

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

INTERACCIONES ELÉCTRICAS EN MACROMOLÉCULAS
Relación estructura-función en complejos biomoleculares

MARCELO DANIEL COSTABEL

1998

Este trabajo para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido llevado a cabo en el Departamento de Física de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca), y en el IFLYSIB (Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos) de la ciudad de La Plata, bajo la dirección del Profesor Doctor J. Raúl Grigera.

DEDICACIÓN

A Nancy, por su compañía, su paciencia y su Amor, y por ser mi refugio en todo momento y lugar.

A Macarena, Lucas y Agustín, mis tres soles que alegran cada día de mi vida.

A mis padres, Norman y Zulema, que me enseñaron el valor de la educación y la moral en el camino de la vida.

AGRADECIMIENTOS

Decir gracias es una tarea grata pero no sencilla e implica distintos aspectos, como el profesional y el particular.

Es una parte importante en todo lo que uno emprenda en la vida y siento el deber de realizarla con responsabilidad y afecto sincero.

Ante todo gracias a mi director , el Profesor Dr. J. Raúl Grigera por haberme permitido trabajar bajo su dirección, lo que realmente es un orgullo para mí, y con quien he adquirido mucho más que un aprendizaje profesional gracias a la cordial amistad que me ha brindado.

A Diego Guérin, sobre todo un gran amigo, quien ha participado de manera especial en la realización de este trabajo, y a quien debo gran parte de mi crecimiento profesional.

A Diego Vallejo por su colaboración en este trabajo, pero sobre todo por haber encontrado en él un gran amigo.

Gracias a todos quienes durante todo este tiempo han compartido conmigo un mate, o una charla, haciendo más placentera esta actividad: Al Fino, por tantos ratos buenos pasados. A Gabriela y Débora por aquellos primeros tiempos. A Zulma, por sus consejos y su ayuda sincera. A Elbio, Néstor, Walter, Virginia, Graciela, Cristina, María Marta, Oscar, Héctor, y tantos otros que están cada vez que uno los necesita.

A quienes han compartido conmigo una cátedra, como alumnos o docentes, y desde su lugar han estimulado mi trabajo.

A la gente del IFLYSIB, por haber hecho agradable mis estadías en La Plata.

Al Director del Departamento de Física de la UNS, Dr. Alfredo Juan, y en su nombre al personal de esa Unidad Académica, por el apoyo brindado durante este tiempo.

Gracias a mi familia por su aliento y su apoyo constante.

Gracias a Dios, por poder decir tantas veces gracias.

ÍNDICE

DEDICACIÓN	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN:	1
CAPÍTULO 2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA MACROMOLÉCULA. ASPECTO TEÓRICO.	5
2.1 PRINCIPIOS DE LA ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS:	5
2.2 CRISTALOGRAFÍA DE PROTEÍNAS	10
2.3 INTERACCIONES ELÉCTRICAS EN MACROMOLÉCULAS	38
CAPÍTULO 3. ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL COMPLEJO PAPAÍNA-LEUPEPTINA.	51
3.1 PAPAÍNA Y LEUPEPTINA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.	51
3.2 ANÁLISIS CRISTALOGRAFÍCO DEL COMPLEJO PAPAÍNA- LEUPEPTINA.	53
3.3 CÁLCULO DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO DE LA INTERACCIÓN PAPAÍNA-LEUPEPTINA.	67
CAPÍTULO 4. ELECTROSTÁTICA DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA FOSFOLIPASA A ₂ Y UNA MEMBRANA LIPÍDICA	72
4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA FOSFOLIPASA A ₂ DE PANCREAS PORCINO.	72
4.2 CÁLCULO DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO DE LA INTERACCIÓN PLA ₂ Y UNA MEMBRANA LIPÍDICA DE DIMYRISTOYL FOSFATIDILCOLINA.	73
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.	79
REFERENCIAS	83

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN:

Conocer la estructura de una macromolécula sin ninguna información acerca de su función es como conocer un edificio sin saber nada sobre su uso o acerca de sus habitantes. Esto puede resultar informativamente interesante pero por supuesto por demás incompleto.

Qué características de la estructura terciaria son requeridas para una función en particular o cuáles pueden ser irrelevantes suele ser una pregunta crucial en el análisis de una macromolécula biológica.

En general sólo una pequeña porción de la estructura parece necesaria para la función de muchas proteínas pero es lícito pensar que es toda la secuencia la que en realidad cumple un rol funcional, o participa del mismo de forma indirecta.

Si una macromolécula interactúa con otra, uno quiere conocer de que manera es afectada dicha interacción por la presencia de determinadas zonas dentro de la estructura de alguno de los sistemas en relación.

Un aspecto interesante es que muchas de las funciones de grandes moléculas pueden ser localizadas en una zona limitada de la estructura, por lo cual aquella pregunta crucial acerca del rol funcional puede ser restringida a un estudio de la región en cuestión, observando aquellos residuos de la macromolécula que contactan la molécula que se une, y determinando si alguno de ellos está posicionado de manera de sugerir un rol catalítico.

Una pregunta de suma importancia es si la unión es acompañada de un cambio

estructural significativo en alguna de las moléculas que intervienen en la interacción. Por ejemplo, muchas moléculas existen en diferentes conformaciones, siendo sólo una de ellas la funcionalmente importante; pero en otros casos se puede verificar que la molécula es estructuralmente estable. Todo esto nos indica la necesidad e importancia de observar las moléculas tanto en su forma nativa como así también en su rol funcional.

Puede ocurrir incluso que no se observen cambios importantes en la estructura terciaria, pero sí la necesidad de la presencia de un cofactor que no implique modificaciones estructurales pero que altere propiedades físicas en el entorno del sitio de unión.

Así como cada enzima cumple con su rol catalítico, hay circunstancias en las cuales la actividad debe ser regulada de manera que no se torne contraproducente para el organismo en donde actúa. La presencia de inhibidores cumple en gran medida con este objetivo disminuyendo el número de moléculas en condiciones de cumplir con su acción específica.

Es por esto que el estudio estructural de los complejos enzima-inhibidores también resultan de suma importancia en el análisis funcional.

Muchas de las preguntas que nos hacemos no pueden ser contestadas o su respuesta puede ser inferida indirectamente por medio de un análisis riguroso.

Por otra parte son innumerables las técnicas de análisis de macromoléculas de interés biológico que nos permiten arribar a las respuestas de algunas cuestiones que surgen. Un enfoque por demás interesante lo brinda el cálculo de las interacciones eléctricas entre macromoléculas.

En este marco casi podríamos afirmar que el electromagnetismo es la fuerza

de la Química. Junto con las consecuencias de la mecánica cuántica y la estadística, las fuerzas electromagnéticas mantienen las estructuras y conducen gran número de los procesos biofísicos en los seres vivos. Debido a la naturaleza de largo rango de la interacción coulombica, la electrostática juega un rol vital y particular en las interacciones intra e inter moleculares.

Las interacciones intramoleculares son complicadas por los efectos cuánticos. Por ejemplo las uniones covalentes y las distribuciones electrónicas requerirían una descripción no clásica. No obstante con un fuerte componente electrostático se pueden describir propiedades de conformación y disociación molecular; y por otra parte la polarizabilidad cumple una función importante en los puentes hidrógeno.

Las interacciones intermoleculares son dominadas por fuerzas electrostáticas. El conocimiento de estas interacciones son importantes debido a que constituyen el paso inicial de procesos biomoleculares. Es este proceso de interacción primaria el que puede determinar muchas veces la funcionalidad de moléculas que se mueven en solución.

De esta manera pueden describirse procesos de difusión de macromoléculas en donde los constituyentes pueden ser una enzima y su substrato, dos proteínas que transfieren electrones, una enzima que interactúa con una membrana lipídica, o un ión y un canal.

Un conocimiento de la interacción inicial es críticamente importante en un número de situaciones. Por ejemplo, en algunos casos puede elucidarse la orientación de las moléculas, lo que resulta importante en la reacción química.

En el presente trabajo se aborda un estudio cristalográfico del sitio activo de la enzima cisteínica papaína en complejo con uno de sus inhibidores. El estudio incluye el

proceso de cristalización, con diferentes métodos y seguimientos de la evolución de los cristales; colección parcial de datos de difracción, a partir de los cuales se determinan los parámetros de celda del complejo. Refinamiento de la posición del inhibidor en el sitio activo conjuntamente con la ubicación de moléculas de agua en el mismo.

Posteriormente, y a partir de las coordenadas cristalográficas se realiza un cálculo de la interacción electrostática en el proceso de unión de la Leupeptina con la Papaína.

La última parte comprende el cálculo del potencial electrostático de la Fosfolipasa A₂ de pancreas porcino a una membrana lipídica, observándose la importancia del ión Calcio en la actividad catalítica de la enzima.

CAPÍTULO 2.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA MACROMOLÉCULA. ASPECTO TEÓRICO.

2.1 PRINCIPIOS DE LA ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS:

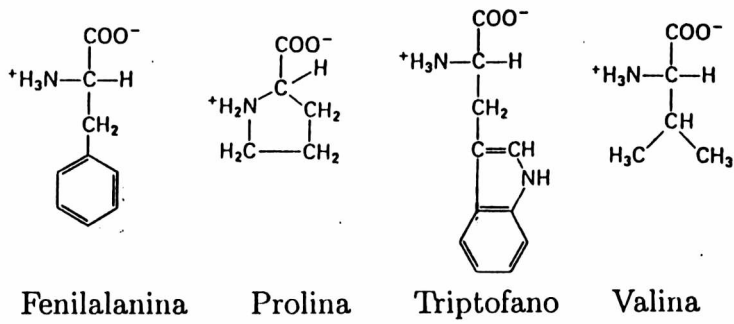
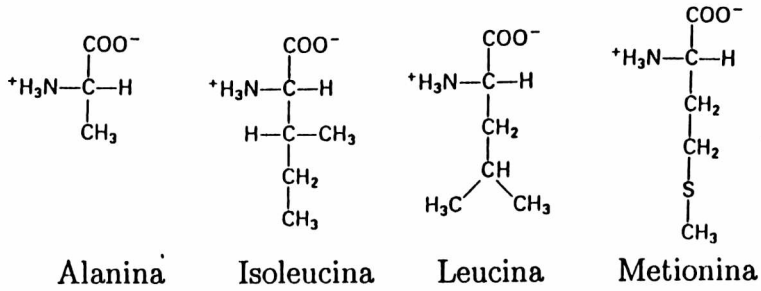
Las proteínas tienen, dentro de los distintos sistemas vivientes, diferentes funciones. Actúan como catalizadores, hormonas, transportadores, proteínas estructurales, etc. Esta diversificación en su actividad radica, fundamentalmente en su estructura. De todas maneras, los principios que gobiernan la estructura de las proteínas son relativamente sencillos y comunes a todas ellas.⁵

Las proteínas se construyen con 21 aminoácidos diferentes, los cuales se conectan como polímeros lineales y se pliegan para dar la estructura tridimensional.

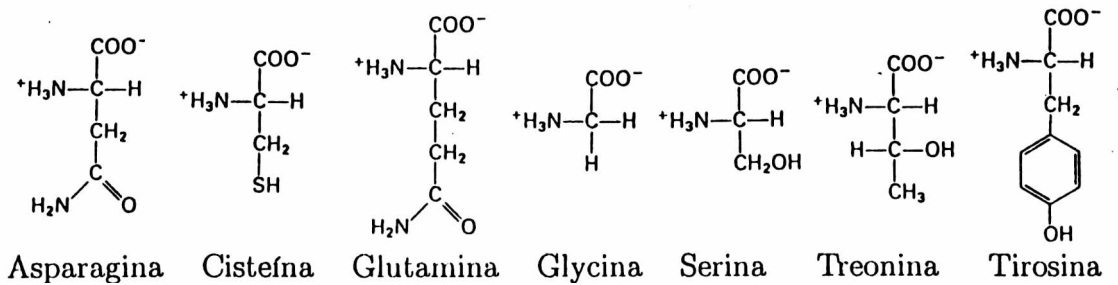
La fórmula general para un aminoácido es $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$. El carbono central se denomina carbono α , los grupos unidos al mismo se denominan α -amino y α -carboxilo, y los átomos en el grupo R se identifican con las letras β, γ, δ , etc. (figura 1).

Cada aminoácido tiene una distribución tetrahédrica de uniones alrededor del carbono α lo que permite la posibilidad de dos isómeros (L y D), que son imágenes espejo de la misma estructura. Con excepción de uno de ellos (la glicina), todos los aminoácidos tienen, en las proteínas, una configuración L.

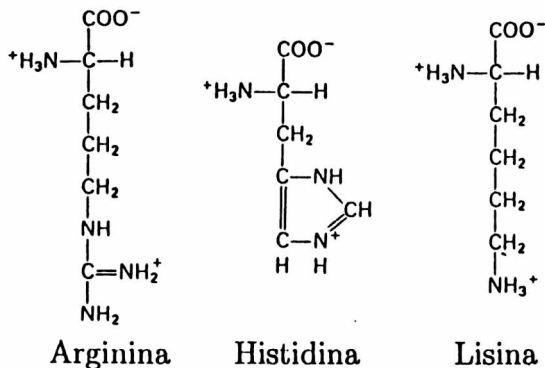
AMINOÁCIDOS HIDROFÓBICOS NO POLARES



AMINOÁCIDOS POLARES NO CARGADOS



AMINOÁCIDOS CON CARGA (+)



AMINOÁCIDOS CON CARGA (-)

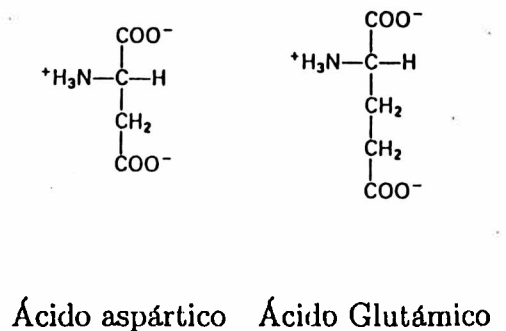


figura 1: estructura de los aminoácidos

En realidad el aspecto funcional de cada aminoácido está dado por el grupo R, el cual conferiere a la proteína características fisicoquímicas determinadas. Es así que dividimos los aminoácidos en polares o no polares y dentro de los primeros en cargados positiva o negativamente. Cuando grupos cargados se encuentran cercanos, se produce una interacción de tipo electrostático, mientras que las cadenas no polares tienden a juntarse en un medio acuoso, por su hidrofobicidad.

El orden de los residuos en una cadena de aminoácidos constituye lo que se conoce como estructura primaria de la proteína.

El conocimiento de esta estructura primaria es crítico en estudios biofísicos posteriores. Uno de estos es el caso de la cristalografía de rayos X, en donde resulta de primordial utilidad el conocimiento de la secuencia de aminoácidos para el trazado de la cadena polipeptídica.

La determinación de esta secuencia de aminoácidos es una técnica bien establecida que, en casos favorables no necesita demasiada participación humana y resulta un procedimiento de rutina.

Ahora bien, el primer paso luego de encontrar la secuencia resulta en buscar si existen uniones entre diferentes partes de dicha secuencia, una de cuyas expresiones más características son los puentes disulfuro, formados por la oxidación de pares de cisteínas, y resultando en lo que se conoce como cistinas. De este modo la presencia de cistinas impone una fuerte restricción en una estructura proteica, confiriéndole mayor grado de estabilidad.

Por otra parte, la conformación de una cadena polipeptídica y el esquema de puentes hidrógeno entre las diferentes zonas de la cadena es conocida como su estructura

secundaria.

Quizás la figura más conocida de estructura secundaria en una cadena polipeptídica es la α hélice. La característica básica de esta conformación es la localización de 3.6 residuos por vuelta y una traslación a lo largo del eje de la hélice de 1.5 Å por residuo. El diámetro, despreciando las cadenas laterales es de aproximadamente 6 Å. Todas las cadenas laterales de las α hélices apuntan hacia afuera y la rotación está dada en el sentido de la mano derecha. (figura 2.a).

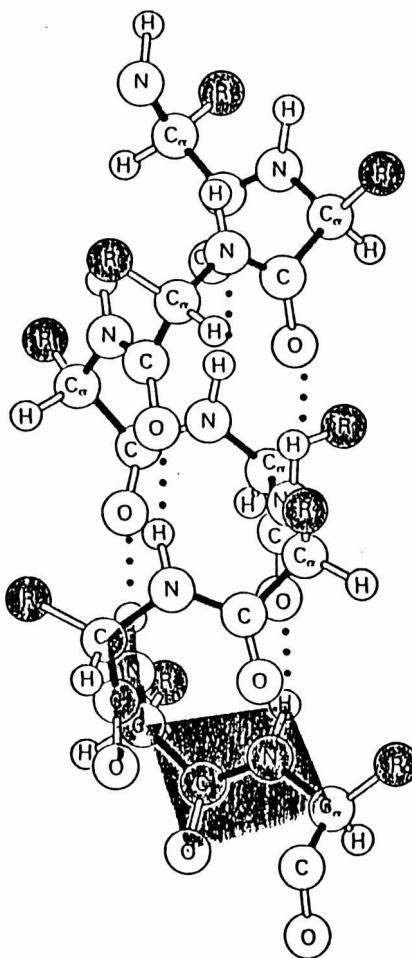


figura2a: estructura de una hélice α

La otra configuración por demás común en una estructura proteica es la lámina β . Esta estructura presenta una topología plana estabilizada por puentes hidrógeno

establecidos entre aminoácidos de regiones distintas. (figura 2.b).

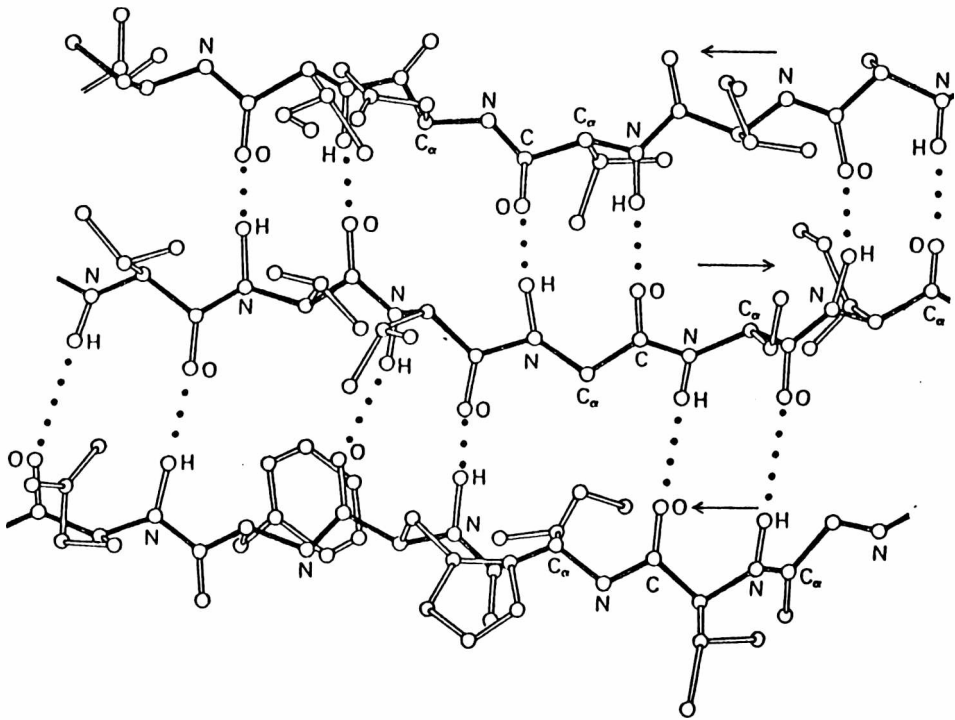


figura 2b: estructura de una lámina β

Existen, además otras estructuras conformadas, en general, por distorsiones de las ya mencionadas, y zonas de unión de hélices y láminas, que no poseen una conformación rígida y se conocen con el nombre de "vueltas".

Plegados y acomodados los diferentes motivos estructurales resulta un arreglo tridimensional: la estructura terciaria, siendo este el objetivo final de un análisis cristalográfico.

Este arreglo tridimensional, posee características de empaquetamiento a pequeña escala de modo de constituir dominios que representan unidades semiindependientes

identificados por su plegamiento, recombinación evolutiva o su movimiento rígido.

Es así que, aunque cada estructura proteica es individual en muchos de sus aspectos significativos, podemos relacionar morfológicamente los dominios y más aún a las proteínas mismas y de esta manera clasificarlas de acuerdo a que presenten mayoría de plegamientos α , β , combinaciones de los mismos o sean mayoritariamente irregulares.¹⁰

2.2 CRISTALOGRAFÍA DE PROTEÍNAS

2.2.1 Poder y limitaciones. La cristalografía de Rayos X, constituye sin duda alguna el método más poderoso para la resolución de moléculas biológicas de gran tamaño, pero el logro del objetivo final es alcanzado sólo bajo circunstancias favorables, como así también con información adicional como la secuencia aminoacídica de la macromolécula.

El producto final del método es una gráfica de la densidad electrónica en la celda unidad.

En estudios cristalográficos de pequeñas moléculas esta función es a menudo suficientemente detallada para permitir la resolución de una estructura sin información previa. Con proteínas no obstante, otro tipo de información es usualmente indispensable para la completa identificación de la cadena polipeptídica.

Algunas de las mayores limitaciones del método son de naturaleza práctica:

En primer lugar la necesidad de cristalizar el material de interés, y posteriormente la necesidad de que el crecimiento del cristal debe ser tal que el mismo alcance dimensiones mayores a 0.2 mm en cada dirección.²²

Una limitación de la cristalografía, inherente al fenómeno de difracción es que la función densidad electrónica resultante es un promedio sobre la celda unidad y sobre

el tiempo de duración del experimento.

$$\rho(x, y, z)_{\text{observados}} = \langle \langle \rho(x, y, z) \rangle \rangle_{N \text{ celdas unidad}} \text{ tiempo}$$

Esto indica que la cristalografía puede llevar consigo poca información de la funcionalidad y que el potencial total de los métodos cristalográficos pueden ser alcanzados sólo cuando se combine con otros tipos de experimentos o métodos de cálculo.

En los primeros tiempos de la cristalografía de rayos X una de las principales dudas fue acerca de la diferencias que pueden encontrarse en la conformación de proteínas en cristales con respecto a su conformación en solución.

Esta discusión ha sido ampliamente resuelta por distintos tipos de evidencias. La primera es la similitud que existe en la estructura que existe para una misma molécula cristalizada en diferentes formas cristalinas, como es el caso de la Papaína, lo cual indicaría que las fuerzas internas debidas al cristal no deforman significativamente la estructura molecular.

Aunque quizás la evidencia más fuerte está dada por la retención de actividad en enzimas que fueron cristalizadas, como así también la interacción de substratos o inhibidores que se combinan con moléculas en estado cristalino⁴⁶; no obstante debe aclararse que la velocidad de reacción en este último caso es mucho más lenta, lo cual puede ser adjudicado a limitaciones en el acceso al sitio activo o por la reducción en la movilidad conformacional.

Un párrafo aparte merece el análisis estructural de macromoléculas en solución, a partir de resonancia magnética nuclear (RMN). Esta técnica aporta datos por demás importantes en el aspecto estructural que cotejados con los ofrecidos por rayos X muestran una similitud notable, a pesar de que es válido acotar que existen casos en los

cuales las estructuras propuestas difieren en gran medida. No obstante esto, la combinación de las técnicas resultan de gran utilidad en la búsqueda del objetivo final, que es la resolución de la estructura tridimensional de una molécula biológica.

2.2.2 Cristalogénesis de macromoléculas Biológicas. La palabra cristal deriva de la raíz griega "krystallos" que significa hielo claro. Como el hielo, los cristales son químicamente bien definidos, y a menudo son geoméricamente regulares, lo cual probablemente explica por qué la cristalinidad, aunque en sentido figurado, es considerado como un símbolo de la perfección y la pureza.

Desde el punto de vista físico, los cristales son arreglos regulares tridimensionales de átomos, moléculas o ensambles moleculares. Cristales ideales pueden ser imaginados como arreglos infinitos y perfectos en los cuales las unidades se acomodan de acuerdo a simetrías bien definidas dentro de celdas que son repetidas tridimensionalmente por traslación.

Los cristales experimentales, no obstante, tienen dimensiones finitas, con dislocaciones que interrumpen su perfección. El fenómeno de periodicidad de los cristales se refleja también en sus propiedades físicas macroscópicas, cuyo ejemplo más notorio y directo es la capacidad de los mismos para difractar los rayos X.

La simetría de los cristales forma en sí misma un aspecto fascinante. El estudio de la forma externa de los cristales provee el lógico punto de partida para el conocimiento de la simetría cristalina. Una mirada bajo el microscopio muestra que los cristales exhiben caras y bordes arreglados con algún grado de simetría, que están relacionados al arreglo periódico de moléculas en el cristal.

Para conocer este acomodamiento de moléculas en la red cristalina debemos conocer algunas definiciones:

Red espacial: es un arreglo de puntos tal que cada punto esta en el mismo entorno y en la misma orientación que cualquier otro.

Celda unidad: es definida como el paralelepípedo mínimo con el cual puede ser construido el volumen total del cristal por ensamble regular del mismo. Los bordes son definidos por tres vectores : a, b, c , y el ángulo entre estos vectores definidos como α, β, γ . (figura 3).

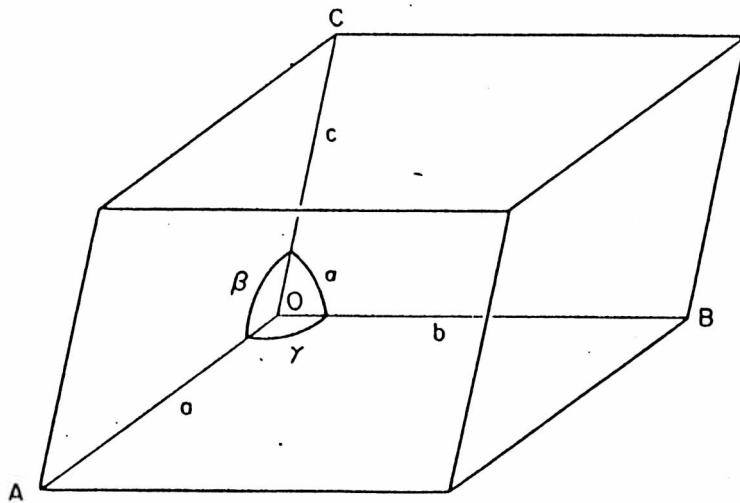


figura 3: celda unidad característica

Unidad asimétrica: es el objeto básico repetitivo que está relacionado a otros idénticos dentro de la celda unidad por operaciones de simetría.

Para una particular elección de la celda unidad, es posible definir un plano, paralelo a una de las caras del cristal el cual corta en $a/h, b/k, c/l$, donde h, k, l son números enteros.

Estos últimos son los denominados *Índices de Miller*, y se utilizan en difracción de rayos X, para indicar reflexiones.

Conocida la simetría externa del cristal podemos, ahora, considerar los posibles operadores de simetría para la red cristalina.

En un exámen de varios cristales de la misma sustancia se ve que, aunque tienen formas similares, algunas de las caras pueden ser asociadas a diferentes formas cristalinas.

En un cristal ideal podemos ubicar un punto desde el cual trazar líneas perpendiculares a cada una de las caras del cristal; este grupo de líneas representan la simetría externa del cristal, e indican que hemos encontrado el conjunto de operadores que aseguran que cada punto en la estructura es llevado a su posición original por operación de elementos de simetría. Este concepto de una simetría de grupo puntual lleva a las *treinta y dos clases de simetría*. Existen tres tipos básicos de operadores de simetría.

(a) *plano espejo* (m): reflexión a través de un plano de simetría.

(b) *eje de rotación* (x): Una rotación de grado x rota un objeto $\frac{360}{x}$ alrededor del eje; donde x puede ser 1,2,3,4 o 6.

(c) *inversión alrededor de un punto* (\bar{x}): operación que indica la inversión a través de un centro.

En base a su más alto grado de simetría rotacional presente, los cristales pueden ser agrupados en *siete sistemas cristalinos*, y, en combinación a estos y de acuerdo a la ubicación de los puntos dentro de la red se determinan las posibles *catorce redes de Bravais* de un cristal: *Triclínico*(P), *Monoclínico*(P, C), *Ortorrómico*(P, C, I, F), *Trigonal*(R), *Tetragonal*(P, I), *Hexagonal*(C) y *Cúbico*(P, I, F).

El conjunto de elementos de simetría que forman un grupo puntual describe la simetría de un cristal como un todo y puede ser reconocido de la forma externa del cristal. Ahora bien, existen arreglos internos que permitan la misma simetría externa en un cristal?

En el caso de la simetría interna, consideraremos el conjunto de operaciones autoconsistentes tales que alguna operación de simetría o traslación de red llevan al resto de operaciones restantes al mismo lugar. Existen, por lo tanto dos operadores de simetría de traslación:

(i) *plano de deslizamiento*: la estructura es reflejada a través de un plano y trasladada paralela al mismo.

(ii) *eje tornillo*: la estructura es rotada un ángulo correspondiente al eje de rotación y trasladada paralela al mismo.

El resultado de estas operaciones es una estructura que continúa indefinidamente en el espacio y resulta en un cristal terminado en el lado opuesto del eje; pero, como la traslación es de dimensión molecular, no se evidencia en el aspecto externo del cristal.

La combinación de los elementos de simetría externos, representados por las treinta y dos clases, y los elementos de simetría internos, representados por las catorce redes de Bravais y los operadores de traslación, llevan a un número finito de *grupos espaciales*. El número total es de 230, pero como las moléculas biológicas son enantiomorfas necesitamos considerar sólo 65 de los mismos.

Los cristales representan uno de los mas fascinantes y maravillosos ejemplos de orden y simetría en la naturaleza, con características llamativas como su gran fragilidad; fragilidad que es consecuencia de la debilidad de las interacciones intermoleculares

dentro del cristal, como así también del alto contenido de solvente en los mismos. Este alto contenido del solvente (que puede llegar al 80% del volumen total), permite además la difusión de pequeñas moléculas dentro de la estructura, lo cual ha permitido en algunos casos verificar reacciones enzimáticas dentro de redes cristalinas.

La cristalización de proteínas es determinada por su solubilidad, y por los factores cinéticos que controlan la nucleación y el crecimiento. Para cristalización, una proteína en solución es llevada a un punto de saturación, y una vez que la cristalización comienza el sistema se mueve hacia el equilibrio, hasta alcanzarlo. La concentración de la proteína en el equilibrio es una compleja función de un número de factores, tales como temperatura, pH, solventes, concentración, etc. El tamaño del cristal depende también del grado de saturación y de la cinética de nucleación.

Termodinámicamente el estado de un sistema en el equilibrio se describe por medio de la temperatura, presión y composición. La regla de fase determina el número de grados de libertad, f , en función de variables de estado. $f = c - p + 2$, donde c es el número de componentes y p es el número de fases. A presión y temperatura constantes: $f = c - p$.

Es sabido que las proteínas son complejos polielectrolitos con cargas positivas y negativas. A bajas concentraciones de sal, la molécula de proteína es rodeada por una atmósfera aniónica descrita por la teoría de Debye-Hückel¹⁷ con un exceso de iones opuestos a su carga neta. Este apantallamiento decrece la energía libre electrostática de la proteína por lo cual decrece su actividad y aumenta su solubilidad.

Para proteínas iónicas la solubilidad se describe por⁵³: $\ln\left(\frac{s_2}{s_{2,w}}\right) = \frac{Z^2 \epsilon^2 N \kappa}{2DRT(1+\kappa a)}$

donde Z es la carga neta de la proteína, ϵ es la carga electrónica, N es el número

de Avogadro, D es la constante dieléctrica del medio, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura termodinámica, a es la suma del radio del ion proteína y el promedio del ion del electrolito en la solución, y κ esta dado por : $\kappa = \sqrt{\frac{8\pi N e^2}{1000 D k T}} \sqrt{I}$, con: $I = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2$, donde I es la fuerza iónica y k es la constante de Boltzmann.

La ecuación anterior indica que la solubilidad aumenta con la raíz cuadrada de la fuerza iónica y que tiene un mínimo en el punto isoelectrico a baja fuerza iónica. Es en este punto de baja fuerza iónica que se produce un efecto de "salting in " en el cual la solubilidad aumenta si la fuerza iónica es también aumentada (figura 4.a)²⁵.

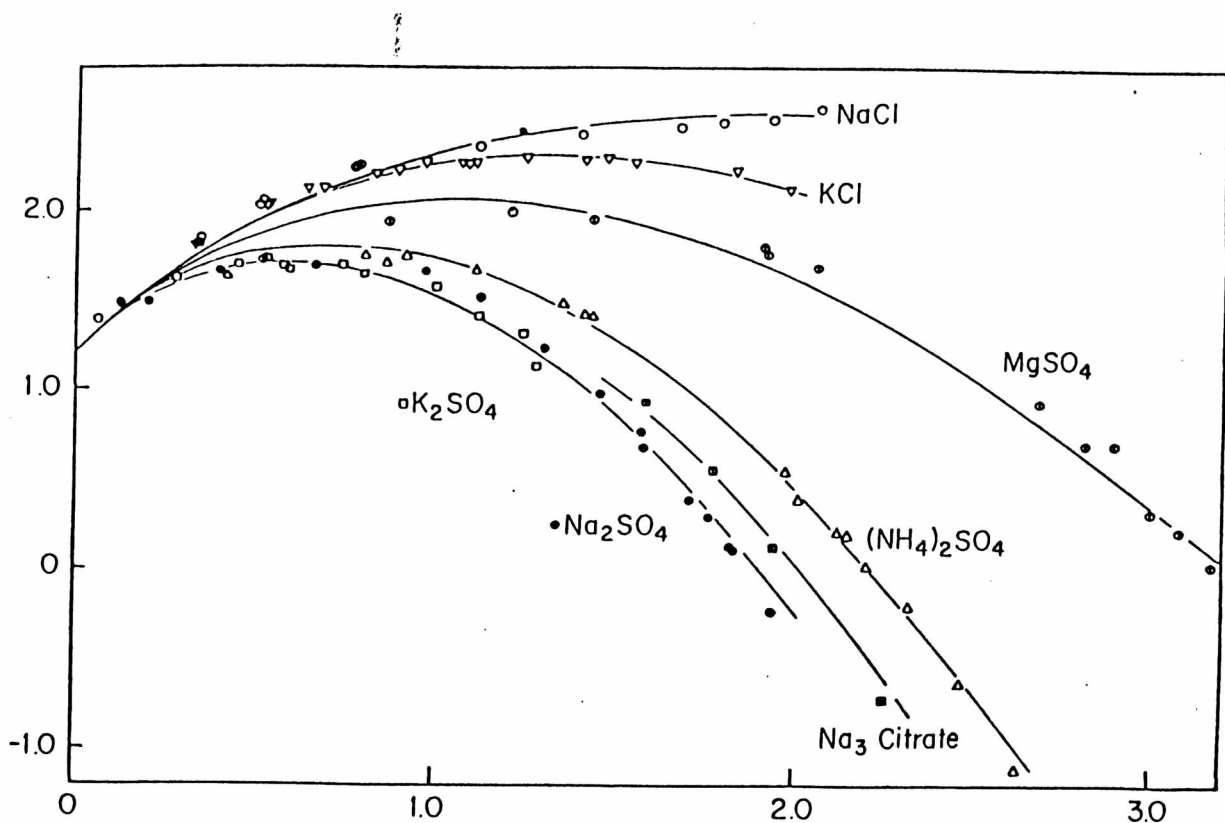


figura 4a: logaritmo de la solubilidad de una enzima en función de la raíz cuadrada de la fuerza iónica, en varios electrolitos.

Por otra parte, a altas concentraciones de sal la solubilidad decrece por un efecto de "salting-out " que de acuerdo a Kirkwood,³⁴ responde a las interacciones

electrostáticas, basando su modelo en que la polarización del solvente debido a iones se reduce como resultado de la presencia de las moléculas en el medio. (figura 4.b).

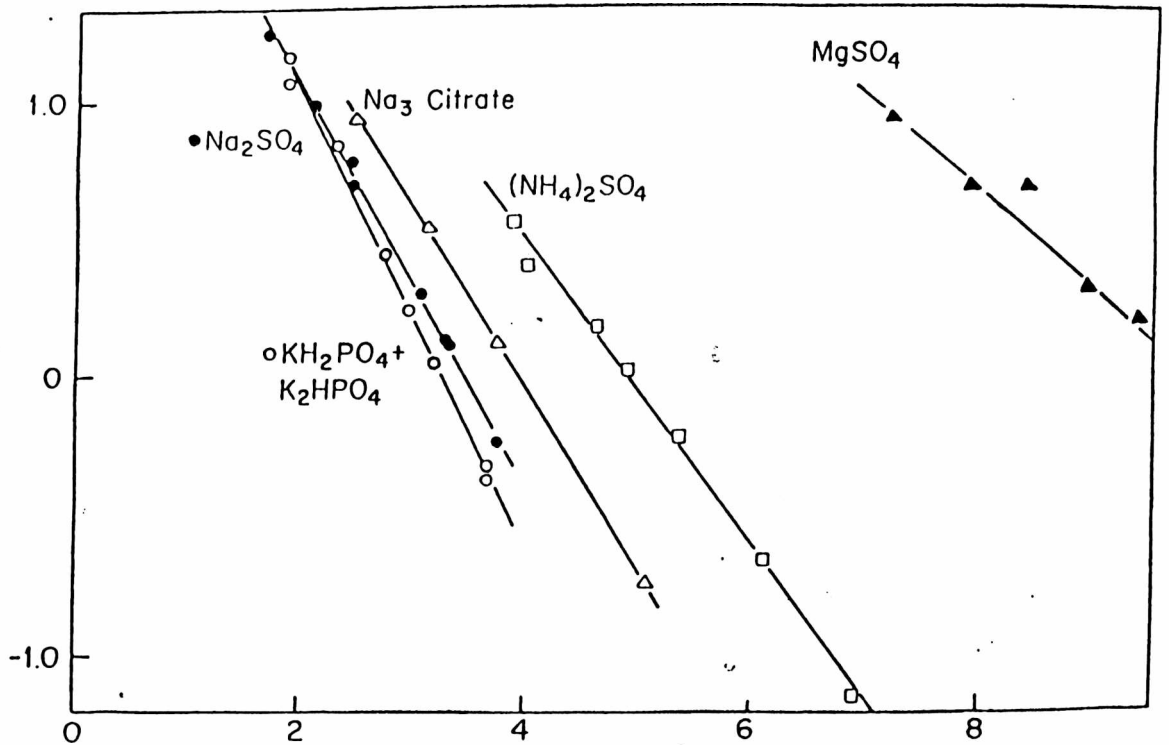


figura 4b: logaritmo de la solubilidad de una enzima en función de la fuerza iónica para varios electrolitos.

Por supuesto que la teoría de Debye-Hückel no explica completamente la solubilidad de las proteínas. Estas son mucho más grandes que los iones del medio circundante y tienen distribuciones de carga superficial que no están relacionadas a su carga neta. Además la teoría no considera de manera adecuada el ordenamiento de moléculas de solvente alrededor del soluto, para lo cual debe tenerse en cuenta la naturaleza de cada grupo.

Por otra parte, diferentes iones pueden afectar la solubilidad de las proteínas de diferentes formas. El efecto tiende a seguir la serie de Hofmeister, esto es, para

el proceso de salting-out, pequeños iones con mucha carga, serán más efectivos que aquellos iones de gran tamaño pero con cargas débiles.

Aunque la primera proteína fue cristalizada hace ya una centena de años el proceso de cristalización sigue siendo considerado el cuello de botella para la resolución de una estructura. Este proceso de cristalización puede dividirse en tres pasos: nucleación, crecimiento y cese del crecimiento.

En la primera fase se tiene una solución sobresaturada de macromoléculas que rápidamente se distribuyen en agregados, en un estado de cuasi equilibrio. A este tiempo dos términos de energía libre compiten : un término de energía superficial positivo proporcional a r^2 , y otro negativo, proporcional a r^3 . De este modo , cuando el tamaño del agregado (r), se incrementa , el término cúbico es preponderante hasta un tamaño crítico r_c . Un agregado con un tamaño crítico es un núcleo que puede crecer espontáneamente como un cristal macroscópico. Es este crecimiento que representa el segundo paso del proceso y puede ser visualizado en dos estados : (1) el transporte de material a la superficie, y (2) la asociación de moléculas en una red cristalina ordenada. El cese de ese crecimiento es de importancia fundamental desde que se requiere un tamaño mínimo del mismo para obtener un patrón de difracción adecuado para resolver la estructura.

El comportamiento de macromoléculas en solución es complejo y bastante impredecible por lo cual se pueden alcanzar distintos mínimos de solubilidad, dependiendo de la naturaleza del electrolito, precipitantes, concentraciones, pH, temperatura, y otras influencias. Este comportamiento de multimínimos se evidencia de manera más notoria en el polimorfismo cristalino exhibido por varias proteínas.

Los precipitantes son uno de los factores más importantes en este análisis, y caen en tres categorías principales: sales, solventes orgánicos y polyetilenglicoles.

Para sales, la solubilidad decrece exponencialmente cuando aumenta la fuerza iónica, y por lo tanto iones divalentes o trivalentes son mas comunmente usados.

Los solventes orgánicos por su parte, impiden que las moléculas de agua se unan a la proteína y bajan la constante dieléctrica del medio reduciendo el apantallamiento electrostático.

Los polyetilenglicoles, por último son polímeros de varias longitudes con alteracion de oxígenos de grupos éter y etileno. Una consecuencia es que esto significativamente perturba la estructura del agua remplazandola por una estructura mas compleja con ambos elementos constitutivos. Un resultado de esta reestructuración es que la macromolécula tiende a ser excluída y la separación de fase es promovida.⁴⁰

2.2.3 Principios de la difracción de Rayos X. A partir de los trabajos de Röntgen desarrollados a fines del siglo pasado , fueron conocidas gran número de propiedades de los rayos X; pero fue Sommerfeld, ya en los comienzos de este siglo quien logró calcular su longitud de onda en aproximadamente $4 * 10^{-9}$ cm. Con esta información Laue logra ya en 1912 mostrar de manera concluyente la naturaleza ondulatoria de los rayos X y sentar las bases de la cristalografía de rayos X.

Paralelamente y luego de varias pruebas, Friedrich y Knipping logran la primera foto de difracción de un cristal de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Un año despues, en1913, W.L.Bragg⁶estableció la ley que lleva su nombre y permite ver el scattering de rayos X en términos de reflexión de planos paralelos de

átomos:

Dado que los planos de un cristal iluminados a un ángulo θ , son reflejados en un ángulo igual al de reflexión y en el mismo plano, la interferencia constructiva entre rayos pertenecientes a diferentes planos en el cristal tendrá lugar solo si la diferencia de longitud de los mismos es equivalente a un número entero de longitudes de onda, es decir:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad \text{Ley de Bragg}$$

donde λ es la longitud de onda de los rayos X (1.5418 para la radiación Cu $K\alpha$).

Esta ecuación fundamental predice la posición en el espacio de un rayo difractado, aunque no contiene información acerca de la intensidad del mismo.

Ahora bien, si consideramos el patrón de difracción de un número de pequeños orificios arreglados para representar una molécula, la interferencia entre rayos difractados por los diferentes puntos llevan a una continua variación de intensidades débiles y fuertes en el patrón de difracción. La distribución irregular de intensidades es centrosimétrica alrededor del origen y es una característica común de los mismos, y su variación es debida a la estructura interna de la molécula. Este patrón de difracción de una única molécula es, por lo tanto, su transformada molecular, o sea, la transformada de Fourier de la misma.

En el caso de difracción de luz, es posible simular la transformada molecular ya que la interacción de luz con la materia es relativamente fuerte. La interacción de los rayos X sin embargo es débil y la observación de la transformada de moléculas individuales es imposible. Es por esta razón que resulta necesario cristalizar el compuesto de

modo que todas las moléculas estén arregladas en una estructura regular y el scattering de una de ellas se vea reforzado por el de las demás.

Ahora bien, utilizando las propiedades de la transformada de Fourier para la difracción, y teniendo en cuenta que el patrón de difracción de una red es también una red pero cuyas dimensiones son inversamente proporcionales a la real, podemos considerar al cristal como la convolución de la molécula con una grilla bidimensional, es decir, si tomamos dicha molécula y la colocamos en cada uno de los puntos de la red construiremos el cristal.

Es así que, el patrón de difracción de un cristal molecular es el producto del patrón de difracción de la molécula (transformada molecular), con el patrón de difracción de la red (red recíproca).

En cristalografía de proteínas es de suma importancia conocer el límite al cual han sido colectados los datos de difracción. De esta manera, términos tales como 6.0 Å (baja resolución) y 2.0 Å (alta resolución), indican el límite de ese espaciado interplanar.

Este concepto de resolución, en difracción de rayos X es el mismo que en la formación de imagen en el microscopio óptico. De acuerdo a la teoría de Abbe, una distancia dm es resoluble si el objetivo puede aceptar al menos el espectro de difracción de primer orden; por analogía, en difracción de rayos X, $dm = \frac{\lambda}{2} \sin \theta$, y puede ser mostrado que átomos puntuales no son registrados como puntos sino como máximos circundados por anillos de difracción positivos y negativos correspondientes al espectro de difracción de Fraunhofer de una esfera de radio $\frac{1}{dm}$. En tres dimensiones la posición del primer cero alrededor de la esfera de difracción de densidad positiva corresponde a $r = 0.715 dm$ y de este modo es asumido que el menor detalle que puede ser registrado

en el mapa de densidad electrónica corresponde a puntos separados por más de r . En la práctica es usual caracterizar la resolución nominal de un mapa de densidad electrónica en términos de dicho dm .

Cuando un haz de rayos X interactúa con el cristal se produce el fenómeno conocido como dispersión o scattering, y para obtener la expresión del scattering de un átomo es necesario tener en cuenta la distribución espacial de los electrones.

2.2.4 Colección de datos. Al comienzo de una investigación cristalográfica, la caracterización primaria del compuesto es realizada con fotografías del espectro de difracción tomadas con una cámara de precesión lo cual da una figura no distorsionada de la red recíproca, siendo el problema inicial en este paso la correcta alineación del cristal respecto a los Rayos X.

A partir de que los cristales son sensible a la radiación, este procedimiento es fundamental ya que cuanto más rápida sea su alineación menor será el daño sufrido por el cristal.

Una vez montado el tubo capilar conteniendo el cristal, el mismo es fijado a la cabeza de un goniómetro, de manera que, alguna de las caras del cristal sea posicionada paralela o perpendicular a alguno de los arcos graduados del mismo. Esto permitirá un ajuste más fácil durante la alineación. En general los ejes de la celda unidad son paralelos o perpendiculares a las caras.

Logrado este primer paso, se monta la cabeza goniométrica en la cámara para proceder al centrado del cristal respecto al haz de rayos X, asegurándonos que el cristal permanecerá en el camino del haz durante la rotación alrededor del eje de la cabeza

goniométrica. Para esto son usados los tornillos de ajuste ubicados en la misma, primero rotando el cristal un ángulo de 360° y centrando nuevamente respecto al haz. Este proceso será iterado de manera que el cristal (no el tubo) esté estacionario a través de toda la rotación.

La geometría de la cámara de precesión es ilustrada esquemáticamente en la *figura 5*; un cristal es montado y alineado con el haz de rayos X paralelo al eje real, lo cual indica que un plano del espacio recíproco es paralelo al film. El cristal es entonces movido un ángulo conocido μ , lo cual implica un movimiento similar en la red recíproca. El movimiento de la cámara de precesión es bastante complicado pero la misma está diseñada para permitir al film seguir el mismo movimiento del cristal durante toda la precesión. A medida de que el cristal se mueve, se mantiene a una distancia fija del film, y el haz directo siempre incide en el centro del mismo cuando se toma una fotografía de nivel cero.

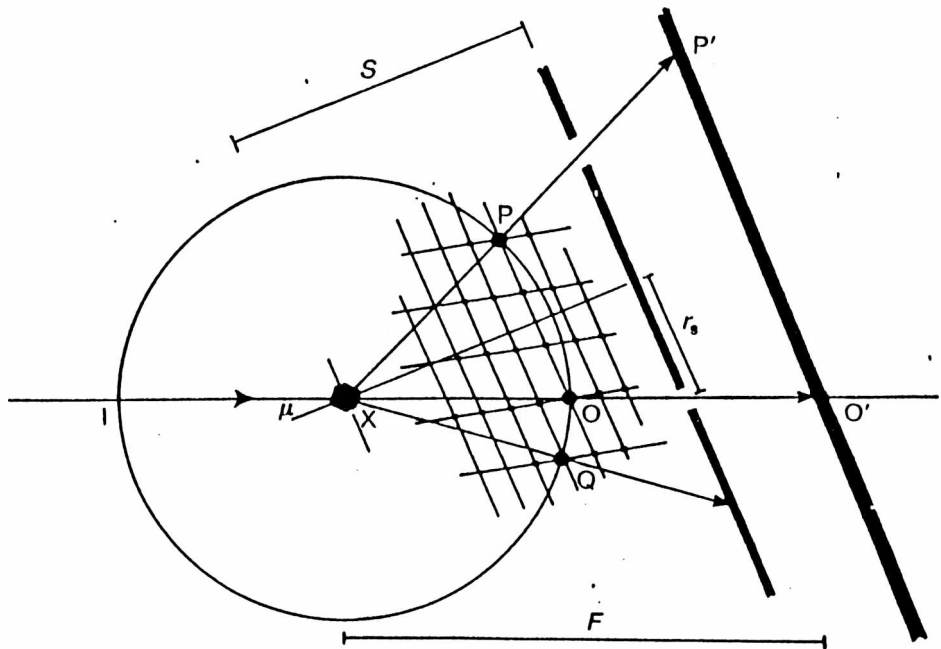


figura 5: geometría de la cámara de precesión

El movimiento de precesión conduce el plano OP alrededor de XO teniendo a O como punto fijo. Todos los puntos de la red recíproca dentro del círculo de radio OP cortarán en algún momento la esfera de reflexión y los rayos difractados como XP pasarán a través del círculo de la pantalla para ser registrado como una imagen magnificada en el film en O'P'. Los Rayos difractados desde otras capas como XQ son bloqueados por la pantalla cuyo movimiento es unido al del cristal. Tanto el film como la pantalla y el plano de la red recíproca son siempre paralelos entre sí y perpendiculares al eje de precesión. La gran ventaja del método es la capacidad de registrar una capa no distorsionada de la red recíproca en cada film. El factor de magnificación de la imagen de la red recíproca es simplemente la distancia F del cristal al film.

La alineación de cristales de proteínas en una cámara de precesión involucra una serie de fotografías fijas para obtener una orientación dentro de los 30 'de arco, seguidas por una serie de fotografías de pequeño ángulo lo cual permite la orientación dentro de los 5 'de arco.¹²

Para lograr una óptima orientación del cristal debemos controlar la intensidad de las marcas de difracción, lo cual se logra ajustando los tiempos de exposición, y se deben poder observar círculos concéntricos, ajustando los arcos de acuerdo a la desorientación indicada por las fotografías.

Inicialmente el interés radica en círculos concéntricos pertenecientes a las llamadas zonas principales que corresponden a capas de la red recíproca perpendiculares a los ejes cristalinos reales. Una vez elegido el conjunto de círculos que se quieren alinear se miden los desplazamientos (vertical y horizontal) del centro de los círculos al centro del haz primario y se calcula la corrección necesaria con la fórmula: $\tan \varepsilon \approx \frac{\Delta}{F}$,

donde Δ es el desplazamiento desde el centro de la posición del haz, y F es la distancia del cristal al film.

Una vez logrado el ajuste y si se requiere una corrección del orden de 2.0° se realizan fotografías de precesión de pequeño ángulo, las cuales son tomadas sin la presencia de la pantalla.

Si el cristal está perfectamente centrado, el centro del círculo del plano correspondiente al nivel cero se corresponde con el punto de incidencia del haz directo.

Las fotografías fijas permiten una medición de las dimensiones de la celda unidad, lo cual puede ser utilizado para los cálculos realizados a partir de de las fotografías de precesión donde el espaciado de filas de puntos en el film puede ser relacionado a la longitud de los ejes de la red recíproca. El mejor camino para medir el espaciado es medir la distancia entre puntos consecutivos que fueron totalmente registrados y dividir por el número de espacios entre ellos. Cuando medimos espaciado entre puntos debemos estar seguros de la posible ubicación de ausencias sistemáticas, particularmente a lo largo de los ejes $h00$, $0k0$, $00l$, o sea los ejes recíprocos a^* , b^* , c^* .

Si los ángulos entre los ejes de la red recíproca son de 90° entonces a^* , puede ser convertido directamente en a , ya que $a = \frac{1}{a^*}$, lo cual puede extenderse a los demás ejes. Por otra parte, en los casos donde el ángulo sea distinto de 90° la conversión es más complicada y requiere una relación adecuada a cada grupo espacial.

La determinación de estos grupos espaciales se sigue de observar la simetría del patrón de difracción de fotografías de precesión de nivel cero. Son estas fotografías las que permiten determinar los ejes cristalográficos como así también los ángulos correspondientes. Además, el análisis de ausencias permite identificar el grupo con

precisión.

2.2.5 Interpretación de los datos de difracción. Conocida la densidad electrónica $\rho(r)$ a una distancia r desde el centro de un átomo, la onda total dispersada por un pequeño volumen dv ubicado en una posición r tendrá una amplitud proporcional a $\rho(r)dv$ y fase $2\pi rS$, o bien,

$$\text{onda dispersada} = \rho(r) \exp(2\pi r.S) dv$$

donde $S = s_o - s$, posición en el espacio de difracción, como r describe una posición en el espacio real.

Es así que la onda total dispersada por el átomo se calcula sumando las contribuciones individuales sobre el volumen total del átomo:

$$F(S) = \int_{\text{vol. del átomo}} \rho(r) \exp(2\pi r.S) dv$$

Esta expresión representa el factor de scattering atómico y es debida a un átomo en reposo, pero los cambios dados en la temperatura afectan el movimiento térmico de átomos y de esta manera se modifican las intensidades de la dispersión.

Ya en 1914, Debye¹⁶ mostró que dicho movimiento térmico causa una caída en la intensidad en un factor $\exp[-B(\frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2})]$, donde $B = \frac{8}{3}\pi^2 \bar{u}^2$, con \bar{u} como el desplazamiento medio de átomos en la dirección normal al plano de reflexión. En cristales de proteínas, los factores de temperatura son del orden de $B = 12^2 - 20^2$, correspondientes a desplazamientos medios entre 0.15 Å y 0.5 Å.

Conocido ya el término correspondiente al factor de scattering atómico, derivamos ahora la expresión para el scattering producido por átomos colocados en posiciones definidas en la celda unidad.

Si colocamos átomos a una distancia r_j del origen, esto implica una modificación en la ecuación del Factor de scattering atómico, donde ahora la onda total dispersada será:

$$G(S) = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i r_j \cdot S),$$

donde $G(S)$ representa la transformada molecular, y es una función compleja que varía sobre todo el espacio de difracción S .

El paso siguiente es considerar un arreglo unidimensional de celdas unidad colocados a una distancia a , la onda total dispersada será:

$$F(S) = \sum_{n=1}^T G(S) \exp[2\pi i(n-1)a \cdot S],$$

donde T es el número total de celdas unidad.

Ahora bien, en este caso el scattering tendrá lugar sólo si se satisface $a \cdot S = h$, donde h es un entero, y si queremos extender el resultado a tres dimensiones, las condiciones para la difracción serán:

$a \cdot S = h$; $b \cdot S = k$; $c \cdot S = l$; con h, k, l , enteros, lo que nos lleva a:

$$\mathbf{F}(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i(h \cdot x_j + k \cdot y_j + l \cdot z_j)],$$

ecuación conocida como Factor de estructura. El factor de estructura para una reflexión particular de un cristal es una cantidad compleja que puede ser representada por su amplitud y su fase, o sea:

$$\mathbf{F}(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i(h \cdot x_j + k \cdot y_j + l \cdot z_j)] = F(hkl) \exp i\alpha(hkl),$$

cuando la radiación es registrada por un medio adecuado (film fotográfico, detector de área, etc), toda la información de la fase es perdida y solamente es obtenida una medición de la energía a partir de la Intensidad dada por:

$$I(hkl) = \mathbf{F}(hkl) \cdot \mathbf{F}^*(hkl) = F(hkl)^2.$$

Como ya hemos visto, el patrón de difracción de un cristal puede ser calculado de la ecuación de factor de estructura, una vez que la estructura del cristal es conocida, ahora veamos la manera de resolver el problema inverso, aplicando la teoría de la transformada de Fourier, ya que como el patrón de difracción es la transformada de Fourier de la estructura; la estructura es la transformada de Fourier del patrón de difracción, así que, si: $\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S} = \int_{\text{vol.de la celda unidad}} \rho(\mathbf{r}) \exp 2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S} d\mathbf{v}$,

multiplicando ambos lados por $-2\pi i \mathbf{r}' \cdot \mathbf{S}$ e integrando sobre el volumen del espacio de difracción tenemos que:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_{\text{vol.esp.difracción}} F(\mathbf{S}) \exp -2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S} d\mathbf{v}_s \text{ o bien,}$$

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} \mathbf{F}(hkl) \exp -2\pi i (hx + ky + lz),$$

de este modo si son conocidos los factores de estructura para todas las reflexiones hkl , entonces puede ser calculada la densidad electrónica para cada punto xyz de la celda unidad, y esta densidad electrónica representa la estructura del cristal.

En una estructura cristalina, la densidad electrónica es computada de manera en una grilla de puntos de acuerdo a intervalos $\Delta x, \Delta y, \Delta z$, apropiados, de acuerdo a la resolución de los datos de difracción. El resultado es un conjunto de puntos donde a cada uno le corresponde un valor que representa el valor de la densidad electrónica en ese sitio. Estos valores serán altos en cercanías de posiciones atómicas y caerán hasta cerca de cero en otros lados. Con el objeto de enfatizar la estructura y mostrar los átomos, el mapa de densidad electrónica es contorneado a niveles del orden de $0.25\frac{e}{\text{\AA}^3}$.

Para el cálculo adecuado de la densidad electrónica necesitamos conocer $\mathbf{F}(hkl)$, lo cual implica conocer su amplitud y la fase correspondiente a cada factor.

Como ya hemos dicho, sólo las intensidades, y por lo tanto las amplitudes, son

conocidas, por lo cual la información de las fases se pierde. La determinación de las fases es un problema importante en la resolución de una estructura cristalina. Para resolver este inconveniente hay varios métodos posibles: (i) *Sumas de Patterson*: Esto es una suma de Fourier, basada en las intensidades medidas, y es esencialmente un mapa vectorial de la molécula adecuado para estructuras con pocos átomos. (ii) *Métodos directos*: en los cuales se usan relaciones matemáticas entre reflexiones para conseguir la información. (iii) *Reemplazo isomorfo de átomos pesados*: en este método un átomo pesado es introducido en la estructura y es utilizado como un marcador de fácil ubicación y por lo tanto dar la información de fases. (iv) *Scattering anómalo*: en este caso la fase es obtenida de la información contenida en el scattering de un átomo cuya frecuencia natural de absorción es cercana a la longitud de onda de la radiación incidente. (v) *Reemplazo molecular*: este método se aplica en el caso de tener o esperar idénticas estructuras o partes de la misma, en diferentes entornos cristalográficos, por lo cual podemos esperar similitudes en el patrón cristalográfico. Esto implica que una restricción en los factores de estructura puede ser utilizada para determinar las fases y por lo tanto resolver la estructura cristalina.

Una vez obtenidas las fases correspondientes a cada factor de estructura podemos tener el mapa de la densidad electrónica y por lo tanto la estructura cristalográfica. Ahora bien, tanto los parámetros posicionales como térmicos pueden ser mejorados de manera de acercarlos lo más posible a la realidad, en un proceso posterior de refinamiento.

El tratamiento de este tipo de problemas de refinamiento fue discutido por Legendre en 1806 en trabajos en los cuales describía el cálculo de las órbitas de cometas

a partir de un número de observaciones.³⁶ Legendre sugiere que los mejores parámetros son aquellos para los cuales la suma de los cuadrados de las diferencias de los valores calculados y los observados sea mínima.

Dado un conjunto de parámetros desconocidos x_1, x_2, \dots, x_n son relacionados a un conjunto de m valores observables g_1, g_2, \dots, g_m por un conjunto de ecuaciones lineales.

$$g_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1n}x_n$$

$$g_2 = a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \dots + a_{2n}x_n$$

.....

$$g_m = a_{m1}x_1 + a_{m2}x_2 + \dots + a_{mn}x_n$$

donde los valores de a son constantes.

Estas ecuaciones son conocidas como ecuaciones observables, con n parámetros desconocidos y m observables. Si $n > m$, el problema no puede ser resuelto; si $n = m$ el problema es unívocamente determinado y si $n < m$ el problema está sobredeterminado.

Suponemos valores aproximados para x_1, x_2, \dots, x_n son conocidos, entonces el error está definido como E_1, E_2 , etc. y son definidos como:

$$E_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1n}x_n - g_1$$

$$E_2 = a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \dots + a_{2n}x_n - g_2$$

.....

$$E_m = a_{m1}x_1 + a_{m2}x_2 + \dots + a_{mn}x_n - g_m$$

El principio de Legendre sugiere que los "mejores" valores de los parámetros son aquellos para los cuales $\sum_{r=1}^m E_r^2$ es un mínimo, por lo cual:

$$\frac{\partial(\sum_{r=1}^m E_r^2)}{\partial x_1} = \frac{\partial(\sum_{r=1}^m E_r^2)}{\partial x_2} = \dots = \frac{\partial(\sum_{r=1}^m E_r^2)}{\partial x_n} = 0$$

donde ahora tenemos n ecuaciones para n incógnitas. La primera de ellas dada por:

$$\frac{\partial(\sum_{r=1}^m E_r^2)}{\partial x_1} = \sum_{r=1}^m a_{r1} (a_{r1}x_1 + a_{r2}x_2 + \dots + a_{rn}x_n - g_r) = 0$$

Estas ecuaciones son conocidas como ecuaciones normales y pueden ser resueltas directamente por métodos matriciales.

En un problema cristalográfico, los parámetros desconocidos son la posición y el parámetro térmico para cada uno de los átomos y los observables son las amplitudes de los factores de estructura $F_o(\mathbf{h})$ para cada una de las reflexiones \mathbf{h} . La cantidad minimizada es $\sum_{\mathbf{h}} (F_o(\mathbf{h}) - F_c(\mathbf{h}))^2$. donde la suma es sobre todas las reflexiones y los amplitudes de los factores de estructura calculados $F_c(\mathbf{h})$ estan dados por:

$$F_c(h) = \left| \sum_{j=1}^n f_j \exp\left(-B_j \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right) \exp 2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{x}_j \right|,$$

donde B representa los parámetros de vibración térmica.

No obstante $F_c(\mathbf{h})$ no es una función lineal de los parámetros atómicos \mathbf{x}_j y B_j por lo cual las ecuaciones condicionantes son no lineales. En orden de sobreponer esta dificultad, supondremos que los valores experimentales de los parámetros no se encuentran demasiado lejos de los verdaderos y calcularemos pequeñas correcciones a estos. $F_c(\mathbf{h})$ se desarrolla por el teorema de Taylor de forma que:

$$F_c(\mathbf{x}^o + \delta\mathbf{x}) \simeq F_c(\mathbf{x}^o) + \sum_{j=1}^n \delta x_j \left. \frac{\partial F_c}{\partial x_j} \right|_{\mathbf{x}^o}$$

donde $F_c(\mathbf{x}^o)$ es el valor de las amplitudes de los factores de estructura calculados para una particular reflexión en los valores experimentales de los parámetros atómicos \mathbf{x}^o , y $\delta\mathbf{x}$ son las correcciones buscadas para los n desconocidos. Es así que con esta aproximación para los F_c , las ecuaciones serán :

$$F_o(\mathbf{h}) - F_c(\mathbf{h}) = \sum_{j=1}^n \delta x_j \frac{\partial F_c}{\partial x_j} ,$$

que son ecuaciones lineales en términos de los parámetros de corrección δx_j y puede ser resuelto por métodos de cuadrados mínimos. Los términos de corrección son aplicados a los parámetros atómicos, nuevos valores de F_c son calculados y se itera el proceso hasta llegar a la convergencia.

2.2.6 Refinamiento en el análisis estructural de rayos X de una proteína. Los modelos tridimensionales de macromoléculas basados en difracción de Rayos X, son derivados inicialmente de mapas de densidad electrónica.

Las coordenadas atómicas basadas en tales modelos no son suficientemente buenas en parte debido a problemas en la resolución o porque las fases no son precisas.

Aún en los casos derivados de mapas de buena calidad, el modelo puede tener serios errores de configuración.

Estos modelos no obstante son de gran utilidad para mostrar las características globales de la molécula . Es importante por lo tanto, mejorar el modelo realizando un procedimiento iterativo que permita una mejor la localización de la cadena polipeptídica.

En su forma tradicional, el término refinamiento se refiere al proceso de ajustar parámetros del modelo, principalmente las posiciones de los átomos dentro de la celda unidad. En orden de mejorar el acuerdo entre las amplitudes de las reflexiones observadas y los valores calculados de un modelo inicial.

El proceso de refinamiento, por lo tanto, tiende a converger cuando los cambios en los parámetros no son significativos.

En cristalografía de rayos X, el progreso del refinamiento es usualmente seguido por el índice:

$$R = \frac{\sum_h |F_o(\mathbf{h}) - F_c(\mathbf{h})|}{\sum_h |F_o(\mathbf{h})|},$$

lo cual es una forma de error relativo. Claramente, cuanto mejor sea el acuerdo entre las amplitudes observadas y los valores calculados el valor de R baja y en principio el modelo es mejor.

Para propósitos comparativos una mala ubicación del modelo lleva a valores de R del orden de 0.60. Unos pocos ciclos de refinamiento lleva a valores del orden de 0.4, a partir de lo cual puede llegarse a porcentuales menores dependiendo de la calidad de los datos.

Valores del orden de 0.25 son comunmente aceptados para la determinación de la estructura cristalina de una proteína, llegándose incluso a 0.15 en ocasiones muy favorables. Para pequeñas estructuras estos valores difieren en gran medida y están usualmente por debajo de 0.10 llegando a 0.04.

Cuando se obtienen fases aceptables, para una dada estructura, por los métodos mencionados en la sección anterior, se realiza el cálculo de un mapa de densidad electrónica. Esta densidad está determinada por la siguiente expresión:

$$\rho(r) = \sum m F_p \exp(i\alpha) \exp(-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}),$$

Como vimos anteriormente la calidad de estos mapas de densidad está determinada por el valor de la resolución. En este contexto, la menor separación, r , que puede ser resuelta en la imagen de rayos X está dada por: $r \approx 0.71 dm = 0.71 \frac{\lambda}{2} \sin \theta(\max)$, donde $\sin \theta(\max)$ es el máximo valor de la función para los datos incluidos en la suma de Fourier y dm es el mínimo espaciado interplanar. No obstante la resolución posible

para para cristales de proteínas está limitada por el desorden propio de las moléculas dado por la vibración térmica y el desorden estadístico. La resolución dependerá de la calidad de los datos de difracción y usualmente es caracterizada por el valor dm .

Los mapas trazados a baja resolución, con $dm > 4.5$, no permiten un trazado perfecto de la cadena polipeptídica, pero dan una buena impresión de la forma general de la molécula, relaciones de simetría de subunidades, o identificación de zonas particulares en la estructura.

Con valores de espaciado interplanar entre 3.5 y 2.5 se permite el seguimiento de la cadena, aunque su interpretación depende de un conocimiento de la estereoquímica de los residuos individuales. Con estos valores de resolución es posible identificar zonas de hélice α , o láminas β , pero zonas más detalladas de la cadena son muy difíciles de identificar.

Mapas de densidad electrónica calculados a valores de resolución del orden de los 2.4 son los considerados adecuados para resolver una estructura cristalina. En la actualidad, incluso se ha llegado a resoluciones por debajo de 1, lo que da la posibilidad de posicionar los átomos de la cadena de manera sumamente precisa.

Una vez que la estructura de la proteína ha sido determinada a alta resolución, la interacción de la molécula con un inhibidor o un sustrato puede ser calculada por medio de lo que se conoce como síntesis de diferencia de Fourier, que fue inicialmente sugerida por Cochran en 1951.⁶³

Esta técnica fue utilizada por primera vez para estudiar la unión del ión azida a la mioglobina y, a partir de ahí el método fue extendido hasta permitir la resolución de estructuras de inhibidores y sustratos a una proteína, permitiendo la identificación

y análisis del sitio activo de una enzima.

La difusión de una pequeña molécula en una proteína resulta en la interacción de dicha molécula con el sitio de unión de la macromolécula, es en este contexto que pueden ocurrir cambios conformacionales en la macromolécula o el inhibidor que pueden ser analizados por el método.

La adición de una pequeña molécula conteniendo unos pocos átomos a un cristal lleva a un cambio en la amplitud de los factores de estructura. La síntesis de Fourier para la proteína nativa está dada por:

$$\rho_P = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} F_P \exp i\alpha_P \exp -2\pi i\mathbf{h}\cdot\mathbf{x},$$

y para la proteína más el inhibidor.

$$\rho_{PI} = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} F_{PI} \exp i\alpha_{PI} \exp -2\pi i\mathbf{h}\cdot\mathbf{x},$$

donde el subíndice P indica la proteína, I el inhibidor y PI la proteína más el inhibidor.

Como F_I es pequeño, α_{PI} no es muy diferente de α_P de modo que ρ_{PI} puede ser aproximada por:

$$\rho_{PI} \simeq \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} F_{PI} \exp i\alpha_P \exp -2\pi i\mathbf{h}\cdot\mathbf{x} ;$$

por lo tanto, la diferencia entre la densidad electrónica de la proteína más el inhibidor y la proteína nativa será:

$$\rho_{PI} - \rho_P \simeq \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} (F_{PI} - F_P) \exp i\alpha_P \exp -2\pi i\mathbf{h}\cdot\mathbf{x},$$

lo cual corresponde a la densidad electrónica del inhibidor solo.

La diferencia de Fourier da un visión clara de los cambios conformacionales entre el complejo proteína inhibidor y la proteína nativa.

Un cálculo de Fourier con coeficientes $(F_o - F_c) e^{i\alpha_c}$, puede revelar gruesos er-

rores en la estructura indicando la magnitud y dirección de corrección de los parámetros. Por ejemplo, si la estructura contiene un átomo en una posición incorrecta, el mapa muestra un pico negativo en la posición incorrecta y un pico positivo en la correcta ubicación. Si un átomo es correctamente localizado el mapa no muestra picos en el centro a menos que el factor de temperatura este equivocado. En este caso la síntesis provee un medio de estimar correcciones. El efecto de un incremento en el factor de temperatura es una reducción en la magnitud del factor de estructura. Por ejemplo si un valor isotrópico del factor de temperatura es asignado, la altura del pico correspondiente en el mapa será proporcional al valor de la escala utilizada.

La entrada de un ciclo de refinamiento de Fourier ($F_o - F_c$) es una estructura tomada como modelo inicial, (con los datos correspondientes a las coordenadas atómicas, ocupación y factor de temperatura), a partir de los cuales se computan los factores de estructura (F_c), y la salida será una nueva estructura de prueba y por lo tanto nuevos factores de estructura. Un ciclo está compuesto por al menos cinco pasos diferentes.

(1) cálculo de un mapa ($F_o - F_c$), típicamente con un espaciado igual a la mitad del valor de la resolución de los datos.; (2) determinación de los cambios de parámetros a partir del mapa; (3) agregado, borrado o corrección de posiciones atómicas ; (4) aplicación de restricciones estereoquímicas; (5) cálculo de nuevos factores de estructura.

El paso (1) por su parte consta de un esfuerzo computacional importante ya que implica distintas etapas de corrección a partir del modelo inicial, (minimización de la Energía a partir de refinamientos rígidos, y por medio del método de Powell del gradiente conjugado que utiliza las coordenadas de todos los átomos libres como

variables).⁸

En el caso de una minimización rígida, el método minimiza los seis grados de libertad, es decir, tres rotacionales y tres traslacionales para cada grupo de átomos especificados, esto es, los grupos de átomos son tratados como cuerpos rígidos.

Se utiliza el término de energía total. Los parámetros rotacionales corresponden a los ángulos de Euler para una rotación alrededor del centro de masa del sistema; mientras que los parámetros traslacionales son las coordenadas x , y , z . En el caso en que parte de la molécula no sea especificado, el sistema en consideración obviará los átomos correspondientes.

En el proceso de minimización de la Energía a partir del gradiente conjugado el método toma las coordenadas iniciales y las cambia por nuevas coordenadas corregidas. Sólo las coordenadas de los átomos libres se modifican durante la minimización.

Aunque el uso de las diferencias de Fourier en el refinamiento tiene ciertas dificultades, como en el caso en que quieran analizarse un gran número de átomos o bien que los átomos en el mapa nativo tengan parámetros térmicos muy altos, el método es extremadamente útil en la identificación de cadenas laterales colocadas incorrectamente, o para colocar átomos de solvente en el entorno de la molécula.

2.3 INTERACCIONES ELÉCTRICAS EN MACROMOLÉCULAS

2.3.1 El rol de la electrostática en las estructuras biológicas: Las fuerzas electromagnéticas mantienen las estructuras y conducen gran número de los procesos biofísicos en los seres vivos. Debido a la naturaleza de largo rango de la interacción coulombica, la electrostática juega un rol vital y particular en las interacciones intra e inter

moleculares.

Los primeros trabajos relacionados a las interacciones eléctricas en proteínas fueron limitados a partículas moviéndose en potenciales con altos grados de simetría. Simulaciones por dinámica browniana permitieron posteriormente dar una imagen más realista; en este sentido, el algoritmo básico de Ermak y Mc Cammon²³ permitió la simulación de movimientos de difusión y, junto con sus posteriores refinamientos han permitido el estudio de sistemas biomoleculares que a menudo exhiben geometrías y potenciales sin simetría.

Debido a la importancia de las interacciones electrostáticas y como consecuencia de que las principales complicaciones son producto de los efectos de varios cuerpos, un amplio rango de técnicas han sido desarrolladas para modelar este tipo de interacciones. Cada uno de estos métodos cuenta con aspectos positivos y negativos, pero representan un considerable esfuerzo en función de describir la electrostática de los fenómenos biológicos.

2.3.2 Métodos de cálculo para el potencial electrostático en un medio acuoso. El fenómeno de que las fuerzas entre dos cargas varían inversamente con el cuadrado de la distancia fue establecido en primera instancia por Joseph Priestly en respuesta a las observaciones de la ausencia de carga en el interior de un conductor esférico, hueco y cargado. Charles Coulomb, cuyo nombre ha sido asociado con la ley fue quien verificó el comportamiento a través de mediciones con una balanza de torsión. Posteriormente fue descubierto que la presencia de materiales dieléctricos colocados entre las cargas pueden reducir la fuerza de interacción manteniéndose la relación de cargas y distancia.

El factor de escala aportado por el material es la constante dieléctrica que es una función de la polarizabilidad del medio.

El uso de una constante dieléctrica baja y uniforme es en principio una razonable aproximación en simulaciones donde tanto el solvente como el soluto sean explícitos. El problema de desarrollar funciones potencial que traten la polarizabilidad explícitamente ha limitado el uso corriente del método a pequeños sistemas moleculares y sólo unas pocas aplicaciones han sido hechas a proteínas. En este marco, la complementaridad electrostática ha sido utilizada en examinar unión de proteínas⁵⁹

Aplicando la ley de coulomb a nivel molecular se evidencia que diferentes pares de cargas se comportan como si tuvieran diferentes constantes dieléctricas efectivas. Experimentalmente ha sido determinado que la constante dieléctrica efectiva en una proteína globular generalmente se incrementa con la separación.⁴⁷ Cargas cercanas pueden interactuar casi como en el vacío, en cambio cargas distantes sentirán el efecto del solvente que las rodea, es así que la constante dieléctrica será asociada con regiones del espacio y no con sitios particulares, y si se considera la forma diferencial de la ley de Gauss en un medio inhomogéneo:

$$-\nabla \cdot \epsilon(r) \nabla \phi(r) = \rho(r),$$

donde ϵ es la permitividad dependiente de la posición, ϕ es el potencial electrostático y ρ es la densidad del cargo. Por su parte, la permitividad en este caso será una medida de la polarizabilidad de regiones determinadas del espacio.

El primer paso en tomar modelos continuos más allá de la descripción de un dieléctrico uniforme y efectivo ha involucrado modelos consistentes en una cavidad central con cargas asociadas.

Quizas el modelo más viejo de cavidad es el de Born, el cual considera la energía libre de solvatación de un ión esférico inmerso en un fluido homogéneo de permitividad ϵ_s . La simetría esférica del sistema reduce la ecuación de Poisson a una ecuación diferencial ordinaria de la forma:

$$d^2 (r\phi) / dr^2 = r\rho/\epsilon_s$$

En regiones donde no hay cargas el potencial tendrá la forma $\phi = C_{1/r} + C_2$. La constante en el término $1/r$ satisface la ley de Gauss mientras que el término constante cumple con las condiciones de continuidad de el potencial.

El modelo de Born de solvatación puede desarrollarse en términos de un dieléctrico uniforme o en términos de un modelo de cavidad. En el modelo uniforme el ión de carga q es considerado como una esfera de radio a con su carga distribuída homogéneamente en la superficie. Para satisfacer la ley de Gauss y anular el potencial cuando $r \rightarrow \infty$, el potencial externo a la esfera debe ser igual a $q/4\pi\epsilon r$, donde ϵ es la permitividad. La energía total electrostática es $G_B = 1/2 \int \rho\phi dV$ o $q^2/8\pi\epsilon a$. de modo que el cambio de Energía en ir del vacío a la solución es $\Delta G_B = (q^2/8\pi\epsilon a) (1/\epsilon_0 - 1/\epsilon_s)$.

La expresión de Born provee una medida de la energía libre de solvatación de los iones. Igualmente la energía de Born ha sido aplicada para corregir energías en cálculos dinámicos utilizando cortes en los potenciales electrostáticos. Este corte ignora interacciones coulómbicas más allá de un radio específico. La corrección es suponer que la región más allá del corte puede ser tratada como solvente, lo cual implica que la energía de interacción de las cargas con el solvente está dada por esa energía de Born.

En el área de interacciones intermoleculares el modelo de Born no mejora el modelo de un dieléctrico uniforme. Las cavidades de otras moléculas no pueden ser

incluidas sin destruir la simetría y por lo tanto la simplicidad del modelo. En conclusión los potenciales de interacción son idénticos a los del modelo de dieléctrico uniforme.

El fenómeno de incluir los efectos de iones electrolitos en la descripción electrostática en líquidos fue considerado en 1923 a partir del trabajo teórico de Debye y Hückel.¹⁷

En solventes polares un campo aplicado produce un efecto de alineación de los dipolos lo cual no conduce a una densidad de carga neta sino a inhomogeneidades en la permitividad. Para soluciones iónicas por lo tanto las cargas pueden moverse libremente bajo la influencia del campo.

Considerando un tratamiento estadístico los iones serán distribuidos en la solución de acuerdo a la distribución de Boltzmann. El número de iones positivos y negativos será por lo tanto:

$$n_{\pm} = n_{\infty} \exp(-U_{\pm}/k_B T).$$

Para un electrolito 1:1 se puede obtener la forma diferencial de la ley de Gauss:

$$-\nabla \cdot \epsilon(r) \nabla \phi(r) = \rho + en_+ - en_-$$

y si suponemos que la energía del ion es precisamente el producto de la carga por el potencial entonces tendremos una ecuación diferencial no lineal en ϕ , esto es la ecuación de Poisson-Boltzmann

$$-\nabla \cdot \epsilon(r) \nabla \phi(r) = \rho - en_{\infty} \sinh(e\phi/k_B T).$$

La siguiente aproximación fue suponer que $e\phi$ es pequeño respecto a $k_B T$ y entonces tomar sólo el término lineal en la serie de Taylor del seno hiperbólico esto lleva a la ecuación de Poisson-Boltzmann linealizada (P-BL).

$$-\nabla \cdot \epsilon(r) \nabla \phi(r) = \rho - e\kappa^2 \phi,$$

donde el parámetro de apantallamiento es $\kappa^2 = Ie^2/k_B T$, donde I es la fuerza iónica.

A partir de esto se determina el potencial de la forma:

$$\phi = \frac{q}{4\pi} \left[\frac{1}{\epsilon_i r} - \frac{1}{\epsilon_i a} + \frac{1}{\epsilon_s a(1+\kappa a)} \right] \quad r \leq a$$

$$\phi = \frac{q \exp(-\kappa(r-a))}{4\pi \epsilon_s r(1+\kappa a)} \quad r \geq a$$

Para el uso de un potencial intermolecular se debe notar que, al igual que el modelo de Born, el potencial no es la suma de los potenciales individuales de las partículas cuando el radio de la cavidad es distinto de cero. Físicamente la suma de los potenciales ignora la interacción de cada átomo con la carga de polarización inducida en la superficie de otras cavidades. En estudios de Dinámica Browniana hechos en la enzima Superóxida Dismutasa se descubrió que desprestigiar la forma irregular del volumen de exclusión lleva a predecir velocidades de reacción que son significativamente diferente de las observadas.⁵¹

Un nuevo modelo que generaliza el de Debye-Hückel y considera la distribución de cargas en cavidades no esféricamente simétricas fue desarrollado por Kirkwood.³³

En regiones sin carga explícita la ecuación P-BL lleva a la ecuación de Laplace dentro de la cavidad de exclusión y la ecuación de Helmholtz en el solvente.

De este modo para una carga q a r_o el potencial será :

$$\phi = \frac{q}{4\pi \epsilon_i |r-r_o|} + \sum_{l=0} \sum_{m=-l} A_{lm} r^l Y_l^m(\theta, \phi) \quad r \leq b$$

$$\phi = \sum_{l=0} \sum_{m=-l} (B_{lm} r^l + C_{lm} r^{-l-1}) Y_l^m(\theta - \phi) \quad b \leq r \leq a$$

$$\phi = \sum_{l=0} \sum_{m=-l} D_{lm} \frac{K_l(\kappa r) \exp(-\kappa r)}{r^{m+1}} Y_l^m(\theta, \phi) \quad r \geq a$$

Tanford y Kirkwood aplicaron este método a proteínas en 1957 para determinar sus curvas de titulación.⁵⁴

Mientras esto provee un esquema para incluir el apantallamiento extra que tendrá una carga superficial, el factor de de accesibilidad del solvente parece cuestionable para potenciales intermoleculares.

Utilizando este método, y distintas modificaciones posteriores han sido determinados efectos de complementariedad electrostática en varios sistemas enzima-substrato.^{27 9}

Con el objeto de resolver el problema de las ecuaciones diferenciales, diferentes métodos matemáticos pueden ser aplicados. Uno de ellos es el método de elementos finitos que fue desarrollado inicialmente por ingenieros abocados al estudio de stress mecánico, aunque ha sido ampliado a muchas disciplinas.

En este método el espacio es dividido en una colección de pequeños dominios, llamados elementos finitos, en los cuales la solución tiene una forma simple de un número limitado de términos en una serie de potencias. Por ejemplo, en un elemento triangular la solución puede ser expandida en términos de tres funciones, cada una de las cuales tiene un valor igual a uno en uno de los nodos y cero en otros dos. Para mejorar la precisión el espacio será dividido en pequeños elementos.

La solución de la ecuación de Poisson en términos de estas funciones, lleva a un gran sistema de ecuaciones lineales. Precisamente para esas funciones los coeficientes son los potenciales en los nodos.

El método de elementos finitos permite la descripción de geometrías arbitrarias con suficiente precisión, aunque su implementación en tres dimensiones no resulta trivial.

En un camino similar, Warwicker y Watson aplicaron el método de diferencias

finitas a problemas electrostáticos alrededor de una cavidad irregular.⁶² En este método el espacio es dividido en una red regular de puntos, generalmente rectangulares, y cuyas derivadas son aproximadas como diferencias entre los valores de la función en estos puntos.

Los valores de la permitividad para las caras de la grilla son determinadas como parte del solvente o del interior de acuerdo a ciertos criterios al momento de definir la superficie.

La principal ventaja del método incluye la naturaleza directa y físicamente transparente del cálculo y la facilidad para obtener valores del campo en puntos arbitrarios.

Diferencias finitas han sido utilizadas en simulaciones de Dinámica Browniana de SOD,⁵¹ hemoproteínas,⁴² e isomerasas³⁸; como así también en el rol de la electrostática en mecanismos enzimáticos.¹⁴

Algunos sistemas con múltiples dieléctricos pueden ser reemplazados por un problema dieléctrico uniforme equivalente con cargas superficiales apropiadas en los bordes, denominado precisamente método de elementos de borde.

Levitt³⁷ aplicó la técnica a sistemas con simetría cilíndrica y Zauhar y Morgan posteriormente extendieron el método a geometrías arbitrarias^{67, 66}. El método es similar a los elementos finitos pero solo elementos en la región bidimensional necesitan ser considerados.

Conceptualmente el problema de determinar el potencial eléctrico para cargas en una cavidad irregular de baja constante dieléctrica, inmersas en un solvente de constante dieléctrica elevada, es reemplazado por el problema de determinar las cargas que pueden producir la misma función potencial en el vacío.

El método de elementos finitos es utilizado para determinar la densidad de carga superficial. La superficie es dividida en elementos triangulares de modo que la carga en cada elemento será la incógnita en un sistema de ecuaciones lineales. Con la solución del sistema de ecuaciones el potencial en un punto arbitrario es la suma de los potenciales coulombianos para todas las cargas.

A partir de que solamente se requiere una red bidimensional, el método puede describir la superficie molecular para un determinado número de ecuaciones con mucha mayor precisión que lo que se puede lograr con el método de elementos finitos o diferencias finitas. Además las cargas son colocadas como cargas puntuales y no como integraciones sobre puntos como en el método de diferencias finitas.

Por último, una visión diferente del problema electrostático es el enfoque mecánico cuántico.

La distribución de electrones en las moléculas está determinada por la ecuación de Schroedinger independiente del tiempo para los electrones y el núcleo que interactúan con un potencial Coulombiano de la forma:

$$\left[-\sum_i \frac{\hbar^2}{8\pi^2 m_i} \nabla_i^2 + \sum_i \sum_{j \leq i} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 r_{ij}} \right] \Psi = E \Psi$$

donde \hbar es la constante de Planck, m_i es la masa de la partícula y Ψ es la función de onda molecular.

Técnicas *ab initio* son utilizadas para resolver los autovalores de la ecuación en varios niveles de aproximación, y por lo tanto:

$$\phi(r) = \sum_{i=\text{nucleos}} \frac{Z_i}{4\pi \epsilon_0 r_{ij}} + \int \frac{\rho(r)}{4\pi \epsilon_0 |r-r'|} dr$$

donde ρ es la distribución de carga electrónica determinada a partir de la función de onda molecular.

En conclusión, el conjunto de métodos es suficientemente amplio y ninguno de ellos es perfecto para todas las aplicaciones.

Modelos con dieléctricos uniformes son adecuados para Dinámica molecular debido a la velocidad y simplicidad .

Modelos con dieléctricos efectivos proveen una buena aproximación para cálculos de solvatación cuando no es posible utilizar métodos más precisos.

La Energía de Born, provee una conveniente aproximación para energías de solvatación para cuerpos esféricos.

De forma similar la teoría de Debye-Hückel provee una aproximación conveniente para los casos en que los efectos de contraiones son de interés.

Por su parte las técnicas numéricas explicitadas permiten la consideración de efectos más detallados, como consideraciones locales en la forma del potencial electrostático en enzimas.

En este contexto, y de acuerdo a este último concepto es que utilizamos el desarrollo de Juffer para el método de elementos de borde,³⁰ que se describe a continuación, para estudiar cuestiones precisas que remarcan la importancia del potencial electrostático en interacciones de macromoléculas.

2.3.3 Método de los elementos de borde. Algoritmo de Juffer. Como se ha visto, las interacciones eléctricas juegan un rol fundamental en las propiedades funcionales y estructurales de macromoléculas. La presencia de un solvente con una alta constante dieléctrica, como lo es el agua, modifica la interacción entre cargas más allá del termino coulombiano como influencia del campo generado por el medio.

Una forma posible de estudiar el fenómeno resulta en una descripción continua de las propiedades dieléctricas del sistema. Si es posible obtener soluciones numéricas precisas, el comportamiento electrostático de largo rango se podrá describir correctamente, y sólo serán necesarias correcciones de corto alcance para precisar el detalle atómico.

Para esto se supone que la región dentro de la molécula tiene una constante dieléctrica uniforme ϵ_1 y que todas las cargas explícitas de la misma se encuentran en esta región. La región exterior por su parte tendrá una constante dieléctrica ϵ_2 y representa una solución iónica ideal con una dada fuerza iónica y un comportamiento de acuerdo a la ecuación de Poisson-Boltzmann linealizada. La respuesta dieléctrica se asume lineal en ambas regiones, lo cual es válido cuando el campo eléctrico es pequeño o en el caso en que ocurran ordenamientos estructurales específicos de las moléculas del solvente. En tales casos, no obstante, las moléculas del solvente serán tratadas explícitamente y no como parte del continuo.

Esta descripción del continuo puede ser considerada de la siguiente manera. Consideremos una superficie cerrada, Σ , que contiene la molécula y sigue rigurosamente su forma. Dentro de la superficie (*región I*) existen N cargas q_i en puntos r_i . $i = 1, 2, \dots, N$. En esta región la constante dieléctrica es ϵ_1 y el potencial eléctrico es φ . mientras fuera de la superficie (*región II*) la constante dieléctrica es $\epsilon_2 = \epsilon\epsilon_1$ y el potencial es ψ ; por lo tanto φ satisface la ecuación de Poisson:

$$\nabla^2\varphi(\mathbf{r}) = -\sum_{i=1}^N q_i \frac{\delta(\mathbf{r}-\mathbf{r}_i)}{\epsilon_i},$$

donde $\mathbf{r} \in$ *región I*, y $\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ es la función de distribución delta en \mathbf{r}_i .

Por otra parte el potencial exterior ψ satisface la ecuación de Poisson -Boltzmann

linealizada

$$\nabla^2 \psi(\mathbf{r}) = \kappa^2 \psi(\mathbf{r}) ,$$

donde $\mathbf{r} \in \text{región II}$, y aquí κ es la inversa de la longitud de apantallamiento de Debye definida como : $\kappa^2 = \frac{2IF^2}{\epsilon_2 RT}$ con $I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$

En esta ecuación I es la fueraz iónica, F es el Faraday (96485.309 C mol⁻¹), y ϵ_2 es la conatante dieléctrica del medio, que es igual a la constante dieléctrica relativa (80 para el agua), multiplicada por la permitividad del vacío ($\epsilon_0 = 8.854187817 \times 10^{-12}$ Fm⁻¹). R es la constante de los gases (8.314510 J mol⁻¹ K⁻¹), T es la temperatura absoluta en °K , c_i la concentración de las especies iónicas en moles por metro cúbico, y z_i su carga en unidades de carga elemental.

Los potenciales deben satisfacer las siguientes condiciones de borde:

(i) continuidad del potencial eléctrico: $\varphi(\mathbf{r}) = \psi(\mathbf{r})$, en la superficie Σ .

(ii) continuidad de la componente normal del desplazamiento dieléctrico:

$$\left(\frac{\partial \varphi}{\partial n} \right) (\mathbf{r}) = \epsilon \left(\frac{\partial \psi}{\partial n} \right) (\mathbf{r}) \text{ en } \Sigma. , \text{ donde } n \text{ es el vector unidad normal a la superficie}$$

con sentido hacia el exterior ubicado en el punto \mathbf{r} , y $\epsilon = \frac{\epsilon_2}{\epsilon_1}$.

Soluciones analíticas en problemas de este tipo, son sólo posibles para casos especiales, por lo cual métodos numéricos han sido desarrollados, como por ejemplo métodos de diferencias finitas o elementos finitos, pero el desarrollado por Juff er , en base a la teoría de elementos de borde, permite reformular las ecuaciones integrales de manera que no aparecen singularidades, y llegándose a dos ecuaciones integrales que pueden ser resueltas para encontrar las dos incógnitas: $\varphi(\mathbf{r})$ y $\left(\frac{\partial \varphi}{\partial n} \right) (\mathbf{r})$.

De esta manera pueden obtenerse los potenciales internos y externos que, a partir de los datos de coordenadas obtenidos de la resolución de la estructura atómica de una

proteína, permiten el análisis electrostático de la misma.

2.3.4 Efecto de la frecuencia en el apantallamiento de cargas. Como hemos visto, las interacciones eléctricas son de extrema importancia en los sistemas biológicos, y son afectadas por las condiciones del medio. La estabilidad molecular, por ejemplo, es dependiente de la concentración y composición de las sales que contiene el soluto.⁵³

De acuerdo a la teoría de Debye- Hückel, las interacciones eléctricas en una solución electrolítica son completamente apantalladas para distancias mayores a una longitud característica que depende de la concentración de los iones.¹⁷

Otro aspecto importante en el análisis de las fuerzas eléctricas en soluciones iónicas es el comportamiento dinámico de las cargas. Este aspecto no puede considerado con el tratamiento antes citado ni con otras teorías en equilibrio. Cuando campos oscilantes están involucrados, Maxwell predice una frecuencia característica (ω_M) por encima de la cual el sistema cambia del régimen conductor al dieléctrico. Para frecuencias mayores que ω_M , la interacción eléctrica es reestablecida.

En el análisis de fuerzas intermoleculares entre macromoléculas en solución, se observa que una gran molécula puede tener grupos cargados que se muevan a diferentes frecuencias, alguna de ellas por encima de la frecuencia característica de la solución, esto implica la posibilidad de que el apantallamiento de cargas sea eliminado produciendo una selección de cargas a grandes distancias.^{15 57}

CAPÍTULO 3.

ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL COMPLEJO PAPAÍNA-LEUPEPTINA.

3.1 PAPAÍNA Y LEUPEPTINA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.

Las proteasas cisteínicas, muestran secuencias³¹ y estructuras similares, como lo demuestran la papaína²¹, actinidina², calotropina,²⁶ y cruzipapaína³⁹; lo cual es una fuerte evidencia de la existencia de un único ancestro.

La papaína es una de las proteasas sulfhidrúlicas extraídas del látex de *Carica Papaya*.

Es un monómero con un peso molecular aproximado de 23000Da. (*figura 6*), que tiene dos dominios: uno plegado en un barril beta y otro caracterizado con una hélice de aproximadamente 20 residuos.



figura 6:estructura terciaria de la Papaína

El Sitio activo presenta una forma de V con la presencia de una cisteína (CYS 25) y una histidina (HIS 159), en el vértice de la hendidura y un aspártico (ASP 158), posible responsable del enfoque electrostático de algunos inhibidores.

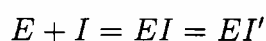
Esta enzima fue aislada por primera vez en forma cristalina por Balls,³ y a partir de ese momento extensivamente estudiada, por ser un típico ejemplo de la familia de proteínas cisteínicas .

Por su característica de poseer un grupo thiol en el grupo activo, es un excelente modelo estructural para proteínas de estas características que se conocen partícipes de la degeneración de proteínas musculares.

Una amplia variedad de inhibidores de bajo peso molecular han sido estudiados⁵⁵,⁵⁶ y las estructuras de la papaína sola y en complejo con diferentes de estos inhibidores han sido resueltos en distintas formas cristalinas^{29 35 64 32 , 21} con la intención de realizar estudios comparativos que determinen la existencia de modificaciones de la estructura terciaria de la enzima, en presencia de distintos inhibidores o en diferentes condiciones de cristalización.

Uno de los inhibidores de la papaína es el péptido aldehído Leupeptina (Ac-Leu-Leu-Arginal).¹ La Leupeptina tiene una amplia especificidad, inhibiendo otras proteasas cisteínicas como así también proteasas de serina como plasmina y tripsina. La Leupeptina también ha sido investigada en estudios relacionados con la acción de proteasas en metástasis,⁴³ síntesis de proteínas⁴¹ y distrofias musculares.⁵²

La reacción de inhibición de la Leupeptina a la papaína ocurre en dos pasos⁴⁸:



el inhibidor *I* se une de manera no covalente al sitio activo de la Enzima y forma

el complejo EI . en un segundo paso se forma una estructura que corresponde a análogo de transición EI' con una constante de disociación de 10^{-9} .

La estructura terciaria del complejo papaína- leupeptina ha sido resuelta en una de sus formas cristalográficas,⁴⁹ , con parámetros de celda similares a los obtenidos para la estructura de la enzima en complejo con el inhibidor E64-C(forma II)³²

En este capítulo se describe el trabajo realizado en el análisis cristalográfico del complejo con parámetros de celda similares a la forma I resuelta para el mismo complejo papaina-E64C.⁶⁴

3.2 ANÁLISIS CRISTALOGRAFICO DEL COMPLEJO PAPAÍNA- LEUPEPTINA.

La proteasa purificada utilizada en este trabajo fue adquirida a Sigma Chemical Company, al igual que la leupeptina usada para inhibir el sitio activo. La inhibición fue realizada mezclando leupeptina y papaína en una relación estequiométrica 4:1, es decir , cuatro moléculas del inhibidor por cada una de la enzima nativa.

En un tubo eppendorff fue colocada la enzima en una concentración de 20 mg/ml y a esto se le agrega el inhibidor , disolviendo todo en un buffer Tris 20 mM a pH 8.0 . La muestra es centrifugada a 7 Krpm durante 4 min con el fin de eliminar las impurezas.

Los ensayos de cristalización se realizaron con el método de difusión de vapor en gotas suspendidas.

Entre los micrométodos de cristalización, las técnicas de difusión de vapor son probablemente las más utilizadas. Este principio es adecuado cuando se cuenta con pequeños volúmenes . Una gota conteniendo la enzima a cristalizar, junto con el buffer,

agentes cristalizantes y otros posibles aditivos, es equilibrado contra un reservorio conteniendo una solución de agente cristalizante a una mayor concentración que la gota. El equilibrio es logrado por difusión de los elementos volátiles (agua o solventes orgánicos) hasta que la presión de vapor es igual en todo el medio.

El sistema consiste en una caja plástica conteniendo 24 reservorios para posibilitar la realización de varias pruebas simultáneas. Cada uno de estos reservorios tiene un volumen de aproximadamente 2 ml y será recubierto con un vidrio previamente lavado y siliconado el cual contendrá la gota con el material a cristalizar, de acuerdo a lo que muestra la *figura 7*.

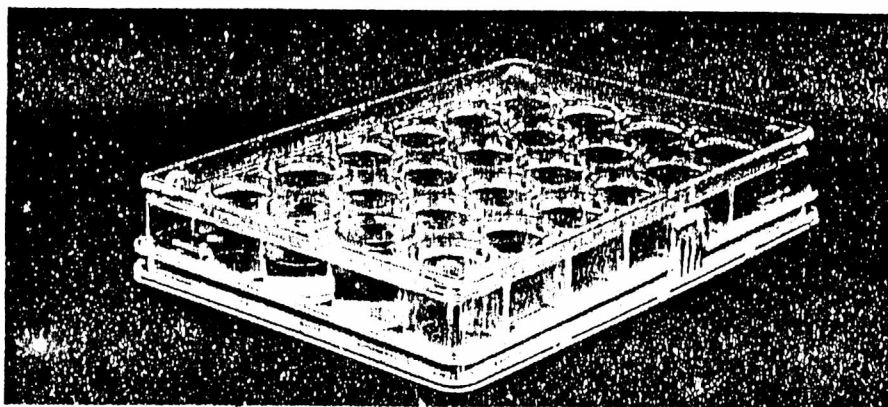


figura 7:caja de cristalización

El sistema permite el control de los ensayos al mismo tiempo que se puede seguir la evolución del contenido de las gotas para observar la posible existencia de precipitados. Cuando no se observan precipitados o cristales es posible que no se haya llegado al punto de sobresaturación o bien que el sistema se encuentre en un punto de equilibrio metaestable, lo cual es modificado cambiando las condiciones del medio.

En nuestro caso, los reservorios contenían buffer Tris junto con metanol, el cual fue utilizado como agente precipitante en distintas concentraciones, entre 20% y 70%. También fueron usadas otros agentes precipitantes como Sulfato de Amonio o PEG (polyetilen-glycol), de diferentes pesos moleculares (2 KD, 4 KD, 6KD).

Con varias de estas condiciones fueron conseguidos precipitados de tipo amorfo y luego cristalinos, lo cual permitió la modificación sucesiva de los parámetros, siendo las mejores condiciones obtenidas : gotas de 6 μ l, de la muestra stock, en equilibrio con un reservorio conteniendo 1ml de metanol-Tris (2:1) con un 10% de cloruro de sodio. La caja, fue colocada a 4°C, y los cristales crecieron en el término de 6 a 7 días. Estas condiciones de cristalización fueron perfectamente reproducibles, e inclusive se lograron cristales de idénticas características en las mismas condiciones de entorno pero por el método de sitting-drop con volúmenes de muestra del orden de 12 μ l.

El problema surgido a partir de las condiciones antes mencionadas es que, debido a que los cristales crecen en un medio conteniendo un solvente muy volátil, después de poco tiempo las gotas se secan, lo que torna muy dificultoso el proceso de montar los cristales en un tubo capilar. Esto llevó a la necesidad de desarrollar un proceso de rehidratación de los cristales sin que esto signifique un deterioro en los mismos, y permitiéndolo la posterior manipulación de los mismos.

A valores de pH entre 7.0 y 8.5 dos hábitos cristalinos se obtuvieron, y se identificaron como forma A y forma B.

A partir de la obtención de los cristales, comienza el proceso de colección de datos.

Luego de varios intentos, se tomó un cristal de la forma A de dimensiones

(0.4x0.4x0.6) mm, (*figura 8*) el cual fue montado en una cámara de precesión de acuerdo a lo que fue anteriormente descrito.

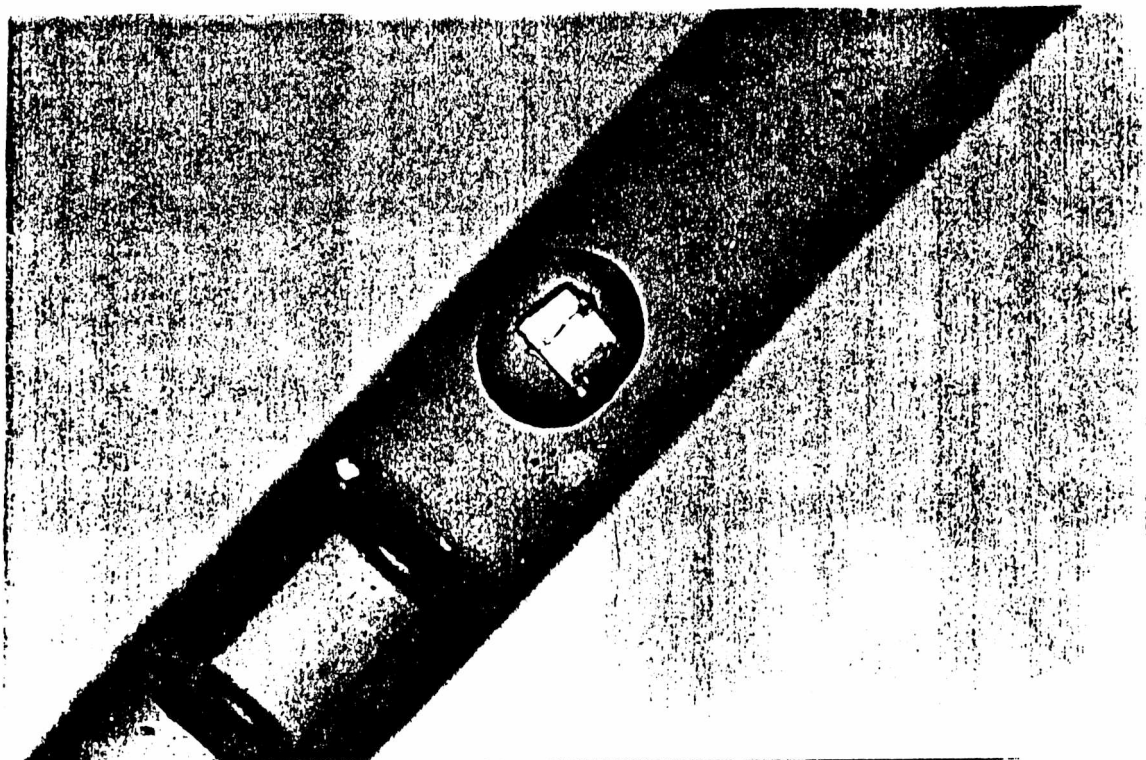


figura 8: cristal del complejo Papaína-Leupeptina

Estos datos preliminares se tomaron en un equipo Rigaku de ánodo rotatorio a una potencia de 8Kw. El proceso de orientación del cristal involucró un gran número de fotos fijas y de bajo ángulo de precesión.

Primero se realizó un pequeño corte en la esquina superior derecha de un film de 13 cm x 13 cm que fue colocado en un cassette y montado en la cámara. El corte realizado asegura poder relacionar el patrón de difracción con la cámara.

Luego se reguló la distancia del cristal al film a 70 mm y se centró y ajustó el eje de la cámara de modo que el haz de rayos X incida perpendicular a la cara elegida.

De esa manera se tomó la fotografía con un haz no filtrado . El tiempo de

exposición de estas fotografías varió entre 5 min y 10 min.

Una vez lograda la foto, se procedió al revelado de la misma dentro del cuarto oscuro. Este proceso de revelado implica abrir el cassette, ponerlo en una cubeta con solución reveladora por 4min a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.7 l de revelador Kodak diluído en 3.3 l de agua; luego se pasa el film a una solución con un 1% de ácido acético la cual detiene el revelado, para proceder por último al fijado del registro fotográfico en una solución con 0.81 l de fijador Kodak y 3.2 l de agua, una vez que el film es fijado por 10 minutos, debe lavarse con agua por espacio de 30 min y secado con aire a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.¹²

En las fotos de precesión, los films, marca Kodak, fueron colocados a una distancia cristal-film de 60 mm. Las fotos utilizadas para determinar los parámetros de celda fueron sacadas con un ángulo de precesión de 20° y una pantalla con un $r = 15$ cm a una distancia de 41.2 mm. El colimador usado en esta ocasión fue de 0.3mm con un filtro de níquel y el tiempo de exposición de cada foto fue de 8 horas.

A partir de dos fotos de precesión con las características citadas, y tomadas a 90° entre sí se determinó que el cristal pertenece al sistema ortorrómbico con grupo espacial $P_{2_12_12_1}$ y con parámetros de celda $a=42.6\text{ \AA}$, $b=96.0\text{ \AA}$, $c=50.0\text{ \AA}$.

El mismo procedimiento fue seguido con un cristal de la forma B, para el que se obtuvieron los siguientes parámetros $a= 32.7\text{ \AA}$ $b= 101.3\text{ \AA}$ y $c= 32.7\text{ \AA}$ con $\beta = 98^{\circ}$.

Una vez obtenidos los parámetros cristalinos se inició la colección de datos de difracción para la forma A con fotos de oscilación con un tiempo de exposición de 25 horas, y oscilaciones de 2.5° a una potencia de 1Kw.

Un total de 30 fotos fueron colectadas originalmente. Posteriormente, y debido a dificultades encontradas para microdensitometrizarse las placas, se logró una colab-

oración del National Center Institute, Frederick Cancer Research and Development Center, en Frederick, Maryland, USA, a donde fueron enviados cristales con los cuales se obtuvieron un conjunto de datos a alta resolución cuya estadística se adjunta en la

Tabla 1.

R merge = 13.13% Reliability = 13.63%
Refined sum = 0.7327E+06
R merge of full reflections = 10.46% R merge of partial reflections = 25.03%
12996 independent reflections
mean intensity = 76.0 maximum intensity = 2596.2
mean sigma(int)= 10.0 minimum intensity = 0.1
39489 total accepted observations, (FSQ/SIG > 0.0)
single observations: 646 full, 274 partial
accepted observations: 27759 full, 10810 partial
rejected observations: 984 full, 1695 partial
number of reflections = 12996 min & max resolution = 48.00 2.07

Tabla 1: Estadística de los datos de difracción

Los datos colectados en un sistema R-axis II image plate, montado en un generador Rigaku RU-200 y que confirmaron los parámetros cristalinos, cuyos valores refinados son: $a=42.67 \text{ \AA}$, $b=96.12 \text{ \AA}$, $c=50.03 \text{ \AA}$. Con el conjunto de datos a una resolución máxima de 2.1 \AA se inicia el análisis con el fin de ubicar el inhibidor en el sitio activo de la enzima.

El análisis de los datos de rayos X, que llevaron al estudio cristalográfico del complejo Papaína-leupeptina con los parámetros de celda antes mencionados, fue real-

izado con el programa X-plor.⁸

X-Plor es un programa para la determinación y refinamiento de estructuras tridimensionales de moléculas biológicas utilizando datos de difracción.

Realiza una exploración del espacio de conformación de macromoléculas confinadas a regiones permitidas por los datos experimentales y los errores estimados.

El programa está basado en una aproximación de la función energía que consiste en una combinación arbitraria de términos energéticos efectivos y empíricos que describen los datos experimentales.

La energía puede ser minimizada por una variedad de métodos de gradientes descendientes o procedimientos de "simulated annealing". La búsqueda de cambios conformacionales y energéticos puede ser realizada además por medio de protocolos personales gracias a la flexibilidad del lenguaje utilizado por el programa.

Varios pasos son necesarios a partir de la obtención de los datos experimentales, comenzando con el adecuado formato para los datos estructurales iniciales. Este paso implica la utilización de la topología y parámetros que fueron tomados de Charmm⁷

La topología utilizada trata los hidrógenos implícitamente, excepto para la interacción entre N y H, en la cual son tratados explícitamente en orden de obtener un potencial más cercano a la realidad.

Unos pocos parámetros estereoquímicos fueron modificados. Por ejemplo el ángulo dihedro de la unión peptídica fue reemplazado para permitir solo la transición *trans*. en el caso de la prolina, el término de segundo grado fue retenido con una constante de fuerza reducida para permitir la transición entre prolinas *cis* y *trans*.

También fue modificada la constante de fuerza del ángulo de torsión impropio el cual especifica la geometría tetrahédrica de los carbonos α para evitar la transición de L a D aminoácidos.

Por último, durante el proceso de refinamiento fueron sacadas las cargas de los aminoácidos cargados.

Para generar una estructura molecular para una combinación de proteína, inhibidor y aguas estructuradas fue necesario cortar la secuencia original en una serie de archivos cada uno con las coordenadas y parámetros correspondientes para poder establecer la topología adecuada a cada uno de los elementos constitutivos.

Inicialmente, se toman las coordenadas correspondientes a la estructura cristalográfica de la papaína en su forma nativa,²¹ con parámetros de celda: $a=42.8 \text{ \AA}$, $b=95.7 \text{ \AA}$, $c=49.7 \text{ \AA}$ obtenidas del Protein Data Bank.⁴ A partir de esto e incorporando los parámetros adecuados se genera el archivo que contiene los datos de coordenadas, con factores de temperatura y ocupación correspondientes a las mismas; juntamente con un archivo en el cual se incluyen las características de conectividad de la secuencia. Durante este paso se tienen en cuenta cuestiones adicionales y de gran utilidad como son la posibilidad de establecer los puentes disulfuro que se encuentran en la estructura entre los residuos Cys22 - Cys63, Cys56 - Cys95 y entre Cys153 - Cys200 además se incorporan hidrógenos que posteriormente serán necesarios en los ciclos de refinamiento.

Algo más que fue considerado es la inclusión de la información de las moléculas de agua que debieron tratarse explícitamente y con los parámetros adecuados.

Una vez obtenidos los archivos, el siguiente paso es verificar el valor del parámetro R y determinar el factor de peso ideal W_A entre E_{XREF} y E_{EMPIR} .

Este proceso es necesario antes de realizar cualquier paso de refinamiento del sistema.

Los terminos energéticos corresponden a valores involucrados en la energía total del sistema. E_{EMPIR} . describe la energía de la molécula a través de una función empírica. La misma consta de una suma de términos pesados con factores que tienen en cuenta los átomos involucrados. Algunos de los términos de esta suma corresponden a la energía conformacional del sistema, teniendo en cuenta el aporte de la energía de unión covalente, los ángulos dihedros, la planaridad y la quilaridad. Otros términos involucrados describen las interacciones del tipo puente hidrógeno, como así también parámetros relacionados con la simetría del sistema, terminos electrostáticos e interacciones intramoleculares.

En esta etapa es necesario introducir los archivos de datos estructurales, los términos de energía adecuados, los parámetros cristalográficos calculados, y los operadores de simetría del grupo espacial, y los factores de forma atómicos para los distintos tipo de átomos involucrados. Con estos datos se calculan los Factores de estructura que luego se utilizan en el refinamiento.

Al mismo tiempo se introduce un archivo con los factores de estructura observados, indicándose el número de reflexiones, el rango de resolución del cual se tomarán los datos, el corte que se realiza de acuerdo al sigma de los valores observados. y el método de Transformada Rápida de Fourier que se utiliza.

En la *Tabla 2* se muestran los parámetros que son utilizados para el refinamiento de la estructura.

Número de Reflexiones: 8986
Rango de Resolución: 10-2.4
Corte : $2.5 * \sigma$

Tabla 2: parámetros de refinamiento

Con estos datos se realiza el primer paso que conduce a un valor de R inicial de .535, y un $W_A=168754$.

Con este valor de peso se procedió al primer ciclo de refinamiento.

Esta etapa comienza con una minimización rígida, que baja el R a un valor de .507.

Posteriormente un ciclo de "Simulating Annealing" es efectivizado calentando la molécula a una temperatura de $3000^{\circ}K$ y permitiendo el enfriamiento lento en pasos de $25^{\circ}K$, durante los cuales se realizan ciclos de minimización. El paso concluye cuando el baño alcanza nuevamente la temperatura de $300^{\circ}K$.

Este proceso de Simulating annealing otorga a la molécula gran movilidad a través del aumento de temperatura permitiendo a las cadenas laterales buscar posiciones más efectivas, abandonando mínimos energéticos locales que de otra forma mantendrían una estructura con átomos posicionados en lugares equivocados.

Esta minimización lleva a valores de R del orden de 40 % lo cual nos está denotando una mejora en el posicionamiento de los átomos.

El ciclo culmina con lo que se conoce como un refinamiento posicional convencional del tipo Powell. En este tipo de refinamiento las componentes energéticas de interacción inter e intramolecular son consideradas. El método permite a los átomos

moverse en la vecindad de su posición minimizando las componentes de Energía.

Ciclos sucesivos fueron llevados a cabo intercalando en cada uno de ellos un cálculo del factor de peso que otorgue una escala adecuada entre los datos cristalográficos y los datos estructurales de la estructura conocida.

El proceso llevó a un valor del R del 28.8%.

A este punto fue necesario observar la geometría de la estructura para corroborar que la misma no haya sufrido modificaciones que determinen posiciones estéricamente prohibidas.

Este análisis se lleva a cabo calculando el RMS (root mean square) para los valores de longitud en las uniones entre los átomos, los ángulos, los ángulos dihedros impropios y propios.

Los valores finales indican para las uniones un RMS de 0.17 Å, para los ángulos un valor de 2.6 ° y muestran que la estructura respeta la geometría para una cadena polipeptídica y las cadenas laterales correspondientes.

Con esta estructura obtenida, se calculan diferentes mapas de densidad electrónica, de acuerdo a cálculos $F_O - F_C$ y $2F_O - F_C$.

Estos mapas permiten el seguimiento de la cadena polipeptídica de la papaína con la ubicación precisa de ciertos átomos y aminoácidos en general.

Esta etapa de determinación de posiciones atómicas, fue realizada utilizando el programa gráfico Frodo, en una PC Pentium MMX 233 con 32 Mb de memoria RAM.

En la zona del sitio activo se observa una zona de densidad electrónica que indicaría la presencia del inhibidor (*figura 9*).

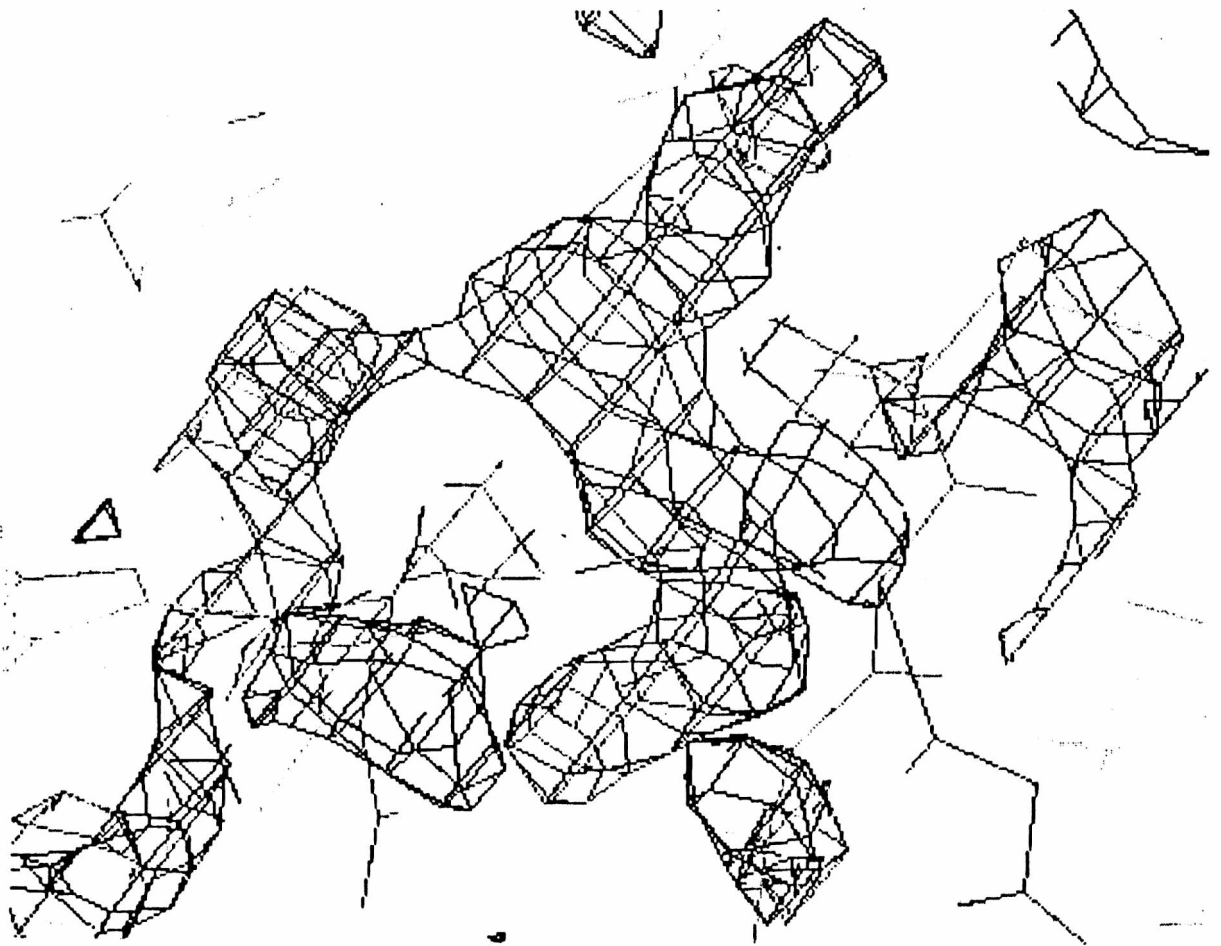


figura 9: mapa de densidad electrónica Fo-Fc que muestra el sitio de ubicación del inhibidor.

Es así que se toma una molécula de leupeptina que es colocada inicialmente dentro de la densidad electrónica, comprobándose que gran parte de su estructura fitea de manera clara en la zona de densidad.

A partir de esto se modifica ligeramente la estructura de la Leupeptina, identificándose interacciones puente hidrógeno entre el inhibidor y la enzima y al mismo tiempo se incorporan moléculas de agua dentro del sitio activo de acuerdo a la presencia de densidad electrónica. (*figura 10 y figura 11*).

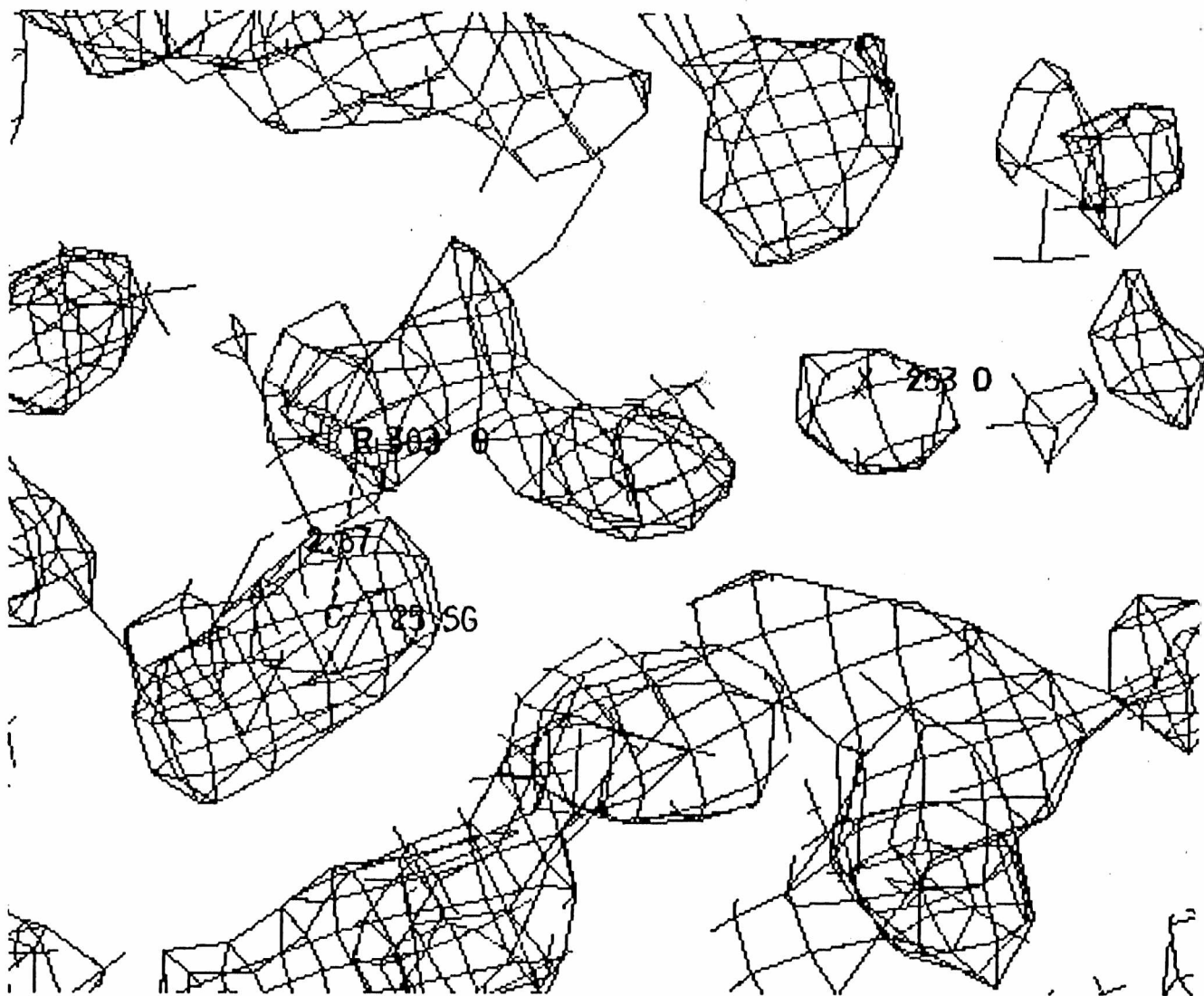


figura 10: mapa 2Fo-Fc que muestra la interacción entre el O de la ARG 303 del inhibidor y el S de la CYS 25. Se observa además una molécula de agua (253) en cercanías del sitio de unión.

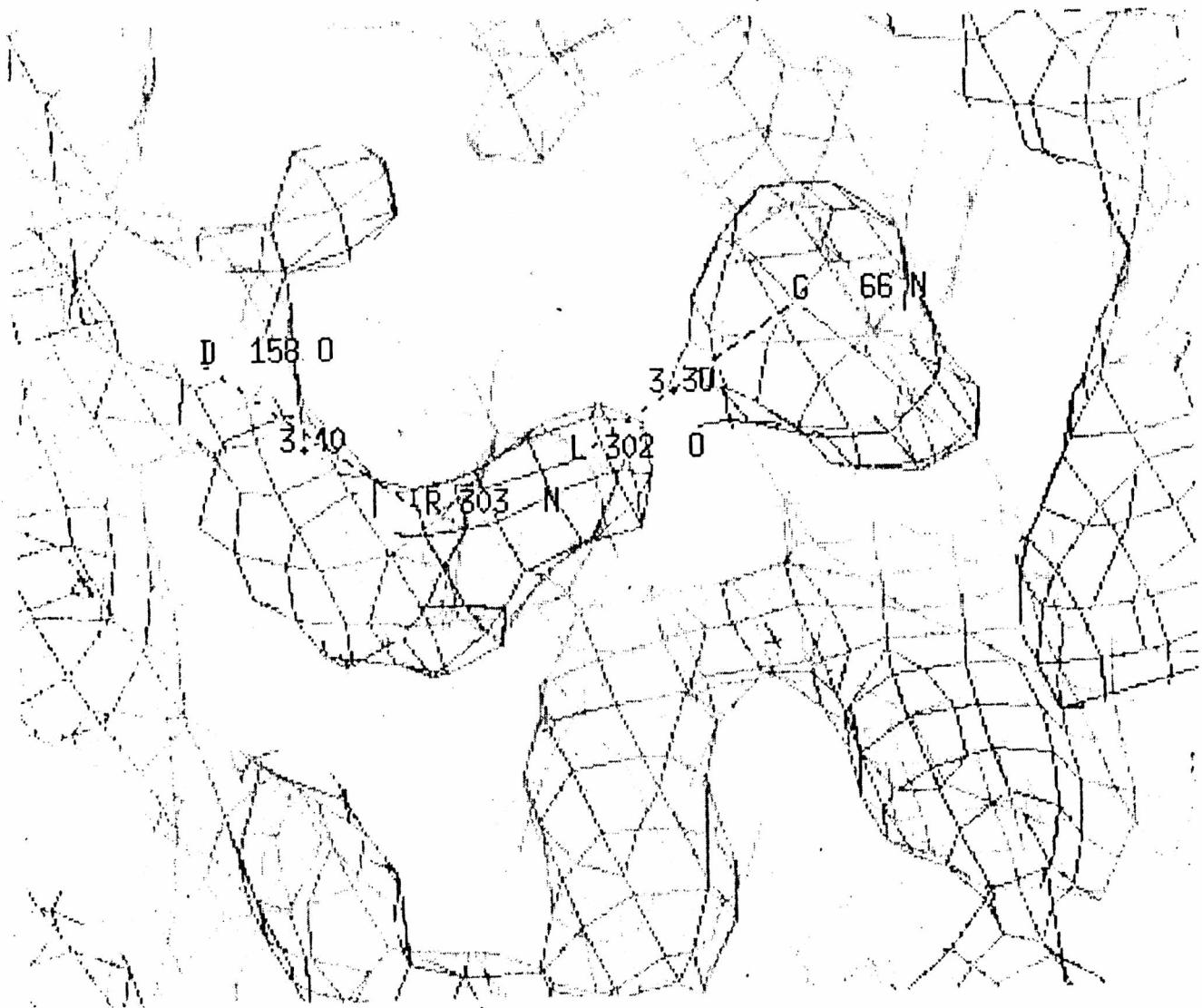


figura 11: mapa 2Fo-Fc que muestra la interacción entre átomos pertenecientes a aminoácidos ubicados en el sitio activo de la papaína con átomos del inhibidor.

La ubicación de la molécula de inhibidor lleva a establecer las interacciones intermoleculares y reacomodar de esta manera posiciones atómicas de las cadenas laterales de aminoácidos dentro del sitio activo como así también del inhibidor.

La *Tabla 3* muestra las distancias determinadas para las interacciones, que encuadran en las longitudes standar para este tipo de uniones. En la misma se identifica la longitud de enlace de la interacción entre tres átomos del inhibidor con los correspondientes a las cadenas laterales de los aminoácidos de la enzima.

átomo de leupeptina	átomo en la papaína	longitud del enlace
oxianión ARG	nitrógeno CYS 25	2.67
nitrógeno ARG	oxígeno ASP 158	3.10
oxígeno LEU	nitrógeno GLY 66	3.30
oxianión ARG	nitrógeno CYS 25	2.95

Tabla3 : interacciones puente hidrógeno en el complejo P-L

Con esta nueva estructura se realizan un par de ciclos de refinamiento con las mismas características que el proceso llevado a cabo inicialmente y que fuera detallado.

Este refinamiento lleva a un R cristalográfico del 25.2 % con un RMS de 0.17 para el total de los átomos involucrados y una estructura medianamente refinada.

3.3 CÁLCULO DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO DE LA INTERACCIÓN PAPAÍNA-LEUPEPTINA.

A pH fisiológico la papaina tiene una carga neta de +10, mientras que la leupeptina posee una carga positiva de +1.

Si la forma detallada del campo electrostático no fuera considerada, esto podría

sugerir que existiría una repulsión neta entre el inhibidor y la enzima que reduciría la velocidad de asociación .

El hecho de que la interacción se lleva a cabo y el inhibidor ingresa al sitio activo de la enzima uniéndose a la misma por medio de puentes hidrógeno , es una fuerte evidencia de que, a pesar de su carga neta, la papaína produce un potencial electrostático en el cual debe tenerse en cuenta la distribución particular de las cargas, lo cual sería capaz de aumentar dicha velocidad de asociación del inhibidor, favoreciéndola.

La contribución del efecto electrostático al reconocimiento enzima-inhibidor es analizado y calculado, por medio del programa Molpot,³⁰ basado en el método de elementos de borde.

El cálculo fue realizado con un modelo del complejo, a una molaridad de 0.1 y considerando una constante dieléctrica de 2.0 para el interior de la molécula y de 78.54 para el solvente , es decir la permitividad del agua a 298.16°K.

Los mapas de potencial electrostático muestran de manera clara, la presencia de un "canal " negativo en la zona del Sitio Activo (*figuras 12a y 12b*),

Este fenómeno, se asigna a la distribución de aminoácidos cargados negativamente, particularmente el ASP 158, como así también a la presencia del átomo de Azufre también con carga negativa, los cuales se ubican estratégicamente dentro de la estructura terciaria de la enzima y le confieren a la misma un perfil electrostático particular con la presencia de dicha región negativa en cercanías del Sitio Activo.

Esta zona negativa , desaparece por la presencia del inhibidor cargado positivamente (*figuras 13a y 13b*).

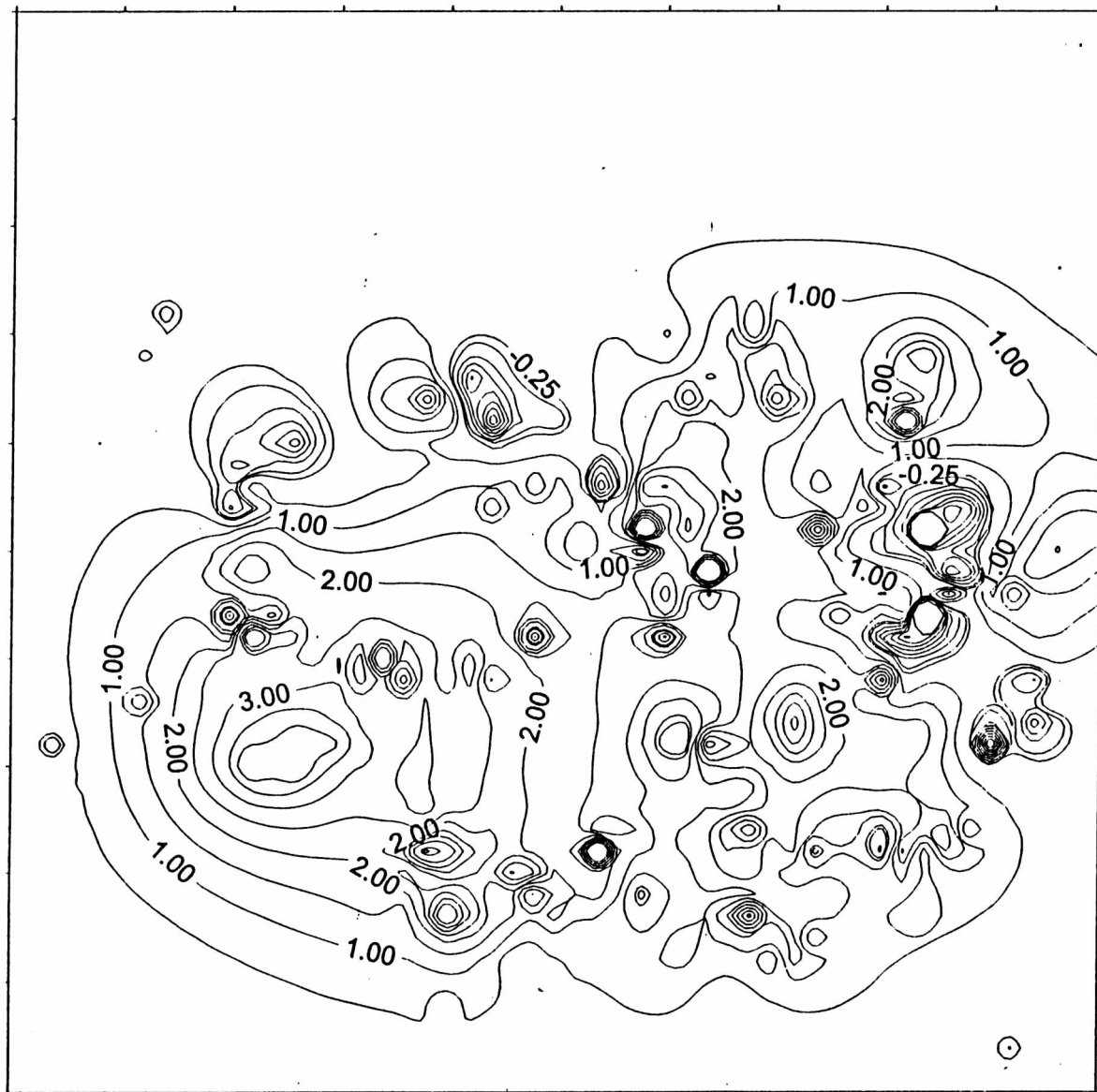


figura 12a : mapa del potencial electrostático de la papaína en ausencia del inhibidor y en una orientación molecular similar a la de la figura 6.

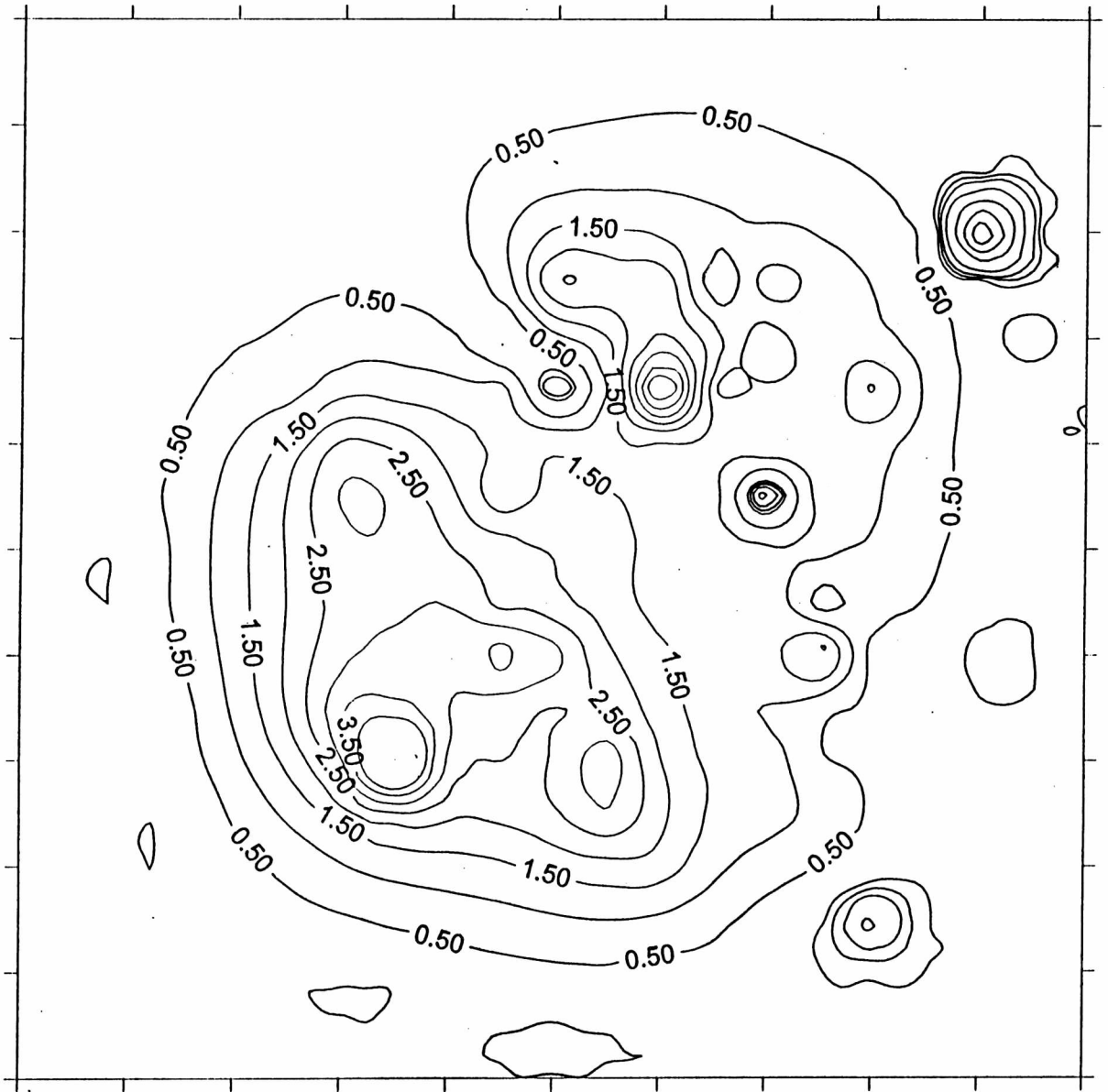


figura 12b : el mismo mapa en una orientación molecular rotada en 90° según el eje y, con respecto a la figura anterior.

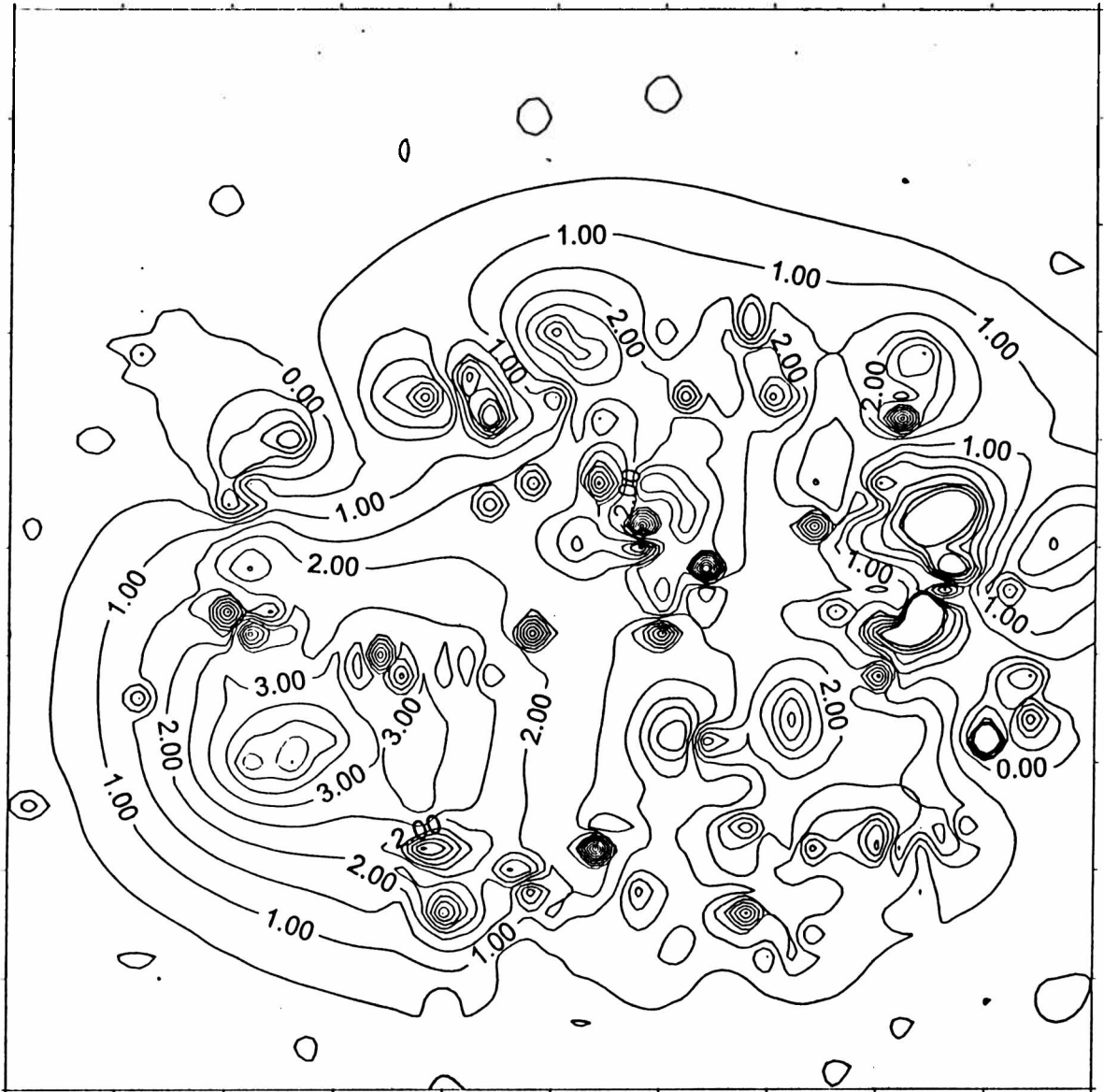


figura 13a: mapa del potencial electrostático de la papaína con la leupeptina en el sitio activo y en una orientación molecular similar a la figura 12a.

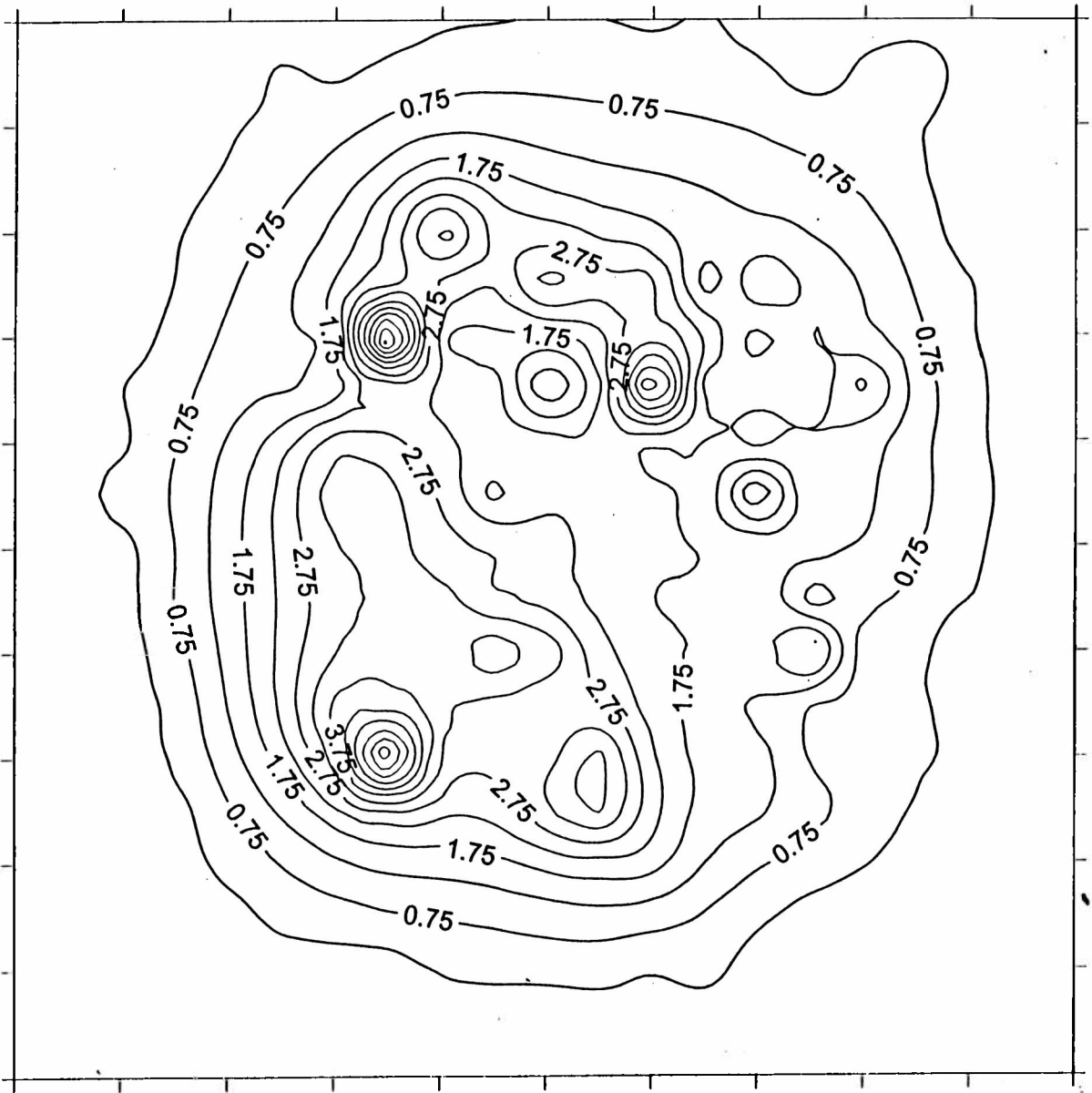


figura13b: el mismo mapa rotado en 90° según el eje y , con respecto a la figura

anterior.

Los datos cristalográficos aportan un dato adicional, ya que los átomos pertenecientes al aminoácido citado tienen valores para el factor de temperatura nominalmente más elevados que el promedio en la zona indicada.²¹

Para estos átomos el valor de B es del orden de 30 \AA^2 , cuando desplazamientos medios normales indican valores que no superan los 20 \AA^2 . Esto está indicando de manera inequívoca la mayor movilidad para los átomos involucrados en el reconocimiento del inhibidor, datos que son apoyados por otros obtenidos por cálculos de Dinámica Molecular. Este comportamiento dinámico de las cargas, como ya ha sido dicho, no puede ser considerado con un tratamiento de Debye-Hückel.

Como resultado vemos que el apantallamiento de las cargas puede ser eliminado a altas frecuencias produciendo una selección de cargas interactuantes a largas distancias lo cual tiene evidentes consecuencias en la cinética del proceso.

En conclusión la relación entre estructura y función se denota en este caso particular, a partir de la importancia que adquiere el entorno del sitio activo en el reconocimiento de la leupeptina por parte de la enzima.

Los resultados sugieren que el campo electrostático particular del sitio activo de la papaína permite a la leupeptina acercarse sin ser repelida por la carga neta de la enzima, es por esto que el potencial negativo en la región juega un rol crucial en proveer un área de acercamiento para el inhibidor.

CAPÍTULO 4.

ELECTROSTÁTICA DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA FOSFOLIPASA A₂ Y UNA MEMBRANA LIPÍDICA

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA FOSFOLIPASA A₂ DE PANCREAS PORCINO.

Las Fosfolipasas del tipo A₂ (PLA₂, por sus siglas en inglés) pueden ser agrupadas en distintas familias de proteínas que catalizan la hidrólisis de las uniones 2-acyl de fosfolípidos, específicamente la unión 2-ester de los 1,2-diacyl-3-sn-fosfoglicéridos formando ácidos grasos y lisofosfolípidos cuyos productos son parte de la respuesta inflamatoria.⁶¹

Las fosfolipasas mejor caracterizadas son las pequeñas (de aproximadamente 14 KD), dependientes de calcio, que son enzimas secretorias de diferentes orígenes, como pancreático o venenoso.⁶⁰

Este tipo de enzima es caracterizado por trabajar a pH alcalino teniendo su máxima actividad enzimática en presencia de una interfase agua-lípidos organizada y como se ha dicho en presencia de Calcio..¹⁸

Es conocido que la enzima une dos iones Ca²⁺ . Uno de ellos es fuertemente unido al residuo Asp49 del sitio activo,²⁴ mientras que el otro, se une al Glu71²⁰ de manera más débil, mejorando la afinidad de la enzima por interfaces agua-lípido organizadas.⁴⁴

Estructuras a alta resolución correspondientes a complejos de PLA₂ secretorias con fosfolípidos han dado información acerca de la estereoquímica y estados de

transición, confirmando el mecanismo de esterólisis.⁵⁰

Además, en el caso particular de la PLA₂ de pancreas porcino, la presencia del catión divalente resulta obligatoria para la reacción enzimática. En este contexto, se ha postulado el requerimiento de los iones Ca para la unión de la enzima al sustrato, suponiéndose un mecanismo mediante el cual se produce primero la unión del Ca a la enzima, y posteriormente la interacción PLA₂-membrana..⁶⁵

4.2 CÁLCULO DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO DE LA INTERACCIÓN PLA₂ Y UNA MEMBRANA LIPÍDICA DE DIMYRISTOYL FOSFATIDILCOLINA.

La interacción electrostática de la Fosfolipasa A₂ y una membrana lipídica es analizada en presencia y en ausencia de calcio, computándose el potencial electrostático de los componentes y del complejo.

Como ya se ha dicho las interacciones electrostáticas juegan un rol fundamental en varios procesos intercelulares. A menudo estas interacciones involucran residuos característicos cargados pero en casos particulares son reforzados por la presencia de iones tanto positivos como negativos que favorecen la reactividad molecular.

La acción enzimática en lípidos de membrana implica primero la unión a la membrana y luego la acción sobre los lípidos.

Precisos cálculos del potencial electrostático fueron realizados para la enzima aislada y para el complejo y los resultados muestran que la presencia de los iones Calcio contribuyen tanto a la estabilidad del complejo como así también a la creación de un perfil electrostático favorable para la lipólisis de los componentes de la membrana.¹³

El estudio llevado a cabo implicó inicialmente el modelado del complejo. El

mismo fue confeccionado a partir de las coordenadas cristalográficas de la enzima fosfolipasa A₂ de pancreas porcino¹⁹ tomadas del Brookhaven Protein Data Bank,⁴ y una membrana de Dimyristoyl fosfatidilcolina. Las coordenadas pertenecientes a la membrana corresponden a una configuración obtenida luego de una simulación de Dinámica Molecular realizada por Chiu et al..¹¹

Inicialmente un modelo de monocapa regular fue confeccionado, utilizando el programa HyperChem y tomando como punto de partida un fosfolípido armado *ad hoc* y cuyas coordenadas fueron minimizadas con el mismo programa a partir de una corrida en la cual fueron tomados en cuenta los parámetros energéticos.

Con este modelo se realizaron los primeros cálculos que dieron los primeros indicios de los resultados observados posteriormente. A partir de esto y con la posibilidad de contar con un modelo de membrana más realista, se modelizó un complejo enzima-membrana. En el mismo fueron considerados resultados experimentales previos que describían sectores de la PLA₂, que deberían ubicarse en una orientación que les permitiera interactuar con la membrana.

Por otra parte el "canal" del sitio activo fue orientado de manera apropiada. de manera tal que permita a los fosfolípidos ingresar al mismo una vez realido el clivaje de la membrana.

Con el fin de aproximar la enzima a la membrana a distancias favorables energéticamente, fue calculada la energía potencial de interacción del complejo a diferentes distancias PLA₂-membrana. Este cálculo se muestra en la *figura 15* y está tomado con un *r* medido entre puntos arbitrarios de las moléculas intervinientes.

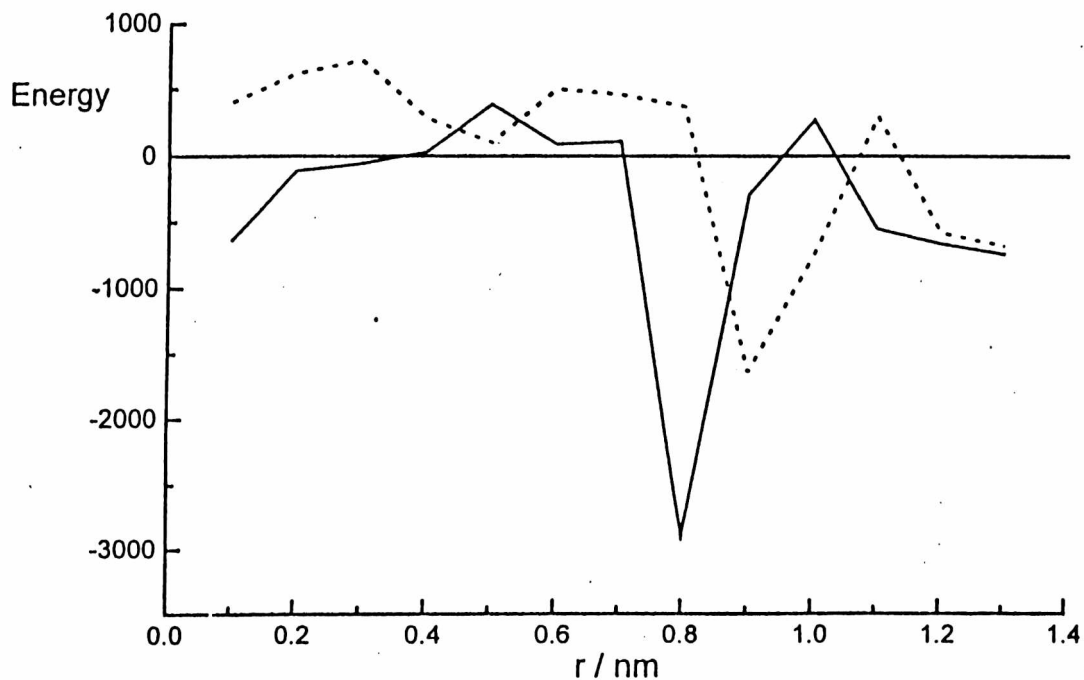


figura 15: Energía Potencial (en unidades arbitrarias del complejo PLA₂-membrana a diferentes distancias r tomado entre dos puntos arbitrarios de la membrana y la enzima. (—) PLA₂ con los dos iones Ca. (- - -) PLA₂ sin los iones Ca.

Como muestra la figura se calcula la Energía en presencia y ausencia de los iones Ca^{2+} siendo evidente el corrimiento producido debido a la inclusión de los iones.

Con este resultado se corrige la posición de la fosfolipasa en el modelo y se procede al cálculo del perfil electrostático.

La imposibilidad de contar con una herramienta gráfica adecuada para visualizar en forma global las líneas equipotenciales, implicó un trabajo especial que permitió identificar el fenómeno postulado.

El potencial electrostático fue calculado utilizando el programa Molpot desarrollado por Juffer y que ya fuera descrito.³⁰

Para el presente caso, las cargas fueron asignadas como cargas atómicas parciales

de acuerdo al campo de fuerzas Gromos,⁵⁸ y localizadas en el centro de cada átomo.

La permitividad dieléctrica de la molécula fue considerada igual a 2.0 y el solvente igual a 78.54, es decir la permitividad del agua a 298.16 °K. Además la longitud de apantallamiento de Debye fue tomada como 0.96223 nm lo que corresponde a valores característicos para una solución fisiológica.

La *figura 16* muestra contornos del potencial eléctrico generado por la PLA₂ en un solvente acuoso en presencia de los dos iones Ca²⁺ y del mismo modo, el potencial producido por una membrana de Dimyristoyl fosfatidilcolina .

En la *figura 17* se observa un corte del complejo PLA₂ - membrana en un plano perpendicular a la membrana y pasando a través de la posición de los iones Ca²⁺ y muestra el contorno del potencial electrostático para el complejo en presencia y en ausencia de los iones. La distancia proteína-membrana es la correspondiente para el mínimo de energía potencial.

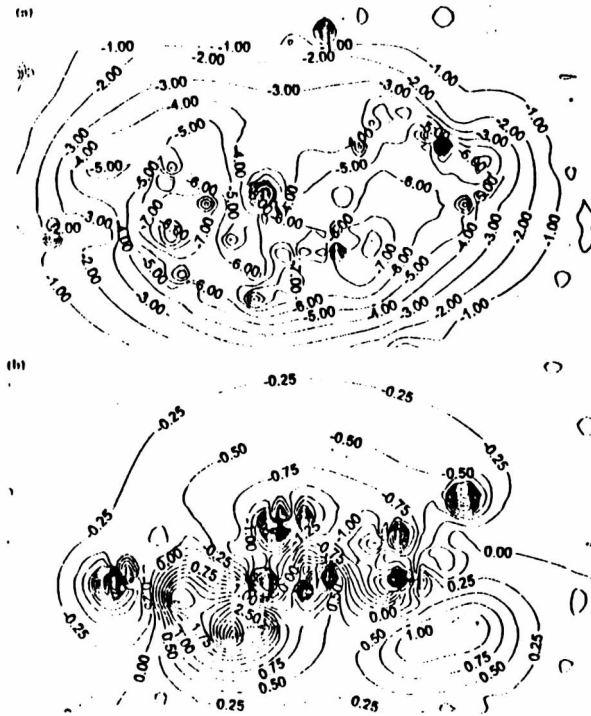


figura 16: contornos de pot. electr. de : (a) la PLA₂ (b) la membrana de DMPC.

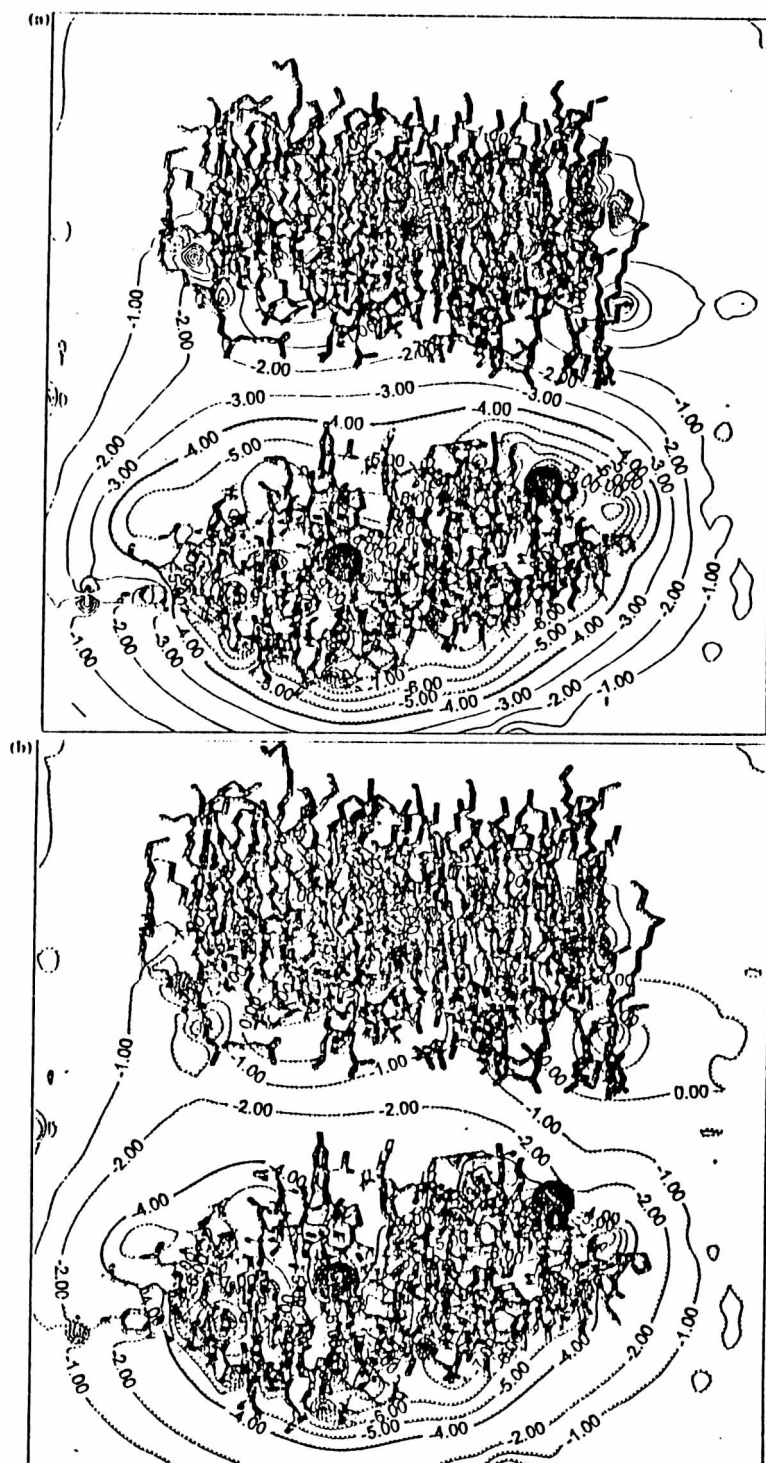


figura 17: contorno de potencial electrostático del complejo mostrado en un corte que pasa por la posición de los iones Ca. (a) en ausencia de los iones y (b) en presencia de los mismos.

De manera similar a las observaciones de Zhou y Shoulten en human synovial PLA₂⁶⁸ los resultados muestran el efecto en el potencial superficial dado a la presencia de los iones Ca⁺⁺ y la preferencia de la Fosfolipasa A₂ pancreática porcina a unirse a membranas cargadas negativamente.

Por otra parte ha sido mostrado que la unión de la enzima a la interfase se produce con la consiguiente deshidratación de ambas superficies.²⁸ Este fenómeno refuerza la sugerencia que surge del presente trabajo de que los fosfolípidos son transferidos al Sitio Activo de la Fosfolipasa a través de un "canal eléctrico" generado por la presencia de la carga positiva de los iones Ca. Esto indicaría que una mutación dirigida a los residuos involucrados en la unión de los iones afectaría en un camino determinante la actividad enzimática.

Es claro que el sitio activo muestra una región de potencial positivo favorable para la posterior interacción con lípidos pertenecientes a la membrana.

Los resultados mostrados muestran de forma inequívoca la importancia del Calcio en la relación estructura-función de la Fosfolipasa A₂.

CAPÍTULO 5.

CONCLUSIONES.

En un trabajo de investigación, como en muchos otros órdenes de la vida, determinar conclusiones no significa marcar una cota superior infranqueable sino permitir una mirada a lo trabajado y elaborar un juicio crítico sobre lo actuado a partir de lo cual podamos aprender de las experiencias positivas y por qué no de las negativas.

Entendido esto, definir el capítulo final de una tesis con el título de conclusiones, invita a trazar una serie de líneas perfectamente diferenciadas en lo conceptual pero que unidas hacen un todo indivisible.

Así planteado, el primer aspecto que debe enfocarse es la formación e inserción en un ambiente tan humano como cualquiera pero a la vez tan particular: la investigación científica. En este marco, el contacto, el diálogo fluido y la discusión seria con hombres de gran experiencia no sólo en la labor científica sino también con una ética ejemplar, me han permitido abrazar esta profesión aceptando sus defectos pero entendiendo que el aspecto moral está por encima en cualquier actividad que uno emprenda y que el respeto a los demás (y a sus opiniones) son la única herramienta que nos permite crecer y que hace que la ciencia sea un servicio al hombre.

Como fue dicho en más de una oportunidad, en el transcurso de este trabajo, un estudio estructural y funcional requiere de un gran número de técnicas y métodos que en conjunto permiten acercarse cada vez más a las respuestas que los sistemas biofísicos nos plantean. Obviamente ni este trabajo (ni ningún otro) pudo pretender abarcar todos los aspectos posibles; por el contrario, resulta evidente la necesidad de la inter-

acción interdisciplinaria que permita el aporte experimentado del especialista. De todas maneras es indispensable para quien siga una carrera científica tomar los conocimientos fundamentales de las ciencias básicas que permitan un mejor entendimiento de la tarea específica emprendida.

Sin duda alguna son estas las primeras conclusiones de la tesis, y constituyen el pilar fundamental en que se asienta el trabajo específico emprendido y considero que entenderlo a tiempo permitió arribar a los resultados obtenidos.

El estudio cristalográfico realizado en el complejo Papaína-Leupeptina, es uno de los primeros realizados mayoritariamente en el país y sin contar con las herramientas de cálculo de última generación que pueden encontrarse en otros laboratorios.

El análisis permite concluir que la estructura del complejo se mantiene prácticamente inalterada en relación a la resuelta con parámetros cristalinos diferentes, las distancias características determinadas entre átomos de la cadena y del inhibidor así lo demuestran.

La interacción del nitrógeno de la ARG del inhibidor con el oxígeno del ASP 158, marca la primera evidencia encontrada para resaltar la importancia de este aminoácido en el proceso.

Es así que, a partir de las coordenadas cristalográficas se calculó el potencial electrostático tanto para la papaína sola como para el complejo con la leupeptina.

Los resultados muestran la importancia de considerar el perfil de potencial localizado en las interacciones entre macromoléculas, contrariamente a la suposición inicial tomada a partir de los datos de carga neta de la enzima y el inhibidor, esto permitió identificar aquellos aminoácidos que intervienen en el proceso de enfoque electrostático

del inhibidor, donde aparece nuevamente el ASP 158 como principal involucrado.

Si bien el efecto no puede generalizarse, los resultados muestran sin duda alguna que el mismo puede ocurrir en muchos procesos de unión, donde no solo el potencial generado por las cargas es importante sino también la movilidad de las mismas, que influyen en el apantallamiento de la interacción.

El trabajo realizado sobre la interacción entre la PLA₂ y una membrana permitió confirmar resultados obtenidos por otros métodos y destacar en el proceso la importancia del potencial electrostático.

En este aspecto se refuerza la influencia del CA²⁺ en el proceso de unión interfacial, y del enfoque electrostático del sustrato hacia el sitio activo. Los resultados mostrados explican aspectos postulados y no demostrados como por ejemplo la secuencia del mecanismo de unión donde se evidencia la necesidad de que en primera instancia se unan los cationes a la enzima y posteriormente se produzca la actividad lipolítica.

En general, el estudio estructural y funcional en un proceso biofísico requiere de la implementación de diferentes técnicas que permitan observar distintos aspectos, reforzar resultados teóricos (u obtenidos por diferentes metodologías) y obtener conclusiones que permitan dilucidar la relación estructura-función en situaciones particulares y elaborar nuevas hipótesis de trabajo en los mismos sistemas o en otros de interés.

En este último punto sería innumerable la gama de posibilidades futuras que se abren a partir de los resultados mostrados, y como ejemplo cabe citar la posibilidad de implementar en un modelo como el de Papaína -Leupeptina el modelo de multicopia⁴⁵ en la distribución de moléculas de agua en cristales moleculares, no sólo para confirmar la posición de las moléculas de solvente sino para posicionar el inhibidor y las cadenas

laterales de los aminoácidos ubicados en el sitio activo.

Así llegamos al punto final de esta tesis que, como fue dicho al comienzo de este capítulo es de alguna manera el punto de inicio tanto para desarrollos futuros en el estudio de fenómenos involucrados en procesos biomoleculares, como así también en mi propia formación profesional.

REFERENCIAS

1. T. Aoyagi and H. Umezawa. *Proteases and Biological Control*, page 429, 1975.
2. E. Baker. *J. Mol. Biol.*, 141:441, 1980.
3. J. Balls. *Science*, 86(379), 1937.
4. F. Berstein, T. Koetzle, G. Williams, E. Meyer, M. Brice, J. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, and M. Tasumi. *J. Mol. Biol.*, 112:535, 1977.
5. T. Blundell and L. Johnson. *Protein Crystallography*. Academic Press, 1976.
6. W. Bragg. *Proc. Camb.Phil.Soc.*, 17:43, 1913.
7. C. Brooks. *J. Comp. Chem.*, 4(7):187, 1983.
8. A. Brunger. *X-Plor*. 1992.
9. B. Brunschwig, S. Ehrenson, and N. Sutin. *J. Phys. Chem.*, 91:4714, 1987.
10. R. Cantor and P. Schimmel. *Biophysical Chemistry*. W.H.Freeman and Company, 1980.
11. S. Chiu, M. Clark, h. Subrammiam Scott, and E. Jakobson. *Biophys. J.*, 69:1230, 1995.
12. S. Colowick and N. Kaplan. *Methods in Enzymology*, volume 114.
13. M. Costabel, D. Vallejo, and R. Grigera. *Int. J. of Biolog. Macrom.*, 23:185, 1998.
14. S. Dao-Pin, D. Liao, and S. Remington. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:5361, 1989.

15. J. de Xammar ORo, G. Ruderman, F. Vericat, and J. Grigera. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 88:699, 1992.
16. P. Debye. *Annl. Phys.*, 43:49, 1914.
17. V. Debye and E. Hückel. *Phys. Z.*, 24:185, 1923.
18. B. Dijkstra, K. Kalle, M. Hol, and J. Drenth. *J. Mol. Biol.*, 147:97, 1981.
19. B. Dijkstra, R. Renetseder, K. Kalk, M. Hol, and J. Drenth. *J. Mol. Biol.*, 168:163, 1983.
20. G. Donné-Op den Kelder, G. de Haas, and M. Egmond. *Biochemistry*, 22:2470, 1983.
21. J. Drenth, J. Jansonius, R. Koekoek, and B. Wolthers. *Adv. Protein Chem.*, 25:79, 1971.
22. A. Ducruix and R. Giegé. *Crystallization of nucleic acids and proteins*. Oxford University Press, 1992.
23. D. Ermak and J. McCammon. *J. Chem. Phys.*, 69:1352, 1978.
24. E. Fleer, H. Verheij, and G. de Haas. *Eur. J. Biochem.*, 113:283, 1981.
25. A. Green. *J. Biol. Chem.*, 95:47, 1932.
26. U. Heinemann, G. Pal, R. Hingelfeld, and W. Saeger. *J. Mol. Biol.*, 161:591, 19852.
27. T. Imoto. *Biophys. J.*, 44:293, 1983.

28. M. Jain and W. Vaz. *Biochim. Biophys. Acta*, 905:1, 1987.
29. J.Drenth, K.Kalk, and H.Swen. *Biochemistry*, 15:3731, 1976.
30. A. Juffer, E. Botta, B. van Keulen, A. van der Ploeg, and H. Berendsen. *J. Comp. Phys.*, 97:144, 1991.
31. I. Kamphuis, J. Drenth, and E. Baker. *J. Mol. Biol*, 182:317, 1985.
32. M. Kim, D. Yamamoto, K. Matsumoto, T. Ishida, M. Inoue, H. Mizuno, S. Sumiya, and K. Kitamura. *Biochem. J.*, 287:797, 1992.
33. J. Kirkwood. *J. Chem. Phys.*, 6:506, 1938.
34. J. Kirkwood. *Proteins, Amino Acids and Peptides*, page 276. Van Nostrand-Reinhold, 1943.
35. K.I.Varughese, F.R.Ahmed, P.R.Carey, S.Hasnain, C.P.Huber, and A.C.Storer. *Biochemistry*, 28:1330, 1989.
36. A. Legendre. *Nouvelles methods pour le determination des orbites des cometes*, 1806.
37. D. Levitt. *Biophys. J.*, 22:209, 1978.
38. J. Madura and J. McCammon. *J. Phys. Chem.*, 93:7285, 1989.
39. M. McGrath, A. Eakin, C. Engel, J. McKerrow, C. Craik, and R. Fletterick. *J. Mol. Biol*, 247:251, 1995.

40. A. McPherson. *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. J Wiley and Sons, 1982.
41. D. Neblock and R. Berg. *Arch. Biochem. Biophys.*, 233:338, 1984.
42. S. Northrup, J. Luton, and J. Reynolds. *J. Computer-Aided Mol. Des.*, 1:291, 1987.
43. L. Ostrowski, A. Ahsn, B. Suthar, P. Pagast, D. Bain, C. Wong, A. Patel, and R. Schultz. *Cancer Res.*, 46:4121, 1986.
44. W. Pieterse, J. Volwerk, and G. de Haas. *Biochemistry*, 13:1439, 1974.
45. A. Podjarny, E. Howard, A. Urzhumtsev, and J. Grigera. *Proteins*, 28(303), 1997.
46. F. Quijcho, C. McMurray, and W. Lipscomb. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69:2850, 1972.
47. D. Rees. *J. Mol. Biol.*, 141:323, 1980.
48. D. Rich. *Proteinase Inhibitors*, page 153, 1986.
49. E. Schoder, C. Phillips, E. Garman, K. Harlos, and C. Crawford. *FEBS*, 315:38, 1993.
50. D. Scot. *Science*, 250:1541, 1990.
51. K. Sharp, R. Fine, K. Schulten, and B. Honig. *J. Phys. Chem.*, 91:3624, 1987.
52. J. Sher, A. Stracher, S. Shafiq, and J. Hardy-Stachin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:7742, 1981.
53. C. Tanford. *Physical Chemistry of Macromolecules*, page 241. Wiley, 1961.

54. C. Tanford and J. Kirkwood. *J. Am. Chem. Soc.*, 79:5333, 1957.
55. R. Thompson. *Methods in Enzimology*, 46:220, 1977.
56. H. Umezawa. *Annu. Rev. Microbiol.*, 36:75, 1982.
57. D. Vallejo and J. Grigera. *J. Chem. Phys.*, 101:9049, 1994.
58. W. van Gunsteren and H. Berendsen. *Groninger Molecular Simulation. BIOMOS*, 1987.
59. C. Venanzi and K. Manboodiri. *Anal. Chim. Acta*, 210:151, 1988.
60. H. Verheij, A. Slotboom, and G. de Haas. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 91:91, 1981.
61. M. e. Waite. *The Phospholipases. Handbook of Lipid Research*, volume 5. Plenum Press, New York, 1987.
62. J. Warwicker and H. Watson. *J. Mol. Biol.*, 157:671, 1982.
63. W. Cochran. *Acta Cryst*, 4:408, 1951.
64. D. Yamamoto, K. Matsumoto, H. Ohishi, T. Ishida, M. Inoue, K. Kitamura, and H. Mizuno. *J. Biol. Chem.*, 266:14771, 1991.
65. B. Yu, O. Berg, and M. Jain. *Biochemistry*, 32:6485, 1993.
66. R. Zauhar and R. Morgan. *J. Mol. Biol.*, 186:815, 1985.
67. R. Zauhar and R. Morgan. *J. Comput. Chem.*, 9:171, 1988.

68. F. Zhou and K. Schulten. *Proteins*, 25:12, 1996.