

SEBBM DIVULGACIÓN

ACÉRCATE A NUESTROS CIENTÍFICOS



Calorimetría isotérmica de titulación: desentrañando interacciones biológicas

DOI: http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2020.07.1

Adrián Velázquez Campoy

Investigador ARAID, Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza

Biografía Resumen

Adrián Velázquez Campoy realizó su tesis doctoral en el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada, estudiando la adsorción de proteínas sobre nanopartículas. Durante su estancia postdoctoral en el laboratorio de Ernesto Freire (Departamento de Biología, The Johns Hopkins University, 1998-2003) trabajó en el estudio de la interacción de inhibidores clínicos y experimentales con la proteasa del VIH-1, participando en el desarrollo de un nuevo paradigma de diseño de fármacos para proteínas diana variables, y en la identificación de inhibidores de la proteasa 3CLpro del virus SARS. En 2003 se reincorporó como investigador Ramón y Cajal en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) de la Universidad de Zaragoza. Actualmente trabaja como investigador ARAID en el estudio biofísico de proteínas diana para su aplicación en descubrimiento de fármacos. En 2018 fue nombrado Académico Correspondiente de la Real Academia de Medicina de España.

La calorimetría isotérmica de titulación es una técnica biofísica versátil que se ha convertido en el gold-standard para medir afinidad de interacción. Se emplea en estudios básicos sobre interacciones biológicas y mecanismos fisiológicos, o en estudios aplicados en programas de descubrimiento de fármacos para validación y optimización de compuestos candidato.

Summary

Isothermal titration calorimetry is a versatile biophysical technique that has become the gold-standard for affinity determination. It is employed in basic studies on biological interactions and physiological mechanisms, as well as applied developments for lead compounds validation and optimization in drug discovery.

<http://www.sebbm.es/>

HEMEROTECA: http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/acercate-a-nuestros-cientificos_107

En los seres vivos tienen lugar continuamente procesos de interacción dependientes de proteínas: enzima-sustrato, enzima-inhibidor, receptor-ligando, proteína-proteína, proteína-DNA, etc. Los mecanismos fisiológicos se pueden descomponer en series de procesos elementales de interacción (asociación/disociación) y de cambios conformacionales acoplados, de modo que un mecanismo complejo se puede estudiar mediante la caracterización de esos procesos elementales.

En procesos de interacción reversibles que conducen a la formación de complejos mediante interacciones no covalentes ($A+B \rightarrow AB$), cuanto más negativo es el incremento de energía de Gibbs en el proceso de asociación, mayor es la fortaleza de la interacción y la tendencia a formar el complejo (mayor constante de asociación –afinidad– y menor constante de disociación), mientras que cuanto menos negativo es dicho incremento, menor es la fortaleza de la interacción y la tendencia a formar el complejo (menor constante de asociación y mayor constante de disociación).

La calorimetría isotérmica de titulación (o valoración) permite determinar la variación de energía de Gibbs estándar asociada a un proceso de interacción, además de la variación de entalpía y la estequiometría de la interacción (1). Por tanto, también permite determinar la constante de equilibrio de interacción y la variación de entropía. Y todo ello en un único ensayo experimental basado en la medida de calor. Este conjunto de parámetros de interacción constituye el perfil termodinámico de la interacción y constituye la base para describir el modo de interacción.

Hoy día el término titulación designa al propio proceso de añadir gradual y progresivamente una disolución de un reactivo sobre otro. En un calorímetro isotérmico de titulación se estudian procesos de interacción mediante la adición controlada de un reactivo A en disolución desde una jeringa de inyección (reactivo titulante) sobre otro reactivo B localizado en una célula termostatazada (reactivo titulado) (ver Figura). La adición de titulante A perturba el estado de equilibrio químico en la célula (exceso de especies químicas libres, reactivos), de modo que el sistema evoluciona (principio de Le Châtelier) minimizando dicha adición y se forma el complejo AB (producto). La concentración de complejo AB formado depende de la concentración total de reactivos A y B, y de la constante de equilibrio de interacción. Además, la formación de complejo AB está acompañada por calor puesto en juego en dicho proceso, que depende de cuánto

complejo AB se forma y de la entalpía molar de interacción (formación del complejo). En este tipo de titulación el elemento indicador es el propio calor de reacción. El proceso continúa hasta que se consigue saturar o neutralizar (casi) todo el reactivo B posible y se acumula el complejo AB. Del ensayo se obtiene una isoterma de interacción en la que se representa el calor asociado con cada adición de reactivo A frente al avance del proceso de formación de complejo AB. Mediante un análisis preciso de los datos experimentales, considerando el equilibrio químico y la conservación de masa para cada reactivo, se puede estimar la constante de equilibrio del proceso de interacción, la energía de Gibbs, la entalpía y la entropía de interacción, así como la estequiometría del complejo.

La calorimetría isotérmica de titulación permite estudiar interacciones básicas $A+B \rightarrow AB$, para describir el modo de interacción de una proteína con otra biomolécula, entender la especificidad de las interacciones en proteínas, confirmar la interacción de un compuesto candidato a fármaco con su proteína diana, o discriminar la susceptibilidad de ligandos frente a mutaciones o variabilidad en la proteína diana (2,3). Además, realizando titulaciones calorimétricas en diferentes condiciones (ej. temperatura, pH, fuerza iónica, tampón) se consigue obtener información sobre las interacciones interatómicas (interacciones de hidrógeno, electrostáticas, van der Waals e hidrofóbicas) responsables de dicha interacción, y empleando variantes funcionales (mutantes) de la proteína y el ligando es posible identificar grupos funcionales clave para dicha interacción.

También permite abordar interacciones más complejas caracterizadas por fenómenos cooperativos y/o alostéricos reguladores: interacción de una molécula que altera la interacción de otra de diferente o igual naturaleza con la misma

macromolécula (interacciones heterotrópicas y homotrópicas) (4,5,6), acoplamiento de interacciones con cambios conformacionales y plegamiento en proteínas (7), e interacción de moléculas pequeñas y proteínas con membranas lipídicas, entre otros casos relevantes.

Referencias:

1. Velazquez-Campoy, A., Leavitt, S.A. and Freire, E. (2015) Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol.* **1278**, 183-204.
2. Claveria-Gimeno, R., Lanuza, P.M., Morales-Chueca, I., Jorge-Torres, O.C., Vega, S., Abian, O., Esteller, M. and Velazquez-Campoy, A. (2017) The intervening domain from MeCP2 enhances the DNA affinity of the methyl binding domain and provides an independent DNA interaction site. *Sci Rep.* **7**, 41635.
3. Vega, S., Kang, L.W., Velazquez-Campoy, A., Kiso, Y., Amzel, L.M. and Freire, E. (2004) A structural and thermodynamic escape mechanism from a drug resistant mutation of the HIV-1 protease. *Proteins.* **55**, 594-602.
4. Velazquez-Campoy, A., Goñi, G., Peregrina, J.R. and Medina M. (2006) Exact analysis of heterotropic interactions in proteins: Characterization of cooperative ligand binding by isothermal titration calorimetry. *Biophys J.* **91**, 1887-1904.
5. Taneva, S.G., Bañuelos, S., Falces, J., Arregi, I., Muga, A., Konarev, P.V., Svergun, D.I., Velazquez-Campoy, A. and Urbanaja, M.A. (2009) A mechanism for histone chaperoning activity of nucleoplasmin: Thermodynamic and structural models. *J Mol Biol.* **393**, 448-463.
6. Felix, J., Weinhäupl, K., Chipot, C., Dehez, F., Hessel, A., Gauto, D.F., Morlot, C., Abian, O., Gutsche, I., Velazquez-Campoy, A., Schanda, P. and Fraga, H. (2019) Mechanism of the allosteric activation of the ClpP protease machinery by substrates and active-site inhibitors. *Sci Adv.* **5**, eaaw3818.
7. Abian, O., Neira, J.L. and Velazquez-Campoy, A. (2009) Thermodynamics of zinc binding to hepatitis C virus NS3 protease: a folding by binding event. *Proteins.* **77**, 624-636.

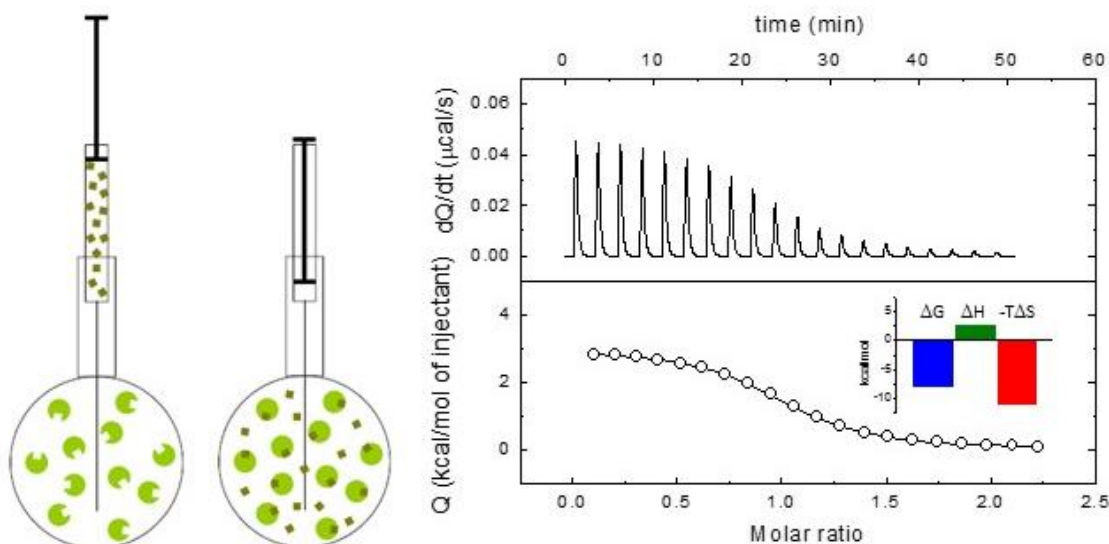


Figura. Titulación calorimétrica: esquema básico experimental, termograma e isoterma de interacción.