Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 2830-287.
- Zhang, Z., Komives, E. A., Sugio, S., Blacklow, S. C., Narayana, N., Xuong, N. H., Stock, A. M., Petsko, G. A. & Ringe, D. (1999). The role of water in the catalytic efficiency of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **38**, 4389-4397.
- Zhang, Y. & Cremer, P. S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 658–663.

**APÉNDICE A. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE LA CONSTANTE DE UNIÓN
PROTEÍNA-INHIBIDOR.**

La unión de una enzima con un inhibidor ($E + I \rightleftharpoons EI$) puede describirse mediante la siguiente ecuación:

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

donde K_u es la constante de unión; $[EI]$ es la concentración del complejo enzima-inhibidor, $[E]$ es la concentración de proteína y $[I]$ es la concentración de inhibidor.

El siguiente desarrollo es válido para sistemas de interacción enzima-inhibidor donde la fluorescencia del ligando es insignificante o nula a la longitud de onda de emisión analizada.

Considerando que las intensidades de (F) son aditivas:

$$F = F_E[E] + F_{EI}[EI] \quad (\text{A.2})$$

donde F_E es la fluorescencia intrínseca de la proteína y F_{EI} es la fluorescencia del complejo enzima-inhibidor.

Si E_T es la concentración total de enzima:

$$E_T = [E] + [EI] \quad (\text{A.3})$$

Despejando $[E]$ de (A.2) y sustituyendo en (A.3), tenemos:

$$\begin{aligned} F &= F_E(E_T - [EI]) + F_{EI}[EI] \\ F &= F_E E_T - F_E[EI] + F_{EI}[EI] \end{aligned} \quad (\text{A.4})$$

Sea F_T la fluorescencia de la enzima a la concentración E_T en ausencia de inhibidor:

$$F_T = F_E + E_T \quad (\text{A.5})$$

Sustituyendo (A.5) en (A.4): $F = F_T + F_{EI}[EI] - F_E[EI]$

Dividiendo cada término entre F_T y despejando $[EI]$:

$$\begin{aligned}\frac{F}{F_T} &= 1 + \frac{F_{EI}}{F_T} [EI] - \frac{F_E}{F_T} [EI] \\ \frac{F}{F_T} - 1 &= + \left(\frac{F_{EI}}{F_T} - \frac{F_E}{F_T} \right) [EI] \\ [EI] &= \frac{\frac{F}{F_T} - 1}{\frac{F_{EI}}{F_T} - \frac{F_E}{F_T}} = \frac{\frac{F}{F_T} - 1}{\frac{F_{EI} E_T}{F_E E_T} - \frac{F_E}{F_E E_T}}\end{aligned}\quad (A.6)$$

Multiplicando (A.6) por E_T en el numerador y denominador del segundo miembro de la ecuación:

$$[EI] = \frac{E_T \left(1 - \frac{F}{F_T} \right)}{1 - \frac{F_{EI}}{F_E}} \quad (A.7)$$

En el caso de que la proteína fluoresca menos al unir el inhibidor: $\frac{F_{EI}}{F_E} < 1$ y $\frac{F}{F_T} < 1$

Denominamos al cociente $\frac{F_{EI}}{F_E} = CA$; donde CA es la constante de apagamiento.

Entonces si sustituimos CA en (A.7), tenemos:

$$[EI] = E_T \frac{1 - \frac{F}{F_T}}{1 - CA} \quad (A.8)$$

Si K_I es la constante de disociación y $K_I = 1/K_U$, entonces:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (\text{A.9})$$

$$[I] = \frac{K_I}{\frac{E_T}{[EI]} - 1}$$

De (A.8) se obtiene:

$$\frac{E_T}{[EI]} = \frac{1 - CA}{1 - \frac{F}{F_T}}$$

Si definimos $y = 1 - \frac{F}{F_T}$; llegamos a la siguiente ecuación: $[I] = \frac{K_I y}{1 - CA - y}$ (A.10)

Si redefinimos: $1 - CA = a$

$$K_I = b$$

$$E_T = c$$

Entonces $[EI] = \frac{cy}{a}$ y $[I] = \frac{by}{a - y}$

Si x es la concentración total de inhibidor, entonces:

$$x = \frac{cy}{a} - \frac{by}{a - y} \quad (\text{A.11})$$

Rearreglando la ecuación (A.11) como un polinomio de segundo grado:

$$cy^2 - ay(c + x + b) + a^2x = 0$$

Resolviendo para y :

$$y = \frac{a}{2c} \left[c + x + b - \sqrt{(c + x + b)^2 - 4cx} \right] \quad (\text{A.12})$$

Cabe señalar que únicamente el signo negativo de la ecuación cuadrática (A.12) es el que ajusta los datos de la titulación fluorimétrica (curva hiperbólica). Este desarrollo fue tomado de la Tesis de González-Mondragón Edith, 2004.

APÉNDICE B. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN.

Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)

Los experimentos que se realizaron en CTI para el complejo ScTIM-2PG y ScTIM-PGH a fuerza iónica de 0.36 y 0.66M se detallan a continuación:

Tabla B.1. Número de inyecciones programadas para la titulación de 2PG a ScTIM por CTI a dos diferentes fuerzas iónicas.

Fuerza iónica (mol L ⁻¹)	[ScTIM] mM	[2PG] mM	Volumen de la primera inyección de ajuste	Número y volumen de inyecciones consecutivas
0.36	0.22	7.2	1 × 0.5 μL	25 × 1.5 μL
0.66	0.28	14	1 × 0.3 μL	25 × 0.9 μL

Tabla B.2. Número de inyecciones programadas para la titulación de PGH a ScTIM por CTI a dos diferentes fuerzas iónicas.

Fuerza iónica (mol L ⁻¹)	[ScTIM] mM	[PGH] mM	Volumen de la primera inyección de ajuste	Número y volumen de inyecciones consecutivas
0.36	0.15	4.9	1 × 0.3 μL	25 × 0.8 μL
0.66	0.23	6.8	1 × 0.3 μL	24 × 1.4 μL

Calorimetría de Titulación Multitérmica (MTC)

Los experimentos que se realizaron en MTC para el complejo ScTIM-2PG y ScTIM-PGH a 0.3M y 0.6M de NaCl se detallan en la siguiente tabla:

Tabla B.3. Número de inyecciones programadas para la titulación de 2PG a ScTIM por MTC a dos diferentes fuerzas iónicas y diferentes segmentos de temperatura.

Fuerza iónica (mol L ⁻¹)	[ScTIM] mM	[2PG] mM	Número y volumen de inyecciones a 25°C	Número y volumen de inyecciones a 32°C	Número y volumen de inyecciones a 40°C
0.06	0.094	2.0	1 × 0.2 μL (ajuste) 6 × 0.8 μL	1 × 0.2 μL (ajuste) 7 × 1.0 μL	1 × 0.2 μL (ajuste) 4 × 1.5 μL 3 × 3.0 μL
0.36	0.17	6.0	1 × 0.5 μL (ajuste) 5 × 1.0 μL	1 × 0.5 μL (ajuste) 5 × 1.5 μL 2 × 1.8 μL	1 × 0.5 μL (ajuste) 4 × 2.2 μL 3 × 2.5 μL
0.66	0.22	11.0	1 × 0.5 μL (ajuste) 7 × 0.8 μL	1 × 0.5 μL (ajuste) 6 × 1.0 μL 2 × 1.5 μL	1 × 0.5 μL (ajuste) 5 × 2.2 μL 4 × 2.5 μL

Tabla B.4. Número de inyecciones programadas para la titulación de PGH a ScTIM por MTC a dos diferentes fuerzas iónicas y a diferentes segmentos de temperatura.

Fuerza iónica (mol L ⁻¹)	[ScTIM] mM	[PGH] mM	Número y volumen de inyecciones a 25°C	Número y volumen de inyecciones a 32°C	Número y volumen de inyecciones a 40°C
0.06	0.10	1.3	1 × 0.2 µL (ajuste) 7 × 1.5 µL	1 × 0.2 µL (ajuste) 7 × 1.8 µL	1 × 0.2 µL (ajuste) 6 × 2.2 µL
0.36	0.16	4.2	1 × 0.3 µL (ajuste) 7 × 0.75 µL	1 × 0.3 µL (ajuste) 7 × 1.3 µL	1 × 0.3 µL (ajuste) 7 × 1.6 µL
0.66	0.27	7.0	1 × 0.3 µL (ajuste) 6 × 1.0 µL	1 × 0.3 µL (ajuste) 7 × 1.3 µL	1 × 0.3 µL (ajuste) 8 × 1.6 µL

APÉNDICE C. CICLO TERMODINÁMICO DE LA ENERGÍA ELECTROSTÁTICA.

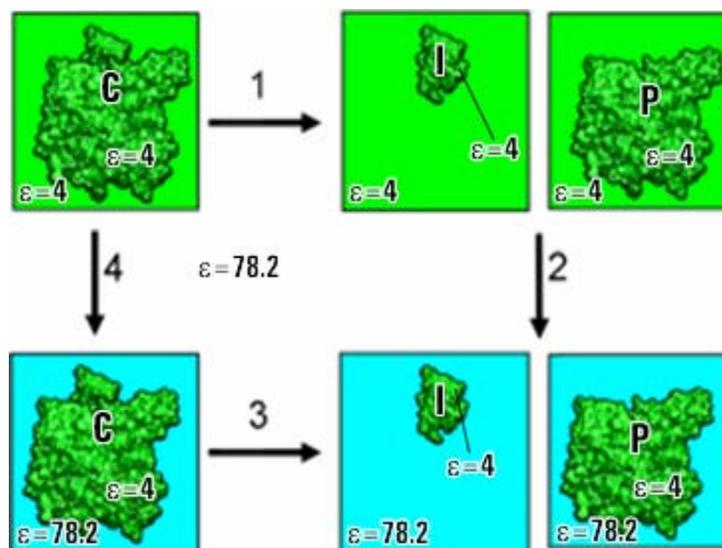


Figura C.1. Ciclo termodinámico para determinar la contribución electrostática al ΔG_u de una proteína (P) y un inhibidor (I) para formar el complejo (C) en solución acuosa por APBS. La energía electrostática está dada por: $\Delta G_{elec} = -\Delta_3 G = \Delta_4 G - \Delta_1 G - \Delta_2 G$.

La energía electrostática de unión (ΔG_{elec}) está dada por:

$$\Delta G_{elec} = -\Delta G_3 = \Delta G_4 + (-\Delta G_2) + (-\Delta G_1)$$

$$\Delta G_4 = \Delta G_{complejo(4,78)} - \Delta G_{complejo(4,4)}$$

$$-\Delta G_3 = \Delta G_{complejo(4,78)} - \Delta G_{inhibidor(4,78)} - \Delta G_{proteína(4,78)}$$

$$-\Delta G_2 = -\Delta G_{inhibidor(4,78)} - \Delta G_{proteína(4,78)} + \Delta G_{inhibidor(4,4)} + \Delta G_{proteína(4,4)}$$

$$-\Delta G_1 = \Delta G_{complejo(4,4)} - \Delta G_{inhibidor(4,4)} - \Delta G_{proteína(4,4)}$$

$$\Delta G_{elec} = -\Delta G_3 = [\Delta G_{complejo(4,78)} - \Delta G_{complejo(4,4)}] + [-\Delta G_{inhibidor(4,78)} - \Delta G_{proteína(4,78)} + \Delta G_{inhibidor(4,4)} + \Delta G_{proteína(4,4)}] + [\Delta G_{complejo(4,4)} - \Delta G_{inhibidor(4,4)} - \Delta G_{proteína(4,4)}]$$

$$\Delta G_{elec} = -\Delta G_3 = \Delta G_{complejo(4,78)} - \Delta G_{inhibidor(4,78)} - \Delta G_{proteína(4,78)}$$

El método más general para calcular la energía electrostática se establece por el componente de solvatación y el componente coulombico.

$$\Delta \Delta G_{electrostático} = \Delta \Delta G_{solvatación} + \Delta \Delta G_{coulombico}$$

Contribución electrostática de solvatación a la unión.

Los cálculos para la contribución electrostática de solvatación se debe al paso 4 y paso 2 en el ciclo termodinámico a través de:

$$\begin{aligned} \Delta\Delta G_{\text{solvatación}} &= \Delta G_4 - \Delta G_2 = \Delta G_{\text{complejo}(4,78)} - \Delta G_{\text{complejo}(4,4)} - \Delta G_{\text{inhibidor}(4,78)} - \Delta G_{\text{proteína}(4,78)} + \Delta G_{\text{inhibidor}(4,4)} \\ &= + \Delta G_{\text{proteína}(4,4)} \\ &= \Delta G_{\text{solvatación_complejo}} - \Delta G_{\text{solvatación_proteína}} - \Delta G_{\text{solvatación_inhibidor}} \end{aligned}$$

Contribución electrostática coulombica a la unión.

Los cálculos para la contribución electrostática coulombica se debe al paso 1 en el ciclo termodinámico a través de:

$$\begin{aligned} \Delta\Delta G_{\text{coul}} &= - \Delta G_1 = \Delta G_{\text{complejo}(4,4)} - \Delta G_{\text{inhibidor}(4,4)} - \Delta G_{\text{proteína}(4,4)} \\ &= \Delta G_{\text{coul_complejo}} - \Delta G_{\text{coul_inhibidor}} - \Delta G_{\text{coul_proteína}} \end{aligned}$$

APÉNDICE D. PERFILES DE DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA POR DC.

En la Fig. D.1 se muestran los perfiles de desnaturalización térmica a las diferentes concentraciones de NaCl, mismas que se indican en la figura así como la T_m de cada perfil. Estas transiciones térmicas fueron seguidas registrando los cambios de elipticidad a 220 nm, mientras que la temperatura aumentaba a razón de 2°C min^{-1} . En todos los experimentos la concentración de la ScTIM fue de 0.015 mg/mL en un amortiguador Tris 50 mM a pH de 7.4 , contenida en una celda de 1.0 cm de recorrido óptico con agitación continua.

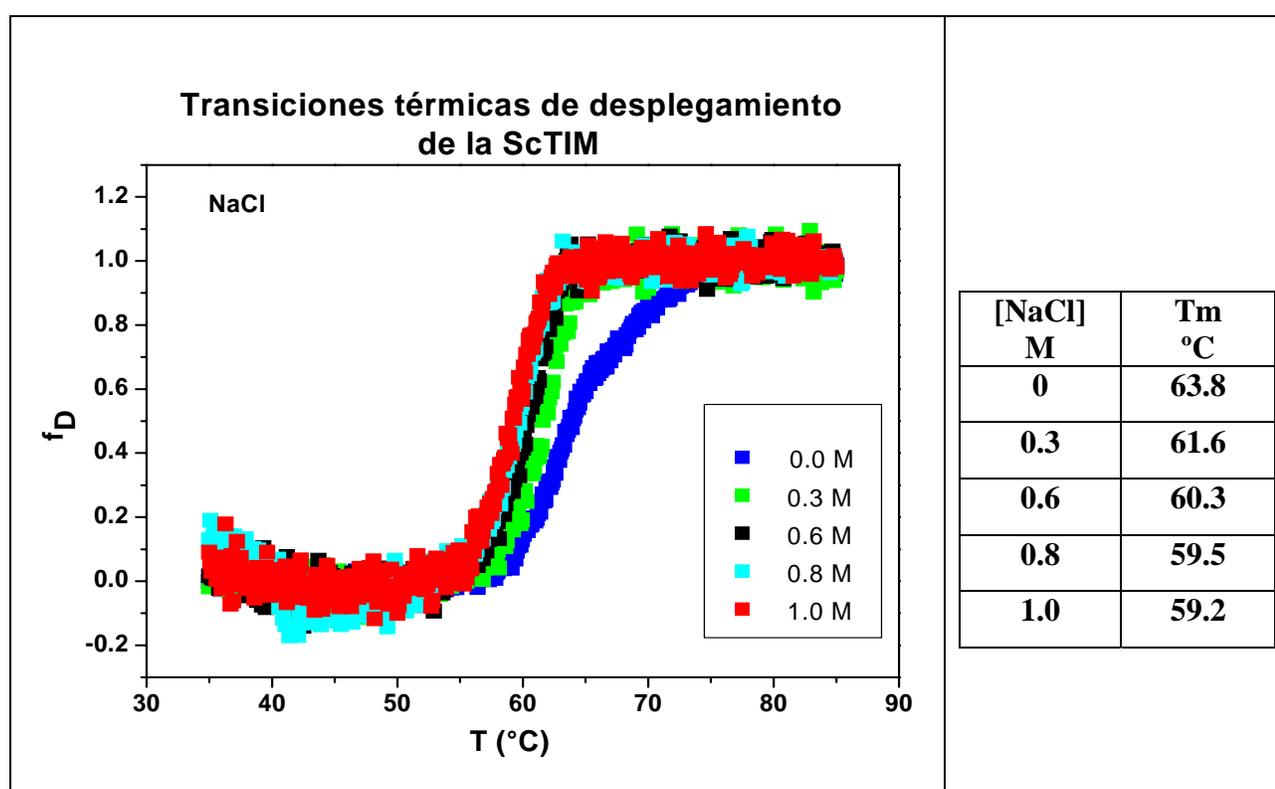


Figura D.1. Transiciones térmicas seguidas por DC a una elipticidad de 220 nm en un amortiguador Tris 50 mM a pH de 7.4 a diferentes concentraciones de NaCl mismas que se indican en la figura. En la Tabla se muestran la T_m obtenida para cada perfil.

En la figura anterior se muestra que al adicionar NaCl desestabiliza a la enzima cambiando los perfiles a bajas temperaturas.

En la Fig D.2 se muestran los perfiles de desnaturalización térmica a las diferentes concentraciones de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$. Estos experimentos se realizaron a las mismas condiciones que en la Fig **.

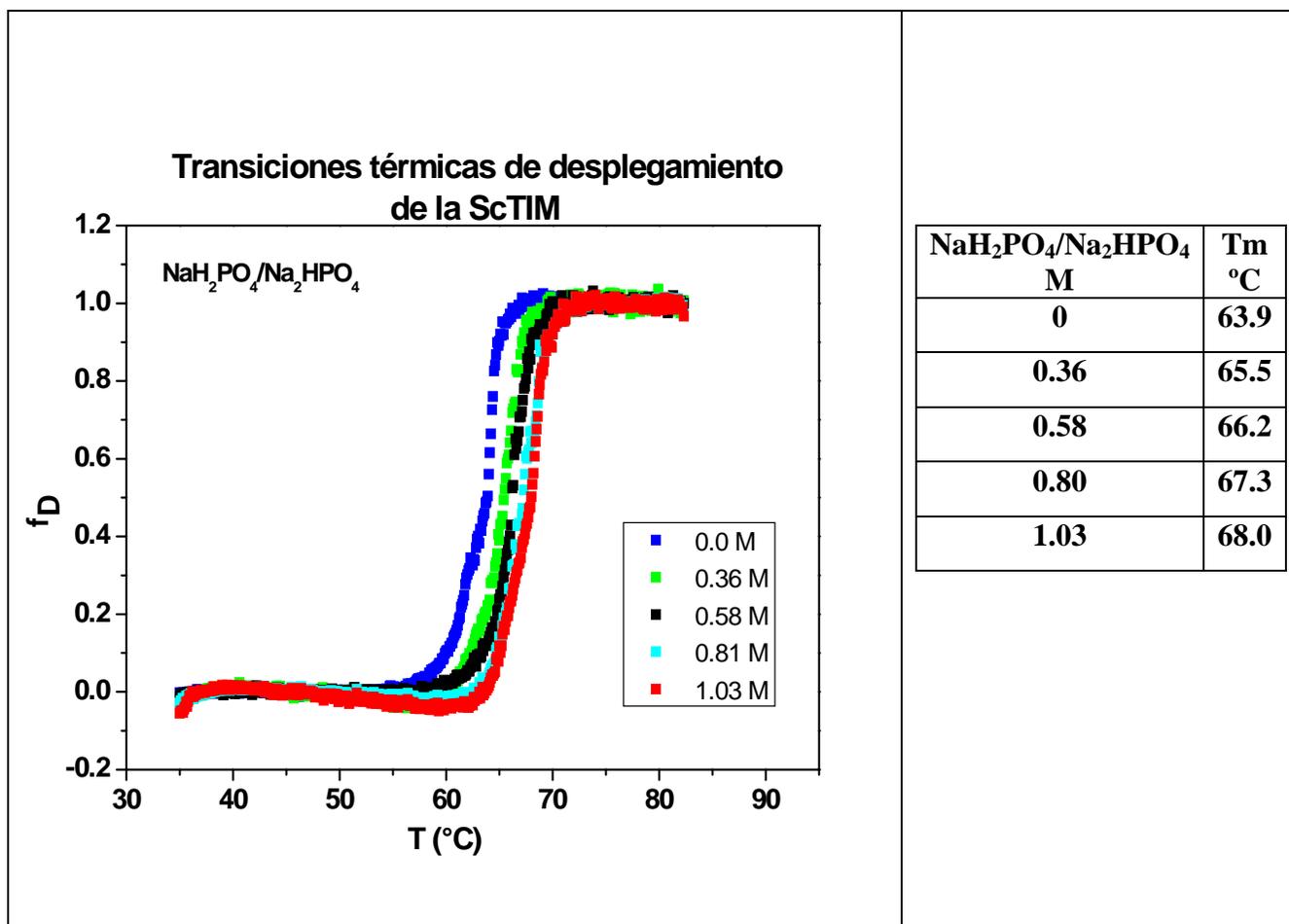


Figura D.2. Transiciones térmicas seguidas por DC a una elipticidad de 220 nm en un amortiguador Tris 50 mM a pH de 7.4 a diferentes concentraciones de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ mismas que se indican en la figura. En la Tabla se muestran la T_m obtenida para cada perfil.

En la figura anterior se puede observar que al adicionar $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ las transiciones térmicas se desplazan a temperaturas más altas, es decir, se estabiliza a la ScTIM.

APÉNDICE E. ANÁLISIS DE CONTACTO ScTIM-INHIBIDOR OBTENIDOS POR LPC.

A continuación se muestran los puentes de hidrógeno que se establecen entre átomos de la proteína y átomos del inhibidor por monómero para ScTIM-2PG y ScTIM-PGH:

A) ScTIM-2PG

Tabla E.1. Puentes de hidrógeno que se forman entre el ligando **2PG** y la **ScTIM** para el **monómero A**, obtenidos por el LPC/CSU. <http://ligin.weizmann.ac.il/cgi-bin/lpcsu/LpcCsu.cgi>

Átomos del ligando	Átomo del monómero A del complejo ScTIM-2PG			Distancia entre los átomos del ligando y la proteína (Å ²)
O1P	GLY	232 A	N	3.5
O2P	SER	211 A	N	3.1
O2P	ALA	212 A	N	3.4
O2P	GLY	232 A	N	3.6
O2P	ALA	212 A	O	3.9
O2P	GLY	210 A	N	4.3
O2P	GLY	233 A	N	4.4
O2P	ALA	234 A	N	5.5
O2P	HOH	640	O	2.8
O3P	GLY	171 A	N	2.6
O3P	SER	211 A	N	2.7
O4P	GLY	233 A	N	3.3
O4P	HOH	640	O	3.6
O1	HIS	95 A	NE2	2.9
O2	GLU	165 A	OE2	2.8
O2	HIS	95 A	NE2	3.1
O2	GLU	165 A	OE1	3.3
O2	ASN	10 A.	ND2	3.6
O2	LEU	230 A	O	3.9

Nota: 19 Puentes de hidrógeno se establecen en el monómero A del complejo ScTIM-2PG.

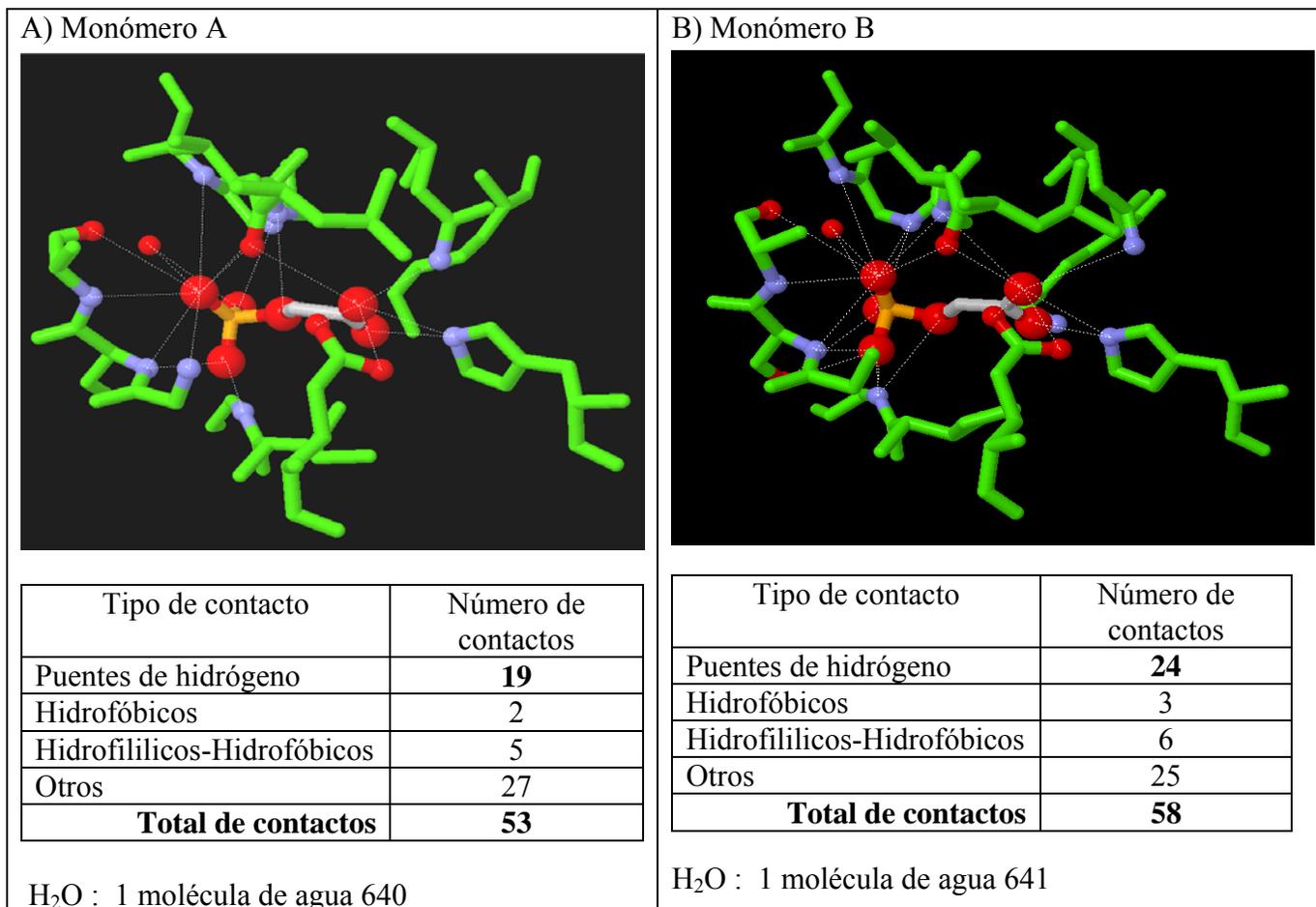
Tabla E.2. Puentes de hidrógeno que se forman entre el ligando **2PG** y la **ScTIM** para el **monómero B**, obtenidos por el LPC/CSU. <http://ligin.weizmann.ac.il/cgi-bin/lpcsu/LpcCsu.cgi>

Átomos del ligando	Átomo del monómero B del complejo ScTIM-2PG			Distancia entre los átomos del ligando y la proteína (Å ²)
O1P	GLY	171 B	N	3.9
O2P	GLY	232 B	N	3.1
O2P	SER	211 B	N	3.6
O2P	GLY	233 B	N	3.8
O2P	ALA	212 B	N	4
O2P	LEU	230 B	O	4.1
O2P	ALA	212 B	O	4.3
O2P	ALA	234 B	N	4.9
O2P	HOH	641 B	O	2.4
O3P	SER	211 B	N	2.7
O3P	GLY	171 B	N	2.7

O3P	SER	211 B	OG	3.3
O4P	GLY	171 B	N	3.2
O4P	GLY	233 B	N	3.5
O4P	SER	211 B	OG	4.3
O4P	HOH	641 B	O	3.6
O1	HIS	95 B	NE2	2.5
O1	LYS	12 B	NZ	2.8
O2	GLU	165 B	OE2	2.6
O2	GLU	165 B	OE1	3.1
O2	LEU	230 B	O	3.2
O2	HIS	95 B	NE2	3.6
O2	GLY	232 B	N	4.2
O2	ASN	10 B	ND2	4.8

Nota: 24 Puentes de hidrógeno se establecen en el monómero B del complejo ScTIM-2PG.

En la siguiente figura se ilustran los puentes de hidrógeno en ambos monómeros de ScTIM-2PG.



Número de puentes de hidrógeno entre el inhibidor y la ScTIM o moléculas de aguas en el sitio de unión: $(19+24)/2=21.5$

Número de contactos atómicos establecidos por el inhibidor en el sitio de unión: $(53+58)/2= 55.5$

Número de moléculas de agua en contacto con el ligando: $(1+1)/2=1$

B) ScTIM-PGH

Tabla E.3. Puentes de hidrógeno que se forman entre el ligando **PGH** y la **ScTIM** para el **monómero A**, obtenidos por el LPC/CSU. <http://ligin.weizmann.ac.il/cgi-bin/lpcsu/LpcCsu.cgi>

Átomos del ligando	Átomo del monómero A del complejo ScTIM-PGH			Distancia entre los átomos del ligando y la proteína (Å)
N2	GLU	165 A	OE2	2.7
N2	LEU	230 A	O	3.6
N2	ASN	10 A	ND2	4
N2	GLY	232 A	N	4.1
O2	GLU	165 A	OE1	3.1
O2	ASN	10 A	ND2	3.2
O1	HIS	95 A	NE2	2.7
O1	LYS	12 A	NZ	2.8
O1P	LYS	12 A	NZ	3.6
O2P	GLY	233 A	N	2.8
O2P	LYS	12 A	NZ	4.5
O2P	HOH	621	O	2.6
O2P	HOH	622	O	2.9
O3P	GLY	232 A	N	2.6
O3P	GLY	233 A	N	3.6
O3P	SER	211 A	N	3.9
O3P	LEU	230 A	O	4.4
O3P	ALA	212 A	N	4.5
O3P	ALA	212 A	O	4.7
O3P	ALA	234 A	N	5
O3P	HOH	620	O	2.6
O4P	SER	211 A	N	2.8
O4P	GLY	171 A	N	2.8
O4P	ALA	169 A	O	3.6
O4P	HOH	845	O	3.8

Nota: 25 Puentes de hidrógeno se establecen en el monómero A del complejo ScTIM-PGH.

Tabla E.4. Puentes de hidrógeno que se forman entre el ligando **PGH** y la **ScTIM** para el **monómero B**, obtenidos por el LPC/CSU. <http://ligin.weizmann.ac.il/cgi-bin/lpcsu/LpcCsu.cgi>

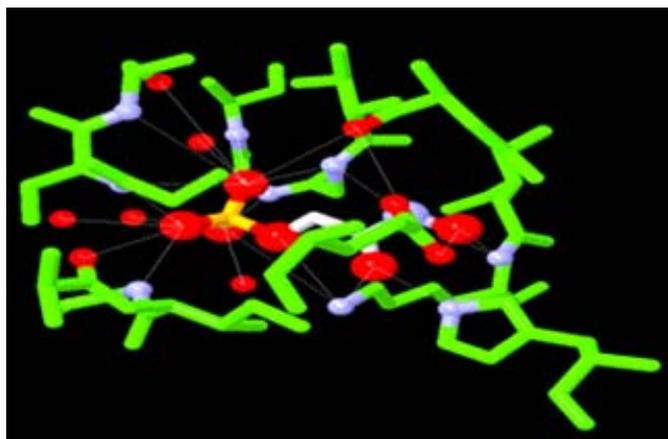
Átomos del ligando	Átomo del monómero B del complejo ScTIM-PGH			Distancia entre los átomos del ligando y la proteína (Å)
N2	GLU	165 B	OE2	2.5
N2	LEU	230 B	O	3.7
N2	ASN	10 B	ND2	4.1
N2	GLY	232 B	N	4.3
O2	GLU	165 B	OE1	2.7
O2	GLU	165 B	OE2	2.8
O2	HIS	95 B	NE2	3
O2	ASN	10 B	ND2	3.5
O1	HIS	95 B	NE2	2.7
O1	LYS	12 B	NZ	3.1
O1P	LYS	12 B	NZ	3.5

O2P	GLY	233 B	N	2.7
O2P	GLY	171 B	N	3.8
O2P	LYS	12 B	NZ	4.3
O2P	HOH	634 B	O	2.6
O2P	HOH	788 B	O	3.1
O3P	GLY	232 B	N	2.9
O3P	SER	211 B	N	3.7
O3P	GLY	233 B	N	3.7
O3P	ALA	212 B	N	4.2
O3P	GLY	210 B	N	4.3
O3P	ALA	212 B	O	4.5
O3P	ALA	234 B	N	5.3
O3P	HOH	630 B	O	2.9
O4P	GLY	171 B	N	2.5
O4P	SER	211 B	N	2.9
O4P	HOH	788 B	O	4.1

Nota: 27 Puentes de hidrógeno se establecen en el monómero B del complejo ScTIM-PGH.

En la siguiente figura se ilustran los puentes de hidrógeno en ambos monómeros de ScTIM-PGH.

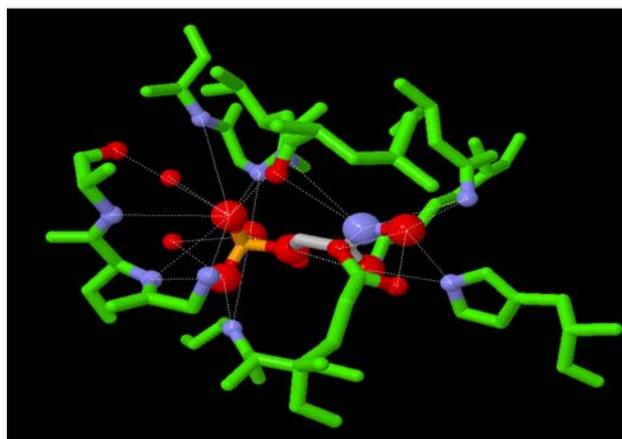
A) Monómero A



Tipo de contacto	Número de contactos
Puentes de hidrógeno	25
Hidrofóbicos	3
Hidrofílicos-Hidrofóbicos	7
Otros	26
Total de contactos	61

H₂O : 3 moléculas de agua 620, 621, 622

B) Monómero B



Tipo de contacto	Número de contactos
Puentes de hidrógeno	27
Hidrofóbicos	3
Hidrofílicos-Hidrofóbicos	7
Aceptor-aceptor	1
Otros	27
Total de contactos	65

H₂O: 3 moléculas de agua 630, 634, 788.

Número de puentes de hidrógeno entre el inhibidor y la ScTIM o moléculas de aguas en el sitio de unión: $(25+27)/2=26$

Número de contactos atómicos establecidos por el inhibidor en el sitio de unión: $(61+65)/2=63$

Número de moléculas de agua en contacto con el ligando: $(3+3)/2=3$

APÉNDICE F. ENERGÍAS DE UNIÓN EXPERIMENTALES Y TEÓRICAS.

F.1. Energías de unión experimentales.

En la siguiente Tabla se muestran los valores de las constantes de unión (K_u) y los valores en términos de la energía libre de unión (ΔG_u) de los complejos ScTIM-2PG y ScTIM-PGH, obtenidos por los ajustes de las curvas de titulación fluorimétrica a las diferentes fuerzas iónicas (Fig. 5.3). Se realizaron dos replicas de cada titulación, los valores representan el valor promedio:

Tabla F.1. Comparación de los valores de K_u y ΔG_u para ambos complejos obtenidos por titulaciones fluorimétricas en TE 50/5, pH 7.4 a 25°C.

Fuerza iónica (mol L ⁻¹)	ScTIM-2PG		ScTIM-PGH	
	K_u (M ⁻¹)	ΔG_u (kJ/mol)	K_u (M ⁻¹)	ΔG_u (kJ/mol)
0.06	59,400 ± 625	-27.25 ± 0.03	144,800 ± 4949	-29.46 ± 0.08
0.16	22,900 ± 1061	-24.88 ± 0.12	-----	----
0.26	8,070 ± 773	-22.30 ± 0.24	-----	----
0.36	5,850 ± 137	-21.50 ± 0.06	21,440 ± 3704	-24.77 ± 0.13
0.46	4,660 ± 42	-20.94 ± 0.02	-----	----
0.56	3,170 ± 58	-19.98 ± 0.05	-----	----
0.66	1,660 ± 296	-18.36 ± 0.44	11, 320 ± 796	-23.14 ± 0.17
0.76	1,540 ± 320	-18.16 ± 0.52	-----	----
0.86	1,350 ± 118	-17.87 ± 0.22	8,450 ± 226	-22.42 ± 0.07
0.96	1,110 ± 23	-17.39 ± 0.05	-----	----
1.06	1,010 ± 0.1	-17.15 ± 0.00	5,320 ± 418	-21.27 ± 0.19

----- significa que no fueron determinados.

En la tabla anterior se puede observar que el valor de la K_u se modifica al incrementar la fuerza iónica. La K_u disminuyó 10 veces en la unión de ScTIM-2PG y 7 veces con ScTIM-PGH a 0.36 M de fuerza iónica y en términos de energía de unión disminuyó 6 kJ/mol con 2PG y 4 kJ/mol con PGH a esta misma fuerza iónica, lo que representa un ΔG_u menos favorable a la unión para ambos complejos debido a que las interacciones electrostáticas que se establecen en la formación del complejo se van debilitando por el efecto de apantallamiento de los iones salinos, haciendo menos favorable la unión, lo cual se observa claramente al incrementar la fuerza iónica.

F.2. Energías de unión teóricas.

En la siguiente Tabla se muestran los valores de las contribuciones a la energía de unión para ambos complejos obtenidos por APBS (energía de solvatación y energía coulombica) y NACCESS (energía no polar).

Tabla F.2. Valores de las contribuciones a la energía de unión del complejo ScTIM-inhibidor a diferentes fuerzas iónicas.

Fuerza iónica	Energía de Solvatación (kJ/mol)		Energía Coulombica* (kJ/mol)		Energía No polar* (kJ/mol)		Energía de unión ΔG_u (kJ/mol)	
	ScTIM-2PG	ScTIM-PGH	ScTIM-2PG	ScTIM-PGH	ScTIM-2PG	ScTIM-PGH	ScTIM-2PG	ScTIM-PGH
0.06	97.27	-112.10	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-111.24	-178.38
0.16	98.67	-110.87	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-109.85	-177.15
0.26	99.54	-110.06	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-108.97	-176.33
0.36	100.19	-109.46	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-108.33	-175.74
0.46	100.69	-108.99	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-107.82	-175.27
0.56	101.11	-108.61	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-107.40	-174.89
0.66	101.46	-108.28	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-107.05	-174.56
0.76	101.77	-108.00	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-106.74	-174.28
0.86	102.05	-107.76	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-106.47	-174.04
0.96	102.29	-107.54	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-106.23	-173.82
1.06	102.51	-107.34	-200.49	-58.33	-8.02	-7.95	-106.01	-173.62

*Cálculo de energía coulombica

a) ScTIM-2PG

$$\Delta G_{u-coul} = \Delta G_{ScTIM-inhibidor} - \Delta G_{ScTIM} - \Delta G_{inhibidor}$$

Complejo ScTIM-2PG	-4.36E+05
ScTIM	-4.31E+05
2PG	-4.19E+03
ΔG_{coul} (kJ/mol)	-801.96
$\Delta G_{coul/4}$ (kJ/mol)	-200.49

La energía coulombica se dividió entre el valor de la constante dieléctrica que se utilizó en el cálculo de APBS.

b) ScTIM-PGH

Complejo ScTIM-2PG	-4.42E+05
ScTIM	-4.37E+05
2PG	-4.67E+03
ΔG_{coul} (kJ/mol)	-233.31

$$\Delta G_{\text{coul}/4}(\text{kJ/mol}) \quad \mathbf{-58.33}$$

*Cálculo de Energía No polar por NACCESS

a) ScTIM-2PG

$$\Delta G_{\text{u_nopol}} = \gamma(\text{ASA}_{\text{ScTIM-inhibidor}} - \text{ASA}_{\text{ScTIM}} - \text{ASA}_{\text{inhibidor}})$$

$\text{ASA}_{\text{ScTIM-inhibidor}}$	1.88E+04
$\text{ASA}_{\text{ScTIM}}$	1.89E+04
$\text{ASA}_{\text{inhibidor}}$	3.08E+02
ΔASA	-383.50
γ	0.021
$\Delta G_{\text{u_nopol}} (\text{kJ/mol})$	-8.02

a) ScTIM-PGH

$\text{ASA}_{\text{ScTIM-inhibidor}}$	1.88E+04
$\text{ASA}_{\text{ScTIM}}$	18896.4
$\text{ASA}_{\text{inhibidor}}$	3.02E+02
ΔASA	-380.10
γ	0.021
$\Delta G_{\text{u_nopol}} (\text{kJ/mol})$	-7.95

F.3. Efecto de las cargas en la obtención de ΔG_u teórico.

En la siguiente Tabla se muestran los valores de las contribuciones a la energía de unión apagando algunos átomos de los residuos catalíticos y el grupo fosfato de ambos inhibidores.

Tabla F.3. Valores de energía de unión obtenidos por el efecto de las cargas de algunos residuos en la asociación ScTIM-inhibidor.

	$\Delta G_{\text{solvatación}}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{\text{coulómbica}}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{\text{no-polar}}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kJ/mol)
ScTIM-2PG a $I = 0.06$ M	97.27	-200.49	-8.02	-111.24
H ζ 1, H ζ 2, H ζ 3, de la Lys12 tanto en el complejo como en la proteína sin inhibidor.	118.89	-29.61	-8.02	81.26
Grupo COO ⁻ del Glu165 en la proteína sin inhibidor.	416.55	-446.50	-8.02	-37.97
Grupo PO ₄ ²⁻ de 2PG tanto en el complejo como en el inhibidor libre.	270.04	-177.86	-8.02	84.16
ScTIM-PGH a $I = 0.06$ M	-112.10	-58.33	-7.95	-178.38
H ζ 1, H ζ 2, H ζ 3, de la Lys12 tanto en el complejo como en la proteína sin inhibidor.	-78.58	111.86	-7.95	25.32
Grupo COO ⁻ del Glu165 en la proteína sin inhibidor.	212.89	-297.73	-7.95	-92.79
Grupo PO ₄ ²⁻ de PGH tanto en el complejo como en el inhibidor libre.	273.26	-66.88	-7.95	198.42

En la Tabla anterior se puede observar que la contribución electrostática (energía de solvatación + energía coulómbica) se ve afectada por el efecto de las cargas de los átomos en comparación con los valores obtenidos para la energía no polar, el valor no cambió en cada caso respecto al valor obtenido a 0.06 M para cada complejo.

F.4. Contribución electrostática a la estabilidad de la ScTIM en el estado nativo.

Se realizaron cálculos para determinar la energía electrostática de la ScTIM (energía de solvatación y energía coulombica) en el estado nativo variando el pH a diferentes fuerzas iónicas (0.06, 0.36, 0.66 y 1.06 M), resolviendo la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann implementado en el programa APBS.

Tabla F.4. Cálculos de la energía electrostática a la estabilidad de la ScTIM en el estado nativo variando el pH a diferentes fuerzas iónicas (0.06, 0.36, 0.66 y 1.06 M).

pH	Energía de solvatación (kJ mol ⁻¹)				Energía coulombica (kJ mol ⁻¹)	Energía electrostática (kJ mol ⁻¹)			
	0.06 M	0.36 M	0.66 M	1.06 M		0.06 M	0.36 M	0.66 M	1.06 M
3.5	-5.03E+03	-4.94E+03	-4.90E+03	-4.88E+03	-1.27E+05	-1.32E+05	-1.32E+05	-1.32E+05	-1.31E+05
4	-4.85E+03	-4.74E+03	-4.71E+03	-4.68E+03	-1.29E+05	-1.34E+05	-1.34E+05	-1.34E+05	-1.34E+05
4.5	-5.05E+03	-4.93E+03	-4.90E+03	-4.87E+03	-1.29E+05	-1.34E+05	-1.34E+05	-1.34E+05	-1.34E+05
5	-5.53E+03	-5.41E+03	-5.37E+03	-5.34E+03	-1.28E+05	-1.34E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05
5.5	-5.53E+03	-5.41E+03	-5.37E+03	-5.34E+03	-1.28E+05	-1.34E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05
6	-5.53E+03	-5.41E+03	-5.37E+03	-5.34E+03	-1.28E+05	-1.34E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05
6.5	-5.54E+03	-5.41E+03	-5.37E+03	-5.34E+03	-1.28E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05
7	-5.53E+03	-5.40E+03	-5.36E+03	-5.33E+03	-1.28E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05
7.5	-5.53E+03	-5.40E+03	-5.36E+03	-5.33E+03	-1.28E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05
8	-5.48E+03	-5.36E+03	-5.32E+03	-5.29E+03	-1.28E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05
8.5	-5.48E+03	-5.36E+03	-5.32E+03	-5.29E+03	-1.28E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05
9	-5.48E+03	-5.36E+03	-5.32E+03	-5.29E+03	-1.28E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05	-1.33E+05

APÉNDICE G. DEDUCCIÓN DE LA ECUACIÓN 6.2.

Considerando los tres equilibrios involucrados en la Fig.6.1 se obtiene:

$$K_u = \frac{[TIM - 2PG]}{[TIM][C]} \quad \text{Ec.(G.1)}$$

$$K_1 = \frac{B[H^+]}{C} \quad \text{Ec.(G.2)}$$

$$K_2 = \frac{B[H^+]}{A} \quad \text{Ec.(G.3)}$$

Despejando B y A de la Ec.(G.2) y Ec.(G.3) respectivamente:

$$B = \frac{K_1 C}{[H^+]} \quad \text{Ec.(G.4)}$$

$$A = \frac{B[H^+]}{K_2} \quad \text{Ec.(G.5)}$$

Sustituyendo B en la Ec. (G.5) se obtiene:

$$A = \frac{K_1 C}{K_2} \quad \text{Ec.(G.6)}$$

Se puede deducir que la constante de unión medida ($K_{u,intr}$), se obtiene considerando la concentración total de inhibidor [I]:

$$K_{u,intr} = \frac{[TIM - 2PG]}{[TIM][I]} \quad \text{Ec.(G.7)}$$

Donde la concentración total de inhibidor [I] es:

$$I = A + B + C \quad \text{Ec.(G.8)}$$

Sustituyendo Ec. (G.4) y Ec.(G.6) en la Ec.(G.8) se obtiene:

$$I = \frac{K_1 C}{K_2} + \frac{K_1 C}{[H^+]} + C \quad \text{Ec.(G.9)}$$

entonces:

$$I = C \left(\frac{K_1}{K_2} + \frac{K_1}{[H^+]} + 1 \right) \quad \text{Ec.(G.10)}$$

Finalmente la Ec. (G.10) se sustituye en la Ec.(G.7) y se obtiene:

$$K_u = \frac{[TIM - 2PG]}{[TIM] \left[C \left(\frac{K_1}{K_2} + \frac{K_1}{[H^+]} + 1 \right) \right]} \quad \text{Ec.(G.11)}$$

Rearreglando se obtiene:

$$K_u = K_{u,intr} \frac{K_2[H^+]}{K_1[H^+] + K_1K_2 + K_2[H^+]} \quad \text{Ec.(G.12)}$$

Factorizando K_2 en la expresión se obtiene:

$$K_u = K_{u,intr} \frac{K_2[H^+]}{K_1[H^+] + K_2 + [K_1 + [H^+]]} \quad \text{Ec.(G.13)}$$



Binding Thermodynamics of Phosphorylated Inhibitors to Triosephosphate Isomerase and the Contribution of Electrostatic Interactions

Iris N. Serratos¹, Gerardo Pérez-Hernández², Georgina Garza-Ramos³, Andrés Hernández-Arana¹, Edith González-Mondragón¹ and Rafael A. Zubillaga^{1*}

¹Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, C.P. 09340, México D.F., México

²Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana –Cuajimalpa, C.P. 01120, México, D. F., México

³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, México, D. F., México

Received 28 June 2010;
received in revised form
29 September 2010;
accepted 14 October 2010
Available online
21 October 2010

Edited by J. E. Ladbury

Keywords:

binding thermodynamics;
enzyme–inhibitor binding;
ionic strength;
multithermal titration
calorimetry;
structural energetics

Electrostatic interactions have a central role in some biological processes, such as recognition of charged ligands by proteins. We characterized the binding energetics of yeast triosephosphate isomerase (TIM) with phosphorylated inhibitors 2-phosphoglycollate (2PG) and phosphoglycolohydroxamate (PGH). We determined the thermodynamic parameters of the binding process (K_b , ΔG_b , ΔH_b , ΔS_b and ΔC_p) with different concentrations of NaCl, using fluorimetric and calorimetric titrations in the conventional mode of ITC and a novel method, multithermal titration calorimetry (MTC), which enabled us to measure ΔC_p in a single experiment. We ruled out specific interactions of Na^+ and Cl^- with the native enzyme and did not detect significant linked protonation effects upon the binding of inhibitors. Increasing ionic strength (I) caused K_b , ΔG_b and ΔH_b to become less favorable, while ΔS_b became less unfavorable. From the variation of K_b with I , we determined the electrostatic contribution of TIM–2PG and TIM–PGH to ΔG_b at $I=0.06$ M and 25 °C to be 36% and 26%, respectively. The greater affinity of PGH for TIM is due to a more favorable ΔH_b compared to 2PG (by 19–24 kJ mol⁻¹ at 25 °C). This difference is compatible with PGH establishing up to five more hydrogen bonds with TIM. Both binding ΔC_p s were negative, and less negative with increasing ionic strength. ΔC_p s at $I=0.06$ M were much more negative than predicted by surface area models. Water molecules trapped in the interface when ligands bind to protein could explain the highly negative ΔC_p s. Thermodynamic binding functions for TIM–2PG changed more with ionic strength than those for TIM–PGH.

*Corresponding author. E-mail address: zlra@xanum.uam.mx.

Abbreviations used: TIM, triosephosphate isomerase; 2PG, 2-phosphoglycollate; PGH, phosphoglycolohydroxamate; K_b , equilibrium binding constant; ΔG_b , binding free energy; ΔH_b , binding enthalpy; ΔS_b , binding entropy; ΔC_p , heat capacity of binding; FT, fluorimetric titration; ITC, isothermal titration calorimetry; MTC, multithermal titration calorimetry; ASA, solvent-accessible surface area; ΔASA , change in ASA upon binding; ΔASA_{pol} , change in polar ASA upon binding; ΔASA_{ap} , change in apolar ASA upon binding; APBS, adaptive Poisson–Boltzmann solver; T_m , half-denaturation temperature; T^* , reference temperature; TEA, triethanolamine hydrochloride; ΔH_{ioniz} , ionization enthalpy; P–L, protein–small ligand; P–P, protein–protein; P–C, protein–carbohydrate.

This greater dependence is consistent with linked, but compensated, protonation equilibria yielding the dianionic species of 2PG that binds to TIM, process that is not required for PGH.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Because binding is a process driven by thermodynamics, dissecting the free energy of binding into the enthalpic and entropic components is essential to address the problem of rational drug design. Structure/activity relationships that explicitly incorporate the interplay between enthalpy and entropy are being developed to accelerate the affinity optimization process.¹ For the last two decades, many studies have focused on the problem of relating the thermodynamic properties of protein–ligand binding to structural features of the molecular partners involved in complex formation and of the complex itself. Most approaches used to predict binding energetics rely on parameterization of known thermodynamic data in terms of the polar and nonpolar buried surface areas caused by the association, here denoted as ΔASA_{pol} and ΔASA_{ap} , respectively.^{2,3} Alternatively, experimental binding enthalpies (ΔH_b) and heat capacities (ΔC_p) have been used to estimate the values of ΔASA upon association.^{4,5} However, several studies have reported discrepancies between experimental thermodynamic functions and surface area calculations.^{6–9} This indicates that some aspects of the molecular mechanisms involved in binding remain obscure due to the diversity of physical factors participating in macromolecular recognition.¹⁰ Specifically, electrostatic forces have long been recognized as important elements in driving the binding of molecules with charged groups.^{11,12} Nevertheless, it is still unclear whether a general thermodynamic signature exists for electrostatically driven association processes.

A deep dependence of the binding constant (K_b) on the environmental ionic strength is considered to be symptomatic of a major participation of charge–charge interactions in the association process. However, the contribution of these interactions to ΔH_b and ΔC_p remains a controversial matter because the contribution of other interactions to the binding process frequently masks the electrostatic ones.¹³

In this work, we have determined the effect of ionic strength on the thermodynamic functions for the binding of two phosphorylated inhibitors to triosephosphate isomerase (TIM). The binding site of TIM contains a conserved lysine residue (K12 of the sequence numbering of *Saccharomyces cerevisiae* TIM), whose positive charge is the determinant for the binding affinity of the natural phosphodianion substrates (D-glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate) and inhibitors.^{14,15} The inhibitors studied, 2-phosphoglycollate (2PG) and phosphoglycolhydroxamate (PGH), are relatively small (Fig. 1), and the contribution of their polar and nonpolar surface areas to ΔH_b and ΔC_p might be comparable to that of the charge–charge interaction, thus making these compounds ideal for study of the combined effects of electrostatics and buried surface areas on binding.

Results

Effect of ionic concentration on TIM stability

Theoretical determinations

The electrostatic free energy of TIM was calculated under the continuous solvent approximation using the numerical solution to the nonlinear Poisson–Boltzmann equation implemented in the program APBS¹⁶ (Materials and Methods). This was done at each half unit of pH between pH 3.0 and pH 9.0, at 298.15 K and at four different ionic strengths: 0.06, 0.36, 0.66 and 1.00 M. The results are presented in Fig. 2a. The energy of the enzyme was lower at lower ionic strengths for the entire pH range analyzed.

CD thermal scans at various ionic concentrations

Thermal denaturation analysis was used to investigate the effect of ionic concentration on the conformational stability of TIM. Denaturation pro-

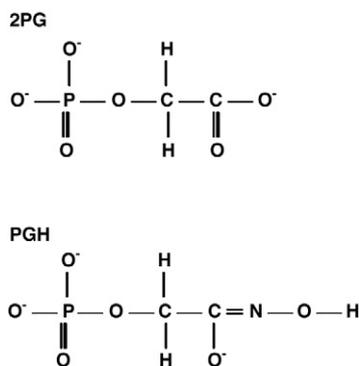


Fig. 1. Covalent structure of enzyme-bound 2-phosphoglycollate (2PG) and phosphoglycolhydroxamate (PGH).

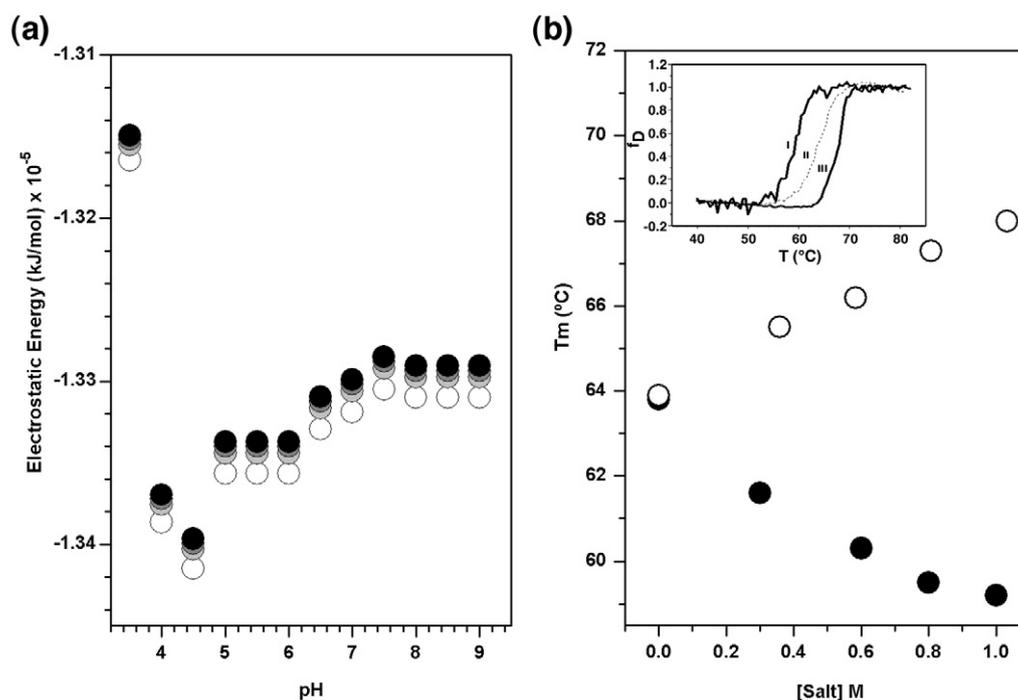


Fig. 2. The effects of salt on TIM stability. (a) Total electrostatic free energy of TIM as a function of pH and ionic strength. Theoretical estimations were obtained by solving the nonlinear Poisson–Boltzmann equation at 298.15 K for four different ionic strengths: 0.06 M (○), 0.36 M (◐), 0.66 M (◑) and 1.06 M (●) using the APBS program.¹⁶ (b) Thermal denaturation profile shifting effect of salts. Variation of the denaturation midpoint (T_m) of TIM in 50 mM Tris (pH 7.4) as a function of added sodium chloride (●) or sodium phosphates (○); these values were determined from ellipticity measurements (θ_{220}). The inset shows thermal scans of TIM at: (I) 1.0 M NaCl, (II) no added salt and (III) 1.0 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$.

files of TIM followed by ellipticity measurements at different concentrations of sodium phosphates ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) or sodium chloride (NaCl) at pH 7.4 were obtained. Some of these transitions are presented in the inset in Fig. 2b. From these profiles, we determined the half-denaturation temperature, T_m , for each of the solvent conditions assayed. Figure 2b illustrates how the effect produced by each salt was clearly different. While the addition of NaCl destabilizes the enzyme, thus shifting the profile to lower temperatures, the presence of sodium phosphates moves the profile to higher temperatures (i.e. stabilizes the isomerase).

Thermal and salt dependence of phosphorylated inhibitors binding to TIM

Fluorimetric studies

The binding constants (K_b) of TIM to the inhibitors 2PG and PGH at various ionic strengths were determined by fluorimetry as described.¹⁷ Titration curves at some of the NaCl concentrations assayed are presented in Fig. 3. The full set of K_b values obtained from curve fittings are presented in Fig. 4a. The data points represent mean values from two or

three replicas. Binding constants for both inhibitors decreased with increasing ionic strength. The affinity of TIM for PGH was always higher than that for 2PG, and added salt diminished the binding constant of 2PG more steeply.

We also fluorimetrically analyzed the thermal dependence of the affinity of TIM for both inhibitors. The K_b values for both inhibitors in the absence of NaCl were determined over a range of temperatures at which TIM remains native (10 – 50 °C; Fig. 2b inset). For the TIM–2PG complex, we also made titrations in the presence of 0.30 M NaCl. To obtain the binding enthalpy (ΔH_b) and heat capacity change (ΔC_p) for each TIM–inhibitor association, these data sets (T_i , K_{bi}) were fit to the van 't Hoff integrated equation:

$$\ln \frac{K_b}{K_b^*} = \left(\frac{\Delta H_b^* - T^* \Delta C_p}{R} \right) \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \ln \frac{T}{T^*} \quad (1)$$

where R is the gas constant and symbols with an asterisk (*) represent values at an arbitrary reference temperature (T^*). Figure 4b shows the variation of K_b with temperature for both complexes in the absence of NaCl (pH 7.4; ionic strength of 0.06 M

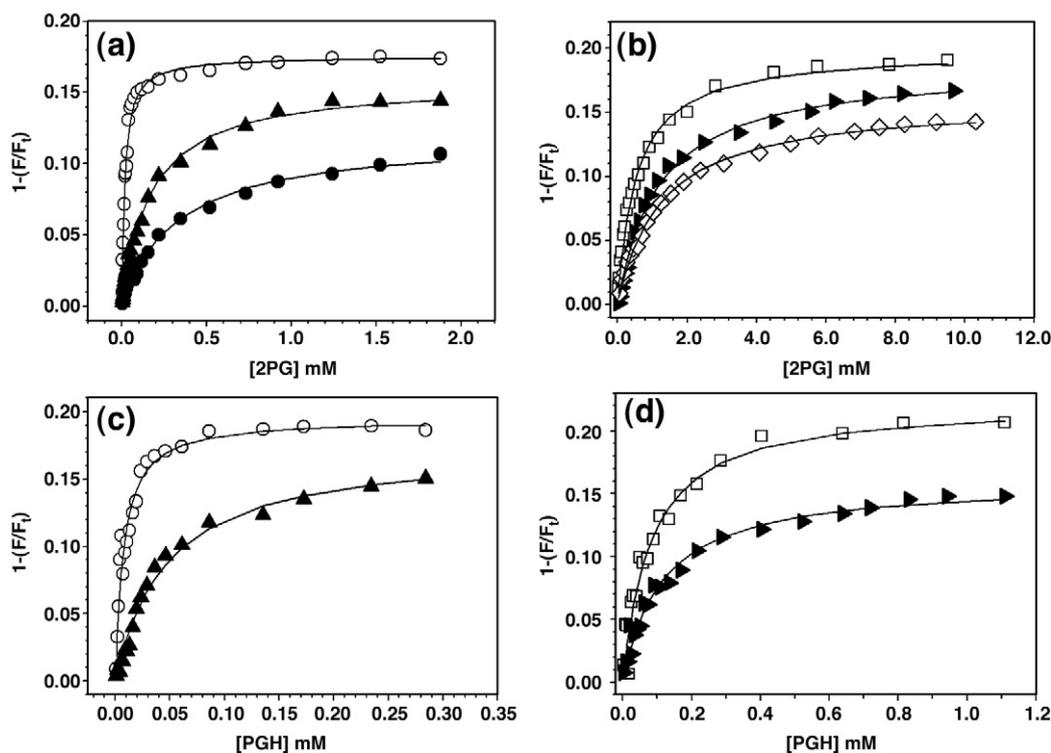


Fig. 3. Fluorimetric titrations of TIM with the inhibitors 2PG and PGH at different ionic strengths. Symbols represent the fraction of total TIM fluorescence (F_i) that is quenched by the added inhibitor. Data points were fitted to Eq. (6) by a nonlinear regression (continuous lines). The excitation wavelength was 280 nm and the emission was registered at 320 nm. Experiments were done at 25 °C in 50 mM TEA and 5 mM EDTA at pH 7.4 and different ionic strength: 0.06 M (○), 0.36 M (▲), 0.56 M (●), 0.66 M (□), 0.86 M (▶) and 1.06 M (◇). (a and b) TIM–2PG. (c and d) TIM–PGH. The initial enzyme concentration was 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (a and c) or 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b and d). These titrations represent one of the two or three replicas made for each condition.

from TEA buffer). From the fitted curves shown, we determined the values of K_b , ΔH_b , and ΔC_p at 25 °C (Table 1). The binding free energy (ΔG_b) and the binding entropy (ΔS_b) were calculated from the standard relationships:

$$\Delta G_b = -RT \ln K_b$$

$$\Delta S_b = (\Delta H_b - \Delta G_b) / T$$

Calorimetric studies

We used isothermal titration calorimetry (ITC) to measure K_b and ΔH_b , for the binding of both inhibitors to TIM at 25 °C and pH 7.4. Figure 5 shows the calorimetric titrations for TIM–2PG and TIM–PGH at three different concentrations of NaCl: 0.0, 0.30 and 0.60 M. The thermodynamic parameters of binding determined from these titration curves are shown in Table 1. We also considered the possibility of linked protonation effects in both binding equilibria, i.e., changes in the degree of protonation of ionizable residues in the ligand or the receptor due to the association, which could affect the measured

binding enthalpies. To account for this, we performed ITC experiments for both complexes in the absence of NaCl with Pipes ($\Delta H_{\text{ioniz}} = 11.45 \text{ kJ mol}^{-1}$) instead of TEA ($\Delta H_{\text{ioniz}} = 33.59 \text{ kJ mol}^{-1}$) as the buffering system.¹⁸ The measured binding enthalpies in Pipes were -40.2 ± 0.6 and $-59.2 \pm 0.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ for TIM–2PG and TIM–PGH complexes, respectively, which were similar to those obtained in TEA (-40.5 ± 1.0 and $-60.9 \pm 0.3 \text{ kJ mol}^{-1}$).

To measure the heat capacity of binding (ΔC_p) at different ionic strengths, we used the multithermal titration calorimetry method (MTC),¹⁹ which allowed us to obtain ΔC_p , K_b and ΔH_b from a single titration experiment. We validated the use of this method with our system by determining ΔC_p for the TIM–2PG complex and comparing it to the value obtained from the measurement of ΔH_b at various temperatures by the traditional ITC method (Fig. 6). The values obtained by both methods were very similar, as shown in Table 1. Using MTC, we determined ΔC_p , ΔH_b and K_b for the binding of 2PG and PGH to TIM at three different ionic strengths. The results are presented in Table 1. The thermal and salt dependence of the corresponding

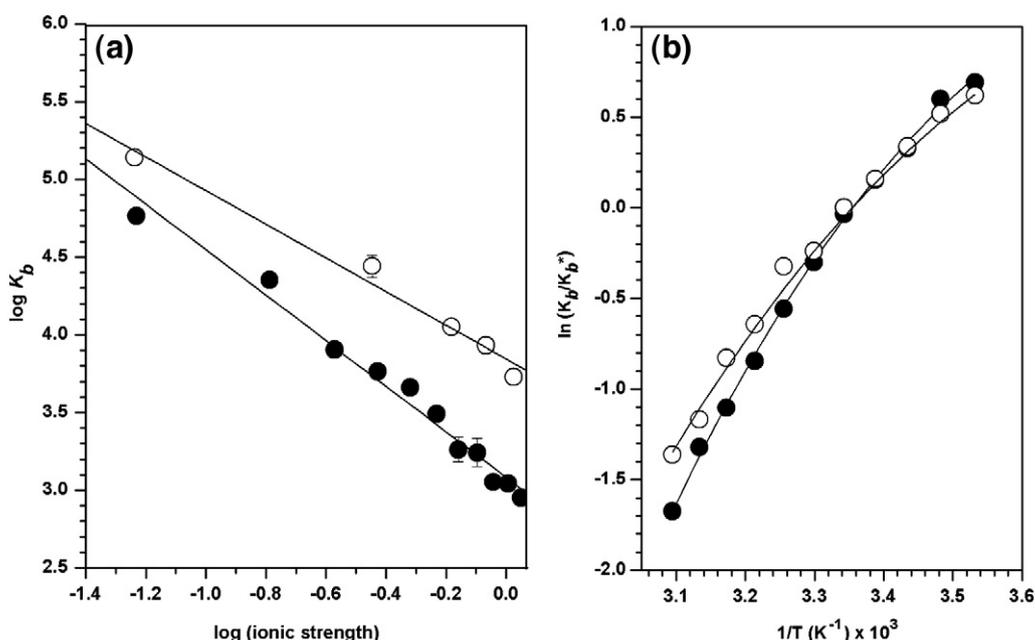


Fig. 4. Salt and thermal dependence of TIM binding to 2PG and PGH. (●) TIM–2PG complex, (○) TIM–PGH complex. (a) Variation of K_b with the ionic strength in 50 mM TEA buffer, pH 7.4 at 25 °C. K_b values were obtained by the fluorimetric titrations shown in Fig. 3. Equations obtained by linear adjustments were: $\log K_b = 3.053 - 1.487 \log I$ for TIM–2PG, and $\log K_b = 3.845 - 1.083 \log I$ for TIM–PGH. (b) Variation of K_b with temperature at pH 7.4 in the absence of NaCl in 50 mM TEA buffer at 0.06 M ionic strength. Lines represent the curves fit to the integrated van't Hoff equation (Eq. (1)).

ΔG_b , as well as ΔH_b and $T\Delta S_b$, are shown in Fig. 7. Again, the effect of ionic strength was more pronounced for the 2PG–TIM complex.

Structural energetics calculations

The catalytic site of TIM, where phosphorylated ligands bind, is covered with a mobile segment, an Ω loop,²⁰ which excludes solvent from the site, contributes to stabilization of the enediolate intermediate and minimizes the alternative elimination reaction that yields methylglyoxal and inorganic phosphate.²¹ NMR experiments suggest that the movement of the catalytic loop is not ligand-gated²² and the enzyme itself might control the rate of loop opening/closing independently from binding.²⁰ Therefore, it is not clear which conformation should be used as the reference for the free enzyme in the binding process. To calculate the accessible surface area (ASA) buried upon binding in both complexes of TIM, we decided to take two reference conformations for the free enzyme: (i) the crystallographic structure of free yeast TIM in its “open” conformation (PDB code 1YPI); and (ii) the structure of TIM as it exists in its respective complex (PDB code 2YPI or 7TIM), i.e. a “rigid-body” binding. Another question is whether to consider the crystallographic water molecules when determining ASA. In our calcula-

tions, we explored both possibilities. Based on these considerations, we made four calculations of ΔASA for each complex:

- C1=ASA of the complex including water molecules – (ASA of the enzyme as rigid body + ASA of the inhibitor with water molecules associated)
- C2=ASA of the complex without water molecules – (ASA of the enzyme as rigid body + ASA of the inhibitor without water molecules)
- C3=ASA of the complex without water molecules – (ASA of the enzyme in its free and open conformation + ASA of the inhibitor without water molecules)
- C4=ASA of the complex including water molecules – (ASA of the enzyme in its free and open conformation + ASA of the inhibitor with water molecules associated)

The results of these calculations are given in Table 2 together with the outcomes of the ligand–protein contact analysis made by LPC.²³ These figures represent the mean values obtained for calculations on both subunits of the enzyme.

The parameters of three semiempirical models devised to estimate binding enthalpies from the buried surface areas upon binding (according to Eq. (10)) are given in Table 3. These models are based on

Table 1. Binding thermodynamic parameters of phosphorylated inhibitors to TIM at 25 °C, determined by three different titration methods

TIM-2PG						
Ionic strength (mol L ⁻¹)	Method	K _b × 10 ⁻³	ΔG _b (kJ mol ⁻¹)	ΔH _b (kJ mol ⁻¹)	TΔS _b (kJ mol ⁻¹)	ΔC _p (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)
0.06	FT	59 (1)	-27.3 (0.03)	-41.4 (0.7) ^a	-14.1 (0.7)	-1.00 (0.08) ^b
	ITC	63 (4)	-27.4 (0.2)	-40.5 (1.0)	-13.1 (0.8)	-1.11(0.15)
	MTC	63 (2)	-27.4 (0.1)	-40.4 (0.4)	-13.0 (0.3)	-1.12 (0.10)
	Mean	62 [100]	-27.4 [100]	-40.8 [100]	-13.4 [100]	-1.08 [100]
0.36	FT	5.9 (0.1)	-21.5 (0.06)	-29.1 (0.6) ^a	-7.6 (0.5)	-0.22 (0.06) ^b
	ITC	5.0 (0.2)	-21.1 (0.1)	-29.3 (1.6)	-8.2 (1.5)	
	MTC	5.8 (0.3)	-21.5 (0.1)	-29.5 (1.9)	-8.1 (1.8)	-0.28 (0.09)
	Mean	5.6 [9.0]	-21.4 [78]	-29.3 [72]	-8.0 [60]	-0.25 [23]
0.66	FT	1.7 (0.3)	-18.4 (0.4)			
	ITC	1.3 (0.04)	-17.8 (0.1)	-22.3 (1.7)	-4.5 (1.6)	
	MTC	1.0 (0.04)	-17.2 (0.1)	-22.7 (1.5)	-5.5 (1.4)	-0.22 (0.04)
	Mean	1.3 [2.1]	-17.8 [65]	-22.5 [55]	-5.0 [37]	-0.22 [20]
TIM-PGH						
Ionic strength (mol L ⁻¹)	Method	K _b × 10 ⁻⁴	ΔG _b (kJ mol ⁻¹)	ΔH _b (kJ mol ⁻¹)	TΔS _b (kJ mol ⁻¹)	ΔC _p (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)
0.06	FT	15.0 (0.5)	-29.5 (0.1)	-60.0 (1.8) ^a	-30.5 (1.7)	-1.11 (0.20) ^b
	ITC	17.0 (0.5)	-29.8 (0.1)	-60.9 (0.3)	-31.1 (0.2)	
	MTC	17.0 (1.0)	-29.9 (0.2)	-59.2 (0.7)	-29.2 (0.5)	-1.22 (0.37)
	Mean	16.3 [100]	-29.7 [100]	-60.0 [100]	-30.3 [100]	-1.17 [100]
0.36	FT	2.1 (0.4)	-24.8 (0.3)			
	ITC	2.3 (0.1)	-24.9 (0.1)	-52.2 (0.9)	-27.3 (0.8)	
	MTC	1.8 (0.1)	-24.3 (0.1)	-51.1 (1.1)	-26.7 (1.0)	-0.44 (0.15)
	Mean	2.1 [13]	-24.7 [83]	-51.7 [86]	-27.0 [89]	-0.44 [38]
0.66	FT	1.1 (0.08)	-23.1 (0.2)			
	ITC	1.5 (0.1)	-23.8 (0.2)	-46.8 (1.4)	-23.0 (1.2)	
	MTC	1.0 (0.1)	-22.8 (0.2)	-46.7 (1.2)	-23.9 (1.0)	-0.35 (0.15)
	Mean	1.2 [7.4]	-23.2 [78]	-46.8 [78]	-23.5 [78]	-0.35 [30]

^a ΔH_b and ^b ΔC_p were obtained by the van't Hoff method, determining K_b at different temperatures by fluorimetric titrations (FT). Numbers in parentheses indicate one standard deviation from two or three replicas for FT and the standard errors in the fitted parameters for ITC and MTC. For mean values, the percentage with respect to I=0.06 M are included in square brackets.

protein–small ligand data²⁴ (P–L), protein–protein and protein unfolding data²⁵ (P–P), and protein–carbohydrate data²⁵ (P–C). By using these parameters and the four ΔASA values calculated before for both complexes, we obtained the values for ΔH_b given in Table 4. The experimental values of ΔH_b (Table 1) are within the range of values predicted by these area models.

We also used surface area models to calculate ΔC_p from ΔASA, according to Eq. (11) and the parameters given in Table 3. All five models failed to reproduce the experimental ΔC_p values (Table 4).

Discussion

Chloride exerts a screening effect on TIM while phosphate binds to its native state

Two main types of effects of dissolved salts on proteins have been described: those related to the specific binding of ions and those linked to a general screening effect, which is associated with the concentration of charges and not with particular

ions. The Poisson–Boltzmann treatment of electrostatics captures only this last nonspecific effect because it is based on a continuum solvent model. Applied to TIM, this model predicts that the stability of the native state across the entire pH range analyzed (4.0 – 9.0) is diminished by increasing the ionic strength because of the concomitant increase in the electrostatic energy of the system (Fig. 2a). Experimentally, this is in accordance with the T_m-lowering effect observed on the heat denaturation profiles of TIM induced by the addition of NaCl (Fig. 2b). The destabilization caused by this salt, considered as neutral within the Hofmeister series,³⁰ suggests that the electrostatic interactions contribute favorably and significantly to maintain the native structure of TIM. The increasing ionic strength hampers these favorable interactions, leading to a destabilizing effect. In contrast, the addition of sodium phosphates to the medium induces a stabilization of TIM (Fig. 2b), an effect that is consistent with hydrogen phosphate (HPO₄²⁻) being a competitive inhibitor of the enzyme.³¹ This anion binds to the active site, stabilizing the native state. We studied this effect earlier using the inhibitor 2PG.³² Overall, these results indicate that the effect of NaCl on the solution of TIM is associated with a

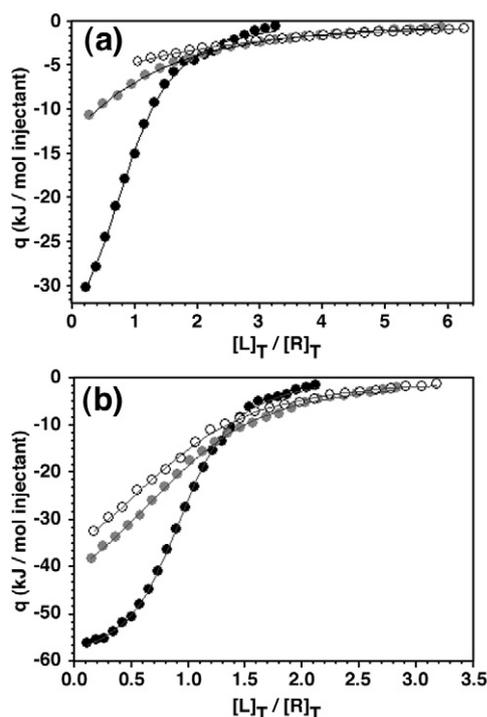


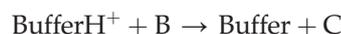
Fig. 5. Calorimetric titrations of TIM with the inhibitors 2PG and PGH at different ionic strengths. ITC experiments were done at 25.0 °C in 50 mM TEA and 5.0 mM EDTA (pH 7.4, 0.06 M ionic strength) at different concentrations of NaCl: 0.0 M (●), 0.30 M (●) and 0.60 M (○). (a) TIM–2PG titrations; (b) TIM–PGH titrations. Symbols stand for the measured heats evolved during the addition of each inhibitor normalized by the quantity of added 2PG or PGH. Continuous lines represent the best fit curves calculated from an identical and independent binding sites model.

screening effect and not with specific binding to the protein.

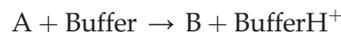
Effects of salt and temperature on binding of TIM to 2PG and PGH

The affinity of TIM for both phosphorylated inhibitors decreases as ionic strength increases (Fig. 4a), suggesting an important contribution of favorable electrostatic interactions to their binding. This is not unexpected, as it is established that the positive charge of the ϵ -amino group of Lys12 is required to bind the anionic substrates,¹⁵ as well as PGH and 2PG. In addition, ion–dipole interactions could be important, as demonstrated for the binding of phosphate by a periplasmic phosphate-binding protein.³³ Earlier analyses^{34–36} show that both 2PG and PGH bind to TIM in their dianionic form with both phosphate oxygens charged and their respective third ionizable group protonated. Once the inhibitor is at the catalytic site, the last proton is

abstracted by the carboxylate of Glu165, so the fully ionized form of each inhibitor is the final bound species.^{37,38} Considering that both inhibitors stay equally trianionic in their respective complex with TIM, it is difficult to explain the greater sensitivity of the TIM–2PG complex to the ionic strength of the medium (Figs 4a and 7). However, the carboxylic group of 2PG and the hydroxamic group of PGH have very different pK_a values (5.2 for 2PG³⁶ and 9.5 for PGH³⁴), leading to dissimilar degrees of protonation in their free forms at pH 7.4. For 2PG, the trianionic form (${}^{-2}\text{O}_3\text{PO-CH}_2\text{-CO}_2^-$) is the abundant, while the dianionic (${}^{-2}\text{O}_3\text{PO-CH}_2\text{-CO-NH-OH}$) and ready-to-bind species is the commonest for PGH. NMR measurements have shown that at a neutral pH the most populated species of 2PG is indeed ${}^{-}\text{O}_2\text{C-CH}_2\text{-OPO}_3^{2-}$, but ${}^{-}\text{O}_2\text{C-CH}_2\text{-OPO}_3\text{H}^{-}$ ^{37,39} is also present to a lesser extent.³⁶ The binding of 2PG to TIM at pH 7.4, unlike PGH, involves two previous proton exchanges (See Fig. 8), one from the buffer ($\text{BufferH}^+/\text{Buffer}$) to the carboxylate of 2PG^{3-} ;



and another from the phosphate –OH to the buffer to regenerate 2PG^{3-} :



According to the equilibria depicted in Fig. 8, the K_b for the formation of the TIM–2PG complex should involve only the concentration of the dianionic form of 2PG with its carboxyl group protonated (species marked with C in Fig. 8):

$$K_b = \frac{[\text{TIM-2PG}]}{[\text{TIM}][\text{C}]} \quad (2)$$

In contrast, considering the three linked equilibria shown in Fig. 8, it can be deduced that the measured binding constant ($K_{b,\text{obs}}$), which is based on the total concentration of inhibitor ($[\text{A}] + [\text{B}] + [\text{C}]$), is related to K_b and the acidic ionization constants K_1 and K_2 through the expression:

$$K_{\text{app}} = K_b \frac{K_2[\text{H}^+]}{K_2(K_1 + [\text{H}^+]) + K_1[\text{H}^+]} \quad (3)$$

This analysis implies that the thermodynamic functions for the binding of 2PG to TIM obtained and reported in this work must be considered as apparent parameters.

The equilibrium dissociation of acids is affected by the ionic strength of the medium.⁴⁰ A similar effect is seen for the binding reactions of charged partners, such as those of 2PG and PGH with TIM. Therefore, the binding of 2PG could be more affected by ionic strength because there are two other linked equilibria besides K_b that involve charged species whose constants (K_1 and K_2) will be affected by salt.

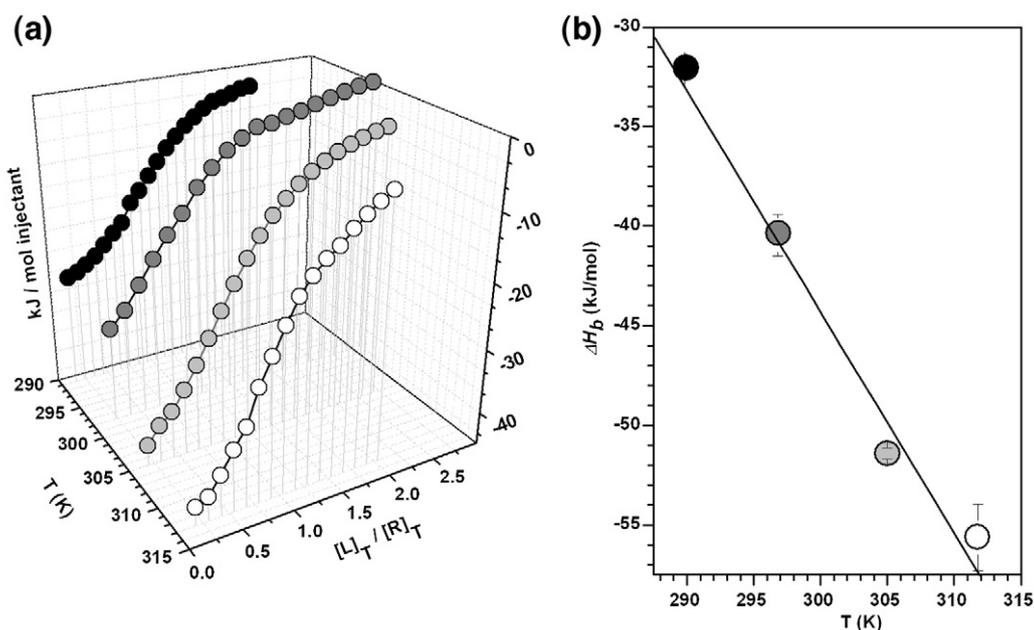


Fig. 6. Traditional measurement of binding ΔC_p for the TIM-2PG complex. (a) Binding isotherms in 50 mM TEA and 5.0 mM EDTA (pH 7.4) at 18 °C (●), 25 °C (●), 32 °C (●) and 40 °C (○). Symbols represent the measured heats evolved during each 2PG addition normalized by the quantity of the added inhibitor. Continuous lines represent the best fit curves calculated from an identical and independent binding sites model, from which ΔH_b is obtained as one of the fitting parameters. (b) Determination of ΔC_p as the slope of the linear variation of ΔH_b with temperature ($-1.11 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Symbols represent the binding enthalpies obtained from the respective isotherm from panel a.

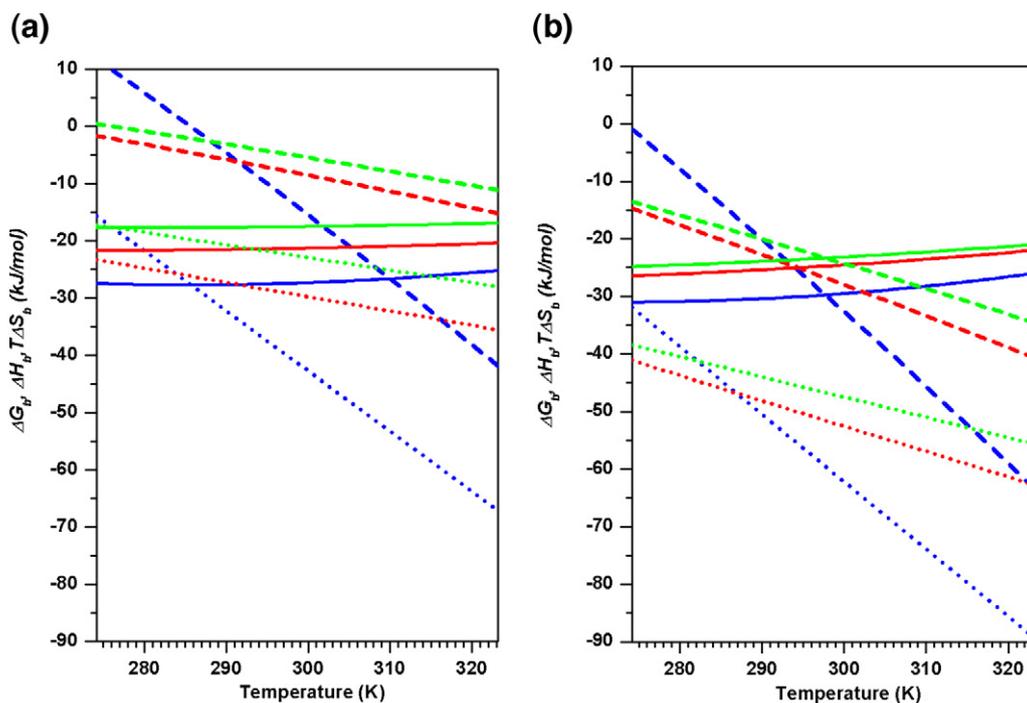


Fig. 7. Salt and thermal effects on binding thermodynamic functions for (a) TIM-2PG and (b) TIM-PGH. ΔG_b (continuous lines), ΔH_b (dotted lines), $T\Delta S_b$ (broken lines). These functions were constructed with the mean values given in Table 1 for ionic strengths of 0.06 M (blue), 0.36 M (red) and 0.66 M (green).

Table 2. Structural properties of TIM–2PG and TIM–PGH complexes

	TIM–2PG				TIM–PGH			
H bonds ^a	21.5				26.0			
Contacts ^b	55.5				63.0			
H ₂ O ^c	1.0				3.5			
	ΔASA_{apol}	ΔASA_{pol}	ΔASA_{tot}	Polar (%)	ΔASA_{apol}	ΔASA_{pol}	ΔASA_{tot}	Polar (%)
C1 ^d	-106.6	-304.5	-411.1	74.1	-138.3	-390.7	-529.0	73.8
C2	-99.7	-261.5	-361.1	72.4	-87.6	-296.9	-384.5	77.2
C3	-50.4	-484.2	-534.7	90.6	-200.5	-329.8	-530.2	62.2
C4	-57.4	-527.2	-584.7	90.2	-251.2	-423.6	-674.8	62.8

The values are the mean for both subunits in the dimer.

^a The number of hydrogen bonds between inhibitor and TIM or water molecules within the binding site.

^b The number of atomic contacts established by the inhibitor in the binding site.

^c The number of water molecules contacting ligand.

^d C1 – C4 represent different calculations of ΔASA , whose characteristics are given in Results.

If we consider that the binding of anionic inhibitors to TIM is accompanied by the release of anions (Cl⁻) into the solvent, we can apply the theory of protein–polyelectrolyte interactions^{41,42} and use the following equation to relate the variation of K_b with the concentration of NaCl:

$$\log K_b = \log K_{b,nel} - Z\psi \log[\text{NaCl}] \quad (4)$$

where the first term on the right-hand side results from nonelectrostatic (nel) interactions and the second comes from the electrostatic effects associated with the release of counterions, and $Z\psi$ represents the number of counterions released upon binding the inhibitor. When the salt concentration reaches 1.0 M, the electrostatic term vanishes and $-RT \ln K_b$ represents the nonelectrostatic part of the Gibbs energy of the complex formation, $-RT \ln K_{b,nel}$, which can be evaluated from the linear fit shown in Fig. 4a. It is then possible to quantify the electrostatic contribution to affinity:

$$\Delta G_b = \Delta G_{b,nel} + \Delta G_{b,ele} \quad (5)$$

From the linear regressions shown in Fig. 4a, we obtained $\Delta G_{b,nel}$ values of $-17.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ and -21.9 kJ

Table 3. Binding enthalpy and heat capacity parameterizations based on changes in polar and apolar accessible surface areas

	$\Delta h_{pol,cal}$ ($\text{mol } \text{Å}^2$) ⁻¹	$\Delta h_{apol,cal}$ ($\text{mol } \text{Å}^2$) ⁻¹
Luque & Freire (P–L) ²⁴	31.4	-8.44
García & Hernández (P–P) ²⁵	19.4	-7.0
García & Hernández (P–C) ²⁵	46.1	-5.8
	$\Delta c_{p,pol,cal}$ ($\text{mol } \text{Å}^2 \text{ K}$) ⁻¹	$\Delta c_{p,apol,cal}$ ($\text{mol } \text{Å}^2 \text{ K}$) ⁻¹
Murphy & Freire ²	-0.26	0.45
Spolar <i>et al.</i> ²⁶	-0.14	0.32
Myers <i>et al.</i> ²⁷	-0.09	0.28
Makhatadze & Privalov ²⁸	-0.21	0.51
García-Hernández <i>et al.</i> ²⁹	0.07	0.23

mol^{-1} for 2PG–TIM and PGH–TIM, respectively. Then, using the mean ΔG_b values from Table 1, we calculated that at 25 °C $\Delta G_{b,ele}$ represents 36% and 26% of the binding free energy for 2PG–TIM and PGH–TIM at $I=0.06 \text{ M}$, respectively.

Using three different titration methods, we characterized the binding thermodynamics of both complexes at three different ionic strengths (0.06 M, 0.36 M and 0.66 M), and quantified ΔG_b , ΔH_b , ΔS_b and ΔC_p , the parameters necessary to give a complete description of the binding process. There was very good agreement among the results obtained by the different methodologies used. Particularly, the concordance between calorimetric and van't Hoff (fluorimetric) enthalpies is indicative of appropriate experimentation and data modeling.⁴³ The averaged values of the thermodynamic functions are given in Table 1. In contrast, the constancy of evolved binding heats, irrespective of the ionization enthalpy of the buffering system, would suggest an absence of linked protonation effects.⁴⁴ As described above, this seems to be the case for the PGH–TIM complex. However, the binding of 2PG to TIM involves two earlier proton exchanges. This apparent discrepancy might be clarified by noting that, as shown in Fig. 8, the conversion of 1 mol of A to 1 mol of C renders the degree of protonation of the buffer unchanged, i.e., the proton captured by B from the buffer is compensated for by the proton released by A to the medium. Thus, there would not be a heat effect associated with this conversion (A→B→C). It is worth mentioning that some heat effect could be associated with the internal proton transfer between the inhibitor and the catalytic carboxylate due to the different ionization enthalpies of the involved groups. Nonetheless, this effect would not be detected calorimetrically by changing the buffer system.

Both binding processes are enthalpically driven, as can be seen in Fig. 7. However, the ΔH_b of PGH is more favorable than that of 2PG by -20 kJ mol^{-1} at

Table 4. Comparison of ΔH_b and ΔC_p values for TIM–2PG and TIM–PGH binding processes, computed through different surface area models and the four calculations (C1 – C4) of ΔASA from Table 2

	TIM–2PG				TIM–PGH			
ΔH_b (kJ mol ⁻¹)	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4
P–L ²⁴	-36.3	-30.9	-61.4	-66.8	-46.5	-35.9	-36.7	-47.3
P–P ²⁵	-21.6	-18.3	-37.8	-41.1	-27.3	-21.3	-20.6	-26.7
P–C ²⁵	-56.1	-48.0	-92.2	-100.3	-72.0	-55.1	-58.7	-75.6
ΔC_p (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4
References								
2	0.131	0.097	0.432	0.465	0.165	0.158	-0.019	-0.012
26	0.036	0.020	0.216	0.232	0.044	0.057	-0.075	-0.088
27	-0.010	-0.018	0.123	0.131	-0.015	0.009	-0.111	-0.135
28	0.040	0.017	0.318	0.341	0.048	0.074	-0.138	-0.164
29	-0.192	-0.172	-0.190	-0.210	-0.248	-0.171	-0.289	-0.366

The values in bold are the most suitable calculations for the respective models.

25 °C. This energetic difference could be explained by the results of the LPC analysis of their crystallographic structures. PGH establishes 14% more atomic contacts with TIM and up to five more hydrogen bonds in the catalytic site of the enzyme compared with 2PG (Table 2).

The affinity decrease at higher ionic strengths, i.e. the increase in ΔG_b , was due to a less favorable ΔH_b (Fig. 7). This binding enthalpy quenching with higher ionic concentrations can be explained by a Debye screening effect of dissolved ions on favorable electrostatic interactions between the enzyme and the phosphorylated ligands. 2PG reduces its binding enthalpy to TIM more steeply at increasing salt concentrations than PGH. Raising the ionic strength from 0.06 M to 0.36 M (0.66) at 25 °C reduces ΔH_b for 2PG by about 28% (45%), whereas ΔH_b is reduced by only 14% (22%) for PGH. These differences indicate that other important contributors exist for the binding enthalpy of PGH besides charge–charge interactions that are not much affected by salt concentration. The most likely contributors are hydrogen bonds. The binding entropy, ΔS_b , was always unfavorable (see Table 1) for both inhibitors, and was less favorable for PGH. Higher salt concentrations yielded a less unfavorable ΔS_b .

Structural energetic models

According to the area-based models that correlate ΔH_b to the ΔASA obtained from the structures of the complex and free molecules and considering that ΔASA values are negative for the binding process, the burying of polar surface area is exothermic (Eq. (10); Table 3), while apolar area hiding is endothermic (i.e., larger buried polar areas and smaller buried apolar areas render more favorable binding enthalpies). Based on this rationale, the fact that PGH has one more polar atom (N) than 2PG, and that the binding of TIM to PGH is more exothermic than it is to 2PG in all experimental conditions (Table 1), we expected that the polar buried surface area for TIM–PGH was larger than that for TIM–2PG with, perhaps, a smaller apolar counterpart. However, the opposite was observed for ΔASA calculations made with the “open” structure of TIM as the reference conformation for the free enzyme (C3 and C4 in Table 2). This inconsistency suggests that ΔASA calculations involving the three crystallographic structures of TIM (*1YPI*, *2YPI* and *7TIM*) are not reliable for these purposes, and we will not consider the results obtained through these calculations. It is important to note that even though the crystallization medium reported for *7TIM* was the

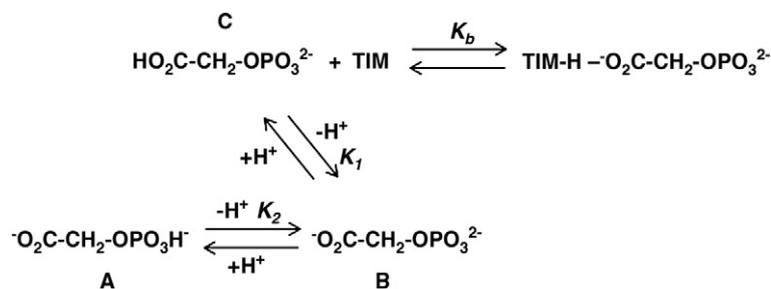


Fig. 8. Protonation/deprotonation equilibria implicated in the binding of 2-phosphoglycollate (2PG) to triosephosphate isomerase (TIM) at pH 7.4.

same as that for 1YPI (50 mM Tris, pH 7.5),^{45,46} the buffering system for 2YPI was slightly different (0.20 M Tris, pH 6.8).⁴⁷ In contrast, computations for the rigid-body binding (C1 and C2) were consistent: the buried polar area increased from TIM–2PG to TIM–PGH and the buried apolar area decreased (C2) or at least increased in similar proportions to the buried polar area (C1; Table 2). Accordingly, for both C1 and C2 calculations, all three models predicted more exothermic ΔH_b values for TIM–PGH than for TIM–2PG (Table 4). The P–L model takes water molecules within 7 Å of the ligand into account to determine ASA.²⁴ Thus, the most suitable calculation for this model is C1. In contrast, the P–P and P–C models do not consider water molecules in their ASA calculations, so C2 is more appropriate for these models.²⁵

The existence of different surface area models reflects the need to develop new parameters for systems containing functional groups that are unrepresented or under-represented in the database. In P–C systems, the contribution of polar areas was more highly weighted than in other models, which seems to be due to stronger and more abundant hydrogen bonds at the interface of P–C complexes compared to P–P interfaces.⁴⁸ In this work, the P–C model, as a whole, yields values more similar to experimental ΔH_b (at 25 °C and 0.06 M ionic strength): $-48.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ for TIM–2PG ($\Delta H_{b,\text{exp}} = -40.8 \text{ kJ mol}^{-1}$) and $-55.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ for TIM–PGH ($\Delta H_{b,\text{exp}} = -60.0 \text{ kJ mol}^{-1}$). The two other models, P–P and P–L, underestimate the exothermic ΔH_b , and their predictions are more similar to the experimental values obtained at high ionic strength. Overall, these results suggest that, in the context of surface area models, the binding of 2PG and PGH to TIM is better described by models with enhanced polar interactions, such as P–C complexes. However, at high ionic strength, where charge–charge interactions are diminished, the binding enthalpy is better described by more protein-like models.

With respect to the calculations of binding ΔC_p , of the five surface area models employed, only the one based on protein–carbohydrate complexes²⁹ gave values comparable with those that were determined experimentally, i.e. negative and of the order of hundreds of J mol^{-1} (Table 4). However, these values (about -0.2 kJ mol^{-1}) are only slightly similar to those measured at high ionic strength with NaCl, where $\Delta C_{p,\text{exp}}$ was about -1.1 kJ mol^{-1} for both complexes. As has been shown for other binding systems,^{8,9,49,50} this highly negative ΔC_p could be explained by the reduced mobility of water molecules trapped at the interface when ligands bind to proteins. Several water molecules have been identified at the binding site of the TIM–PGH complex in X-ray crystallography experiments,⁴⁵ and the influence on the enzyme activity of a cluster of them has been evaluated.⁵¹ Additionally, in the crystal structure of *Leishmania*

mexicana TIM complexed with 2PG at 0.83 Å resolution, various water molecules were found at the binding site.⁵² The less negative ΔC_p observed for both complexes at a higher ionic strength is compatible with the release of some of these water molecules to the bulk,⁵³ as the diminished activity of solvent could induce this dehydration.

Materials and Methods

Reagents

TEA, Tris, Pipes, EDTA and phosphoglycolic acid tri (monocyclohexylammonium) salt (2PG) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Phosphoglycolohydroxamic acid (PGH) was synthesized as described.⁵⁴ The purity of the cyclohexylamine salt of PGH was confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and ³¹P NMR. The concentration of the solutions of PGH and 2PG were determined by a colorimetric assay of the inorganic phosphate released by alkaline phosphatase.⁵⁵ All other reagents were obtained from commercial sources and were used without further purification.

Protein production

The over-expression and purification of TIM was done as described,⁵⁶ TIM preparation was found to be homogeneous as determined by SDS-PAGE and anion-exchange FPLC analysis. The protein concentration was determined using the absorption coefficient at 280 nm.⁵⁷

Fluorimetric titration

Fluorescence measurements were made at 25 °C in a K2 spectrofluorimeter from ISS (Champaign, IL, USA) equipped with a water-jacketed cell holder for temperature control. All experiments were done in buffer A (50 mM TEA, 5 mM EDTA, pH 7.4, 0.06 M ionic strength), filtered before each experiment. Titrations were done with 0.050 mg mL^{-1} TIM solutions in the cell with successive additions of small portions from a concentrated 2-phosphoglycollate (2PG) or phosphoglycolohydroxamate (PGH) solution. To study the effect of the ionic strength on the binding constant (K_b) of TIM with the inhibitor (2PG/PGH), we varied the concentration of NaCl from 0.10 – 1.0 M. For the higher ionic strengths, from 0.60 – 1.0 M NaCl, the concentration of TIM was increased to 0.200 mg mL^{-1} , and we augmented the inhibitor concentration accordingly. After each inhibitor addition (2PG/PGH), the fluorescence intensity at 320 nm was recorded once/s for 3 min to obtain a mean value and corrected by subtracting the buffer signal. The excitation wavelength was 280 nm. Assuming that the fluorescence intensities of the emitting species (free TIM and the TIM–inhibitor complex) are additive, we adjusted the titration data set according to the following equation:¹⁷

$$Y = \left(\frac{a}{2E_t} \right) \left[(E_t + x + K_d) - \sqrt{(E_t + x + K_d)^2 - 4xE_t} \right] \quad (6)$$

where x is the total concentration of inhibitor in the cell, E_t represents the total concentration of TIM monomers, K_d is the dissociation equilibrium constant ($K_d = 1/K_b$) and a denotes the asymptotic value to which Y tends at high x values. $Y = 1 - F/F_t$, where F is the overall fluorescence intensity after each addition of inhibitor and F_t is the fluorescence of free TIM at the corresponding concentration, respectively. We obtained K_d and a as fitting parameters from a nonlinear least-squares regression, using the program Origin (MicroCal Inc. Northampton, MA, USA).

Calorimetric titration

Calorimetric experiments were done with a high-precision ITC₂₀₀ titration calorimeter (Microcal, Inc). Most experiments were done in buffer A containing different concentrations of NaCl. TIM was equilibrated in the working buffer by dialysis and the solution was thoroughly degassed by evacuation before filling the sample cell. The final concentration of the enzyme was determined from the measurement of absorbance at 280 nm. For all titrations, the concentration of TIM in the calorimetric cell was between 0.094 and 0.28 mM of monomers. The inhibitors were dissolved in the dialysis buffer previously equilibrated with TIM to minimize dilution heats. The concentrations of inhibitor in the syringe were from 3.0 – 14 mM for 2PG and from 2.0 – 6.8 mM for PGH.

Isothermal titration calorimetry (ITC)

A typical isothermal titration consisted of a preliminary 0.3 μ l (dummy) injection followed by 25 additions of 0.9 μ l with a 4 min interval between injections. To determine the heats of dilution of the inhibitor, titrations were done with buffer alone under identical conditions in the sample cell. These values were subtracted from the measured heats of binding. The binding constant (K_b), the enthalpy change (ΔH_b) and the stoichiometry (n) were determined by nonlinear fitting of the normalized titration data based on an identical and independent binding sites model.⁵⁸ ITC experiments in the absence of NaCl were done for both complexes (TIM–2PG and TIM–PGH) using 50 mM Pipes as the buffer system under the conditions described above.

Multithermal titration calorimetry (MTC)

These studies were done as described.¹⁹ A representative experiment was started by equilibrating the sample-loaded equipment at 25 °C. After isothermally carrying out an injection program consisting of a single 0.2 μ l (dummy) addition followed by six 0.8 μ l ligand additions, the temperature was changed to 32°C and the equipment was allowed to equilibrate at this new temperature for 45 min before a single 0.2 μ l (dummy) injection and seven 1.0 μ l ligand injections were applied. Finally, this procedure was repeated at 40 °C, with a single 0.2 μ l (dummy) injection followed by four 1.5 μ l and three 3.0 μ l ligand injections. To determine the heats of dilutions for the ligand, titrations were done under identical conditions but with buffer alone in the sample cell. These values were

subtracted from the measured binding heats. A binding multitherm was constructed as the heat evolved normalized per mol of ligand injected versus the molar ratio:

$$X_t = [L]_t / [R]_t$$

where $[L]_t$ and $[R]_t$ are the total concentration of ligand and protein, respectively. By adjusting the data through a nonlinear regression to the function that describes this multitherm, it is possible to determine simultaneously the values of K_b , ΔH_b , ΔC_p and n .¹⁹ The expression applicable to the independent and identical binding sites model is:⁵⁸

$$\frac{\partial Q_p(T)}{\partial [L]_T} \frac{1}{V_0} = \Delta H_b(T) \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{X_T}{n} - \frac{1}{K_b(T)n[R]_T}}{2\sqrt{\left(1 + \frac{X_T}{n} + \frac{1}{K_b(T)n[R]_T}\right)^2 - 4\frac{X_T}{n}}} \right] \quad (7)$$

where $Q_p(T)$ is the absorbed or released binding heat and V_0 is the effective volume of the calorimeter cell. Thermal variation of $K_b(T)$ and $\Delta H_b(T)$ were taken into account using the van 't Hoff and Kirchoff relationships, respectively, with ΔC_p as a constant:¹⁹

$$K_b(T) = K_b(T^*) \exp \left[\frac{1}{R} \left(\left(\Delta H_b(T^*) - T^* \Delta C_p \right) \times \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) + \Delta C_p \ln \frac{T}{T^*} \right) \right] \quad (8)$$

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

Theoretical estimations of binding enthalpy and heat capacity

There are a number of semiempirical models that correlate the magnitude of buried surfaces areas in the interface of the formed complex, determined as the change in ASA:

$$\Delta ASA = ASA_{\text{complex}} - ASA_{\text{protein}} - ASA_{\text{ligand}}$$

with the binding enthalpy (ΔH_b) and the binding heat capacity (ΔC_p) according to the following phenomenological partitions:

$$\Delta H_b = (\Delta h_{\text{pol}} \Delta ASA_{\text{pol}}) + (\Delta h_{\text{apol}} \Delta ASA_{\text{apol}}) \quad (10)$$

$$\Delta C_p = (\Delta c_{\text{p,pol}} \Delta ASA_{\text{pol}}) + (\Delta c_{\text{p,apol}} \Delta ASA_{\text{apol}}) \quad (11)$$

in which lowercase parameters represent the contributions per unit of polar (pol) or apolar (apol) area to the thermodynamic function. The calculations of ASA were done with the program NACCESS[†], based on the Lee and Richards algorithm,^{59,60} using a probe radius of 1.4 Å and the atomic coordinates of PDB files 2YPI for TIM–2PG, 7TIM for TIM–PGH and 1YPI for free TIM. Accessible

[†] <http://wolf.bms.umist.ac.uk/naccess/>

areas in these protein structures were different for subunits A and B of TIM, so we used the mean values for calculations. Phosphorus, nitrogen and oxygen atoms were considered polar, and all other atoms were considered apolar. Table 3 shows the values reported in the literature for Δh_{pol} , Δh_{apol} , $\Delta c_{\text{p,pol}}$, and $\Delta c_{\text{p,apol}}$ that have been obtained from protein folding, solute transfer and protein binding data. Both the TIM-2PG and TIM-PGH complexes were analyzed for ligand-protein contacts using the LPC algorithm.²³

Circular dichroism

Ellipticity measurements were performed using a JASCO J-175 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD) equipped with a PTC-348WI Peltier-type cell holder for temperature control. Thermal denaturation transitions of 0.015 mg mL⁻¹ TIM in 50 mM Tris (pH 7.4) were obtained at different concentrations (0.0–1.0 M) of either NaCl or NaH₂PO₄/Na₂HPO₄. Each transition was followed by continuously monitoring the ellipticity changes at 220 nm, while the sample temperature was increased at 2.0 °C min⁻¹ in a 1.00 cm pathlength cell with continuous stirring. Temperature within the cell was measured with the external probe of the cell holder. Fractions of denatured enzyme (f_D) at each temperature were calculated using the following expression:

$$f_D = \frac{\theta_T - \theta_N}{\theta_D - \theta_N} \quad (12)$$

where θ_T is the ellipticity measured at each temperature and θ_N and θ_D are the ellipticities of the native and denatured TIM, respectively. We made linear adjustments of the pre- and post-transition data to estimate θ_N and θ_D for the entire temperature range scanned.

Electrostatic calculations

The total electrostatic energies of native TIM (PDB ID 1YPI) at different pH and ionic strength values were calculated using the numerical solution to the nonlinear Poisson-Boltzmann equation implemented in program APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver).¹⁶ Dielectric constants of 78 and 4 were used for water and protein, respectively. Ionic radii and atomic charges were assigned from the forcefield PARSE,⁶⁰ and terminal amino and carboxyl groups were taken as neutral. PROPKA⁶¹ was used to assign the protonation state of ionizable residues for each pH evaluated.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACyT, México) by grant numbers 46166 and 61044 and by scholarship number 193744 to INS. We are very grateful to the reviewers for their perceptive comments that improved this work.

References

- Freire, E. (2008). Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? *Drug Discov. Today*, **13**, 869–874.
- Murphy, K. P. & Freire, E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Protein Chem.* **43**, 313–361.
- Luque, I. & Freire, E. (1998). Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods Enzymol.* **295**, 100–127.
- Daum, S., Fanghänel, J., Wildemann, D. & Schiene-Fischer, C. (2006). Thermodynamics of phosphopeptide binding to the human peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase Pin1. *Biochemistry*, **45**, 12125–12135.
- Nielsen, P. K., Bønsager, B. C., Berland, C. R., Sigurskjold, B. W. & Svensson, B. (2003). Kinetics and energetics of the binding between barley α -amylase/subtilisin inhibitor and barley α -amylase 2 analyzed by surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Biochemistry*, **42**, 1478–1487.
- Stites, W. E. (1997). Protein-protein interactions: interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis. *Chem. Rev.* **97**, 1233–1250.
- Milev, S., Bjelić, S., Georgiev, O. & Jelesarov, I. (2007). Energetics of peptide recognition by the second PDZ domain of human protein tyrosine phosphatase 1E. *Biochemistry*, **46**, 1064–1078.
- Katragadda, M., Morikis, D. & Lambris, J. D. (2004). Thermodynamic studies on the interaction of the third complement component and its inhibitor, compstatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 54987–54995.
- Holdgate, G. A., Tunnicliffe, A., Ward, W. H., Weston, S. A., Rosenbrock, G., Barth, P. T. *et al.* (1997). The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry*, **36**, 9663–9673.
- Bjelić, S. & Jelesarov, I. (2008). A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry. *J. Mol. Recogn.* **21**, 289–311.
- Honig, B. & Nicholls, A. (1995). Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science*, **268**, 1144–1149.
- Dong, F., Olsen, B. & Baker, N. A. (2008). Computational methods for biomolecular electrostatics. *Methods Cell Biol.* **84**, 843–870.
- Gallagher, K. & Sharp, K. (1998). Electrostatic contributions to heat capacity changes of DNA-ligand binding. *Biophys. J.* **75**, 769–776.
- Joseph-McCarthy, D., Lolis, E., Komives, E. A. & Petsko, G. A. (1994). Crystal structure of the K12M/G15A triosephosphate isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site. *Biochemistry*, **33**, 2815–2823.
- Lodi, P. J., Chang, L. C., Knowles, J. R. & Komives, E. A. (1994). Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of lysine-12. *Biochemistry*, **33**, 2809–2814.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 10037–10041.
- González-Mondragón, E., Zubillaga, R. A., Saavedra, E., Chánez-Cárdenas, M. E., Pérez-Montfort, R. &

- Hernández-Arana, A. (2004). Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry*, **43**, 3255–3263.
18. Fukada, H. & Takahashi, K. (1998). Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **33**, 159–166.
 19. Chavelas, E. A., Zubillaga, R. A., Pulido, N. O. & García-Hernández, E. (2006). Multithermal titration calorimetry: a rapid method to determine binding heat capacities. *Biophys. Chem.* **120**, 10–14.
 20. Xiang, J., Jung, J. Y. & Sampson, N. S. (2004). Entropy effects on protein hinges: the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **43**, 11436–11445.
 21. Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, **350**, 121–124.
 22. Williams, J. C. & McDermott, A. E. (1995). Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated. *Biochemistry*, **34**, 8309–8319.
 23. Sobolev, V., Sorokine, A., Prilusky, J., Abola, E. E. & Edelman, M. (1999). Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics*, **15**, 327–332.
 24. Luque, I. & Freire, E. (2002). Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **49**, 181–190.
 25. García-Hernández, E. & Hernández-Arana, A. (1999). Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: comparison with protein-folding energetics. *Protein Sci.* **8**, 1075–1086.
 26. Spolar, R. S. & Record, M. T., Jr (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science*, **263**, 777–784.
 27. Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M. (1995). Denaturant *m* values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* **4**, 2138–2148.
 28. Makhataдзе, G. I. & Privalov, P. L. (1995). Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.* **47**, 307–425.
 29. García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., Chavelas-Adame, E. A., Vázquez-Contreras, E., Rojo-Domínguez, A. & Costas, M. (2003). Structural energetics of protein-carbohydrate interactions: insights derived from the study of lysozyme binding to its natural saccharide inhibitors. *Protein Sci.* **12**, 135–142.
 30. Zhang, Y. & Cremer, P. S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 658–663.
 31. Lambeir, A. M., Opperdoes, F. R. & Wierenga, R. K. (1987). Kinetic properties of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* **168**, 69–74.
 32. González-Mondragón, E., Zubillaga, R. A. & Hernández-Arana, A. (2007). Effect of a specific inhibitor on the unfolding and refolding kinetics of dimeric triosephosphate isomerase: establishing the dimeric and similarly structured nature of the main transition states on the forward and backward reactions. *Biophys. Chem.* **125**, 172–178.
 33. Ledvina, P. S., Tsai, A. L., Wang, Z., Koehl, E. & Quiocho, F. A. (1998). Dominant role of local dipolar interactions in phosphate binding to a receptor cleft with an electronegative charge surface: equilibrium, kinetic, and crystallographic studies. *Protein Sci.* **7**, 2550–2559.
 34. Collins, K. D. (1974). The use of phosphoglycolohydroxamate as a stable analogue of a transiently occurring dihydroxyacetone phosphate-derived enolate in enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.* **249**, 136–142.
 35. Hartman, F. C., LaMuraglia, G. M., Tomozawa, Y. & Wolfenden, R. (1975). The influence of pH on the interactions of inhibitors with triosephosphate isomerase and determination of the pK_a of the active-site carboxyl group. *Biochemistry*, **14**, 5274–5279.
 36. Donnini, S., Villa, A., Groenhof, G., Mark, A. E., Wierenga, R. & Juffer, A. H. (2008). Inclusion of ionization states of ligands in affinity calculations. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **76**, 138–150.
 37. Campbell, I. D., Jones, R. B., Kiener, P. A., Richards, E., Waley, S. G. & Wolfenden, R. (1978). The form of 2-phosphoglycolic acid bound by triosephosphate isomerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 347–352.
 38. Alahuhta, M. & Wierenga, R. (2010). Atomic resolution crystallography of a complex of triosephosphate isomerase with a reaction-intermediate analog: new insight in the proton transfer reaction mechanism. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **78**, 1878–1888.
 39. Campbell, I. D., Jones, R. B., Kiener, P. A. & Waley, S. G. (1979). Enzyme-substrate and enzyme-inhibitor complexes of triose phosphate isomerase studied by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Biochem. J.* **179**, 607–621.
 40. MacInnes, D. A. & Shedlovsky, T. (1932). The determination of the ionization constant of acetic acid, at 25°, from conductance measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **54**, 1429–1438.
 41. Manning, G. S. (1978). The molecular theory of electrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q. Rev. Biophys.* **11**, 179–246.
 42. Lohman, T. M., deHaseth, P. L. & Record, M. T. (1980). Pentalysine-deoxyribonucleic acid interactions: a model for the general effects of ion concentrations on the interactions of proteins with nucleic acids. *Biochemistry*, **19**, 3522–3530.
 43. Horn, J. R., Russell, D., Lewis, E. A. & Murphy, K. P. (2001). van't Hoff and calorimetric enthalpies from isothermal titration calorimetry: are there significant discrepancies? *Biochemistry*, **40**, 1774–1778.
 44. Baker, B. M. & Murphy, K. P. (1996). Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophys. J.* **71**, 2049–2055.
 45. Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A. & Ringe, D. (1991). Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry*, **30**, 5821–5826.
 46. Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. & Petsko, G. A. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*, **29**, 6609–6618.
 47. Lolis, E. & Petsko, G. A. (1990). Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate

- isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5-Å resolution: implications for catalysis. *Biochemistry*, **29**, 6619–6625.
48. García-Hernández, E., Zubillaga, R. A., Rodríguez-Romero, A. & Hernández-Arana, A. (2000). A stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology*, **10**, 993–1000.
 49. Bergqvist, S., Williams, M. A., O'Brien, R. & Ladbury, J. E. (2004). Heat capacity effects of water molecules and ions at a protein-DNA interface. *J. Mol. Biol.* **336**, 829–842.
 50. Guinto, E. R. & Di Cera, E. (1996). Large heat capacity change in a protein-monovalent cation interaction. *Biochemistry*, **35**, 8800–8804.
 51. Zhang, Z., Komives, E. A., Sugio, S., Blacklow, S. C., Narayana, N., Xuong, N. H. *et al.* (1999). The role of water in the catalytic efficiency of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **38**, 4389–4397.
 52. Kursula, I. & Wierenga, R. K. (2003). Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **278**, 9544–9551.
 53. Li, Z. & Lazaridis, T. (2007). Water at biomolecular binding interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 573–581.
 54. Weber, P., Fonvielle, M. & Therisod, M. (2003). New facile synthesis of phosphoglycolohydroxamic acid and other phosphoglycolic acid derivatives. *Tetrahedron Lett*, **44**, 9047–9049.
 55. Ames, B. N. (1966). Assay of inorganic phosphates, total phosphate and phosphatase. *Methods Enzymol.* **8**, 115–118.
 56. Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R. A., Mendoza-Hernández, G., Costas, M. & Fernández-Velasco, D. A. (2000). Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept. Lett.* **7**, 57–64.
 57. Norton, I. L. & Hartman, F. C. (1972). Haloacetyl phosphates. A comparative study of the active sites of yeast and muscle triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **11**, 4435–4441.
 58. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131–137.
 59. Lee, B. & Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* **55**, 379–400.
 60. Sitkoff, D., Sharp, K. A. & Honig, B. (1994). Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. *J. Phys. Chem.* **98**, 1978–1988.
 61. Li, H., Robertson, A. D. & Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and interpretation of protein pK_a values. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **61**, 704–721.