

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Química



ESTUDIOS MACROMOLECULARES Y ESTABILIDAD TÉRMICA DE PROTEÍNAS

Guillermo Jiménez Hernández
Curso académico 2019-2020
Fecha: 23 junio 2020

Tutores
Dr. Luis García Fuentes
Dra. Ana María Aguilera del Real
Departamento de Química y Física

**ESTUDIOS MACROMOLECULARES Y ESTABILIDAD
TÉRMICA DE PROTEÍNAS**

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por
Guillermo Jiménez Hernández

Almería, 23 de junio de 2020

Fdo: Guillermo Jiménez Hernández

Fdo: Luis García Fuentes

Fdo: Ana María Aguilera del Real

Agradecimientos

Quisiera comenzar agradeciendo a la Universidad de Almería por la excelente formación que me ha proporcionado durante estos 4 años del Grado, este hecho, es digno de mencionar a todos y cada uno de los profesores con los que me he encontrado desde el primer curso hasta la actualidad, ya fuesen profesores de grupo docente o reducido, considero que siempre se aprende algo nuevo de cada uno, por eso, soy consciente de que he evolucionado estos años, esto no hubiese sido posible sin todos ellos. También, quisiera agradecer a la Facultad de Ciencias Experimentales por la formación en el laboratorio que he adquirido a lo largo de los años, tanto a profesores como a técnicos de laboratorio, todos sus consejos siempre han llegado desde el respeto y con el único fin de ayudarme en mi formación experimental para desenvolverme mejor en el interior del laboratorio.

Me gustaría también hacer hincapié en mis compañeros, durante toda mi estancia en el Grado se ha fomentado un gran clima de trabajo entre todos, lo cual, es de agradecer porque de esta manera se ha conseguido que el mensaje de las lecciones haya llegado de forma correcta al alumnado, lo que se reproduce en una mejor formación académica.

Debo de hacer una mención especial a mi grupo de amigos que he encontrado dentro de la carrera, han sido muchas tardes y alguna que otra noche de biblioteca, siempre ayudándonos los unos a los otros. Lo que comenzó como compañeros de estudio ha acabado a lo largo de los años como grandísimas amistades, donde cualquier tema de conversación es posible, pero siendo la Química siempre nuestro punto de unión.

Como no, agradecer a mi familia el apoyo y la confianza que me han mostrado siempre, aunque en ocasiones no comprendan bien lo que estudio o a lo que me dedicaré en un futuro próximo, son conscientes de mi evolución a lo largo de los años y sé que siempre estarán a mi lado, sea cuales sean mis decisiones en los próximos años.

Por último, agradecer tanto a Ana María Aguilera del Real su cercanía, trato, conocimiento, consejos y apoyo, como a Luis García Fuentes su gran capacidad docente, supo saber captar mi atención desde el principio como persona y como profesor, además, es conocedor de la gran admiración y respeto que siento por él, cosa que se ha disparado realizando este TFG, ya que, ha estado para mí en cualquier momento. Agradecerle también el uso y disponibilidad de su laboratorio siempre que fue necesario.

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1. ESTRUCTURA DE LA LISOZIMA DE CLARA DE HUEVO	5
3.2. DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	5
3.2.1 TERMODINÁMICA DEL PROCESO DE DESNATURALIZACIÓN	6
4. OBJETIVOS	8
5. MÉTODOS EXPERIMENTALES	10
5.1. REACTIVOS Y MATERIALES	10
5.2. ESPECTROSCOPIA UV-VIS	10
5.3. ENSAYO DE BRADFORD	13
5.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD	14
5.5. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	14
5.5.1. MODELO DE DOS ESTADOS	16
5.5.2. ANÁLISIS DE DATOS DE FLUORESCENCIA	17
5.6. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE UNA PROTEÍNA MEDIANTE ENSAYO DE BRADFORD	24
6.2. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR EN ESTADO NATIVO DE LISOZIMA	25
6.2.1. Estimación teórica del coeficiente de extinción molar de lisozima	26
6.2.2. Obtención del coeficiente de extinción molar experimental de lisozima	26
6.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LISOZIMA MEDIANTE MEDIDAS UV-VIS	28
6.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LISOZIMA	30
6.4.1. Preparación de reactivos para el ensayo de actividad de lisozima	30
6.4.2. Estudio del ensayo de actividad de lisozima	31
6.5. ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO TÉRMICO DE LISOZIMA MEDIANTE MEDIDAS DE FLUORESCENCIA	33
6.5.1. Diálisis de lisozima mediante cromatografía de exclusión molecular	33
6.5.2. Ajuste previo del equipo de fluorescencia	33
6.5.3. Realización de los espectros de emisión de fluorescencia	34

6.6. ANÁLISIS DEL DESPLEGAMIENTO TÉRMICO DE LISOZIMA MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).....	37
6.6.1. Preparación del calorímetro y llenado de las células	37
6.6.2. Desarrollo del experimento de DSC con lisozima.....	37
6.6.3. Corrección instrumental de la línea de base de la traza calorimétrica	39
6.6.4. Corrección de la línea de base química (“spline”).....	40
6.6.5. Poblaciones X_N (proteína en estado nativo) y X_D (proteína desnaturalizada)	41
7. CONCLUSIONES	44
8. BIBLIOGRAFÍA	45

1. RESUMEN

Los estudios biofísicos con proteínas requieren de ciertos ensayos preliminares, usando técnicas y procedimientos habituales en estudios de caracterización de proteínas, cuyo fin es estudiar su estado y comportamiento. Nuestros estudios están centrados en la proteína lisozima en tampón acetato sódico, pH 5. Se determinó la concentración, actividad y el coeficiente de extinción molar de lisozima en estas condiciones mediante técnicas espectrofotométricas. La actividad y características de esta proteína la hacen idónea para analizar su estabilidad térmica mediante fluorescencia y calorimetría diferencial de barrido. Estos estudios han permitido evaluar el carácter reversible del desplegamiento térmico de lisozima y obtener los valores de los parámetros termodinámicos de este proceso. Se demostró igualmente la presencia de sólo dos estados mayoritarios (nativo y desnaturalizado) en equilibrio, así como la temperatura en la que las poblaciones de ambos estados son iguales, o temperatura de la transición.

2. ABSTRACT

Biophysics studies on proteins require some specific preliminary assays using standard techniques and procedures in characterization studies. The purpose was to study its state and behaviour. Our subject is focused on the lysozyme protein in sodium acetate buffer, pH 5. Protein concentration, enzymatic activity and molar extinction coefficient were determined by spectrophotometric techniques under these experimental conditions. The activity and characteristics of this protein are adequate to analyze its thermal stability by fluorescence spectroscopy and differential scanning calorimetry (DSC). These studies have made it possible to evaluate the reversible character of the lysozyme thermal unfolding as well as obtain the thermodynamic parameters values from this process. The presence of only two major states (native and denatured) in equilibrium as well as the temperature on which populations from both states are equal, also named as transition temperature, was examined.

3. INTRODUCCIÓN

La lisozima, también conocida como muramidasa (N-acetil muramidaglicano hidrolasa, E.C. 3.2.1.17), fue descubierta por Alexander Fleming en 1922. Fue la primera enzima de la que se determinó su mecanismo enzimático, gracias a David Phillis (Jollès y Jollès, 1984). Desde su descubrimiento, esta proteína ha sido fundamental en modelos enzimáticos y en muchos otros aspectos de la biología moderna, incluyendo la química de proteínas, resonancia magnética nuclear (RMN), cristalografía, inmunología y plegamiento de proteínas (Chantal et al., 2007).

Esta proteína se encuentra en muchos organismos como virus, insectos, reptiles, mamíferos, aves y anfibios, produciéndose en multitud de tejidos y fluidos, incluyendo huevos de aves, y en el caso de los humanos, en la leche, saliva, lágrimas y es segregada por los leucocitos polimorfonucleares (Niyonsaba y Ogawa, 2005). En el caso de las lágrimas, la lisozima se encuentra en cantidades comprendidas entre 3000 y 5000 $\mu\text{g/mL}$ y protege frente a bacterias y virus (Lesnierowski et al., 2007). Por otro lado, cuando los humanos segregan saliva, la lisozima generada hace frente a una gran variedad de microorganismos como virus, bacterias y hongos de diferente especie (Tenovuo, 2002; Samaranayake et al., 2008).

Además de la actividad antibacteriana, se han descrito muchas otras actividades biológicas de esta proteína como son la actividad antiviral y antiinflamatoria, que se ponen de manifiesto cuando la lisozima es administrada por vía oral y cutánea (Sava, 1996). En ensayos *in vitro*, se ha descrito que posee actividad frente al virus del VIH de tipo 1 (Lee-Huang et al., 1999).

En nuestro caso, el origen de la lisozima objeto de estudio, es de la clara de huevo, la cual, ha demostrado su actividad antioxidante (Liu et al., 2006), actividad antiheparínica (Mega et al., 1994), actividad antifúngica y capacidad fusogénica con fosfolípidos y potenciación del efecto de antibióticos (Ibrahim et al., 2001).

Muchos países como Alemania, Bélgica, España, Francia, Italia, Reino Unido y Japón entre otros, y organismos internacionales como la FAO/WHO tienen reconocida a la lisozima de clara de huevo como una proteína no tóxica, debido a que la consideran favorable para nuestra salud, por ello, es utilizada con fines alimentarios, farmacológicos y terapéuticos y se estima que más de 100 toneladas de lisozima son usados con estos propósitos anualmente. El aditivo alimentario con el código (E-1105) corresponde a la lisozima de huevo, y se usa, para conservar alimentos como pepinillos, sushi o fideos chinos entre otros. Entre sus usos, encontramos también la protección en los quesos frente a bacterias dañinas como el *Clostridium tyrobutyricum* que provoca la hinchazón de los quesos (Mine et al., 2004).

Desde su descubrimiento, muchos han sido los trabajos que se han llevado a cabo para describir las distintas actividades biológicas de esta proteína, entre ellas su actividad antiviral, antiinflamatoria, antibacteriana, antitumoral, analgésica y antioxidante. Su actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas es la más ampliamente estudiada. Se han llevado a cabo modificaciones térmicas, químicas, enzimáticas, mutaciones genéticas y efectos sinérgicos con otros compuestos, con el objetivo cumplido de conseguir ampliar el espectro antibacteriano, proponiendo en todos los casos que dicha actividad es independiente de su actividad enzimática.

3.1. ESTRUCTURA DE LA LISOZIMA DE CLARA DE HUEVO

Existen 6 tipos diferentes de lisozima dependiendo de su origen. La lisozima de gallina (tipo-C), lisozima de ganso (tipo-G), lisozima de plantas, lisozima bacteriana, lisozima del fago T4 y lisozima de invertebrados (tipo-I). De todas las lisozimas existentes, la lisozima de huevo de gallina es la más estudiada, debido a que se encuentra a alta concentración (1-3 g/L de clara de huevo) y a su fácil manejo. La lisozima de huevo es una proteína que puede representar cerca del 3,4 % de las proteínas totales existentes en la clara de huevo. Su masa molecular es 14307 Da y está compuesta por una secuencia de 129 residuos de aminoácidos. Posee 4 puentes disulfuro (-S-S-) que le confieren una alta estabilidad, en ellos se encuentran las 8 cisteínas presentes en la molécula (You et al., 2010). La mayoría de las cadenas laterales no polares están en el interior de la molécula, fuera del contacto con el solvente acuoso. Además, es una proteína estable en soluciones ácidas (Lesnierowski et al., 2007).

En la región α de su estructura (Figura 1), se encuentran dos de sus puentes disulfuro (Cys 6-Cys 127 y Cys 30-Cys 115), en el dominio β se ubica otro (Cys 64-Cys 80), por último, el puente disulfuro restante (Cys 76-Cys 94) se halla entre ambas regiones, α y β .

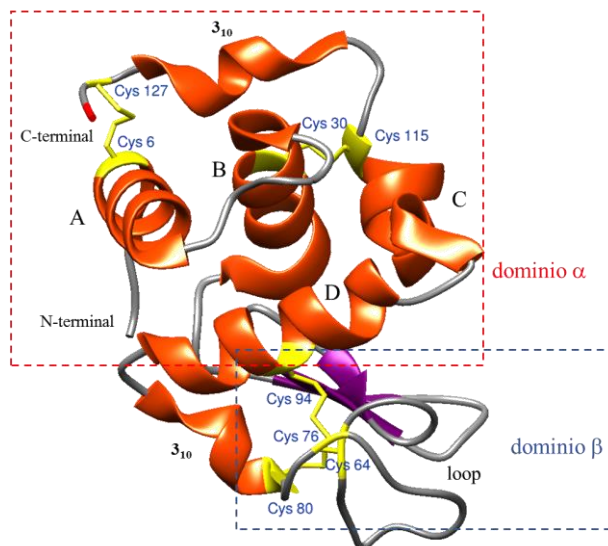


Figura 1. Representación estructural de lisozima nativa (1DPX) con el dominio α conteniendo las α -hélices A-D y la hélice 3_{10} en el extremo C-terminal y con un dominio β compuesto 3 láminas β entrecruzadas y una larga región desordenada, “loop”.

La lisozima proveniente de la clara de huevo es una de las proteínas más utilizada en la industria debido a su eficacia demostrada frente a las bacterias. También es utilizada en la industria farmacéutica, veterinaria, médica y cosmética, además de su utilidad como modelo para multitud de estudios biofísicos.

3.2. DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Cuando una proteína no ha sufrido ningún cambio químico o físico, se dice que presenta una estructura nativa o plegada (forma activa). La forma nativa, presenta una estructura más o menos compacta y guarda poca relación, a simple vista, con su estructura primaria. Se llama desnaturalización de una proteína a la pérdida de la

estructura compacta (terciaria y cuaternaria), quedando la cadena polipeptídica reducida a un polímero estadístico.

Cualquier factor que modifique las interacciones de la proteína con el disolvente u otro cambio físico podrá disminuir su estabilidad, pudiendo inducirse la precipitación. Una proteína desnaturalizada cuenta únicamente con su estructura primaria. En algunos casos, la desnaturalización puede ser reversible. La estructura primaria contiene la información necesaria y suficiente para adoptar niveles superiores de estructuración (los experimentos de Anfinsen con ribonucleasa A lo confirman). El proceso mediante el cual la proteína desnaturalizada recupera su estructura nativa se llama renaturalización o replegamiento. Esta propiedad es de gran utilidad en procesos de purificación de proteínas, ya que no todas las proteínas reaccionan de igual forma ante un cambio en el medio donde se encuentra disuelta. En determinados casos, la desnaturalización conduce a la pérdida total de la solubilidad, con lo que la proteína forma agregados y precipita, impidiendo su renaturalización, siendo en este caso el proceso irreversible (Gómez-Moreno y Sancho, 2003).



Figura 2. Ruptura del enlace β (1-4) por lisozima.

Los agentes que provocan la desnaturalización de una proteína se llaman agentes desnaturalizantes y pueden ser físicos (temperatura, agitación) y químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica). A veces, la desnaturalización es reversible, y en esos casos es posible precipitar proteínas de manera selectiva mediante cambios en la polaridad del disolvente, fuerza iónica, pH o temperatura.

La lisozima de huevo, usada en nuestros experimentos, posee este carácter reversible en condiciones no extremas. No obstante, a temperaturas superiores a 95 °C, parte de la proteína precipita impidiendo la total reversibilidad del proceso de renaturalización.

3.2.1 TERMODINÁMICA DEL PROCESO DE DESNATURALIZACIÓN

Se ha demostrado que el equilibrio que surge a causa del plegamiento de muchas proteínas es extremadamente simple, debido a que en dicho equilibrio solo se encuentran las proteínas en dos estados, el estado nativo (correctamente plegado) y el estado desplegado (constituido por diversas formas desordenadas de la proteína) (Gómez-Moreno y Sancho, 2003).



La constante de equilibrio aparente viene definida por el cociente entre la concentración de moléculas de estado desnaturalizado y la concentración de moléculas en estado nativo.

$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (2)$$

Del valor de la constante de equilibrio, es posible conocer el cambio de energía libre de Gibbs entre ambos estados, donde R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K \quad (3)$$

La energía libre se utiliza para describir, desde un punto de vista termodinámico la estabilidad conformacional de la proteína. La estabilidad conformacional de cada proteína está determinada por un balance de diversas interacciones de distinta magnitud que se oponen entre sí dando lugar a valores de estabilidad conformacional pequeños. Factores energéticos (enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals...) se van a oponer factores entrópicos.

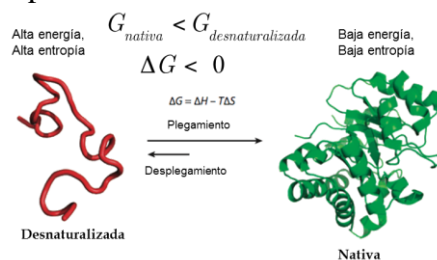


Figura 3. Estabilidad conformacional de una proteína.

Las interacciones que se observan en el estado nativo sólo son posibles a expensas de destruir interacciones de naturaleza y magnitud comparable que se manifiestan en el estado desplegado. Un disolvente como el agua puede influir decisivamente en la estabilidad de la misma. La entropía presente en el estado desplegado de una proteína es alta debido al gran número de conformaciones diferentes que son posibles. Estamos ante la entropía conformacional, dado que dichas conformaciones desplegadas pueden diferir tanto en el esqueleto peptídico como en las cadenas laterales, es evidente que ambas partes de las proteínas contribuyen a la entropía conformacional. Se puede relacionar los factores energéticos y entrópicos mediante la expresión de la energía libre:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (4)$$

Ya habíamos visto anteriormente, la relación entre la energía libre y la constante de equilibrio, pero ahora analizamos la interpretación molecular del balance entalpía/entropía que determina el valor de ΔG . Los factores que influyen en los cambios entálpicos son puramente energéticos, mientras que los cambios entrópicos se deben a la entropía conformacional del estado desplegado antes mencionada (Gómez-Moreno y Sancho, 2003).

Las interacciones que surgen entre el soluto y el disolvente se pueden considerar contribuciones de solvatación, tanto energéticas como entrópicas, lo cual afectará directamente al valor de la energía libre. Como la estructura del disolvente se ve afectada por la temperatura, la entropía y entalpía de solvatación también lo estarán, y se puede saber cuantitativamente la dependencia de la temperatura, calculando el cambio de capacidad calorífica, dicho cambio estará en función de la variación de los términos entrópicos y entálpicos de la siguiente manera:

$$\frac{d\Delta H}{dT} = \Delta C_p \quad (5)$$

$$\frac{d\Delta S}{dT} = \frac{\Delta C_p}{T} \quad (6)$$

Una vez sabido todo esto, podemos abordar ya la descripción energética del desplegamiento de una proteína en disolución acuosa, en nuestro caso, estudiaremos los cambios de desplegamiento de la lisozima en una disolución de acetato de sodio 50 mM, pH 5.

En términos cinéticos, la velocidad de una reacción es el cambio de la concentración de los reactivos por unidad de tiempo, sabiendo esto, y viendo el equilibrio de la reacción (1), la velocidad de formación de las moléculas de lisozima en estado desnaturalizado dependerá de la concentración inicial de lisozima en estado nativo, $[N]$, siendo k_1 , la constante de velocidad de la reacción.

$$v_1 = k_1 [N] \quad (7)$$

Como la lisozima es una proteína reversible, el proceso inverso será

$$v_{-1} = k_{-1} [D] \quad (8)$$

En el equilibrio, ambas velocidades, (7) y (8), serán iguales.

$$k_1 [N] = k_{-1} [D] \quad (9)$$

De esta ecuación, se deduce la constante de equilibrio, K .

$$K = \frac{k}{k_{-1}} = \frac{[D]}{[N]} \quad (10)$$

Relacionando este hecho con la energía libre de Gibbs de la ecuación (3), consideramos que es realmente importante tener en cuenta la reversibilidad de la proteína, en los sucesivos estudios realizados. La formación de moléculas de lisozima en estado desnaturalizado a partir de las moléculas nativas, por ejemplo, por efecto de la temperatura, describe una “curva” tipo sigmoideal donde paulatinamente la población de moléculas en el estado desnaturalizado ($[D]$) irá aumentando a la vez que irá disminuyendo las moléculas en estado nativo ($[N]$). Ambas poblaciones coincidirán a una temperatura, llamada temperatura de desnaturalización, T_m , que será cuando $K=1$, y en tal caso a dicha temperatura, $\Delta G=0$.

4. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado (TFG) es conocer, aprender y utilizar las técnicas más usadas en la caracterización de proteínas:

1. Determinación de la concentración mediante espectrofotetría UV-vis y ensayos colorimétricos.
2. Determinación del coeficiente de extinción molar tanto de forma teórica como experimental.

3. Seguimiento de un proceso de desplegamiento térmico mediante fluorescencia y de calorimetría diferencial de barrido.
4. Determinación de los parámetros termodinámicos, interpretación de resultados y conclusiones acordes con los resultados obtenidos para la proteína objeto de estudio: Actividad enzimática, identificación de número de estados que presenta, reversibilidad, estabilidad con la temperatura y la determinación e interpretación de los valores entálpicos del proceso de desplegamiento térmico.

5. MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.1. REACTIVOS Y MATERIALES

- Lisozima (Sigma-Aldrich).
- Albúmina de suero bovino, BSA (Sigma-Aldrich).
- Extracto de pared bacteriana de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich).
- Tampón de disolución de la proteína: Acetato sódico 50 mM, pH 5 e Hidrógenofosfato de potasio 0,1 M, pH 6,24.
- Colorante Comassie Blue G-250 (Quick-Start Bradford, Bio-Rad).
- Agitador Vórtex (ThermoFisher Scientific).
- pHmetro (Crison).
- Vasos de precipitado de 100 y 250 mL. Probeta de 100 mL. Tubos de ensayo de 1, 5 y 10 mL, Tubos eppendorf de 1 mL. Micropipetas y puntas (grandes y pequeñas). Cucharilla y espátula.
- Balanza analítica (Thermo).
- Espectrofotómetro UV-vis Evolution 201 (ThermoFisher Scientific).
- Placa agitadora (Selecta).
- Columnas PD-10 Desalting Columns con Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare Bio-Sciences AB).
- Espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI) QuantaMaster (QM4-CW) equipado con sistema Peltier de termostatización de la muestra y controlado con software FelixGX.
- Calorímetro Diferencial de Barrido (VP-DSC) (MicroCal™, LLC, Northampton, MA con software Origin® VP-viewer.

5.2. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

El término espectroscopia engloba un gran número de técnicas que utilizan la radiación electromagnética para obtener información sobre la estructura, dinámica y función de un compuesto. El principio fundamental de la espectroscopia es la interacción de la radiación electromagnética sobre una muestra y la observación a la respuesta obtenida después de que la muestra haya recibido dicho estímulo (Visser y Rolinski, 2010).

La espectrofotometría UV-vis es una técnica que permite determinar la concentración de un compuesto en disolución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez en que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. El espectro ultravioleta-visible (Figura 4) se encuentra situado en el intervalo de longitud de onda de 70 a 700 nm, pero el ojo humano solo puede detectar un estrecho intervalo a partir de 400 nm. Cuando la radiación electromagnética en la zona del ultravioleta-visible se hace pasar a través de una muestra en disolución, algunas moléculas tienen la capacidad de absorber luz.

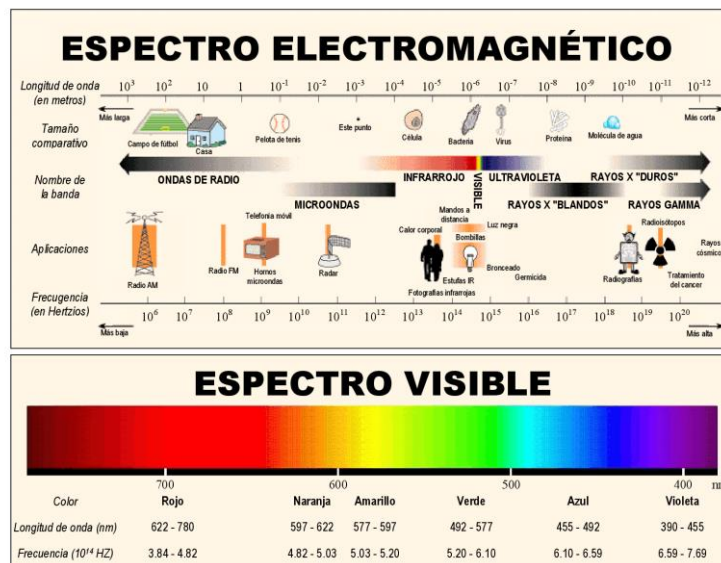


Figura 4. Espectro electromagnético, en el que se destaca la región visible.

La radiación electromagnética es generada en una lámpara que contiene un filamento por el que circula una corriente eléctrica, emitiendo luz a una gran variedad de longitudes de onda (Skoog et al., 2008). Para seleccionar una determinada longitud de onda se hace pasar la luz a través de un monocromador. Esta radiación, incide sobre las moléculas, absorbiendo parte de la energía y el resto es transmitida o dispersada y sus cromóforos pasan de estar en estado fundamental a ser excitados. Cuando vuelven a su estado fundamental, pueden perder la energía absorbida, en forma de energía cinética sin emitir radiación, o bien emitir parte a otra longitud de onda (Sheehan, 2009).



Figura 5. Espectrofotómetro UV-vis utilizado.

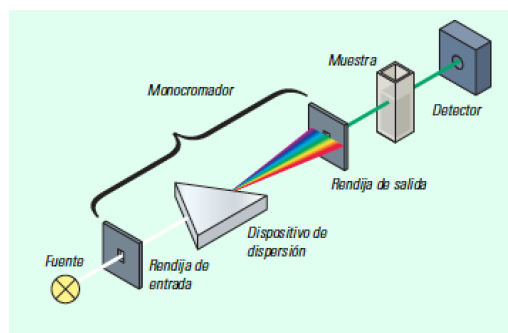


Figura 6. Instrumentación de un espectrofotómetro UV-vis.

La intensidad de la luz absorbida se cuantifica mediante la Ley de Lambert-Beer.

$$\log \frac{I_0}{I} = E \cdot b \cdot c \quad (11)$$

Donde I_0 es el término correspondiente a la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, E es el coeficiente de extinción molar del cromóforo a una longitud de onda determinada, b es el ancho de la cubeta de medida y siendo c la concentración de la disolución. El término $\log (I_0/I)$ corresponde a la absorbancia a una determinada longitud de onda (Abs), quedándose entonces la siguiente expresión:

$$Abs = E \cdot b \cdot c \quad (12)$$

El espectro de absorción de una muestra en disolución es la representación gráfica de los valores de absorbancia de sus cromóforos en función de una determinada longitud de onda. En el caso de las proteínas, hay ciertas longitudes de onda características. A 210 nm todos los aminoácidos presentan un valor de absorbancia elevado, hecho que se usa para la detección sencilla de péptidos. Además, en torno a 280 nm, los aminoácidos aromáticos como la tirosina, triptófano y fenilalanina presentan un máximo de absorción característico, principalmente los dos primeros (Figura 7) (Lakowicz, 2006). Cada proteína, en función del número de estos aminoácidos, presentan un valor diferente y característico de coeficiente de extinción molar.

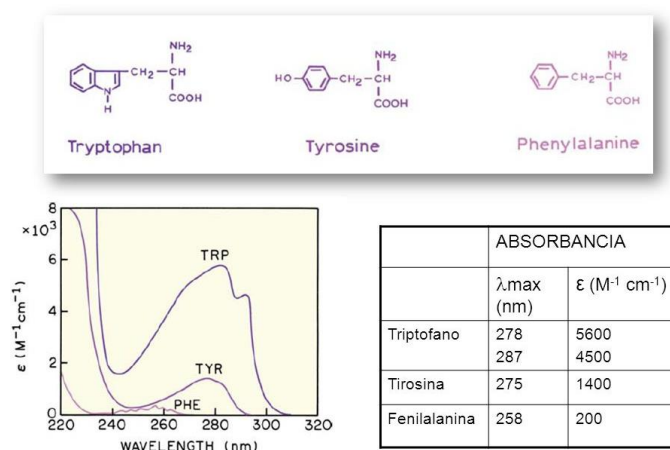


Figura 7. Espectros de absorción, longitudes de onda y coeficientes de extinción de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina presentes en proteínas.

5.3. ENSAYO DE BRADFORD

El ensayo de Bradford es un procedimiento sencillo y rápido para la determinación de la concentración total de proteínas en disolución, principalmente usado en etapas de purificación. Este ensayo se basa en el cambio de absorbancia que se produce al adicionar el colorante Coomassie Blue G-250 a proteínas.

A diferencia de muchos otros ensayos de determinación de concentración de proteínas, este ensayo es menos susceptible a interferencias producidas por la presencia, en muchos casos, de otros componentes (diferentes a la/s proteína/s) que pueden estar presentes en las muestras (detergentes, tampones, sales, ...). Los aminoácidos que son reconocidos por el colorante Coomassie Blue son arginina, fenilalanina, triptófano y prolina (Figura 8) (Bradford, 1976).

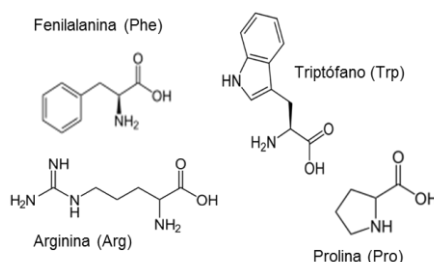


Figura 8. Estructura molecular de los aminoácidos sensibles al colorante Coomassie Blue.

El ensayo se basa en la observación de que la absorbancia máxima para una solución ácida de Coomassie Blue G-250 cambia de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión a la proteína (Figura 9). Las interacciones proteína/colorante estabilizan la forma aniónica del tinte, causando un cambio de color (en la región visible del espectro electromagnético), ya que, en la zona de 465 nm el colorante estaba en forma catiónica de color naranja y cuando se desplaza su máximo de absorbancia hasta 595 nm, el colorante se encuentra en forma aniónica de color azul (Figura 9). Dentro del rango lineal de un ensayo, a mayor cantidad de proteína presente en una muestra, mayor coloración azul se observará (Stoscheck, 1990).

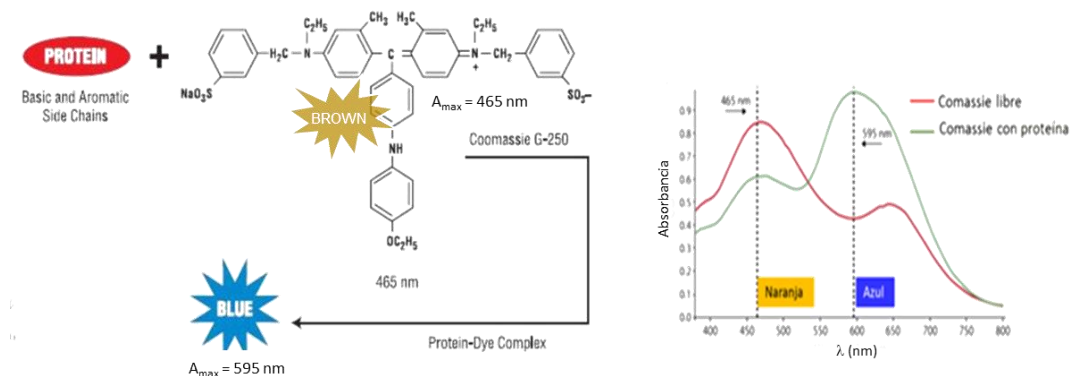


Figura 9. Esquema del ensayo Bradford y espectros de las formas catiónica y aniónica del Coomassie Blue G-250.

La concentración de proteína (o de proteína total) de una muestra desconocida se determina a partir de la deducida para unos de patrones de proteína (que frecuentemente suele ser albúmina o inmunoglobulina G) que exhiben, de manera reproducible, un perfil de absorbancia lineal para este ensayo en el intervalo de

concentraciones de 0 a 1 mg/mL. Dada que la absorción se produce en la región del espectro visible, se suelen usar cubetas de plástico de 1 cm de paso de luz y en las que se puede observar también visualmente los cambios de color de las disoluciones durante el ensayo.

5.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD

La medida de la actividad de la lisozima se realiza utilizando una suspensión de agregados de pared celular del microorganismo *Micrococcus lysodeikticus* en concentración suficientemente elevada para atenuar por dispersión, la transmisión de luz monocromática a través de la cubeta de un espectrofotómetro (Shugar, 1952). Al incubar esta suspensión con lisozima, los fragmentos de pared celular se hidrolizan, originando otros más pequeños, lo que reduce la dispersión de la luz, que se manifiesta en una reducción de la absorbancia a 450 nm. La actividad enzimática es proporcional a la disminución de la absorbancia a 450 nm. Por definición, en condiciones estándar (25°C, pH 6,24 y 0,1 M fosfato), se considera que 1 unidad de actividad enzimática de lisozima (U) produce una disminución en la absorbancia de 0,001 en 1 minuto.

En este ensayo, es fundamental que la concentración de proteína sea precisa, por ese motivo, se debe medir espectrofotométricamente.

5.5. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un proceso de emisión de luz por átomos y moléculas excitadas al absorber luz o radiación electromagnética. Cuando los átomos o moléculas excitadas se relajan al estado fundamental, liberan el exceso de energía, a veces en forma de fotones. Esta emisión de fluorescencia que tiene lugar en millonésimas de segundo, induce modificaciones en las propiedades de los compuestos fluorescentes que pueden ser medidas, tales como la vida media, rendimiento cuántico, entre otras (Skoog et al., 2008).

La espectrometría de fluorescencia o fluorimetría es un tipo de espectroscopía que permite analizar y medir la fluorescencia de una muestra. Los fluorímetros o espectrofluorímetros son instrumentos que permiten medir los parámetros de la fluorescencia de una muestra como su intensidad y la distribución de longitudes de onda del espectro de emisión después de la excitación por una fuente de luz monocromática de alta energía. En los fluorímetros pueden usarse filtros y monocromadores para seleccionar la/s longitud/es de onda de excitación y emisión de interés. El tipo más común de monocromador emplea un retículo de difracción, que permite que la luz colimada (la luz cuyos rayos son paralelos entre sí) que entre a la rejilla pueda salir con diferente ángulo dependiendo de la longitud de onda que haya sido seleccionada. También, es posible la adición de filtros de polarización (polarizadores) para estudios de polarización o anisotropía (Skoog et al., 2008).

La muestra a analizar se sitúa en un compartimento de forma tal que, tanto la luz directa que atraviesa el cristal como la emitida por la muestra, es recogida por el sistema de detección (Figura 10).

Las dos principales ventajas de los métodos de fluorescencia sobre los de absorción son: 1) La sensibilidad es entre 1 y 3 órdenes de magnitud mayor, 2) Mayor intervalo de respuesta lineal.

No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican menos que los de absorción ya que no todos los sistemas químicos son capaces de emitir fluorescencia y además el equipamiento necesario es mucho más costoso que el de la espectroscopia de absorción.

La emisión de fluorescencia es uno de posibles mecanismos mediante los que una molécula regresa a su estado basal después de haber sido excitada por absorción de radiación. Por lo tanto, a priori cualquier molécula capaz de absorber radiación electromagnética podría dar fluorescencia. No obstante, la mayoría de las moléculas no presentan fluorescencia porque disponen de vías no radiativas que las desactivan sin emitir fluorescencia. Por este motivo, en aquellas moléculas que presentan fluorescencia, la longitud de onda de emisión es mayor (menos energética) que la de excitación (más energética).

Un fluorímetro (Figura 10) consta de una fuente de luz y de un sistema de selección de longitud de onda de excitación. Cuando la muestra es excitada con radiación de energía apropiada emite radiación en todas las direcciones del espacio. No obstante, la luz emitida se detecta mejor en ángulo recto con respecto al haz de excitación ya que se evitan problemas de dispersión de la luz y también el haz de luz excitante que es de mucha mayor intensidad que el haz de luz emitida. La luz emitida es recogida seleccionando una longitud de onda apropiada y conducida a un detector donde queda registrada por sistemas similares a los de un espectrofotómetro de absorción.

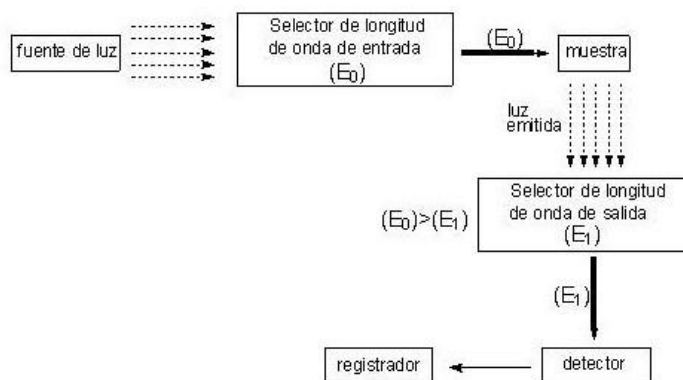


Figura 10. Diseño de un equipo de medida de fluorescencia.

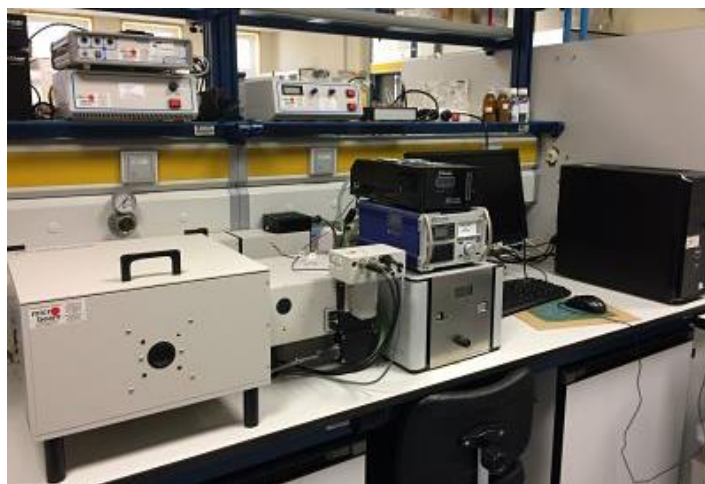


Figura 11. Espectrofluorímetro modular utilizado.

5.5.1. MODELO DE DOS ESTADOS

La estabilidad de algunas proteínas obedece a un modelo en el que sólo dos estados están suficientemente poblados y en equilibrio, el estado nativo (N) y el estado desnaturalizado (D) (Figura 12). La población de posibles intermedios se considera despreciable. En estos casos, se dice que el proceso de desnaturalización de estas proteínas obedece a un modelo reversible de dos estados, siendo éste el modelo más sencillo del que puede obtenerse una caracterización termodinámica completa de la estabilidad de la proteína. Según este modelo, se considera el siguiente equilibrio,

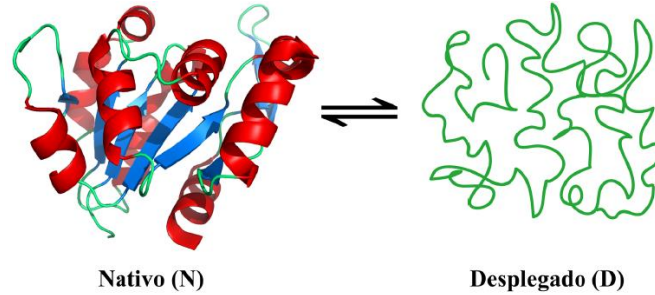


Figura 12. Equilibrio para un modelo de dos estados



donde K_D sería la constante de equilibrio aparente del proceso de desplegamiento, y como tal, vendrá expresada en función de las concentraciones de los estados nativo (N) y desplegado (D), de la forma,

$$K_D = \frac{[N]}{[D]} \quad (14)$$

La concentración de proteína total $[P]_t$, será igual a la suma de las concentraciones de la forma nativa y la de la forma desplegada.

$$[P]_t = [N] + [D] \quad (15)$$

Por tanto, la fracción proteína de proteína en forma nativa, X_N , será:

$$X_N = \frac{[N]}{[N] + [D]} = \frac{1}{1 + K_D} \quad (16)$$

y la fracción de forma desplegada, X_D ,

$$X_D = \frac{[D]}{[N] + [D]} = \frac{K_D}{1 + K_D} \quad (17)$$

siendo $X_N + X_D = 1$, cumpliéndose la ley de conservación de la masa.

De estas ecuaciones se observa que la constante de equilibrio, K_D , puede calcularse a partir de la relación:

$$K_D = \frac{X_D}{X_N} \quad (18)$$

Estas fracciones corresponderán a las poblaciones de cada estado. En consecuencia, cualquier propiedad lineal del sistema (aditiva), $\langle Y \rangle$, será suma de las contribuciones a dicha propiedad de cada estado, y se expresará como:

$$\langle Y \rangle = X_N \cdot Y_N + X_D \cdot Y_D \quad (19)$$

siendo X_N y X_D la contribución a esa propiedad por la especie en estado nativo y por la especie en el estado desplegado, respectivamente. Esta propiedad puede ser fluorescencia, UV-visible, CD, H (entalpía), ...

5.5.2. ANÁLISIS DE DATOS DE FLUORESCENCIA

Cuando la propiedad física es fluorescencia, $\langle Y \rangle$ podrá ser la intensidad de fluorescencia a una determinada longitud de onda, una relación de intensidades de fluorescencia a dos longitudes de onda, o cualquier otra transformación que permita el seguimiento del proceso de desplegamiento. Si la llamamos $\langle F \rangle$, quedaría,

$$\langle F \rangle = X_N F_N + X_D F_D = (1 - X_D) \cdot F_N + X_D \cdot F_D \quad (20)$$

siendo F_N y F_D , la fluorescencia (o relación) para el estado nativo (pretransición) y para el estado desnaturalizado (pos-transición), donde se ha tenido en cuenta que $X_N + X_D = 1$.

De la ecuación (20) se deduce:

$$X_D = \frac{\langle F \rangle - F_N}{F_D - F_N} \quad (21)$$

y, por tanto, $X_N = 1 - X_D$, será

$$X_N = \frac{F_D - \langle F \rangle}{F_D - F_N} \quad (22)$$

F_N y F_D , suelen expresarse como las expresiones lineales de los puntos de la pretransición y la pos-transición, respectivamente, como se indica en la Figura 13.

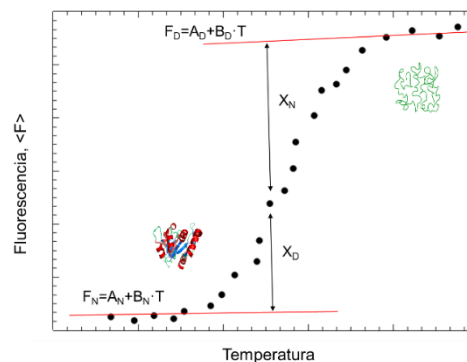


Figura 13. Zonas de pre y pos-transición en el gráfico genérico de fluorescencia frente a la temperatura.

Una vez calculados los valores de X_N y X_D , a cada temperatura, se puede determinar la constante de equilibrio, K_D , mediante la ecuación 18, a cada temperatura y por consiguiente la gráfica de las poblaciones para los dos estados (Figura 14). Así, por ejemplo, para X_D ,

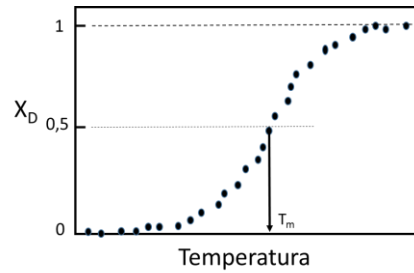


Figura 14. Poblaciones de lisozima en estado desnaturalizado frente a la temperatura. Se representa X_N vs a T .

El valor de la temperatura de desnaturalización, T_m , será el valor de temperatura en el punto de inflexión, es decir, donde $X_N=X_D=0,5$, y $K=1$ ($\Delta G = 0$) (hay la misma proporción de proteína en el estado nativo y en el estado desnaturalizado).

El método más común (aunque indirecto) para determinar el cambio de entalpía del proceso de desplegamiento, ΔH , a partir de estas medidas, es usando la ecuación de van't Hoff (de los puntos de la región de la transición), que expresa la dependencia de la constante de equilibrio con la temperatura (suponiendo que el cambio de capacidad calorífica es despreciable) (Figura 15).

$$\frac{d \ln K_D}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H}{R} \quad (23)$$

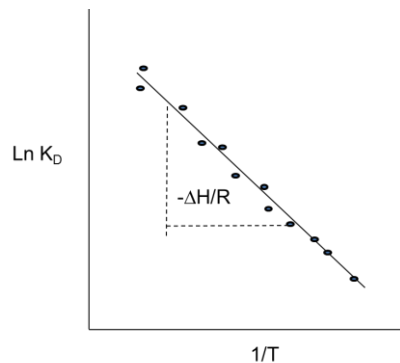


Figura 15. Determinación gráfica del ΔH mediante la ecuación de van't Hoff.

De la pendiente se deduce $\Delta H(T_m)$. Por otro lado, teniendo en cuenta que

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_D \quad (24)$$

calculamos el valor del cambio de energía libre de Gibbs a cada temperatura (también de la región de la transición), y con la expresión,

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (25)$$

de la pendiente del gráfico el ΔG^0 vs T , se determina $\Delta S(T_m)$ de la pendiente (Figura 16).

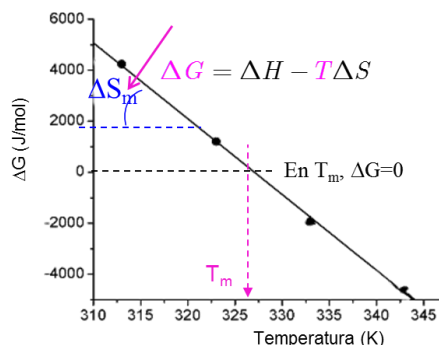


Figura 16. Dependencia ΔG vs. T .

5.6. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (en inglés, *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) es una técnica ampliamente utilizada para estudiar la estabilidad de las proteínas y para determinar los parámetros termodinámicos de estabilización de la estructura macromolecular. El fundamento de la técnica consiste en la medida de la energía transferida en forma de calor hacia o desde la muestra, a presión constante, durante un cambio físico o químico. Es decir, se registra la diferencia de temperatura entre la célula de referencia (que contiene el disolvente de la muestra) y la célula de la muestra.

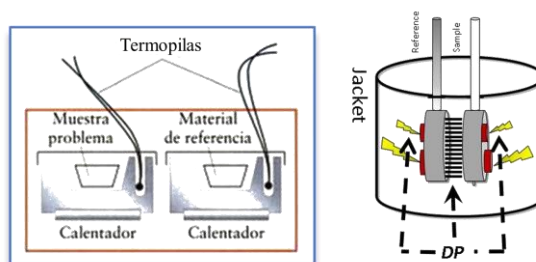


Figura 17. Diagrama esquemático de la configuración de las células (muestra y referencia) de un DSC.

Esta diferencia de temperatura será compensada mediante el suministro de un exceso de potencia eléctrica a la célula que se encuentra a menor temperatura con el objetivo de restablecer la igualdad de temperaturas en ambas células (Figura 17). De esta forma, la señal, diferencia de potencial que se registrará (DP en la Figura 17) será proporcional al exceso de potencia eléctrica que se haya aplicado, y ésta a su vez (a velocidad de barrido constante) directamente proporcional a la diferencia de capacidad calorífica entre ambas células (ΔC_p). A la medida de la capacidad calorífica molar de una muestra macromolecular (en nuestro caso la proteína lisozima) en función de la temperatura se le denomina termograma calorimétrico. A partir de los análisis de los termogramas de DSC, se pueden determinar los parámetros termodinámicos asociados a la transición inducida por la temperatura: cambios de entalpía (ΔH), de entropía (ΔS), de energía de Gibbs (ΔG) y de capacidad calorífica (ΔC_p), si el proceso de desplegamiento es reversible.

En los experimentos de DSC que se describen en esta memoria de TFG, se pretende estudiar el proceso de desplegamiento de la lisozima (en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5) mediante esta técnica y la determinación de los parámetros termodinámicos asociados a la transición (desnaturalización) inducida por la temperatura.

En general, las muestras de proteína para experimentos calorimétricos han de prepararse de una manera rigurosa, de modo que se garantice la pureza e integridad de la proteína en estudio. Además, la concentración de ésta debe determinarse de una manera precisa, ya que un error en la concentración se reflejará directamente en la medida de los distintos parámetros termodinámicos que se derivan del termograma. Una vez preparada la disolución (previamente dializada en PD-10 y filtrada en tampón de trabajo), y antes de que se introduzca en el calorímetro, hay que desgasificarla.

Una vez acabados los experimentos, se deben lavar las células inmediatamente con abundante agua Milli-Q o detergentes especiales para evitar que los posibles agregados que se hayan formado se adhieran a las paredes de las mismas.

El calorímetro utilizado en estos experimentos es un VP-DSC de Microcal™ (Plotnikov et al, 1997) (Figura 18). Presenta dos células gemelas (medida y referencia) en forma de moneda, soldadas a los tubos de llenado (Figura 17, derecha). El material de las células es una aleación de Tántalo, denominada comercialmente como Tantaloy 61, de gran inercia química, fundamentalmente a ácidos y bases fuertes. El volumen efectivo es de 0,5126 mL y el intervalo de temperatura de trabajo va desde -10 °C hasta 130° C, aunque por debajo de 0°C no es habitual usarlo ya que puede provocar daños irreversibles en las células. La velocidad de barrido puede variar desde 0 a 2 °C/min. Al poder trabajar con temperaturas por encima del punto de ebullición de las disoluciones, a presión atmosférica, el VP-DSC ha sido diseñado con un sistema de presurización que permite el uso de presiones entre 0 y 35 psi, evitando así la ebullición de la muestra.



Figura 18. Equipo calorimétrico VP-DSC utilizado.

En estudios de desplegamiento térmico mediante DSC, el parámetro observable es entalpía, H . Por tanto, para un mecanismo de desplegamiento de dos estados, la entalpía global $\langle H \rangle$ incluirá la contribución de la entalpía del estado nativo, H_N , y la entalpía del estado desnaturalizado, H_D . Por consiguiente, la entalpía global se expresará como:

$$\langle H \rangle = X_N H_N + X_D H_D \quad (26)$$

Si se toma como referencia, para la medida del cambio de entalpía del proceso de desplegamiento, el estado nativo, la ecuación 26 queda como,

$$\langle \Delta H \rangle = \langle H \rangle - X_N H_N = X_D H_D = \frac{K_D}{1 + K_D} \Delta H_D \quad (27)$$

donde ΔH_D es el cambio de entalpía del estado desplegado, respecto del estado nativo (considerado como referencia), también denominado entalpía calorimétrica.

Ya que la transición (desplegamiento) ocurre a presión constante, según la ecuación de Kirchhoff, el cambio de capacidad calorífica, se podrá expresar como:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \left(\frac{\partial \langle \Delta H \rangle}{\partial T} \right)_p = \frac{\left(\frac{\partial K_D}{\partial T} \right)_p}{(1 + K_D)^2} \Delta H_D + \left(\frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} \right)_p \frac{K_D}{1 + K_D} \quad (28)$$

y donde la variación de la constante de equilibrio con la temperatura se expresa mediante la ecuación de van't Hoff, donde el cambio de entalpía correspondiente la llamaremos, ΔH_{vh} , para diferenciarlo del cambio de entalpía calorimétrico, ΔH_D ,

$$\left(\frac{\partial \ln K_D}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H_{vh}}{RT^2} \quad (29)$$

En principio, si el proceso es de dos estados reversible, el valor del cambio de entalpía ΔH_{vh} , deberá ser igual al cambio de entalpía calorimétrico, ΔH_D ($\Delta H_{vh} = \Delta H_D$). En este caso, la ecuación 28 queda como:

$$\langle \Delta C_p \rangle = C_p - C_{p,N} = \underbrace{\frac{K_D}{(1 + K_D)^2} \frac{\Delta H_D^2}{RT^2}}_1 + \underbrace{\Delta C_p \frac{K_D}{1 + K_D}}_2 \quad (30)$$

En el caso en que se diferencie ΔH_{vh} y ΔH_D , la ecuación 30 resulta,

$$\langle \Delta C_p \rangle = C_p - C_{p,N} = \underbrace{\frac{K_D}{(1 + K_D)^2} \frac{\Delta H_D \Delta H_{vh}}{RT^2}}_1 + \underbrace{\Delta C_p \frac{K_D}{1 + K_D}}_2 \quad (31)$$

En las ecuaciones 30 y 31, aparecen dos sumandos: El primero de ellos (1), proporciona la curva de desplegamiento (con forma gaussiana). El término (2), refleja el cambio de capacidad calorífica entre el estado nativo y desplegado, y tiene forma sigmoideal (línea base química). La capacidad calorífica de exceso, $C_{p,exc}$, será

$$C_{P,exc} = \langle \Delta C_p \rangle + C_{p,N} = C_{p,N} + \frac{K_D}{(1 + K_D)^2} \frac{\Delta H_D^2}{RT^2} + \Delta C_p \frac{K_D}{1 + K_D} \quad (32)$$

donde, $C_{p,N}$, se puede expresar como una función lineal de T, $C_{p,N} = A + B \cdot T$, y K_D , se expresaría mediante la ecuación de van't Hoff,

$$\ln K_D = \frac{-\Delta H_D}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \quad (33)$$

siendo T_m la temperatura de desnaturalización, que corresponde con el máximo de la curva de capacidad calorífica. De ajuste no lineal tomando como datos de inicio la traza calorimétrica en la que únicamente se corrija la línea base instrumental (Temperatura en Kelvin y $C_{p,exc}$ en $\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) (Figura 19), utilizando un algoritmo de ajuste, en el que se introducen las ecuaciones 32 y 33 y mediante el software *Micromath Scientist* (Salt Lake City, USA) se obtienen como parámetros, ΔH_D , T_m , A, B, ΔC_p .

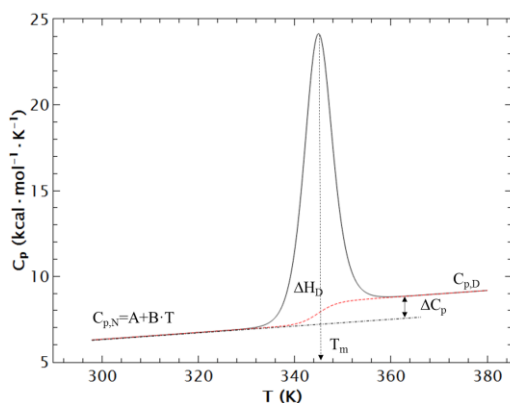


Figura 19. Simulación de un termograma de capacidad calorífica obtenido usando las ecuaciones 32 y 33, para valores de $A = 0,3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; $B = 0,02 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$; $T_m = 345 \text{ K}$, $\Delta H_D = 125 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $\Delta C_p = 1,25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.

Una vez restada la línea base química (es decir, $\Delta C_p = 0$), la ecuación 32 de la capacidad calorífica de exceso, quedará únicamente expresada en función del término (1), y que corresponderá a la capacidad calorífica de la transición, sin ninguna contribución adicional y que se expresará como (Figura 20) y con forma gaussiana:

$$\Delta C_{p,exc} = \frac{K_D}{(1 + K_D)^2} \frac{\Delta H_D^2}{RT^2} \quad (34)$$

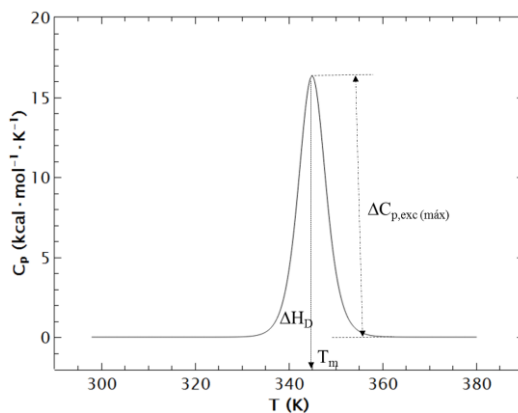


Figura 20. Simulación de la capacidad calorífica de una proteína (restada la línea de base química) frente a la temperatura obtenida usando las ecuaciones 33 y 34.

El ΔC_p en el máximo, junto al ΔH_D , obtenido del área bajo la curva, y T_m , pueden utilizarse para estimar la “entalpía de van’t Hoff”.

$$\ln K_D = \frac{-\Delta H_{vh}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \quad (35)$$

En el máximo de la curva, $K_D = 1$, y $\Delta C_{p,exc} = \Delta C_{p,exc(max)}$ y distinguiendo entre ΔH_{vh} y ΔH_D , la ecuación 34, resulta

$$\Delta C_{p,exc(max)} = \frac{1}{4} \frac{\Delta H_D \cdot \Delta H_{vh}}{RT_m^2} \quad (36)$$

donde,

$$\Delta H_{vh} = 4RT_m^2 \frac{\Delta C_{p,exc(max)}}{\Delta H_D} \quad (37)$$

Si ΔH_{vh} obtenido de esta expresión y ΔH_D calorimétrico obtenido del área bajo la curva anterior, coinciden (dentro del error experimental), se puede considerar que la proteína se despliega mediante un modelo de dos estados. Dicho de otro modo, si la relación $\Delta H_D/\Delta H_{vh} \sim 1$, se puede considerar que no existen intermedios estables en el desplegamiento inducido por temperatura, y por consiguiente, el mecanismo podrá considerarse de dos estados.

La reversibilidad del proceso de desplegamiento mediante DSC suele comprobarse realizando un segundo barrido a la misma muestra después de haber sido enfriada. Si la traza obtenida en el segundo barrido es similar a la primera, la transición es reversible. Frecuentemente, se considera que la desnaturalización es reversible si el área de la endoterma del segundo barrido es al menos el 90% del área del primer barrido (Blumleim y McManus, 2013). A este % suele denominarse índice de reversibilidad (RI). Si no hay endoterma en el segundo barrido, el proceso de desnaturalización es irreversible y su tratamiento no es termodinámico, sino cinético (Sánchez-Ruíz, 1992; Quesada-Soriano et al., 2006). Otra forma de examinar si el proceso es de equilibrio (termodinámico) o cinético es realizar una traza a distinta velocidad de barrido. Si T_m es independiente de la velocidad de barrido, el proceso es reversible. También este hecho se pone de manifiesto, analizando la dependencia de T_m con la concentración de proteína, a una misma velocidad de barrido. Si realizando barridos (a una determinada velocidad de barrido) de una proteína a distinta concentración, T_m no varía, el proceso es de dos estados.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE UNA PROTEÍNA MEDIANTE ENSAYO DE BRADFORD

Todo el procedimiento de este ensayo (incluida la recta patrón con albúmina, BSA) se realizó en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5. Se prepara cuidadosamente, por pesada, una disolución (10 mL) de albúmina (BSA) de 2 mg/mL en dicho tampón. Una vez preparada, se realizan 5 diluciones (de 1 mL) en tubos de vidrio de 10 mL según se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Disoluciones de BSA para la recta patrón del ensayo de Bradford.

Dilución	1	2	3	4	5
$V_{\text{tampón}} (\mu\text{L})$	63	125	250	375	500
$V_{\text{AcNa}} (\mu\text{L})$	937	875	750	625	500
[BSA] (mg/mL)	0,125	0,25	0,5	0,75	1

Una vez preparadas las 5 diluciones (con concentraciones de BSA entre 0,125 y 1 mg/mL), se separaron 100 μL de cada muestra en tubos separados, adicionándole 5 mL del colorante Coomassie Blue y agitándolas con ayuda de un agitador vórtex para homogeneizar las muestras. De esta manera, todas las moléculas de colorante estarán en contacto con las de proteína. El reactivo de Bradford conteniendo el colorante fue añadido secuencialmente a cada dilución con un desfase de 2 minutos, ya que, la reacción ocurre a gran velocidad y era la manera de asegurarnos de que nos daba tiempo a medir espectrofotométricamente cada dilución de manera correcta. Cada muestra se mide a 595 nm a los 5 min de la adición del colorante comenzando desde la más diluida a la más concentrada.

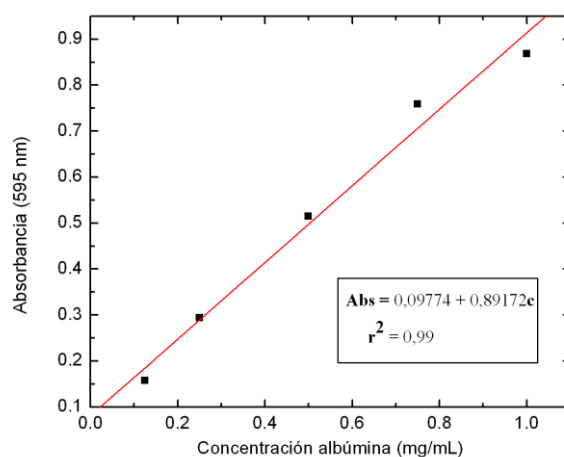


Figura 21. Recta patrón de albúmina (BSA) del ensayo de Bradford.

La linealidad es aceptable, como se deduce del coeficiente de correlación ($r^2 = 0,99$). Por lo que, es adecuado tomar la recta realizada de albúmina (BSA) como patrón. A continuación, en la Tabla 2 se muestran 2 diluciones realizadas a partir de una disolución madre de lisozima en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5. Dicha disolución se preparó por pesada de la proteína en el tampón mencionado y su

concentración teórica fue de 5,5 mg/mL Para calcular la concentración real de lisozima le practicamos el ensayo de Bradford.

Tabla 2. Disoluciones de lisozima para la determinación de su concentración

Dilución	V _{lisozima} (μ L)	V _{AcNa} (μ L)	Factor de dilución	Absorbancia 595 nm	[] _{cubeta} (mg/mL)	[] _{lisozima} (mg/mL)
1	100	900	1/10	0,56	0,518	5,18
2	50	950	1/20	0,32	0,249	4,98

Se ha usado la ecuación de la recta obtenida (Figura 21), para el cálculo de la concentración de la cubeta. Deshaciendo el factor de dilución se obtiene la concentración de la disolución de lisozima en tampón acetato sódico. De la media de los dos valores, obtenemos que la concentración de lisozima de la preparación es 5,08 mg/mL. La concentración teórica, obtenida por pesada, era de 5,5 mg/mL. La diferencia (7% de error) puede ser debida a varios factores: 1) errores en la determinación de la recta patrón de albúmina; 2) error en la pesada de la albúmina; 3) inadecuados tiempos de espera del ensayo de Bradford; 4) que el tiempo de espera con las disoluciones de lisozima no deba ser igual al utilizado para los patrones de albúmina; 5) que la cantidad pesada contenga además de proteína otros aditivos, como residuos de sales de la liofilización; 6) otros errores instrumentales o experimentales. A pesar de todo, este método (con sus errores), proporciona buenos resultados para la estimación de la concentración de proteína o proteínas totales. No obstante, para la determinación de la concentración de una proteína (no un extracto de diversas proteínas) es mejor utilizar un método espectrofotométrico.

6.2. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR EN ESTADO NATIVO DE LISOZIMA

Según la ley de Beer ($A=E \cdot b \cdot c$), la absorbancia de una disolución es directamente proporcional a su concentración (c). También depende de la distancia que recorre la luz por la disolución (b) y, por último, depende de una constante de proporcionalidad, E , denominada coeficiente de extinción, que es específica de cada cromóforo, de la longitud de onda de medida y del medio en el que se encuentre el cromóforo. Por tanto, el coeficiente de extinción molar es un parámetro que define la absorbancia de la luz a una determinada longitud de onda por concentración molar. Por tanto, sus dimensiones suelen resultar ser $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ (expresando la anchura de la cubeta en cm). Cuando la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M , por ejemplo, $g \cdot L^{-1}$, las dimensiones de E son distintas, por ejemplo, $g^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$. En nuestro caso particular, una disolución de proteína, dependiendo del estado (condiciones experimentales) en el que se encuentre, pueden obtenerse coeficientes de extinción (a igual longitud de onda) algo diferentes. Este es el caso que se presenta cuando la proteína está en estado nativo o en estado desnaturalizado. Las condiciones experimentales para el estudio en estado nativo y desnaturalizado han sido tampón acetato sódico 50 mM, pH 5 y cloruro de guanidina 6 M (disuelto en el mismo tampón), respectivamente.

6.2.1. Estimación teórica del coeficiente de extinción molar de lisozima

El valor teórico del coeficiente de extinción molar de la proteína en estado desplegado o desnaturalizado (E_U) a 280 nm, se puede calcular mediante la siguiente expresión:

$$E_U^{280} = 5690 \cdot n_{Trp} + 1280 \cdot n_{Tyr} + 120 \cdot n_{S-S} \quad (38)$$

Igualmente, el valor del coeficiente de extinción molar teórico de la proteína en estado plegado (E_F) a 280 nm, se calcula mediante la expresión:

$$E_F^{280} = 5500 \cdot n_{Trp} + 1490 \cdot n_{Tyr} + 125 \cdot n_{S-S} \quad (39)$$

En ambos casos, desnaturalizada y nativa, estas expresiones han sido deducidas a partir del análisis de los coeficientes de extinción de un conjunto grande de proteínas (Pace et al., 1995; Pace y Schmid, 1997), siendo n_{Trp} , n_{Tyr} y n_{S-S} el número de residuos de triptófano, tirosina y enlaces disulfuro en la estructura de la proteína, respectivamente. A partir del análisis de la secuencia de aminoácidos para esta proteína (lisozima) y el número de enlaces disulfuro presentes en la estructura tridimensional, código 1DPX del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), se observa que presenta 6 triptófanos ($n_{Trp} = 6$), 3 tirosinas ($n_{Tyr}=3$) y 8 cisteínas que están formando 4 enlaces disulfuro ($n_{S-S} = 4$). Introduciendo estos datos en las expresiones anteriores, se deduce que los coeficientes de extinción (teóricos) para la lisozima en el estado desnaturalizado y nativo, a 280 nm, son 384460 y $37970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivamente.

Existen diferentes aplicaciones *online* que permiten realizar automáticamente el cálculo del coeficiente de extinción teórico de una proteína, simplemente introduciendo su secuencia o el código PDB de la estructura. Entre ellas una muy utilizada es ExPASy (<https://www.expasy.org/>). Según esta aplicación, y utilizando la secuencia correspondiente al código PDB, (1DPX), se observa que el coeficiente de extinción molar teórico de la lisozima en estado nativo es algo menor que en su estado desnaturalizado, lo que podría justificarse como que, en el estado nativo, algunos de los aminoácidos que actúan como cromóforos en la proteína podrían estar en el interior de la estructura y, en consecuencia, ser menor su coeficiente de extinción. En estado desnaturalizado, la proteína está desplegada y en consecuencia todos los aminoácidos cromóforos contribuirán al valor total del coeficiente de extinción. No obstante, también en el estado nativo, puede influir el entorno en el que se encuentren los cromóforos. Todo ello justifica que ambos coeficientes deban ser, como ocurre aquí, comúnmente algo diferentes.

6.2.2. Obtención del coeficiente de extinción molar experimental de lisozima

Gill y von Hippel (1989) describieron un procedimiento para determinar experimentalmente el coeficiente de extinción de una proteína, en estado nativo, de la que se desconozca su valor o se quiera determinar en otras condiciones experimentales diferentes a las que ha sido ya determinado. De esta proteína (lisozima), el coeficiente de extinción a 280 nm descrito en la mayor parte de la bibliografía es para la proteína en KCl 0,1 M. Ya que todos los experimentos recogidos en esta memoria se hacen en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5, nosotros hemos utilizado este procedimiento (Gill y von Hippel, 1989) para determinarlo en este tampón y pH. Como hemos dicho antes, el coeficiente de extinción es dependiente (entre diversos factores) de las condiciones del medio en el que se encuentre la proteína, de ahí esta determinación y también como criterio metodológico. Una vez determinado, lo compararemos con dado en la bibliografía o en la ficha técnica dada por la casa comercial.

Para realizar esta determinación, se prepara una disolución de 6 M de cloruro de guanidina en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5, reajustando el pH con NaOH con ayuda del pHmetro. Se prepara una disolución de la proteína (lisozima) 4 mg/mL (0,2 mM) en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5. Se preparan dos alícuotas iguales de 50 μ L de esta disolución de proteína. Una se adiciona sobre 950 μ L de tampón acetato sódico, pH 5 y la otra sobre 950 μ L de cloruro de guanidina 6M (preparado con anterioridad). A continuación, se dejan ambas disoluciones, a temperatura ambiente, durante 1 h. Se miden los espectros UV-visible de cada muestra, transfiriendo ambas disoluciones a una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz y se lee (de los espectros, Figura 22) el valor de la absorbancia (en ambos casos) a 280 nm. Basándose en la Ley de Beer, para ambas disoluciones se cumplirá la siguiente relación (40) En esta relación aparecen los valores de absorbancia a 280 nm y los coeficientes de extinción de la proteína en el estado nativo (o plegada) y desnaturalizado (en cloruro de guanidina).

$$\frac{Abs_F^{280}}{Abs_U^{280}} = \frac{E_F^{280}}{E_U^{280}} \quad (40)$$

Los valores de absorbancia obtenidos, para la proteína plegada (A_F) y desplegada (A_U) fueron 1,177 y 1,134. Utilizando el valor del coeficiente de extinción de la lisozima desnaturalizada, calculado anteriormente de forma teórica según la ecuación 38, se deduce el coeficiente de extinción molar experimental para la lisozima en estado plegado (nativo),

$$E_F^{280} = 39894 M^{-1} cm^{-1}$$

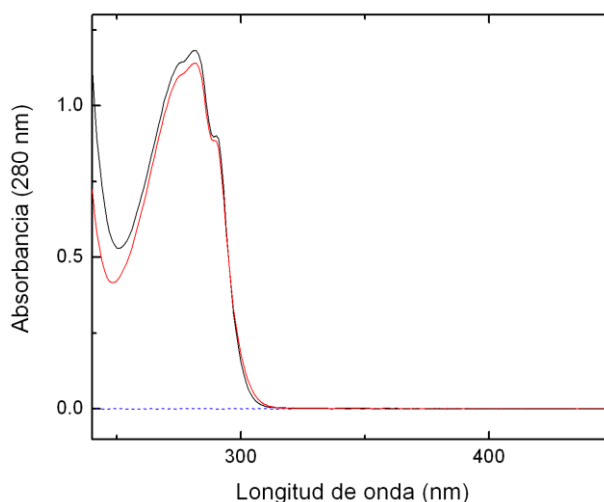


Figura 22. Espectros UV-visible de lisozima en estado nativo (color rojo) y desnaturalizado (color negro). Máximo de absorción a 280 nm.

En la Tabla 3 se muestran los valores de los coeficientes de extinción (en distintas unidades) obtenidos o deducidos, según distintos procedimientos.

Tabla 3. Coeficientes de extinción molar de proteína en estado desnaturalizado.

$* E_F^{280}$	$(M^{-1}cm^{-1})$	$(mL \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1})$
Teórico	37970	2,65
Experimental	39894	2,78
Sigma-Aldrich	36000 en 0,1 M en KCl	2,52

*Masa molar utilizada, 14307 gr/mol

Los valores indicados (Tabla 3) presentan unas diferencias del 5 % y la utilización de uno u otro van a proporcionar errores en la determinación de la concentración de proteína de mismo orden. Aunque es frecuente en bibliografía usar el teórico o el deducido de bibliografía, aun no estando en las mismas condiciones en las que vayamos a usar la proteína, resulta sin duda, más preciso y aconsejable usar el que se determina experimentalmente en las condiciones experimentales de trabajo. Por tanto, en todos los cálculos y determinaciones usadas en esta memoria, se ha utilizado el valor obtenido experimentalmente.

6.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LISOZIMA MEDIANTE MEDIDAS UV-VIS

La determinación se realizó en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5. Se prepara, por pesada una disolución (en este tampón) de 5,5 mg/mL. Una vez preparada, se filtra con ayuda de un filtro de 0,45 μ m, se procedió a realizar 5 diluciones según la Tabla 4.

Tabla 4. Diluciones formadas a partir de la disolución de lisozima en tampón acetato sódico.

	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5
Factor de dilución	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{12,5}$	$\frac{1}{16,7}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{50}$
V. tampón (μ L)	900	920	940	960	980
V _{proteína} (μ L)	100	80	60	40	20

El volumen total fue de 1 mL, y cada disolución fue llevada a una cubeta de cuarzo, para medir su concentración mediante el espectrofotómetro de UV-vis.

Las diluciones con mayor concentración de lisozima presentaban una mayor absorción del haz de luz (Figura 23).

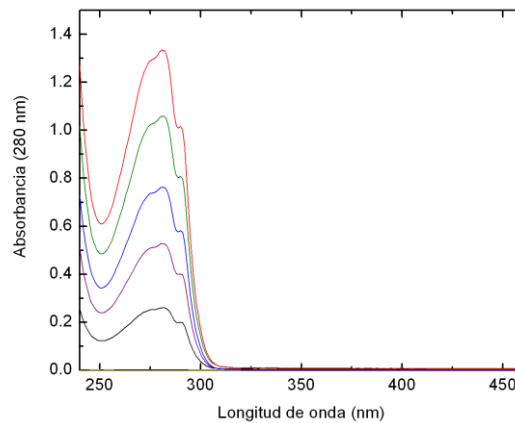


Figura 23. Espectros UV-visible de las disoluciones (diluciones) indicadas en la Tabla 1. Se registraron espectros en el intervalo de longitudes de onda comprendidas entre 230 y 450 nm. Máximo de absorción a 280 nm.

Con los valores de absorbancia, a 280 nm, para las distintas diluciones, se procedió a realizar una representación gráfica de las absorbancias frente al factor de dilución (Tabla 5).

Tabla 5. Absorbancias obtenidas para cada dilución y su concentración esperada.

	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5
Factor de dilución	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{12,5}$	$\frac{1}{16,7}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{50}$
Abs (280 nm)	1,330	1,055	0,760	0,525	0,260

Evidentemente, cuanto menor es el factor de dilución de la disolución de lisozima, su absorbancia es mayor, debido a una concentración de proteína mayor (Tabla 5 y Figuras 23 y 24).

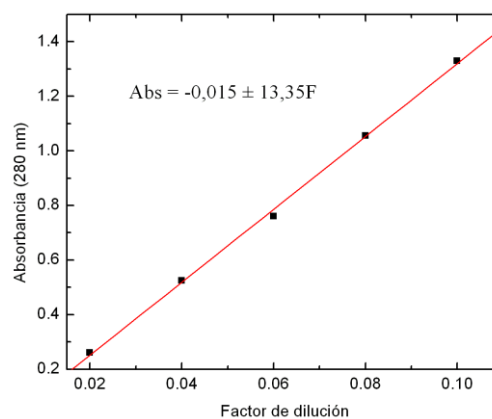


Figura 24. Dependencia de la absorbancia, a 280 nm, para las 5 diluciones, frente a su factor de dilución.

De acuerdo con la ley de Beer, la pendiente (13,35) de la representación indicada en la Figura 24, permite obtener la concentración de la muestra original, usando como datos el coeficiente de extinción de la proteína a 280 nm (2,78 mL/mg) y $b = 1$ cm.

$$Abs = \underset{\text{pendiente}}{E \cdot b \cdot c} \cdot F \quad (41)$$

La concentración, c , obtenida es 4,80 mg/mL. De esta forma, la determinación de la concentración no está supeditada a una sola medida (dilución) con el consiguiente error instrumental y de pipeteo, que pudiera tener, sino que es el resultado de diversas medidas (diluciones) que permiten una mayor exactitud. La concentración deducida de una pesada usando una balanza analítica conlleva a errores instrumentales, tales como mal calibrado de la balanza analítica u otro tipo de errores que asociados en la pesada de proteínas como, por ejemplo, que la proteína liofilizada comercial pueda contener sales u otros excipientes. Estos pueden evitarse midiendo tras la preparación, la concentración mediante UV-visible ya que dichas sales no absorben a 280 nm.

Estas discrepancias entre el valor de concentración deducida de la pesada y la determinada por UV-visible se ponen de manifiesto en este ejemplo, donde por pesada era 5,5 mg/mL y la real (medida por UV-visible) es 4,80 mg/mL. La determinación exacta de la concentración de una proteína es muy importante cuando se hacen estudios posteriores: actividad, desplegamiento térmico, etc, ya que los resultados derivados de esa discrepancia proporcionarían datos erróneos en los parámetros que puedan determinarse de esos estudios.

6.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LISOZIMA

Para la determinación de la actividad de una enzima, es importante conocer exactamente su concentración. Por este motivo, como paso previo a cualquier ensayo de actividad, debe medirse la concentración, frecuentemente mediante espectrofotometría UV-visible, en lugar de usar la concentración aproximada deducida de la pesada de la enzima durante la preparación.

6.4.1. Preparación de reactivos para el ensayo de actividad de lisozima

Se pesaron inicialmente ~5 mg de lisozima y se disuelven en 5 mL dihidrógenofosfato de potasio (H_2KPO_4) 0,1 M a pH 6,24, obteniendo una disolución de proteína de ~1 mg/mL. Para medir su concentración exacta, de una dilución intermedia (50 μ L de la de ~1 mg/ml y 950 μ L de tampón H_2KPO_4), se toman 300 μ L y 700 μ L de H_2KPO_4 . Esta última disolución se mide espectrofotométricamente su absorbancia a 280 nm, y usando la ecuación de Lambert-Beer, y el protocolo descrito en el apartado 6.3, se determina su concentración exacta. A partir del valor medio de 2 medidas de absorbancia (0,797 y 0,799), obtenemos que la concentración fue 0,301 mg/mL, muy similar a la que se deduce por pesada (0,3 mg/mL), lo cual nos indica, en este caso, que la pesada ha sido bastante precisa.

De sustrato se utiliza una suspensión de 0,03 % [w/v] (0,03 g/100 mL) de pared bacteriana de *Micrococcus lysodeikticus*. Para ello, pesamos 7,5 mg de pared bacteriana y redisolvemos con H_2KPO_4 hasta 25 mL.

$$\frac{7,5 \text{ mg } Micrococcus \text{ lysodeikticus}}{25 \text{ mL } H_2KPO_4} = 0,3 \frac{\text{mg sustrato}}{\text{mL } H_2KPO_4}$$

6.4.2. Estudio del ensayo de actividad de lisozima

Inicialmente se prepara un blanco con 2 mL de H_2KPO_4 , se adiciona a una cubeta de plástico de 1 cm y se introduce en el espectrofotómetro como referencia. Se realizan tres ensayos, con distinta cantidad de lisozima (Tabla 6), midiendo la absorbancia a 450 nm durante 4 min a intervalos de 20 s, usando siempre como referencia la cubeta con el blanco. Las cantidades de cada reactivo en cada ensayo se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Descripción de las cantidades de cada reactivo utilizadas en los ensayos de actividad con lisozima.

Reactivo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Blanco
Sustrato (μL)	1900	1900	1900	0
Tampón (μL)	0	30	60	2000
Lisozima (μL)	100	70	40	0
Volumen total (μL)	2000	2000	2000	2000
mg lisozima	0,005	0,0035	0,002	0
mg sustrato	0,285	0,285	0,285	0

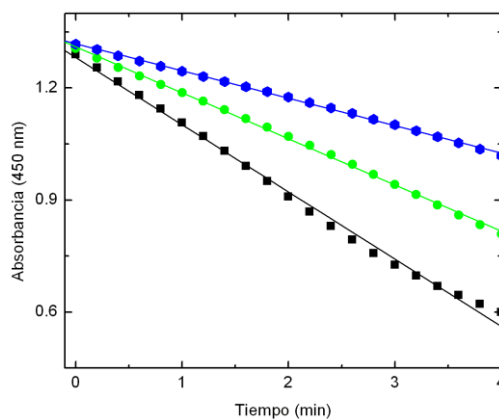


Figura 25. Variación de la absorbancia (a 450 nm) con el tiempo (en min) de los 3 ensayos con lisozima. Se representan en negro, verde y azul, los ensayos 1, 2 y 3, respectivamente.

De la Figura 25 se observa, que cuanto menor es la cantidad de enzima presente en el ensayo menor es la pendiente de la recta obtenida. Es decir, para un mismo tiempo de medida, la disminución de absorbancia es menor. Por eso, el ensayo 3 (con menor cantidad de lisozima), tiene menor pendiente (menos actividad) que en los otros dos ensayos (Tabla 7).

Las unidades de actividad (U) de cada ensayo se deducen de la pendiente de cada recta, de acuerdo con lo descrito en el apartado 5.4 (Métodos).

Tabla 7. Valores de las pendientes y de las unidades de actividad (U) para los tres ensayos de actividad de la Figura 25.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Pendiente	-0,1799	-0,1238	-0,0734
Unidades (U)	179,9	123,8	73,4

Según indicamos en el apartado 5.4 (Métodos), 1 unidad de actividad enzimática (U) de lisozima produce una disminución de absorbancia de 0,001 en 1 minuto. De ahí los valores de U recogidos en la Tabla 7. La actividad específica de una enzima se define como el número de unidades (U) por mg de enzima (U/mg). Por tanto, para calcular la actividad específica en cada ensayo usaremos la siguiente expresión:

$$\text{Actividad específica (U/mg)} = \frac{\text{Unidades}}{\text{mg lisozima}} \quad (42)$$

La actividad específica para los tres ensayos (que analizados individualmente debe ser aproximadamente la misma) se puede deducir de la pendiente del ajuste lineal de la representación de las unidades de actividad, frente a los mg de enzima (Figura 26).

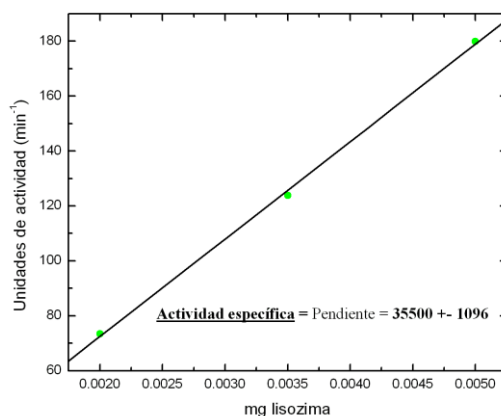


Figura 26. Unidades de actividad frente a la cantidad de enzima para cada ensayo de lisozima.

La linealidad es bastante buena, como se deduce del coeficiente de correlación ($r^2 = 0,9995$). Se obtiene una actividad específica de aprox. 35500 U/mg, valor que está dentro del intervalo que se describe en las especificaciones técnicas del proveedor (Sigma-Aldrich), y donde se indica que la actividad específica de la enzima en condiciones óptimas, debe estar comprendida entre 30000 y 40000 U/mg. Por tanto, de esta forma demostramos que la lisozima utilizada en este trabajo está en condiciones óptimas para realizar cualquier estudio de los descritos en esta memoria.

6.5. ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO TÉRMICO DE LISOZIMA MEDIANTE MEDIDAS DE FLUORESCENCIA

6.5.1. Diálisis de lisozima mediante cromatografía de exclusión molecular

A partir de una disolución de lisozima de 5 mg/mL (2 mL) en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5, preparada por pesada, se procede a dializarla mediante paso por una columna de exclusión molecular (*fast desalting*) PD-10 (General Electric) para eliminar los aditivos (principalmente sales) que hayan quedado en la liofilización y que frecuentemente presentan las proteínas comerciales. Para ello, se colocan cuidadosamente los 2 mL de proteína en la parte superior de la columna (PD-10) y se hace pasar por gravedad utilizando tampón acetato como fase móvil (previamente hay que equilibrar la columna en tampón acetato). Se recogen alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf como se muestra en la Figura 27.

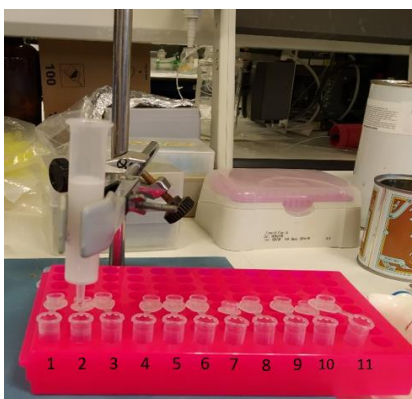


Figura 27. Esquema de elución de la proteína en una columna PD-10.

Se identifican los tubos que contienen la proteína, midiendo su absorbancia a 280 nm y que en este caso corresponden a las fracciones 3-5. La fracción 6, que contiene algo de proteína se desecha ya que podría contener sales de las que queremos eliminar. Se juntan los tubos 3-5 y se filtran utilizando un filtro de 0,45 μm . Todas las demás fracciones se desechan, incluido las 2 primeras porque no contenían proteína.

De este filtrado se preparó, por dilución 2 mL (de la que medimos su concentración a 280 nm mediante UV-visible), de concentración 0,035 mg/mL (2,44 μM).

6.5.2. Ajuste previo del equipo de fluorescencia

Se ajustaron los parámetros del espectrofluorímetro para las medidas de los espectros de emisión de fluorescencia de esta proteína. La temperatura de la cubeta no se fijó, ya que se iba variando, con el tiempo, durante el experimento, mediante el uso de un programador de temperatura controlado por un sistema Peltier. La temperatura inicial, que se fijó, fue de 35 °C (temperatura fisiológica) y en la que la lisozima se encuentra en estado nativo.

- Parámetros del equipo:
 - Longitud de onda de excitación: 280 nm
 - Espectro (longitudes de onda de emisión): 310-420 nm
 - Rendijas: Excitación: 4 nm; Emisión: 4 nm
 - Paso (muestreo): cada 1 nm. Integración: 0,4
 - Se seleccionaron las medidas en modo digital

Antes de comenzar el experimento hay que introducir la microsonda de temperatura en la cubeta de la muestra sin obstaculizar el paso de la luz. Se introduce un pequeño imán agitador (que estará funcionando lentamente, durante todo el experimento para evitar la formación de burbujas) y se cerró muy bien la parte superior de la cubeta (sujetando la sonda térmica) con parafilm, para evitar la evaporación de muestra que puede producirse a temperaturas altas.

6.5.3. Realización de los espectros de emisión de fluorescencia

Partiendo de una muestra de lisozima a $2,44 \mu\text{M}$, en la cubeta de fluorescencia, termostatazada inicialmente a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, fuimos registrando espectros de emisión (desde 310 a 420 nm) a temperaturas crecientes con intervalos de $3\text{-}4 \text{ }^\circ\text{C}$ y una rampa de temperatura de aproximadamente $1^\circ\text{C}/\text{min}$. A medida que la temperatura se incrementaba hasta alcanzar $90\text{-}92 \text{ }^\circ\text{C}$ se observó que los espectros de fluorescencia iban disminuyendo en intensidad a la vez que el máximo del espectro se desplazaba desde 337 nm hasta 349 nm (Figura 28).

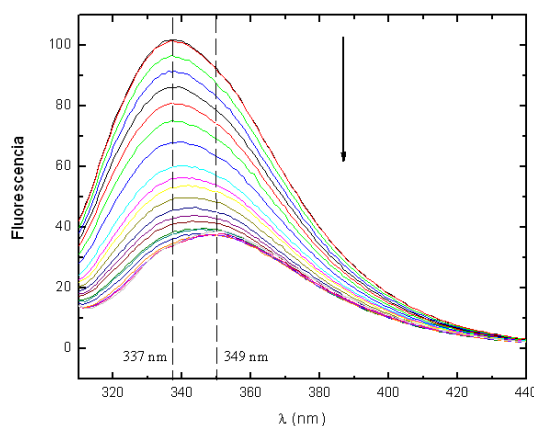


Figura 28. Espectros de emisión de fluorescencia de lisozima a diferentes temperaturas comprendidas entre $35 \text{ }^\circ\text{C}$ y $92 \text{ }^\circ\text{C}$. El sentido de la flecha indica un aumento de temperatura.

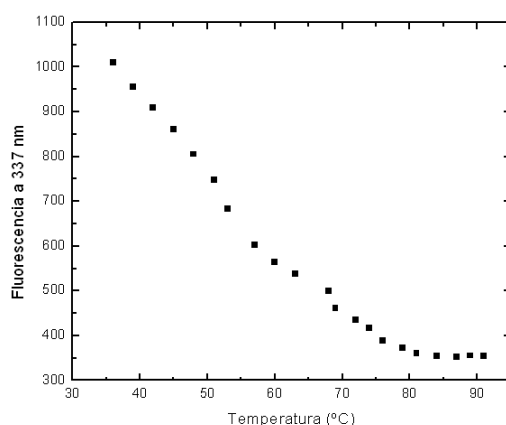


Figura 29. Variación de la intensidad de fluorescencia a 337 nm , de la muestra de lisozima, en función de la temperatura.

Representando, por ejemplo, los valores de fluorescencia a 337 nm , en función de la temperatura, se observa que entre 72 y $77 \text{ }^\circ\text{C}$, se produce un cambio de intensidad de fluorescencia, y por tanto, T_m debe de estar previsiblemente en ese intervalo de

temperatura. Una mejor representación de esta transición térmica puede visualizarse representando la relación entre los valores de fluorescencia a 349 y 337 nm, de cada espectro.

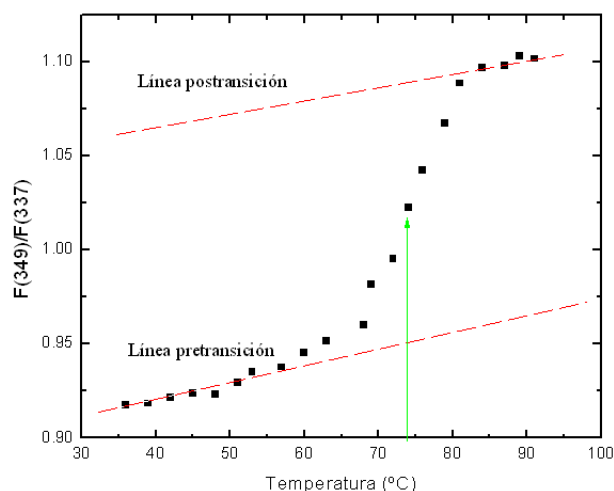


Figura 30. Variación de la relación de fluorescencia (F_{349}/F_{337}) a distintas temperaturas comprendidas entre 35 y 92 °C.

Se observan 2 zonas con buena linealidad, la primera de ellas es la zona de pretransición, y donde predominan las moléculas de lisozima en estado nativo y la segunda, es la correspondiente a la zona de postransición, donde son mayoritarias las moléculas de lisozima en estado desnaturalizado. Entre ambas zonas, se encuentra la región de la transición de desplegamiento y donde la fracción del estado nativo (X_N) y estado desnaturalizando (X_D) va variando (X_N de 1 a cero, X_D de 0 a 1). Esta variación en las poblaciones de cada estado, puede visualizarse mejor en la Figura 31. El protocolo para convertir los datos de la Figura 30 a la Figura 31 está descrito en el apartado 5.5 de (Métodos).

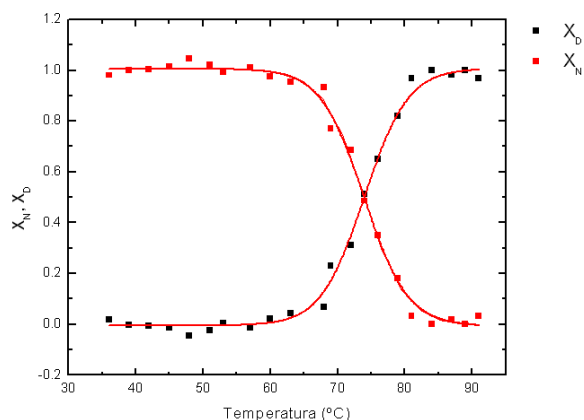


Figura 31. Poblaciones del estado nativo (X_N) y del estado desnaturalizado (X_D) en función de la temperatura. Las líneas continuas representan un ajuste sigmoidal genérico.

En la Figura 31, observamos claramente el valor de T_m , 74 °C (347,15 K) que es el punto de inflexión de las curvas sigmoidales y que corresponde al valor de temperatura

al cual $X_N=X_D=0,5$. Es decir, el valor de temperatura al que el número de moléculas de proteína en estado nativo y desnaturalizado es el mismo (50 %), y que sería cuando la constante de equilibrio del proceso de dos estados vale $K_D = 1$ (ver métodos). Calculando los valores de K_D , de los puntos correspondientes a la región de la transición (tal y como se describe en el apartado 5.5 de Métodos), y representando frente a $1/T$ de acuerdo con la ecuación de van't Hoff se obtiene la Figura 32.

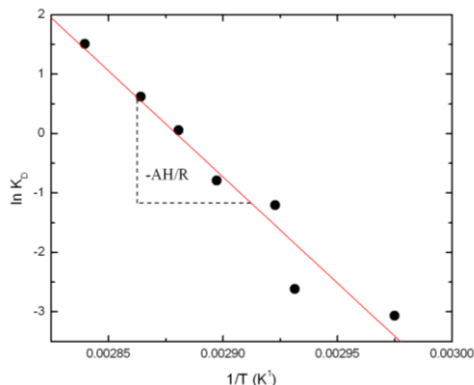


Figura 32. Gráfico de van't Hoff para los valores de K_D y T , correspondientes a la región de la transición (70-85 °C).

De la pendiente de esta gráfica (Pace y Scholtz, 1996) podemos determinar el cambio de entalpía del proceso de desplegamiento, $\Delta H^0 = 71000 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (71 kcal·mol⁻¹) (con $R=1,987 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$). Dada la aparente linealidad de este gráfico se deduce que el cambio de entalpía sería válido para todo el intervalo de temperatura de la transición. Por otro lado, se observa que el proceso es endotérmico, debido a que un proceso de desplegamiento (en este caso térmico) requiere energía, necesaria para desplegar la proteína desde su estado estable plegado a un estado desplegado.

Tal y como se ha descrito en el apartado 5.5 de (Métodos), haciendo uso de la ecuación de Gibbs ($\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0$), podemos transformar los datos de K_D en ΔG^0 ($\Delta G^0 = -RT \ln K_D$) y representar frente a la temperatura (Figura 33) (Pace y Scholtz, 1996). La pendiente de la recta, en el punto $\Delta G^0 = 0$ ($K_D = 1$) nos da una estimación del cambio de entropía del proceso de desplegamiento, $\Delta S^0 = 204,49 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. El cambio de entropía es positivo, resultado normal en un proceso de desplegamiento de una proteína, ya que el desplegamiento supone un aumento del desorden, y por consiguiente está acompañado de un $\Delta S^0 > 0$.

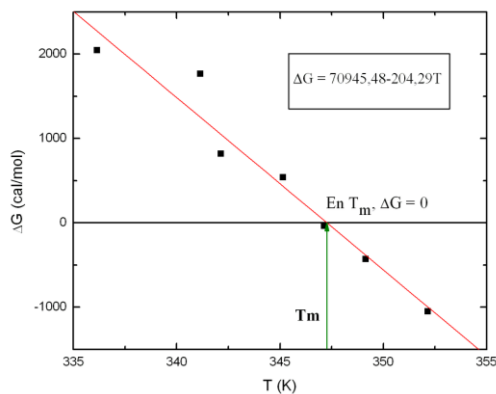


Figura 33. Representación de la energía libre de Gibbs frente a la temperatura.

T_m se alcanza cuando la energía libre de Gibbs ($\Delta G^0 = 0$). En este punto las poblaciones de moléculas de proteína en estado nativo y en estado desnaturalizado son iguales. El valor de T_m se puede deducir a partir de la gráfica y tiene un valor de 347,28 K = 74,13 °C.

Analizando todos los resultados obtenidos de fluorescencia para lisozima, deducimos diversos datos interesantes. 1) El máximo de los espectros de emisión de fluorescencia se desplaza batocrómicamente y se hace menor la fluorescencia a medida que aumentamos la temperatura de la proteína (contenida en la cubeta del fluorímetro); 2) Los datos mostrados en Figuras 29-31 han facilitado la estimación del valor de T_m , es decir, conocer el intervalo de temperatura (Figuras 29 y 30) y el valor de T_m (Figura 31); 3) Los resultados obtenidos de las Figuras 32 y 33, han permitido, además de calcular el valor exacto de T_m , determinar los valores del cambio de entalpía y entropía del proceso de desplegamiento térmico de lisozima en este tampón y pH.

6.6. ANÁLISIS DEL DESPLEGAMIENTO TÉRMICO DE LISOZIMA MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

6.6.1. Preparación del calorímetro y llenado de las células

Previamente a la realización de las experiencias de DSC con lisozima se llenan las dos células del calorímetro (muestra y referencia) con tampón acetato sódico 50 mM, pH 5 (filtrado y desgasificado) con ayuda de una jeringa de aguja larga tal y como indica el fabricante (Microcal™). Para el registro de las trazas se ajustaron los parámetros de barrido en el software del microcalorímetro (Origin® Viewer for DSC): rampa de temperatura de 15 °C hasta 95 °C, velocidad de barrido de 90 °C/h (1,5 °C/min), concentración en la célula 0,0676 mM, pre-scan de 15 minutos, nombre de archivo, etc. Una vez tapado el compartimento de las células se presurizan a 30-35 psi (nunca superior a 80 psi, ya que ocasionaría daños indeseados en las células de tántalo) y se realizan barridos sucesivos de tampón (a la velocidad de barrido que se vaya a realizar el experimento con proteína, por ej. 1,5 K/min) hasta que se consiga repetitividad en las trazas. Una vez conseguido, una de estas últimas trazas se utilizará, para el análisis de datos posterior, como línea base instrumental (traza de referencia o blanco). A continuación, una vez enfriado el calorímetro, y siempre dentro del intervalo 20-35 °C, se extrae el contenido de la célula de muestra (que será tampón) y se llena con una disolución de lisozima 0,0676 mM (0,97 mg/mL), previamente dializada en columna PD-10, concentrada y determinada su concentración por UV-visible (apartado 5.2 Métodos). La célula de referencia se deja llena con el tampón (no se vacía).

6.6.2. Desarrollo del experimento de DSC con lisozima

Realizado y registrado el barrido con proteína a esta concentración (0,0676 mM) y velocidad de barrido (1,5 °C/min), se deja enfriar el calorímetro y alcanzados los 25-35 °C (intervalo de temperatura para extraer e inyectar nueva muestra), se extrae nuevamente el contenido de la célula de muestra y se introduce otra muestra de lisozima más diluida (0,037 mM, 0,53 mg/mL) y se registra nuevamente la traza calorimétrica (con los mismos parámetros de barrido, excepto la concentración de proteína). Igualmente se procede, al terminar este segundo barrido, con una tercera muestra de lisozima 0,020 mM (0,29 mg/mL). Los resultados se muestran en la Figura

34, donde se observa que con independencia de la concentración se obtiene el mismo valor de T_m (a velocidad de barrido, 1,5 °C/min).

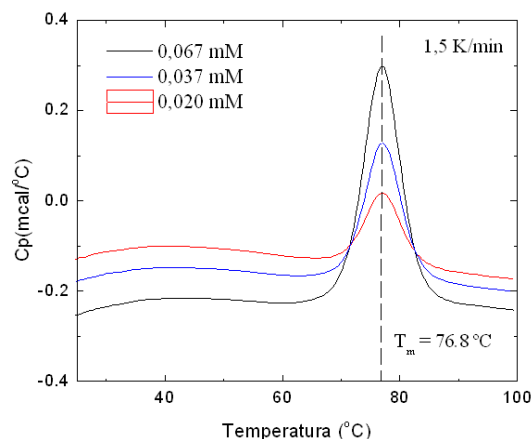


Figura 34. Diferentes barridos de diferentes concentraciones de lisozima en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.

Este resultado (igual T_m) es una de las características que debe cumplirse para que el desplegamiento de la proteína sea de dos estados (Ibarra-Molero et al., 2016). Por tanto, los cambios en concentración de lisozima no son relevantes en el proceso de desplegamiento térmico de lisozima en estas condiciones experimentales.

Una vez realizadas estas experiencias, extraemos la proteína de la célula de muestra (tras un prelavado de la célula con agua MilliQ) y se introduce otra muestra de lisozima (0,012 mM) y se realizaron dos barridos consecutivos para examinar la reversibilidad del proceso de desplegamiento. Se utilizó igualmente una velocidad de barrido de 1,5 °C/min. Finalizada la traza (desde 15 °C hasta 90 °C), se dejó enfriar la muestra dentro del calorímetro hasta 15 °C y, sin extraer la proteína de la célula, se inició un segundo barrido “reheating”, también hasta 90 °C (Figura 35)

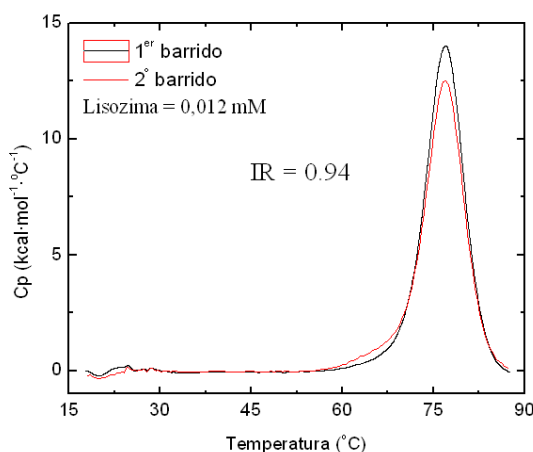


Figura 35. Cálculo del índice de reversibilidad.

Corregidas ambas trazas, con la línea base instrumental y normalizadas a la concentración de lisozima utilizada (0,012 mM, 0,17 mg/mL), se observa que en el segundo barrido aparece de nuevo una endoterma con igual T_m (Figura 35), lo que nos indica la reversibilidad del proceso de desplegamiento térmico. Del área bajo ambos

picos (segundo/primer barrido) se deduce un índice de reversibilidad (IR) del 94 %. Se ha establecido (Blumleim y McManus, 2013) que, cuando IR está por encima del 85% puede aceptarse que el proceso es reversible, y, en consecuencia, los posibles efectos cinéticos derivados del proceso de desplegamiento pueden despreciarse. Esto nos permite asegurar que el proceso de desplegamiento térmico de lisozima es reversible, es decir, cuando, por efecto de la temperatura, la proteína despliega (a T_m), y posteriormente se enfría, ésta recupera nuevamente la estructura terciaria o plegada (nativa).

Otra prueba que debe hacerse para verificar definitivamente que el proceso de desplegamiento térmico obedece a un mecanismo de dos estados reversible es examinar si T_m es dependiente de la velocidad de barrido. Frecuentemente, como se indicó (apartado 5.6 de Métodos) si el proceso de desplegamiento está controlado termodinámicamente, el valor de T_m debe ser independiente de la velocidad de barrido. Para ello, se preparó y equilibró el calorímetro para registrar una traza del desplegamiento de lisozima, en este caso a 0,035 mM (0,5 mg/mL) y 60 °C/h (1 °C/min) en lugar de 90 °C/h (1,5 °C/min) como anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 36.

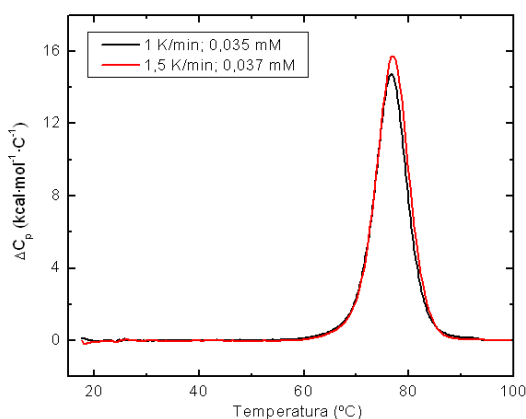


Figura 36. Desplegamiento de lisozima a diferente velocidad de barrido.

Al variar la velocidad de barrido, prácticamente no varía T_m , pues las pequeñas diferencias observadas están dentro del error experimental. Con todos estos resultados, se concluye que el proceso de desplegamiento térmico de lisozima (analizado por DSC) en las condiciones experimentales ensayadas (acetato sódico 50 mM, pH 5) es de dos estados y reversible.

6.6.3. Corrección instrumental de la línea de base de la traza calorimétrica

A continuación, procederemos a describir el procedimiento seguido para el análisis de una traza de DSC y deducir todos los parámetros termodinámicos del proceso, en este caso, reversible de dos estados. Para ello, utilizaremos la traza obtenida por DSC de lisozima a 1,5 °C/min a concentración 0,0676 mM.

Obtenida la traza calorimétrica con la proteína (endoterma), se realiza en primer lugar, una substracción de esta traza con la traza obtenida con tampón acetato sódico (traza de referencia) en ambas células (denominada corrección de línea base instrumental). Esto consiste en restar de la traza de lisozima, la traza de tampón. Realizada la

corrección instrumental, se normaliza la endoterma neta resultante con la concentración de lisozima utilizada (ambos procedimientos se realizan en el software del instrumento). De esta forma los datos de C_p obtenidos en $\text{mcal}/^\circ\text{C}$ (ver Figura 37) quedarán expresados por mol de proteína ($\text{kcal}\cdot^\circ\text{C}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$). La traza en este momento tiene la forma de la Figura 37. Siguiendo el protocolo explicado en el apartado de Métodos 5.6, las ecuaciones 32 y 33, y los datos de la traza corregida y el software *Micromath Scientist* (Salt Lake City, USA) se obtienen como parámetros ajustables, ΔH_D , T_m , A, B, ΔC_p .

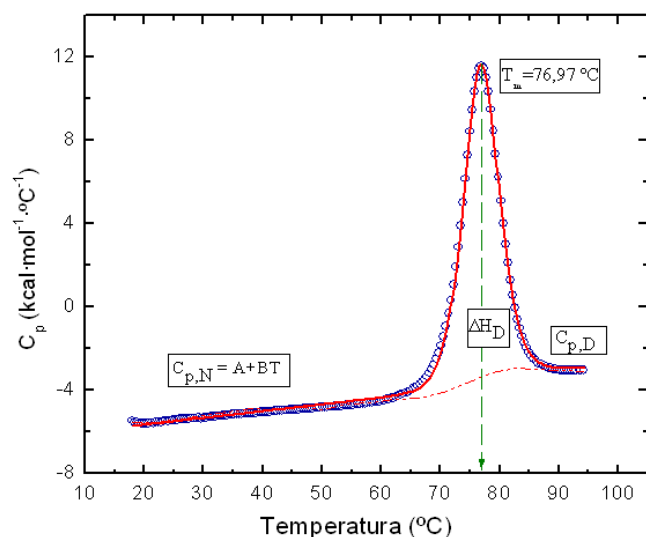


Figura 37. Termograma calorimétrico de lisozima (0,0676 mM), tras la corrección de la línea base instrumental. La línea continua representa el ajuste a los datos de la traza y que proporciona los parámetros citados en el texto.

Se obtuvieron los siguientes valores de $A = 15,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$; $B = 0,03 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$; $T_m = 76,97 \pm 0,01 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_D = 122,5 \pm 0,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $\Delta C_p = 0,34 \pm 0,04 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$.

6.6.4. Corrección de la línea de base química (“spline”)

Aunque ya todos los parámetros los hemos deducido del análisis no lineal anterior, suele ser habitual realizar la corrección de línea de base química a la endoterma. Esta corrección consiste en eliminar en la ecuación de $C_{p,exc}$, el término correspondiente al cambio de capacidad calorífica (ΔC_p) entre el estado desplegado ($C_{p,D}$) y el estado nativo ($C_{p,N}$) (término 2 en la ecuación 43). De esta forma la ecuación

$$C_{P,exc} = \underbrace{\frac{K_D}{(1 + K_D)^2} \frac{\Delta H_D^2}{RT^2}}_1 + \underbrace{\Delta C_p \frac{K_D}{1 + K_D}}_2 \quad (43)$$

se reduce a:

$$\Delta C_{P,exc} = \frac{K_D}{(1 + K_D)^2} \frac{\Delta H_D^2}{RT^2} \quad (44)$$

Para realizar esta corrección, existen varias alternativas (Cooper, 2000; Cooper et col. 2000), aunque la más utilizada está basada en el procedimiento de Takahashi y Sturtevant (1981), también denominada corrección “spline” y que consiste en aplicar una línea suavizada “*spline*” entre la pretransición y postransición (línea de trazos de color rojo en la Figura 37). Del ajuste de la traza experimental a la ecuación 44, se podrá deducir la capacidad calorífica de la transición (endoterma), sin ninguna contribución adicional, es decir, ya no tendremos la capacidad calorífica del estado nativo ni del desplegado, solamente tendremos el término de capacidad calorífica en el estado de transición (el paso de moléculas de proteína desde el estado nativo a desnaturalizado) (Figura 38).

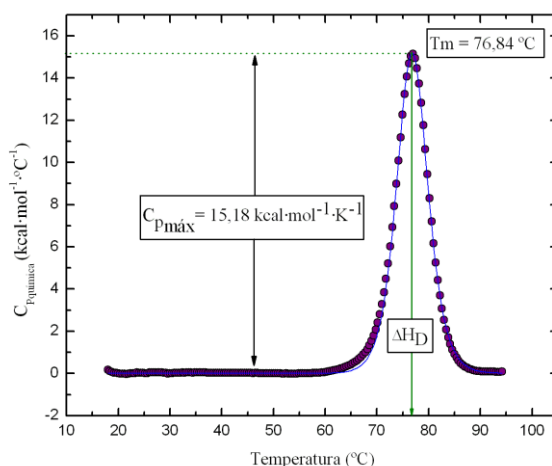


Figura 38. Traza experimental tras la corrección de línea de base instrumental y química.

El ajuste de mínimos cuadrados no lineales, utilizando la ecuación 44 y la ecuación de van't Hoff con $\Delta H_{vh} = \Delta H_D$, nos proporciona los siguientes parámetros: $\Delta H_D = 122 \pm 0,211 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (que coincide con el área bajo la curva) y $T_m = 76,97 \pm 0,012 \text{ }^\circ\text{C}$. También de esta gráfica puede obtenerse el valor del cambio de capacidad calorífica en el máximo, $C_{p,m} = 15,18 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$.

6.6.5. Poblaciones X_N (proteína en estado nativo) y X_D (proteína desnaturalizada)

Tras realizar la integración del área bajo la curva de la Figura 38 y normalización, pueden determinarse los valores de X_D a cada temperatura, así como los valores de X_N ($X_N = 1 - X_D$). En la figura 39, se muestra la variación de las poblaciones X_N y X_D en función de la temperatura, gráfica que es muy similar a la deducida de fluorescencia y que realmente debería coincidir, dentro del error experimental. Según la figura 39, al igual que ocurría en fluorescencia (apartado 6.5), el punto donde convergen las dos sigmoides (punto de inflexión), será la temperatura del barrido en la que se alcanza T_m (máximo del pico de capacidad calorífica), y que corresponderá al valor de temperatura en el que las moléculas de los estados nativo y desplegado se encuentran en la misma proporción (50 %) y donde $K_D = 1$ y $\Delta G = 0$.

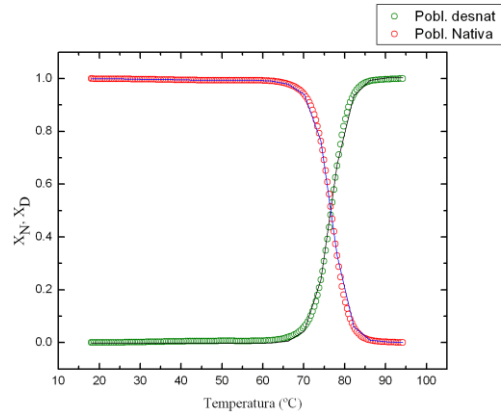


Figura 39. Poblaciones del estado nativo (X_N) y del estado desnaturado (X_D) en función de la temperatura. Las líneas continuas representan un ajuste sigmoidal genérico.

Como ya se ha demostrado, la lisozima se comporta como una proteína en la que únicamente dos estados están poblados significativamente, nativo (N) y desnaturado (D), y sus cantidades relativas según la temperatura están determinadas por el valor de la constante de equilibrio K_D . En la Figura 39 se observa que al aumentar la temperatura es mayor la fracción de proteína desplegada (X_D) y que este aumento va ligado a una progresiva disminución de la fracción de proteína en estado nativo (X_N). Por tanto, el valor de K_D , va aumentando con la temperatura y de cuya dependencia usando la ecuación de van't Hoff podría obtenerse el cambio de entalpía, en este caso denotada como “entalpía de van't Hoff”, para diferenciarla del cambio de entalpía calorimétrica, ΔH_D .

$$\ln K_D = \frac{-\Delta H_{vh}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) = \frac{-\Delta H_{vh}}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (45)$$

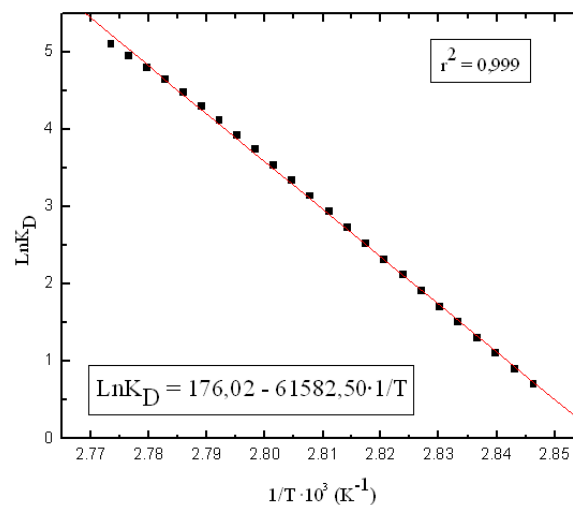


Figura 40. Determinación del cambio de entalpía de van't Hoff.

De la de Figura 40, se deduce un buena linealidad (coeficiente de correlación es ~ 1) y la entalpía de van't Hoff ($\Delta H_{vh} = 121933,4 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1} \cong 122 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), obtenida de la pendiente, con $R = 1,98 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. El valor de la ordenada en el origen se podría utilizar para determinar el cambio de entropía a la temperatura de desnaturalización (T_m). Igualmente, como sabemos que a T_m , $\Delta G(T_m) = 0$, y como $\Delta G = \Delta H - T\cdot\Delta S$, $\Delta S(T_m) = 348,5 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$.

También, puede obtenerse ΔH_{vh} por otro procedimiento (apartado 5.6 de Métodos), basado en la ecuación (36):

$$\Delta C_{p,exc} = \frac{K_D}{(1 + K_D)^2} \frac{\Delta H_{vh} \Delta H_D}{RT^2} \quad (46)$$

con $K_D = 1$, $T_m = 350,1 \text{ K}$ y $\Delta C_{p,exc} = C_{p,max} = 15,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ y distinguiendo entre ΔH_{vh} y ΔH_D . Ya que $\Delta H_D = 122,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, despejando, ΔH_{vh} como,

$$\Delta H_{vh} = 4RT_m^2 \frac{\Delta C_{p,exc(max)}}{\Delta H_D} \quad (47)$$

se deduce $\Delta H_{vh} = 120,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabla 8. Relación de la entalpía calorimétrica con las entalpías de van't Hoff

ΔH_D (kcal·mol ⁻¹)	^a ΔH_{vh} (kcal·mol ⁻¹)	^b ΔH_{vh} (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta H_D / ^a\Delta H_{vh}$	$\Delta H_D / ^b\Delta H_{vh}$
122,5	121,9	120,3	0,99	0,98

^aDeterminada de la Figura 40 (gráfico de van't Hoff). ^b Ecuación 47

A la vista de los resultados, cualquiera de los dos procedimientos aplicados para obtener la entalpía de van't Hoff es válido, obteniéndose en ambos casos una relación $\Delta H_D / \Delta H_{vh} \sim 1$. Esto es concluyente para afirmar y asegurar que el desplegamiento térmico de lisozima en estas condiciones es de dos estados y además como también hemos demostrado reversible. No habrá intermedios estables, diferentes de N y D, en el proceso de desplegamiento inducido por temperatura en lisozima de clara de huevo en las condiciones experimentales ensayadas.

En la Tabla 9 se muestra de forma resumida los parámetros termodinámicos deducidos mediante todos los procedimientos aplicados para lisozima en tampón acetato sódico 50 mM pH 5, tanto por fluorescencia como por DSC.

Tabla 9. Resumen de parámetros termodinámicos para el desplegamiento térmico de lisozima en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.

Parámetro	DSC	Fluorescencia
T_m	350 K, 76,8 °C	347,28 K, 74,13 °C
ΔH_D (kcal·mol ⁻¹)	122,2	nd*
ΔH_{vh} (kcal·mol ⁻¹)	121,9	~71
ΔC_p (cal·mol ⁻¹ ·°K ⁻¹)	340	nd*
$C_{p,max}$ (kcal·mol ⁻¹ ·°K ⁻¹)	15,2	nd*
$\Delta S(T_m)$ (cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	348,5	204,5

*nd: No determinado

Analizando conjuntamente los parámetros termodinámicos obtenidos, para el desplegamiento térmico de lisozima (fluorescencia y DSC), se observan ciertas diferencias. Estas diferencias pueden ser atribuidas principalmente a que los estudios de fluorescencia hacen uso de una medida indirecta (fluorescencia) para determinar parámetros termodinámicos, concretamente el cambio de entalpía y de entropía. Parámetros que evidentemente son más fiables de medidas directas en un calorímetro. Evidentemente, en ausencia de un instrumento de DSC, la fluorescencia suele ser usada para estudios de desplegamiento de este tipo, pero, en cualquier caso, los valores de los parámetros obtenidos deben tomarse como estimación y siempre, si se quieren determinar con exactitud es necesario recurrir a una determinación directa mediante calorimetría diferencial de barrido. DSC también nos proporciona valores de otros parámetros como el cambio de capacidad calorífica, ΔC_p , del paso del estado nativo al desplegado, que de la fluorescencia difícilmente podría determinarse con fiabilidad. Valores positivos de $\Delta C_p > 0$, similares al obtenido en este estudio, son frecuentes en el desplegamiento de proteínas y suele correlacionarse con la exposición de grupos hidrofóbicos al disolvente como consecuencia del desplegamiento, y que en el estado plegado se encontraban encerrados dentro de la estructura plegada de la proteína (Gómez-Moreno y Sancho, 2003). Los valores de los parámetros obtenidos para lisozima por DSC son similares a los deducidos en bibliografía en condiciones experimentales semejantes (Schwarz et al., 1989; Cooper, 2000; Cooper et al., 2000; Blumlein y McManus, 2013; Seelig y Schönfeld, 2016; Magsumov et al., 2019).

En cualquier caso, los valores de T_m son similares por ambas técnicas. En ambos casos, se observa el proceso de desplegamiento es endotérmico $\Delta H > 0$, es decir, se necesita aportar energía para que la proteína pase de un estado plegado estable a un estado desplegado inestable (Gómez-Moreno y Sancho, 2003). El proceso está también favorecido entrópicamente, $\Delta S > 0$, debido evidentemente a que el paso del estado desplegado (ordenado) al desplegado supone un aumento del desorden de la cadena polipeptídica (Gómez-Moreno y Sancho, 2003).

7. CONCLUSIONES

Se han utilizado distintos procedimientos de uso común en estudios de caracterización molecular con proteínas y en concreto se han aplicado a la proteína monomérica lisozima de clara de huevo.

1. Se ha determinado la concentración de proteína mediante ensayos colorimétricos, tales como el ensayo de Bradford. Estos ensayos, aunque se utilizan preferentemente para determinaciones estimativas de la concentración de proteínas totales en etapas de purificación, también pueden aplicarse a proteínas puras cuando el coeficiente de extinción es desconocido.
2. Se ha aplicado un procedimiento experimental para la determinación del coeficiente de extinción de la proteína en nuestras condiciones experimentales (tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5).
3. Hemos realizado la determinación teórica del coeficiente de extinción de la proteína a partir de ecuaciones dadas en bibliografía o herramientas de internet (online), comparando el resultado con el deducido experimentalmente.
4. Se ha determinado la concentración de proteína mediante UV-vis, usando el coeficiente de extinción molar experimental obtenido.

5. La actividad de lisozima, mediante el seguimiento por UV-vis de la lisis de membranas bacterianas ha permitido conocer si la proteína utilizada estaba en condiciones óptimas.
6. El estudio de la estabilidad térmica, mediante espectroscopía de fluorescencia, proporciona un valor de la temperatura de desplegamiento térmico de 74,13 °C así como los valores del cambio de entalpía y entropía del proceso.
7. Se ha seguido también la estabilidad térmica de la proteína mediante calorimetría diferencial de barrido, obteniéndose que únicamente dos estados, el nativo y desnaturalizado están lo suficientemente poblados y en equilibrio, lo que prueba la reversibilidad del proceso. Este estudio ha permitido la determinación de todos los parámetros termodinámicos característicos de esta transición, en las condiciones experimentales ensayadas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Blumlein, A., McManus, J.J. Reversible and non-reversible thermal denaturation of lysozyme with varying pH at low ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1834: 2064–2070.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72: 248-254
- Chantal, A., Mochois, V., Byrne, D., Chenivresse, S., Lembo, F., Lazanori, J., y Claverie, J.M. Structure and evolution of the Ivy protein family, unexpected lysozyme inhibitors in Gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2007**, 104: 6394-6399.
- Cooper, A. Microcalorimetry of protein-DNA interactions in A. Travers and M. Buckle (Eds.), *DNA-Protein Interactions*. Oxford University Press, Oxford, **2000**; pp 125-139.
- Cooper, A., Nutley, M.A., Wadood, A. Differential scanning microcalorimetry in S. E. Harding and B. Z. Chowdhry (Eds.), *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry*. Oxford University Press, Oxford New York, **2000**; pp 287-318.
- Gómez-Moreno, C. y Sancho, J. Estructura de proteínas (coord.), **2003**, ed. Ariel. ISBN 84-344-8061-1
- Grossowicz, N., Ariel M. y Weber, T. Improved Lysozyme Assay in Biological Fluids. *Clin. Chem.* **1979**, 25: 484-485.
- Ibarra-Molero, B., Naganathan, A.N., Sánchez-Ruíz, J.M., Muñoz, V. Modern Analysis of Protein Folding by Differential Scanning Calorimetry. *Methods Enzymol.* **2006**, 567: 281-318.
- Ibrahim, H.R., Matsuzaki, T. y Aoki, T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett.* **2001**, 506: 27-32.
- Jolles, P., y Jolles, J. What's new lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.* **1984**, 63: 165-189.
- Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, **2006**, 3rd edition, Springer: ISBN-10: 0-387-31278-1.
- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Sun, Y., Huang, P.L., Kung, H.F., Blithe, D.L and Chen, H.C (1999): Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beca-core preparations of human chronic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, 96: 2678-2681.
- Lesnierowski, G., y Kijowski, J. Bioactive Compounds (edited by R. Huopalathi, R. López-Fandiño, M. Amton y R. Schade. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, **2007**: pp 33-42.
- Liu, H., Zheng, F., Cao, Q, Ren, B., Zhu, L., Striker, G y Vlassara, H. Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, 290: E824.
- Magsumov, T., Fatkhutdinova, A., Mukhametzyanov, T., Sedov, I. The effect of dimethyl sulfoxide on the lysozyme unfolding kinetics, Thermodynamics, and Mechanism. *Biomolecules.* **2009**, 9: 547-553; doi:10.3390/biom9100547.
- Mega, T. y Hase, S. Conversion of egg-white lysozyme to lectin like protein with agglutinating activity analogous to wheat germ agglutinin. *Biophysic.* **1994**, 64: 1488-1490.
- Mine, Y., Ma, F.P. y Lauriau, S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg White lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 58: 1088-1094.

- Niyonsaba, F., y Ogawa, H. Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *J. Dermatol. Sci.* **2005**, 40: 157-168.
- Pace, C.N. y Scholtz, J.M. Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E., ed.). IRL Press, Oxford, **1996**; pp. 299-321.
- Quesada-Soriano, I., García-Maroto, F., García-Fuentes, L. Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase. *Biochem. Biophys. Acta* **2006**, 1764: 979-984.
- Samaranayake, Y.H., Cheung, B.P.K., Parahitiyama, N., Senevitatne, C.J., Yau, J.Y.Y., Young, K.W.S., y Samaranayake, L.P. Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms of denture acrylic surfaces. *Arch. Oral Biol.* **2009**, 54: 115-126.
- Sánchez-Ruíz J.M. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys J.* **1992**, 61: 921-935.
- Sava, G. Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes. *EXS.* **1996**, 75: 433-339.
- Schwarz, F.P. Biological thermodynamic data for the calibration of differential scanning calorimeters: Heat capacity data on the unfolding transition of lysozyme in solution. *Thermochimica Acta*, **1989**, 147: 71-91.
- Seelig, J., Schönfeld, H.J. Thermal protein unfolding by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy: Two-state model *versus* sequential unfolding. *Q. Rev. Biophys.* **2016**, 49, e9. DOI: 10.1017/S0033583516000044.
- Skoog, D. A., Holler, F.J., y Crouch, S.R. *Principios de análisis instrumental.* **2008**. ISBN-13: 978-607-481-390-6.
- Sheehan, D. *Physical Chemistry: Principles and Applications*, **2009** (2nd ed.) Wiley y Sons, UK, ISBN: 9780470856024.
- Shugar, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys.* **1952**, 8: 302-309.
- Stoscheck, C. Increased uniformity in the response of the Comassie blue protein assay to different proteins. *Anal. Biochem.* **1990**, 184: 111-116.
- Takahashi, K. y Sturtevant, M. Thermal denaturation of *Streptomyces subtilisin* inhibitor, subtilisin BPN', and the inhibitor-subtilisin complex. *Biochemistry* **1981**, 20: 6185-6190.
- Tenovuo, J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: Efficacy and safety. *Oral Dis.* **2002**, 82: 23-39.
- Visser, A.J.W, y Rolinski, O.J. *Basic Photophysics*, on Photobiological Sciences Online (KC Smith, ed.). American Society for Photobiology, **2010**, (6^a edition). <http://www.photobiology.info/>.
- You, S.J, Udeniwe, C.C., Aluko, R. E., y Wu, J. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Res. Ent.* **2010**, 43: 848-855.