

3/107

~~Pr. I~~
~~22/84~~

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 23-6-98.....
ENTRADA NUM. 2161.....

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

**LA ENERGÉTICA DE LA DESNATURALIZACIÓN DE
PROTEÍNAS INDUCIDA POR GUANIDINA Y UREA:
RELACIÓN CON LAS CONTRIBUCIONES
ELECTROSTÁTICAS A LA ESTABILIDAD**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613379756
N.º Copia i.15449245

Beatriz Ibarra Molero

TESIS DOCTORAL

GRANADA

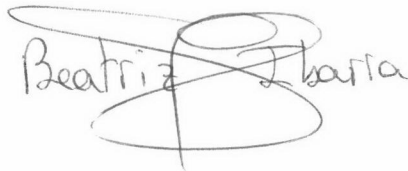
1998

UNIVERSIDAD DE GRANADA
15 JUN. 1998
COMISION DE GRADO

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias
Departamento de Química Física

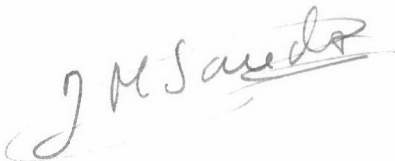
Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas



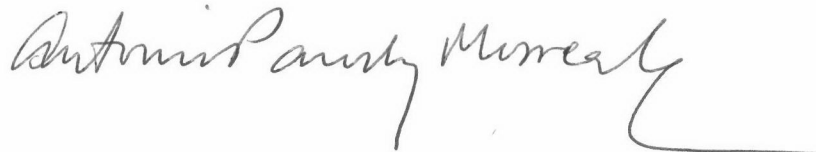
Firmado: Beatriz Ibarra Molero
Licenciada en Ciencias Químicas

Visado en Granada, a 13 de Junio de 1998

Los directores de la Tesis



Firmado:
José Manuel Sánchez Ruiz
Catedrático de Química Física
de la Universidad de Granada



Firmado:
Antonio Parody Morreale
Profesor Titular de Química Física
de la Universidad de Granada

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 MATERIALES	
2.1.1 PRODUCTOS.....	15
2.1.2 INSTRUMENTACIÓN.....	16
2.2 MÉTODOS	
2.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	
2.2.1.1 <u>Preparación de tampones y diálisis</u>	18
2.2.1.2 <u>Preparación de disoluciones concentradas de desnaturizante</u>	22
2.2.1.2a La medida del pH en mezclas agua-codisolvente.....	3
2.2.1.2b Disoluciones concentradas de guanidina.....	27
2.2.1.2c Disoluciones concentradas de urea.....	28
2.2.2 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	
2.2.2.1 <u>Introducción</u>	29
2.2.2.2 <u>Instrumentación</u>	30
2.2.2.3 <u>Experimento calorimétrico</u>	
A) Preparación de la experiencia.....	38
B) La línea base Instrumental.....	39
C) Calibrado.....	41
D) Barrido de la muestra.....	42
E) Segundo barrido de la muestra.....	43
2.2.2.4 <u>Análisis preliminar de las trazas de DSC</u>	44
2.2.2.5 <u>Análisis de los datos de DSC según la termodinámica de equilibrio</u>	48
2.2.2.5.1 El modelo de equilibrio de dos estados.....	49
2.2.2.5.2 Modelo de equilibrio multiestado.....	55
2.2.3 FLUORESCENCIA	
2.2.3.1 <u>Generalidades</u>	58
2.2.3.2 <u>Ensayos cinéticos de desplegamiento</u>	62
2.2.3.3 <u>Ensayos cinéticos de replegamiento</u>	67

3. ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO DE LISOZIMA INDUCIDO POR GUANIDINA.....	71
3.1 ESTUDIO MEDIANTE MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDO POR GUANIDINA	
3.1.1 <u>Procedimiento experimental</u>	72
3.1.2 <u>Análisis según el modelo de desnaturalización de dos estados</u>	75
3.2 ESTUDIO MEDIANTE ENSAYOS DE DESPLEGAMIENTO DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR GUANIDINA	
3.2.1 <u>Procedimiento experimental y Análisis de los perfiles cinéticos</u>	87
3.2.2 <u>Análisis de los perfiles de ΔI versus C según el modelo de dos estados</u>	89
3.3 ESTUDIO MEDIANTE MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DE LAS CINÉTICAS DE REPLEGAMIENTO-DESPLEGAMIENTO INDUCIDAS POR SALTOS EN CONCENTRACIÓN DE GUANIDINA	
3.3.1 <u>Procedimiento experimental y Análisis de los perfiles cinéticos</u>	97
3.3.2 <u>Análisis según el modelo cinético de dos estados</u>	98
3.4 ESTUDIO DE LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE LISOZIMA EN PRESENCIA DE GUANIDINA	
3.4.1 <u>Condiciones experimentales y Análisis de las trazas según el modelo de dos estados</u>	110
3.4.2 <u>Curva de estabilidad de lisozima en 0 M guanidina</u>	115
3.4.3 <u>Cálculo de los valores de $m_{1/2}$ de desnaturalización a partir de datos de DSC</u>	119
3.5 COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE ΔG DE DESNATURALIZACIÓN OBTENIDOS POR EXTRAPOLACIÓN LINEAL Y LA CURVA DE ESTABILIDAD CALCULADA A PARTIR DE EXPERIMENTOS DE DSC.....	122
3.6 CAMBIO DEL VALOR DE $m_{1/2}$ PARA LA DESNATURALIZACIÓN DE LISOZIMA A LO LARGO DE LA LÍNEA DE EQUILIBRIO C-T.....	130
3.7 PROCEDIMIENTO DE EXTRAPOLACIÓN A ΔG CONSTANTE.....	132
3.7.1 <u>Aplicación del procedimiento de extrapolación a ΔG constante a la desnaturalización de barnasa inducida por urea</u>	139
3.7.2 <u>Aplicación del procedimiento de extrapolación a ΔG constante a la proteína transportadora de fósforo que contiene histidina (Hpr)</u>	143
3.7.3 <u>Aplicación del procedimiento de extrapolación a ΔG constante a la desnaturalización de lisozima inducida con guanidina</u>	147

3.8 CONTRIBUCIÓN ELECTROSTÁTICA A LA ESTABILIDAD DE LISOZIMA Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES DE ΔG DE DESNATURALIZACIÓN DETERMINADOS A PARTIR DE DATOS DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR GUANIDINA.....150

3.9 EL ESTADO DE TRANSICIÓN DE LISOZIMA EN EL DESPLEGAMIENTO A ALTA CONCENTRACIÓN DE GUANIDINA.....157

4. ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO INDUCIDO POR GUANIDINA DE UBIQUITINA.....163

4.1 ESTUDIO MEDIANTE MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDO POR GUANIDINA.....164

4.1.1 Fluorescencia de los estados nativo y desplegado.....166

4.1.2 Determinación del pK del grupo/s carboxilato atenuantes/s de la fluorescencia.....167

4.1.3 Perfiles de intensidad de fluorescencia versus concentración de guanidina: Análisis según el modelo de dos estados.....172

4.2 ESTUDIO MEDIANTE MEDIDAS DE DICROÍSMO CIRCULAR DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDO POR GUANIDINA.....178

4.2.1 Procedimiento experimental.....179

4.2.2 Análisis según el modelo de dos estados.....181

4.3 ESTUDIO DE LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE UBIQUITINA EN PRESENCIA DE GUANIDINA.....186

4.3.1 Análisis de las trazas según el modelo de equilibrio de dos estados: desnaturalización caliente y fría.....187

4.3.2 Efecto de la guanidina sobre los valores del cambio de entalpía y de capacidad calorífica de desnaturalización. Cálculo de curvas de estabilidad a diferentes concentraciones de desnaturalizante.....202

4.3.3 Dependencia de $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ con la concentración de guanidina. Cálculo $dem_{1/2}$212

4.4 COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE ΔG DE DESNATURALIZACIÓN POR GUANIDINA OBTENIDOS POR EXTRAPOLACIÓN LINEAL Y EXPERIMENTOS DE DSC A DIFERENTES pHs.....214

4.5 CÁLCULO TEÓRICO DE LA CONTRIBUCIÓN ELECTROSTÁTICA A LA ESTABILIDAD DE UBIQUITINA.....	223
4.5.1 <u>Simulación del efecto del pH en proteínas</u>	224
4.5.2 <u>Comparación de los valores teóricos y experimentales de la contribución electrostática a la estabilidad de ubiquitina</u>	228
4.5.3 <u>Comparación de los valores experimentales y teóricos de Δv debido al desplegamiento</u>	233
4.5.4 <u>pK de la Histidina 68</u>	236
5. ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO INDUCIDO POR UREA DE LISOZIMA.....	241
5.1 EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR UREA ESTUDIADO MEDIANTE ENSAYOS DE DESPLEGAMIENTO	
5.1.1 <u>Procedimiento experimental y Análisis global de los perfiles cinéticos</u>	242
5.1.2 <u>Análisis del perfil ΔI versus C según el modelo de dos estados</u>	245
5.2 EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR UREA ESTUDIADO MEDIANTE ENSAYOS DE DESPLEGAMIENTO	
5.2.1 <u>Procedimiento experimental y Análisis global de los perfiles cinéticos</u>	249
5.2.2 <u>Análisis del perfil ΔI versus C según el modelo de dos estados</u>	252
5.3 CINÉTICAS DE PLEGAMIENTO-DESPLEGAMIENTO INDUCIDAS POR SALTOS EN LA CONCENTRACIÓN DE UREA	
5.3.1 <u>Procedimiento experimental y Análisis global de los perfiles cinéticos</u>	253
5.3.2 <u>Análisis según el modelo de dos estados</u>	263
5.4 ESTUDIO POR FLUORESCENCIA DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN DE LISOZIMA INDUCIDO POR UREA.....	264
5.5 DESPLEGAMIENTO DE LISOZIMA INDUCIDO POR pH EN PRESENCIA DE 5.6M UREA	
5.5.1 <u>Procedimiento experimental</u>	270
5.5.2 <u>Análisis según el modelo de dos estados</u>	270
5.6 ¿HAY ESTADOS INTERMEDIOS DE EQUILIBRIO SIGNIFICATIVAMENTE POBLADOS EN EL DESPEGAMIENTO DE LISOZIMA INDUCIDO POR UREA?.....	276

5.7 REINTERPRETACIÓN DE LOS DATOS DE DISPERSIÓN DE RAYOS X DE
BAJO ÁNGULO.....279

6. BIBLIOGRAFÍA.....289



1. INTRODUCCIÓN

Una gran parte de lo que se conoce hasta el momento sobre el plegamiento de proteínas se centra en consideraciones termodinámicas y estructurales sobre la estabilidad de las mismas. Si hablamos de estabilidad, el parámetro que generalmente se usa como estimación de ésta es el cambio de energía de Gibbs de desplegamiento en solución acuosa (ΔG_w). Así por ejemplo, a partir del estudio de los efectos de mutaciones sobre ΔG es posible llegar a conocer contribuciones moleculares a la estabilidad de la proteína (Makhatadze y Privalov, 1995) e incluso proponer estructuras para intermedios y estados de transición (Fersht, 1995; Matthews y Fersht, 1995; Daggett et al., 1996). No obstante hay que tener presente que la interpretación de los valores de energía de Gibbs no es sencilla debido fundamentalmente a dos razones:

1. Por un lado, la interpretación a nivel molecular resulta complicada ya que el cambio de energía de Gibbs de desplegamiento en una proteína viene dado por un número relativamente pequeño, resultado de la cancelación de contribuciones moleculares mayoritarias tales como las que provienen del efecto hidrofóbico, puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals, entropía configuracional, etc. De este hecho se deducen dos consecuencias inmediatas:

- en general, valores pequeños de una magnitud van a ser difíciles de explicar molecularmente. Así ligeras variaciones en dichas contribuciones mayoritarias harán que la energía de Gibbs del sistema varíe significativamente.

- dado que ΔG es resultado de un balance, las contribuciones minoritarias a la estabilidad de la proteína, como por ejemplo la que procede de interacciones electrostáticas, son también importantes.

2. Los métodos habituales para determinar ΔG no parecen fiables. Así la polémica existente en la bibliografía en relación a este aspecto hace dudar sobre la validez de los valores de ΔG_w obtenidos, como veremos más adelante.

Estas ideas que acabamos de plantear y que justifican la dificultad de interpretar los datos de ΔG están íntimamente relacionadas entre sí. En nuestro trabajo trataremos ambos aspectos, comenzando en primer lugar por el problema metodológico en la determinación de la energía de Gibbs para después abordar el problema a nivel molecular.

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es la técnica que de manera más exacta y fiable proporciona una detallada caracterización energética del proceso de desnaturalización reversible de proteínas (Sturtevant, 1987; Privalov, 1989; Freire, 1995; Sanchez-Ruiz, 1995; Makhatadze y Privalov, 1995). No obstante, en la mayoría de los casos la energía de Gibbs de desnaturalización se determina a partir de estudios experimentales de desnaturalización inducida por desnaturalizantes como urea o guanidina. A continuación mencionamos algunas de las ventajas que han hecho popular este segundo enfoque:

(1) Se trata de experimentos rápidos y simples; además hay que tener en cuenta que muchos laboratorios no disponen de calorímetros diferenciales de barrido en el laboratorio, técnica que, por otro lado, requiere de cierta especialización.

(2) En estudios de desnaturalización térmica de proteínas es frecuente encontrar transiciones irreversibles que no es posible analizar sobre la base de la termodinámica de equilibrio (Sanchez-Ruiz, 1992, 1995). Sin embargo, algunos de los procesos responsables de dicha irreversibilidad, como la agregación, son menos probables en concentraciones desnaturalizantes de urea o guanidina.

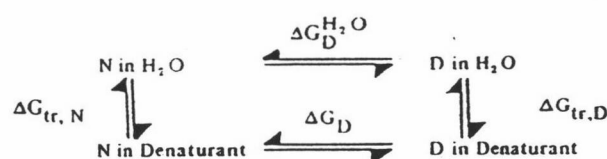
(3) Si se utiliza fluorescencia para la caracterización de los perfiles de desnaturalización inducida por codisolventes, la concentración de proteína está en el rango de micromolar lo cual es conveniente cuando se trabaja con muestras valiosas o cuando queremos evitar la agregación.

Por contra, el principal inconveniente que nos encontramos en los estudios de desnaturalización inducida por codisolventes reside en las *suposiciones extra-termodinámicas* que es necesario emplear en el análisis de los perfiles experimentales. Una de ellas viene de suponer un mecanismo de desnaturalización de dos estados; este punto será discutido de manera exhaustiva en la última parte de este trabajo (sección 5). El problema fundamental proviene, sin embargo, del hecho de que en este tipo de estudios vamos a obtener valores de ΔG a alta concentración de desnaturalizante (en el rango donde ocurre la transición) mientras que el parámetro que realmente nos interesa es ΔG_w , es decir, a concentración cero de desnaturalizante. Será necesario, por tanto, utilizar de nuevo algún tipo de suposición que permita su determinación a partir de los datos experimentales.

Los métodos que se han venido utilizando hasta el momento de manera más general para determinar valores de ΔG_w a partir de perfiles experimentales de desnaturalización inducida por codisolventes son básicamente tres:

1.- Modelo de Transferencia (Tanford, 1964 y 1970)

Está basado en las energías libres de transferencia para péptidos y aminoácidos desde agua a soluciones de urea o guanidina:



donde $\Delta G_{\text{tr},\text{N}}$ y $\Delta G_{\text{tr},\text{D}}$ representan los cambios de energía libre que acompañan la transferencia del estado nativo (N) y del estado reversiblemente desnaturalizado de la proteína (D),

respectivamente, de agua a disolución acuosa de desnaturizante. De este ciclo termodinámico se deduce que:

$$\Delta G - \Delta G_w = \Delta G_{tr,D} - \Delta G_{tr,N} \quad (1)$$

Obsérvese que el segundo miembro de esta expresión depende de los grupos expuestos al disolvente en el estado desplegado de manera que, simplificando, parece razonable escribir:

$$\Delta G = \Delta G_w + \Delta\alpha \sum_i n_i \cdot \delta g_{tr,i} \quad (2)$$

en donde $\Delta\alpha$ representa un valor medio del cambio en la accesibilidad al disolvente de todos los grupos en la proteína (Pace, 1986), $\delta g_{tr,i}$ la energía libre de transferencia de un grupo i de agua a desnaturizante y n_i el número total de grupos i en la proteína.

2.- Modelo de unión de desnaturizante (Aune y Tanford, 1969)

Supone que existe un número discreto de sitios de unión en la proteína para el desnaturizante, de manera que el proceso de desplegamiento que tiene lugar cuando aumenta la concentración de éste se debe a que se exponen más sitios de unión en la forma desplegada que en la nativa de la proteína. Si los sitios son iguales e independientes tenemos que:

$$\Delta G = \Delta G_w - \Delta n RT \ln(1 + Ka) \quad (3)$$

donde Δn es la diferencia en el número de sitios de unión entre D y N, K es la constante de equilibrio para la unión a cada sitio y a es la actividad del desnaturizante. Dado que el perfil experimental se describe adecuadamente mediante dos parámetros y en este método son tres (ΔG_w , Δn y K) los parámetros ajustables, se fija K en un valor razonable y se determinan los otros

dos. Es por esto que los valores calculados para ΔG_w y Δn son sensibles al valor supuesto para la constante de equilibrio (Pace, 1986); además la elección de las apropiadas constantes de unión para urea y guanidina no está clara (Pace, 1986; Makhatadze y Privalov, 1992; Scholtz et al., 1995) ya que las constantes de unión para la desnaturalización de proteínas y hélices peptídicas y las que se derivan de estudios de interacción de desnaturalizantes con compuestos modelo no están en total acuerdo.

3.- Método de Extrapolación Lineal (LEM)

Está basado en la observación empírica de la dependencia lineal de los valores de ΔG obtenidos en función de la concentración de desnaturalizante, en la zona donde tiene lugar la transición. Es el método más extendido debido precisamente a que de una manera simple (sin necesidad de parámetros adicionales que deban “suponerse” y añadirían incertidumbre al valor de ΔG_w obtenido) se estima el parámetro ΔG_w suponiendo que esta dependencia lineal se mantiene hasta 0 M desnaturalizante.

A continuación vamos a tratar algunos aspectos teóricos que aclararán el procedimiento:

A temperatura constante, el efecto de la concentración de desnaturalizante (C) sobre la energía de Gibbs de desnaturalización se puede expresar como un desarrollo de Taylor en torno a la concentración ($C_{1/2}$) a la que $\Delta G=0$:

$$\Delta G = \left(\frac{\partial \Delta G}{\partial C} \right)_{C_{1/2}} \times (C - C_{1/2}) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial C^2} \right)_{C_{1/2}} \times (C - C_{1/2})^2 + \dots \quad (4)$$

en donde todas las derivadas se evalúan en $C_{1/2}$. De los perfiles experimentales sólo es posible obtener valores de ΔG en un rango estrecho de concentración en torno a $C_{1/2}$, debido al carácter

cooperativo del desplegamiento; como resultado, dichos valores no contienen información sobre términos de orden superior en la ecuación (4), y dentro de este rango estrecho pueden ser descritos adecuadamente por la forma truncada en el término lineal del desarrollo de Taylor:

$$\Delta G \cong -m_{1/2} \cdot (C - C_{1/2}) \quad (5)$$

donde $m_{1/2}$ viene dado por (Green y Pace, 1974):

$$m_{1/2} = - \left(\frac{\partial \Delta G}{\partial C} \right)_{C_{1/2}} \quad (6)$$

En general el parámetro m es característico de cada proteína. Myers et al. (1995) han encontrado buenas correlaciones entre éste y el cambio de área superficial accesible al disolvente debido al desplegamiento, ΔASA , para diferentes proteínas.

Si sustituimos $C=0$ en la ecuación (5) se obtiene la estimación de ΔG_w mediante *extrapolación lineal*:

$$\Delta G_w = m_{1/2} \cdot C_{1/2} \quad (7)$$

y sustituyendo esta última expresión en (5) se obtiene:

$$\Delta G = \Delta G_w - m_{1/2} \cdot C \quad (8)$$

Resumiendo, la ecuación (4) (con infinitos términos en la expansión) es completamente general, pero carece de utilidad práctica. La ecuación (5) proporciona una descripción adecuada de ΔG en el estrecho rango en el que tiene lugar la transición. (7) y (8) pueden ser usadas para calcular valores de ΔG_w aunque, obviamente, suponiendo que la dependencia de ΔG con C es

lineal *fuera* de la zona de la transición, lo cual carece de cualquier fundamento termodinámico.

En la bibliografía es frecuente encontrar casos en los que la aplicación de los tres métodos que acabamos de describir a los mismos datos de desnaturalización inducida por codisolvente, conduce a valores diferentes de ΔG_w , como por ejemplo en Pace (1986). En general el modelo de unión de desnaturalizante predice una dependencia de ΔG con C aproximadamente lineal a alta concentración pero con desviaciones positivas de la linealidad en el rango de baja concentración (Pace, 1986).

En los últimos años y debido a la discrepancia de los resultados que se han ido obteniendo se ha empezado a cuestionar la validez de la aproximación lineal sin obtenerse conclusiones claras como veremos a continuación:

Desde un punto de vista teórico, los trabajos de Schellman (Schellman, 1978, 1987) y Dill (Alonso y Dill, 1991) proponen argumentos termodinámicos y resultados teóricos en favor de la linealidad, aunque también se pone de manifiesto una considerable ambigüedad a la hora de generalizar tal dependencia. Por ejemplo, Dill desarrolló una teoría basada en la termodinámica estadística para la predicción de los efectos de disolventes sobre la estabilidad de proteínas haciendo uso de datos de energía libre de transferencia (Alonso y Dill, 1991). El modelo predice que la dependencia de ΔG es lineal con la concentración de guanidina o urea en el rango accesible experimentalmente y que sólo en el caso de guanidina debería existir una pequeña curvatura hacia valores mayores de ΔG a baja concentración.

Desde el punto de vista experimental encontramos resultados diversos en la bibliografía como se detalla a continuación. En general se emplean diferentes estrategias para aumentar el

rango de concentración de desnaturalizante en el que se dispone de datos y poder juzgar la validez o no del LEM:

Así, Pace y Vanderburg (1979) estudiaron la desnaturalización inducida por guanidina de mioglobina de caballo a diferentes pHs. Después de corregir los valores observados de ΔG a un pH común, se observaba que la dependencia de éstos con la concentración experimentaba una desviación positiva de la linealidad a baja concentración (consistente con el modelo de unión de desnaturalizante).

Por su parte Santoro y Bolen (1992) estudiaron la dependencia de ΔG con la concentración de guanidina en tioredoxina, comparando medidas de desnaturalización térmica obtenidas mediante experimentos de DSC en presencia de guanidina con datos obtenidos a partir cambio de elipticidad *versus* guanidina. Los valores de ΔG derivados de DSC fueron corregidos a temperatura ambiente haciendo uso de la ecuación de Gibbs-Helmholtz y representados frente a la concentración de guanidina, junto con los que se derivan de la aplicación del LEM a los perfiles de desplegamiento inducido por guanidina. Estos autores encontraron una dependencia lineal hasta aproximadamente 1.5 M guanidina de manera que por debajo de esta concentración aparecían desviaciones negativas resultando un ΔG_w subestimado, si lo comparamos con el que se obtiene de LEM.

Una estrategia similar a la utilizada por Santoro y Bolen (1992) fue seguida por Johnson y Fersht (1995) en el estudio del desplegamiento inducido por urea de barnasa. Se encontró una desviación positiva de la linealidad, concretamente una diferencia de unos 6 kJ/mol si comparamos el valor de ΔG_w de experimentos de DSC y el obtenido mediante extrapolación lineal.

En los tres trabajos que acabamos de describir se observaron desviaciones de la linealidad. Por contra, en otros estudios sobre el tema que aparecen en la bibliografía se apoya la validez del LEM como veremos a continuación:

En el trabajo anteriormente citado de Santoro y Bolen (1992) en el que se observó una desviación negativa de la linealidad en tioredoxina, los autores señalan, no obstante, que manteniendo la concentración total de cloruros en 1.5 M o superior (con NaCl) la dependencia es lineal en todo el rango de concentración.

Otro ejemplo de validez de la aproximación lineal lo tenemos en el caso de la desnaturalización inducida por urea de ribonucleasa T1. Diferentes trabajos (Hu et al., 1992; Yu et al., 1994) señalan la buena concordancia existente entre los valores de ΔG_w obtenidos según LEM con aquellos que proceden de la desnaturalización térmica estudiada bajo diferentes condiciones experimentales.

Nicholson y Scholtz (1996) estudiaron la desnaturalización inducida por urea de la proteína transportadora de fósforo que contiene histidina (HPr) encontrando también una dependencia lineal de los valores de ΔG con C en todo el rango.

Otro enfoque experimental diferente para expandir el rango de concentración de desnaturalizante en el que se dispone de datos experimentales se recoge en el trabajo de Ahmad et al. (1994). Estos autores estudiaron el desplegamiento inducido por mezclas guanidina/urea en diferentes proteínas. Los datos corregidos según el efecto de la urea se describen aceptablemente mediante una dependencia lineal.

Myers et al. (1995) apoyan la validez de la aproximación lineal afirmando que no hay razones para usar métodos más complejos cuando éste parece ser el comportamiento general y

sólo en contadas ocasiones se han detectado desviaciones de la linealidad.

Además de los estudios que como vemos se han venido realizando para intentar aclarar la validez de la extrapolación lineal encontramos diversos trabajos en los que se plantea a su vez la validez termodinámica del valor de ΔG_w obtenido. Es decir, se cuestiona si éste es una propiedad exclusiva de la proteína o depende del procedimiento utilizado para inducir su desnaturalización:

El desplegamiento de fenilmetanosufonil-quimotripsina (PMS-Ct) inducido mediante tres desnaturalizantes diferentes (guanidina, urea y 1,3-dimetilurea) fue estudiado por Santoro y Bolen (1988) siguiendo cambios en la absorbancia a 293 nm. Estos autores encontraron que los valores de ΔG_w calculados para los tres desnaturalizantes aplicando LEM coincidían en un mismo valor sugiriendo que el cambio de energía de Gibbs es una propiedad del sistema, independiente del desnaturalizante utilizado. La misma independencia de la naturaleza del codisolvente empleado para inducir el desplegamiento fue encontrada por Ahmad y Bigelow (1982) aplicando LEM a ribonucleasa A, lisozima, α -lactalbúmina y mioglobina. En el trabajo de Yao y Bolen (1995) se exploran las suposiciones, condiciones y criterios que deben darse para la evaluación de valores "auténticos" de ΔG_w .

En resumen, existe una considerable controversia en la literatura sobre el procedimiento para obtener valores del cambio de energía de Gibbs en solución acuosa a partir de datos de desplegamiento inducido por disolventes así como sobre el significado físico del valor obtenido. Por esta razón nos pareció interesante abordar este tema en nuestro trabajo de investigación.

En primer lugar nos planteamos, utilizando una proteína modelo como es lisozima, comparar los valores de ΔG_w obtenidos aplicando el método de extrapolación lineal con aquellos que se derivan de experimentos de Calorimetría Diferencial de Barrido (ver sección 3.5).

Generalmente los estudios sobre desnaturalización por codisolventes que se recogen en la literatura, se limitan a la determinación del perfil experimental a una única temperatura. Nosotros hemos querido ser más exhaustivos en el planteamiento experimental del trabajo de manera que hemos caracterizado el desplegamiento inducido por guanidina de lisozima a diferentes temperaturas, y empleando distintos procedimientos:

- medidas de fluorescencia de muestras en equilibrio en el rango de 30-56 °C (sección 3.1).

- ensayos de desplegamiento (Mücke y Schmid, 1994): este método cinético permite determinar la fracción molar de proteína en estado nativo, dadas unas condiciones de desnaturalizante y temperatura (concretamente los experimentos se hicieron entre 30 y 45 °C; ver sección 3.2). Constituye, por tanto, un excelente test para comprobar la validez del modelo de dos estados.

- medidas cinéticas (sección 3.3): estudiamos las cinéticas en la dirección de replegamiento-desplegamiento inducido mediante saltos entre diferentes concentraciones de guanidina, en el rango de 18 a 45 °C.

El análisis de los diferentes perfiles de desnaturalización inducida por guanidina mediante el método de extrapolación lineal, arroja valores de ΔG_w unos 15 kJ/mol menores a los obtenidos mediante DSC (ver sección 3.4), en todo el rango de temperatura de nuestros experimentos. Esta discrepancia encontrada nos llevó a:

1. En primer lugar proponer un procedimiento alternativo de extrapolación para determinar el cambio de energía de Gibbs en disolución acuosa. Lo hemos denominado **procedimiento de extrapolación a ΔG constante**, y se trata de un método no lineal e independiente de cualquier modelo (detalles en la sección 3.7).

2. Analizar esta diferencia entre los datos de ΔG obtenidos por el LEM y DSC en términos moleculares (sección 3.8): creemos que está relacionada con la contribución debida a interacciones electrostáticas ($\Delta\Delta G^{q-q}$).

Estos dos aspectos son precisamente a los que hacíamos mención al comienzo de esta introducción, cuando nos referíamos a las principales dificultades a la hora de interpretar datos de energía de Gibbs y cómo iban a ser abordadas en este trabajo.

Llegados a este punto decidimos seguir profundizando en el estudio de la contribución electrostática a la estabilidad de proteínas. Una manera sencilla de comprobar nuestra hipótesis sobre la relación entre ésta y las desviaciones de la linealidad es mediante un estudio sistemático en función del pH. Para ello escogimos como proteína modelo ubiquitina (bovina y de levadura), ya que se trata de una molécula pequeña (de unos 8 kDa) con menor número de residuos que lisozima y por tanto mucho más simple. El enfoque experimental fue el siguiente:

1. Caracterizamos el equilibrio de desplegamiento inducido por guanidina de ubiquitina, mediante medidas de fluorescencia y dicroísmo circular en el rango de pH de 2-5 aproximadamente (secciones 4.1 y 4.2).

2. Estudiamos la desnaturalización térmica en presencia de diferentes concentraciones de guanidina (0-4 M), a pHs 2 y 4 (sección 4.3). De esta manera podremos estudiar el efecto del pH sobre las desviaciones de la linealidad y relacionarlas con factores electrostáticos (sección 4.4).

Ya comentamos anteriormente que una de las suposiciones extra-termodinámicas que es necesario aplicar al analizar los datos de desnaturalización inducida por codisolventes es el mecanismo de desplegamiento de dos estados. En la mayoría de las ocasiones la validez de esta suposición se basa en la concordancia entre perfiles de desplegamiento estudiados mediante diferentes técnicas. No obstante, ya hemos comentado cómo tuvimos especial precaución en este sentido en los experimentos con lisozima; no sólo utilizamos diferentes procedimientos para la caracterización del desplegamiento sino además métodos como los ensayos de desplegamiento que permiten conocer la cantidad de proteína en estado nativo en unas condiciones dadas.

Relacionado con esto apareció en la literatura un trabajo de Chen et al. (1996) en el que se sugiere la existencia de un intermedio de equilibrio en la desnaturalización inducida por urea de lisozima, detectado mediante medidas de dispersión de rayos X de bajo ángulo y dicroísmo circular. Este era un resultado sorprendente ya que lisozima se había venido considerando como ejemplo típico de proteína modelo cuyo desplegamiento ocurre sin que se observen estados intermedios de equilibrio significativamente poblados. Puesto que en nuestro trabajo experimental con lisozima habíamos puesto a punto diferentes procedimientos para la caracterización del desplegamiento inducido por codisolventes, nos pareció la ocasión perfecta para ponerlos en práctica (ver secciones 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4) en las condiciones dadas por estos autores en las que la población de intermedio era máxima y contrastar resultados (secciones 5.6 y 5.7).

Además en esta última parte del trabajo se pretende señalar algunos errores experimentales en la detección de intermedios así como sugerir procedimientos para soslayarlos (Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 1997).



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 PRODUCTOS

Los siguientes productos se obtuvieron de la casa comercial SIGMA:

Lisozima de clara de huevo de gallina (Lote 111H701015; Ref. L-7651). Liofilizado de una riqueza aproximada del 95%. Se conserva a -20°C . Peso molecular de 14400 g/mol.

Ubiquitina de glóbulos rojos bovinos (Lote 125H9332; Ref. U-6253). Liofilizado de riqueza mínima del 90% (el tanto por ciento restante lo componen sales y otros compuestos de bajo peso molecular como glicina). Se conserva a 4°C . Peso molecular de 8433 g/mol.

Ubiquitina de levadura proporcionada amablemente por el grupo del Dr. Makhatadze.

Urea, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (Lote 86H0778; Ref. U-0631). Peso molecular de 60.06 g/mol.

Citrato trisódico dihidratado, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lote 125H0375; Ref. C8532). Peso molecular de 294.1 g/mol.

Ácido cítrico monohidratado, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Lote 75H1048; Ref. C1909). Peso molecular de 210.1 g/mol.

El cloruro de guanidina fue suministrado por PIERCE (Lote 97011361; Ref. 24110) de grado ultrapuro. Se conserva en desecador debido a su gran higroscopicidad. Peso molecular de 95.53 g/mol.

De CARLO ERBA fueron:

Cloruro sódico (Ref. 479687). Calidad reactivo para análisis. Peso molecular de 58.443 g/mol.

Glicina, $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ (Ref. 453807). Calidad reactivo para análisis. Peso molecular de 75.068 g/mol.

Acetato sódico (Ref. 71183) de FLUKA. Peso molecular 82.04 g/mol.

El ácido clorhídrico se adquirió de la casa PANREAC, químicamente puro y de MERCK de calidad producto para análisis. Peso molecular 36.46 g/mol.

Ácido acético 96% extra puro de MERCK. Peso molecular de 60.05 g/mol.

El agua utilizada en la preparación de las disoluciones fue siempre destilada, desionizada mediante una resina de intercambio iónico (1 μ s) y nuevamente desionizada y filtrada con un equipo Milli-Q (Millipore).

Para las diálisis se utilizaron membranas de SPECTRA/POR de tamaño de poro tal que permita el paso de moléculas de peso molecular menor al de la proteína. Así para lisozima se utilizaron membranas con un punto de corte entre 12000 y 14000 Daltons (No:132700) y para ubiquitina entre 6000 y 8000 Daltons (No:132650). Antes de su utilización es necesario calentar las membranas hasta 70 °C en agua Milli-Q, repitiendo este proceso tres veces. Se almacenan a 4 °C.

2.1.2 INSTRUMENTACIÓN

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes instrumentos:

Espectrofotómetro BECKMAN DU 70 de haz simple para la obtención de los espectros ultravioleta-visible de las distintas muestras de proteína con las que se trabajó. Eventualmente también se usó un espectrofotómetro CARY 210 de doble haz, de la casa Varian.

Espectrofluorímetro PERKIN-ELMER LS-5, aunque ocasionalmente también se utilizó el modelo Perkin-Elmer LS50B que amablemente fue puesto a nuestra disposición por el Departamento de Química-Física de la Universidad de Almería. La termostatación de la cubeta de medida situada en el portacubetas se llevó a cabo recirculando agua desde un baño Selecta 6000383. La temperatura se comprobaba directamente en la cubeta mediante una sonda de platino tipo PT100 conectada a un termómetro digital LAUDA modelo R 42/2 que permite apreciar hasta 0.01°C. Además se dispuso de otro baño adicional de mayor capacidad, de la marca HETO, para la incubación de las muestras a la temperatura deseada. Como foco frío en los baños utilizados se dispuso de un dedo frío inmerso en éstos, de la marca SELECTA.

Para los experimentos de calorimetría diferencial de barrido se utilizaron un microcalorímetro diferencial de barrido DASM-1 y un microcalorímetro VP-DSC (Microcal Incorporated) de adquisición reciente.

Los experimentos de dicroísmo circular se realizaron en el laboratorio del Dr. George Makhatadze, Department of Chemistry and Biochemistry, TEXAS TECH UNIVERSITY Lubbock (Texas), dentro del marco de colaboración que existe entre el grupo del Dr. Makhatadze y el nuestro. Se utilizó un espectropolarímetro Jasco-J20 de la casa Japan Electronic Inc. equipado con modulador fotoelástico y amplificador sincrónico ("lock-in amplifier"), sensible a la variación de señales de su propia frecuencia. La señal que procede del amplificador se hace pasar por un microvoltímetro Kethley/Metrabyte y se recoge en un computador personal a través de un conversor analógico/digital de 12-bit. La señal eléctrica se calibra en unidades de elipticidad usando valores conocidos para disoluciones acuosas de ácido d-(+)-10-canforsulfónico; concretamente una disolución de concentración igual a 1 mg/mL da un valor de elipticidad de 33.5 mdeg a 290.5 nm, usando una cubeta de 1 mm de paso de luz (Yang et al., 1986).

Para las medidas de índice de refracción se usaron refractómetros de Abbe modelo RL Nr 2276 y de mano modelo ATAGO R5000.

Para las medidas de pH se utilizaron electrodos combinados de vidrio Crison modelos 52-03 “clásico” para grandes volúmenes (diámetro del bulbo de unos 10mm) y 52-09 “micro” para pequeños volúmenes (diámetro del bulbo de aproximadamente 5mm). Estos electrodos estaban conectados a un pHmetro Crison digital modelo 501, de sensibilidad 0.01 unidades. La calibración del pHmetro se realizaba sistemáticamente con disoluciones estándar de pH 7.02 y 4.00, también de la marca Crison.

Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fueron amablemente realizados por la Dr. Maria Luisa Tasayco y su grupo de investigación en el Department of Chemistry, The City College, Nueva York. Se utilizó un espectrómetro modelo VARIAN UNITY*plus* de 500 MHz.

El tratamiento de los datos experimentales se llevó a cabo con la ayuda de computadores personales Pentium y del programa comercial MLAB (Civilized Softwre, Inc.).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

2.2.1.1 Preparación de tampones y diálisis

El primer paso de la diálisis consiste en la preparación del tampón en el que va a ir disuelta la proteína. El procedimiento general que se ha seguido en este trabajo consiste en prepararlo a partir de la mezcla de dos disoluciones de igual concentración de tampón y de pHs

superior e inferior al deseado. El pH más básico lo da el propio tampón y el ácido se consigue añadiendo un volumen de la forma ácida del tampón o en su defecto HCl.

Los detalles acerca de los diferentes tampones utilizados, pHs y condiciones de trabajo en general, se encuentran en la parte de Resultados.

Como ya se indicó en el apartado 2.1.1, las proteínas utilizadas en el presente trabajo (lisozima y ubiquitina) se adquieren en forma de liofilizado de manera que el primer paso en la preparación de la diálisis es la pesada de la cantidad apropiada según la concentración que se desee. A continuación se disuelve, con cuidado y sin agitar bruscamente, en el volumen requerido del correspondiente tampón que previamente se ha filtrado, usando filtros Millipore de 45 μm de tamaño de poro. Ayudándonos con una pipeta Pasteur introducimos la disolución de proteína en la membrana de diálisis preparada anteriormente como se explica en el apartado 2.1.1. La bolsa se cierra mediante unas pinzas especiales (de Spectrum Medical Industries) dejando una pequeña cámara de aire. Finalmente se introduce en un recipiente que contiene un volumen de tampón de 500 a 600 veces mayor al de la muestra y se pone a agitar suavemente durante unas 8 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo se repone el tampón que baña la bolsa de diálisis por otro volumen fresco y de nuevo dejamos en agitación otras 8 horas aproximadamente. El proceso se repite una tercera vez de manera que transcurrido el tiempo indicado extraemos la disolución dializada de proteína de la bolsa. Con objeto de eliminar cualquier residuo insoluble filtramos dicha disolución utilizando filtros Millex-GV de Millipore con tamaño de poro de 0.45 μm (cat. No. SJHV013NS).

La concentración de proteína en disolución se determina espectrofotométricamente registrando el espectro ultravioleta-visible en cada caso:

- Para lisozima se utilizó como coeficiente de extinción el valor de $2.65 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 280 nm que aparece en bibliografía (Canfield, 1963). Para registrar el espectro se toma una alícuota de la disolución madre de proteína y se diluye de manera que su absorbancia a 280 nm esté en torno a la unidad. De esta manera nos aseguramos estar en el rango lineal de la dependencia de la absorbancia con la concentración. Sistemáticamente se realizaron tres medidas que provienen de diferentes diluciones para luego tomar el valor medio de absorbancia a 280 nm. En la Figura 1 se muestra un espectro ultravioleta-visible típico de lisozima .

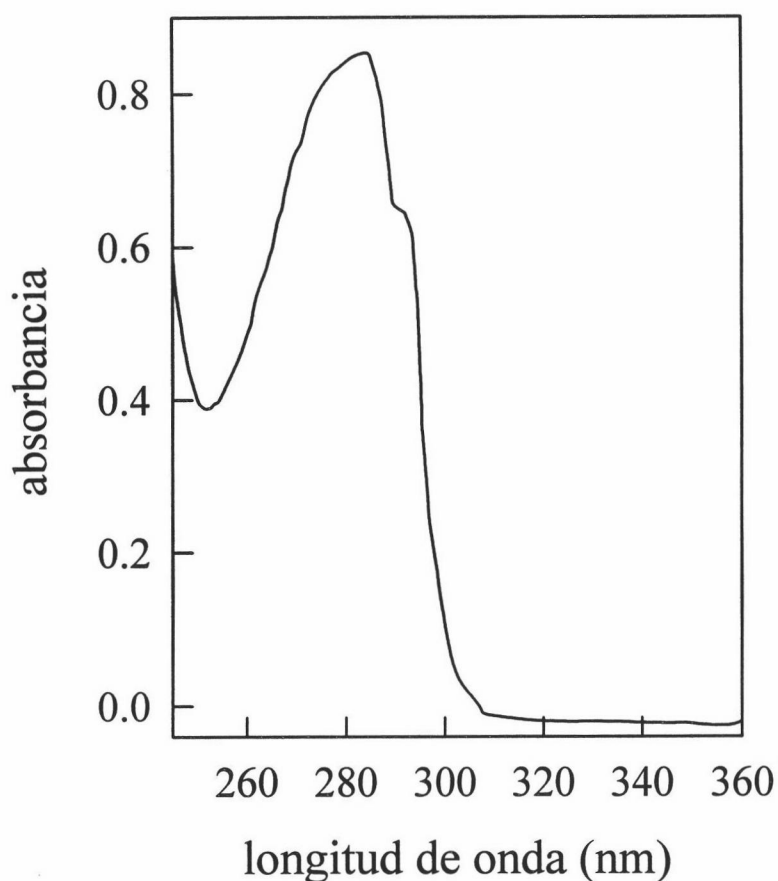


Figura 1: Espectro ultravioleta-visible de lisozima de clara de huevo en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5. La concentración de proteína fue de 0.32 mg/mL y para la obtención del espectro se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

- Para ubiquitina se usó como coeficiente de extinción $0.149 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 280 nm calculado de acuerdo a Gill et al. (1989). Debido a su bajo valor y en el rango de concentraciones que trabajamos no fue necesario, en general, diluir la muestra para obtener valores de absorbancia a 280 nm en torno a 1. También se realizaron tres medidas en cada caso para obtener un valor medio. En la Figura 2 se muestra un espectro de ubiquitina.

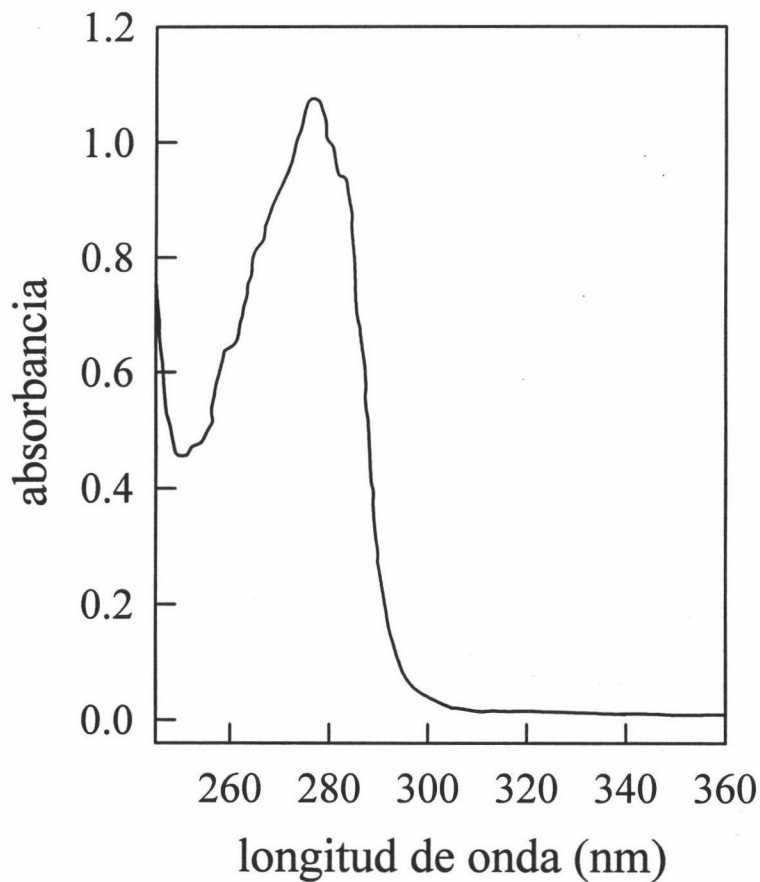


Figura 2: Espectro ultravioleta-visible correspondiente a ubiquitina de glóbulos rojos bovinos dializada en tampón glicina 10 mM/HCl, pH 2.0. La concentración de proteína fue de 6.40 mg/mL y para la obtención del espectro se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

2.2.1.2 Preparación de disoluciones concentradas de desnaturizante

A la hora de preparar las disoluciones concentradas de guanidina o urea prestamos especial interés a la cuestión del pH de las mismas. Desde el punto de vista experimental hemos planteado dos procedimientos distintos para su preparación:

A) Disolver el producto sólido de guanidina, previamente pesado según la concentración deseada, directamente en el tampón de la diálisis que había sido equilibrado con la solución de proteína. Al disolverse aquélla va a ocasionar un aumento significativo del volumen, de manera que la concentración de tampón y el pH de la disolución van a verse modificados en mayor o menor medida. En relación al primer efecto hay que decir que es irrelevante una ligera variación en la concentración del tampón en términos de fuerza iónica ya que la mayor contribución a ésta viene dada por la gran concentración de sal presente en el medio (en torno a 8 M guanidina). El efecto de pH lo trataremos más adelante de modo detallado.

B) Disolver el tampón sólido en la solución concentrada de desnaturizante en agua, de manera que el pH deseado se consigue mezclando dos de estas disoluciones de la misma concentración de desnaturizante y con pHs superior e inferior respectivamente al de trabajo. El pH más básico lo da simplemente el tampón disuelto en la disolución de desnaturizante mientras que el pH ácido se obtiene añadiendo además un volumen de HCl antes de enrasar el matraz aforado.

El procedimiento concreto utilizado así como los detalles de las condiciones experimentales en cada caso se detallan en la sección de Resultados.

Cualquiera que sea el procedimiento seguido, creemos que existe una incertidumbre en la determinación del valor real del pH debido precisamente a que el medio es parcialmente no acuoso. Para aclarar esta idea vamos a introducir unas nociones acerca del concepto de pH y su significado:

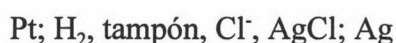
2.2.1.2a La medida del pH en mezclas agua-codisolvente

La definición operacional de pH recomendada por la I.U.P.A.C. puede formularse como:

$$pH(\chi) = pH(S) + \frac{(E_{\chi} - E_S) \cdot F}{RT \cdot \ln 10} \quad (1)$$

donde pH(S) es el valor de pH asignado a un patrón y E_S y E_{χ} son los valores de la f.e.m. de una célula de medida de pH sumergida en el patrón y en la disolución problema.

Para aplicar la ecuación (1) es necesario asignar a determinadas disoluciones (patrones) valores inequívocos de pH, es decir de $-\log a_H$ donde a_H es la actividad de protones. Dado que no es posible medir la actividad de un ión individual, para llevar a cabo dicha asignación es inevitable hacer alguna suposición sobre un coeficiente de actividad. Así, por ejemplo, en el caso de los tampones patrón N.B.S. (National Bureau of Standards) se determina $-\log (a_H \gamma_{Cl^-})$ a partir de la f.e.m. de la célula:



y se obtiene $-\log a_H$ suponiendo que el coeficiente de actividad del ión cloruro cumple la convención de Bates-Guggenheim:

$$\log \gamma_{Cl^-} = -\frac{A \cdot I^{1/2}}{1 + 1.5 \cdot I^{1/2}} \quad (2)$$

donde I es la fuerza iónica y A la constante de Debye-Huckel. De esta forma se define lo que suele llamarse una escala convencional de actividades protónicas ya que está basada en una suposición [ecuación (2)].

Una vez asignados valores de pH a disoluciones patrón es inmediato calcular el pH de una disolución problema, midiendo la f.e.m. de una célula de medida de pH sumergida en un patrón y en el problema y aplicando la ecuación (1), o bien ajustando un pHmetro conectado a dicha célula con el patrón y leyendo directamente el pH con la célula sumergida en el problema.

Las células usadas comúnmente para la medida del pH constan de un electrodo de vidrio (en lugar del de hidrógeno) y de un electrodo de referencia adecuado (calomelanos, por ejemplo). Esto tiene como consecuencia la conveniencia de usar dos patrones para el ajuste del pHmetro, dado que los electrodos de vidrio rara vez presentan una respuesta ideal con el pH (es decir, aunque la f.e.m. varíe linealmente con el pH el factor de proporcionalidad se desvía del valor teórico $F/RT \ln 10$).

Por otra parte hay que tener en cuenta la presencia del potencial de unión líquida que difícilmente será igual con el patrón y con el problema. A pesar de esto se considera que el pH medido coincide con el valor de $-\log a_{\text{H}}$ en la escala convencional si estamos tratando con disoluciones acuosas diluídas de solutos simples. Esto excluye suspensiones, coloides, medios acuosos de fuerza iónica mayor de 0.2 y medios no acuosos o parcialmente no acuosos (Bates, 1973).

En este último caso (medios parcialmente no acuosos) la lectura de un pHmetro (que llamaremos B) ajustado con patrones acuosos y conectado a una célula de medida de pH, como la anteriormente descrita (electrodo de vidrio y electrodo de referencia, calomelanos por ejemplo) no puede, ni siquiera de forma aproximada, suponerse igual a $-\log a_{\text{H}}$ (entendiendo por a_{H} una

actividad protónica convencional tomando como estado de referencia la dilución infinita en el medio parcialmente no acuoso considerado).

Esto se debe básicamente a dos razones (Bates, 1973):

A) El potencial químico del ión hidrógeno a dilución infinita es diferente en agua y en una mezcla parcialmente no acuosa (efecto primario del medio).

B) El potencial de unión líquida varía también con la composición del medio.

Van Uitert et al. (1953, 1954) desarrollaron un método relativamente simple para el cálculo, a partir de B, de concentraciones y actividades de protones en mezclas agua-codisolvente, el cual se describe a continuación.

Se define U_H como

$$U_H = \frac{10^{-B}}{[H^+]} \quad (3)$$

donde $[H^+]$ es la concentración molar estequiométrica de protones. Según esta ecuación, U_H puede calcularse a partir de la lectura del pHmetro (B) en disoluciones de concentración conocida de ácido clorhídrico y es, en general, función de la composición del disolvente y de la concentración iónica. Si este último efecto fuese el resultado del cambio en el coeficiente de actividad del protón con la concentración iónica, se podrían corregir los valores de U_H usando coeficientes de actividad conocidos y obtener U_H^0 que correspondería al factor de corrección a fuerza iónica cero,

$$U_H^0 = \frac{U_H}{\gamma_H} \quad (4)$$

donde γ_H es el coeficiente de actividad del protón. Dado que no es posible disponer de valores

de γ_H , Van Uitert y Haas los supusieron iguales a los coeficientes de actividad iónicos medios del ácido clorhídrico ($\bar{\gamma}_{\pm}$) en las mezclas agua-codisolvente, lo cual está de acuerdo con la teoría de Debye-Huckel en su forma más simple.

Por tanto

$$\log U_H^0 = \log U_H - \log \gamma_{\pm} \quad (5)$$

y teniendo en cuenta la ecuación (3)

$$B + \log U_H^0 = -\log([H^+] \cdot \gamma_{\pm}) \quad (6)$$

si suponemos como se ha hecho anteriormente que $\gamma_H = \gamma_{\pm}$

$$B + \log U_H^0 = -\log([H^+] \cdot \gamma_{\pm}) = -\log a_H \quad (7)$$

y reteniendo la nomenclatura pH para $-\log a_H$,

$$pH = B + \log U_H^0 \quad (8)$$

Por tanto U_H^0 es el factor de corrección que hay que sumar a la lectura del pHmetro (B) para obtener el pH ($-\log a_H$).

Para mezclas agua-guanidina y agua-urea no tenemos constancia de la existencia de estudios experimentales encaminados a la determinación de estos factores de corrección y dado que este aspecto se escapa a los objetivos de este trabajo, tomaremos como valor de pH en cada caso la lectura que arroja el pHmetro. En cualquier caso la imposibilidad de conocer los

valores reales de pH hace que cualquiera de los dos procedimientos experimentales explicados anteriormente (ver página 22) para preparar las disoluciones de desnaturizante, sea razonable según el punto de vista que se adopte. Así, podemos plantearnos mantener constante la lectura del pHmetro en todo el rango de concentración estudiado de manera que la reproducibilidad en estas condiciones sería mayor. O bien, podemos planearnos ajustar el pH del tampón acuoso (valor perfectamente conocido) e ir añadiendo guanidina. Este segundo procedimiento sería el apropiado cuando al pH de trabajo existen grupos en la proteína parcialmente ionizados y grupos químicamente similares en el tampón. Al aumentar la concentración de guanidina el pH del medio iría cambiando y con él cambiaría de igual manera el pK de dichos grupos comunes en el tampón y en la proteína. Así se mantendría el mismo estado de ionización de éstos a medida que el pH del medio se ve modificado por cambios en el disolvente.

Para los experimentos realizados con lisozima se usaron ambos procedimientos para preparar la disolución concentrada de desnaturizante mientras que con ubiquitina se procedió manteniendo constante la lectura del pHmetro en todos los experimentos ya que, como se verá más adelante, el pH no parece afectar a los parámetros termodinámicos que se obtienen de los perfiles de desnaturización inducida por disolvente.

2.2.1.2b Disoluciones concentradas de guanidina

Una vez preparada la disolución madre de guanidina, por cualquiera de los dos procedimientos ya mencionados en el apartado anterior, se filtró usando filtros Millipore con tamaño de poro de 0.45 μm . La concentración exacta de guanidina en disolución se determina mediante medidas del índice de refracción (Pace et al., 1989). La diferencia entre el índice de refracción de la disolución de guanidina y el correspondiente al tampón acuoso en el que aquella

está disuelta nos dará Δn que está relacionado con la concentración de guanidina (en mol/l) por la siguiente expresión (Nokazi, 1972):

$$[GdnClH] = 57.147 \cdot (\Delta n) + 38.68 \cdot (\Delta n)^2 - 91.60 \cdot (\Delta n)^3 \quad (9)$$

Todas las medidas fueron hechas a temperatura ambiente.

2.2.1.2c Disoluciones concentradas de urea

Así como las disoluciones de GdnClH son estables durante meses, las de urea descomponen lentamente formándose en el medio iones amonio y cianato (Hagel et al., 1971). Estos últimos pueden reaccionar con los grupos amino de la proteína (Stark, 1965) de manera que es aconsejable usar una disolución fresca de urea, preparada el mismo día que se van a hacer los experimentos. A continuación detallamos los pasos seguidos en la preparación de una disolución madre de urea, aproximadamente 10 M, en tampón citrato 100 mM, ClNa 100 mM, pH 2.9:

En primer lugar pesamos la cantidad necesaria de urea para disolverla después en un volumen de agua Milli-Q algo menor al final. Dado que estamos muy cerca de la saturación (la solubilidad a 25 °C es 10.49 M) y con objeto de acelerar el proceso de solubilización, sonicamos la muestra. Es importante tener en cuenta que no debemos calentar la disolución, tal como hacíamos con la de guanidina, ya que se estaría favoreciendo la descomposición de la urea. A continuación pasamos la disolución a través de una resina de intercambio iónico AG501-X8(D) de BioRad repitiéndose este proceso dos o tres veces. Una vez purificada la urea, separamos dos fracciones de igual volumen y disolvemos en ellas el tampón sólido. Así a una de ellas, fracción ácida, añadiremos la cantidad correspondiente de ClNa y ácido cítrico monohidratado mientras que a la otra, fracción básica, añadiremos ClNa y citrato trisódico. Además fue necesario añadir

un pequeño volumen de HCl a la fracción ácida para conseguir una lectura de pH por debajo de 2.9. Por último y ayudados de un matraz aforado enrasamos el volumen final de cada fracción con agua. De esta manera basta mezclar ambas disoluciones hasta que se alcance una lectura en el pHmetro igual a 2.9. La disolución resultante se filtra utilizando filtros Millipore de 45 μm de tamaño de poro.

Para determinar la molaridad exacta de las disoluciones de urea nos basamos de nuevo en medidas de índice de refracción (Pace et al., 1989). La diferencia entre el índice de refracción de la disolución de urea y el correspondiente al tampón acuoso en el que aquella está disuelta nos dará Δn que está relacionado con la concentración de urea por la expresión (Warren et al., 1966):

$$[urea] = 117.66 \cdot (\Delta n) + 29.753 \cdot (\Delta n)^2 + 185.56 \cdot (\Delta n)^3 \quad (10)$$

Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

2.2.2 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

2.2.2.1 Introducción

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es la técnica más poderosa para la caracterización energética de los cambios conformacionales inducidos por temperatura en sistemas biológicos tales como proteínas, ácidos nucleicos y biomembranas. De hecho, los estudios de DSC sobre desnaturalización térmica de proteínas han jugado un papel fundamental en el desarrollo de los actuales puntos de vista acerca de los factores que determinan la estabilidad de aquellas. En la literatura se encuentran diversas revisiones sobre los aspectos más interesantes de esta técnica (Privalov, 1979, 1982, 1989; Mateo, 1984; Sturtevant, 1987; Sanchez-Ruiz y Mateo, 1987; Chowdry et al., 1989; Freire et al., 1990; Cooper et al., 1994 a y b;

Sanchez-Ruiz, 1995).

Mediante un experimento de calorimetría diferencial de barrido es posible obtener la capacidad calorífica molar aparente de un proteína o de cualquier macromolécula como función de la temperatura. El posterior análisis de esta dependencia nos dará una caracterización termodinámica completa de la transición que ha tenido lugar por efecto de la temperatura. En un termograma típico de DSC ésta se manifiesta por un pico, correspondiente a un proceso endotérmico de acuerdo con el Segundo Principio de la Termodinámica (supuesto el proceso de equilibrio), tanto más agudo cuanto más cooperativa sea la transición.

En general, de los experimentos de DSC analizados según la termodinámica de equilibrio podemos obtener información acerca de:

1. La capacidad calorífica parcial absoluta de una molécula.
2. El conjunto de parámetros termodinámicos [cambio de entalpía (ΔH), cambio de entropía (ΔS) y cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p)] asociados a la transición inducida por temperatura.
3. La función de partición y consecuentemente la población de estados intermedios y sus parámetros termodinámicos.

2.2.2.2 Instrumentación

El interés despertado desde los años 70 en la caracterización termodinámica de macromoléculas biológicas por DSC, indujo un desarrollo paralelo de la instrumentación necesaria. Ninguno de los calorímetros conocidos podía ser utilizado para estudios físico-químicos de materiales biológicos. Además de necesitarse una gran cantidad de muestra de la que a veces no se dispone, la viscosidad representaba un problema ya que no era posible agitar para

alcanzar un rápido equilibrio térmico durante el calentamiento, como usualmente se hacía en estudios de líquidos. A esto hay que añadir los pequeños calores puestos en juego durante el proceso y que escapaban a la sensibilidad del instrumento. Por tanto se trabajó en el diseño de nueva instrumentación más sensible y que requiriese un volumen de muestra menor.

Los microcalorímetros diferenciales de barrido utilizados actualmente tienen una serie de características comunes:

1) Carecen de agitación mecánica, eliminándose así la contribución por efecto Joule que podría ser mayor incluso que el calor que queremos medir. Esto fue posible debido a la disminución significativa en el volumen operacional del calorímetro.

2) Medida de la capacidad calorífica de manera continua (no a través de incrementos discretos de energía) calentando o enfriando la muestra a velocidad constante. Es por esto que se denominan microcalorímetros de barrido. Con este sistema se obtiene una información más completa de la función de capacidad calorífica y permite la automatización del proceso de medida. En cambio la principal desventaja es que la muestra nunca está en completo equilibrio térmico (aquí entra en juego el diseño de las células).

3) Esquema diferencial de medida. Realmente se mide la diferencia en capacidad calorífica entre dos células iguales en las que se encuentra la disolución objeto de estudio y el líquido patrón. De aquí el término diferencial que se le da a estos calorímetros.

4) Funcionan de modo adiabático, como veremos a continuación.

5) El bloque calorimétrico es fijo obteniéndose así una mayor reproducibilidad en los datos.

Un microcalorímetro de DSC consiste básicamente en dos células gemelas, una de referencia y otra de muestra. Al comenzar un barrido se suministra a las resistencias eléctricas, que se encuentran asociadas íntimamente a la superficie de cada célula, la misma intensidad de corriente cuyo valor está fijado por la velocidad de barrido seleccionada. Para medir la diferencia en capacidad calorífica de las células se utiliza el método de compensación, de manera que cuando se produce algún efecto térmico (desnaturalización de una proteína, fusión de una bicapa lipídica...), la termopila, que se encuentra en contacto con las células, detecta una diferencia de temperatura entre éstas y suministra una señal eléctrica proporcional que va a servir para incrementar mediante un sistema regulador, la potencia recibida por la célula de menor temperatura. La diferencia de temperatura entre la célula de muestra y de referencia se mantiene de esta manera igual a cero por un mecanismo de retroalimentación, a medida que la temperatura aumenta o disminuye a velocidad de barrido constante. La diferencia de potencia que necesita ser aplicada a la célula de muestra para mantener ΔT cero es seguida continuamente como función de la temperatura. Esta potencia eléctrica diferencial (generalmente dada en $\mu W = \mu J/s$ o en $\mu cal/s$) es directamente proporcional a la diferencia de capacidad calorífica entre ambas células ($\mu J/grad$ o o $\mu cal/deg$) y constituye la magnitud fundamental medida en este instrumento.

La adiabaticidad del sistema se consigue rodeando ambas células de corazas concéntricas que las separan del medio. La temperatura de estas corazas se controla a través de termosensores y efectores apropiados para que esté en todo momento próxima a la temperatura de las células.

Esta es la descripción general de un microcalorímetro diferencial de barrido. Para el desarrollo de los experimentos calorimétricos incluidos en este trabajo se han utilizado dos modelos de calorímetros. Así, los experimentos con lisozima se realizaron al comienzo de este trabajo y entonces sólo disponíamos de un modelo DASM-1M mientras que los llevados a cabo

con ubiquitina se hicieron en un VP-DSC adquirido recientemente. A continuación vamos a comentar algunos de los aspectos más significativos de ambos.

El DASM-1M (Differential Adiabatic Scanning Microcalorimeter) es de fabricación soviética (Privalov, 1980) aunque los dispositivos de medida y control fueron posteriormente modificados en nuestro laboratorio (Lechuga, 1986).

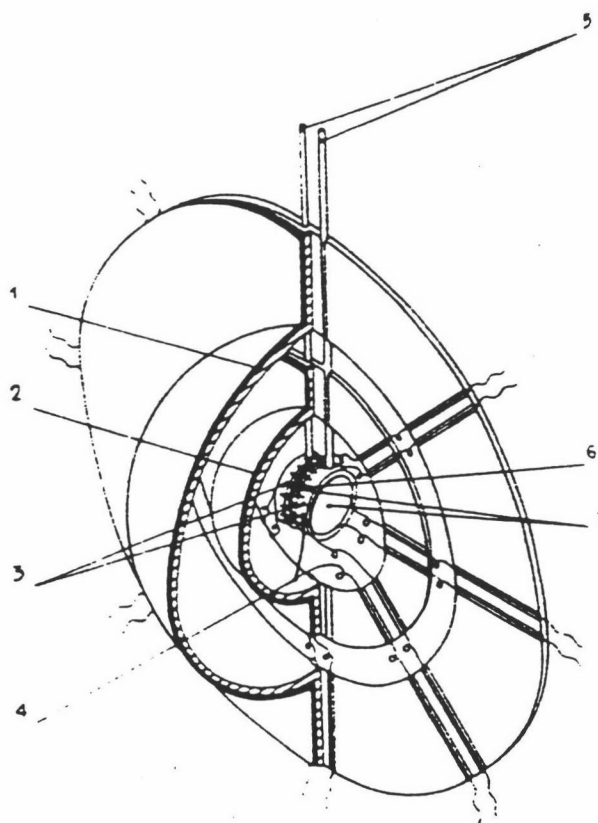


Figura 3: Bloque calorimétrico del microcalorímetro diferencial de barrido DASM-1M: (1,2) corazas adiabáticas interna y externa, con calentadores; (3) células; (4) termosensor de la coraza; (5) tubos capilares de llenado; (6) termopila y (7) calentador de las células.

Las células están construidas en oro (material inerte y de alta conductividad térmica) con forma de moneda, de aproximadamente 20 mm de diámetro y 3 mm de espesor. En la Figura 3 se muestra un esquema del bloque calorimétrico del DASM-1M. Como se observa, el acceso a las

células se realiza a través de dos capilares de platino que desembocan en una cámara hermética que se puede presurizar. Se trabaja con una sobrepresión de 1 atm con aire, para evitar la ebullición del líquido en las células y la formación de microburbujas. El volumen operacional es de 1 ml, el intervalo de temperaturas de trabajo va de 0 a 120 °C y las velocidades de barrido de 0.1 a 2 K/min. Este calorímetro no actúa cíclicamente, es decir, es necesario que cada barrido sea parado o iniciado manualmente. La reproducibilidad de la línea base rellenando es de $3 \cdot 10^{-4} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ (Privalov, 1980), pudiéndose determinar la capacidad calorífica parcial de una proteína con una precisión del 8%. La adquisición de datos se realiza mediante un ordenador conectado directamente al calorímetro a través de un conversor analógico-digital.

El otro calorímetro usado es el VP-DSC adquirido recientemente por nuestro grupo. Representa un importante avance en cuanto a sensibilidad, reproducibilidad, estabilidad, mejora de la adiabaticidad y fácil manejo si lo comparamos con el resto de los sistemas de DSC disponibles en el mercado. Así, tanto el ruido como la repetitividad han sido mejorados un orden de magnitud con respecto a otros instrumentos de manera que es posible obtener resultados de mayor calidad incluso con unos 50 μg de proteína en la célula de muestra, algo impensable con las generaciones anteriores de calorímetros. Las células tienen forma de moneda y están hechas de tantalio, material con unas características frente a la corrosión similares al vidrio. El volumen efectivo de aquéllas es de 0.5 ml aproximadamente y se encuentran dispuestas en el interior de una coraza cilíndrica que asegura la adiabaticidad accediéndose a ellas a través de unos capilares de unos 1.5 mm de diámetro interno. El VP-DSC opera en un rango de temperaturas que va de -10 a 130 °C. Es capaz de registrar barridos tanto calentando como enfriando (en este caso en modo no adiabático) usando un mecanismo interno Peltier, de manera que no se requieren dispositivos externos de calentamiento o enfriamiento. Las velocidades de barrido son

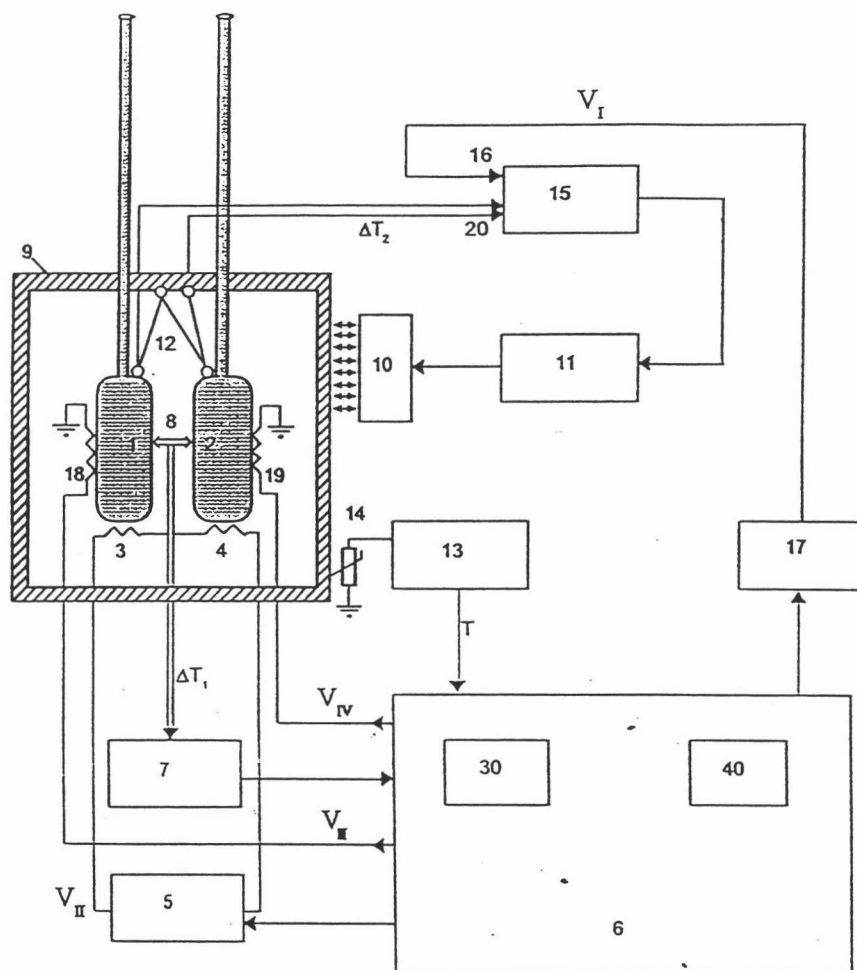


Figura 4: Esquema del calorímetro diferencial de barrido VP-DSC: (1,2) células de muestra y referencia con los tubos capilares de entrada para el llenado y limpieza; (3,4) calentadores principales, situados sobre las células, controlados por el voltaje V_{II} de la fuente de alimentación (5). Esta a su vez está conectada al computador (6) a través de una tarjeta convertora analógico/digital (30); (18,19) elementos auxiliares de calentamiento, activados a través de la tarjeta A/D (30), utilizados en la calibración y en el modo de retroalimentación; dispositivo de medida del efecto térmico (7) y sensor de cristal (8) para medir la diferencia en temperatura ΔT_1 entre las dos células. Rodeando a las células encontramos una coraza (9) con dispositivos de calentamiento/enfriamiento (10) dirigidos por un controlador (11), que responde a una señal que procede de un sistema de amplificación (15). El amplificador recibe, a su vez, una señal entrante en un terminal (20), que procede del sensor (12) que mide la diferencia de temperatura ΔT_2 entre las células y la coraza y en el otro terminal (16) recibe un voltaje V_I de la fuente de alimentación (17), controlada por el computador a través de una tarjeta A/D (30). La coraza tiene además un dispositivo (13) para la medida de temperaturas absolutas activado mediante un sensor (14) dispuesto en la coraza térmica, de manera que la señal que sale de él pasa por el computador a través de la tarjeta A/D (30). Las señales calibradas de entrada al computador (que corresponden a ΔT_1 y ΔT_2), así como la temperatura absoluta T son seguidas continuamente durante el experimento y almacenadas en la memoria del computador (40) a intervalos señalados por el operador.

seleccionadas por el usuario dentro del rango de 0 a 90 °C/hora. Se dispone de un sistema mecánico de presurización que alcanza hasta 2 atmósferas.

En la Figura 4 se muestra un esquema del instrumento (ver pie para más detalles).

La repetitividad de líneas base sucesivas sin rellenar es $2\mu\text{cal}/\text{min}$ y rellenando $5\mu\text{cal}/\text{min}$ (ver Figura 5). Además y debido a su gran estabilidad es posible trabajar en modo isoterma durante largos períodos de tiempo, lo que resulta muy conveniente si se quiere seguir cinéticas a diferentes temperaturas o estudiar la estabilidad de drogas u otros compuestos químicos. El VP-DSC es el primer calorímetro que presenta un tiempo de respuesta seleccionable por el operador según el sistema en estudio (de 30 a 5 segundos). Así para el caso de transiciones anchas, como sucede con la mayoría de las proteínas, en las que se requiere una alta sensibilidad para resolver el pico, es aconsejable usar tiempos de respuesta mayores. Por el contrario para transiciones agudas del tipo gel-cristal líquido en lípidos se aconseja un tiempo de respuesta corto para evitar distorsionar la forma del termograma. No obstante el aumento en el ruido, inherente al uso de tiempos de respuesta menores, va a reducir la calidad de los datos. Para detalles adicionales acerca del diseño y características del VP-DSC ver Plotnikov et al. (1997).

El VP-DSC es controlado por dos circuitos controladores (“interface board”) alojados dentro del PC que se encuentra conectado a aquel. Estos circuitos son preconfigurados y calibrados en MicroCal por lo que no se necesita de ningún ajuste previo a su funcionamiento. La adquisición de datos se lleva a cabo a través de un conversor analógico/digital de 16 bit. El control del instrumento se realiza a través de un segundo conversor A/D de 16 bit que junto con el programa VPViewer hacen posible los barridos en ciclo sin que sea necesaria la intervención del usuario. El operador accede al control del VP-DSC a través del programa VPViewer. Aquí es donde podemos modificar los parámetros experimentales (temperatura de inicio y final,

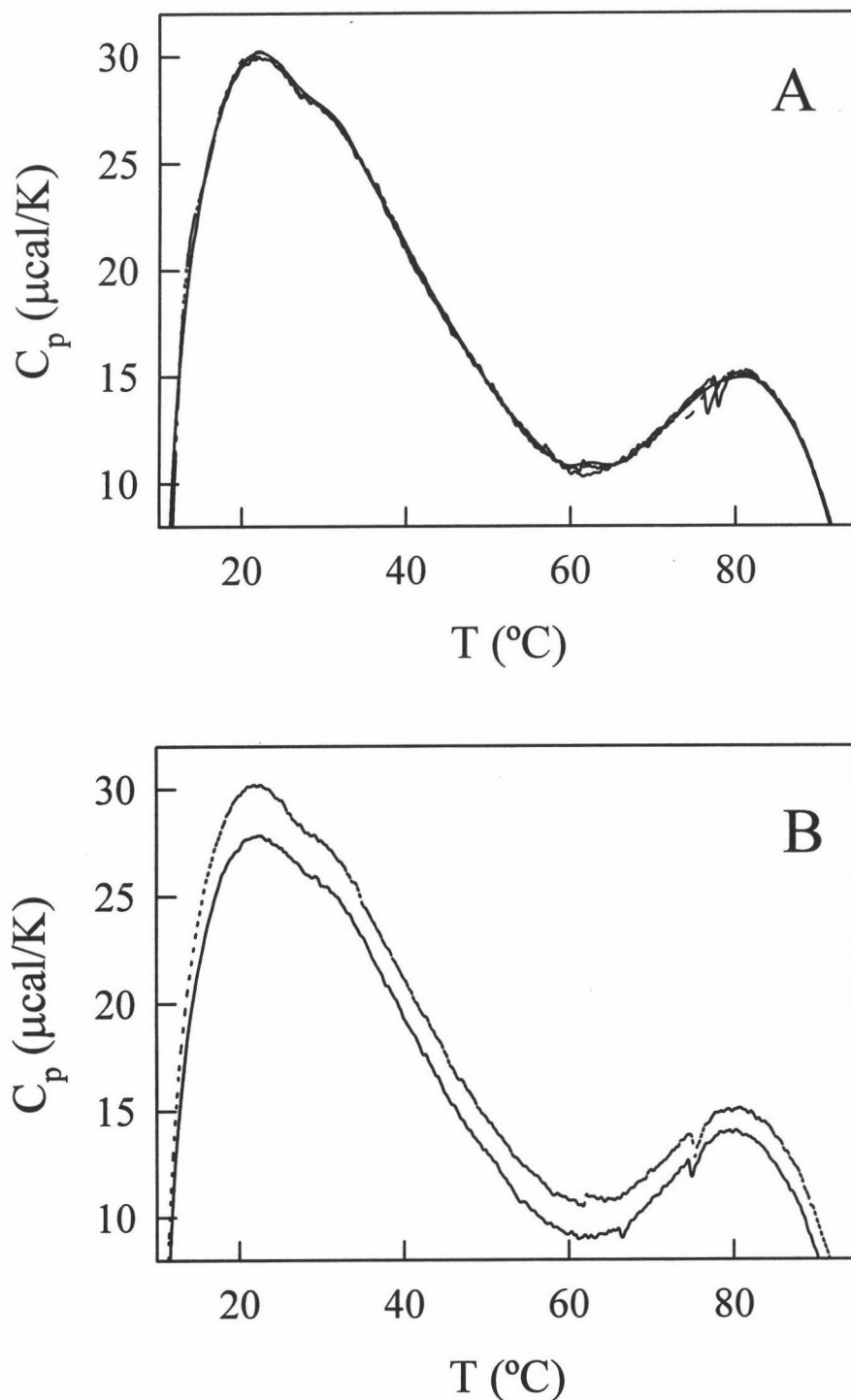


Figura 5: Repetitividad de líneas base instrumentales sucesivas correspondientes a tampón glicina 10 mM/HCl, pH 3.0: en (A) se muestran tres barridos sin rellenar las células; en (B) dos barridos rellenando la célula de muestra. La velocidad fue de 1.5 K/min.

velocidad de barrido...) así como parar o iniciar un barrido, adquirir y almacenar los datos y presentarlos a tiempo real.

2.2.2.3 Experimento calorimétrico

A) Preparación de la experiencia

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. Por ejemplo, un error del 5% en la concentración introducirá un 5% de error en la determinación del cambio de entalpía.

Hemos realizado experimentos de DSC con lisozima y ubiquitina en tampón acuoso y en presencia de diferentes concentraciones de guanidina. Una vez dializada la proteína y preparada la disolución madre de desnaturizante según se indicó en el apartado 2.2.1.2 basta preparar las disoluciones con las que llenaremos las células del calorímetro de la siguiente manera. Según la concentración final de desnaturizante deseada mezclamos los volúmenes adecuados de tampón de diálisis, proteína y guanidina asegurándonos que la concentración final de proteína sea la que queremos. El volumen final debe ser de al menos 1.2 ml para el VP-DSC y de 1.5 ml para el DASM-1M, asegurándose así un fácil llenado de las células. Es importante hacer notar que las disoluciones de partida han sido previamente filtradas y se les ha comprobado el pH.

Una vez preparada la disolución y antes de que se introduzca en el calorímetro hay que desgasificarla en vacío. El tiempo puede variar dependiendo del volumen pero normalmente oscila en torno a 5 minutos en el caso del tampón y 3 para la proteína. Con ésta hay que ser

especialmente cuidadoso ya que si el proceso de desgasificación se alarga podríamos estar modificando la concentración de proteína en disolución.

Medimos el índice de refracción a la disolución que sobra de llenar el calorímetro para conocer exactamente la concentración de guanidina mediante la expresión (9).

B) La línea base instrumental

Idealmente, si las dos células del calorímetro fuesen idénticas, bastaría un sólo barrido para determinar la diferencia en capacidad calorífica entre las soluciones de muestra y referencia. No obstante, en la práctica las dos células no son exactamente iguales y por tanto es necesario registrar dos barridos para sustraer y eliminar la contribución a la señal debida a aspectos instrumentales.

Así pues, en primer lugar registramos la línea base instrumental que coincide con el perfil obtenido cuando las dos células están llenas con el tampón en el que va disuelta la muestra. Esta línea base tampón-tampón se le restará al perfil proteína-tampón con objeto, como ya hemos indicado, de eliminar las distorsiones instrumentales (ver Figura 6). Esta sustracción va a dar lugar, dentro de la mayor parte del intervalo de temperaturas registrado, a valores negativos de capacidad calorífica indicando que la capacidad calorífica de la disolución de referencia es mayor que la de la muestra. Esto es lógico si tenemos en cuenta que el contenido en agua es menor en esta última (la proteína ha desplazado al agua) y que la capacidad calorífica del agua líquida es mayor que la de la proteína.

En el caso del VP-DSC, que actúa cíclicamente, es importante no romper la historia térmica del aparato a la hora del llenado o del lavado de células, de manera que se recomienda hacerlo en la fase de enfriamiento y por debajo de los 30 °C (próximo a la temperatura ambiente).

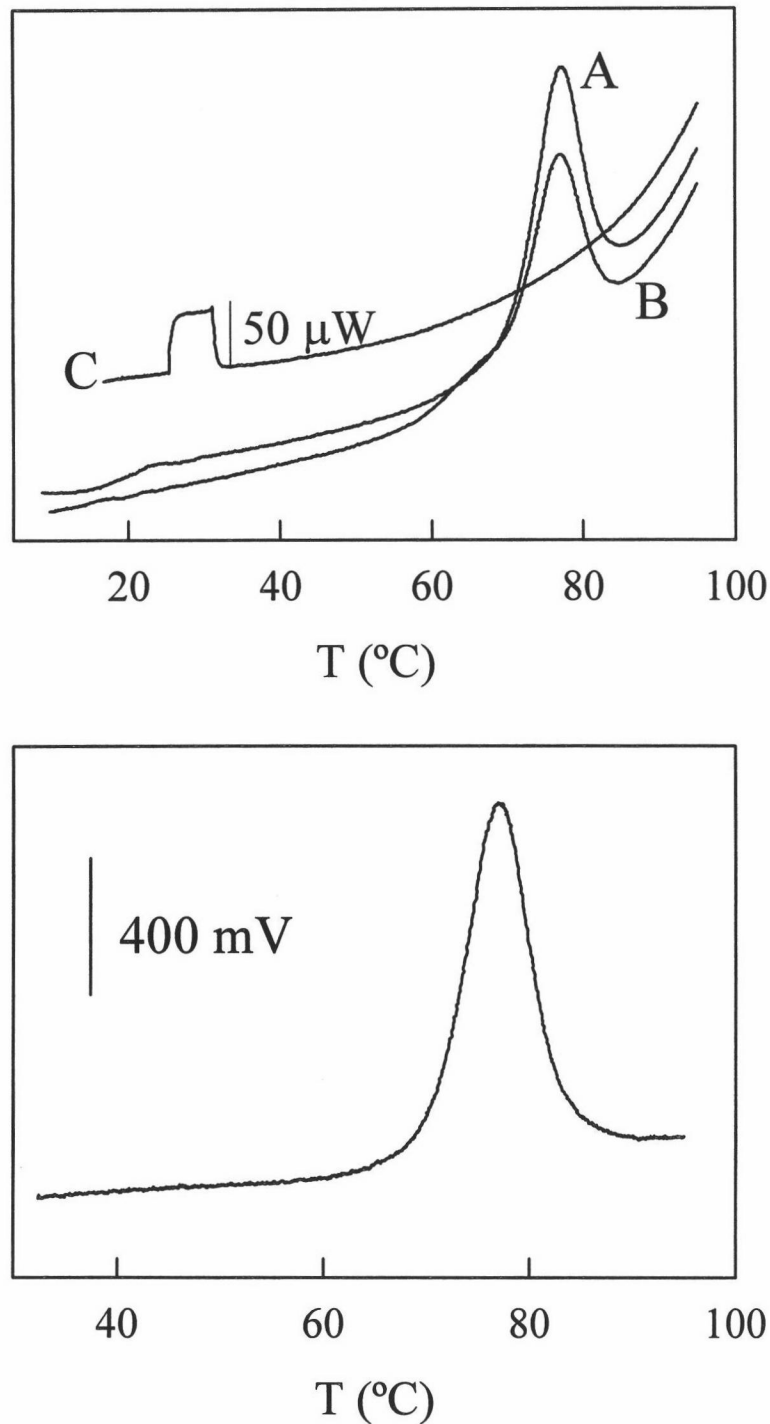


Figura 6: En la parte superior se muestran datos originales de calorimetría diferencial de barrido (señal de salida del instrumento versus temperatura) obtenidos con el DASM-1M a 1.76 K/min: (A) y (B) corresponden al primer y segundo barrido, respectivamente, de una muestra de lisozima en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5, 2 mg/mL. (C) es la línea base instrumental, en la que se muestra un calibrado eléctrico de 50 μ W. En la parte inferior, el resultado de corregir la línea base instrumental a la traza original.

C) Calibrado

La señal original del calorímetro (en mV) se calibra eléctricamente administrando un pulso de potencia conocida a una de las células y midiendo la variación en la señal que se origina como consecuencia (ver Figura 6). Conocida la potencia de entrada y la variación real en la señal, podemos calibrar la señal en las unidades de potencia adecuadas ($\text{kJ}\cdot\text{s}^{-1}$). Si además tenemos en cuenta la concentración y peso molecular de la proteína, la velocidad de barrido del experimento y el volumen de las células, es fácil obtener un factor de conversión, f , que permita transformar directamente mV a valores de capacidad calorífica ($\text{kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$):

$$f = \frac{M(\text{g/mol}) \cdot 60(\text{s/min}) \cdot 10^{-6}(\text{W}/\mu\text{W})}{k(\text{mV}/\mu\text{W}) \cdot V_{\text{cel}}(\text{mL}) \cdot c(\text{mg/mL}) \cdot v(\text{K/min})} \quad (11)$$

Para conseguir una calibración precisa de la señal se recomienda que el barrido que contenga un pulso de potencia se acompañe de otro en ausencia de éste. Es importante que el resto de los parámetros característicos del barrido sean idénticos y que la única diferencia entre dichos barridos sea la presencia/ausencia de pulso(s). Obviamente es crítico que ambas células contengan la misma solución ya que una variación en la capacidad calorífica entre las soluciones de la célula de referencia y la de muestra originaría grandes errores en la calibración.

En el caso del VP-DSC se aconseja llevar a cabo una calibración eléctrica cada 6 meses aproximadamente mientras que para el DASM-1M se comprobó de manera sistemática en cada experimento. Igualmente en el manual del VP-DSC se aconseja una calibración de temperatura cada 6 meses. Para ello disponemos de dos estándares (parafinas) fijados a unos capilares de acero y con puntos de fusión de 28.2 y 75.9 °C. Por supuesto, previamente a la calibración eléctrica o térmica hemos de estar seguros que se ha establecido la historia térmica del aparato.

D) Barrido de la muestra

Cuando se requiere sacar el máximo partido a las características del VP-DSC es necesario seguir ciertos protocolos adicionales en nuestro procedimiento experimental. Un aspecto importantísimo antes de comenzar un nuevo experimento es asegurarnos de la historia térmica del instrumento. El mayor grado de solapamiento entre sucesivos barridos, con o sin rellenar las células, se obtiene cuando el instrumento permanece en el mismo ciclo térmico (igual velocidad de barrido, igual temperatura de inicio y final de barrido, el mismo tiempo de equilibración entre el final de un barrido y el comienzo del siguiente) durante todos los experimentos que serán comparados.

Así pues, antes de pasar al barrido de la muestra debemos registrar al menos dos líneas base tampón-tampón sucesivas (sin rellenar las células) de manera que la diferencia entre ambas se encuentre dentro de las especificaciones del instrumento ($\pm 2 \mu\text{cal/grado}$). Esto será indicativo de que el aparato se encuentra estable y que su historia térmica no se ha interrumpido.

Para registrar el termograma correspondiente a la proteína en estudio basta rellenar la célula de muestra con nuestra disolución, dejando en la célula de referencia el tampón con el que se realizó la línea base instrumental (que es el mismo en el que va disuelta la muestra); ver Figura 6. La operación de vaciado de la célula de muestra y posterior llenado con la disolución de proteína conviene hacerla lo más rápido posible con objeto de tener el bloque calorimétrico destapado poco tiempo y así evitar irreproducibilidades. Para eliminar cualquier burbuja que hayamos podido introducir durante el llenado, empujamos el émbolo de la jeringa hacia abajo en movimientos cortos pero intensos, de manera que el flujo del líquido a presión que entra desplace a cualquier burbuja hacia afuera de la célula. Para conocer exactamente la concentración de proteína en el interior del calorímetro y teniendo en cuenta que se produce una dilución del 1 o

2% de la muestra en la célula, al no estar ésta completamente seca, lo más conveniente es registrar el espectro ultravioleta-visible de la solución sobrante de llenar la célula, cuya composición es igual a la del interior de ésta.

Generalmente un perfil típico de DSC muestra un pico (transición) que se atribuye a la absorción de calor asociada con la desnaturalización de la proteína (para algunas proteínas “complejas” se observa a menudo varias transiciones que solapan en mayor o menor medida), mientras que los valores de la señal en la pre-transición y post-transición reflejan las capacidades caloríficas parciales de los estado nativo y desnaturalizado de la proteína, respectivamente; en la Figura 7 se indican algunos de los parámetros más significativos en una transición calorimétrica.

Es posible obtener la capacidad calorífica parcial absoluta de la proteína a partir de la diferencia de capacidad calorífica entre muestra y referencia y teniendo el volumen molar parcial de la proteína (obtenido de medidas densitométricas). Para más detalles ver Privalov et al. (1989).

E) Segundo barrido de la muestra

Generalmente la reversibilidad de una muestra se expresa en términos del porcentaje del área bajo la curva que se recupera en el segundo barrido de la misma (ver Figura 6). Comprobar la reversibilidad de una muestra es un aspecto muy importante ya que no se puede aplicar un análisis basado en la termodinámica de equilibrio si la muestra presenta una transición irreversible y cinéticamente controlada.

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

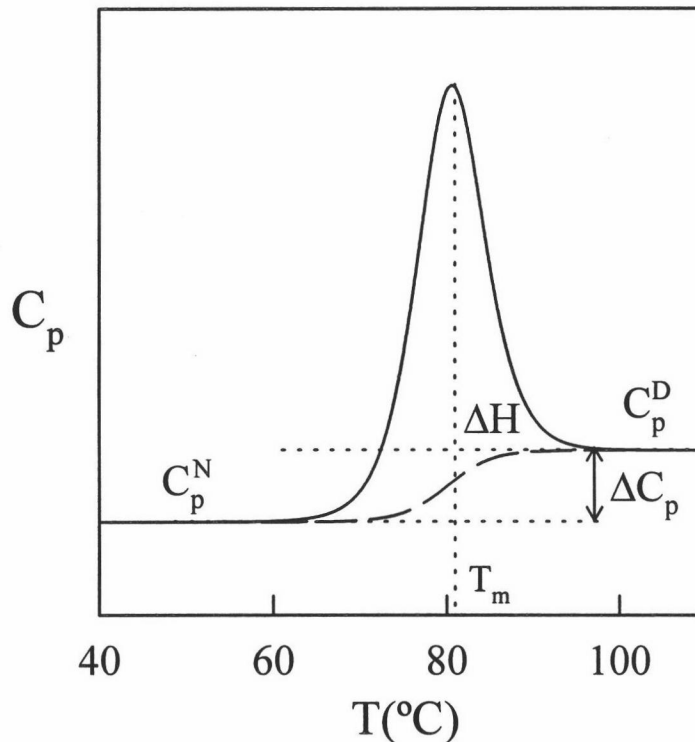


Figura 7: Curva de capacidad calorífica (trazo continuo) en función de la temperatura calculada para una proteína hipotética que despliega según un modelo de equilibrio de dos estados. C_p^N representa la capacidad calorífica del estado nativo y C_p^D la del estado desplegado. En trazo discontinuo se representa la línea base química. El área encerrada entre las dos curvas equivale a la entalpía de desnaturalización, ΔH . Los parámetros utilizados en la simulación son: $\Delta C_p = C_p^D - C_p^N = 7 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\Delta H = 400 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $T_m = 80^\circ\text{C}$.

2.2.2.4 Análisis preliminar de las trazas de DSC

Los ficheros generados por el programa de adquisición de datos contienen el valor de una señal proporcional a la variación de la capacidad calorífica de la disolución de proteína (en mV) con la temperatura. La manipulación de estos datos difiere según se trabaje con el DASM-1M o con el VP-DSC debido a que la calidad de las trazas obtenidas con éste último es mucho mayor que con el DASM-1M y, por otro lado, el conjunto de programas que acompañan al VP-DSC es mucho más avanzado lo que además facilita el proceso de análisis.

En primer lugar vamos a centrarnos en el análisis previo de las trazas obtenidas con el DASM-1M. Así, antes de analizar la traza de acuerdo a un modelo teórico, es necesario realizar una serie de correcciones a los datos originales:

1.- Corrección de la línea base instrumental

Se utilizó el programa CPCAL (escrito por el Dr. Freire, Johns Hopkins University) para restar la línea base tampón-tampón a las trazas obtenidas. Como ya se ha comentado, al restar la línea base instrumental estamos eliminando las distorsiones debidas al instrumento y obteniendo la variación de la capacidad calorífica de la proteína (todavía en mV) con la temperatura.

2.- Conversión de unidades

Dentro del mismo programa, CPCAL, tenemos una opción para convertir las unidades de salida originales del calorímetro (mV) a unidades de capacidad calorífica ($\text{kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$). Para ello usamos el factor de conversión calculado según la ecuación (11), teniendo en cuenta el factor de calibración, peso molecular y concentración de la proteína, velocidad de barrido y volumen de las células.

3.- Corrección de la línea base química

El perfil de capacidad calorífica obtenido una vez restada la línea base instrumental contiene dos contribuciones: **a)** La debida a la absorción de calor por el proceso de desnaturalización, y **b)** la capacidad calorífica intrínseca de la mezcla de los diferentes estados de la proteína y que viene dada por:

$$\langle \Delta C_{p, \text{intr}} \rangle = \sum_i \Delta C_{p, \text{intr}} \cdot x_i \quad (12)$$

donde $\Delta C_{p, \text{intr}}$ es el incremento en capacidad calorífica del estado i respecto del nativo a una

temperatura dada y x_i es la fracción presente del estado i a esa temperatura. La razón por la que normalmente las trazas de DSC empiezan y acaban a diferente altura es precisamente la variación de esta segunda contribución con la temperatura (línea base química). Esta dependencia es conocida fuera de los límites de la transición pero debe determinarse empíricamente dentro del rango de la transición. Una aproximación razonable a la verdadera línea química puede ser cualquier función que conecte de una manera suave los valores de la pre- y post-transición (ver Figura 7). Nosotros realizamos el trazado de la línea base química mediante el método de aproximación cúbica de trazador (“splines”), que a continuación explicamos brevemente. Se representa la pre-transición mediante una serie de puntos, correspondientes a parejas de valores experimentales (C_p , T), de manera que el último de éstos quede justo antes del comienzo de la transición. Igualmente se representa la post-transición mediante varios puntos situando el primero de ellos justo después de la transición. Todos esos puntos se utilizan como nodos para una interpolación cúbica de trazador (Burden y Faires, 1985), es decir, dos nodos contiguos se unen mediante un polinomio cúbico de forma que en cada nodo interior coinciden dos de estos polinomios. Los polinomios se calculan bajo la condición de que las derivadas primeras (y también las segundas) de dos polinomios coincidan en el nodo común. Esto hace que la interpolación cúbica de trazador sea visualmente continua. En realidad este tipo de aproximación origina una curva de forma similar a la que adoptaría una varilla larga y flexible que se hiciera pasar por todos los nodos.

Otro método empírico muy utilizado es el de Takahashi y Sturtevant (1981), en el que la línea base química varía entre los niveles pre- y post-transicional de forma proporcional al calor absorbido a cada temperatura.

Una vez determinada la línea base química la restamos al perfil de DSC para obtener la

contribución a la capacidad calorífica debida al proceso de desnaturalización térmica de la proteína.

4.-Corrección dinámica

Como todo instrumento de medida, el calorímetro tiene un cierto tiempo de respuesta de manera que las curvas obtenidas se encuentran ligeramente deformadas. Por ello es necesario corregir los termogramas. Para un calorímetro que presente una dinámica de primer orden basta realizar la siguiente operación:

$$C_p(T) = C_p^*(T) + \tau \cdot v \cdot \frac{dC_p^*(t)}{dt} \quad (13)$$

donde $C_p(T)$ es la señal real producida por el sistema en estudio, $C^*(T)$ la obtenida experimentalmente y que se encuentra distorsionada por la cinética del instrumento, v la velocidad de barrido y τ es el tiempo de respuesta del instrumento que previamente se ha determinado en el proceso de caracterización dinámica del mismo (López-Mayorga, 1983; Lechuga, 1986; López-Mayorga y Freire, 1987). Para el DASM-1M el valor de τ es de 11 segundos. El cálculo de $dC_p^*(T)/dT$ se ha hecho utilizando el algoritmo de Savitzky-Golay (1964) con una ventana de derivación de siete puntos.

Tanto la corrección de línea base química como la corrección dinámica se hicieron utilizando programas desarrollados en nuestro departamento.

Para las trazas obtenidas con el VP-DSC el análisis preliminar fue mucho más simple. Es posible importar nuestros ficheros al programa Microcal Origin para DSC v 4.1 y una vez aquí

restar la línea base instrumental y normalizar los datos según la concentración de proteína presente en el experimento. Tanto la conversión de mV a unidades típicas de capacidad calorífica como la corrección dinámica de la traza se hacen de manera automática al importar los datos de acuerdo con la última calibración realizada y con el tiempo de respuesta preseleccionado.

2.2.2.5 Análisis de los datos de DSC según la termodinámica de equilibrio

Bajo ciertas condiciones experimentales la desnaturalización de muchas proteínas globulares simples y algunas complejas es reversible (Privalov, 1979; 1982), recuperándose en gran medida la estructura nativa tras enfriar la disolución. Es en estos casos (que son los que vamos a describir en este trabajo) en los que es posible aplicar la formulación basada en la termodinámica de equilibrio suponiendo que en todo momento existe equilibrio químico entre los diferentes estados poblados de la proteína.

A la hora de analizar las trazas según un modelo teórico se utilizaron programas diferentes según se trate de datos obtenidos con el DASM-1M o con el VP-DSC. En el primer caso utilizamos programas desarrollados en nuestro departamento así como el programa CCFIT del Dr. Freire (Johns Hopkins University). Para las trazas obtenidas con el VP-DSC el análisis se llevó a cabo con el programa comercial MLAB, introduciendo la subrutina de ajuste concreta en cada caso (ver sección 4.3.1). Debido a la gran reproducibilidad de las líneas base instrumentales obtenidas con este calorímetro entendemos que las líneas base de la pre- y post-transición reflejan realmente la capacidad calorífica del estado nativo y desplegado, respectivamente, por lo cual no restamos línea base química a las trazas.

Llegados a este punto, vamos a exponer brevemente los modelos más sencillos y que han sido desarrollados ampliamente en la bibliografía.

2.2.2.5.1 El modelo de equilibrio de dos estados

Es el mecanismo más simple de desnaturalización en el que sólo los estados nativo (N) y desplegado (D) de la proteína están significativamente poblados



Las proporciones relativas de ambos estados a una temperatura dada están determinadas por el valor de la constante de equilibrio de desnaturalización (K) a dicha temperatura:

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

En general el cambio en un parámetro termodinámico debido a la desnaturalización (ΔJ) se define como la diferencia entre los valores de éste para el estado desplegado y el nativo: $\Delta J = J(D) - J(N)$, donde J puede ser energía de Gibbs (G), entalpía (H), entropía (S), capacidad calorífica a presión constante (C_p), etc. Según esta notación estamos tomando como estado de referencia el nativo.

La entalpía de exceso y la capacidad calorífica de exceso, siendo el estado nativo el de referencia, vienen dadas por:

$$\langle \Delta H \rangle = x_D \cdot \Delta H = \frac{K}{(1+K)} \cdot \Delta H \quad (15)$$

$$C_p^{ex} = \frac{\partial \langle \Delta H \rangle}{\partial T} = \frac{(\Delta H)^2}{RT^2} \cdot \frac{K}{(1+K)^2} + x_D \cdot \Delta C_p \quad (16)$$

donde x_D es la fracción molar de proteína en estado desplegado. Se han utilizado las ecuaciones

de van't Hoff y Kirchoff para expresar las dependencias de K y ΔH con la temperatura, respectivamente: $\partial \ln K / \partial T = \Delta H / (RT^2)$ y $\partial \Delta H / \partial T = \Delta C_p$. Los corchetes en las ecuaciones anteriores indican el valor promedio de las contribuciones de todos los estados de la proteína a ese parámetro termodinámico.

La temperatura de desnaturalización (T_m) se define como la temperatura a la cual $x_D=0.5$ y por tanto $K=1$ y $\Delta G=0$. Las transiciones predichas son prácticamente simétricas de manera que el valor de T_m está próximo al de la temperatura correspondiente al máximo en capacidad calorífica.

En la ecuación (16) vemos que la función capacidad calorífica de exceso consta de dos términos. El primero se debe al cambio inducido por la temperatura en el equilibrio de desnaturalización (tiene forma de pico) mientras que el segundo término representa la capacidad calorífica promedio de la proteína y corresponde a la línea base química (forma sigmoideal). El área encerrada entre la transición y la línea base química da el cambio total de entalpía debido al proceso de desnaturalización y que se conoce como *entalpía calorimétrica*, ΔH (ver Figura 7). Ésta depende de la temperatura, según la ecuación de Kirchoff y de ΔC_p . Se demuestra que no se comete mucho error cuando se asigna la entalpía calorimétrica a la temperatura de desnaturalización si la transición es simétrica y estrecha: ΔH_m . A $T = T_m$ el cambio en energía de Gibbs es cero de manera que el cambio de entropía a la T_m puede ser calculado como:

$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T_m} \quad (17)$$

En principio, el cambio en capacidad calorífica debido al proceso de desnaturalización puede también calcularse del perfil de DSC y por tanto, los valores de ΔG , ΔH y ΔS a una

temperatura T se pueden determinar usando las ecuaciones termodinámicas habituales:

$$\Delta H(T) = \Delta H_m + \int_{T_m}^T \Delta C_p \cdot dT \quad (18)$$

$$\Delta S(T) = \frac{\Delta H_m}{T_m} + \int_{T_m}^T \frac{\Delta C_p}{T} \cdot dT \quad (19)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T \cdot \Delta S(T) \quad (20)$$

Si consideramos el cambio en capacidad calorífica constante con la temperatura, entonces las ecuaciones (18), (19) y (20) quedarían como:

$$\Delta H(T) = \Delta H_m + \Delta C_p \cdot (T - T_m) \quad (21)$$

$$\Delta S(T) = \frac{\Delta H_m}{T_m} + \Delta C_p \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \quad (22)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \cdot \left[1 - \frac{T}{T_m}\right] + \Delta C_p \cdot \left[T - T_m - T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right] \quad (23)$$

La dependencia de ΔG con la temperatura predicha por la ecuación (23) se conoce como **curva de estabilidad** (Figura 8A). Sus propiedades más importantes se encuentran recogidas en los trabajos de Becketl y Schellman (1987) y Schellman (1987). A continuación comentamos las más significativas. Así, la curvatura viene dada por $\partial^2 \Delta G / \partial T^2 = -\Delta C_p / T$ y siempre adquiere valores negativos ya que ΔC_p es positivo. La pendiente de la curva se obtiene mediante la

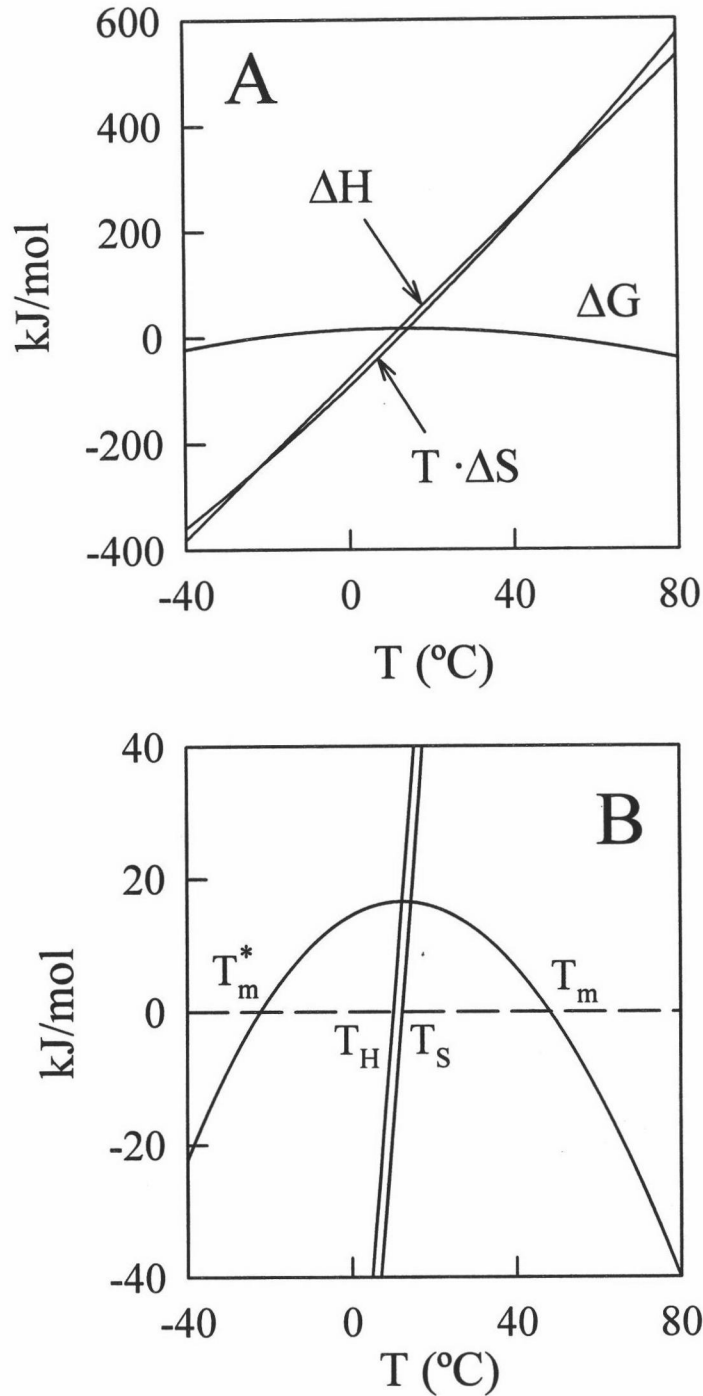


Figura 8: (A) Efecto de la temperatura en los cambios de entalpía, entropía y energía de Gibbs de desnaturalización de una proteína hipotética. (B) Ampliación mostrando las principales características de la curva de estabilidad de la proteína (perfil de ΔG versus T); se indican las temperaturas correspondientes a la desnaturalización caliente (T_m) y fría (T_m^*), así como las temperaturas de inversión de la entalpía (T_H) y entropía (T_S) a las que ΔH y ΔS se hacen cero, respectivamente. Los valores de ΔH , ΔS y ΔG se calcularon usando las ecuaciones (2.21)-(2.23) y valores de $T_m=48$ $^{\circ}\text{C}$, $\Delta H=290$ kJ/mol y $\Delta C_p=7.6$ kJ \cdot K $^{-1}$ \cdot mol $^{-1}$.

expresión $-\partial\Delta G/\partial T = \Delta S$ y muestra un extremo, concretamente un máximo, a la temperatura T_S en la que $\Delta S = 0$ (Figura 8B). La temperatura T_H , a la que ΔH se hace cero, es ligeramente más baja que T_S . La proteína nativa es estable en el rango de temperatura en el que $\Delta G > 0$. Vemos además en la Figura 8B que la curva de estabilidad cruza la línea de $\Delta G = 0$ en dos puntos, siendo el de temperatura más alta el correspondiente a la temperatura de desnaturalización T_m usada en el cálculo de la curva de estabilidad. El punto de corte correspondiente a la temperatura menor es el resultado de la extrapolación de la curva e indica que es posible desnaturalizar la proteína también por frío (desnaturalización fría), idea predicha hace unos 30 años por Brandts (1964) y demostrada experimentalmente por Privalov et al. (1986). En la mayoría de los casos la temperatura predicha a la que ocurre la desnaturalización fría está cerca o por debajo de 0°C , aunque es posible detectarla experimentalmente si se sobreenfría la disolución de proteína o por adición de urea o guanidina con objeto de desplazar dicha temperatura hacia valores superiores (ver Figuras 4.19 y 4.20, sección 4.3.1 correspondiente a los experimentos de DSC realizados con ubiquitina bovina y de levadura en presencia de diferentes concentraciones de guanidina).

Estudios de DSC recientes (Privalov et al., 1986; Griko et al., 1988a, 1989; Tamura et al., 1991; Griko y Privalov, 1992; Azuaga et al., 1992) sugieren que la desnaturalización fría es una propiedad común a las proteínas globulares, confirmando así las características ya mencionadas de la curva de estabilidad de proteínas.

Así pues, si tenemos los valores de T_m , ΔH_m y ΔC_p determinados a partir del termograma de DSC, entonces disponemos de una descripción termodinámica completa del proceso de desnaturalización de la proteína en estudio. En la Figura (7) muestra una simulación de un perfil de capacidad calorífica de exceso en función de la temperatura en donde se han señalado los parámetros más representativos.

Por supuesto todo este formalismo es sólo aplicable en el caso de que el modelo de equilibrio de dos estados describa adecuadamente el proceso de desnaturalización en estudio. Es posible determinar la aplicabilidad de dicho modelo a partir de un análisis directo de la transición de DSC. Si realizamos simulaciones dando diferentes valores a la entalpía de desnaturalización en la ecuación (16) veremos que ésta determina el área bajo la transición así como su anchura. La entalpía de desnaturalización calculada a partir de la forma (anchura) de la transición se conoce como *entalpía aparente o de van't Hoff* (ΔH^{vH}). Se puede derivar una expresión para ésta a partir del término debido al desplazamiento del equilibrio de desnaturalización por efecto de la temperatura en la ecuación (16) y considerando $T=T_m$ (y por tanto $K=1$):

$$\Delta H^{vH} = 4RT^2 \cdot \left[\frac{\Delta C_{p,m}}{\Delta H_m} \right] \quad (24)$$

donde $\Delta C_{p,m}$ es la capacidad calorífica de exceso a la temperatura T_m medida sobre la línea base química. El cociente $\Delta C_{p,m}/\Delta H_m$ no depende de la cantidad de proteína presente en la célula del calorímetro, pero sí es sensible a la forma (anchura) de la transición.

Obviamente no puede haber dos cambios de entalpía para el mismo proceso. A la ecuación (24) se llega suponiendo un modelo de dos estados, de manera que si realmente el proceso de desnaturalización en estudio transcurre según este modelo, encontraremos que las entalpías de van't Hoff y la calorimétrica son iguales dentro, por supuesto, del error experimental. Si por el contrario existen diferencias significativas entre estos dos valores se concluye que el proceso de desnaturalización no sigue un modelo de dos estados. Los resultados de este test del modelo de dos estados se suelen dar como la relación entre las entalpías calorimétrica-van't Hoff: $r = \Delta H_m / \Delta H^{vH}$. Así, si estados intermedios llegan a poblarse significativamente durante el

proceso, entonces la transición de DSC será más ancha que la predicha por el modelo de dos estados, y por consiguiente, la entalpía de van't Hoff será menor que la calorimétrica. Otro caso que puede conducir a un parámetro r aparentemente distinto de la unidad es la presencia de desnaturalización fría en la traza calorimétrica ya que en este caso ΔH^{vH} y ΔH podrían no estar bien determinadas con las ecuaciones habituales. En estas condiciones ΔH estaría infravalorado y ΔH^{vH} sobreestimado. Un claro ejemplo se puede encontrar en este trabajo, concretamente en los experimentos de DSC realizados con ubiquitina en presencia de guanidina (Figuras 4.15 y 4.16; sección 4.3.1).

Privalov y colaboradores han encontrado una relación $r=1.05\pm 0.03$ para diversas proteínas globulares pequeñas (Privalov, 1979), indicando una baja proporción de estados intermedios, y por tanto, una buena concordancia con el modelo de dos estados.

2.2.2.5.2 Modelo de equilibrio multiestado

En ocasiones nos encontramos con transiciones calorimétricas reversibles que no pueden explicarse con un modelo tan sencillo como el descrito. Son los casos en los que aparecen varias transiciones separadas, o bien, aquellos en los que aún existiendo un sólo pico, las entalpías calorimétricas y de van't Hoff no coinciden. Es aquí donde el parámetro r nos resulta de gran utilidad. Si $r < 1$ indica que existe cooperatividad intermolecular, es decir, la unidad cooperativa no es un monómero sino un dímero u otro estado de agregación superior al que se suponía inicialmente. Si $r > 1$ debemos considerar la presencia de estados intermedios en la desnaturalización térmica de la proteína en estudio. En este apartado vamos a centrarnos en este último caso.

Esquema multiestado

Un mecanismo general para la desnaturalización térmica de proteínas en equilibrio fue propuesto por Freire y Biltonen (1978). Estos autores proponen que el estado nativo (I_0) pasa al estado desnaturalizado (I_n) a través de $n-1$ estados intermedios:



El análisis se simplifica si usamos el formalismo de la función de partición. Tomamos como referencia el estado nativo y definimos los pesos estadísticos (ω_i) para cada uno de los estados como el cociente entre su concentración y la del estado de referencia:

$$\omega_i = \frac{[I_i]}{[I_0]} = K_i = \exp(-\Delta_N^i G / RT) \quad (25)$$

Toda la información relevante sobre el sistema está contenida en la función de partición (Z) que se define como la suma de los pesos estadísticos:

$$Z = \sum_{i=0}^n \omega_i = \sum_{i=0}^n \exp(-\Delta_N^i G / RT) = 1 + \sum_{i=1}^n \exp(-\Delta_N^i G / RT) \quad (26)$$

La fracción de proteína (x_i) presente en un determinado estado I_i , viene dada por el cociente entre el peso estadístico de ese estado y la función de partición:

$$x_i = \omega_i / Z = (1/Z) \cdot \exp(-\Delta_N^i G / RT) \quad (27)$$

La entalpía de exceso, promedio de las contribuciones de todos los estados presentes viene dada por:

$$\langle \Delta H \rangle = \sum_{i=0}^n x_i \cdot \Delta_N^i H = (1/Z) \cdot \sum_{i=0}^n \Delta_N^i H \cdot \exp(-\Delta_N^i G / RT) \quad (28)$$

Y la capacidad calorífica de exceso :

$$C_p^{ex} = \partial \langle \Delta H \rangle / \partial T = (\langle \Delta H^2 \rangle - \langle \Delta H \rangle^2) / (RT^2) + \langle \Delta C_p \rangle \quad (29)$$

donde $\langle \Delta H^2 \rangle$ es el valor medio de ΔH^2 [$= \sum x_i \cdot (\Delta_N^i H)^2$]. El primer término de la ecuación (29) se debe al desplazamiento del equilibrio de desnaturalización inducido por la temperatura mientras que el segundo término es la capacidad calorífica media de la proteína [$\langle \Delta C_p \rangle = \sum \Delta_N^i C_p \cdot x_i$] y corresponde a la línea base química.

A partir de la ecuación (28) y mediante una doble integración es posible obtener la función de partición como función de la temperatura:

$$\ln[Z(T)] = \int_{T_0}^T (1/RT^2) \cdot \langle \Delta H \rangle \cdot dT = \int_{T_0}^T (1/RT^2) \cdot \left(\int_{T_0}^T C_p^{ex} \cdot dT \right) \cdot dT \quad (30)$$

donde T_0 es una temperatura en la que toda la proteína está presente como estado nativo.

Vemos como un perfil de DSC contiene (al menos en teoría) toda la información requerida para caracterizar completamente el proceso de desnaturalización en equilibrio como ya señalaron Freire y Biltonen. Estos autores desarrollaron un procedimiento recursivo por pasos para determinar el número de estados intermedios significativamente poblados y caracterizarlos termodinámicamente. También es posible encontrar en la bibliografía modos alternativos de deconvolucionar un perfil de DSC (Filimonov et al., 1982; Gill et al., 1985).

Es posible generalizar el formalismo de la función de partición descrito para incluir

efectos de unión de ligando y oligomerización.

2.2.3 FLUORESCENCIA

2.2.3.1 Generalidades

La fluorescencia intrínseca de las proteínas se viene usando comúnmente para detectar y seguir cambios conformacionales y más concretamente cambios en el ambiente de los fluoróforos. Hemos elegido esta técnica para nuestros estudios de desnaturalización por codisolventes debido a su gran sensibilidad, bajo requerimiento de muestra y fácil disponibilidad.

A continuación detallamos algunos de los aspectos experimentales relativos a cada una de las proteínas estudiadas:

Lisozima

Lisozima tiene seis triptófanos en su secuencia, en posiciones 28, 62, 63, 108, 111 y 123, aunque no todos contribuyen de igual manera a la señal de fluorescencia en la proteína nativa. Experimentos de oxidación selectiva realizados por Imoto et al. (1971) han puesto de manifiesto que la contribución mayoritaria a la señal se debe a los restos en posiciones 62 y 108 de manera que cuando éstos son oxidados la fluorescencia residual es sólo el 20%. Concretamente las contribuciones individuales rondan el 35-75% debida al Trp-62 y 45-65% debida al Trp-108. Por otro lado la contribución de estos residuos a la señal correspondiente al estado desplegado en alta guanidina es del 50% aproximadamente. Además lisozima contiene 3 tirosinas, aunque la contribución de éstas a la señal de fluorescencia es de poca importancia.

Todos los experimentos de fluorescencia realizados con lisozima se hicieron en el

espectrofluorímetro modelo Perkin-Elmer LS-5.

La longitud de onda de excitación fue 280 nm, debido obviamente, a que es aquí donde la proteína tiene su máximo de absorción. Para poder elegir la longitud de onda de emisión hay que comparar los espectros de emisión correspondientes a muestras de proteína nativa y desplegada a alta concentración de desnaturalizante. Se escoge aquella en la que exista una mayor diferencia entre la señal proveniente de la molécula nativa y la desplegada para aumentar la sensibilidad en nuestras medidas. A la vista de la Figura 9 la longitud de onda de emisión seleccionada para los experimentos con lisozima fue 360 nm.

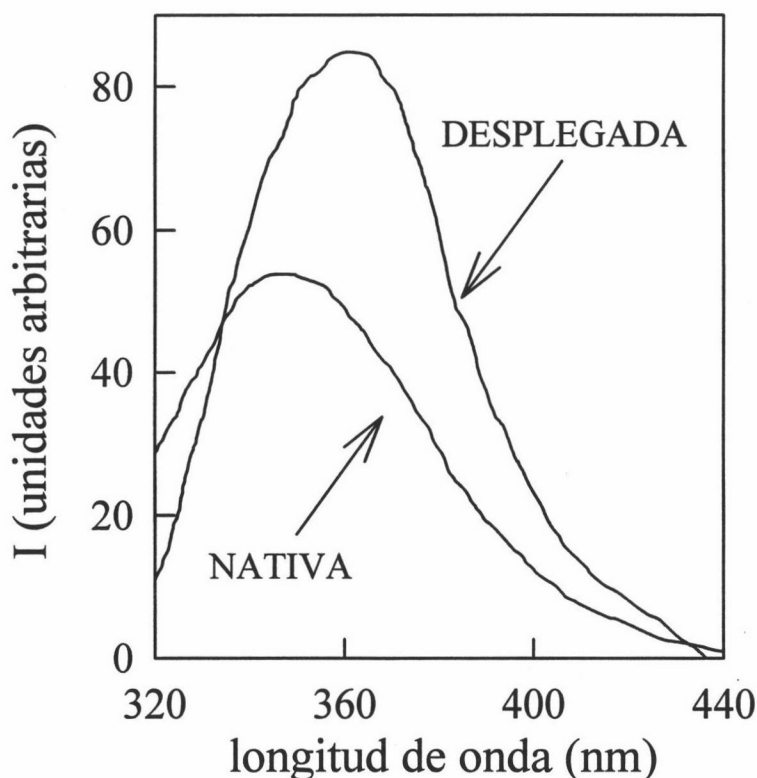


Figura 9: Espectros de emisión de fluorescencia a 25 °C de lisozima en estado nativo y desplegado, excitando a 280 nm. La proteína nativa se preparó en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5 mientras que la desplegada se preparó en 7.1 M guanidina disuelta en este mismo tampón. La concentración de proteína es de 0.01 mg/mL en ambos casos. La velocidad de barrido 12 nm/cm y las rendijas de excitación y emisión 2.5 nm; se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Vemos como la máxima diferencia entre los dos espectros se produce a 360 nm.

A continuación hay que establecer el rango de concentración de proteína en disolución en el que la señal de fluorescencia cambia linealmente (ver Figura 10). Este aspecto es muy importante a la hora de poner a punto cualquier método fluorimétrico ya que interesa obtener la máxima relación señal/ruido, pero dentro de este rango lineal para evitar así efectos no deseados como el de filtro interno. Para ello hemos medido la intensidad de fluorescencia de disoluciones de proteína de concentración comprendida en el rango de 0.01 a 0.06 mg/mL encontrando una dependencia lineal como se observa en la Figura 10. Esto se ha comprobado tanto para la proteína nativa como desplegada en alta concentración de guanidina.

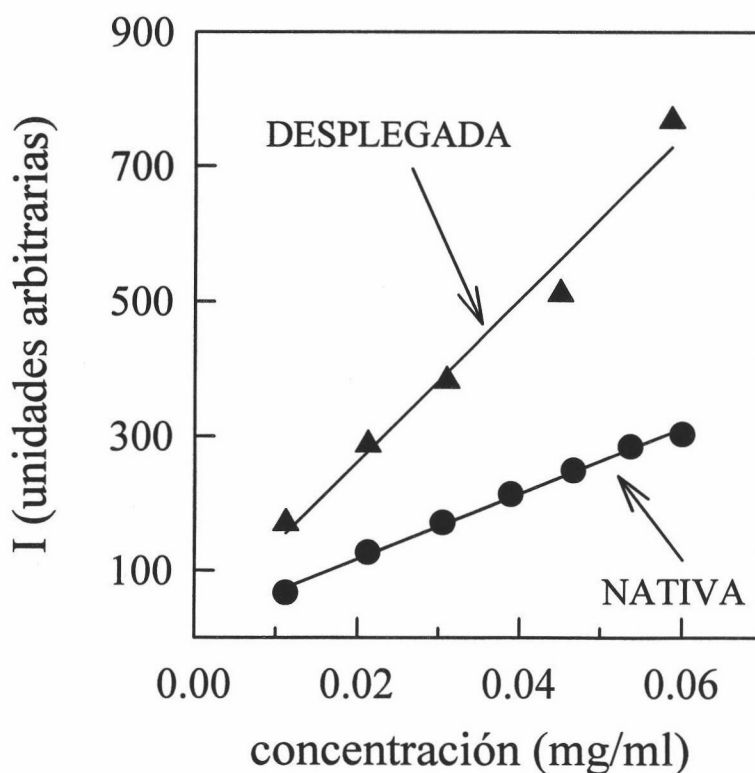


Figura 10: Dependencias de la intensidad de fluorescencia emitida a 360 nm de lisozima nativa y desplegada con la concentración de proteína. Las muestras nativas se prepararon en acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5 mientras que las desplegadas en 8.0 M guanidina disuelta en el mismo tampón. La longitud de onda de excitación es 280 nm; las rendijas de excitación y emisión son 2.5 nm, respectivamente, y la temperatura 25 °C. Las líneas continuas representan el mejor ajuste lineal a los datos.

Por último debemos fijar los valores óptimos de anchura de las rendijas de excitación y emisión. Si la calidad de la señal es suficiente se suele usar una rendija de excitación estrecha para así reducir la intensidad de la radiación que le llega a la muestra y evitar la potencial descomposición fotoquímica de la misma. La apertura de la rendija de emisión dependerá de la señal que se consiga. Debemos jugar con diferentes valores hasta conseguir una buena relación señal/ruido. Para los experimentos de lisozima se usaron rendijas de excitación y emisión de 2.5 nm, respectivamente.

Ubiquitina

La señal de fluorescencia en ubiquitina proviene de la única tirosina que tiene en posición 59, ya que carece de triptófanos, por lo que su intensidad va a ser considerablemente más pequeña si la comparamos con lisozima. Además se sabe que la emisión de fluorescencia se ve atenuada por la forma desprotonada de al menos un grupo carboxílico espacialmente próximo a la tirosina (Jenson et al., 1980); ver secciones 4.1.1 y 4.1.2.

La mayor parte de los experimentos se realizaron en el espectrofluorímetro modelo Perkin-Elmer LS-5 exceptuando los perfiles de desnaturalización inducida por pH a concentración de guanidina constante (ver Figura 4.3) que se obtuvieron con un Perkin-Elmer LS50B.

Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 279 y 310 nm respectivamente (ver Figura 11), y la anchura de las rendijas de excitación y emisión 2.5 y 5 nm.

Por último debemos mencionar que se comprobó la intensidad de fluorescencia de los controles correspondientes a cada muestra y en todo el rango de concentración de desnaturalizante, obteniéndose valores prácticamente despreciables en comparación con el de la

proteína. Es por esto que no hemos considerado necesario en ningún caso restar el valor del control a la muestra.

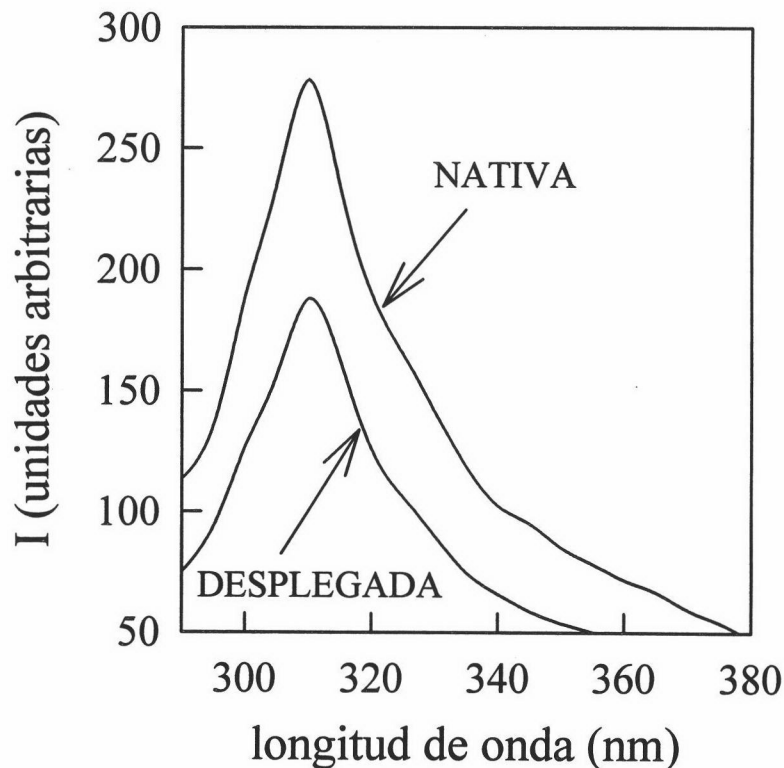


Figura 11: Espectros de emisión de fluorescencia a 25 °C de ubiquitina de glóbulos rojos bovinos nativa y desplegada, excitando a 279 nm. La proteína nativa se preparó en tampón acetato sódico 10 mM/ácido acético, pH 3.5 mientras que la desplegada en 8.0 M guanidina disuelta en este mismo tampón. La concentración de proteína es de 0.04 mg/mL en ambos casos. La velocidad de barrido 12 nm/cm y las rendijas de excitación y emisión 2.5 y 5 nm, respectivamente; se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Vemos como la máxima diferencia entre los dos espectros se produce a 310 nm.

2.2.3.2 Ensayos cinéticos de desplegamiento

Ya hemos visto en la sección 2.2.2.5.1 como la no coincidencia de las entalpías calorimétrica y de van't Hoff puede ser un indicativo de la presencia de intermedios significativamente poblados en el desplegamiento térmico de la proteína. En el caso de

transiciones inducidas por cambios en el disolvente, no existe un criterio similar para confirmar la validez del modelo de dos estados. A menudo la coincidencia de varios perfiles obtenidos siguiendo propiedades espectroscópicas diferentes tales como absorbancia, fluorescencia, elipticidad, etc. se ha tomado como una buena evidencia a pesar de que intermedios que mostrasen propiedades similares al estado nativo no serían detectados. Por tanto, para determinar la naturaleza del desplegamiento inducido por desnaturalizantes no es suficiente con seguir cambios en las propiedades físicas ya que éstas contienen contribuciones de todas las especies presentes que en ocasiones pueden no ser fácilmente separables. En cambio medir directa e independientemente la concentración de moléculas en estado nativo, desplegado y posibles intermedios, en función de la concentración de desnaturalizante sería una prueba más determinante.

En este trabajo hemos aplicado un método cinético propuesto por Mücke y Schmid (1994) para determinar la concentración de moléculas de proteína en estado nativo. En efecto, es posible conocer la fracción molar de proteína presente en estado nativo, dadas unas condiciones determinadas de concentración de desnaturalizante y temperatura, a partir de las cinéticas de desnaturalización observadas al transferir la proteína a condiciones fuertemente desnaturalizantes. En estas condiciones los estados parcialmente desplegados normalmente desnaturalizan más rápidamente que el estado nativo (Schmid, 1992) de manera que es posible seguir independientemente el desplegamiento de éste y calcular la cantidad presente en la muestra original a partir de la amplitud de las cinéticas observadas.

Hemos aplicado los ensayos de desplegamiento para determinar la fracción de estado nativo en:

- muestras de proteína incubadas en presencia de diferentes concentraciones de

desnaturalizante en condiciones de equilibrio.

- cinéticas de desplegamiento inducido por desnaturalizantes (experimentos de interrupción del desplegamiento).

En cualquiera de estos casos el procedimiento experimental es similar: transferimos una alícuota de la muestra hasta condiciones desnaturalizantes en la célula de medida del fluorímetro (también termostatizada) y seguimos la cinética de desplegamiento a través del cambio en la señal de fluorescencia con el tiempo. Es crucial que las condiciones finales para cada ensayo de desplegamiento sean exactamente las mismas, esto es, igual temperatura e igual concentración final de proteína y desnaturalizante en la cubeta de medida. Hay que prestar especial atención a este último aspecto ya que según sea la concentración de guanidina o urea en la muestra original, estaremos alterando la concentración final de desnaturalizante en la célula de medida al añadir la alícuota de proteína en cada caso. Para mantener las mismas condiciones finales en la cubeta y evitar una variación de las constantes de velocidad de las cinéticas como consecuencia, debemos añadir un volumen igual en todos los casos que contenga la cantidad de guanidina o urea necesaria para compensar la añadida en la muestra más concentrada.

Para cinéticas de primer orden la dependencia de la intensidad de fluorescencia con el tiempo viene dada por la ecuación de velocidad siguiente:

$$I = I_{\infty} - \Delta I \cdot e^{(-t/\tau)} \quad (31)$$

donde I_{∞} es la intensidad de fluorescencia a tiempo infinito, ΔI la amplitud de la exponencial y τ el tiempo de relajación que se define como el tiempo requerido para que la concentración de reactivo disminuya $1/e$ de su valor inicial. τ viene dado por inversa de la constante de velocidad:

$$\tau = \frac{1}{k} \quad (32)$$

Es necesario realizar un experimento control en el que se siga la cinética de desplegamiento de la proteína transferida desde tampón acuoso hasta exactamente las mismas condiciones de los ensayos de desplegamiento de las muestras. Así la amplitud de esta cinética, ΔI^0 , corresponderá al 100% nativo ($x_N=1$). La comparación de este control con el resto de las muestras nos dará una doble información:

1.- Si los valores de τ para cada cinética de desplegamiento permanecen constantes, indicaría que las moléculas de N que existen en el rango de concentración de desnaturizante en donde tiene lugar la transición son indistinguibles de aquellas que existen en condiciones nativas.

2.- La amplitud relativa de la cinética de desplegamiento con respecto al control es una medida directa de la fracción de moléculas de proteína que están en el estado nativo, en las condiciones en las que se encontraba la muestra original:

$$x_N = \frac{\Delta I}{\Delta I^0} \quad (33)$$

En la Figura 12 hemos representado algunos perfiles cinéticos correspondientes a ensayos de desplegamiento realizados a muestras incubadas a diferentes concentraciones de guanidina. Claramente la amplitud de estas cinéticas va disminuyendo al aumentar la concentración de desnaturizante.

Si disponemos del perfil x_N versus concentración de desnaturizante podemos compararlo con los perfiles derivados del cambio de cualquier propiedad espectroscópica por efecto del disolvente. Si las curvas coinciden indicaría que la presencia de intermedios de características

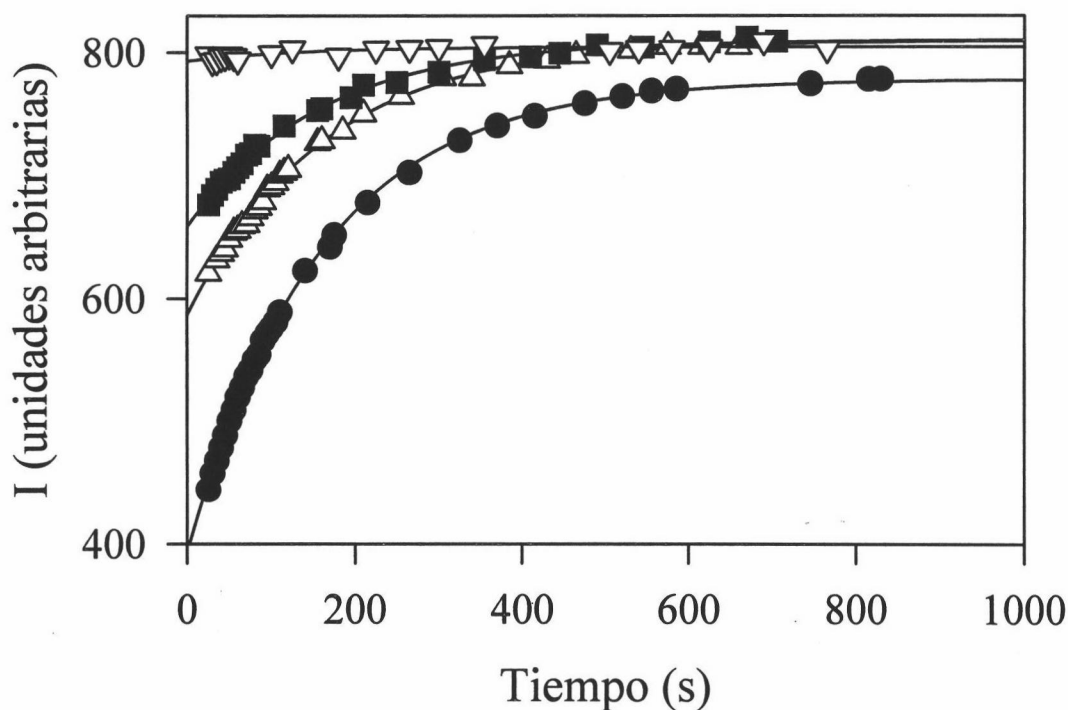


Figura 12: Perfiles cinéticos registrados después de transferir una alícuota de lisozima incubada a 30 °C en: (●) 0.58, (Δ) 3.85, (■) 4.04 y (▽) 4.65 M guanidina, hasta alcanzarse el equilibrio, a condiciones fuertemente desnaturizantes (7.8 M guanidina, pH 4.5, T=18 °C). Las líneas representan los mejores ajustes de la ecuación (2.31) a cada perfil cinético.

diferentes a D es poco probable. Por el contrario si la concentración de moléculas en estado nativo decrece más rápidamente que la propiedad física medida, entonces esto sugeriría que existe un intermedio significativamente poblado que es diferente a D en esa propiedad y que despliega más rápidamente en el ensayo de desplegamiento.

Las ventajas que presenta este método cinético a la hora de caracterizar una transición inducida por codisolventes frente al procedimiento “clásico” de seguimiento de una propiedad espectral son:

a) No es necesario presuponer ningún tipo de mecanismo de desplegamiento a priori ya que medimos directamente x_N .

b) No se requiere de una extrapolación de las líneas base; obviamente éstas serán igual a 1 y 0 en la pre- y post-transición.

Por otro lado, también es importante señalar que el ensayo de desplegamiento cinético descrito sería capaz de discriminar entre moléculas nativas y parcialmente desplegadas pero no distinguiría entre éstas y las desplegadas. Este test tampoco detectaría intermedios que no difieran del estado desplegado en propiedades físicas o que desplegaran tan lentamente como lo hace la proteína nativa, aunque tales especies son poco frecuentes debido a la gran barrera energética que separa ambos estados.

2.2.3.3 Ensayos cinéticos de replegamiento

Una vez descrito el ensayo cinético de desplegamiento parece casi obvio plantear un procedimiento paralelo para obtener la fracción de estado desplegado en unas condiciones dadas. Esta idea fue apuntada también por Mücke y Schmid (1994) aunque estos autores se limitaron a señalar las dificultades inherentes a estos ensayos de replegamiento, que impiden una determinación sencilla y precisa del número de moléculas presentes en el estado desplegado.

Hemos puesto a punto ensayos de replegamiento para determinar la fracción molar de estado desplegado, x_D , en unas condiciones concretas de temperatura y concentración de desnaturizante para lisozima (ver sección 5.2). Las dificultades que se plantearon eran de dos tipos:

- de tipo práctico, es decir, cinéticas integradas por varias exponenciales indicando que el proceso de replegamiento no es simple debido a la presencia de intermedios cinéticos y/o la heterogeneidad del estado desplegado. Efectivamente, la complejidad fundamental del proceso de replegamiento viene dada por la heterogeneidad conformacional del estado desplegado. Bajo

este nombre se engloban un conjunto de microestados que pueden dar lugar a múltiples procesos de replegamiento con pasos paralelos y secuenciales, con constantes de velocidad muy diferentes.

Hemos sorteado estos “inconvenientes” realizando los ensayos en condiciones moderadamente nativas (en torno a 3.2M guanidina; ver Figura 3.19). Esto es así ya que, por un lado los intermedios cinéticos en el replegamiento de lisozima llegan a poblarse significativamente a concentraciones de guanidina menores a 3.2M (ver Figura 3 en Kiefhaber, 1995 y Figura 3.19) y porque en el caso de lisozima la heterogeneidad del estado desplegado a la que hemos hecho mención anteriormente no parece conducir a una gran complejidad cinética. Así, en condiciones nativas, la mayor parte de la población en el estado desplegado (aproximadamente un 90%) alcanza el estado nativo en segundos mientras que sólo un 10% de las moléculas se repliegan a través de una fase más lenta, resultado probablemente de un proceso de isomerización de las prolínas (Kato et al., 1981; Kato et al., 1982). En nuestros ensayos de replegamiento en condiciones moderadamente nativas, nunca hemos detectado esta fase lenta posiblemente porque se había establecido el equilibrio entre las especies de plegamiento lento y rápido en la escala de tiempo de nuestros experimentos, de manera que ambas moléculas se comportan como una única especie desde un punto de vista cinético.

- dificultades de interpretación. Es importante señalar que así como los ensayos de desplegamiento constituyen un excelente método para caracterizar una transición inducida por cambios en el disolvente, ya que se mide directamente x_N , los resultados derivados de los ensayos de replegamiento deben tomarse con más cautela ya que las moléculas D e I podrían encontrarse en rápido intercambio y no serían discriminadas en este tipo de ensayos.

El procedimiento experimental es muy similar al de los ensayos de desplegamiento.

Transferimos una alícuota de la muestra hasta condiciones moderadamente nativas (3.2M guanidina, que está claramente por debajo de la transición y 20 °C) en la célula del fluorímetro y seguimos la cinética de replegamiento a través de la disminución de la señal de fluorescencia con el tiempo. Al igual que en los ensayos de desplegamiento, es necesario compensar en cada muestra el exceso de guanidina o urea añadido en la muestra más concentrada para obtener idénticas condiciones finales.

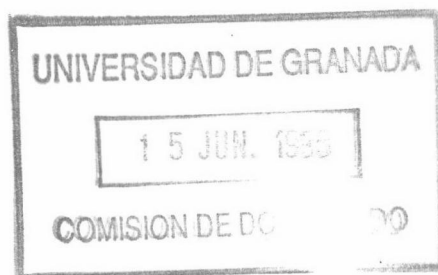
En estas condiciones el replegamiento de la proteína previamente incubada se describe mediante una sola exponencial:

$$I = I_{\infty} + \Delta I \cdot e^{(-t/\tau)} \quad (34)$$

Otra ventaja más de realizar las cinéticas de lisozima en 3.2 M guanidina es que la constante de velocidad (a 20 °C) es de varios minutos (ver Figura 3.19) de manera que es posible seguir la cinética sin necesidad de un stopped-flow, instrumentación de la que no disponemos.

Al igual que los ensayos de desplegamiento, necesitamos de un control que nos de la amplitud correspondiente al 100% de estado desplegado. Para ello seguimos la cinética de plegamiento de una alícuota de proteína que ha sido incubada en presencia de una alta concentración de guanidina (claramente superior al rango de concentración donde se encuentra la transición a esa temperatura), exactamente en las mismas condiciones que el resto de los ensayos de replegamiento. Una vez obtenida la amplitud de esa cinética, ΔI^0 , entonces es fácil obtener la fracción molar de estado desplegado como:

$$x_D = \frac{\Delta I}{\Delta I^0} \quad (35)$$



En la Figura 13 se representan algunas cinéticas correspondientes a ensayos de replegamiento realizados a muestras incubadas en presencia de diferentes concentraciones de guanidina. Vemos cómo la amplitud va disminuyendo a medida que la concentración de desnaturalizante aumenta.

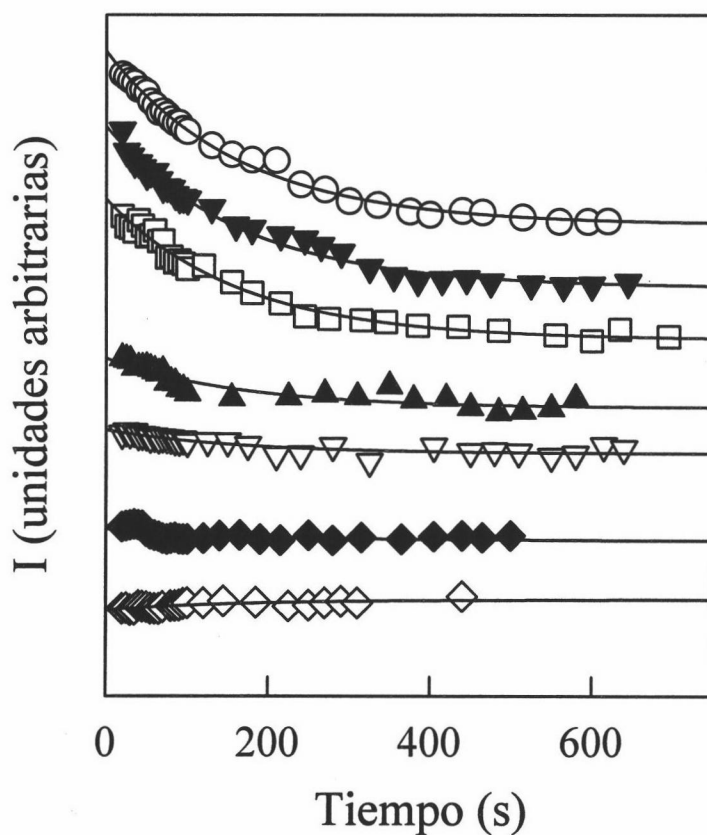


Figura 13: Perfiles cinéticos registrados después de transferir una alícuota de lisozima incubada a 20 °C en: (▼) 7.6, (□) 6.3, (▲) 5.4, (▽) 4.0, (◆) 3.3 y (◇) 2.6 M guanidina, hasta alcanzarse el equilibrio, a condiciones moderadamente nativas (3.2 M guanidina, tampón acetato sódico, pH 4.5, 20 °C). Las curvas se han desplazado a lo largo del eje y por propósitos ilustrativos. Las líneas representan los mejores ajustes de la ecuación (2.34) a cada perfil cinético.

3. ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO
DE LISOZIMA INDUCIDO
POR GUANIDINA

ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO DE LISOZIMA INDUCIDO POR GUANIDINA

En esta parte de nuestro trabajo describiremos, en primer lugar, los estudios llevados a cabo para caracterizar el desplegamiento inducido por guanidina de lisozima, en el rango de 20-56 °C:

- equilibrio de desnaturalización estudiado por fluorescencia (sección 3.1).
- ensayos de desplegamiento (sección 3.2).
- estudio de las cinéticas en la dirección del desplegamiento-replegamiento (sección 3.3).

El análisis según el modelo de dos estados de los perfiles experimentales nos permitirá obtener los parámetros característicos de la transición, como $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$, así como los valores de ΔG_w mediante extrapolación lineal [ecuación (1.7)].

En la sección 3.4 se estudia la desnaturalización térmica de lisozima en presencia de diferentes concentraciones de guanidina, mediante experimentos de DSC: obtenemos la curva de estabilidad en disolución acuosa así como los valores de $m_{1/2}$ de desnaturalización a cada concentración de desnaturalizante estudiada.

A continuación comparamos los valores de ΔG de desnaturalización determinados por extrapolación lineal y la curva de estabilidad calculada por DSC, encontrando una diferencia de unos 15 kJ/mol en todo el rango de temperatura estudiado (ver sección 3.5). Este resultado nos lleva, en primer lugar, a estudiar la validez de la aproximación lineal, en el caso de lisozima, a través de la dependencia de los valores de $m_{1/2}$ con la concentración de guanidina que se describe en la sección 3.6, para después proponer un nuevo método de extrapolación. Lo hemos denominado **procedimiento de extrapolación a ΔG constante** y se detalla en la sección 3.7. Por último, interpretamos la discrepancia encontrada en los valores de ΔG en términos de la

contribución electrostática a la estabilidad de la proteína (sección 3.8).

En el último apartado se recogen también algunos comentarios acerca del estado de transición de lisozima en el desplegamiento a alta concentración de guanidina (sección 3.9).

3.1 ESTUDIO MEDIANTE MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDO POR GUANIDINA

Hemos caracterizado el equilibrio de desnaturalización de lisozima inducido por guanidina a partir de perfiles de intensidad de fluorescencia *versus* concentración de desnaturalizante, en el rango de temperaturas comprendido entre 30 y 56 °C.

3.1.1 Procedimiento experimental

La proteína fue dializada en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4.5 preparado según se indica en el apartado 2.2.1.1. La concentración final en los experimentos fue 0.05 mg/mL. Para preparar la disolución concentrada de desnaturalizante se siguió el procedimiento A) detallado en el apartado 2.2.1.2. Los parámetros instrumentales se indican en el apartado 2.2.3.1.

En primer lugar preparamos las mezclas tampón-guanidina para todo el rango de concentración en el que se medirá la fluorescencia (de 0 a 6 M aproximadamente). De cada una de ellas pipeteamos un volumen constante que depositamos en pequeños tubos de vidrio y al que añadiremos la cantidad de proteína necesaria para alcanzar la concentración final deseada. Es importante mezclar bien todo, agitando el tubo muy suavemente, para que la concentración de guanidina en la muestra sea homogénea. A continuación ponemos las muestras a incubar en un baño de agua a la temperatura de trabajo durante el tiempo necesario para que el equilibrio se

alcance. Las muestras para los experimentos a 30, 33 y 37 °C se incubaron durante 3 horas mientras que para temperaturas superiores fue suficiente con 2 horas (en la Figura 19 se muestra la dependencia de la constante de velocidad aparente con la concentración de guanidina a diferentes temperaturas). Una vez transcurrido este tiempo transferimos, ayudados de una pipeta Pasteur, cada una de las disoluciones a la célula de medida del fluorímetro situada en el portacubetas, que se encuentra a su vez termostatizada a la misma temperatura. Antes de medir esperamos de 10 a 15 minutos para asegurarnos que la medida se hace a la temperatura indicada. Normalmente tomamos como valor la media de tres medidas. Por último medimos el índice de refracción de la disolución para conocer la concentración exacta de guanidina [ecuación (2.9)].

Hemos estudiado la reversibilidad de la desnaturalización inducida por guanidina a 15.2 y 35.0 °C. Para ello preparamos dos tandas de muestras paralelamente, de manera que en una se parte de proteína en tampón acuoso y se diluye a diferentes concentraciones de guanidina mientras que en la otra partimos de proteína en 8 M guanidina (desplegada) y la transferimos a distintas concentraciones de desnaturalizante; a continuación incubamos hasta asegurarnos que el equilibrio se ha establecido. Los perfiles de intensidad de fluorescencia que resultan se muestran en la Figura 1; como puede observarse la transición es muy reversible, lo que nos permitirá aplicar la termodinámica de equilibrio en el análisis posterior de los datos.

En los experimentos iniciales observamos cómo sistemáticamente obteníamos perfiles bifásicos de intensidad de fluorescencia *versus* concentración de guanidina. En la Figura 2A se muestran las dos transiciones; la que tiene lugar a alta concentración obviamente corresponde al proceso de desplegamiento de la proteína. Sin embargo desconocíamos que estaba pasando en el rango de bajas concentraciones (0-0.4 M). En los correspondientes espectros de emisión no se detectó ningún cambio en la forma que indique la presencia de algún contaminante o sustancia

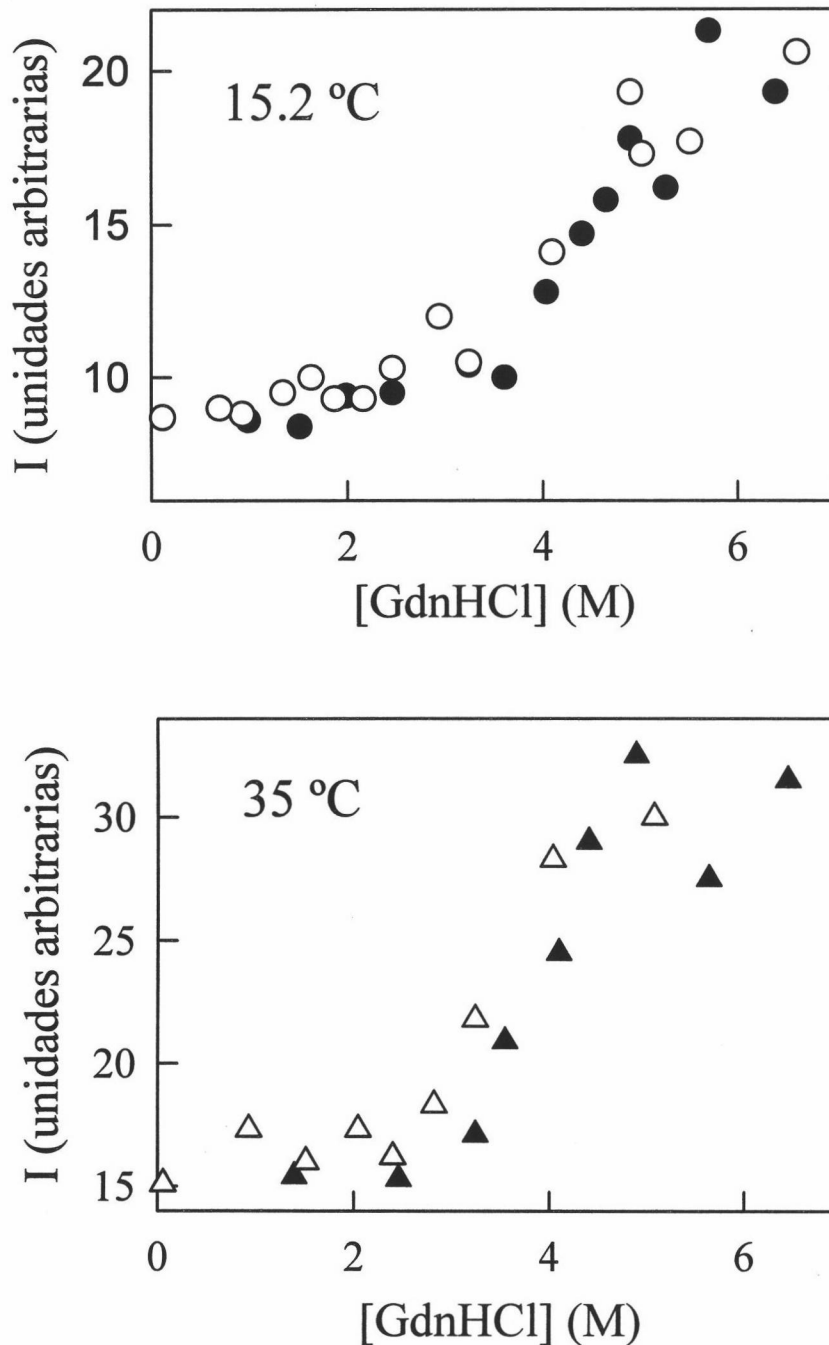


Figura 1: Perfiles de intensidad de fluorescencia emitida a 360 nm (excitación a 280 nm) en función de la concentración de guanidina, de muestras de lisozima incubadas a 15.2 °C y 35.0 °C, hasta alcanzarse el equilibrio. Los símbolos rellenos corresponden al proceso de desplegamiento y se parte de una disolución concentrada de proteína nativa (en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5) para diluirla en disoluciones de diferente concentración de guanidina; los símbolos huecos representan el proceso de replegamiento y se parte de proteína desplegada (en 7 M guanidina, disuelta en el mismo tampón) para diluirla en disoluciones de diferente concentración de guanidina. La concentración final de lisozima fue de 0.002 mg/mL en los experimentos a 15.2 °C y 0.005 mg/mL en los experimentos a 35 °C.

extraña que pudiera alterar las medidas de fluorescencia. Para intentar explicar este efecto comprobamos si la señal de fluorescencia se modificaba de alguna manera con el tiempo de incubación, una vez alcanzado el equilibrio. Para ello añadimos la proteína directamente a la célula del fluorímetro en la se encuentra la mezcla tampón-guanidina termostalizada. Con la cánula de la pipeta automática homogeneizamos la disolución y medimos de inmediato. En este rango de concentración de guanidina, los tiempos de relajación de las cinéticas de desplegamiento están por debajo del segundo (Figura 19) , de manera que el equilibrio se establece mucho antes de que realicemos la medida. El perfil de fluorescencia que se obtiene se muestra en la Figura 2B en donde se observa cómo la aparente transición observada al principio no se detecta ahora. Si dejamos las mismas disoluciones incubando en el baño durante dos horas y medimos su fluorescencia, vemos como el efecto se acentúa claramente con el tiempo. Podemos concluir pues que la transición observada a baja concentración de guanidina (Figura 2A) se trata de un artefacto de manera que no tiene sentido hablar de un proceso de desnaturalización bifásico. La causa de que se produzca tal artefacto podría ser que a baja fuerza iónica la proteína tuviera mayor afinidad por las cargas de los silicatos que componen el vidrio y que parte de ésta se estuviera adsorbiendo sobre la pared del tubo conforme transcurre el tiempo. Para evitar esto, las muestras de proteína en el rango de 0 a 1 M guanidina se midieron justo después de prepararlas.

3.1.2 Análisis según el modelo de desnaturalización de dos estados

Los perfiles obtenidos de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de guanidina se analizaron de acuerdo al modelo de desnaturalización de dos estados en el que, como ya hemos indicado, sólo los estados nativo y desplegado de la proteína están significativamente poblados.

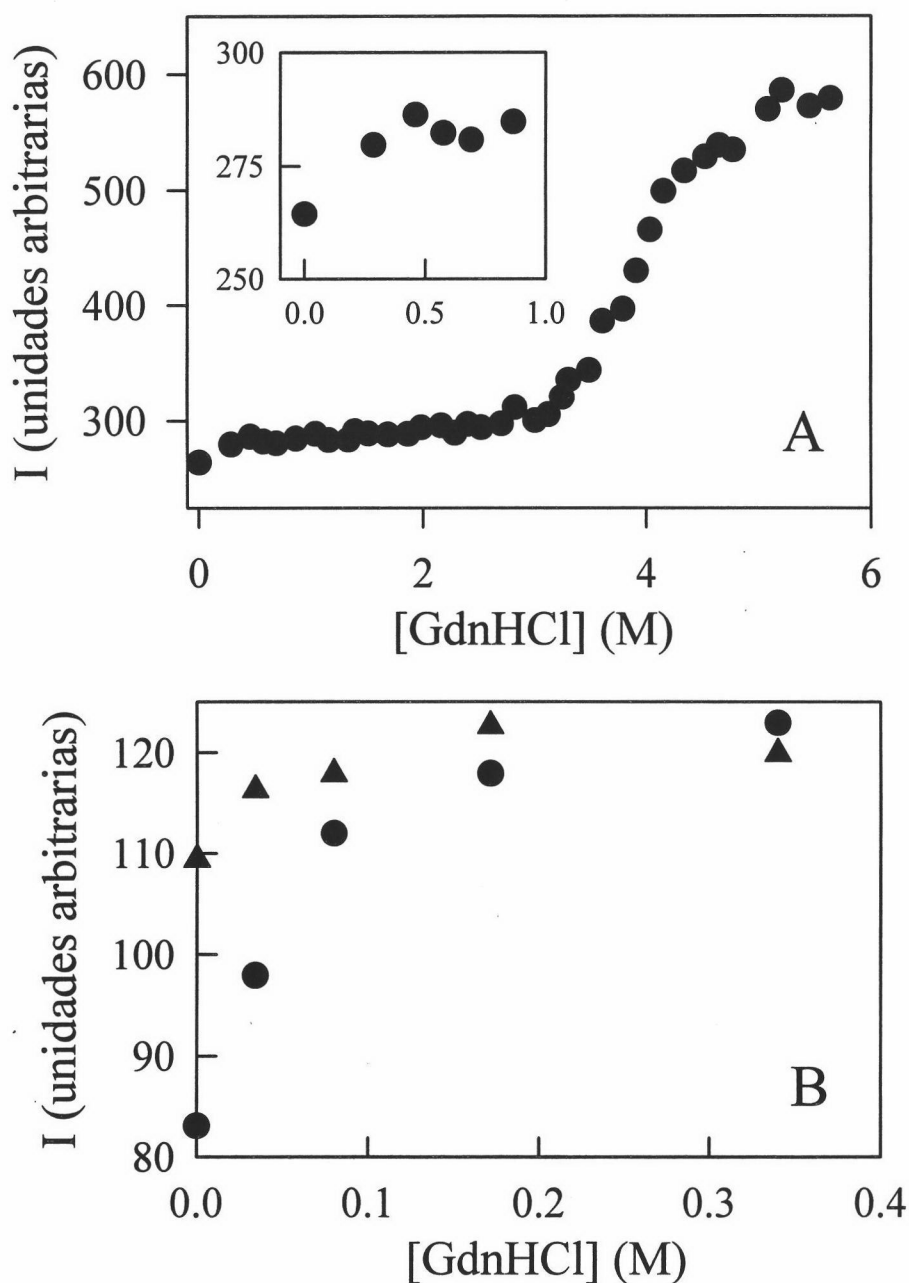


Figura 2: (A) Intensidad de fluorescencia emitida a 360 nm por muestras de lisozima incubadas a 30 °C en presencia de diferentes concentraciones de guanidina, hasta alcanzarse el equilibrio. Se muestra una ampliación de la transición observada a baja concentración de desnaturante. La concentración de proteína fue de 0.05 mg/mL. (B) Comparación de los perfiles de intensidad de fluorescencia obtenidos a baja concentración de guanidina, cuando la proteína es mezclada en cada caso con la disolución de guanidina directamente en la célula y medida de inmediato (▲) y cuando las muestras se dejan incubando en tubos de vidrio durante unas dos horas para ser medidas después (●). La concentración de proteína fue de 0.01 mg/mL y la temperatura 30 °C.

En general vamos a poder expresar algunas de las propiedades del sistema como un promedio de las contribuciones de los diferentes estados presentes (N y D en este caso) a esa propiedad :

$$\langle P \rangle = \sum_i P_i \cdot x_i = P_N \cdot x_N + P_D \cdot x_D \quad (1)$$

donde $\langle P \rangle$ es el valor promedio de la propiedad, P_N y P_D los valores de la propiedad correspondientes a los estados nativo y desplegado respectivamente. De igual manera la intensidad de fluorescencia emitida viene dada por:

$$I = I_N \cdot x_N + I_D \cdot x_D \quad (2)$$

donde, por simplicidad, hemos suprimido los corchetes.

Un perfil idealizado de intensidad de fluorescencia *versus* concentración de guanidina presenta la forma que se observa en la Figura 3. En nuestros experimentos se consideró una dependencia lineal de I_N e I_D con la concentración de desnaturalizante (C):

$$I_N = \alpha_N + \beta_N \cdot C \quad (3)$$

$$I_D = \alpha_D + \beta_D \cdot C \quad (4)$$

α_N , β_N , α_D y β_D son los parámetros que definen las líneas base de la pre- y post-transición.

Teniendo en cuenta que las fracciones molares de proteína en estado nativo y desplegado se relacionan con la constante de equilibrio por las expresiones:

$$x_N = \frac{1}{1+K} \quad (5)$$

$$x_D = \frac{K}{1+K} \quad (6)$$

y dado que:

$$K = \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) \quad (7)$$

sustituyendo las ecuaciones (3)-(7) en la ecuación (2) resulta la expresión:

$$I = \frac{(\alpha_N + \beta_N \cdot C) + (\alpha_D + \beta_D \cdot C) e^{m_{1/2}(C-C_{1/2})/RT}}{1 + e^{m_{1/2}(C-C_{1/2})/RT}} \quad (8)$$

que nos da la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de desnaturalizante.

El ajuste no-lineal por mínimos cuadrados de la ecuación (8) a nuestros perfiles experimentales obtenidos a distintas temperaturas se llevó a cabo con el programa comercial MLAB (Civilized Software, Inc.). Los datos experimentales se introducen en forma de una matriz $M_{N \times 2}$; para ello deben estar contenidos en un fichero formado por dos columnas separadas por comas, de manera que en la primera columna estarán los datos de concentración de guanidina y en la segunda las intensidades de fluorescencia correspondientes. A continuación detallamos la subrutina concreta del análisis dentro del entorno MLAB, teniendo en cuenta que según la ecuación (8) tendremos seis parámetros ajustables (α_N , β_N , α_D , β_D , $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$) que nos definen la transición completa:

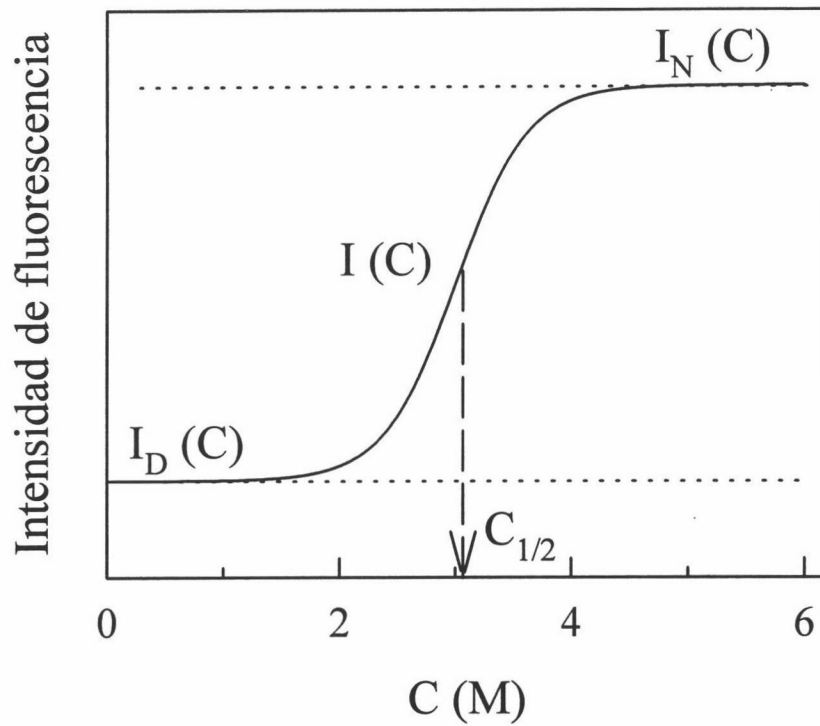


Figura 3: Simulación de la dependencia de la intensidad de fluorescencia emitida por una proteína hipotética en función de la concentración de guanidina. I_N e I_D representan las intensidades de fluorescencia para los estados nativos y desplegado, respectivamente; $C_{1/2}$ es la concentración de desnaturalizante a la que ΔG vale 0.

M=READ("nombre del fichero", número de filas, número de columnas)

FUNCTION $I_N(X)=A+B \cdot X$

FUNCTION $I_D(X)=C+D \cdot (X-6)$

FUNCTION $K(X)=\text{EXP}(-\Delta G(X)/R \cdot T)$

FUNCTION $\Delta G(X)=-F \cdot (X-H)$

FUNCTION $I(X)=(I_N(X)+I_D(X) \cdot K(X))/(1+K(X))$

R=0.008314

T= temperatura de trabajo en Kelvin

FIT(F, H, A, B, C, D), I TO M

Antes de aplicar la instrucción "FIT" hay que dar valores iniciales a cada uno de los parámetros ajustables para que el programa comience el proceso de iteración. Es importante que estos valores iniciales no sean muy diferentes de los óptimos para que el programa no se detenga en un mínimo local. Una vez finalizado el ajuste, los resultados son presentados con su correspondiente error y la dependencia entre ellos. Por último debemos definir otra matriz, Z, en la que se almacene el perfil I vs C resultado del ajuste:

Z=POINTS (I,valor inicial de concentración de guanidina:valor final de concentración de guanidina:intervalo entre valores consecutivos)

Como se muestra en las Figuras 4-8 los ajustes obtenidos en cada caso fueron excelentes. En la Tabla 1 se recogen los parámetros característicos correspondientes a cada perfil que resultan del análisis individual así como los valores para el cambio de energía de Gibbs obtenido como extrapolación lineal hasta 0 M guanidina mediante la ecuación (1.7).

Los errores de cada parámetro son los elementos diagonales de la matriz covarianza. Representan un límite inferior de manera que probablemente la incertidumbre asociada a dichos parámetros sea algo mayor.

Para obtener la estimación del error asociado a ΔG_w hemos repetido el ajuste pero esta vez poniendo ΔG en función de ΔG_w , según la ecuación (1.8), de manera que éste sea el parámetro ajustable en lugar de $m_{1/2}$.

TABLA 1: Valores de $C_{1/2}$, $m_{1/2}$ y ΔG_w correspondientes al equilibrio de desnaturalización de lisozima inducido por guanidina, estudiado por medidas de fluorescencia

Temperatura (°C)	$C_{1/2}$ (M)	$m_{1/2}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)	ΔG_w ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
30	3.81±0.04	9.77±1.06	37.27±3.85
33	3.88±0.04	10.00±1.13	38.87±4.25
37	3.34±0.06	9.34±1.39	31.25±4.52
41	3.29±0.04	9.13±1.07	30.04±3.53
43	3.13±0.02	10.86±0.63	34.03±1.99
45	2.93±0.03	12.29±1.36	36.06±3.96
48	2.73±0.03	11.83±1.47	32.35±4.08
50	2.44±0.04	9.07±0.87	22.18±2.28
52	2.30±0.02	13.84±0.99	31.83±2.37
56	1.86±0.05	10.04±1.02	18.71±2.24

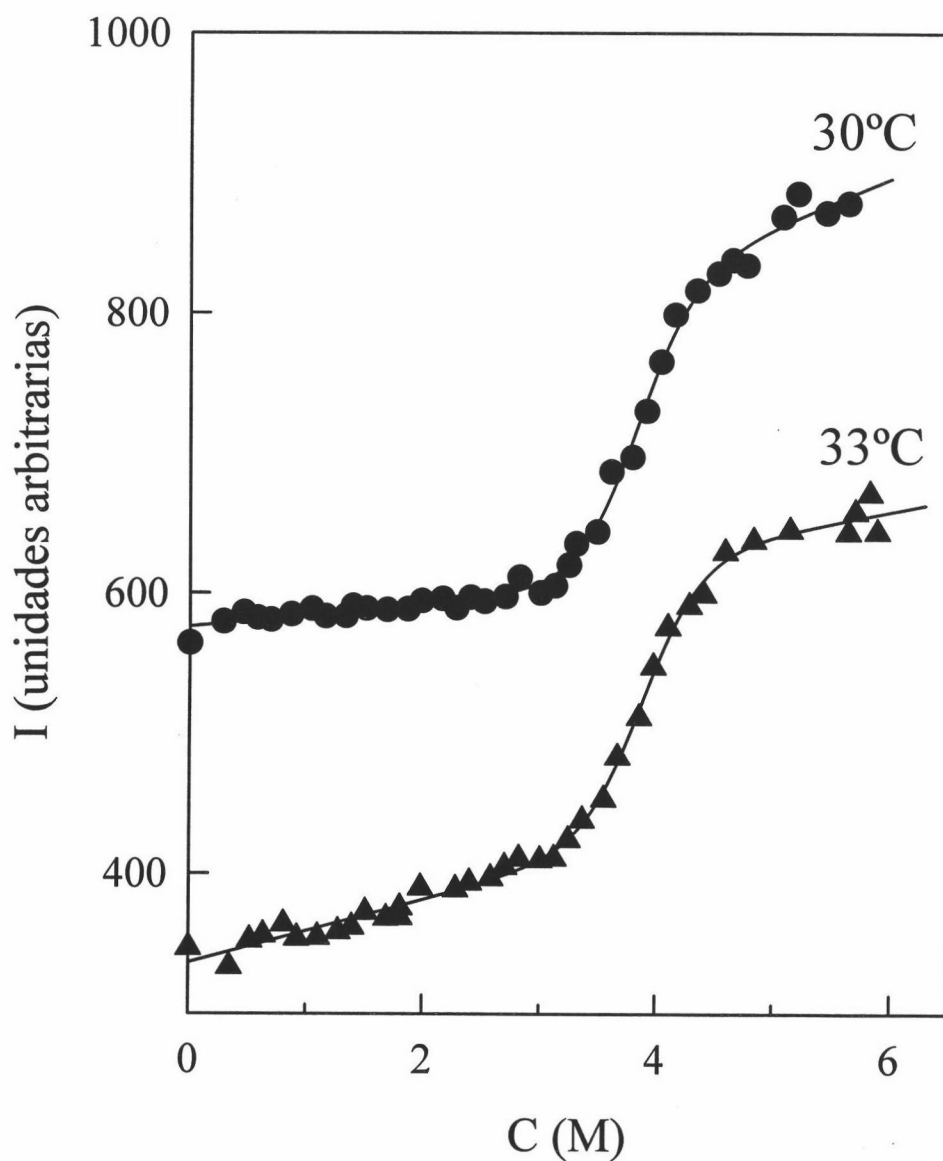


Figura 4: Perfiles de intensidad de fluorescencia emitida a 360 nm (excitación a 280 nm) versus concentración de guanidina, de muestras de lisozima incubadas a 30 y 33 °C, respectivamente, hasta alcanzarse el equilibrio. La proteína se preparó en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5 siendo la concentración de ésta en los experimentos de 0.05 mg/mL. Las rendijas de excitación y emisión 2.5 nm. Las líneas representan el mejor ajuste de la ecuación (8) a los datos experimentales.

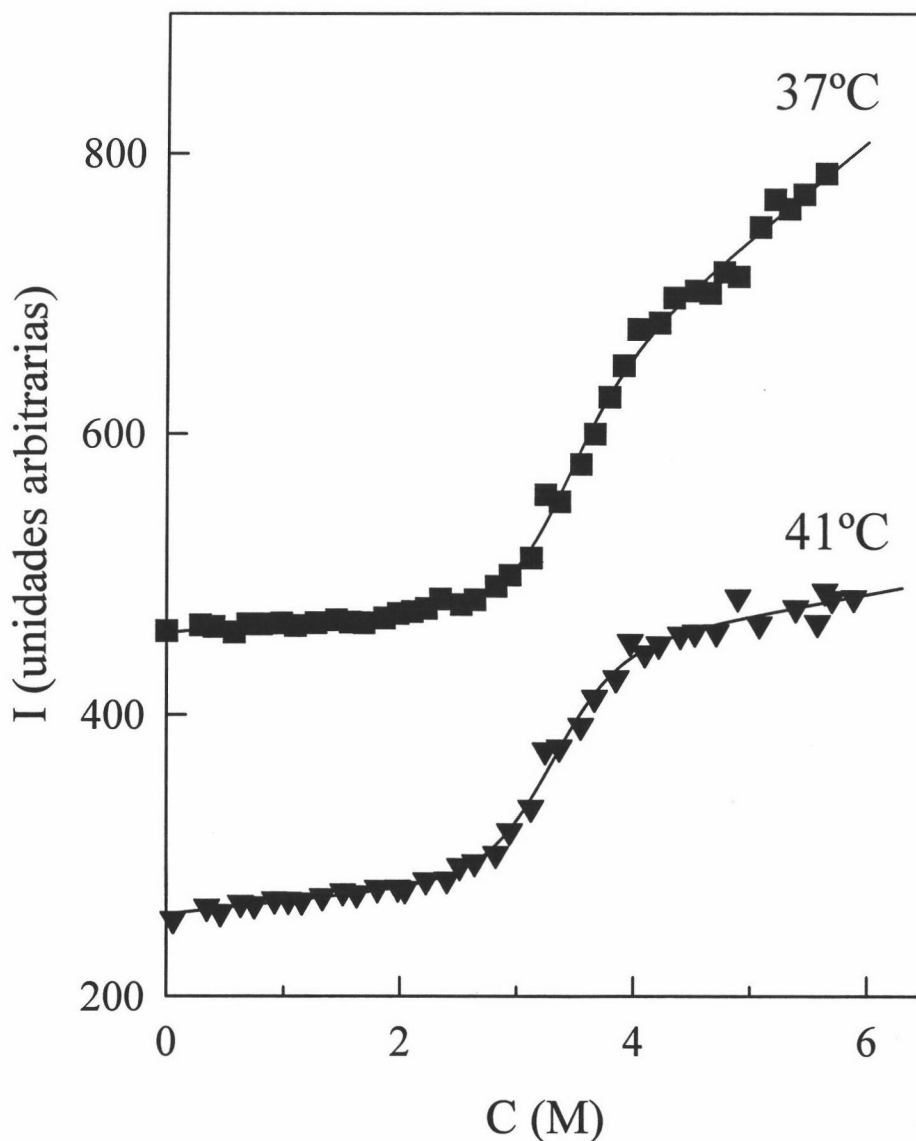


Figura 5: Perfiles de intensidad de fluorescencia emitida a 360 nm (excitación a 280 nm) versus concentración de guanidina, de muestras de lisozima incubadas a 37 y 41 °C, respectivamente, hasta alcanzarse el equilibrio. La proteína se preparó en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5 siendo la concentración de ésta en los experimentos de 0.05 mg/mL. Las rendijas de excitación y emisión 2.5 nm. Las líneas representan el mejor ajuste de la ecuación (8) a los datos experimentales.

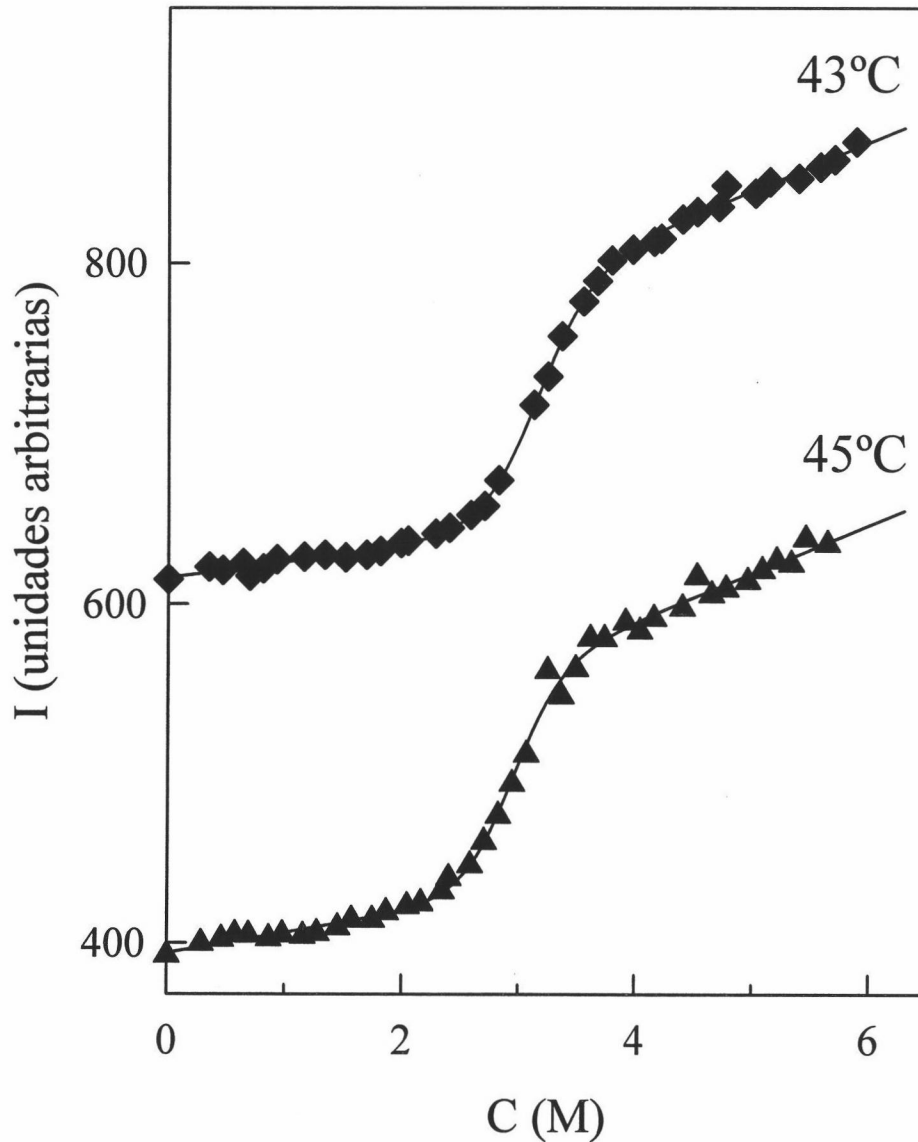


Figura 6: Perfiles de intensidad de fluorescencia emitida a 360 nm (excitación a 280 nm) versus concentración de guanidina, de muestras de lisozima incubadas a 43 y 45 °C, respectivamente, hasta alcanzarse el equilibrio. La proteína se preparó en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5 siendo la concentración de ésta en los experimentos de 0.05 mg/mL. Las rendijas de excitación y emisión 2.5 nm. Las líneas representan el mejor ajuste de la ecuación (8) a los datos experimentales.

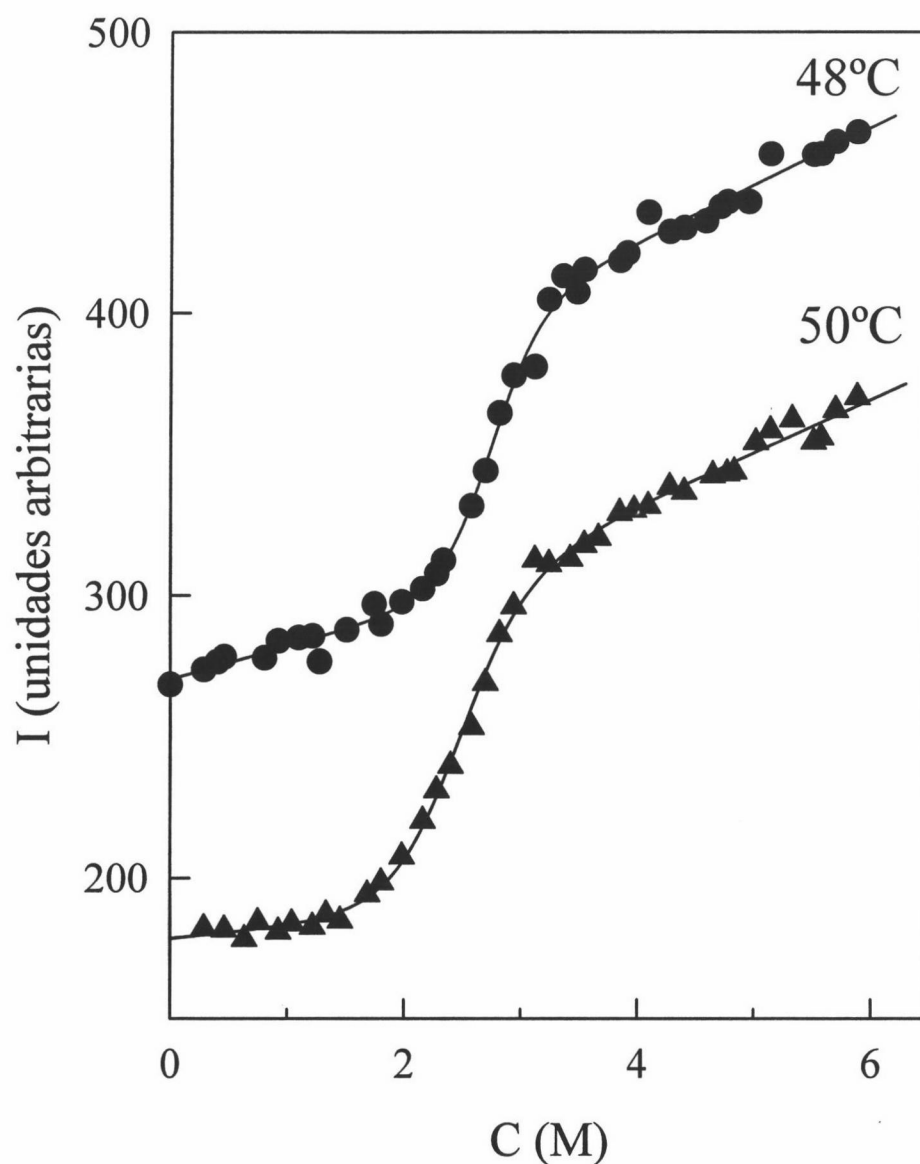


Figura 7: Perfiles de intensidad de fluorescencia emitida a 360 nm (excitación a 280 nm) versus concentración de guanidina, de muestras de lisozima incubadas a 48 y 50 °C, respectivamente, hasta alcanzarse el equilibrio. La proteína se preparó en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5 siendo la concentración de ésta en los experimentos de 0.05 mg/mL. Las rendijas de excitación y emisión 2.5 nm. Las líneas representan el mejor ajuste de la ecuación (8) a los datos experimentales.

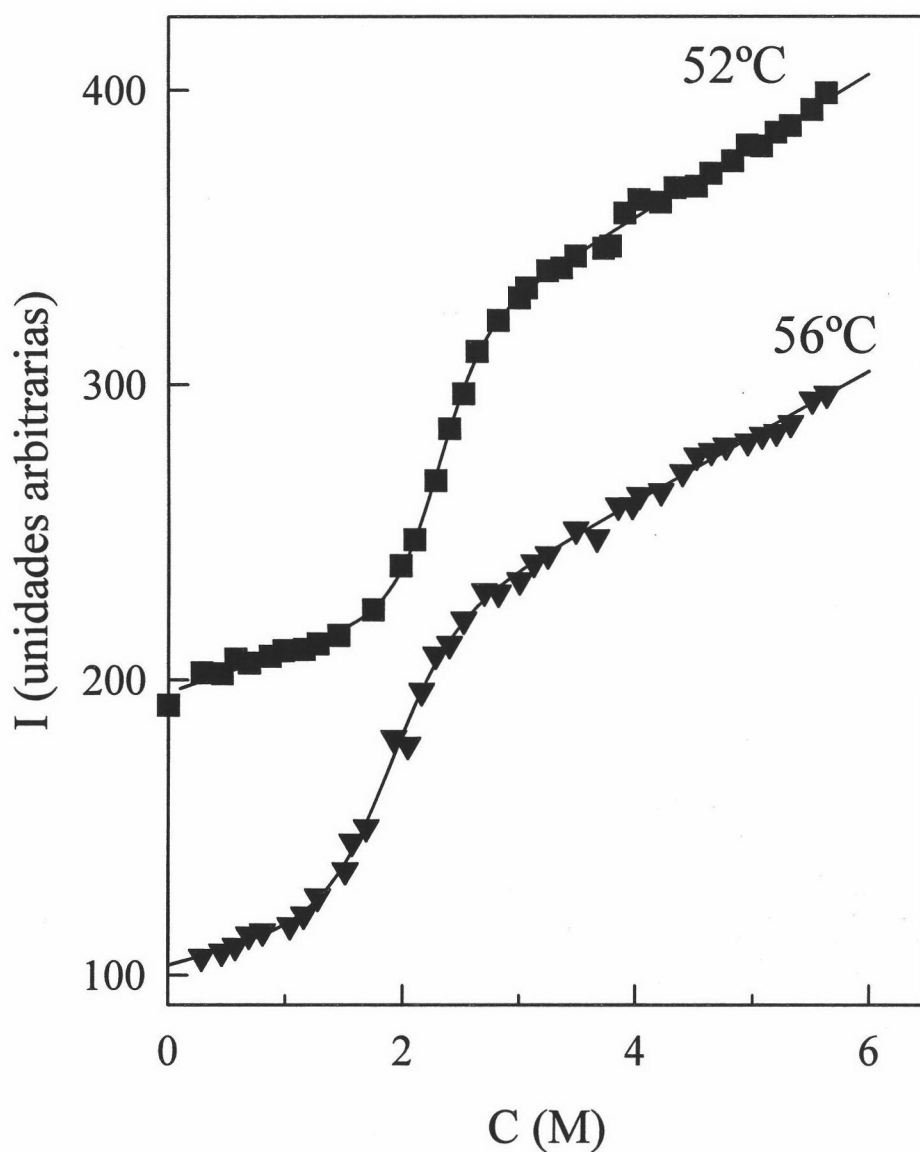


Figura 8: Perfiles de intensidad de fluorescencia emitida a 360 nm (excitación a 280 nm) versus concentración de guanidina, de muestras de lisozima incubadas a 52 y 56 °C, respectivamente, hasta alcanzarse el equilibrio. La proteína se preparó en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5 siendo la concentración de ésta en los experimentos de 0.05 mg/mL. Las rendijas de excitación y emisión 2.5 nm. Las líneas representan el mejor ajuste de la ecuación (8) a los datos experimentales.

3.2 ESTUDIO MEDIANTE ENSAYOS DE DESPLEGAMIENTO DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR GUANIDINA

Mediante el método cinético de ensayos de desplegamiento seguidos por fluorescencia descrito en el apartado 2.2.3.2 hemos determinado los perfiles de fracción de estado nativo para lisozima en función de la concentración de guanidina para temperaturas comprendidas entre 30 y 45 °C.

3.2.1 Procedimiento experimental y Análisis de los perfiles cinéticos

La proteína se dializó en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4.5 preparado como se indica en la sección 2.2.1.1. Para preparar la disolución concentrada de guanidina se disolvió el sólido en el tampón de la diálisis tal y como se detalló en el apartado 2.2.1.2, procedimiento A). Los parámetros instrumentales relativos al fluorímetro se indican en el apartado 2.2.3.1.

La concentración de proteína incubada en presencia de desnaturizante hasta alcanzar el equilibrio fue de 1 mg/mL excepto en los ensayos a 45 °C en los que la concentración fue de 1.9 mg/mL. En todos los casos las cinéticas de desplegamiento se iniciaron diluyendo una alícuota de la muestra en condiciones fuertemente desnaturizantes, siendo la concentración final de proteína en la célula del fluorímetro de aproximadamente 0.047 mg/mL.

Tuvimos que optimizar las condiciones concretas de temperatura y concentración de guanidina en la célula de medida para llevar a cabo los ensayos, de manera que nos fuera posible seguir las cinéticas de desplegamiento con nuestro fluorímetro. Interesa que la concentración de desnaturizante final en la cubeta sea alta para asegurarnos que la proteína se va a desplegar completamente, pero debemos tener en cuenta que al aumentar la concentración de desnaturizante, el tiempo de relajación disminuirá (ver Figura 19). Por tanto, hay que llegar a

una situación de compromiso para conseguir tiempos de relajación de varios minutos, claramente superiores al tiempo de respuesta del instrumento, pero a concentraciones de guanidina superiores al rango donde ocurre la transición. Así pues, las condiciones elegidas para realizar los ensayos de despliegamiento fueron 18 °C y en torno a 7.8 M guanidina en la cubeta del fluorímetro. En estas condiciones el tiempo de relajación está en aproximadamente 3 minutos (ver Figura 19).

De nuevo, debemos mencionar que para evitar posibles efectos de fotodescomposición de la muestra en el caso de cinéticas lentas medimos de forma intermitente. En todos los casos se midió el índice de refracción de la disolución para conocer la concentración exacta de guanidina [ecuación (2.9)].

Los perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo, para cada concentración de guanidina a la que realizamos ensayos de despliegamiento, fueron analizados haciendo uso de la ecuación de velocidad de primer orden [apartado 2.2.3.2; ecuación (2.31)] de manera que tendremos tres parámetros ajustables: I_{∞} , ΔI y τ . Como ya se explicó anteriormente, la amplitud de la exponencial en cada caso, ΔI , va a ser proporcional a la fracción de proteína en estado nativo en la muestra original [ecuación (2.33)].

En las Figuras 9A-12A se muestran algunas de las cinéticas correspondientes a los ensayos de despliegamiento para diferentes concentraciones de guanidina. El ajuste de la ecuación (2.31) a los datos experimentales fue bueno en todos los casos. En la Figura 13 se muestran los tiempos de relajación correspondientes a las cinéticas seguidas a cada temperatura. Como ya comentamos en la sección 2.2.3.2, el hecho de que el valor de τ permanezca constante, dentro del error experimental, supone un control en tanto en cuanto nos asegura que en primer lugar las moléculas nativas presentes en la transición son indistinguibles de aquellas que existen en

condiciones nativas y, en segundo lugar, que las condiciones finales de concentración de guanidina y temperatura en la célula de medida son las mismas en todos los casos. Vemos no obstante que a alta concentración de desnaturalizante el ruido en el tiempo de relajación aumenta. Esto es lógico si pensamos que en estas condiciones la población de estado nativo es prácticamente nula, con lo que la amplitud de las cinéticas observadas, ΔI (que es proporcional a x_N), tiende a cero de manera que los algoritmos usados en el programa de análisis tienen dificultad a la hora de encontrar los parámetros óptimos del ajuste.

A continuación detallamos la subrutina de ajuste en el entorno MLAB:

```
M=READ("nombre del fichero", número de filas, 2)
FUNCTION I(t)=A-B*exp(-t/C)
FIT(A,B,C), I TO M
Z=POINTS (I,0:valor final de [guanidina]:intervalo entre valores de [guanidina])
```

Antes de la instrucción FIT debemos dar valores iniciales a los parámetros ajustables.

3.2.2 Análisis de los perfiles de ΔI versus C según el modelo de dos estados

Para cada temperatura estudiada (30, 37, 41 y 45 °C) podemos representar los valores de ΔI obtenidos del análisis de las cinéticas correspondientes a los ensayos de desplegamiento *versus* concentración de guanidina (ver Figuras 9-12). Debemos señalar que en el caso de las cinéticas correspondientes a alta concentración de guanidina, en donde prácticamente no existe nada de nativo, fijamos la amplitud a cero.

Si suponemos un modelo de dos estados para el proceso de desplegamiento, entonces a partir de la ecuación (2.33) llegamos a la expresión que liga ΔI con C:

$$\Delta I = \frac{\Delta I^0}{1 + e^{m_{1/2} \cdot (C - C_{1/2})/RT}} \quad (9)$$

donde ΔI^0 , $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ son los parámetros ajustables.

En este tipo de análisis las líneas base del estado nativo y desplegado están perfectamente definidas (líneas planas y a una altura igual a ΔI^0 y 0, respectivamente) con lo que se evita la incertidumbre asociada a la determinación de líneas base que conlleva por ejemplo el uso de la ecuación (8).

Los ajustes no lineales por mínimos cuadrados de la ecuación (9) a los perfiles experimentales fueron siempre excelentes. La subrutina de ajuste utilizada en el programa MLAB fue:

```
M=read("nombre del fichero", número de filas, número de columnas)
R=0.008314
T=temperatura en Kelvin
FUNCTION G(X)=-F*(X-H)
FUNCTION K(X)=exp(-G(X)/RT)
FUNCTION H(X)=K(X)/(1+K(X))
FUNCTION I(X)=C*(1-H(X))
```

```
FIT(A,B,C), I TO M
```

```
Z= POINTS (I, valor inicial para la concentración de guanidina: valor final:intervalo entre valores consecutivos)
```

Antes de la instrucción FIT es necesario dar valores a los parámetros ajustables (ΔI^0 , $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$) próximos a los óptimos. Para conocer el error asociado a ΔG_w repetimos el ajuste pero esta vez incluyendo ΔG_w como parámetro ajustable [ecuación (1.8)].

En la siguiente tabla se muestran los valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ resultado de los ajustes a los

datos experimentales de ΔI versus C para cada temperatura, así como los valores de ΔG_w resultado de la extrapolación lineal a 0 M guanidina [ecuación (1.7)]:

TABLA 2: Valores de $C_{1/2}$, $m_{1/2}$ y ΔG_w correspondientes al equilibrio de desnaturalización de lisozima inducido por guanidina, estudiado por ensayos de desplegamiento

Temperatura (°C)	$C_{1/2}$ (M)	$m_{1/2}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	ΔG_w (kJ·mol ⁻¹)
30	3.91±0.01	10.13±0.42	39.65±1.68
37	3.50±0.02	10.34±0.99	36.19±3.57
41	3.37±0.03	8.33±0.61	28.04±2.11
45	3.15±0.02	12.41±0.81	39.08±2.59

Los errores asociados a cada parámetro son los elementos diagonales de la matriz covarianza. Representan un límite inferior de manera que probablemente la incertidumbre asociada a dichos parámetros sea algo mayor.

Por último, es importante destacar que así como en la ecuación (9) se supone que la desnaturalización sigue el modelo de dos estados, en el cálculo de x_N como $\Delta I/\Delta I^0$ [ecuación (2.33)] **no** se hace ninguna suposición a priori en este sentido de manera que constituye un excelente método para comprobar la validez del modelo de dos estados.

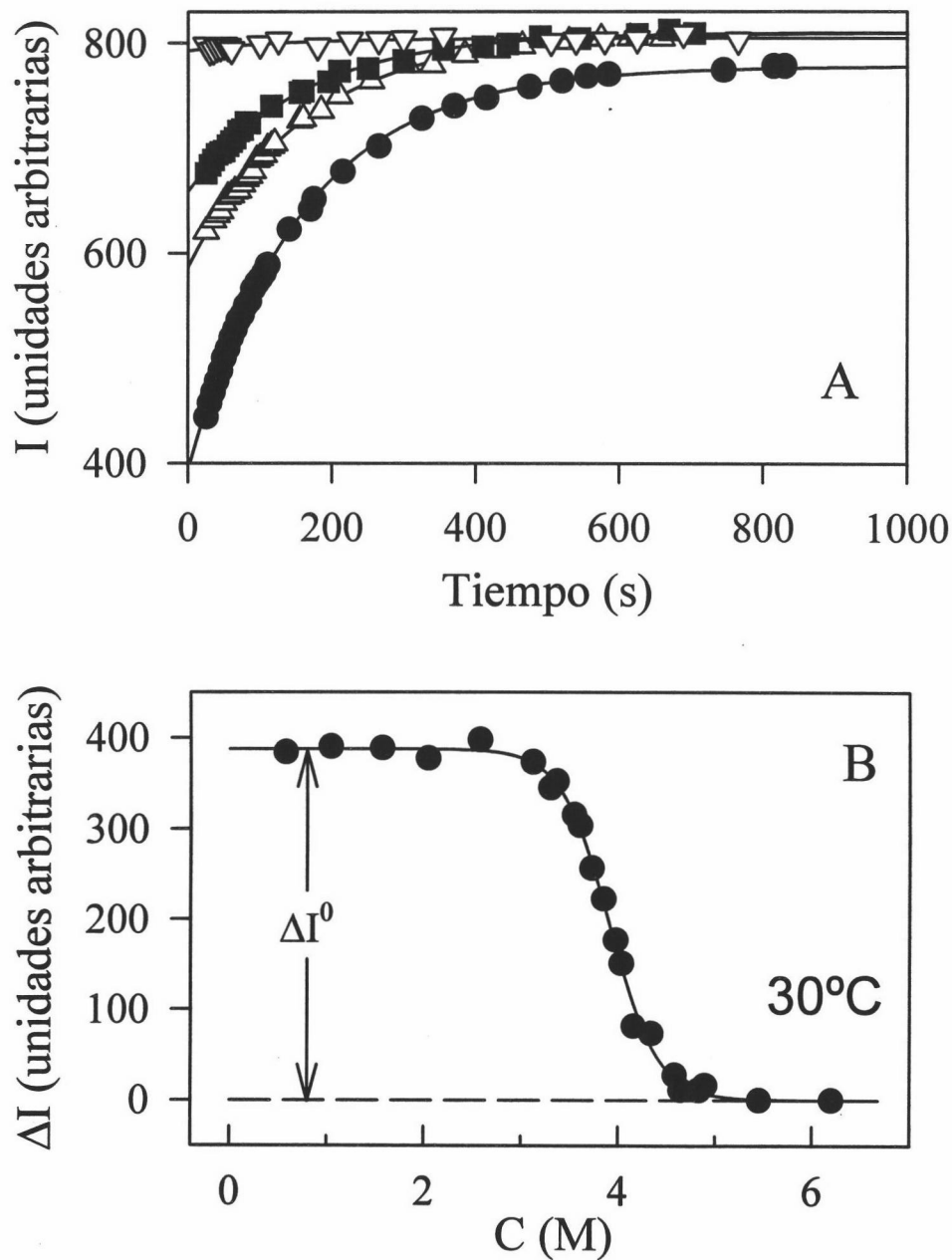


Figura 9: (A) Perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo registrados después de transferir una alícuota de lisozima (de concentración 1 mg/mL, previamente incubada a 30 °C en presencia de concentraciones dadas de guanidina, hasta alcanzarse el equilibrio), a condiciones fuertemente desnaturizantes (7.8 M guanidina, pH 4.5, $T=18$ °C; concentración final de proteína 0.0047 mg/mL). Las concentraciones de guanidina en las soluciones originales fueron: (●) 0.58, (Δ) 3.85, (■) 4.04 y (∇) 4.65 M. Las líneas representan los mejores ajustes de la ecuación (2.31) a cada perfil cinético.

(B) Amplitudes de desplegamiento, calculadas a partir del análisis de cinéticas de desplegamiento como las mostradas en (A) según la ecuación (2.31), en función de la concentración de guanidina. Estas amplitudes son proporcionales a la cantidad de proteína en estado nativo en las soluciones originales. La línea continua es el mejor ajuste de la ecuación (9) a los datos de amplitud de desplegamiento.

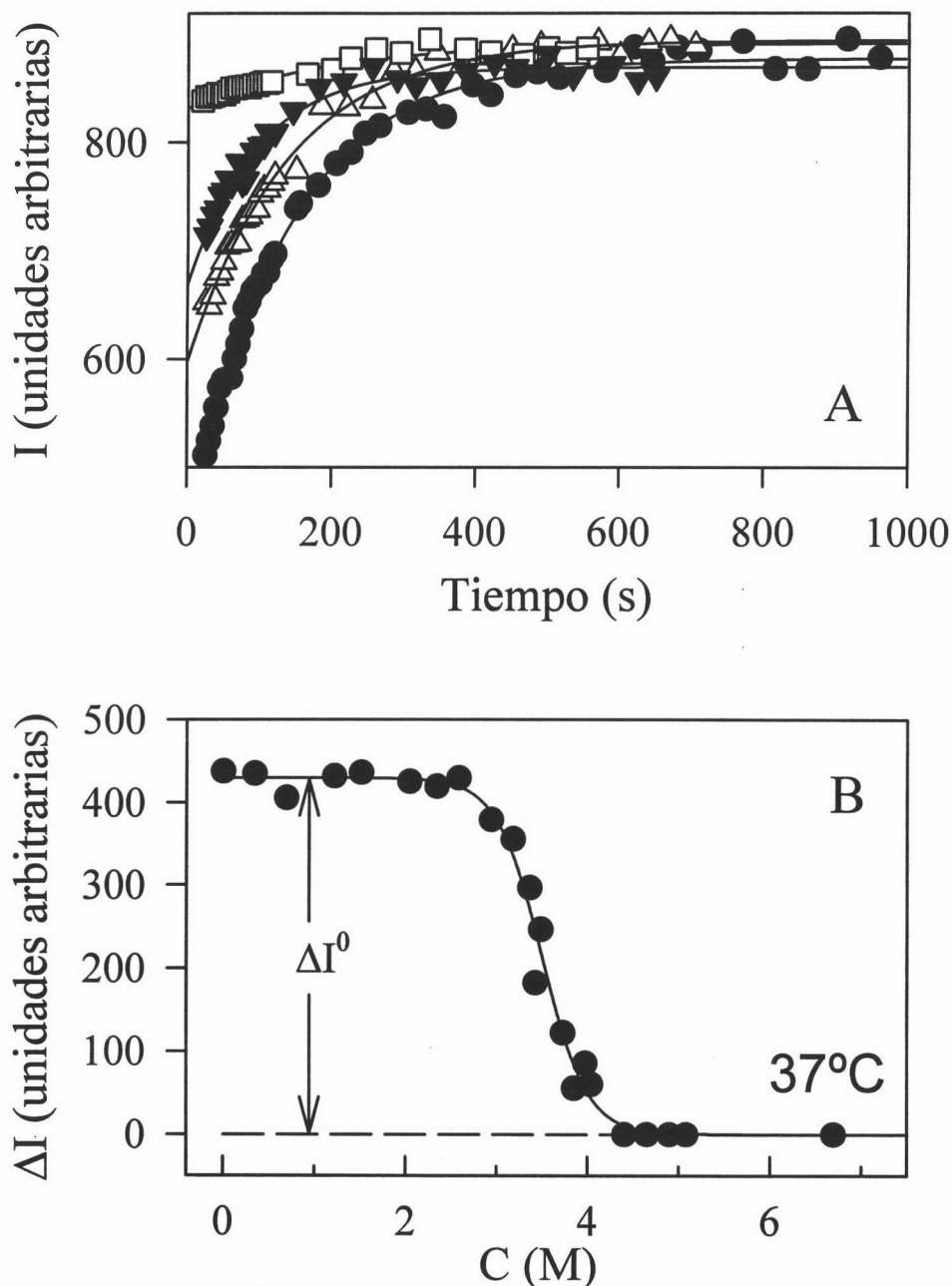


Figura 10: (A) Perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo registrados después de transferir una alícuota de lisozima (de concentración 1 mg/mL, previamente incubada a 37°C en presencia de concentraciones dadas de guanidina, hasta alcanzarse el equilibrio) a condiciones fuertemente desnaturizantes (7.8 M guanidina, pH 4.5, $T=18^\circ\text{C}$; concentración final de proteína 0.0047 mg/mL). Las concentraciones de guanidina en las soluciones originales fueron: (●) 0.34, (Δ) 3.36, (\blacktriangledown) 3.42 y (\square) 4.03 M. Las líneas representan los mejores ajustes de la ecuación (2.31) a cada perfil cinético.

(B) Amplitudes de desplegamiento, calculadas a partir del análisis de cinéticas de desplegamiento como las mostradas en (A) según la ecuación (2.31), en función de la concentración de guanidina. Estas amplitudes son proporcionales a la cantidad de proteína en estado nativo en las soluciones originales. La línea continua es el mejor ajuste de la ecuación (9) a lo datos de amplitud de desplegamiento.

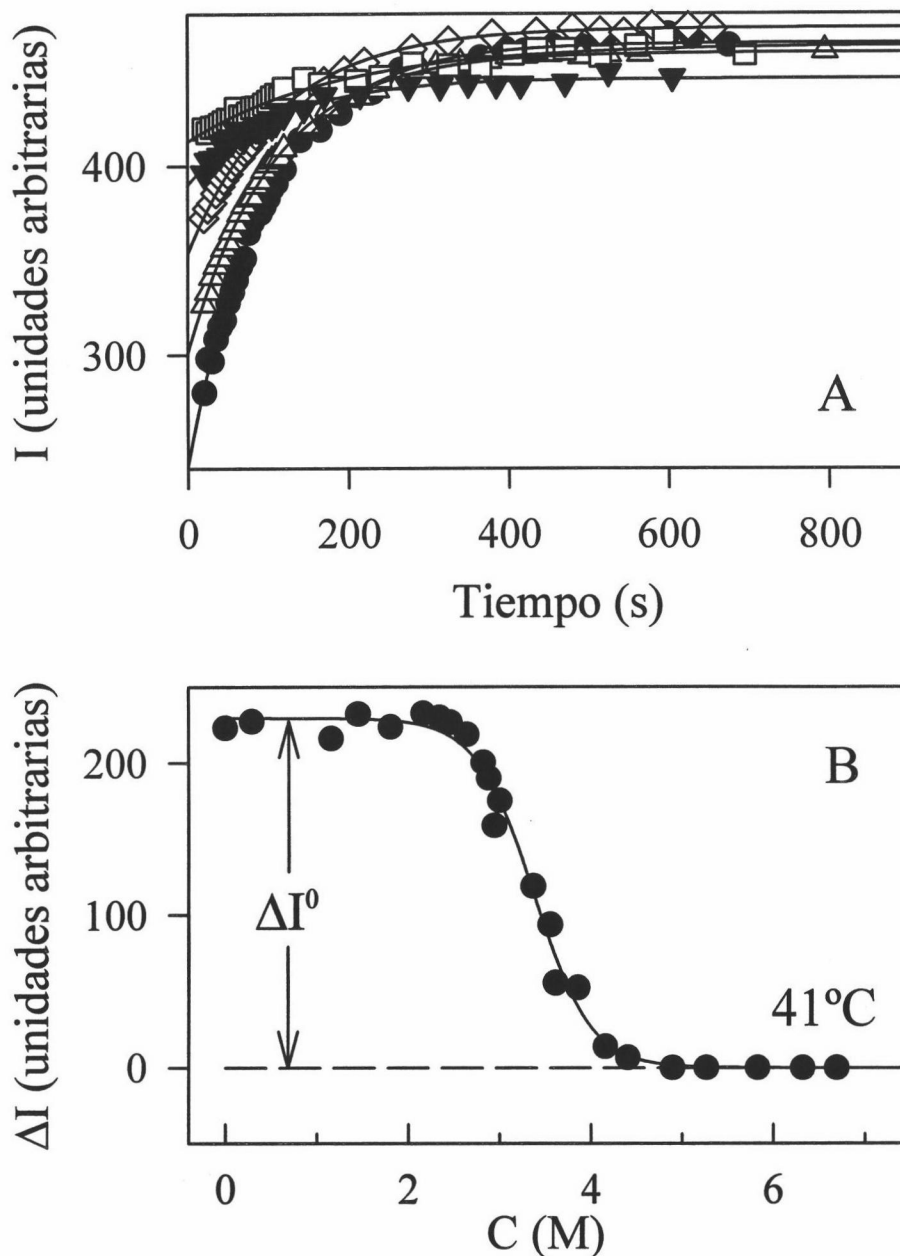


Figura 11: (A) Perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo registrados después de transferir una alícuota de lisozima (de concentración 1 mg/mL, previamente incubada a 41°C en presencia de concentraciones dadas de guanidina, hasta alcanzarse el equilibrio) a condiciones fuertemente desnaturizantes (7.8 M guanidina, pH 4.5, $T=18^\circ\text{C}$; concentración final de proteína 0.0047 mg/mL). Las concentraciones de guanidina en las soluciones originales fueron: (●) 0, (Δ) 2.94, (\diamond) 3.36, (\blacktriangledown) 3.61 y (\square) 3.85 M. Las líneas representan los mejores ajustes de la ecuación (2.31) a cada perfil cinético.

(B) Amplitudes de desplegamiento, calculadas a partir del análisis de cinéticas de desplegamiento como las mostradas en (A) según la ecuación (2.31), en función de la concentración de guanidina. Estas amplitudes son proporcionales a la cantidad de proteína en estado nativo en las soluciones originales. La línea continua es el mejor ajuste de la ecuación (9) a los datos de amplitud de desplegamiento.

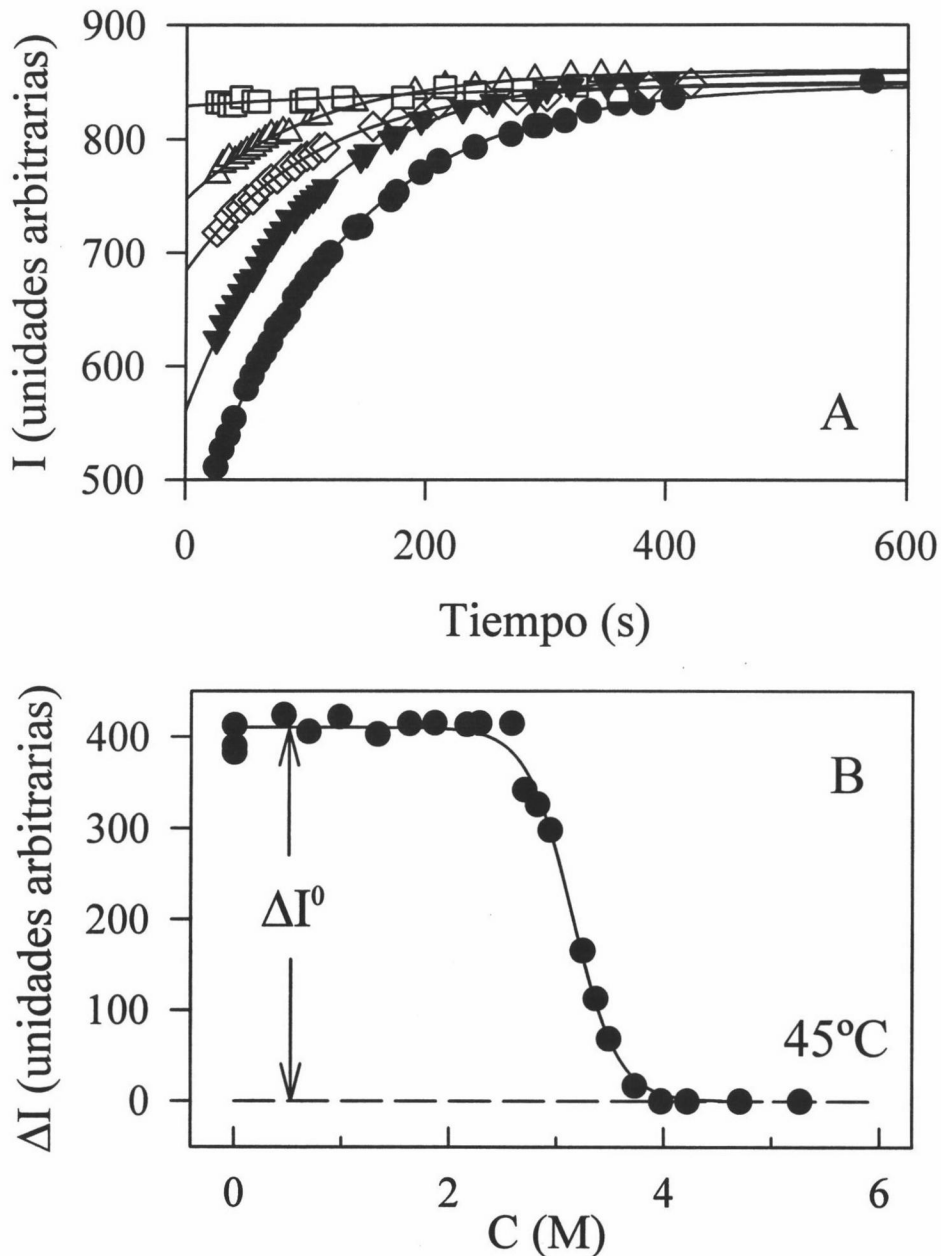


Figura 12: (A) Perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo registrados después de transferir una alícuota de lisozima (de concentración 1.9 mg/mL, previamente incubada a 45 °C en presencia de concentraciones dadas de guanidina, hasta alcanzarse el equilibrio) a condiciones fuertemente desnaturizantes (7.8 M guanidina, pH 4.5, $T=18^\circ\text{C}$; concentración final de proteína 0.0047 mg/mL). Las concentraciones de guanidina en las soluciones originales fueron: (●) 0, (▼) 2.94, (◇) 3.24, (Δ) 3.36 y (□) 3.73 M. Las líneas representan los mejores ajustes de la ecuación (2.31) a cada perfil cinético.

(B) Amplitudes de desplegamiento, calculadas a partir del análisis de cinéticas de desplegamiento como las mostradas en (A) según la ecuación (2.31), en función de la concentración de guanidina. Estas amplitudes son proporcionales a la cantidad de proteína en estado nativo en las soluciones originales. La línea continua es el mejor ajuste de la ecuación (9) a lo datos de amplitud de desplegamiento.

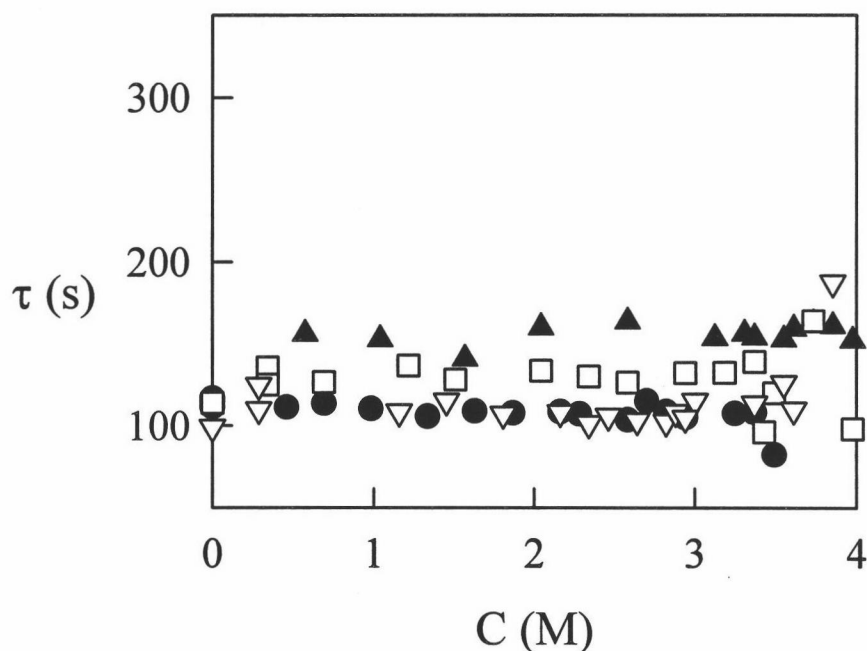


Figura 13: Valores del tiempo de relajación, τ , derivados del análisis de los perfiles cinéticos (Figuras 9-12A) según la ecuación (2.31), correspondientes a los ensayos de desplegamiento a: (▲) 30, (◻) 37, (▽) 41 y (●) 45 °C. El hecho de que τ permanezca aproximadamente constante indica que las moléculas de proteína nativa en la zona de la transición son indistinguibles de aquellas que existen en condiciones nativas (Mücke y Schmid, 1994).

3.3 ESTUDIO MEDIANTE MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DE LAS CINÉTICAS DE REPLEGAMIENTO-DESPLEGAMIENTO INDUCIDAS POR SALTOS EN CONCENTRACIÓN DE GUANIDINA

Hemos caracterizado las cinéticas en la dirección del replegamiento-desplegamiento inducido mediante saltos entre diferentes concentraciones de guanidina, siguiendo la emisión de fluorescencia de lisozima en el rango de temperaturas comprendido entre 18 y 45 °C.

3.3.1 Procedimiento experimental y Análisis de los perfiles cinéticos

La proteína fue dializada en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4.5 preparado como se indica en el apartado 2.2.1.1. La disolución concentrada de guanidina se preparó siguiendo el procedimiento A) descrito en el apartado 2.2.1.2. Las condiciones experimentales relativas al fluorímetro son las detalladas en 2.2.3.1.

1. Cinéticas en la dirección del desplegamiento.

Partimos de una disolución de lisozima de concentración en torno a 1 mg/mL en tampón acuoso y transferimos una alícuota directamente a la cubeta del fluorímetro en donde tenemos una disolución de una concentración dada de guanidina, termostatizada, de manera que la concentración final de proteína sea de 0.047 mg/mL. Una vez añadida la proteína a la cubeta, con la cánula de la pipeta automática homogeneizamos bien la disolución y rápidamente comenzamos a medir el aumento de intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Para evitar posibles efectos de fotodescomposición medimos de manera intermitente para que la radiación no incida en la muestra durante todo el tiempo que dure el experimento. Una vez finalizado éste, medimos el índice de refracción de la disolución para conocer exactamente la concentración de guanidina después de que se haya diluído por la adición de la proteína [ecuación (2.9)].

Para cada temperatura se estudiaron las cinéticas de desplegamiento en presencia de concentraciones de desnaturizante desde $C_{1/2}$ hasta 8 M aproximadamente (Figuras 14B-18). Este límite superior viene dado por la limitación instrumental que supone no poder caracterizar cinéticas cuyos tiempos de relajación sean comparables al tiempo de respuesta del fluorímetro.

2. Cinéticas en la dirección del replegamiento.

El procedimiento experimental es muy similar al descrito para las cinéticas de desplegamiento. En este caso partimos de una disolución de lisozima en aproximadamente 8 M guanidina (a esta concentración nos aseguramos que la proteína está totalmente desplegada). Seguimos las cinéticas de replegamiento mediante el descenso de la intensidad de fluorescencia con el tiempo después de transferir una alícuota hasta disoluciones de diferente concentración de guanidina, desde la $C_{1/2}$ hasta alrededor de 2 M (Figuras 14A-17A). De nuevo aquí el límite inferior viene dado por la limitación de tipo instrumental. Para saber la concentración exacta de desnaturalizante a la que se hizo el experimento medimos el índice de refracción de la disolución al finalizar éste [ecuación (2.9)].

Los perfiles de intensidad de fluorescencia *versus* tiempo obtenidos para los procesos de desplegamiento-replegamiento a distintas temperaturas se analizaron según las ecuaciones (2.31) y (2.34) respectivamente, correspondientes a cinéticas de primer orden y haciendo uso del programa comercial MLAB. Los ajustes en todos los casos fueron buenos como se muestra en las Figuras 14A-18. La subrutina de análisis empleada es similar a la descrita para los ensayos de desplegamiento (ver 3.2.1) y los ensayos de replegamiento (ver sección 5.2.1).

3.3.2 Análisis según el modelo cinético de dos estados

Si representamos, dada una temperatura, el logaritmo neperiano de las constantes de velocidad aparentes obtenidas del análisis de cada cinética en función de la concentración de desnaturalizante, obtenemos una representación en forma de "V" denominada *Chevron* (ver Figura 19) cuyo mínimo coincide de manera aproximada con $C_{1/2}$, donde $k_D = k_F$. La rama de la

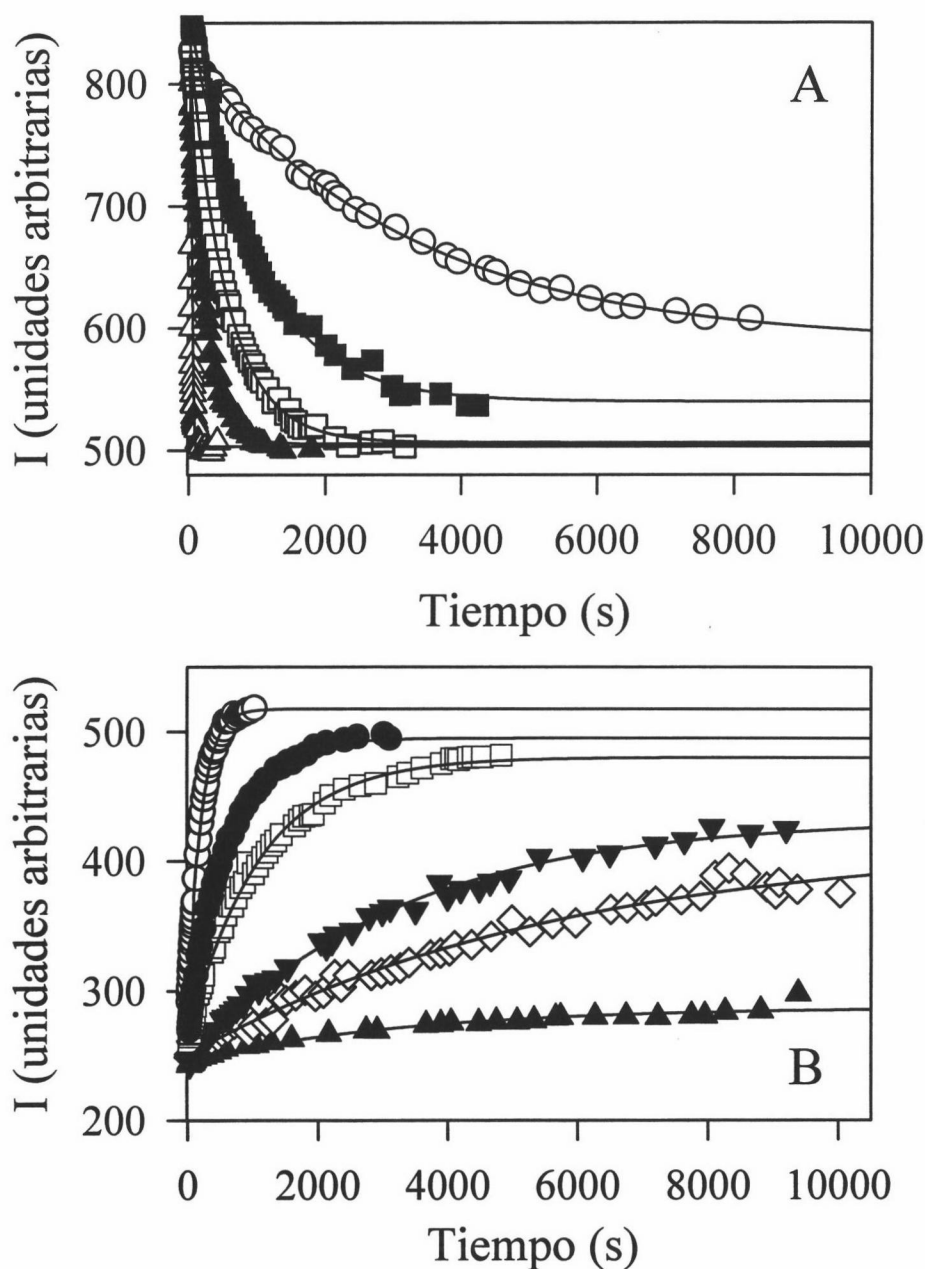


Figura 14: (A) Perfiles cinéticos en la dirección del replegamiento, registrados a 20 °C después de transferir una alícuota de lisozima desplegada en 8 M guanidina, pH 4.5, hasta disoluciones de concentración de guanidina igual a: (Δ) 2.52 M, (\blacktriangle) 3.18, (\square) 3.36, (\blacksquare) 3.55 y (\circ) 3.97 M. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.34). (B) Perfiles cinéticos en la dirección del desplegamiento registrados a 20 °C después de transferir una alícuota de lisozima nativa (en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5) hasta disoluciones de concentración de guanidina igual a: (\blacktriangle) 3.79, (\diamond) 4.46, (\blacktriangledown) 5.02, (\square) 6.01, (\bullet) 6.44 y (\circ) 7.31 M. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.31). La concentración final de proteína en la célula de medida fue de 0.047 mg/mL en todos los casos.

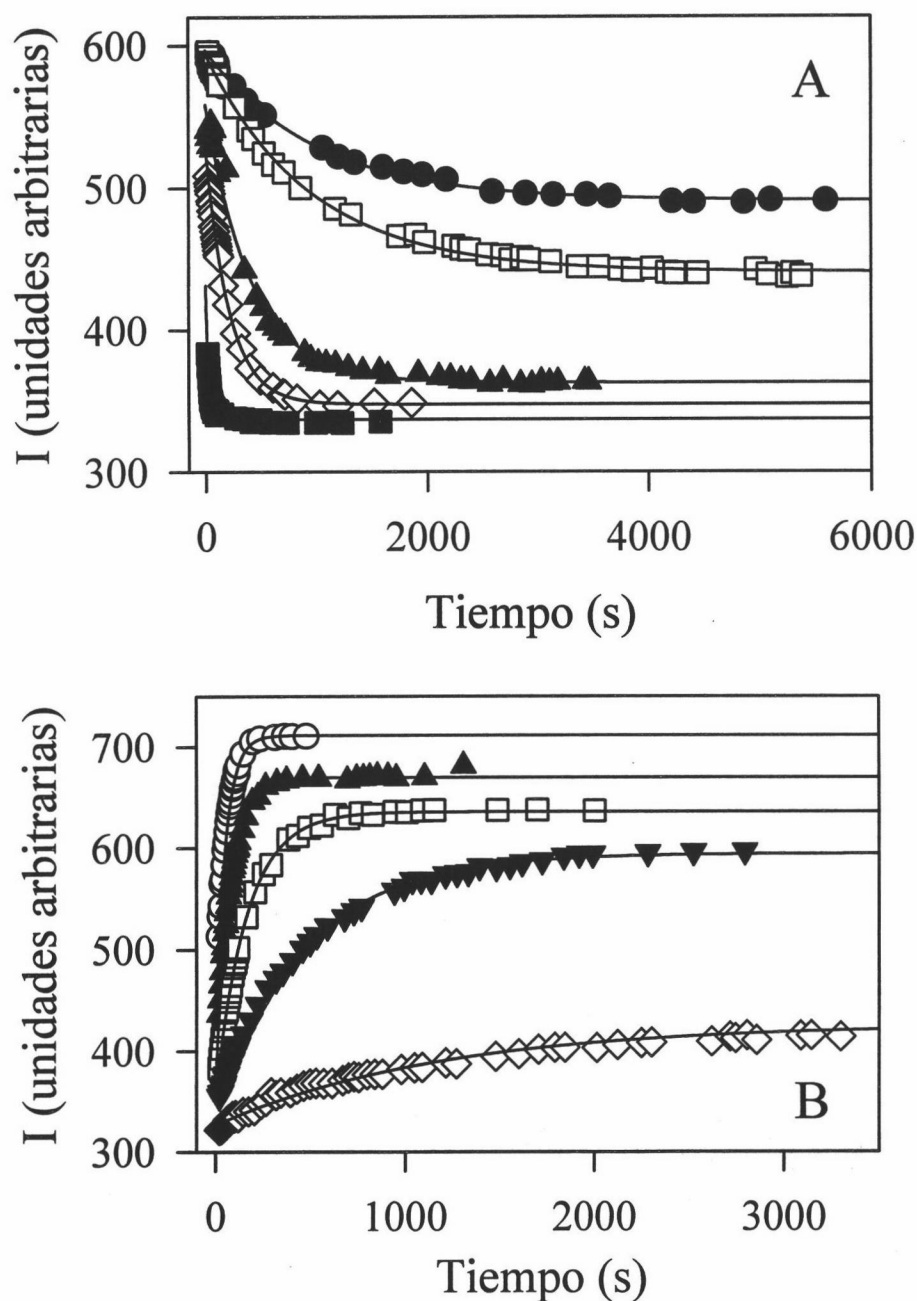


Figura 15: (A) Perfiles cinéticos en la dirección del replegamiento, registrados a 30 °C después de transferir una alícuota de lisozima desplegada en 8 M guanidina, pH 4.5, hasta disoluciones de concentración de guanidina igual a: (■) 2.40, (◇) 3.24, (▲) 3.43, (□) 3.67 y (●) 3.85 M. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.34). (B) Perfiles cinéticos en la dirección del desplegamiento registrados a 30 °C después de transferir una alícuota de lisozima nativa (en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5) hasta disoluciones de concentración de guanidina igual a: (◇) 3.79, (▼) 5.32, (□) 6.20, (▲) 7.00 y (○) 7.32 M. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.31).

La concentración final de proteína en la célula de medida fue de 0.047 mg/mL en todos los casos.

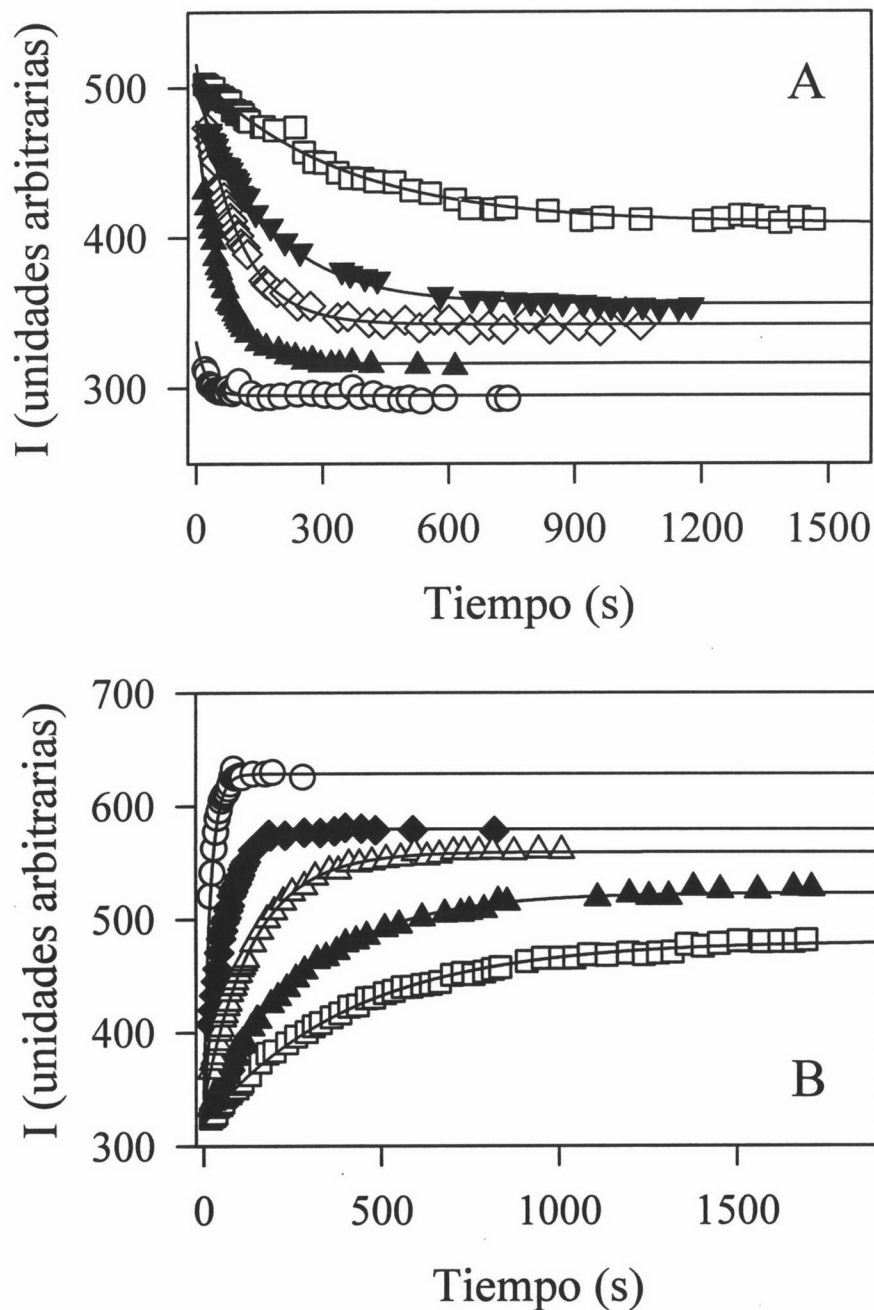


Figura 16: (A) Perfiles cinéticos en la dirección del replegamiento, registrados a 37 °C después de transferir una alícuota de lisozima desplegada en 8 M guanidina, pH 4.5, hasta disoluciones de concentración de guanidina igual a: (○) 2.28, (▲) 2.88, (◇) 3.00, (▼) 3.24 y (□) 3.54 M. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.34). (B) Perfiles cinéticos en la dirección del desplegamiento registrados a 37 °C después de transferir una alícuota de lisozima nativa (en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5) hasta disoluciones de concentración de guanidina igual a: (□) 3.90, (▲) 4.52, (△) 5.14, (◆) 6.19 y (○) 7.13 M. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.31).

La concentración final de proteína en la célula de medida fue de 0.047 mg/mL en todos los casos.

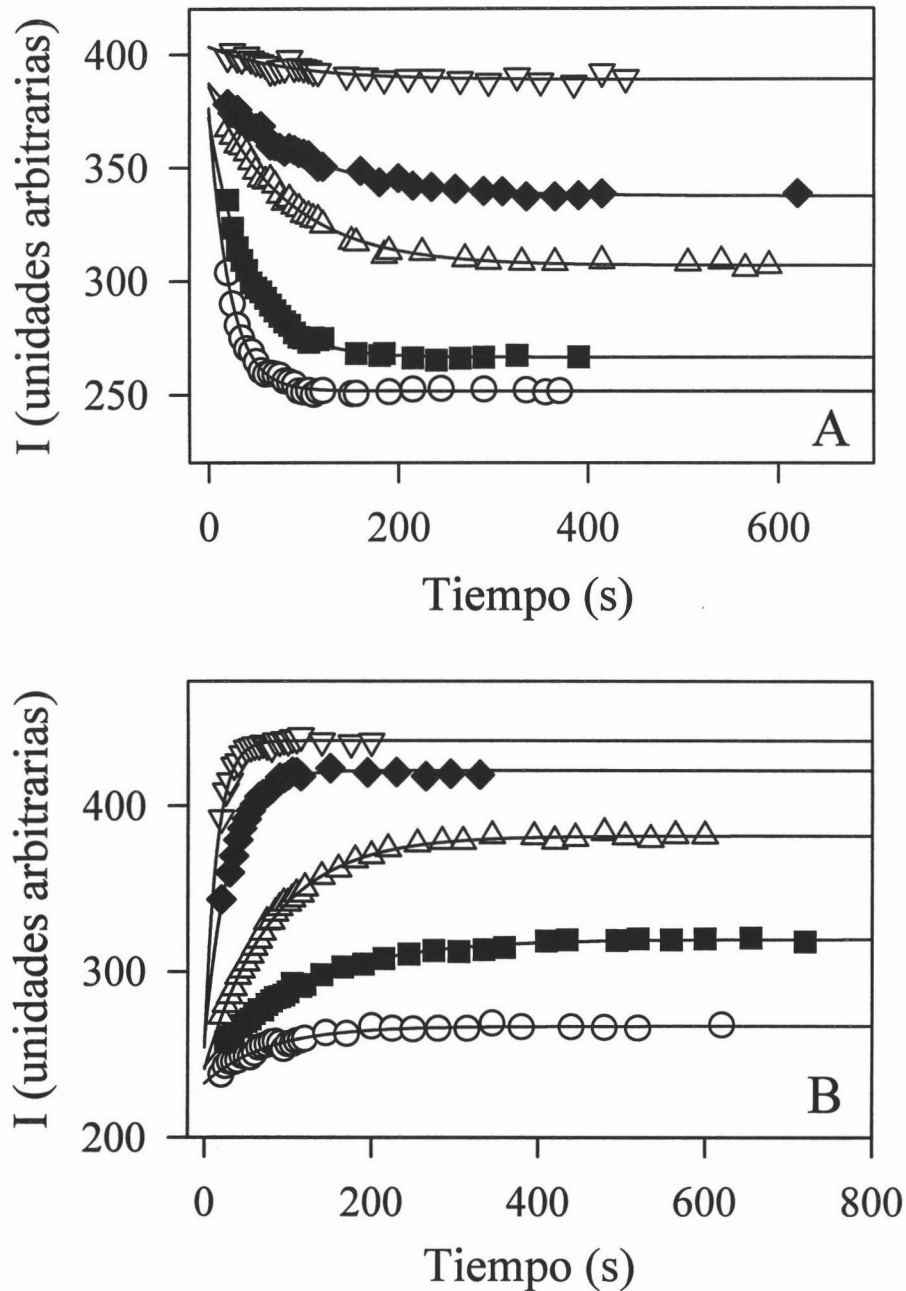


Figura 17: (A) Perfiles cinéticos en la dirección del replegamiento, registrados a 45 °C después de transferir una alícuota de lisozima desplegada en 8 M guanidina, pH 4.5, hasta disoluciones de concentración de guanidina igual a: (O) 2.34, (■) 2.52, (Δ) 2.94, (◆) 3.18 y (∇) 3.61 M. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.34). (B) Perfiles cinéticos en la dirección del desplegamiento registrados a 45 °C después de transferir una alícuota de lisozima nativa (en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5) hasta disoluciones de concentración de guanidina igual a: (O) 2.76, (■) 3.12, (Δ) 4.03, (◆) 5.26 y (∇) 6.13 M. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.31).

La concentración final de proteína en la célula de medida fue de 0.047 mg/mL en todos los casos.

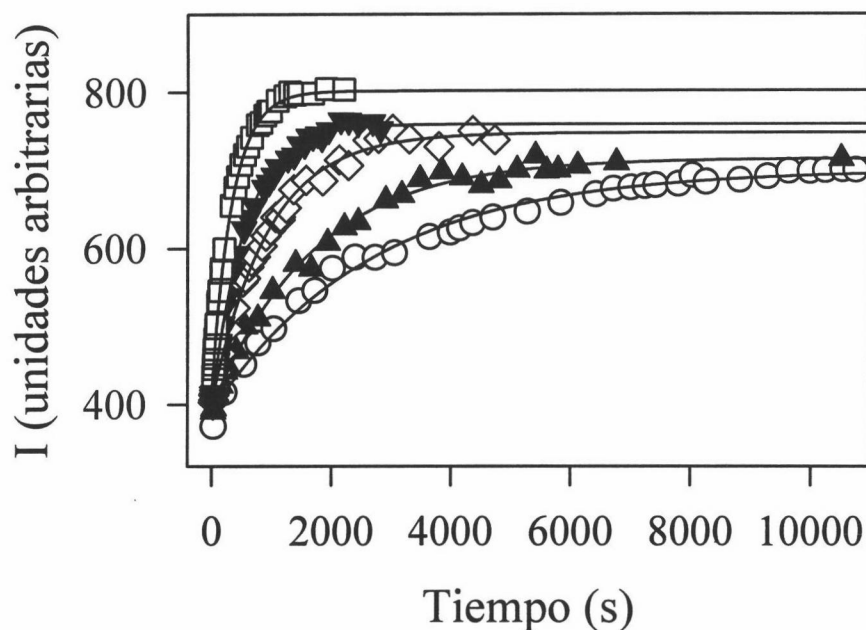


Figura 18: Perfiles cinéticos en la dirección del desplegamiento registrados a 18 °C después de transferir una alícuota de lisozima nativa (en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5) hasta disoluciones de concentración de guanidina igual a: (○) 5.76, (▲) 5.88, (◊) 6.38, (▼) 6.88, (□) 7.19 M. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.31).

La concentración final de proteína en la célula de medida fue de 0.047 mg/mL en todos los casos.

derecha (a alta concentración de desnaturizante) corresponde al proceso de desplegamiento de la proteína inducido por saltos a concentraciones de guanidina mayores a $C_{1/2}$ y se cumple que $k_D \gg k_F$, mientras que la rama de la izquierda (baja concentración de desnaturizante) corresponde al proceso de replegamiento que tiene lugar al diluir la proteína desplegada en disoluciones de guanidina de concentración menor a $C_{1/2}$. En esta rama se cumple que $k_F \gg k_D$. En la Figura 20 se muestra un esquema de los procesos predominantes en cada una de las regiones que se distinguen en el Chevron.

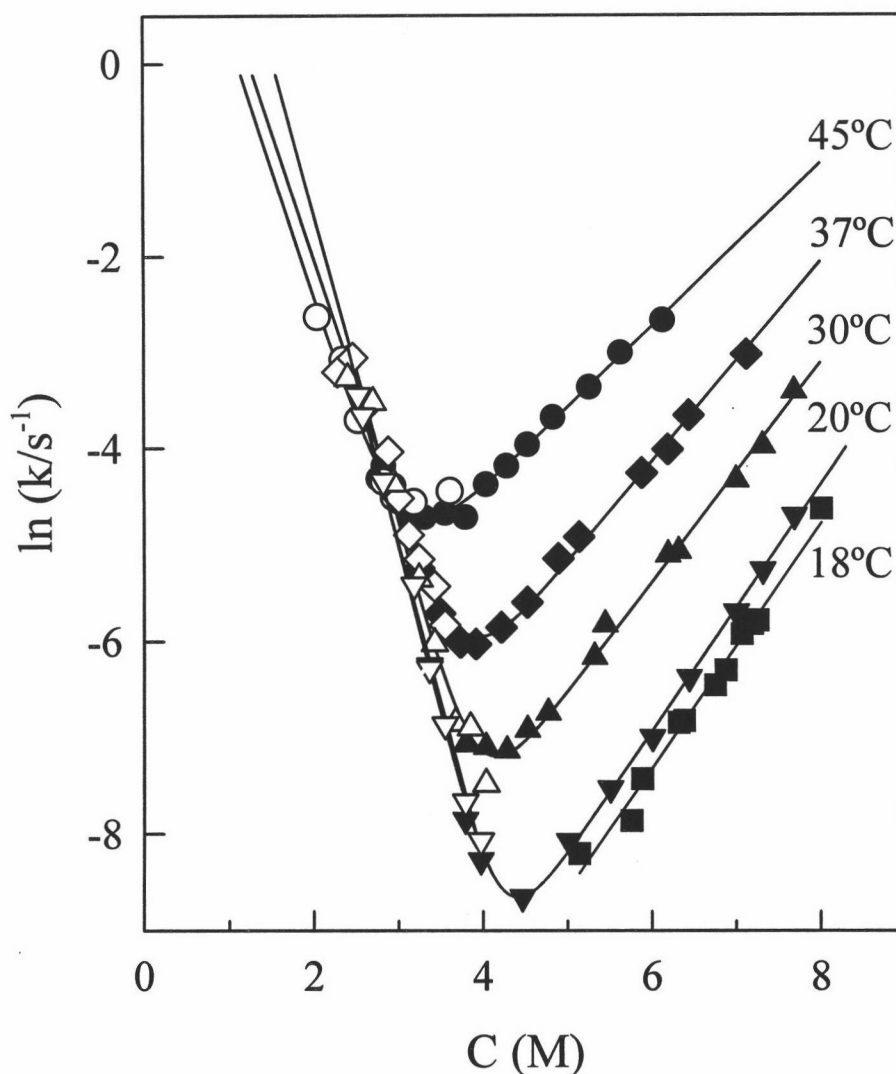


Figura 19: Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento-desplegamiento de lisozima con la concentración de guanidina (representación denominada Chevron), a diferentes temperaturas. Los símbolos huecos y rellenos corresponden, respectivamente, a experimentos cinéticos realizados en las direcciones del replegamiento y desplegado, analizados según las ecuaciones (2.34) y (2.31). Las líneas representan los ajustes de la dependencia predicha por las ecuaciones (11), (13) y (14) a los datos experimentales; el perfil a 18 °C se analizó según la ecuación (19).

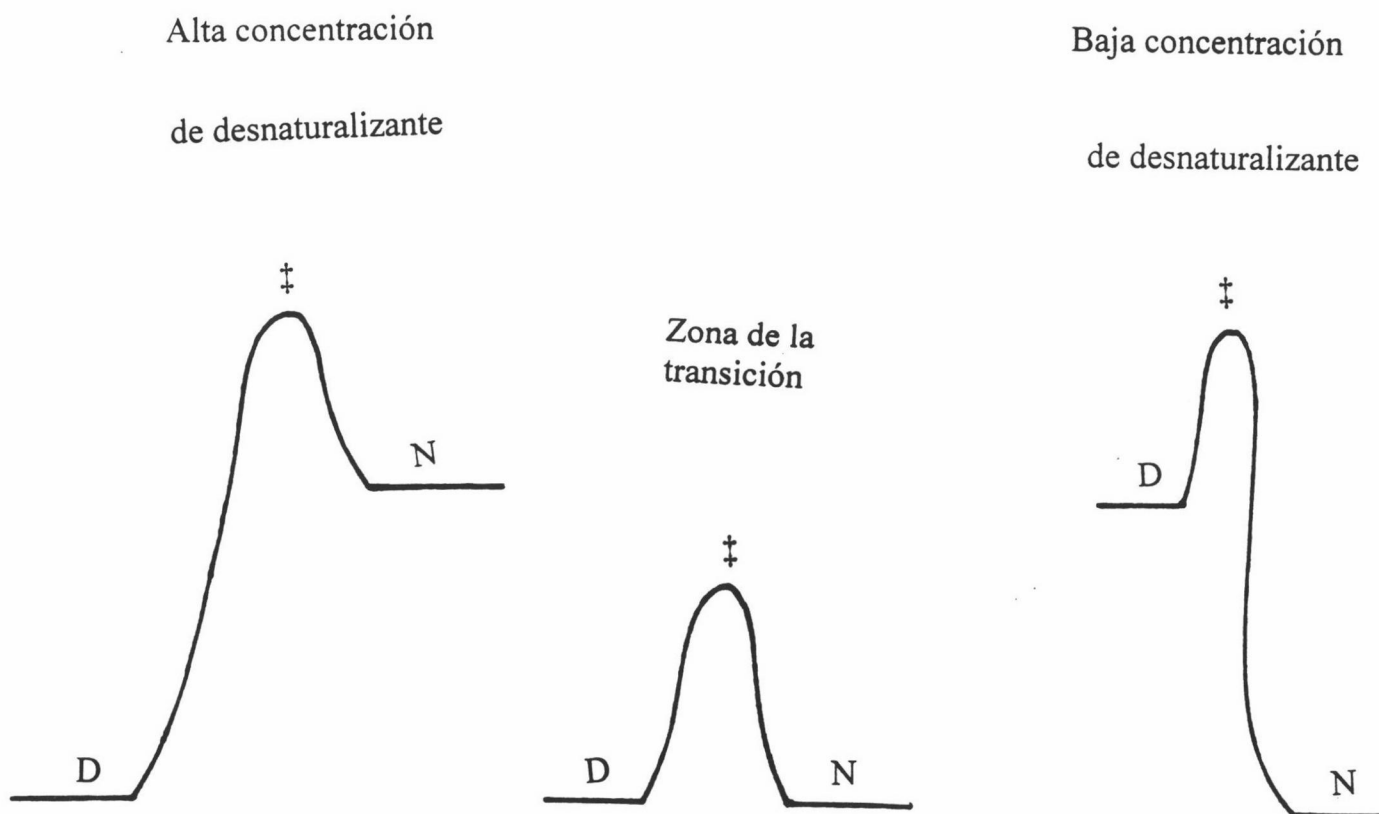


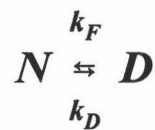
Figura 20: Diagramas de energía simplificados relativos a los estados nativo y desplegado de una proteína hipotética que sigue el modelo de dos estados. A baja concentración de guanidina (rama izquierda del Chevron) el estado más favorecido energéticamente es el nativo; en estas condiciones la constante de equilibrio, K , es mucho menor a la unidad, $k_F \gg k_D$ y por tanto la constante de velocidad aparente que medimos en los experimentos cinéticos se puede aproximar a k_F . A alta concentración de guanidina (rama derecha del Chevron) el estado energéticamente más favorecido es el desplegado; K es mucho mayor a la unidad, $k_D \gg k_F$ y por tanto la constante de velocidad aparente que medimos en los experimentos cinéticos equivale de manera aproximada a k_D .

El análisis de este tipo de representación ha sido ampliamente descrito en diferentes trabajos (Beasty et al., 1986; Hurle et al., 1987; Matthew y Hurle, 1987; Perry et al., 1989; Chen et al., 1989 a y b; Chen et al., 1992; Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 1996).

Los perfiles obtenidos (Figura 19) se interpretaron de acuerdo al modelo cinético de dos estados según el cual los procesos de desplegamiento y plegamiento ocurren sin que ningún

intermedio cinético llegue a poblarse, al menos significativamente. Esto es así ya que, en nuestras condiciones de trabajo el desplegamiento y replegamiento de lisozima se describen aceptablemente mediante una única exponencial. Además los intermedios cinéticos en el replegamiento de lisozima se pueblan significativamente a concentraciones de guanidina por debajo de 3.2 M (la presencia de intermedios cinéticos se pone de manifiesto en una clara desviación de la rama del Chevron, tal y como se puede ver en la Figura 3 del trabajo de Kiefhaber, 1995) y el límite inferior en nuestros experimentos está en torno a 2 M.

Por tanto según el modelo cinético de dos estados tenemos que:



$$K = \frac{[D]}{[N]} = \frac{k_D}{k_F} \quad (10)$$

k_F y k_D son las constantes de velocidad correspondientes a los procesos de plegamiento y desplegamiento, respectivamente. La constante de velocidad aparente, k , viene dada por la suma de éstas de manera que:

$$\ln k = \ln(k_F + k_D) \quad (11)$$

Los datos cinéticos fueron analizados de acuerdo a la teoría del estado de transición mediante la *ecuación de Eyring*:

$$\ln k = cte - \frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \quad (12)$$

donde ΔG^\ddagger es el cambio de energía de Gibbs de activación.

La dependencia lineal de $\ln k$ con C que se observa en las dos ramas del chevron implica una dependencia lineal del cambio de energía de Gibbs de activación con C y es a su vez reminiscencia de la linealidad del $\ln K$ con C . Las expresiones que relacionan k_F y k_D con la concentración de guanidina pueden deducirse fácilmente de la teoría del estado de transición (Chen et al., 1992):

$$\ln k_N = \ln k_{1/2} + \frac{m_{D-\ddagger}}{RT} \cdot (C - C_{1/2}) \quad (13)$$

$$\ln k_D = \ln k_{1/2} + \frac{m_{N-\ddagger}}{RT} \cdot (C - C_{1/2}) \quad (14)$$

donde $k_{1/2}$ es el valor de k_N y k_D cuando $C=C_{1/2}$, $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ describen el efecto de la concentración de desnaturalizante en las energías de Gibbs de activación para el plegamiento y desplegamiento, respectivamente, de manera que :

$$m_{D-\ddagger} = - \left(\frac{\partial \Delta G_{D-\ddagger}}{\partial C} \right) \quad (15)$$

$$m_{N-\ddagger} = - \left(\frac{\partial \Delta G_{N-\ddagger}}{\partial C} \right) \quad (16)$$

Se ha supuesto una dependencia lineal del cambio en las energías de Gibbs de activación con la concentración de desnaturalizante, es decir, $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ se han tomado como constantes.

han sido discutidas ampliamente por Schmid (1992) y Segawa y Sugihara (1984 a y b).

El ajuste no lineal por mínimos cuadrados de las ecuaciones (11), (13) y (14) a los perfiles de $\ln k$ versus C obtenidos a 20, 30, 37 y 45 °C fue siempre excelente, como se observa en la Figura 19, lo que apoya la validez del modelo cinético de dos estados. El análisis de los datos experimentales se hizo utilizando el programa comercial MLAB. Como ya se explicó anteriormente, debemos introducir los datos experimentales en parejas ($\ln k$, C) dispuestas en una matriz $M_{N \times 2}$. A continuación detallamos la subrutina del análisis, siendo $k_{1/2}$, $C_{1/2}$, $m_{N-\ddagger}$ y $m_{D-\ddagger}$ los parámetros ajustables:

M=READ (“nombre del fichero”, número de filas, número de columnas)

```
FUNCTION L (X)=ln (ku (X) + kf (X))
FUNCTION ku (X)=a · exp((m1/RT) · (X-C))
FUNCTION kf (X)=a · exp((m2/RT) · (X-C))
R=0.008314
T= temperatura de trabajo en Kelvin.
```

FIT (a, m1, m2, C), L to M

Z= POINTS (L, valor inicial para la concentración de guanidina: valor final: intervalo entre valores consecutivos)

El valor de $m_{1/2}$ correspondiente al equilibrio se puede calcular a partir de los valores de los valores cinéticos $m_{D-\ddagger}$ y $m_{N-\ddagger}$ dado que:

$$\Delta_N^\ddagger G = \Delta G + \Delta_D^\ddagger G \quad (17)$$

resulta:

$$m_{1/2} = m_{N-\ddagger} - m_{D-\ddagger} \quad (18)$$

$$m_{1/2} = m_{N-\ddagger} - m_{D-\ddagger} \quad (18)$$

Esta última expresión constituye un *test de dos estados* en cinética.

De nuevo es posible calcular el valor de ΔG_w por extrapolación lineal [ecuación (1.7)] a partir de los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ obtenidos en cada caso. En la siguiente tabla se muestran los resultados derivados del análisis de los Chevron a distintas temperaturas:

TABLA 3: Parámetros obtenidos del estudio cinético de los procesos de replegamiento-desplegamiento de lisozima inducidos por saltos en concentración de guanidina

T (°C)	$C_{1/2}$ (M)	$m_{D-\ddagger}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	$m_{N-\ddagger}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	$m_{1/2}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	ΔG_w (kJ·mol ⁻¹)
20	4.20±0.03	-8.53±0.18	3.12±0.09	11.65±0.27	48.93±1.48
30	3.92±0.06	-8.18±0.44	2.87±0.14	11.05±0.58	43.32±2.94
37	3.63±0.03	-7.86±0.27	2.61±0.08	10.47±0.35	38.01±1.58
45	3.04±0.05	-7.20±0.42	2.24±0.11	9.44±0.53	28.70±2.08

Los errores de cada parámetro son los elementos diagonales de la matriz covarianza. Representan un límite inferior de manera que probablemente la incertidumbre asociada a dichos parámetros sea algo mayor.

Para 18 °C sólo se caracterizó la rama del Chevron correspondiente al proceso de desplegamiento. Estos datos fueron analizados según la ecuación:

$$\ln k_D = \ln k_0 + m_{N-\ddagger} \cdot \frac{C}{RT} \quad (19)$$

siendo k_0 la constante de velocidad para el proceso de desplegamiento obtenida como extrapolación lineal a $C=0$.

3.4 ESTUDIO DE LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE LISOZIMA EN PRESENCIA DE GUANIDINA

Hemos estudiado la desnaturalización inducida por temperatura de lisozima mediante DSC en tampón acuoso y en presencia de diferentes concentraciones de guanidina.

3.4.1 Condiciones experimentales y Análisis de las trazas según el modelo de dos estados

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido con lisozima se realizaron con el microcalorímetro modelo DASM-1M (Privalov, 1975) debido a que en este punto de nuestro trabajo experimental nos pareció esencial para el desarrollo del mismo la información obtenida de estos experimentos y todavía no disponíamos del VP-DSC.

La proteína fue dializada en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4.5 y la disolución madre de guanidina se preparó según el procedimiento A) detallado en la sección 2.2.1.2.

Se realizaron experimentos de DSC en el rango de 0 a 0.52 M guanidina siendo la velocidad de barrido de 1.76 K/min. Además se hizo otro experimento en tampón acuoso a 0.93 K/min sin observarse ningún efecto de velocidad de barrido. En todos los casos se registró un segundo barrido de la muestra para comprobar la reversibilidad. Los detalles acerca del experimento calorimétrico se encuentran en la sección 2.2.2.3.

En la Figura 21 se muestra el termograma original correspondiente a lisozima en tampón

acuoso junto con un calibrado eléctrico. El análisis de esta traza se hizo tal y como se describe en los apartados 2.2.2.4 y 2.2.2.5.

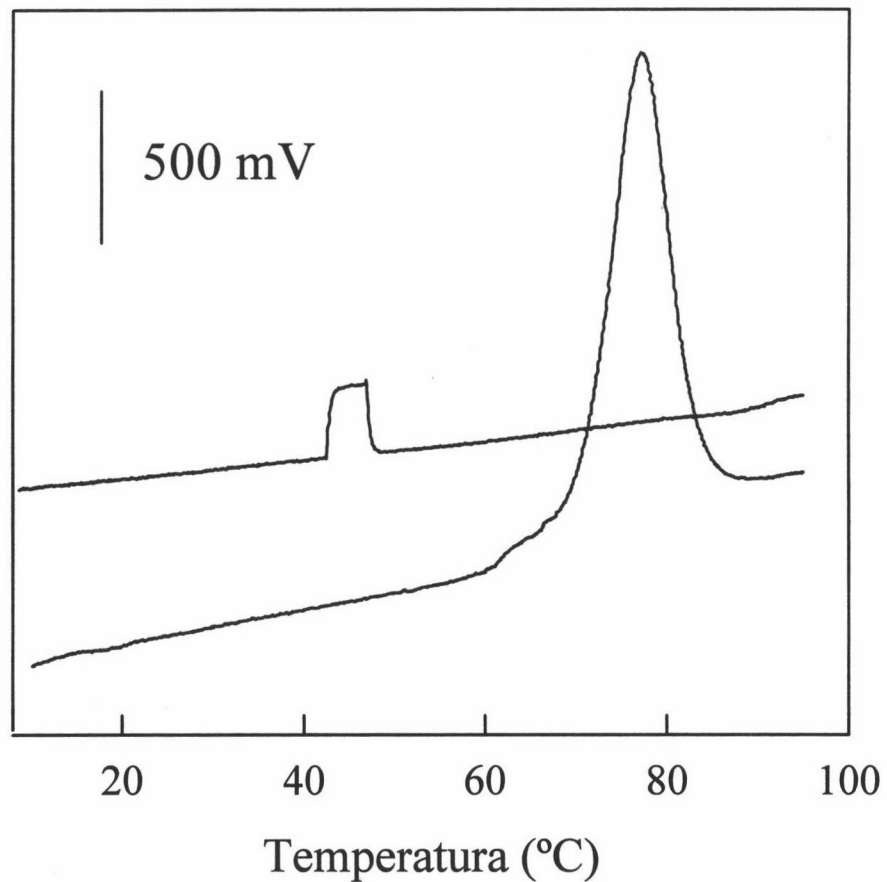


Figura 21: Datos originales de calorimetría diferencial de barrido (señal de salida del instrumento versus temperatura) obtenidos con el DASM-1M a 1.76 K/min: (A) corresponde al primer barrido de una muestra de lisozima en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5, 2.59 mg/mL. (B) Línea base instrumental, en la que se muestra un calibrado eléctrico de 50 μ W.

Las trazas correspondientes al desplegamiento térmico de lisozima en presencia de guanidina (0.11, 0.23 y 0.52 M) se recogen en la Figura 22.

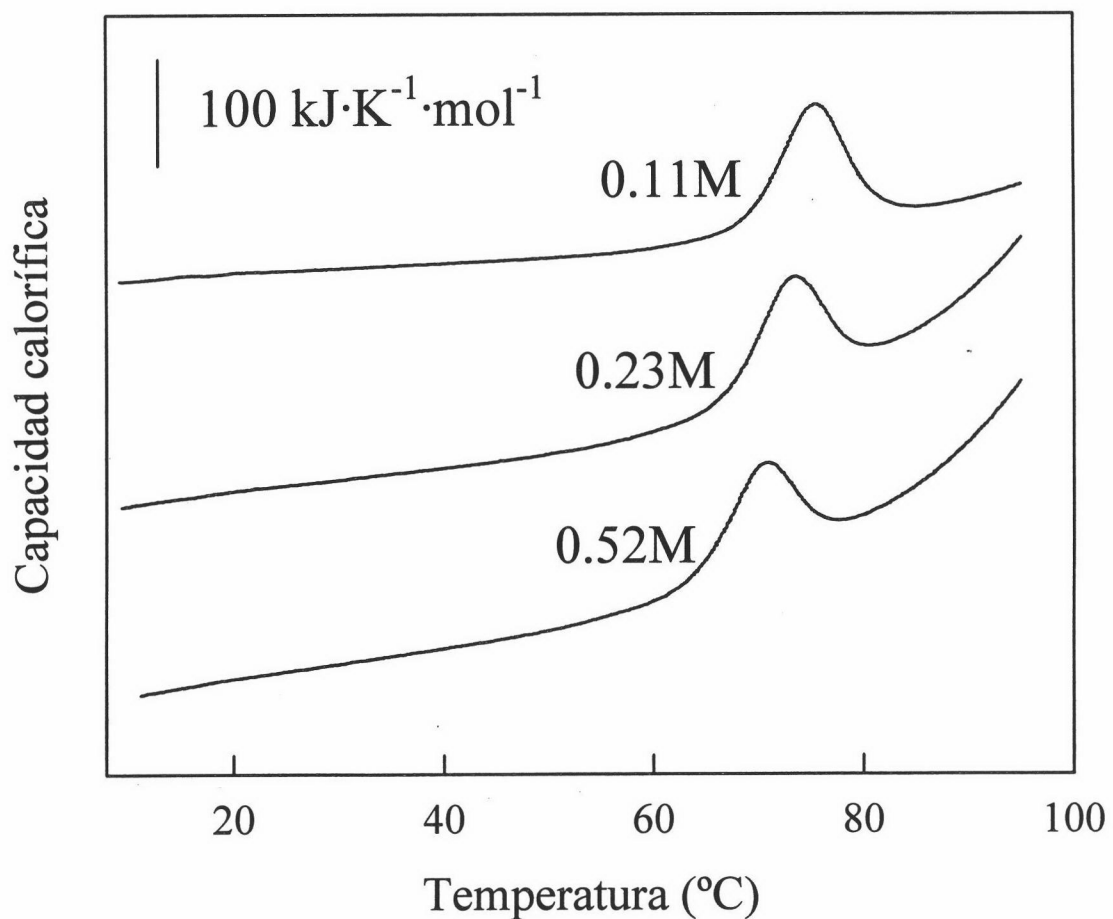


Figura 22: Perfiles de capacidad calorífica molar parcial en función de la temperatura, de lisozima en tampón acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5, y 0.11, 0.23 y 0.52 M guanidina. La concentración de proteína fue de 2 mg/mL y la velocidad de barrido 1.8 K/min.

En el análisis de estos perfiles correspondientes a las tres concentraciones de guanidina estudiadas no restamos línea base instrumental en ningún caso; la razón es que al intentar restarla obteníamos un perfil del que era imposible estimar el valor del ΔC_p , ya que la línea base de la post-transición (correspondiente a la capacidad calorífica del estado desplegado) caía abruptamente, debido probablemente a que la calidad de las trazas no era muy buena teniendo en cuenta que se trabajó con el DASM-1M. Como en ningún caso nuestro objetivo era determinar capacidades caloríficas absolutas sino conocer el cambio en capacidad calorífica, eludimos este paso, aunque el resto del proceso de análisis se realizó según se indica en 2.2.2.4 y 2.2.2.5. En la Figura 23 se representan los ajustes de las trazas correspondientes a diferentes concentraciones de guanidina según el modelo de dos estados, siendo todos ellos buenos. Los parámetros característicos obtenidos del análisis en cada caso se resumen en la siguiente tabla:

[Guanidina] (M)	c (mg/mL)	T _m (°C)	ΔH^{cal} (kJ·mol ⁻¹)	ΔH^{vH} (kJ·mol ⁻¹)	r	$\Delta C_{p,m}$ (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
0	2.59	76.9	582	457	1.27	7.2
0.11	1.88	75.0	508	481	1.05	11.1
0.23	1.91	72.8	432	492	0.88	8.0
0.52	1.91	70.4	385	485	0.79	3.3

Tabla 4: Parámetros obtenidos a partir del ajuste según el modelo de equilibrio de dos estados de las trazas de lisozima en presencia de diferentes concentraciones de guanidina.

Vemos cómo en algunos casos el parámetro r , que da la relación entre las entalpías calorimétrica y de van't Hoff, se aleja de la unidad. Creemos que esto no obedece a una desviación del comportamiento de dos estados, sino que es debido a que la calidad de las trazas obtenidas con el DASM-1M no fue muy buena.

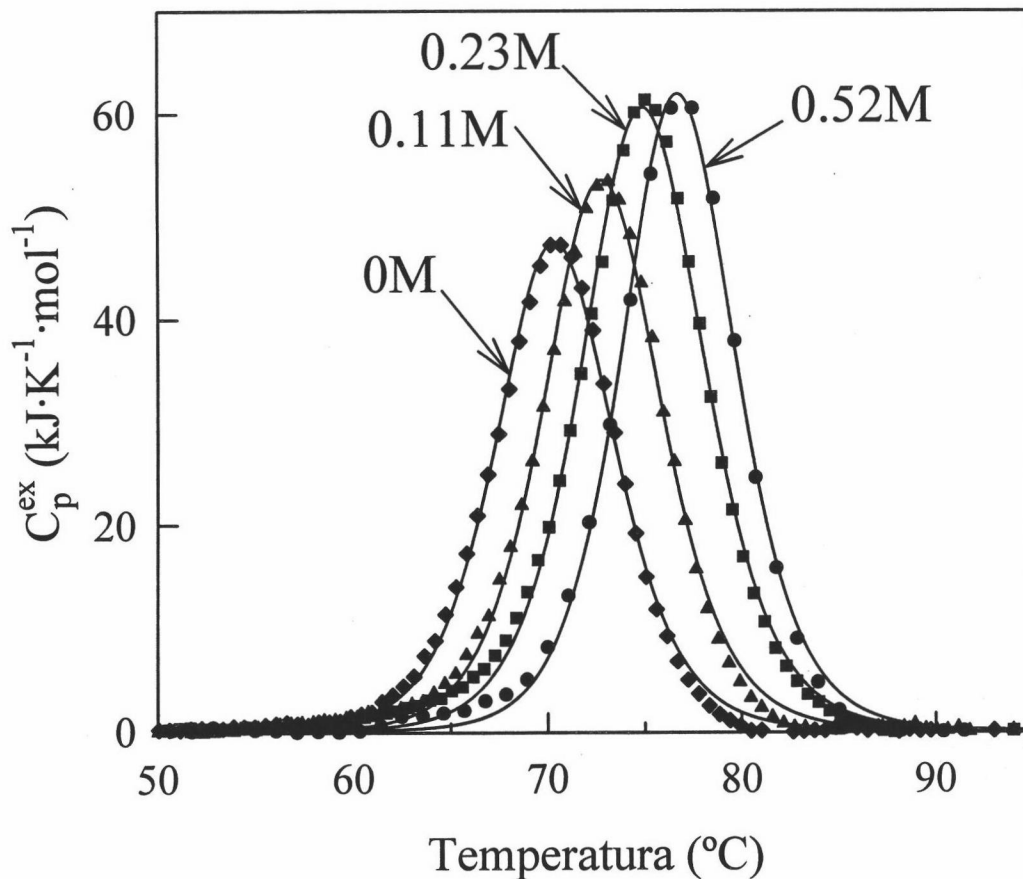


Figura 23: Curvas de capacidad calorífica de exceso versus temperatura correspondientes a las transiciones de DSC mostradas en las Figuras 21 y 22, a las concentraciones de guanidina que se indican. Se ha usado la línea base química como nivel de referencia. Los símbolos indican los datos experimentales y las líneas continuas los mejores ajustes según el modelo de equilibrio de dos estados.

3.4.2 Curva de estabilidad de lisozima en 0 M guanidina

Como ya hemos comentado, las trazas de lisozima fueron obtenidas con el calorímetro diferencial de barrido modelo DASM-1M. Dado que se trata de un instrumento antiguo y de sensibilidad claramente inferior a la de la instrumentación actual, quisimos comparar nuestros resultados en ausencia de guanidina con los ya existentes en la bibliografía. La desnaturalización térmica de lisozima ha sido ampliamente estudiada mediante calorimetría diferencial de barrido de alta sensibilidad (Pfeil y Privalov, 1976; Privalov, 1979; Makhatadze y Privalov, 1993; Privalov y Makhatadze, 1993) de manera que se conoce con una gran precisión las dependencias de ΔH y ΔC_p de desnaturalización con la temperatura; ver Makhatadze y Privalov (1995).

Así pues calculamos la curva de estabilidad correspondiente a lisozima en tampón acuoso de dos formas. Por un lado considerando sólo y exclusivamente los datos de T_m , ΔH_m y ΔC_p obtenidos de nuestro experimento de DSC en ausencia de desnaturalizante (ver Tabla 4) y haciendo uso de la ecuación (2.23). La curva de estabilidad resultante aparece en la Figura 25A. En este caso consideramos que ΔC_p no cambia con la temperatura.

Otra forma de obtener la curva de estabilidad a 0 M guanidina consiste en integrar numéricamente la ecuación de Gibbs-Helmholtz

$$\Delta G_w = -T \int_{T_m}^T \frac{\Delta H}{T^2} dT \quad (20)$$

combinando el valor de T_m determinado por nosotros para las condiciones de tampón y pH utilizadas en nuestro trabajo (50 mM acetato, pH 4.5) junto con los valores del cambio de entalpía de desnaturalización en función de la temperatura que aparecen en la literatura (Makhatadze y Privalov, 1995) y que recogemos en la Figura 24. Estos datos muestran una dependencia no lineal

con T , reflejando el hecho de que estrictamente ΔC_p varía con la temperatura. Consideramos que esa dependencia se describe bien mediante una función cuadrática, de manera que:

$$\Delta H = -3629.75 + 18.95 \cdot T - 0.0199 \cdot T^2 \quad (21)$$

donde T está en K y ΔH en kJ/mol.

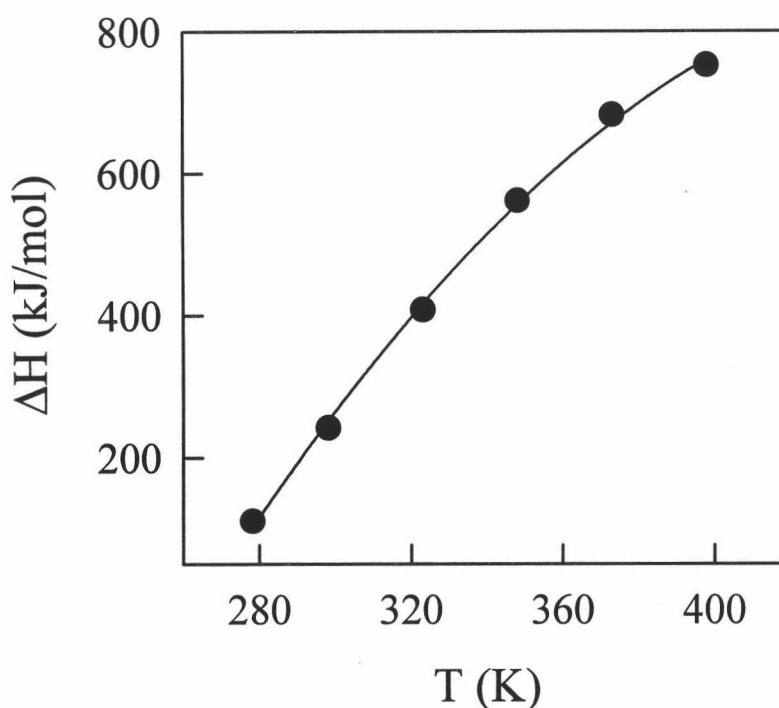


Figura 24: Dependencia del cambio de entalpía de desnaturalización, ΔH , con la temperatura para lisozima. Datos publicados por Makhatazde y Privalov (1995). La línea continua representa el mejor ajuste de un polinomio de segundo grado a dichos datos.

Podemos usar la expresión (21), que nos da la dependencia de ΔH con la temperatura para lisozima de manera general, para calcular la curva de estabilidad en nuestras condiciones concretas debido a que el tampón usado (acetato sódico) tiene un calor de ionización prácticamente despreciable. Por el contrario, debemos usar nuestra temperatura de

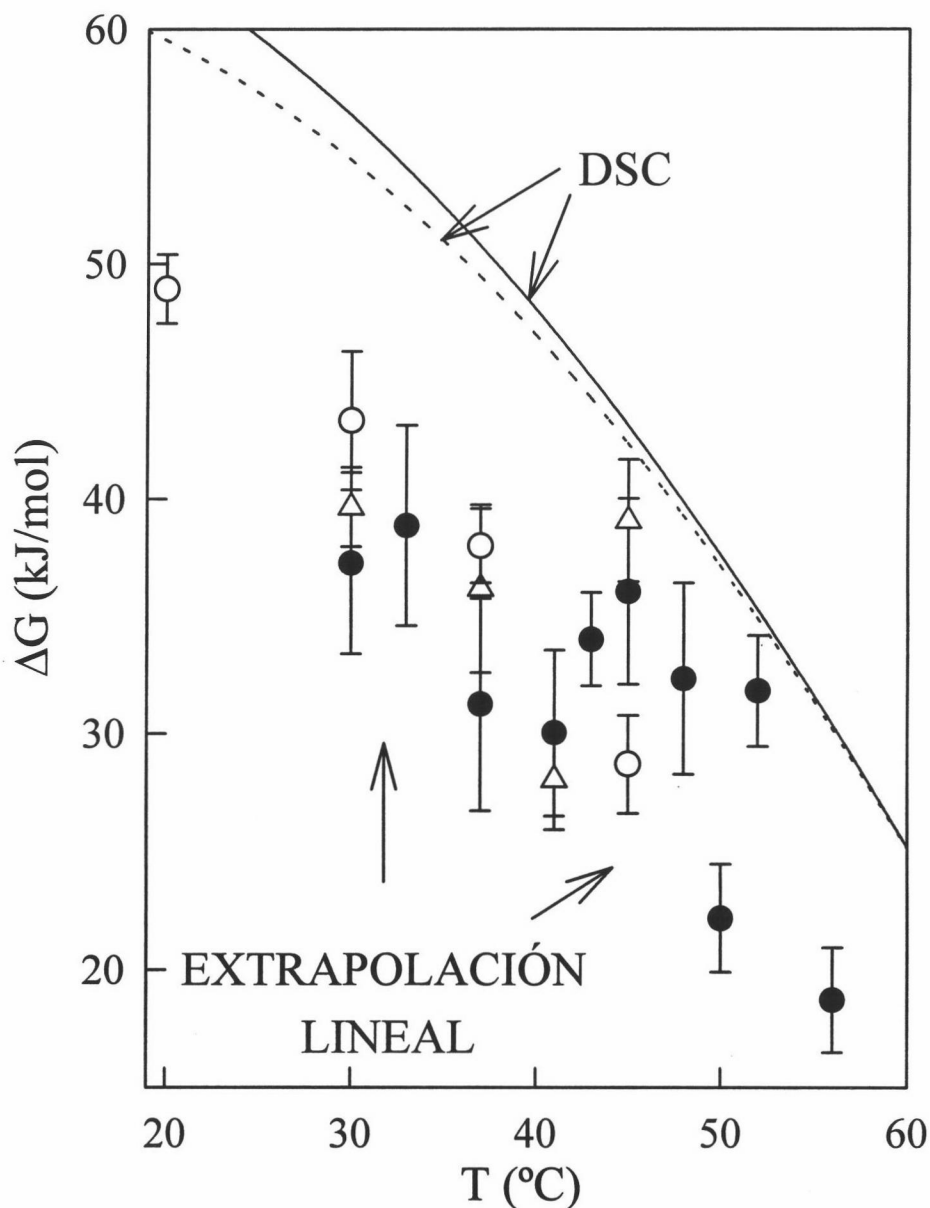


Figura 25A: Dependencia con la temperatura del cambio de energía de Gibbs para la desnaturalización de lisozima en ausencia de guanidina (tampón acetato sódico, pH 4.5). Las estimaciones mediante extrapolación lineal se obtuvieron a partir del análisis de tres tipos diferentes de datos experimentales de desnaturalización inducida por guanidina: (\bullet) perfiles de intensidad de fluorescencia versus concentración de guanidina (Figuras 4-8), (Δ) perfiles de amplitud de desplegamiento versus concentración de guanidina (9-12) y (\circ) perfiles de constantes de velocidad de plegamiento-desplegamiento versus concentración de guanidina (Chevron, Figura 19). Las barras de error representan la desviación estándar dada por el programa MLAB. Las líneas son las curvas de estabilidad derivadas de datos de DSC. Línea continua: curva de estabilidad calculada con el valor de T_m (76.9°C) correspondiente a nuestras condiciones (acetato sódico 50 mM/HCl, pH 4.5), junto con las entalpías de desplegamiento dadas por Makhatadze y Privalov (1995); este cálculo [ecuación (20)] tiene en cuenta la dependencia con la temperatura de ΔC_p . Línea discontinua: curva de estabilidad calculada a partir de los valores de T_m , ΔH_m y ΔC_p (76.9°C , $583\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $7.2\text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente) derivados de nuestros experimentos de DSC, suponiendo que ΔC_p no cambia con la temperatura [ecuación (2.23)].

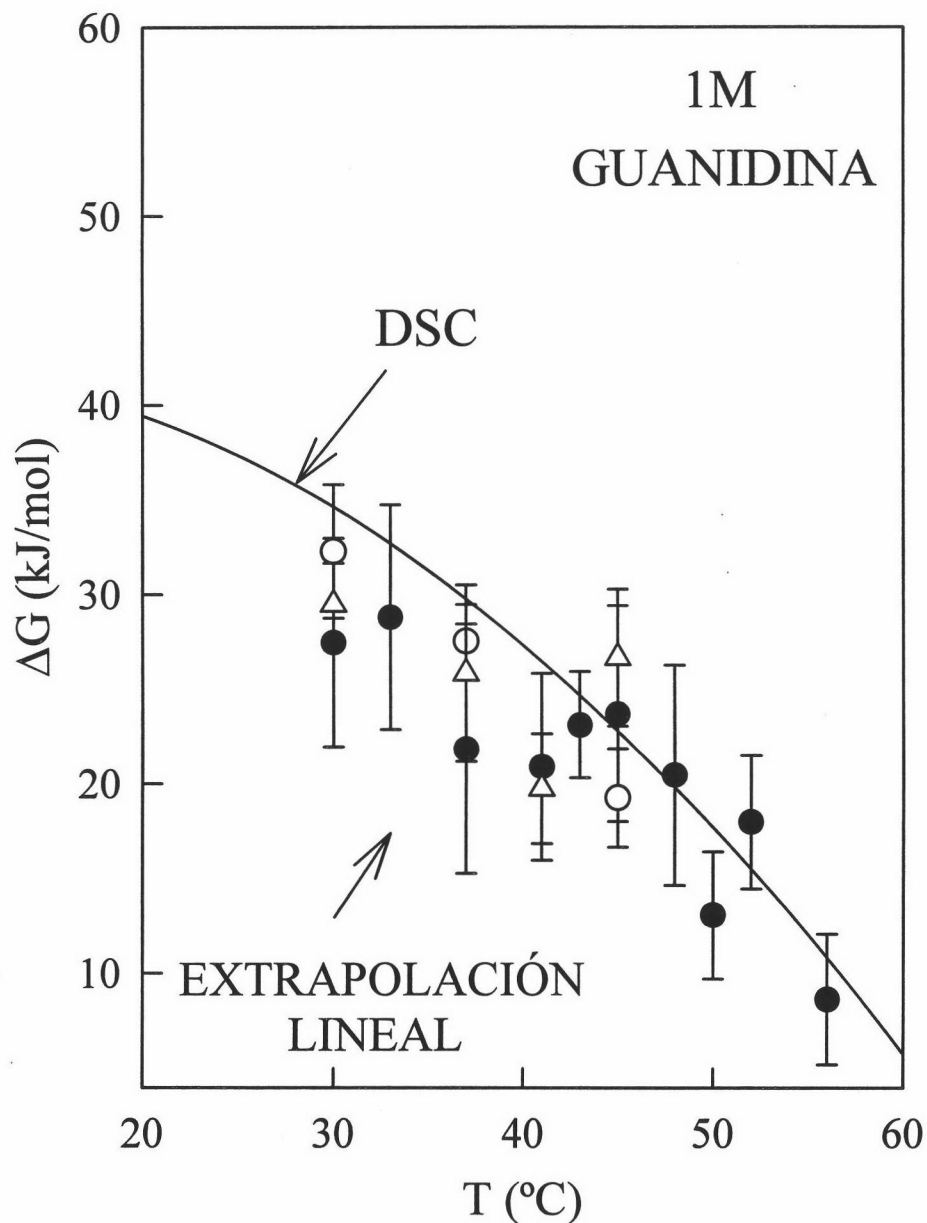


Figura 25B: Dependencia con la temperatura del cambio de energía de Gibbs para la desnaturalización de lisozima en 1 M guanidina, acetato sódico, pH 4.5. Las estimaciones mediante extrapolación lineal se obtuvieron a partir del análisis de tres tipos diferentes de datos experimentales de desnaturalización inducida por guanidina: (●) perfiles de intensidad de fluorescencia versus concentración de guanidina (Figuras 4-8), (▲) perfiles de amplitud de desplegamiento versus concentración de guanidina (9-12) y (○) perfiles de constantes de velocidad de plegamiento-desplegamiento versus concentración de guanidina (Chevron, Figura 19). Las barras de error representan las desviaciones estándar dadas por el programa MLAB. La línea continua es la curva de estabilidad en 1 M guanidina derivada de datos de DSC y calculada según la ecuación (2.23): ΔH_m y ΔC_p determinados a esa misma concentración de desnaturalizante se tomaron del trabajo de Makhatadze y Privalov (1992) y T_m fue extrapolada a 1 M en el perfil de $C_{1/2}$ versus T (ver Figura 32A).

desnaturalización, T_m (ver Tabla 4), ya que éste es un parámetro muy sensible a las condiciones concretas de la disolución. De esta manera, combinando la T_m obtenida experimentalmente (76.9 °C) junto con los valores para el cambio de entalpía en función de la temperatura publicados por Makhatadze y Privalov (1995), obtenemos la curva de estabilidad más fiable que podemos calcular para lisozima a pH 4.5, 50 mM acetato sódico (ver Figura 25A). Obviamente en este cálculo estamos teniendo en cuenta la dependencia del cambio de capacidad calorífica con la temperatura.

No obstante debemos señalar que las curvas de estabilidad obtenidas por los dos procedimientos mencionados no difieren significativamente tal y como se muestra en la Figura 25A; así dentro del intervalo de temperaturas considerado vemos que la diferencia entre ambas es menor a los 2 kJ/mol.

3.4.3 Cálculo de los valores de $m_{1/2}$ de desnaturalización a partir de datos de DSC

Es posible calcular valores de $m_{1/2}$ a partir del efecto de la concentración de desnaturalizante en los parámetros que se obtienen de transiciones de calorimetría diferencial de barrido. Así, la temperatura de desnaturalización, T_m , se va a ver afectada por la presencia de desnaturalizante según la siguiente expresión:

$$\left(\frac{dT_m}{dC} \right) = \left(\frac{\partial T}{\partial C} \right)_{\Delta G=0} = - \frac{(\partial \Delta G / \partial C)_T}{(\partial \Delta G / \partial T)_C} = - \frac{m_{1/2}}{\Delta S_m} \quad (22)$$

donde ΔS_m es la entropía de desnaturalización a la T_m para una concentración dada de desnaturalizante. Para llegar a la ecuación (22) primero hemos tenido en cuenta que ΔG vale cero cuando $T=T_m$ y hemos usado algunas propiedades matemáticas conocidas de las

parciales (Blinder, 1966). Además hemos considerado las definiciones de $m_{1/2}$ y ΔS como derivadas parciales de ΔG . Dado que $\Delta S_m = \Delta H_m / T_m$, entonces se llega a la siguiente expresión para el cálculo de valores de $m_{1/2}$ a partir de los valores de entalpía de desnaturalización y de temperatura de desnaturalización, obtenidos de experimentos de DSC realizados a diferentes concentraciones de desnaturalizante:

$$m_{1/2} = - \frac{\Delta H_m}{T_m \cdot (dC/dT_m)} \quad (23)$$

De esta forma hemos calculado los valores de $m_{1/2}$ correspondientes a la desnaturalización térmica de lisozima en presencia de 0, 0.11, 0.23 y 0.52 M guanidina a partir de los valores de T_m y ΔH_m obtenidos del análisis de cada una de las trazas (ver Tabla 4). El término (dC/dT_m) lo hemos estimado de la representación de concentración de guanidina *versus* temperatura de desnaturalización. Como se observa en la Figura 26A estos datos se describen adecuadamente mediante una ecuación lineal. Del ajuste obtenemos:

$$C = 27.23 - 0.0775 \cdot T_m \quad (24)$$

donde T es la temperatura en K y C la concentración de guanidina en mol/L.

Los valores que resultan para $m_{1/2}$ se resumen en la siguiente tabla:

C (M)	$m_{1/2}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)
0	20.8±2.6
0.11	18.3±2.8
0.23	15.6±2.5
0.52	14.0±2.3

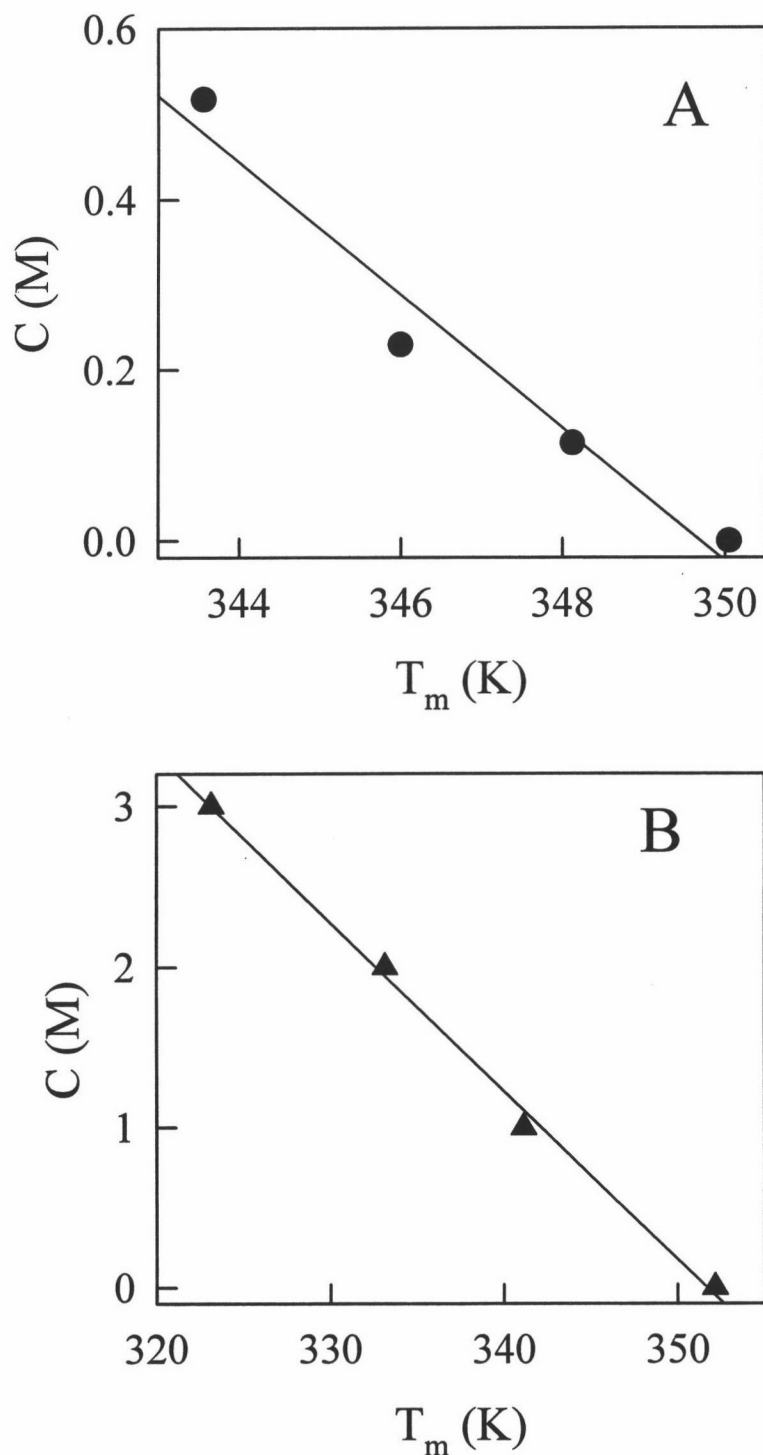


Figura 26: Perfiles de concentración de guanidina en función de la temperatura de desnaturalización obtenida de experimentos calorimétricos con lisozima: (A) en nuestras condiciones de trabajo, es decir, acetato sódico 50 mM/HCl pH 4.5 (ver Figura 23); (B) datos publicados por Privalov y Makhatadze, (1992) obtenidos en tampón acetato, pH 4.6. Las líneas representan el ajuste lineal a los datos.

Los errores que aparecen asociados a $m_{1/2}$ se han calculado mediante propagación lineal de errores a partir de la ecuación (23) considerando un error típico de 15 kJ/mol para la entalpía de desnaturalización.

Paralelamente hemos aplicado también este procedimiento de obtención de valores de $m_{1/2}$ a los datos calorimétricos de lisozima en presencia de guanidina publicados por Privalov y Makhatadze (1992) y que aparecen en la Figura 26B. Los valores de $m_{1/2}$ que resultan de aplicar la ecuación (23) se recogen en la siguiente tabla:

C (M)	$m_{1/2}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)
0	15.8±1.0
1	13.2±0.9
2	11.3±0.9
3	8.8±0.8

A pesar de que los datos de estos autores corresponden a condiciones de tampón y pH diferentes a las nuestras, los valores de $m_{1/2}$ que se obtienen concuerdan bastante bien con los calculados a partir de nuestros datos (ver Figura 32B).

3.5 COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE ΔG DE DESNATURALIZACIÓN OBTENIDOS POR EXTRAPOLACIÓN LINEAL Y LA CURVA DE ESTABILIDAD CALCULADA A PARTIR DE EXPERIMENTOS DE DSC

Como detallamos en las secciones 3.1, 3.2 y 3.3, hemos determinado los valores del cambio de energía de Gibbs en 0 M guanidina en el rango de temperaturas comprendido entre 30 y 56 °C, a partir del análisis de tres tipos diferentes de datos experimentales de desnaturalización

inducida por guanidina que a continuación resumimos brevemente:

1) Perfiles de intensidad de fluorescencia *versus* concentración de desnaturalizante (Figuras 4 a 8). Se analizaron de acuerdo al modelo de equilibrio de dos estados [ecuación (8)].

2) Amplitudes de las cinéticas de desnaturalización observadas después de transferir la proteína (previamente incubada en presencia de una concentración dada de guanidina) a condiciones fuertemente desnaturalizantes (*ensayos de desplegamiento*); estas amplitudes son proporcionales a la cantidad de proteína en estado nativo presente en la solución de partida. Los perfiles de amplitud *versus* concentración de guanidina (Figuras 9 a 12) se analizaron también de acuerdo al modelo de equilibrio de dos estados [ecuación (9)].

3) Perfiles de constantes de velocidad aparentes de plegamiento-desplegamiento *versus* concentración de guanidina (ver Chevron a diferentes temperaturas, Figura 19). Estos fueron analizados según el modelo cinético de dos estados [ecuaciones (11), (13) y (14)].

Como se observa en la Figura 25A existe una excelente concordancia entre los valores de ΔG_w obtenidos a partir de los tres tipos de información experimental descritos y mediante el método de extrapolación lineal [ecuación (1.7)]. No obstante, todos ellos son significativamente menores (alrededor de 15 kJ/mol) que los valores correspondientes a la curva de estabilidad derivada de los datos de DSC [ecuaciones (20) y (2.23)]. No sucede lo mismo si en lugar de extrapolar a 0 M guanidina lo hacemos a 1 M. Hemos obtenido la curva de estabilidad a 1 M guanidina que se deriva de experimentos de DSC; haciendo uso de la ecuación (2.23) tomamos los valores de ΔH_m y $\Delta C_{p,m}$ determinados a la misma concentración de guanidina por Makhatadze y Privalov, (1992) y la T_m extrapolada a 1 M en nuestro perfil de $C_{1/2}$ *versus* T (ver Figura 32A).

En la Figura 25B comparamos la curva de estabilidad correspondiente a 1 M guanidina así calculada, con los valores para ΔG obtenidos a partir de los diferentes procedimientos experimentales descritos, mediante LEM a 1 M; como se observa la concordancia es muy buena.

En principio podríamos pensar que la discrepancia observada a 0 M guanidina podría ser debida a la presencia de estados intermedios significativamente poblados en el transcurso de la desnaturalización de lisozima inducida por guanidina. Las Figuras 27, 28, 29 y 30 muestran los perfiles de fracción de proteína nativa, x_N , en función de la concentración de desnaturalizante a 30, 37, 41 y 45 °C calculados a partir de los tres tipos de información experimental de que se dispone; en cada caso los tres perfiles concuerdan entre sí dentro del error experimental. Es importante destacar que el cálculo de x_N a partir de los ensayos de desplegamiento **no** implica que se haya supuesto el modelo de dos estados, ya que como hemos explicado anteriormente, la relación $\Delta I/\Delta I^0$ (ver 2.2.3.2) proporciona la fracción molar de estado nativo incluso si existe una población significativa de estados intermedios. El hecho de que los valores de fracción molar de nativo que se obtienen de los ensayos de desplegamiento representen un test de dos estados para la desnaturalización inducida por codisolventes ya fue puesto de manifiesto por Mücke y Schmid (1994).

Así pues el solapamiento de los diferentes perfiles de x_N *versus* C a una temperatura dada, calculados a partir del análisis de dos estados de los datos de fluorescencia y de los Chevron junto con los datos de x_N que se obtienen de los ensayos de desplegamiento apoya la validez del mecanismo de dos estados propuesto en un principio.

En la Figura 31 aparecen también los correspondientes perfiles de fracción de estado nativo en función de la concentración de desnaturalizante obtenidos de los experimentos de fluorescencia a diferentes temperaturas (Figuras 4 a 8).

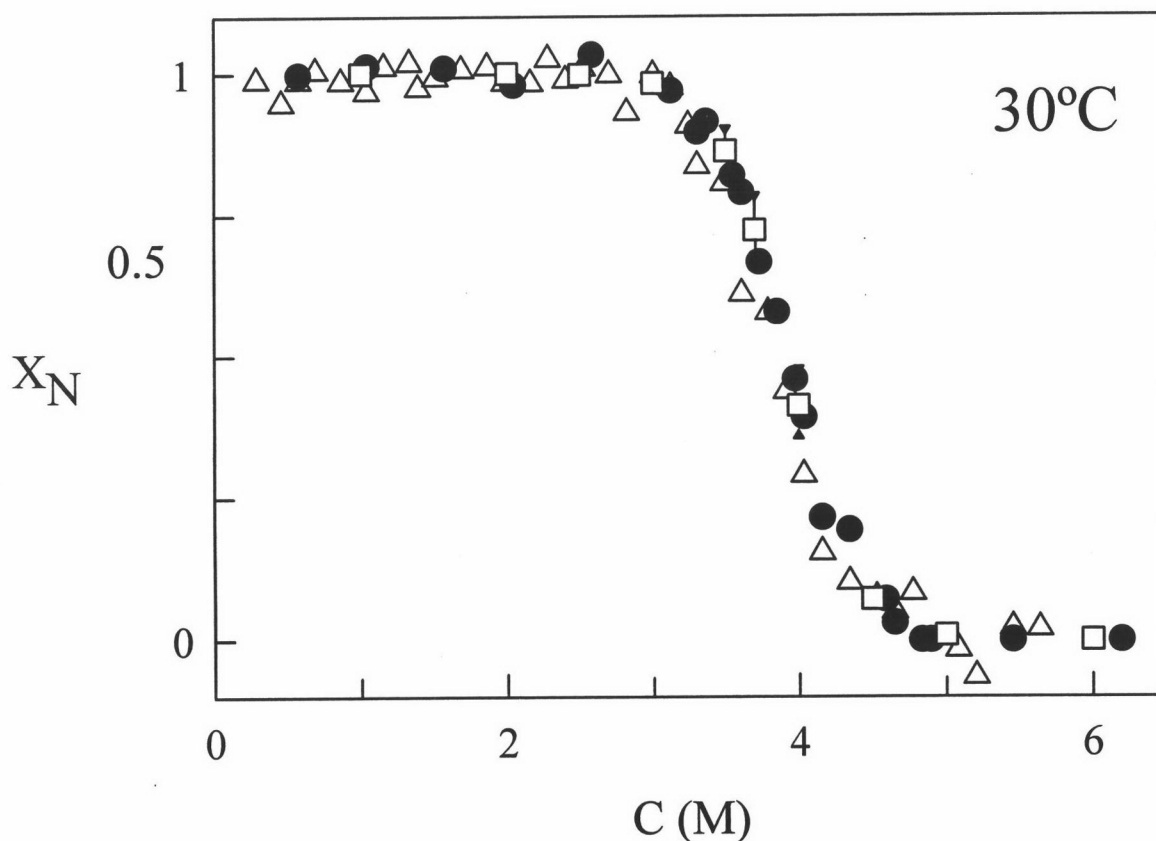


Figura 27: Perfil de equilibrio de fracción molar de lisozima nativa en función de la concentración de guanidina a 30 °C: (Δ) valores calculados a partir de datos de intensidad de fluorescencia (Figura 4), junto con las dependencias de la intensidad de fluorescencia de los estados nativo y desplegado con la concentración de desnaturalizante, determinadas a partir del ajuste de la ecuación (8) a los datos de intensidad de fluorescencia; (\bullet) valores derivados de los ensayos de desplegamiento y calculados como $\Delta I/\Delta I^0$. La fracción molar de proteína nativa así calculada **no** implica la suposición del modelo de dos estados (Mücke y Schmid, 1994); (\square) valores predichos a partir de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ derivados del análisis del Chevron a 30 °C (Figura 19) según las ecuaciones (11), (13) y (14). Las barras de error han sido calculadas a partir de las desviaciones estándar asociadas a $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$, dadas por el programa MLAB.

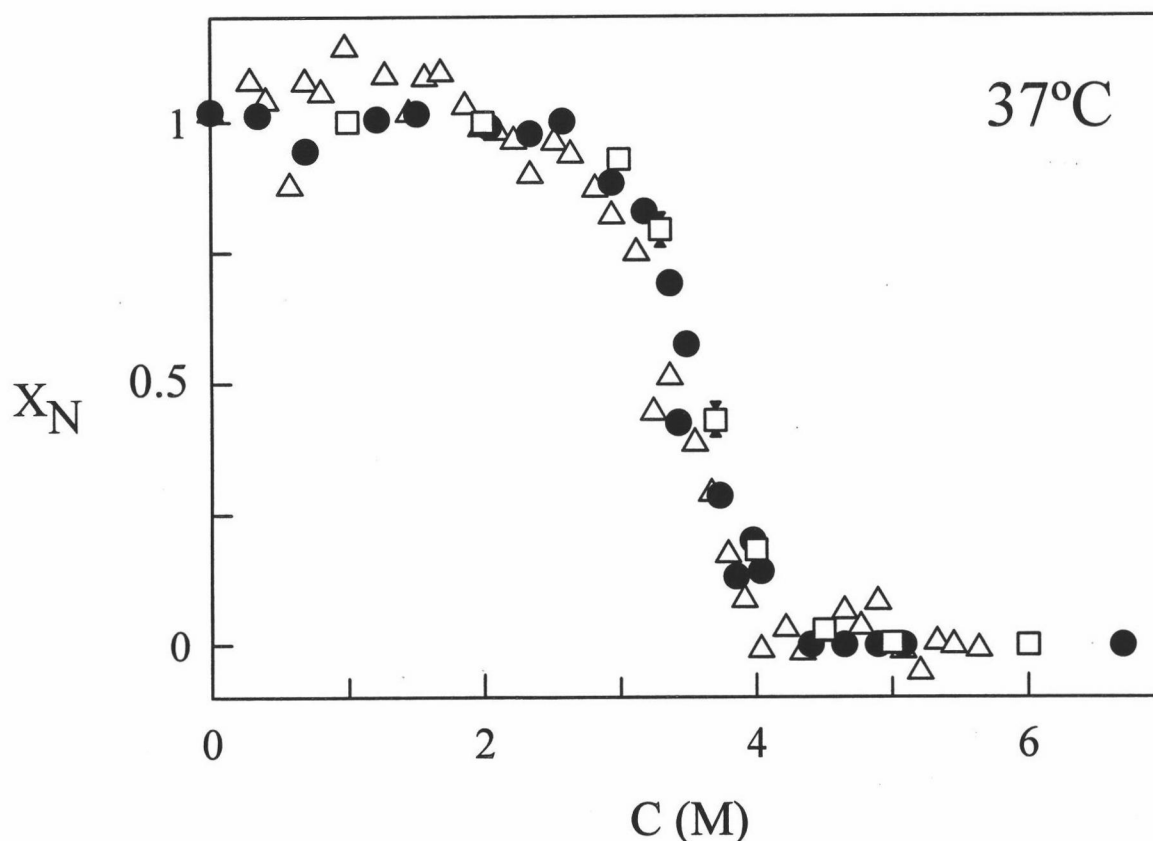


Figura 28: Perfil de equilibrio de la fracción molar de lisozima nativa en función de la concentración de guanidina a 37 °C: (Δ) valores calculados a partir de datos de intensidad de fluorescencia (Figura 5), junto con las dependencias de la intensidad de fluorescencia de los estados nativo y desplegado con la concentración de desnaturante, determinadas a partir del ajuste de la ecuación (8) a los datos de intensidad de fluorescencia; (\bullet) valores derivados de los ensayos de desplegamiento y calculados como $\Delta I/\Delta I^0$. La fracción molar de proteína nativa así calculada **no** implica la suposición del modelo de dos estados (Mücke y Schmid, 1994); (\square) valores predichos a partir de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ derivados del análisis del Chevron a 37 °C (Figura 19) según las ecuaciones (11), (13) y (14). Las barras de error han sido calculadas a partir de las desviaciones estándar asociadas a $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$, dadas por el programa MLAB.

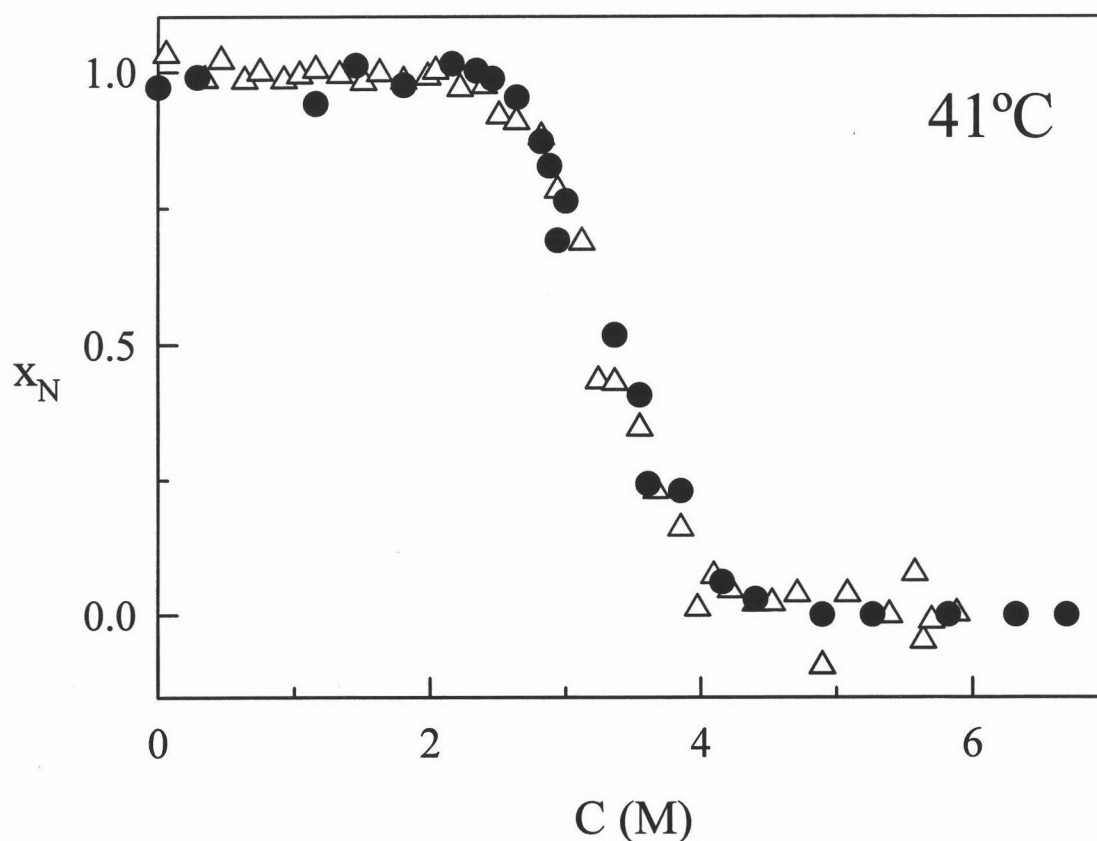


Figura 29: Perfil de equilibrio de la fracción molar de lisozima nativa en función de la concentración de guanidina a 41 °C: (Δ) valores calculados a partir de datos de intensidad de fluorescencia (Figura 5), junto con las dependencias de la intensidad de fluorescencia de los estados nativo y desplegado con la concentración de desnaturizante, determinadas a partir del ajuste de la ecuación (8) a los datos de intensidad de fluorescencia; (●) valores derivados de los ensayos de desplegamiento y calculados como $\Delta I/\Delta I^0$. La fracción molar de proteína nativa así calculada **no** implica la suposición del modelo de dos estados (Mücke y Schmid, 1994).

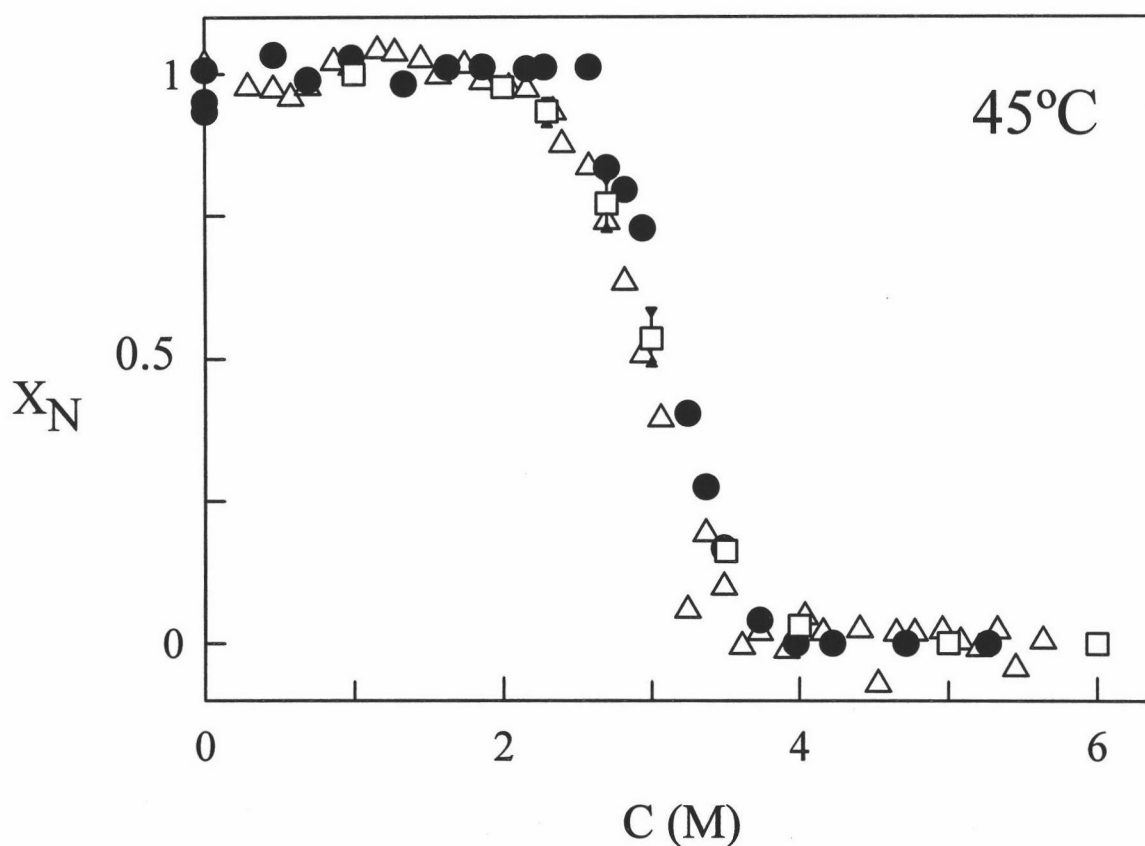


Figura 30: Perfil de equilibrio de la fracción molar de lisozima nativa en función de la concentración de guanidina a 45 °C: (Δ) valores calculados a partir de datos de intensidad de fluorescencia (Figura 6), junto con las dependencias de la intensidad de fluorescencia de los estados nativo y desplegado con la concentración de desnaturalizante, determinadas a partir del ajuste de la ecuación (8) a los datos de intensidad de fluorescencia; (\bullet) valores derivados de los ensayos de desplegamiento y calculados como $\Delta I/\Delta I^0$. La fracción molar de proteína nativa así calculada **no** implica la suposición del modelo de dos estados (Mücke y Schmid, 1994); (\square) valores predichos a partir de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ derivados del análisis del Chevron a 45 °C (Figura 19) según las ecuaciones (11), (13) y (14). Las barras de error han sido calculadas a partir de las desviaciones estándar asociadas a $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ dadas por el programa MLAB.

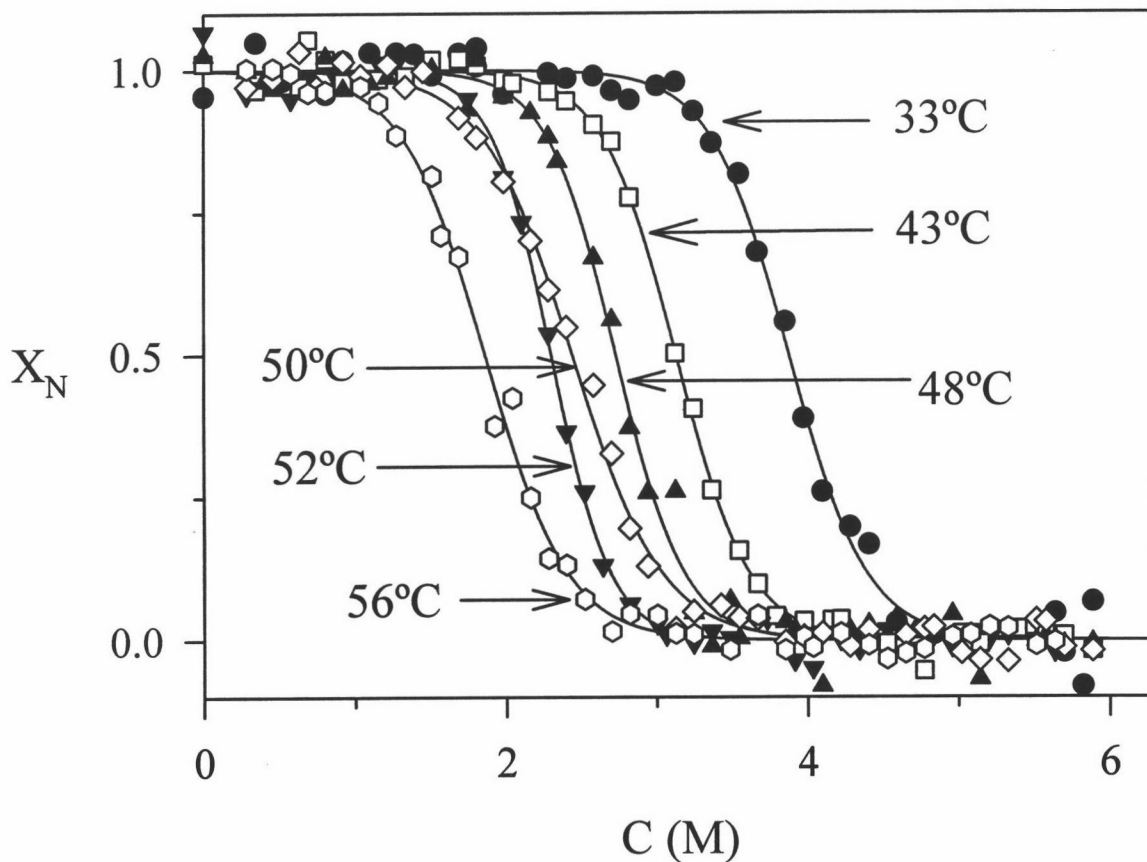


Figura 31: Perfiles correspondientes a la variación de fracción molar de lisozima nativa, en el equilibrio, con la concentración de guanidina a diferentes temperaturas. Los valores han sido calculados a partir de los datos de intensidad de fluorescencia (Figuras 4-8), junto con las dependencias de la intensidad de fluorescencia de los estados nativo y desplegado con la concentración de desnaturalizante, determinadas a partir del ajuste de la ecuación (8) a las curvas de intensidad de fluorescencia. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de la expresión $x_N = (I - I_D) / (I_N - I_D)$ a los datos.

3.6 CAMBIO DEL VALOR DE $m_{1/2}$ PARA LA DESNATURALIZACIÓN DE LISOZIMA A LO LARGO DE LA LINEA DE EQUILIBRIO C-T

Hemos determinado los valores de equilibrio de $m_{1/2}$ para la desnaturalización inducida por guanidina de lisozima a partir del análisis de cuatro tipos diferentes de datos experimentales:

- 1) Perfiles de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de guanidina (Figuras 4 a 8).
- 2) Perfiles de las amplitudes de desplegamiento en función de la concentración de guanidina (Figuras 9 a 12) obtenidos a partir de los ensayos de desplegamiento.
- 3) Perfiles de constantes de velocidad aparentes de plegamiento-desplegamiento en función de la concentración de guanidina (Chevron, Figura 19).
- 4) Efecto de la concentración de desnaturalizante en los parámetros T_m y ΔH_m obtenidos del análisis de termogramas de DSC según la ecuación (23).

Como se observa en la Figura 32B hay una buena concordancia entre los valores de $m_{1/2}$ que se derivan de cada uno de estos cuatro procedimientos.

Llegados a este punto es importante destacar que el análisis de los perfiles experimentales para la desnaturalización inducida por guanidina a temperatura constante permite obtener, además de otros parámetros, los valores de $C_{1/2}$ para esa temperatura en concreto, mientras que los termogramas de DSC correspondientes a la desnaturalización térmica de la proteína en presencia de una concentración constante de desnaturalizante arrojan, además de otros parámetros, la temperatura de desnaturalización (T_m) correspondiente a una concentración dada de desnaturalizante. No obstante, a pesar de la terminología empleada ($C_{1/2}$ correspondiente a una T dada, o T_m para una C dada) en ambos casos el análisis de los datos experimentales proporciona

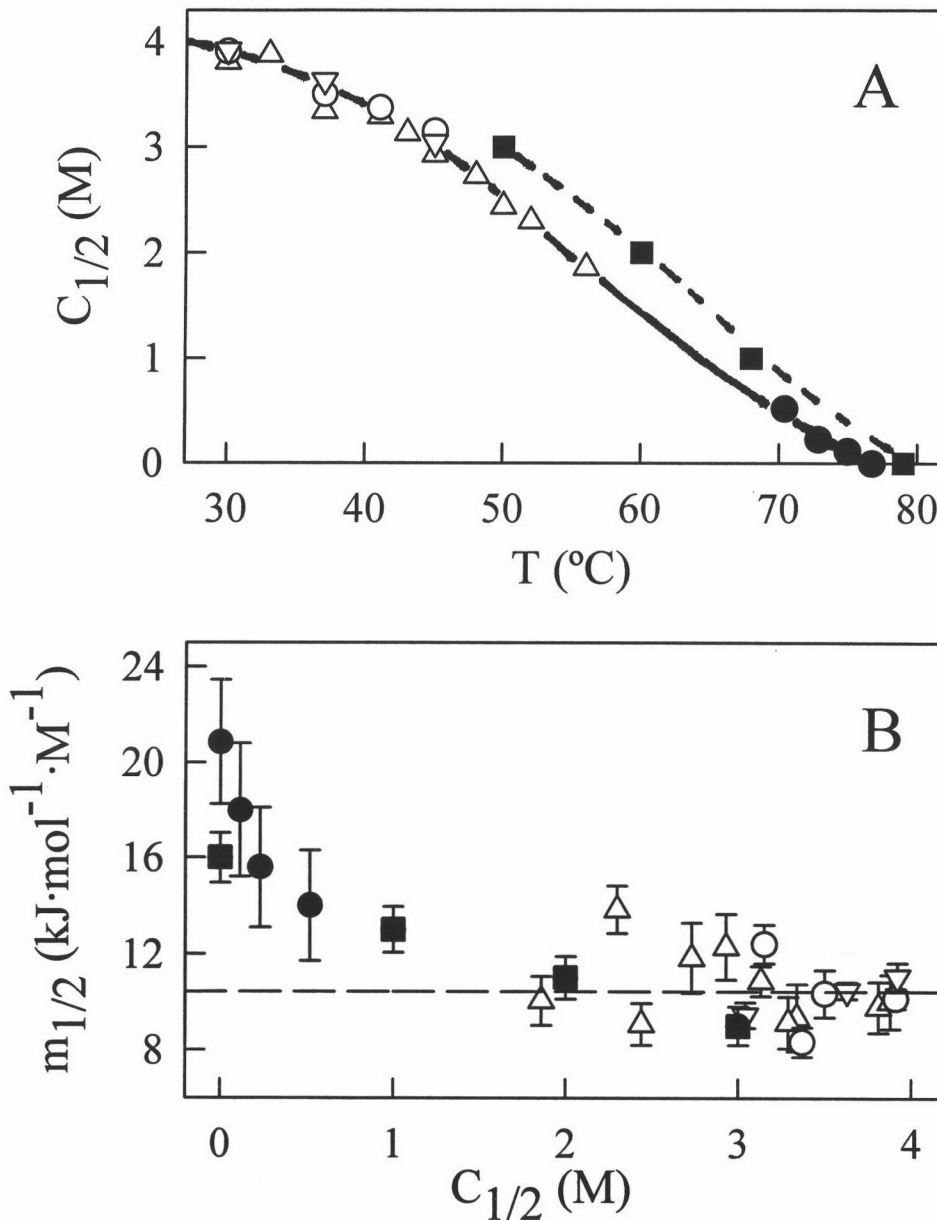


Figura 32: (A) Línea de equilibrio concentración de guanidina/temperatura, correspondiente a lisozima: (O, Δ , ∇ , \bullet) valores derivados de cuatro tipos diferentes de datos experimentales de desnaturalización inducida por guanidina obtenidos por nosotros; (Δ) datos de intensidad de fluorescencia de muestras en equilibrio [Figuras 4-8; ecuación (8)], (O) ensayos de desplegamiento [Figuras 9-12; ecuación (9)], (∇) constantes de velocidad de plegamiento-desplegamiento [Figura 19; ecuaciones (11), (13) y (14)] y (\bullet) experimentos de DSC llevados a cabo en presencia de diferentes concentraciones de guanidina [Figura 23; ecuación (23)]. Los datos representados como (\blacksquare) se han tomado del estudio calorimétrico de Makhatazde y Privalov (1992); las condiciones experimentales son ligeramente diferentes a las muestras y sus datos definen una línea de equilibrio (a trazo discontinuo) situada algo por encima a la que definen nuestros datos (a trazo continuo). Las líneas se muestran para guiar al ojo y no tienen ningún significado teórico. (B) Valores de $m_{1/2}$ correspondientes a la desnaturalización de lisozima, calculados a partir de los cuatro tipos diferentes de información experimental descritos en (A), siendo el significado de los símbolos es el mismo. Los valores que proceden de experimentos de DSC [ecuación (23)] se han representado con símbolos rellenos. Las barras representan las desviaciones estándar dadas por el programa MLAB o, en el caso de los datos de DSC, calculados mediante propagación lineal de errores suponiendo un error típico en ΔH de 15 kJ/mol en la ecuación (23). La línea discontinua representa el valor medio de $m_{1/2}$ calculado a partir de los valores comprendidos en el rango de 1.8 a 4 M guanidina ($\langle m_{1/2} \rangle = 10.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$).

parejas de temperatura-concentración de desnaturalizante para las que ΔG vale 0. En otras palabras, del análisis se obtienen puntos pertenecientes a la línea de equilibrio concentración de desnaturalizante-temperatura. En la Figura 32A se muestra esta línea de equilibrio C-T para la desnaturalización de lisozima. Los valores que hemos calculado de $m_{1/2}$ corresponden a esta línea, es decir, cada pareja C-T para la que ΔG vale 0 lleva asignado un valor de $m_{1/2}$. Así, la representación de $m_{1/2}$ versus $C_{1/2}$ mostrada en la Figura 32B sugiere que $m_{1/2}$ permanece constante (en torno a $10\text{-}11 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) a alta concentración de guanidina y aumenta abruptamente ($16\text{-}20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) por debajo de 1 M guanidina. Esto está relacionado íntimamente con el comportamiento observado en las Figuras 25A y B: a 1 M guanidina la curva de estabilidad determinada por DSC coincide con los datos que se derivan de LEM (Figura 25B) sugiriendo la validez de la aproximación lineal en estas condiciones. Sin embargo a 0 M guanidina (Figura 25A) se observa una discrepancia significativa entre los datos de DSC y los de LEM coincidiendo con el aumento abrupto en el valor de $m_{1/2}$.

Estrictamente hablando, no podemos excluir la posibilidad de que este cambio observado en los valores de $m_{1/2}$ sea debido a un efecto de temperatura ya que tanto C como T están cambiando simultáneamente a lo largo de la línea de equilibrio.

3.7 PROCEDIMIENTO DE EXTRAPOLACIÓN A ΔG CONSTANTE

A partir del análisis de datos de desnaturalización por disolvente, sólo es posible determinar de una manera precisa valores de energía de Gibbs de desnaturalización dentro de un estrecho rango alrededor de cero. Estimamos que este rango se extiende desde -8 a 8 kJ/mol , que corresponde al rango de fracción de estado nativo que va de aproximadamente 0.95 a 0.05; es

decir, para valores de ΔG mayores que -8 kJ/mol y menores que 8 kJ/mol, tanto el estado nativo como el desplegado van a estar significativamente poblados. Dentro del rango de -8 a 8 kJ/mol la dependencia de ΔG con la concentración de desnaturalizante se puede describir adecuadamente mediante una expresión lineal [ecuación (1.5)]. No obstante, nosotros buscamos obtener valores para la energía de Gibbs de desnaturalización en agua, que, a temperatura ambiente, son generalmente muy superiores al límite superior de ese rango de “fiabilidad” que hemos establecido (ver por ejemplo la Figura 25A). Si sólo se dispone de un perfil de desnaturalización inducido por disolvente a una temperatura dada, la única manera posible de calcular ΔG_w es mediante el método de extrapolación lineal (LEM), es decir, utilizar la ecuación (1.5) fuera del rango de -8 a 8 kJ/mol.

Si por el contrario disponemos de varios perfiles de desnaturalización a diferentes temperaturas, entonces existe un procedimiento alternativo independiente de cualquier modelo. En lugar de extrapolar a una concentración de desnaturalizante manteniendo la temperatura constante, consiste en cambiar simultáneamente C y T a lo largo de la extrapolación de tal manera que ΔG permanezca constante e igual a un valor previamente elegido, ΔG^* , dentro del rango de -8 a 8 kJ/mol. Concretamente, para una temperatura dada, T^* , en la que se dispone del perfil de desnaturalización inducida por disolvente y de los valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$, calculamos la concentración de desnaturalizante, C^* , para la que $\Delta G = \Delta G^*$ de la siguiente manera. La ecuación (1.5) se puede escribir como:

$$C^* = \frac{1}{m_{1/2}} \cdot (m_{1/2} \cdot C_{1/2} - \Delta G^*) \quad (25)$$

donde $m_{1/2} \cdot C_{1/2}$ es la estimación de ΔG_w mediante extrapolación lineal a la temperatura T^* . Es

importante destacar que, dado que elegimos un valor para ΔG^* dentro del rango de -8 a 8 kJ/mol, la aplicación de la ecuación anterior **no** implica extrapolación lineal ya que estamos usando una ecuación lineal pero sólo dentro del rango en el que ésta describe bien la dependencia de ΔG con C. Este cálculo utilizando la ecuación (25) se repite para todas las temperaturas a las que se ha caracterizado el perfil de desnaturalización inducida por disolvente, de manera que se obtienen diferentes parejas C^*/T^* para el mismo valor de ΔG^* . Estos valores de C^*/T^* definen una línea de ΔG constante en el plano C-T; la extrapolación de esta línea a $C=0$ obviamente proporcionará la temperatura, T_w , a la que $\Delta G=\Delta G^*$ para concentración cero de desnaturalizante. En otras palabras, esta extrapolación determina un punto de coordenadas $(T_w, \Delta G^*)$ perteneciente a la curva de estabilidad de la proteína a 0 M de desnaturalizante. Es de esperar que estas líneas de ΔG constante muestren cierta curvatura debido, entre otros factores, al gran valor de ΔC_p .

A continuación vamos a desarrollar la expresión que describe esas líneas de ΔG constante en el plano C-T y que nos permitirá extrapolar a 0M desnaturalizante. Volviendo a la ecuación (25), la diferencia entre $m_{1/2} \cdot C_{1/2}$ y el valor real de ΔG_w , aunque significativa, no debe ser muy grande. Por tanto una representación de $m_{1/2} \cdot C_{1/2}$ *versus* temperatura mostrará una curvatura bastante similar a la que presenta la curva de estabilidad real de la proteína. De acuerdo con esto, la dependencia con la temperatura del término $m_{1/2} \cdot C_{1/2}$ puede ser descrita fenomenológicamente por una ecuación de la forma de la de Gibbs-Helmholtz. Lo mismo es obviamente cierto para la diferencia $m_{1/2} \cdot C_{1/2} - \Delta G^*$. Por tanto, la siguiente ecuación parece ser una descripción razonable de la línea de ΔG constante en el plano C-T:

$$C^* = \frac{1}{m_{1/2}} \cdot \left[\Delta H^{ap} \cdot \left(1 - \frac{T^*}{T_w} \right) + \Delta C_p^{ap} \cdot \left(T^* - T_w - T^* \cdot \ln \left(\frac{T^*}{T_w} \right) \right) \right] \quad (26)$$

donde T_w es la temperatura a la que la diferencia $m_{1/2} \cdot C_{1/2} - \Delta G^*$ [y consecuentemente C^* , ver ecuación (25)] se anula. Debemos destacar que el cambio de entalpía y el cambio de capacidad calorífica que figuran en la ecuación anterior se han nombrado con el superíndice “ap” indicando que son valores aparentes que fenomenológicamente describen la dependencia de $m_{1/2} \cdot C_{1/2} - \Delta G^*$ con la temperatura. No obstante, no es de esperar que estos valores difieran mucho de los reales a la temperatura T_w .

El rango de temperatura de la extrapolación a ΔG constante (ver Figura 33) es pequeño comparado con los valores de temperaturas absolutas por lo que la siguiente expansión de Taylor truncada es una excelente aproximación para el término $T^* \cdot \ln(T^*/T_w)$ que aparece en la ecuación (26):

$$T^* \cdot \ln\left(\frac{T^*}{T_w}\right) \cong (T^* - T_w) + \frac{1}{2 \cdot T_w} \cdot (T^* - T_w)^2 \quad (27)$$

y si sustituimos (27) en la ecuación (26) entonces se llega a:

$$C^* = -\frac{\Delta H^{ap}}{T_w \cdot m_{1/2}} \cdot (T^* - T_w) - \frac{\Delta C_p^{ap}}{2 \cdot T_w \cdot m_{1/2}} \cdot (T^* - T_w)^2 \quad (28)$$

Si $m_{1/2}$ se considera constante, entonces la ecuación anterior correspondería básicamente a un polinomio de segundo grado de la forma:

$$C^* = -\alpha \cdot (T^* - T_w) - \beta \cdot (T^* - T_w)^2 \quad (29)$$

donde α , β y T_w son los parámetros ajustables. α y β vendrían dados por:

$$\alpha = \frac{\Delta H^{ap}}{T_w \cdot m_{1/2}} \quad (30)$$

$$\beta = \frac{\Delta C_p^{ap}}{2 \cdot T_w \cdot m_{1/2}} \quad (31)$$

Por tanto a partir del análisis de las diferentes líneas de ΔG constante en el plano C-T y de su extrapolación a C=0 podremos reconstruir la curva de estabilidad de la proteína a alta temperatura en agua, para el intervalo de ΔG de -8 a 8 kJ/mol.

No tenemos constancia de que el método que acabamos de describir haya sido utilizado con anterioridad en la literatura. Lo hemos denominado procedimiento de extrapolación a ΔG constante y es un procedimiento de extrapolación no lineal, no sólo porque se usa un polinomio de segundo orden como función de extrapolación [ecuación (29)], sino principalmente porque no supone una dependencia lineal de ΔG con la concentración de desnaturizante fuera del rango estrecho donde tiene lugar la transición y en el que la expresión lineal sí describe los datos.

Aún cuando $m_{1/2}$ cambie gradualmente a lo largo de la línea de equilibrio C-T, la ecuación (29) sigue siendo una buena descripción fenomenológica de las líneas de ΔG constante, aunque en este caso, los valores de α y β no vendrían dados por las ecuaciones (30) y (31), respectivamente. Esto realmente tiene pocas consecuencias prácticas ya que α y β se usan como parámetros ajustables y, en cualquier caso, los cambios de entalpía y capacidad calorífica aparentes en las ecuaciones (30) y (31), así como el valor de T_w , no son conocidos a priori. Es interesante, no obstante, destacar que a partir de datos de DSC y del correspondiente valor de $m_{1/2}$ es posible obtener estimaciones muy aproximadas para α y β . Así, la temperatura de

desnaturalización en ausencia de desnaturalizante (T_m) puede usarse como estimación de T_w mientras que los valores para ΔH y ΔC_p a la T_m se utilizarían como estimaciones de los correspondientes valores aparentes. Cuando se aplica este procedimiento a la desnaturalización de lisozima (Tabla 4: $T_m = 350\text{K}$, $\Delta H_m = 583\text{ kJ/mol}$, $\Delta C_p = 7.2\text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\langle m_{1/2} \rangle = 10.5\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$), las ecuaciones (30) y (31) dan unos valores de $\alpha = 0.16\text{ M/K}$ y $\beta = 9.8 \cdot 10^{-4}\text{ M/K}^2$. Estos valores no son muy diferentes de los que se derivan del ajuste de la ecuación (29) a las líneas de ΔG constante: α dentro del rango de 0.14 a 0.19 M/K y β en el intervalo $(15-19) \cdot 10^{-4}\text{ M/K}^2$.

Quizás el uso del polinomio de segundo grado como función para la extrapolación [ecuaciones (28) o (29)] requiere algunos comentarios adicionales. Primero debemos destacar que el uso de una función más compleja como la ecuación (26), con $\Delta H^{ap}/m_{1/2}$ y $\Delta C_p^{ap}/m_{1/2}$ como parámetros ajustables, para describir las líneas a ΔG constante en el plano C-T va a dar esencialmente los mismos resultados que el polinomio de segundo grado; así, los valores de T_w obtenidos coinciden dentro del error. Esto es de esperar ya que la ecuación (27) es una excelente aproximación dentro de un rango estrecho de temperaturas y, consecuentemente, las ecuaciones (26) y (28) son equivalentes desde un punto de vista práctico. Por otro lado, el uso de un polinomio de mayor grado no conduce a ninguna mejora, y en particular, no elimina la discrepancia observada entre los valores (T_w , ΔG_w) para la desnaturalización de lisozima obtenidos mediante extrapolación a ΔG constante y la curva de estabilidad que se deriva de los experimentos de DSC (Figura 25A). De hecho, cuando intentamos con un polinomio cúbico en $(T^* - T_w)$ para el análisis de las líneas de ΔG constante para barnasa y lisozima (Figura 33), obtuvimos valores absurdos para T_w con incertidumbres asociadas muy grandes (del orden de varios cientos de grados en algunos casos). De nuevo, este resultado es lógico; las líneas experimentales de ΔG constante (Figura 33) muestran una pequeña curvatura que es tenida en

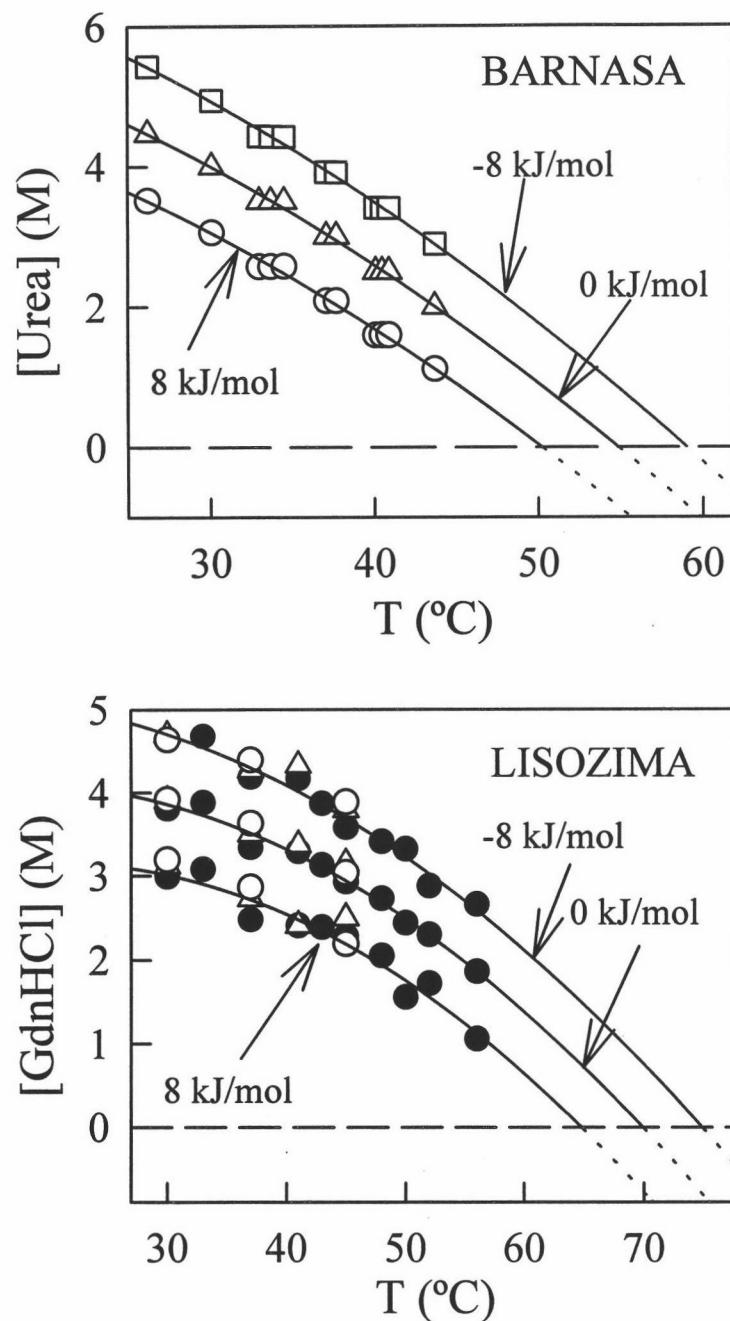


Figura 33: Líneas de ΔG constante en el plano C-T para la desnaturalización inducida por urea de barnasa (gráfica superior) y la desnaturalización inducida por guanidina de lisozima (gráfica inferior). Las líneas continuas representan el mejor ajuste de la ecuación (29) a los datos; para cada una de ellas se indica el valor de ΔG^* correspondiente. En la construcción de las líneas de ΔG constante para lisozima se han utilizado datos procedentes de tres tipos información experimental: (\bullet) datos de intensidad de fluorescencia de muestras en el equilibrio [Figuras 4-8; ecuación (8)], (Δ) ensayos de desplegamiento [Figuras 9-12; ecuación (9)], (\circ) cinéticas en la dirección del plegamiento-desplegamiento [Figura 19; ecuaciones (11), (13) y (14)].

cuenta por un polinomio de segundo orden. Además, los datos experimentales no contienen información acerca de términos de mayor grado en una expansión polinómica y por tanto la inclusión de estos términos sólo conduce a una extrapolación poco fiable. En general, creemos preferible usar una función cuadrática, a menos que se encuentre que ésta es incapaz de ajustarse a las líneas experimentales de ΔG constante; aún en este caso, es preciso tener cautela si se usan polinomios de mayor grado como funciones para la extrapolación en tanto en cuanto pueden mostrar un comportamiento oscilante fuera del rango en el que se dispone de información experimental.

3.7.1 Aplicación del procedimiento de extrapolación a ΔG constante a la desnaturalización de barnasa inducida por urea

Nos parece más conveniente ilustrar en primer lugar la aplicación de nuestro método de extrapolación a los datos de desnaturalización de barnasa inducida por urea publicados por Johnson y Fersht (1995). Realmente, estos autores realizaron experimentos de Calorimetría Diferencial de Barrido en presencia de distintas concentraciones de urea en lugar de obtener perfiles de desnaturalización a temperatura constante. No obstante, esto es irrelevante a la hora de ilustrar la aplicación práctica de nuestro procedimiento de extrapolación a ΔG constante. Así pues, de la línea de equilibrio C-T que aparece en la Figura 2 del citado trabajo, nosotros tomamos valores de $C_{1/2}$ a diferentes temperaturas, dentro del rango que va de 25 a 57 °C. Obviamente para nuestro propósito sólo tomaremos un rango estrecho de valores de $C_{1/2}$, de 4.5 a 2 M urea, aunque los datos que aparecen en dicha figura se extiendan hasta 0 M urea.

Los valores de $m_{1/2}$ correspondientes a la desnaturalización de barnasa inducida por urea fueron calculados a partir de los datos que aparecen en la Tabla 3 de Matouscheck et al. (1995),

en donde se sugiere que $m_{1/2}$ cambia ligeramente a lo largo de la línea de equilibrio C-T. La dependencia de estos valores de $m_{1/2}$ con la temperatura se puede describir adecuadamente mediante la siguiente ecuación lineal, tal y como vemos en la Figura 34:

$$m_{1/2} = 7.37 + 0.0377 \cdot t \quad (32)$$

donde t es la temperatura en grados Celsius y $m_{1/2}$ viene dado en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

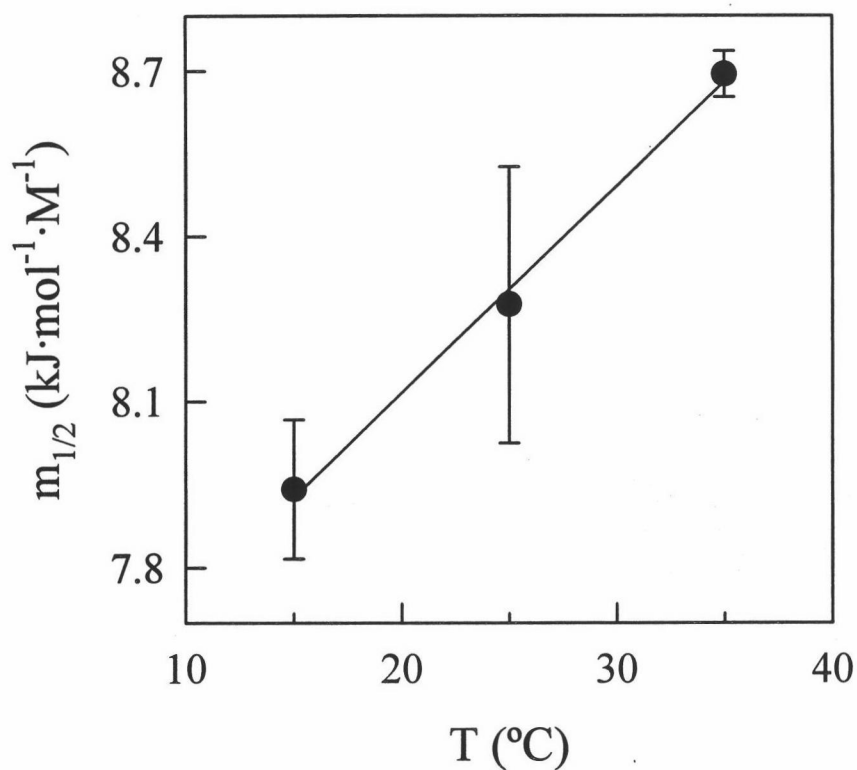


Figura 34: Dependencia de $m_{1/2}$ de desnaturalización con la temperatura para barnasa. Los datos se han tomado del trabajo de Matouscheck et al. (1995), Tabla 3; las barras representan la desviación estándar. La línea continua corresponde al ajuste lineal a dichos datos.

A continuación generamos la líneas de ΔG constante en el plano C-T a partir de los valores de temperatura y $C_{1/2}$ [tomados del trabajo de Johnson y Fersht (1995)] junto con los correspondientes $m_{1/2}$ [obtenidos aplicando la ecuación (32)], haciendo uso de la ecuación (25). Del ajuste de la expresión (29) a dichas líneas obtendremos los correspondientes valores de T_w según se muestra en la Figura 33 y que a continuación recogemos:

ΔG^* kJ/mol	T_w (°C)
8	50.26±0.91
6	51.45±1.04
4	52.61±1.18
2	53.74±1.31
0	54.85±1.45
-2	55.92±1.59
-4	56.97±1.72
-6	58.02±1.86
-8	59.03±2.00

En la Figura 35 se muestran los valores resultantes de ΔG_w *versus* temperatura junto con las estimaciones para la energía de Gibbs de desnaturalización en agua obtenidas por extrapolación lineal [calculadas a partir de los correspondientes $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ y haciendo uso de la expresión (1.7)] y la curva de estabilidad en agua que se deriva de los datos de DSC publicados por Johnson y Fersht (1995). Se observa que el valor de ΔG_w obtenido por extrapolación lineal a 25 °C es 5.5 kJ/mol menor que el que proviene de la curva de estabilidad, discrepancia que ya fue puesta de manifiesto por dichos autores y según ellos indican, atribuida a que el efecto desestabilizante de la urea es mayor a bajas concentraciones de manera que existiría algún tipo

de interacción o unión del desnaturalizante a los estados plegado y desplegado de la proteína. Por otro lado, vemos como nuestro método de extrapolación a ΔG constante conduce a valores de ΔG_w a altas temperaturas que coinciden con los de la curva de estabilidad proveniente de datos de DSC (Figura 35).

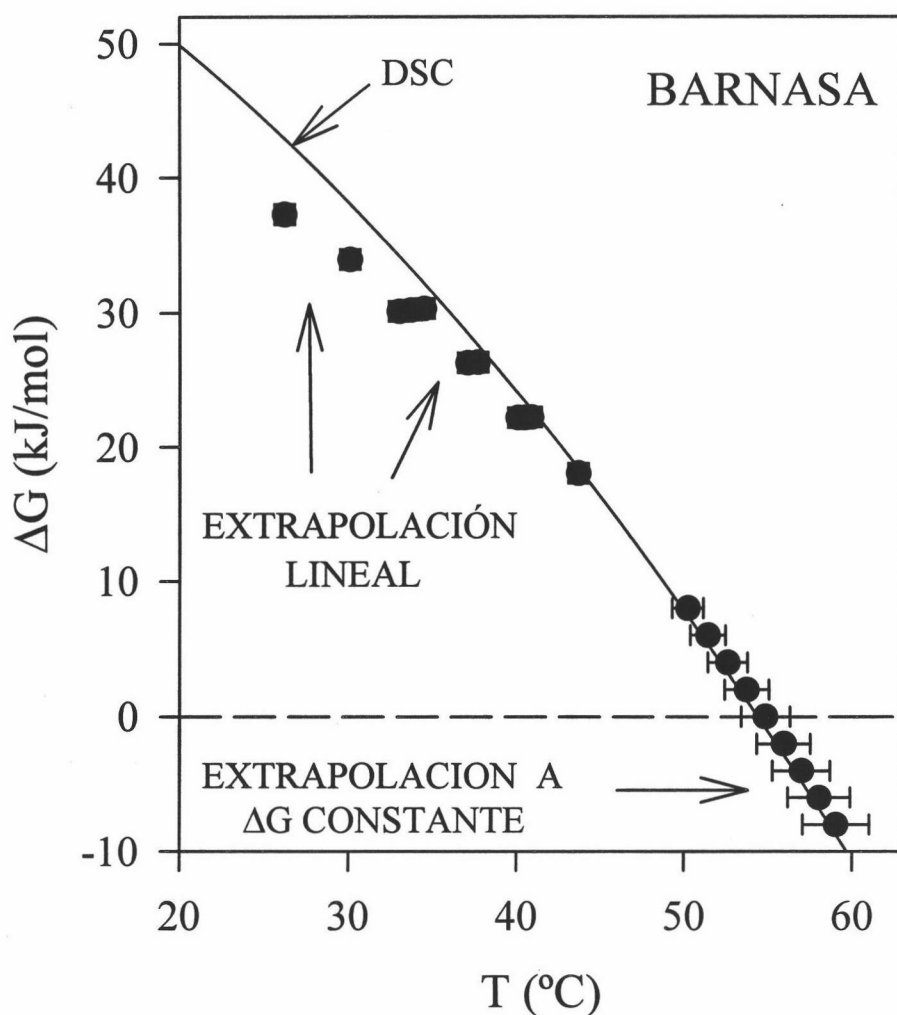


Figura 35: Dependencia con la temperatura del cambio de energía de Gibbs correspondiente a la desnaturalización de barnasa en ausencia de urea. Los valores que se muestran en esta figura se han calculado a partir de los resultados publicados por Johnson y Fersht (1995); ver texto para detalles. Debemos destacar que el procedimiento de extrapolación a ΔG constante [ver Figura 33 y ecuación (29)] da un valor de T_w correspondiente a una energía de Gibbs de desnaturalización dada; así, las desviaciones estándar (dadas por el programa MLAB) están asociadas con la temperatura y se representan mediante barras horizontales en la figura.

3.7.2 Aplicación del procedimiento de extrapolación a ΔG constante a la proteína transportadora de fósforo que contiene histidina (HPr)

Nicholson y Scholtz (1996) han estudiado la estabilidad conformacional de la proteína HPr en base a estudios de desnaturalización térmica e inducida por urea seguida por dicroísmo circular. En este caso se obtiene una caracterización muy precisa de la energética de desnaturalización a partir de datos no calorimétricos, ya que fue posible observar la desnaturalización fría en los perfiles de desnaturalización inducida por temperatura.

Hemos aplicado nuestro procedimiento de extrapolación a ΔG constante a la desnaturalización de HPr inducida por urea usando los valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ que aparecen en la Tabla 1 del trabajo de Nicholson y Scholtz (1996). En la Figura 36 se muestran algunas de las curvas reconstruidas de ΔG constante dentro del rango de -8 a 8 kJ/mol en el plano C-T, calculadas mediante la ecuación (25). Como ya hemos comentado, de la extrapolación de estas líneas a concentración de desnaturalizante cero [ecuación (29)] obtenemos los valores de temperatura, T_w , para los que $\Delta G = \Delta G^*$; de esta manera se consiguen las parejas ($T_w, \Delta G^*$) que a continuación aparecen tabuladas y que definen la curva de estabilidad de la proteína HPr a alta temperatura (Figura 37):

ΔG^* kJ/mol	T_w (°C)
8	51.83±0.40
6	54.43±0.34
4	56.89±0.29
2	59.28±0.28
0	61.56±0.39

ΔG^* kJ/mol	T_w (°C)
-2	63.77±0.59
-4	65.90±0.85
-6	68.00±1.16
-8	70.04±1.51

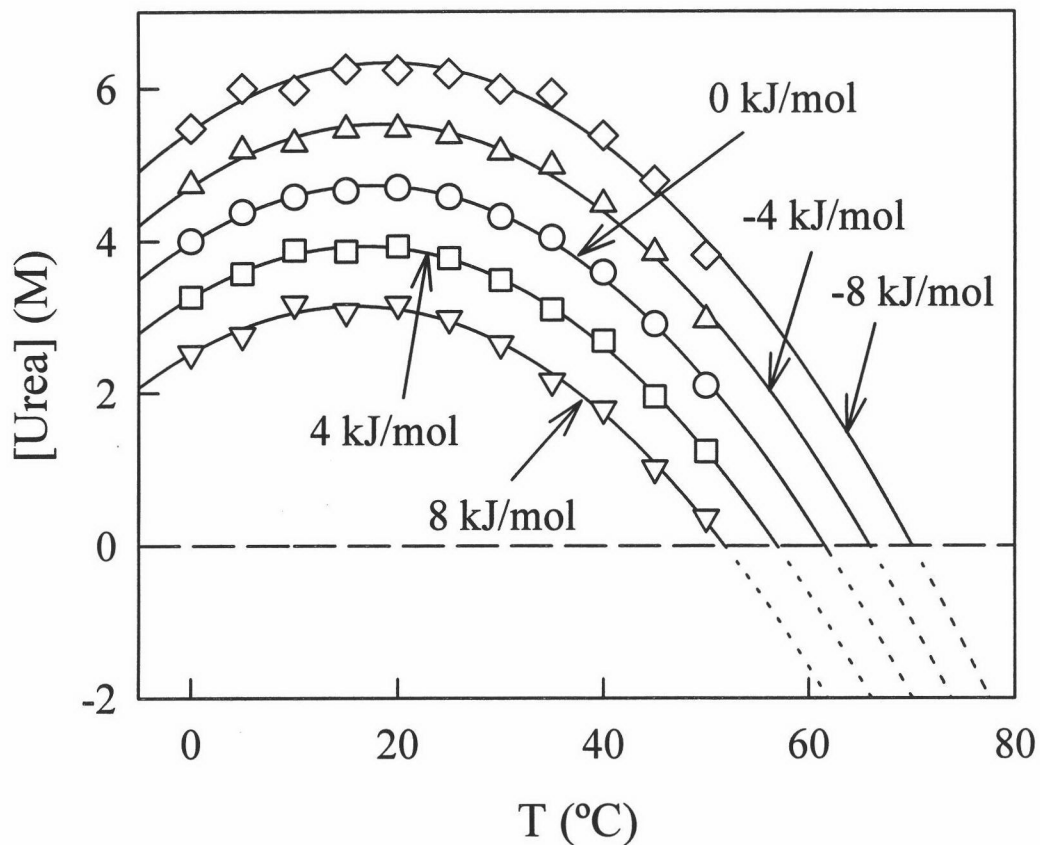


Figura 36: Líneas de ΔG constante en el plano C-T correspondientes a la desnaturalización inducida por urea de la proteína transportadora de fósforo que contiene histidina (HPr). Para la construcción de estas líneas hemos usado los valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ a diferentes temperaturas publicados por Nicholson y Scholtz (1996). Las líneas continuas representan el mejor ajuste de la ecuación (29) a los datos; para cada una de ellas se indica el valor de ΔG^* correspondiente.

A continuación analizamos los datos de $(T_w, \Delta G^*)$ de acuerdo a la ecuación de Gibbs-Helmholtz (2.23); los parámetros ajustables son tres: T_m , ΔH_m y $\Delta C_{p,m}$. El ajuste de dicha ecuación a nuestros datos se llevó a cabo con el programa comercial MLAB. Las barras de error de ΔG^* en la Figura 37 se han calculado teniendo en cuenta que la pendiente de la curva de estabilidad viene dada por $-\partial\Delta G/\partial T = \Delta S$ de manera que considerando la notación usada hasta ahora:

$$\Delta(\Delta G^*) = (\Delta S_m) \cdot \Delta(T_w)$$

ΔS_m se ha calculado según la ecuación (2.17) teniendo en cuenta los valores para ΔH_m y T_w resultado del análisis según la ecuación de Gibbs-Helmholtz (0.8881 kJ/mol) y $\Delta(T_w)$ se considera en cada caso el error que da el programa MLAB.

Para tener en cuenta que no todos nuestros puntos están afectados del mismo error repetimos el análisis con peso, introduciendo en la subrutina del programa un vector S que es igual a la inversa de la varianza asociada a cada punto:

```
M=READ("nombre del fichero", número de filas, 2)
S=READ("nombre del fichero", número de filas, 1)
FUNCTION G(T)=H*(1-T/Tm)+Cp*(T-Tm-T*ln(T/Tm))
FIT (H,Tm,Cp), G TO M WITH WEIGHT S
Z=POINTS (G,0:temperatura final:intervalo entre valores de temperatura)
```

Obtuvimos los siguientes resultados: $T_m=61.6$ °C, $\Delta H_m=71.0$ kcal/mol, $\Delta S_m=212$ cal·K⁻¹·mol⁻¹, que comparados con los determinados por Nicholson y Scholtz (1996) a partir del análisis global de los datos de desnaturalización térmica e inducida con urea [Tabla 3: $T_m=63.8$ °C, $\Delta H_m=70.8$ kcal/mol, $\Delta S_m=210$ cal·K⁻¹·mol⁻¹] vemos que existe una excelente concordancia, lo que apoya la validez de nuestro método de extrapolación. Además fue posible estimar el valor

para el cambio de capacidad calorífica debido a que como se muestra en la Figura 36 se detecta una ligera curvatura en las curvas de estabilidad de -8 a 8 kJ/mol. El valor obtenido por nosotros fue $1.1 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, que no difiere mucho del valor publicado por Nicholson y Scholtz (1996) de $1.4 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$.

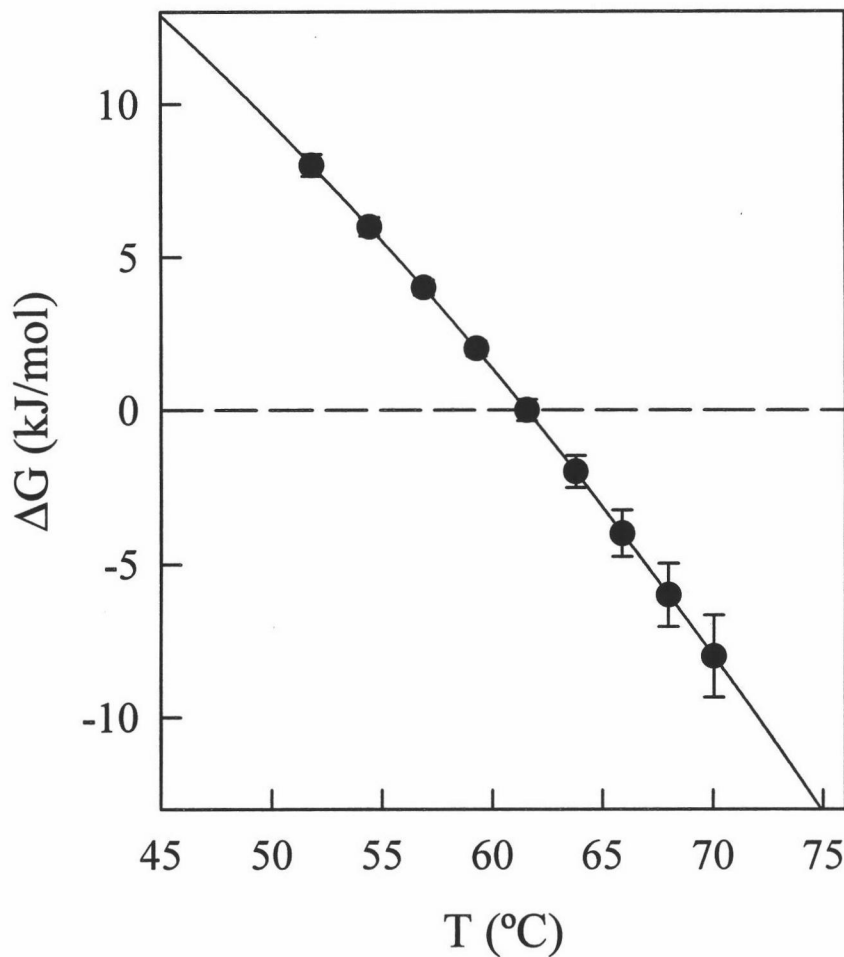


Figura 37: Curva de estabilidad a alta temperatura correspondiente a la proteína transportadora de fósforo que contiene histidina (HPr), obtenida mediante la aplicación del procedimiento de extrapolación a ΔG constante (ver Figura 36). La línea continua representa el mejor ajuste de la ecuación de Gibbs-Helmholtz (2.23) a los datos; para considerar que no todos los puntos están afectados por el mismo error, el análisis se llevó a cabo con peso, de acuerdo a la inversa de la varianza de cada punto. Las barras de error representan el error asociado a ΔG calculado a partir del error en T_w y el cambio de entropía de desnaturalización (como $\Delta H/T_m$), tal y como se explica en el texto.

3.7.3 Aplicación del procedimiento de extrapolación a ΔG constante a la desnaturalización de lisozima inducida con guanidina

En la Figura 33 se muestran las líneas de ΔG constante en el plano C-T para la desnaturalización inducida con guanidina de lisozima. Los puntos que las describen han sido obtenidos [aplicando la ecuación (25)] a partir de los valores calculados de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ a diferentes temperaturas (Figura 32) y expanden el rango de concentración de guanidina de 1 a 5 M. Es importante destacar que **no** hemos usado nuestros datos de DSC a baja concentración de guanidina para la construcción de las líneas de ΔG constante precisamente porque los usaremos a modo de control para contrastar los resultados obtenidos de la aplicación de nuestro procedimiento de extrapolación.

La extrapolación de estas líneas a 0 M desnaturalizante (Figura 32) dará el valor de temperatura, T_w , que corresponde a cada ΔG^* :

ΔG^* kJ/mol	T_w (°C)
8	64.92±2.23
6	65.98±2.05
4	66.99±1.87
2	67.89±1.71
0	68.82±1.61
-2	69.67±1.66
-4	70.45±1.76
-6	71.20±2.02
-8	71.99±2.36

El perfil de ΔG_w versus temperatura resultante se muestra en la Figura 38. Sorprendentemente en este caso, tanto los valores de ΔG_w que provienen de aplicar el método de extrapolación lineal como los valores derivados del método de extrapolación a ΔG constante son significativamente menores que aquellos que proceden de experimentos de DSC y aproximadamente la misma cantidad: unos 15 kJ/mol. Esta concordancia entre los resultados obtenidos por extrapolación lineal y no lineal sugiere que, al menos en una primera aproximación, la dependencia de ΔG con la concentración de guanidina es lineal en el rango expandido de concentración empleado para construir las líneas de ΔG constante (1-5 M aproximadamente) y que, además, desviaciones significativas de esta dependencia lineal (responsables de la discrepancia de 15 kJ/mol) sólo aparecen a bajas concentraciones de guanidina. Esta interpretación es consistente con los valores calculados de $m_{1/2}$ (Figura 32B), si suponemos que los cambios observados en $m_{1/2}$ son debidos fundamentalmente a un efecto de concentración de guanidina más que a un efecto de temperatura. Así, (ver Figura 32B), según esta hipótesis, el valor de $m_{1/2}$ permanece aproximadamente constante en el rango de 2 a 4 M guanidina (esto implica una dependencia lineal de ΔG con C dentro de este rango), mientras que por debajo de 1 M guanidina $m_{1/2}$ aumenta de forma abrupta, indicando que fuertes desviaciones de la linealidad tienen lugar pero a baja concentración de desnaturalizante (esto es, fuera del rango de concentración empleado en la construcción de las líneas de ΔG constante de la Figura 33). Este razonamiento es consistente con el comportamiento que observamos en las Figuras 25A y B según el cual a 1 M guanidina existe una buena concordancia entre los datos de DSC y los derivados de LEM mientras que a 0 M se observa una discrepancia significativa entre ambos.

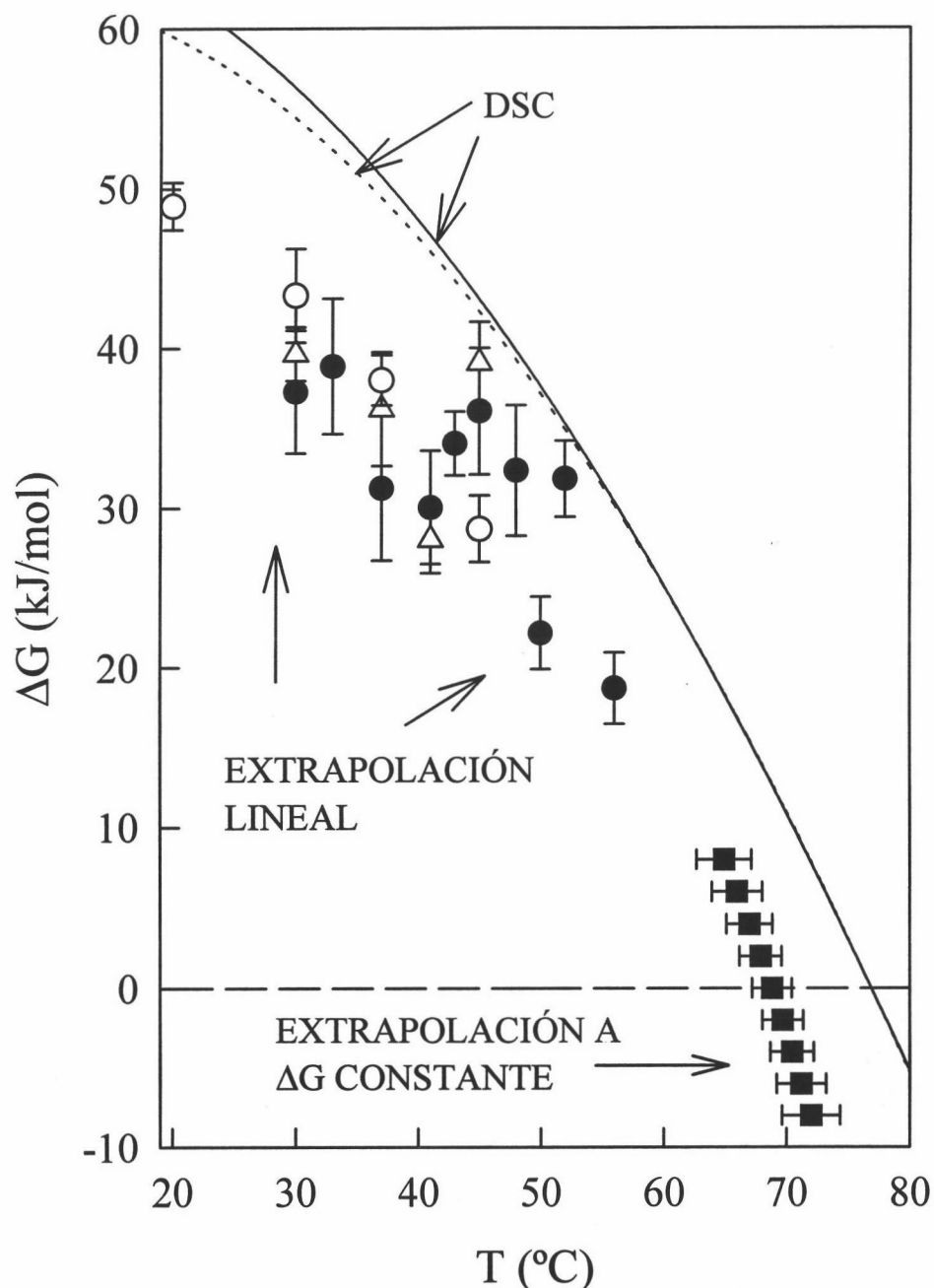


Figura 38: Dependencia con la temperatura del cambio de energía de Gibbs de desnaturalización de lisozima en ausencia de guanidina. El significado de los símbolos para los valores obtenidos mediante extrapolación lineal y las líneas representando las curvas de estabilidad es el mismo que en la Figura 25A. Además se incluyen los valores obtenidos usando el procedimiento de extrapolación a ΔG constante [Figura 33; ecuación (29)] (\blacksquare). Debemos destacar que dicho procedimiento proporciona el valor de T_w correspondiente a una energía de Gibbs de desnaturalización dada; así, las desviaciones estándar (dadas por el programa MLAB) están asociadas con la temperatura y se representan mediante barras horizontales en la figura.

Por último señalar brevemente que nuestro procedimiento de extrapolación a ΔG constante es capaz de tener en cuenta curvaturas suaves en la dependencia de ΔG con la concentración de desnaturalizante. Un claro ejemplo es el caso descrito de la desnaturalización inducida por urea de barnasa [esta dependencia fue adecuadamente descrita por Johnson y Fersht (1995) mediante un polinomio de segundo orden], en el que nuestro método proporciona valores de ΔG_w a alta temperatura en excelente concordancia con la curva de estabilidad obtenida por DSC en ausencia de desnaturalizante (ver Figura 35). Sin embargo, nuestro método es incapaz de detectar aquellas desviaciones abruptas de la linealidad que tienen lugar a baja concentración de desnaturalizante, como sucede con lisozima (ver Figura 38)

3.8 CONTRIBUCIÓN ELECTROSTÁTICA A LA ESTABILIDAD DE LISOZIMA Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES DE ΔG DE DESNATURALIZACIÓN DETERMINADOS A PARTIR DE DATOS DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR GUANIDINA

En el caso general de un tampón a baja fuerza iónica y en ausencia de desnaturalizante, las cargas presentes en la proteína no van a estar totalmente apantalladas. Sin embargo, si en el medio existe cloruro de guanidina es de esperar que, al ser una sal, apantalle de manera significativa las cargas eléctricas, incluso a concentraciones en torno a 1 M. Además, parece razonable suponer que la contribución electrostática a la energía de Gibbs de desnaturalización varía de manera abrupta en la región de baja concentración de desnaturalizante; esto podría explicar la fuerte desviación de la dependencia lineal de ΔG con C por debajo de 1 M a la que hemos hecho mención en el caso de lisozima (sección 3.7.3). De hecho con anterioridad, muchos

autores han indicado que las diferencias entre valores de energía de Gibbs de desnaturalización derivados de desnaturalización con urea y guanidina están relacionadas con factores electrostáticos (Pace et al., 1990; Santoro y Bolen, 1992; Monera et al., 1994; Yao y Bolen, 1995; Smith y Scholtz, 1996). Esta idea está claramente ilustrada en el trabajo de Monera et al. (1994) (ver también Yu et al., 1996). Estos autores estudiaron la desnaturalización inducida por urea y guanidina de cuatro hélices paralelas entrelazadas por puentes disulfuro (“four parallel disulfide-bridged coiled-coils”), que contienen idénticos empaquetamientos hidrofóbicos pero diferentes interacciones electrostáticas. Los valores obtenidos por extrapolación lineal de ΔG_w derivados de los datos de desnaturalización con urea fueron claramente diferentes; por otro lado, los obtenidos de la desnaturalización con guanidina fueron muy similares, sugiriendo que concentraciones desnaturalizantes de guanidina suprimen la contribución electrostática a ΔG .

Debemos destacar, no obstante, que el término “contribución electrostática” es empleado en la literatura con un sentido muy amplio. Así, a veces se refiere a interacciones coulombicas carga-carga, otras a las contribuciones a ΔG dependientes del pH, en ocasiones a las contribuciones dependientes de la fuerza iónica, etc. Para evitar ambigüedades basaremos nuestra discusión en la terminología empleada por Yang y Honig (1993) [ver también Yang et al., 1993; Honig et al., 1993; Yang y Honig, 1994]. Así la energía de Gibbs de desnaturalización se puede escribir como:

$$\Delta G = \Delta G^{neutral} + \Delta \Delta G^{ion} \quad (33)$$

donde $\Delta G^{neutral}$ contiene todas las contribuciones de energía de Gibbs a la estabilidad de la proteína, excepto aquellas que impliquen interacciones electrostáticas de grupos ionizables. $\Delta G^{neutral}$ es independiente del pH y del contenido en sales. El término dependiente del pH, $\Delta \Delta G^{ion}$, viene dado

por :

$$\Delta\Delta G^{ion} = \Delta G^{ion}(U) - \Delta G^{ion}(N) \quad (34)$$

donde $\Delta G^{ion}(X)$ es la energía de Gibbs del estado X (nativo o desplegado) tomando como referencia aquel estado en el que todos los grupos ionizables se encuentran en sus formas neutras.

$\Delta\Delta G^{ion}$ puede separarse a su vez en dos términos:

a) La contribución debida a las interacciones carga-carga, $\Delta\Delta G^{q-q}$.

b) La contribución debida a la desolvatación de cargas (las interacciones carga-dipolo se incluyen también en este término), $\Delta\Delta G^{desolv}$. Desde el punto de vista de la electrostática continua, esta contribución es consecuencia del hecho de que, debido al plegamiento, las cargas se sitúan en la superficie de un objeto de baja constante dieléctrica (proteína nativa) (ver Yang y Honig, 1993).

Incluyendo estos términos en la ecuación (33) resulta:

$$\Delta G = \Delta G^{neutral} + \Delta\Delta G^{desolv} + \Delta\Delta G^{q-q} \quad (35)$$

Los cálculos teóricos basados en modelos de electrostática continua (Yang y Honig, 1993) sugieren que, para lisozima de clara de huevo, el término dependiente del pH [$\Delta\Delta G^{ion}$ en la ecuación (33)] es siempre negativo, es decir desestabilizante, dentro del rango de pH de 1 a 7. Esto se atribuye a la contribución de desolvatación [$\Delta\Delta G^{desolv}$ en ecuación (35)], que es negativa y de valor absoluto alto. De hecho, la contribución debida a las interacciones carga-carga [$\Delta\Delta G^{q-q}$ en ecuación (35)] es positiva, esto es estabilizante, a pH neutro, reflejando el hecho de que las cargas positivas y negativas se encuentran distribuidas en la superficie de la proteína nativa de tal manera que resulta una atracción coulombica neta (las cargas se encuentran rodeadas de otras

cargas de signo opuesto; ver Wada y Nakamura, 1981; Matthew y Gurd, 1986; Yang y Honig, 1993). No obstante, a pHs ácidos el término $\Delta\Delta G^{q-q}$ se hace negativo (desestabilizante) debido a la neutralización de cargas negativas y a la concomitante repulsión entre las cargas positivas remanentes.

Un punto de vista simple acerca del efecto de la guanidina en la energía de Gibbs de desnaturalización sería el siguiente: a concentraciones en torno a 1 M la guanidina eliminaría la contribución electrostática de los grupos ionizables a ΔG de manera que el término $\Delta\Delta G^{\text{ion}}$ en la ecuación (33) se haría cero. Por otro lado es de esperar que $\Delta G^{\text{neutral}}$ cambie gradualmente con la concentración de guanidina. Como resultado, la dependencia de ΔG con C es lineal, al menos en primera aproximación, por encima de 1 M guanidina (ya que para $C > 1\text{M}$ aproximadamente, esperamos que $\Delta\Delta G^{\text{ion}} \approx 0$). Por supuesto para concentraciones menores a 1 M ocurrirán desviaciones de la linealidad debido al cambio abrupto de $\Delta\Delta G^{\text{ion}}$ con la concentración de sal. Obviamente, una estimación de ΔG_w mediante extrapolación lineal calculada a partir de los datos obtenidos a concentración de guanidina ligeramente superior a 1 M será aproximadamente igual a la contribución de $\Delta G^{\text{neutral}}$ a ΔG a 0 M desnaturalizante:

$$\Delta G_w(\text{extrapolación lineal}) = \Delta G_w^{\text{neutral}} \quad (36)$$

No obstante, el punto de vista que acabamos de plantear **no** es consistente con nuestros resultados experimentales (Figura 38) si tenemos en cuenta los cálculos teóricos de Yang y Honig (1993). Estos autores encontraron que $\Delta\Delta G^{\text{ion}}$ para lisozima, en tampón de bajo contenido en sal, es siempre negativo debido a la contribución de desolvatación. Por tanto la contribución de $\Delta G^{\text{neutral}}$ a ΔG_w debe ser mayor que el valor real (que vendría dado por la curva de estabilidad derivada de los datos de DSC). Así, si la ecuación (36) fuese correcta para lisozima, la estimación

por extrapolación lineal de ΔG_w sería mayor que los valores reales derivados de DSC. Sin embargo es justo la situación opuesta la que observamos en la Figura 38.

Un punto de vista alternativo, pero igualmente sencillo, podría ser que la guanidina alterase *gradualmente* la contribución de desolvatación [$\Delta\Delta G^{\text{desolv}}$ en ecuación (35)], mientras que *sólo* la contribución que se debe a las interacciones carga-carga [$\Delta\Delta G^{\text{q-q}}$ en ecuación (35)] fuera abruptamente eliminada (debido al efecto de apantallamiento) en el rango de 0 a 1 M guanidina. En este caso la extrapolación lineal nos daría un valor de ΔG_w que contendría la contribución dada por $\Delta G^{\text{neutral}}$ y la de desolvatación (ver Figura 39):

$$\Delta G_w(\text{extrapolación lineal}) \approx \Delta G_w^{\text{neutral}} + \Delta\Delta G_w^{\text{desolv}} \quad (37)$$

Así la diferencia entre los valores derivados de la extrapolación lineal y aquellos que proceden de experimentos de DSC arrojarían una estimación de la contribución carga-carga a la estabilidad de la proteína. Si interpretamos los resultados de la Figura 38 de acuerdo con este planteamiento entonces $\Delta\Delta G^{\text{q-q}}$ valdría unos 15 kJ/mol para lisozima a 0 M desnaturizante.

Este segundo punto de vista es cualitativamente consistente con los cálculos de Yang y Honig (1993) ya que estos autores encontraron que el término $\Delta\Delta G^{\text{q-q}}$ es positivo en el caso de la desnaturalización de lisozima a pH 4.5 en presencia de un bajo contenido en sales. Tenemos que decir que no es posible un test cuantitativo debido a las incertidumbres asociadas a dichos cálculos. Así, Yang y Honig (1993) publicaron dos perfiles de $\Delta\Delta G^{\text{q-q}}$ *versus* pH para lisozima, calculados empleando dos estructuras diferentes de la proteína: la estructura correspondiente al cristal triclinico y la estructura simulada que se deriva de la anterior usando dinámica molecular (ver Figura 40). Cualitativamente ambos perfiles muestran la misma tendencia, esto es, $\Delta\Delta G^{\text{q-q}}$ es positivo a pH neutro y se hace negativo a pHs ácidos. Cuantitativamente difieren bastante;

así para pH 4.5 la estructura simulada da un valor de $\Delta\Delta G^{q-q}$ de unos 30 kJ/mol mientras que la estructura triclínica da un valor que está ligeramente por encima de cero. El valor de 15 kJ/mol encontrado por nosotros está aproximadamente en la mitad del rango definido por los dos valores calculados por estos autores.

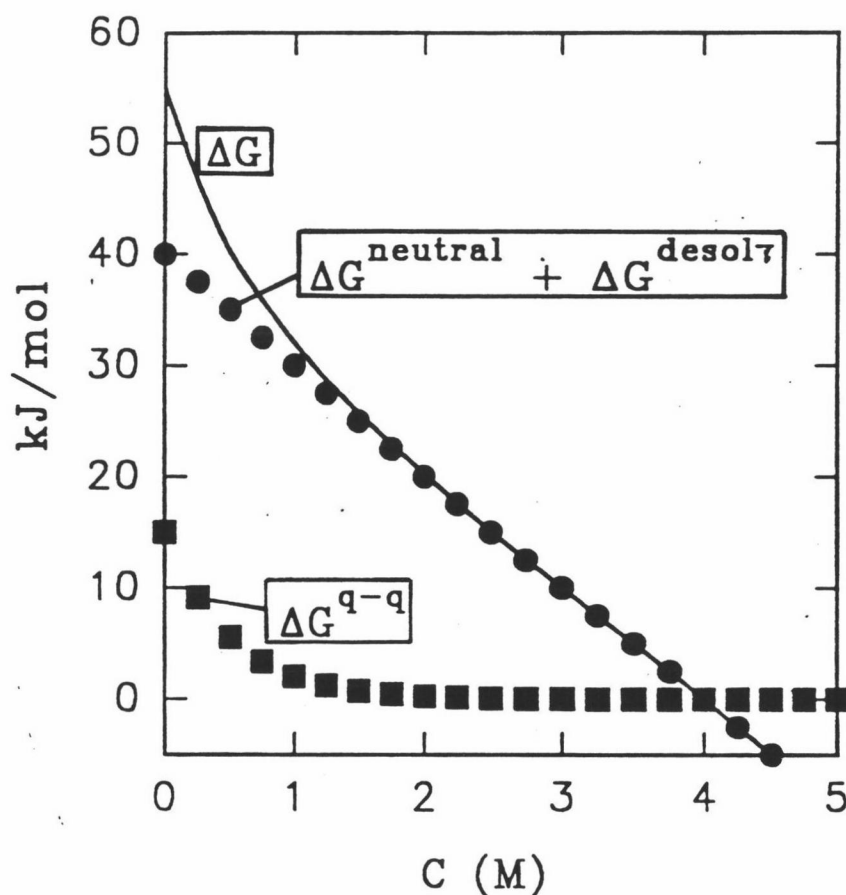


Figura 39: Representación ilustrativa sobre una posible explicación de las desviaciones de la dependencia lineal de ΔG versus C a baja concentración de desnaturalizante: la guanidina alteraría gradualmente la contribución de desolvatación ($\Delta\Delta G^{\text{desolv}}$), mientras que sólo la contribución que procede de las interacciones carga-carga ($\Delta\Delta G^{q-q}$) sería abruptamente eliminada (debido a un efecto de apantallamiento) en el rango de 0 a 1 M guanidina. Según este punto de vista, la diferencia entre los valores de energía de Gibbs en agua obtenidos mediante DSC y LEM daría una estimación de la contribución $\Delta\Delta G^{q-q}$ a la estabilidad de la proteína.

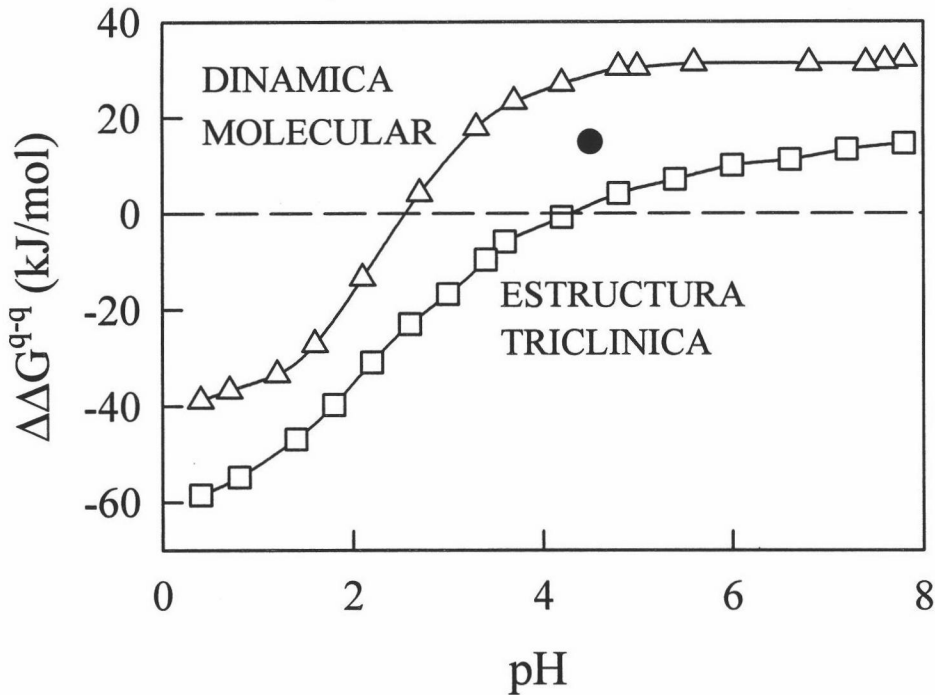


Figura 40: Comparación entre nuestra estimación de la contribución debida a las interacciones carga-carga a la estabilidad de lisozima a pH 4.5 (●) y los perfiles en función del pH calculados por Yang y Honig (1993) según la electrostática continua, empleando dos estructuras diferentes de la proteína: cristal triclinico (□) y la estructura simulada que se deriva de la triclinica mediante dinámica molecular (Δ).

Parece lógico pues que el siguiente paso a seguir para intentar verificar nuestra hipótesis sobre el cálculo de la contribución electrostática a la estabilidad de la proteína sería un estudio sistemático de la energética en función del pH. Si nuestra hipótesis es cierta, entonces dicha contribución debería cambiar de signo en un intervalo de pH lo suficientemente amplio, indicando que tiene carácter estabilizante o desestabilizante según las cargas presentes en la molécula. Para este tipo de estudio escogimos como proteína modelo ubiquitina, proteína pequeña y muy bien caracterizada. Además pudimos disponer de ubiquitinas modificadas cedidas amablemente por el Dr. Makhatadze.

3.9 EL ESTADO DE TRANSICIÓN DE LISOZIMA EN EL DESPLEGAMIENTO A ALTA CONCENTRACIÓN DE GUANIDINA

Si observamos los Chevron a diferentes temperaturas que se recogen en la Figura 19 vemos, por un lado, que en la rama derecha, correspondiente al proceso de desplegamiento no se detectó ninguna curvatura fuera de la zona en la que tiene lugar la transición. Además el valor cinético de $m_{N,\ddagger}$ (pendiente de la rama derecha del Chevron) parece estar cambiando con la temperatura.

La relación entre el valor cinético de m para el proceso de desplegamiento y el correspondiente al valor de equilibrio ($m_{N,\ddagger} / m_{1/2}$) se usa a menudo como un índice del grado de desplegamiento del estado de transición al compararlo con el del estado desplegado y consecuentemente como una medida de la posición del estado de transición a lo largo de la coordenada de reacción (Tanford, 1970; Matouscheck y Fersht, 1993). En la Figura 41B se muestra una representación de Hammond, esto es, del cociente $m_{N,\ddagger} / m_{1/2}$ versus energía de Gibbs de activación para el desplegamiento ($\Delta G_{N,\ddagger}$) a $C=6$ M. Los valores de $\Delta G_{N,\ddagger}$ se han calculado a partir de las constantes de velocidad de desplegamiento correspondientes a 6 M guanidina y para cada temperatura estudiada (ver Chevrons, Figura 19) haciendo uso de la ecuación de Eyring:

$$\Delta G_{N,\ddagger} = -R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{k_D \cdot h}{k_B \cdot T} \right) = R \cdot T \cdot \left(\ln \frac{k_B \cdot T}{h} - \ln \frac{1}{\tau} \right) \quad (38)$$

donde k_D es la constante de velocidad de desplegamiento, h la constante de Planck y k_B la constante de Boltzmann. Se ha escogido 6 M guanidina ya que esta concentración se encuentra aproximadamente en la mitad del rango de concentración en el que disponemos de datos

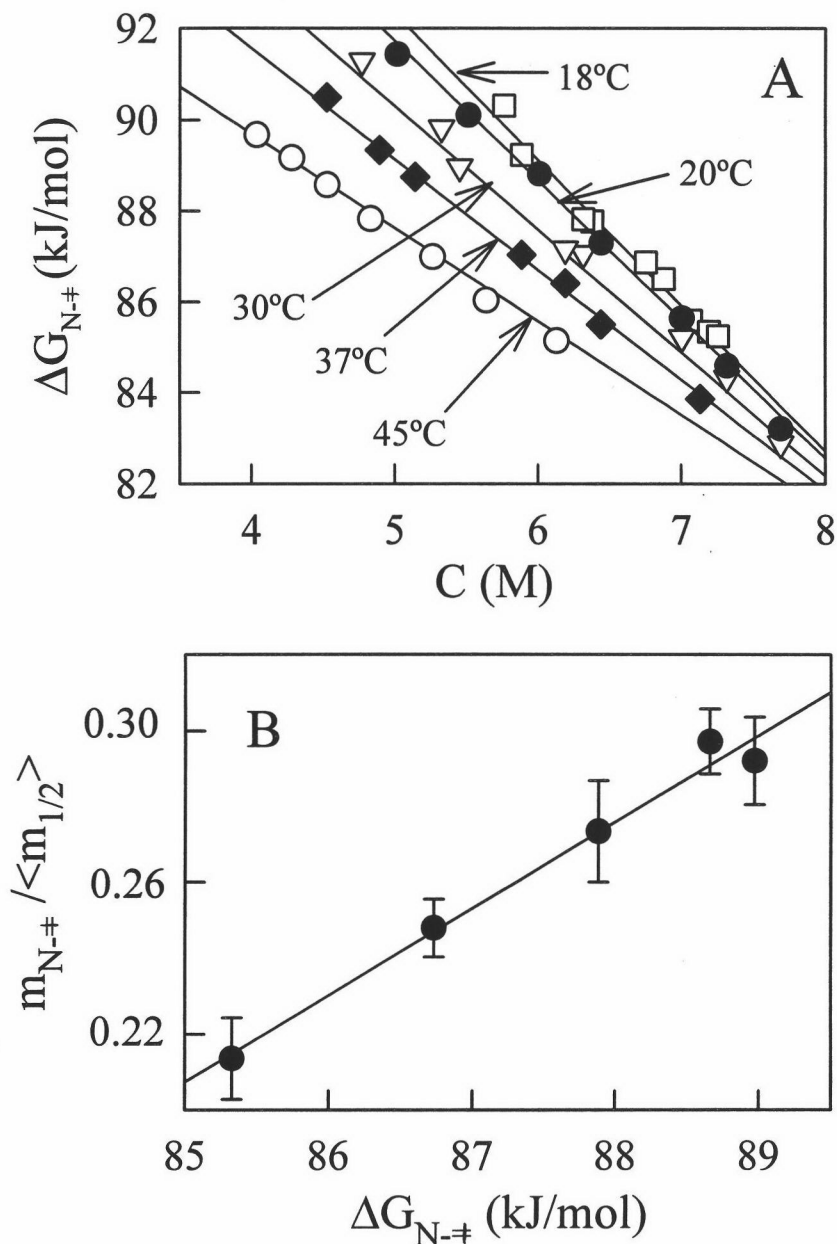


Figura 41: (A) Dependencia de la energía de Gibbs de activación del desplegamiento de lisozima con la concentración de guanidina a 18, 20, 30, 37 y 45 °C. Los datos se han calculado a partir de la rama derecha, correspondiente al proceso de desplegamiento, de los respectivos Chevrons (Figura 19) usando la ecuación de Eyring (38). Las líneas representan el mejor ajuste de la expresión general que describe la dependencia de $\Delta G_{N-‡}$ con la temperatura y concentración de desnaturante (ver texto para más detalles).

(B) Representación de Hammond: valores cinéticos de $m_{N-‡}$ [referidos al valor medio de equilibrio $\langle m_{1/2} \rangle = (10.5 \pm 0.9) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$] versus energía de Gibbs de activación a 6 M guanidina. Las barras de error se calcularon mediante propagación lineal de errores.

experimentales en la rama derecha del Chevron. Para calcular el cociente $m_{N_{\ddagger}}/m_{1/2}$ a cada temperatura tomamos $m_{1/2}=(10.5\pm 0.9) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, que es el valor medio calculado en el apartado 3.6 para el rango que va de 1.8 a 4 M guanidina, y como $m_{N_{\ddagger}}$ (pendiente de la rama derecha del Chevron) el que resulta del ajuste individual del Chevron a una temperatura dada (ver Tabla 3). El error asociado a estos valores se calculó mediante propagación lineal de errores.

Como se observa en la Figura 41B la dependencia de $m_{N_{\ddagger}}/m_{1/2}$ con $\Delta G_{N_{\ddagger}}$ es lineal, dentro del error experimental, y muestra que el cociente $m_{N_{\ddagger}}/m_{1/2}$ aumenta cuando lo hace $\Delta G_{N_{\ddagger}}$ lo que puede ser interpretado como un ejemplo de *comportamiento Hammond* (Hammond, 1955), esto es, el estado de transición se mueve a lo largo de la coordenada de reacción acercándose al estado nativo (menores valores de $m_{N_{\ddagger}}/m_{1/2}$) a medida que la diferencia de energía de Gibbs entre estos estados decrece (menores valores de $\Delta G_{N_{\ddagger}}$). En la literatura encontramos otras evidencias de comportamiento Hammond en el plegamiento de proteínas, como es el caso de barnasa y el inhibidor de quimotripsina 2 (Matouscheck y Fersht, 1993; Matthews y Fersht, 1995; Matouscheck et al., 1995) con cambios en la energía de Gibbs de activación inducidos por mutaciones y temperatura (evidencias de comportamiento anti-Hammond también existen en la literatura: ver Matthews y Fersht, 1995). De hecho, la pendiente de nuestra representación de Hammond en la Figura 41B ($\gamma=2.2\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{kJ}^{-1}$, una medida de la sensibilidad de la posición del estado de transición a cambios en la energía de Gibbs de activación) es similar a los valores publicados para barnasa y el inhibidor de la quimotripsina 2.

Un punto de vista alternativo para explicar los cambios inducidos por la temperatura en $m_{N_{\ddagger}}$ (que no está necesariamente en oposición con la interpretación que hemos explicado en términos de comportamiento tipo Hammond) vendría dado por la siguiente relación:

$$\left(\frac{\partial m_{N-\ddagger}}{\partial T} \right)_C = \left(\frac{\partial \Delta S_{N-\ddagger}}{\partial C} \right)_T \quad (39)$$

que se obtiene fácilmente de la igualdad de las segundas derivadas cruzadas de la energía de Gibbs de activación. De acuerdo a la ecuación (39), el efecto de temperatura en $m_{N-\ddagger}$ refleja un efecto de concentración de desnaturante en la entropía de activación ($\Delta S_{N-\ddagger}$).

A partir de lo anterior es posible obtener una expresión general que describa la dependencia de la energía de Gibbs de activación con la temperatura y la concentración de desnaturante. Así pues, combinamos la dependencia lineal de $m_{N-\ddagger}$ versus $\Delta G_{N-\ddagger}$ (Figura 42B) con la ecuación integrada de Gibbs-Helmholtz de la siguiente manera:

$$\Delta G^\ddagger(C,T) = \Delta G^\ddagger(6M,T) - m_{N-\ddagger} \cdot (C-6) \quad (40)$$

$$\Delta G^\ddagger(6M,T) = \Delta H_{303.15K}^\ddagger \cdot \left(1 - \frac{T}{303.15} \right) + \Delta G_{6M,303.15K}^\ddagger \cdot \frac{T}{303.15} + \Delta C_p^\ddagger \cdot \left[T - 303.15 - T \cdot \ln \left(\frac{T}{303.15} \right) \right]$$

$$m_{N-\ddagger}(T) = m_{N-\ddagger}(303.15K) + \gamma \cdot [\Delta G^\ddagger(6M,T) - \Delta G^\ddagger(6M,303.15K)] \quad (42)$$

donde se ha considerado 303 K como temperatura de referencia.

En la Figura 41A se muestran los perfiles de energía de Gibbs de activación en función de la concentración de guanidina a 18, 20, 30, 37 y 45 °C. Hemos tomado nuestros datos experimentales de la rama derecha de los Chevron correspondiente al proceso de desplegamiento, ver Figura 19, de manera que tendremos para cada temperatura estudiada parejas de concentración

de desnaturizante y tiempo de relajación. Haciendo uso de la ecuación de Eyring (38) es fácil calcular el correspondiente ΔG^\ddagger .

El análisis de estos perfiles considerando las expresiones que nos dan la dependencia de $\Delta G_{N,\ddagger}$ con T y C [ecuaciones (40), (41) y (42)] nos permite determinar la energética del estado de transición. Realizamos el ajuste simultáneo de los cuatro perfiles de ΔG^\ddagger versus C dentro del entorno del programa MLAB. La subrutina de análisis global se detalla a continuación:

```
S1=READ("fichero de datos a 219.15K", número de filas, número de columnas)
S2=READ("fichero de datos a 293.15K", número de filas, número de columnas)
S3=READ("fichero de datos a 303.15K", número de filas, número de columnas)
S4=READ("fichero de datos a 310.15K", número de filas, número de columnas)
S5=READ("fichero de datos a 318.15K", número de filas, número de columnas)
```

```
FUNCTION G(T)=H*(1-T/303.15)+J*T/303.15+P*(T-303.15-T*ln(T/303.15))
FUNCTION M(T)=A+B*(G(T)-J)
FUNCTION R1(C)=G(219.15)-M(219.15)*(C-6)
FUNCTION R2(C)=G(293.15)-M(293.15)*(C-6)
FUNCTION R3(C)=G(303.15)-M(303.15)*(C-6)
FUNCTION R4(C)=G(310.15)-M(310.15)*(C-6)
FUNCTION R5(C)=G(318.15)-M(318.15)*(C-6)
FIT(H, J, P, A, B), R1 TO S1, R2 TO S2, R3 TO S3, R4 TO S4, R5 TO S5
```

Del ajuste no lineal por mínimos cuadrados se obtiene una entalpía de activación de (124 ± 2) kJ/mol (a 30 °C y 6 M guanidina), una energía de Gibbs de activación igual a (87.6 ± 0.1) kJ/mol (a 30 °C y 6 M guanidina) y una capacidad calorífica de activación de (0.66 ± 0.04) kJ·K⁻¹·mol⁻¹. El valor de $\Delta C_{p,N,\ddagger}$ es pequeño si los comparamos con el cambio de capacidad calorífica para la desnaturización de lisozima [que está en torno a 7-8 kJ·K⁻¹·mol⁻¹ en agua y parece aumentar con la concentración de guanidina (Makhatadze y Privalov, 1992)], resultado que cualitativamente concuerda con el trabajo de Segawa y Sugihara (1984a). La interpretación de los cambios de capacidad calorífica es incierta de alguna manera ya que se espera que tanto las

contribuciones positivas (que provienen de la exposición de restos apolares) como las negativas (de la exposición de residuos polares) sean significativas (Murphy y Gill, 1990, 1991; Makhatadze y Privalov, 1990, 1995; Spolar et al., 1992; Privalov y Makhatadze, 1992; Murphy et al., 1992; Sanchez-Ruiz, 1995). Los bajos valores encontrados para el cambio de capacidad calorífica de activación y para la relación $m_{N-\ddagger}/m_{1/2}$ son consistentes con un estado de transición en el que ha tenido lugar poca exposición al disolvente (comparado con el estado nativo). No obstante sorprende el elevado valor de ΔG^\ddagger ; de forma cualitativa podemos plantear una posible estructura del estado de transición, plausible con los valores de $\Delta C_{p,N-\ddagger}$ y ΔG^\ddagger , en donde la molécula de proteína se habría extendido ligeramente debilitándose algunas interacciones de van der Waals y dejando penetrar algo de agua en el interior de la misma.

4. ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO
INDUCIDO POR GUANIDINA DE
UBIQUITINA

ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO INDUCIDO POR GUANIDINA DE UBIQUITINA

En esta segunda parte de la memoria nos planteamos estudiar el efecto del pH sobre la energética del desplegamiento de ubiquitina bovina y de levadura, con objeto de investigar en mayor detalle la posible relación entre la desnaturalización inducida por guanidina y la contribución electrostática a ΔG . En concreto, describiremos los siguientes estudios:

1. Experimentos de desnaturalización inducida por guanidina a 25 °C.

En la sección 4.1 se describe el equilibrio de desplegamiento en el rango de pH de 1.7 a 4.2, mediante medidas de fluorescencia. La obtención de perfiles bifásicos nos llevó a estudiar de manera más detallada el fenómeno de atenuación de la fluorescencia, a través del efecto del pH en la señal de los estados nativo y desplegado de la proteína, así como la influencia de la concentración de sal presente.

A continuación y ya en la sección 4.2 se describe el estudio mediante dicroísmo circular del equilibrio de desnaturalización en el intervalo de pH de 2 a 5.

El análisis según el modelo de dos estados de los perfiles experimentales de fluorescencia y CD nos permitirá determinar los parámetros característicos de la transición, como $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$, así como los valores de ΔG_w mediante extrapolación lineal [ecuación (1.7)] a cada pH.

2. Experimentos de Calorimetría Diferencial de Barrido en presencia de diferentes concentraciones de guanidina (0-4 M) a pH 2 y 4, descritos en la sección 4.3.

Hemos calculado los valores de $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ y $m_{1/2}$ para cada concentración estudiada lo que nos permite evaluar la validez de la aproximación lineal en un rango amplio de concentración y a diferentes pHs.

Además para concentraciones de guanidina entre 3-4 M encontramos evidencias de desnaturalización fría de ubiquitina bovina.

En la sección 4.4 comparamos los valores de ΔG_w obtenidos mediante extrapolación lineal de los datos de desnaturalización por guanidina con los que se derivan de experimentos de DSC, en todo el rango de pH estudiado. Encontramos que la diferencia entre ambos tipos de datos cambia de signo al variar el pH, lo que apoya nuestra idea original de que esta diferencia representa una estimación de la contribución electrostática debida a las interacciones carga-carga a la estabilidad de proteínas.

Por último en la sección 4.5 calculamos teóricamente dicha contribución electrostática utilizando el programa TITRA. Comparamos además las estimaciones experimentales y teóricas de Δv de desplegamiento y el pK de la histidina en posición 68.

4.1 ESTUDIO MEDIANTE MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDO POR GUANIDINA

Hemos caracterizado el equilibrio de desnaturalización inducida por guanidina de ubiquitina de eritrocitos bovinos, en el rango de pH de 1.75-4.26 y a 25°C. A valores de pH superiores no llegamos a detectar ninguna transición mediante fluorescencia debido a la alta estabilidad de ubiquitina.

La proteína fue dializada exhaustivamente en tampón 10 mM acetato sódico/ácido acético, pH 3.5 preparado según se indica en el apartado 2.2.1.1. Los tampones utilizados en los

experimentos a diferentes pHs son los indicados en el trabajo de Wintrode et al. (1994) :

- 10 mM glicina/HCl para el rango de pH comprendido entre 2.0 y 3.5.
- 10 mM acetato sódico/ácido acético para pHs entre 3.5 y 4.5.

La disolución concentrada de desnaturalizante al pH de trabajo se preparó según el procedimiento A) descrito en el apartado 2.2.1.2. Los parámetros instrumentales relativos al fluorímetro se indican en el apartado 2.2.3.1.

Las muestras correspondientes a un pH dado se prepararon mezclando el volumen adecuado de tampón y guanidina según la concentración que se desee de desnaturalizante. De cada una de éstas pipeteamos un volumen constante y añadimos la cantidad de proteína necesaria (a pH 3.5) de manera que la concentración final sea 0.04 mg/mL; por último agitamos suavemente toda la mezcla y ayudados de una pipeta Pasteur la depositamos en la célula de medida del fluorímetro que se encuentra termostatizada a 25 °C. Esperamos unos 10 minutos y medimos la intensidad de fluorescencia debida al único cromóforo presente en la molécula de ubiquitina, la tirosina 59. No es necesario un período de incubación para alcanzar la condición de equilibrio ya que las cinéticas de desplegamiento tienen, en todo el rango de concentración de desnaturalizante, un tiempo de relajación mucho menor al tiempo de manipulación de la muestra y al tiempo de respuesta del instrumento de manera que necesitaríamos de técnicas de stopped-flow para poder seguir las (Briggs et al., 1992). En todos los casos medimos la lectura del pHmetro para cada muestra una vez finalizado el experimento (ver sección 2.2.1.2). La concentración exacta de guanidina presente en cada muestra se calculó a partir de medidas del índice de refracción [ecuación (2.9)].

4.1.1 Fluorescencia de los estados nativo y desplegado

Hemos determinado los perfiles de intensidad de fluorescencia de ubiquitina bovina en función del pH correspondientes al estado nativo (proteína en tampón acuoso) y desplegado (en 7.5 M guanidina) de la misma, a 25 °C.

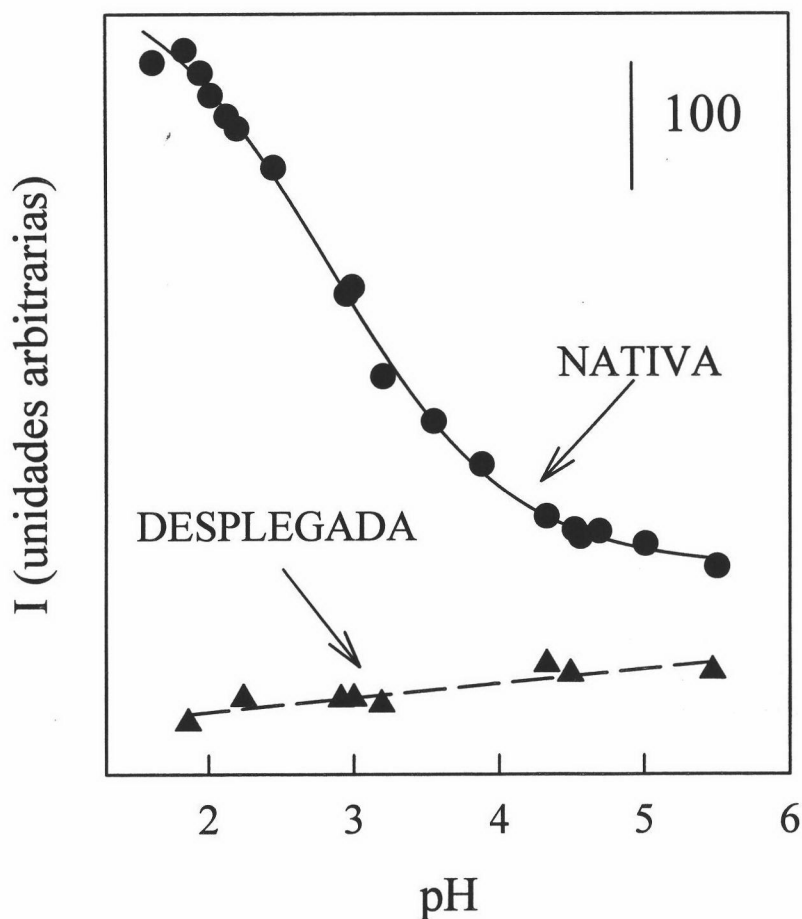


Figura 1: Efecto del pH sobre la intensidad de fluorescencia emitida a 310 nm (excitación a 279 nm) por ubiquitina bovina en estado nativo y desplegado (en 7.5 M guanidina), a 25 °C. La concentración de proteína fue de 0.04 mg/mL. Las rendijas de excitación y emisión fueron 2.5 y 5 nm, respectivamente. La línea continua representa el mejor ajuste de la ecuación (1) a los datos de ubiquitina nativa (ver Figura 3); el trazo discontinuo corresponde al mejor ajuste lineal a los datos de proteína desplegada.

En la Figura 1 se muestra el efecto de pH sobre la fluorescencia de los estados nativo y desplegado. Sorprende el cambio tan abrupto que experimenta la fluorescencia del nativo frente a la del estado desplegado que permanece prácticamente constante con el pH. Este hecho se atribuye a que la fluorescencia del único cromóforo presente en la molécula, la tirosina 59, es fuertemente atenuada por la forma desprotonada de al menos un grupo carboxílico (Jenson et al., 1980), cuyo pK depende de la concentración de sal presente, como veremos en el siguiente apartado. Así al variar el pH del medio, el estado de ionización de dicho grupo cambia y esto se refleja de manera directa en la fluorescencia de la ubiquitina (ver Figura 1). A juzgar por la estructura cristalina (ver Figura 2) parece probable que sea el carboxilato perteneciente al glutámico 51 el responsable del microambiente “peculiar” en el que se encuentra la Tyr 59, consecuencia de lo cual ésta ve perturbada su fluorescencia y su estado de ionización [estudios de titulación espectrofotométrica realizados por Jenson et al. (1980) estiman el pK de dicha Tyr en 11.1, valor anormalmente alto].

4.1.2 Determinación del pK del grupo/s carboxilato atenuante/s de la fluorescencia

Con objeto de determinar el cambio del pK de dicho grupo/s carboxilato con la concentración de guanidina hemos caracterizado diferentes perfiles de intensidad de fluorescencia *versus* pH para concentraciones constantes de aquella en el rango de 0-4 M. Para una concentración dada de desnaturalizante conseguimos los diferentes pHs (dentro del rango de 1.5 a 5.5) mezclando los volúmenes adecuados de dos disoluciones del tampón correspondiente (Gly o AcNa) a esa concentración de guanidina y de pHs superior e inferior al deseado (procedimiento B en 2.2.1.2). Los perfiles obtenidos se recogen en la Figura 3.

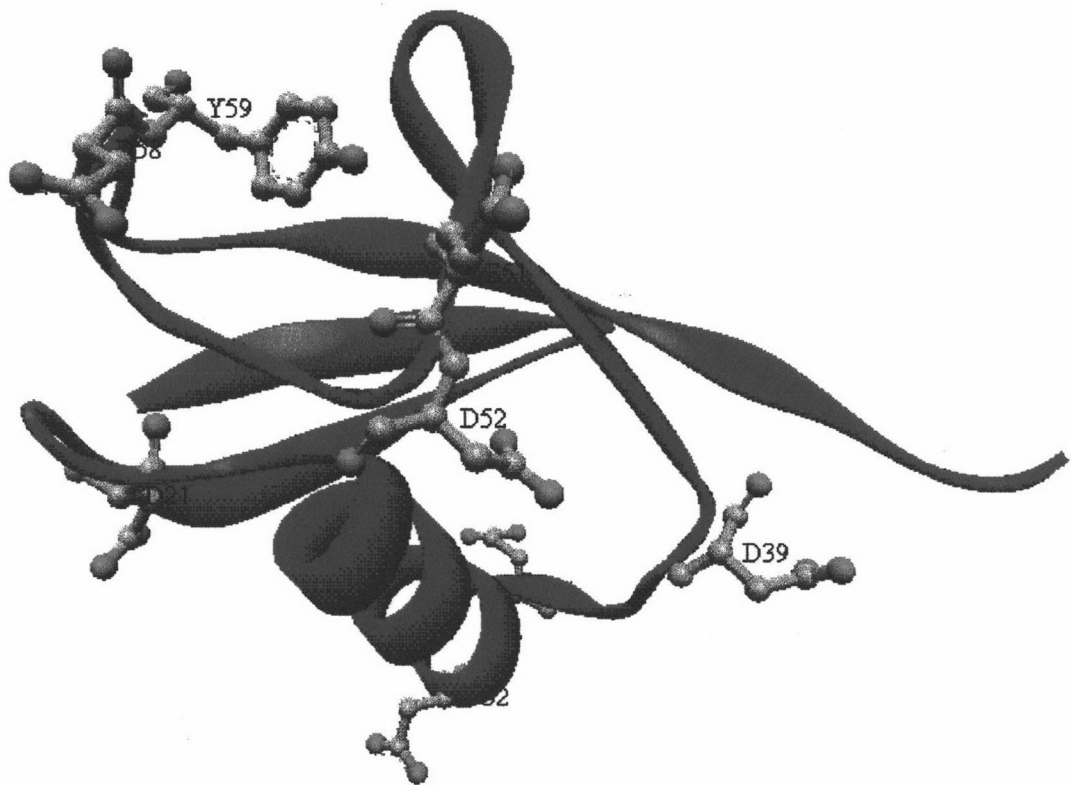


Figura 2: Imagen de ubiquitina bovina obtenida con el programa comercial WebLab ViewerPro. En ella se ha señalado la tirosina 59 así como los grupos carboxilato pertenecientes a residuos próximos; los candidatos más probables responsables del efecto de atenuación de la fluorescencia parecen ser Asp 52 y Glu 51.

El ajuste individual a cada serie de datos se realizó con el programa MLAB y según la ecuación:

$$I = \frac{A + B \cdot 10^{(pK - pH)}}{1 + 10^{(pK - pH)}} \quad (1)$$

considerando planas las líneas base de la pre- y post-transición. Tenemos por tanto tres parámetros ajustables: A, B y pK.

Así pues de este tipo de análisis vamos a poder obtener el pK del grupo o grupos carboxilato responsable/s del efecto de pH sobre la fluorescencia de la tirosina, en función de la concentración de guanidina en el medio. Los pKs resultantes se recogen en la Figura 4B (símbolos huecos).

Hemos querido comparar el efecto observado en el pK del grupo carboxilato debido a la concentración de guanidina con el de otra sal como es el NaCl. De la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de NaCl obtenida a diferentes pHs (ver apartado 4.1.3; Figura 6) podemos obtener fácilmente el cambio de la señal de fluorescencia con el pH para concentraciones dadas de NaCl. En la Figura 4A mostramos dichos perfiles para 0.25, 1 y 3.5 M NaCl. De nuevo realizamos un ajuste individual de estos perfiles según la ecuación (1) obteniendo en cada caso la estimación del pK. Si los representamos conjuntamente con los correspondientes a guanidina vemos que la tendencia es prácticamente la misma. Como se observa, frente al valor típico esperado para un residuo de aspártico o glutámico de entre 4 y 5 nos encontramos con un pK anormalmente bajo (en torno a 3.2) a concentraciones bajas de sal, posiblemente reflejando una interacción electrostática favorable con residuos cercanos cargados positivamente (ver Figura 2). A medida que la concentración de sal aumenta parece que se elimina esa interacción, debido al apantallamiento de las cargas, y el pK va aumentando hasta

alcanzar el valor "normal" a concentraciones de NaCl o GdnHCl en torno a 1-1.5 M.

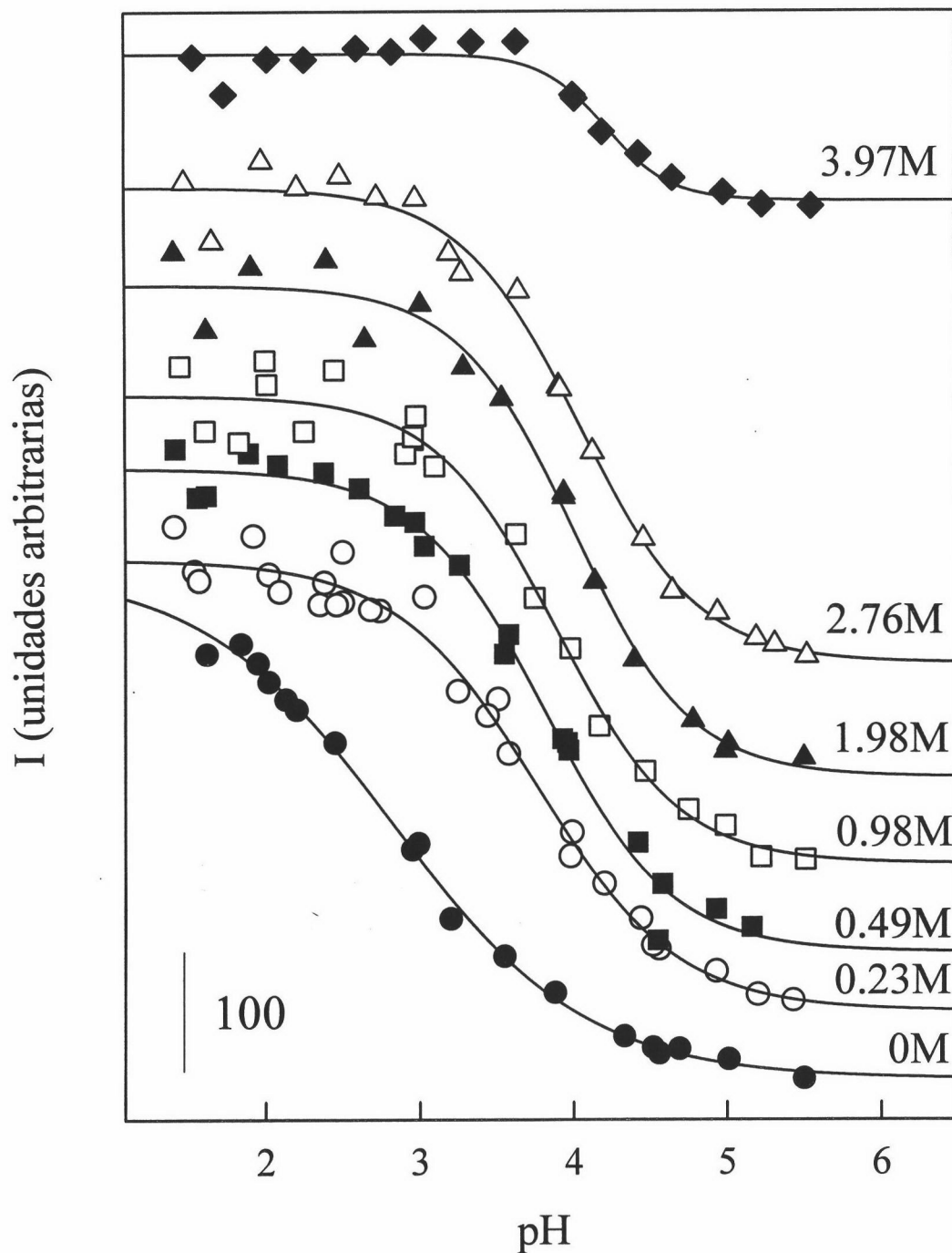


Figura 3: Dependencia con el pH de la señal de fluorescencia de ubiquitina bovina a concentraciones constantes de guanidina, en el rango de 0-3.97 M. Los perfiles se han desplazado a lo largo del eje y con propósitos ilustrativos. La concentración de proteína fue de 0.04 mg/mL y la temperatura 25 °C. Las líneas continuas representan los mejores ajustes de la ecuación (1) a los datos experimentales.

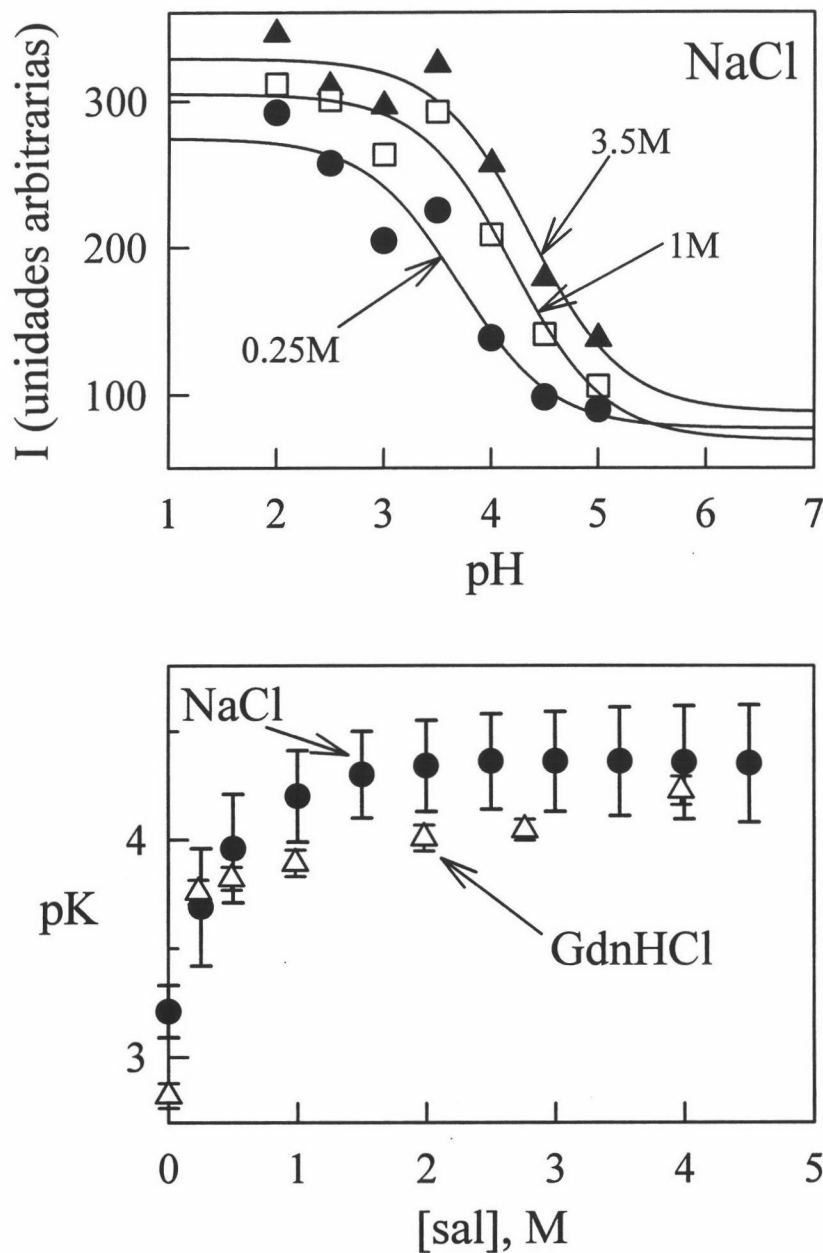
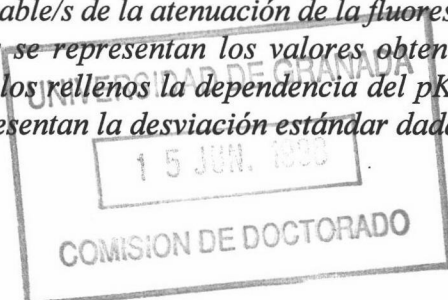


Figura 4: (A) Perfiles de intensidad de fluorescencia versus pH correspondientes a concentraciones dadas de NaCl. Los puntos se han obtenido de las dependencias de la señal de fluorescencia con la concentración de NaCl determinadas a diferentes pHs (ver Figura 6). Las líneas continuas representan el mejor ajuste de la ecuación (1) a dichos datos.

(B) Variación del pK del grupo/s carboxilato responsable/s de la atenuación de la fluorescencia, con la concentración de sal: con símbolos huecos se representan los valores obtenidos en presencia de guanidina (ver Figura 3) y con símbolos rellenos la dependencia del pK con la concentración de NaCl (Figura 4A). Las barras representan la desviación estándar dada por el programa MLAB.



4.1.3 Perfiles de Intensidad de fluorescencia versus concentración de guanidina:

Análisis según el modelo de dos estados

Las muestras de cada perfil correspondiente a un pH dado se prepararon según se indica al comienzo de la sección 4.1, de manera que se cubra el rango de 0 a 8 M guanidina.

En todos los casos tomamos la lectura del pHmetro una vez finalizado el experimento; observamos que para un mismo perfil, estas lecturas de pH variaban gradualmente unas décimas dependiendo de la concentración de guanidina presente en el medio (ver sección 2.2.1.2), aunque en la zona correspondiente a la transición el pH permanecía aproximadamente constante. Por esto el valor concreto que asignamos a cada perfil de desnaturalización resulta de hacer la media de los pHs correspondientes a los puntos situados en esta región.

En la Figura 5 aparecen los diferentes perfiles correspondientes a la desnaturalización de ubiquitina inducida por guanidina, obtenidos a varios pHs. Vemos como en todos los casos se trata de perfiles claramente bifásicos. La transición observada a alta concentración de guanidina es debida al desplegamiento de la proteína mientras que la transición aparente a baja concentración se atribuye al hecho de que la señal de fluorescencia cambia con la concentración de sal a pH constante. Como ya vimos en la sección 4.1.2, esto se debe a que el pK del carboxilato responsable de la atenuación de la fluorescencia se ve afectado por la fuerza iónica del medio. Este hecho se comprueba cuando al estudiar el efecto de otra sal, como el NaCl, obtuvimos perfiles de intensidad de fluorescencia que reproducen aceptablemente los de guanidina (ver Figura 6). Además en nuestros experimentos de dicroísmo circular (ver sección 4.2) se detecta una única transición a alta concentración de guanidina (Figura 8), lo que confirma que la aparente transición observada a baja concentración de guanidina en fluorescencia no se debe a ningún cambio conformacional en la molécula.

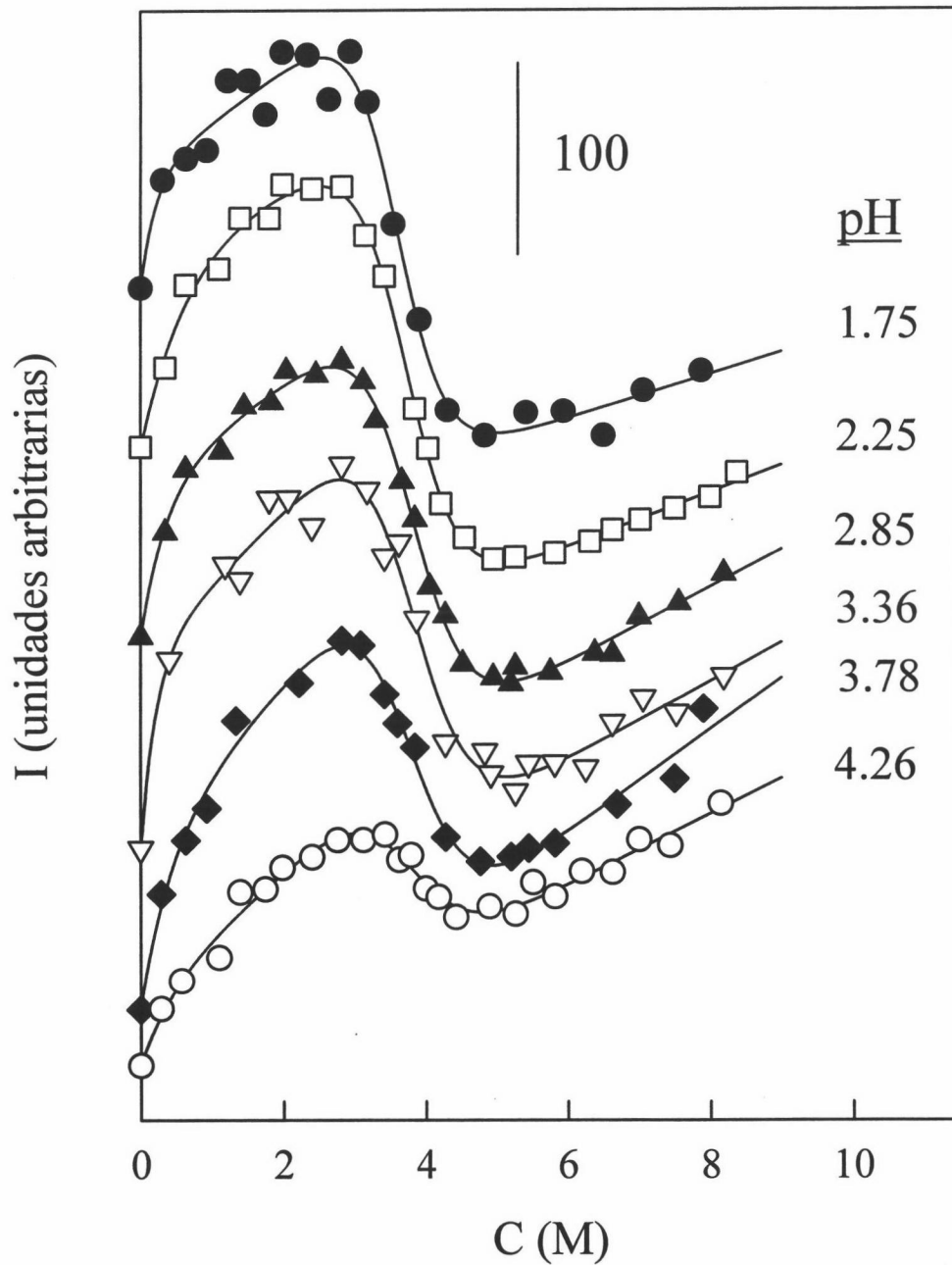


Figura 5: Perfiles de equilibrio correspondientes al desplegamiento inducido por guanidina de ubiquitina bovina en el rango de pH de 1.75-4.26, estudiados mediante medidas de emisión de fluorescencia a 310 nm y 25 °C. La concentración de proteína fue de 0.046 mg/mL. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de las ecuaciones (2), (3), (4) y (3.4) a los datos experimentales. La transición que se observa a baja concentración se atribuye al hecho de que el pK del carboxilato responsable de la atenuación de la fluorescencia se ve afectado por la fuerza iónica del medio, a pH constante (ver Figura 4B).

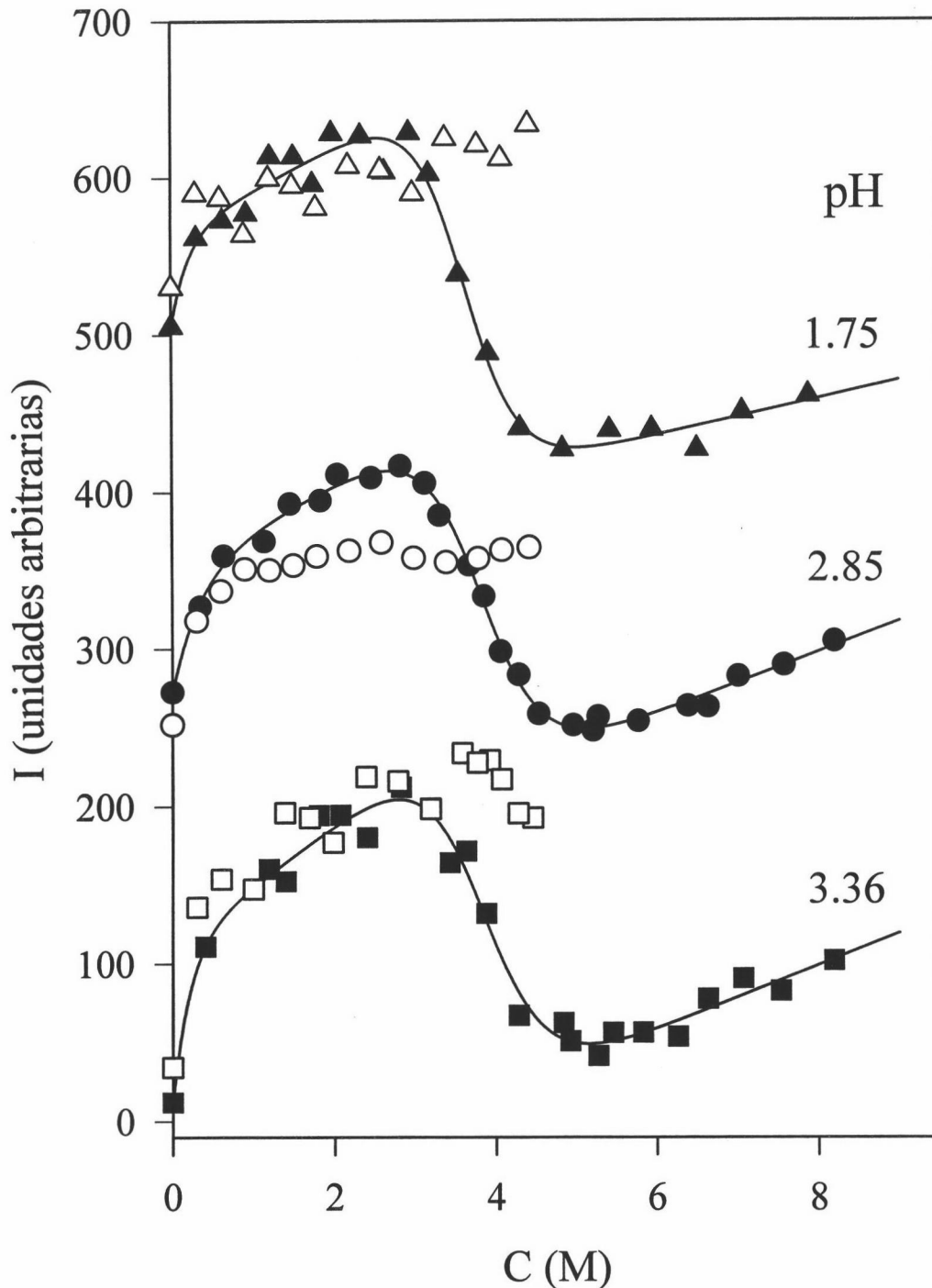


Figura 6: Dependencias de la señal de fluorescencia de ubiquitina a pHs 1.75, 2.85 y 3.36 con la concentración de sal: guanidina con símbolos rellenos y NaCl con símbolos huecos. Se observa una buena concordancia entre ambos tipos de datos en el rango de 0-3 M aproximadamente, lo que confirma que la transición aparente observada a baja concentración se debe al hecho de que el pK del carboxilato responsable de la atenuación de la fluorescencia varía con la fuerza iónica del medio, a pH constante. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de las ecuaciones (2), (3), (4) y (3.4) a los datos de guanidina.

Los perfiles de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de guanidina obtenidos a pHs 1.75, 2.25, 2.85, 3.36, 3.78 y 4.26 (Figura 5) se analizaron de acuerdo al modelo de desnaturalización de dos estados según la ecuación:

$$I = \frac{I_N + I_D \cdot e^{m_{1/2}(C - C_{1/2})/RT}}{1 + e^{m_{1/2}(C - C_{1/2})/RT}} \quad (2)$$

Hemos considerado la línea base para el estado desplegado (I_D) dependiente de C de manera lineal [ecuación (3.4)] mientras que para la línea base nativa (I_N) dicha dependencia se ha considerado de tipo exponencial, para tener en cuenta de esta manera el efecto de la concentración de sal sobre el pK del grupo carboxilato responsable de la atenuación de la fluorescencia; además hemos tenido en cuenta una dependencia del parámetro I_∞ lineal con la concentración de guanidina:

$$I_N = I_\infty - (I_\infty - I_0) \cdot e^{(-h \cdot C)} \quad (3)$$

$$I_\infty = d + f \cdot C \quad (4)$$

Llevamos a cabo dos tipos de análisis paralelos de nuestras curvas de desnaturalización: individual y global. Ambos se realizaron en el entorno MLAB siendo la subrutina de ajuste en cada caso la siguiente:

- *análisis individual*: tenemos en total 8 parámetros ajustables para definir cada curva.

```
M1= READ("nombre del fichero", número de filas, 2)
R=0.008314
T=298.15
FUNCTION IN(C)=I∞(C)-(I∞(C)-I0) · exp (-h·C)
FUNCTION I∞(C)= d+f·C
FUNCTION ID(C)= a+b·C
```

```

FUNCTION I(C)=(IN(C)+ID(C)·exp(m·(C-s)/RT))/(1+exp(m·(C-s)/RT))
FIT(I0, h, d, f, a, b, m, s), I to M1
Z1=POINTS(I, 0:9.5:0.1)

```

- *análisis global*: consideramos ΔG_w dependiente linealmente con el pH:

$$\Delta G(C) = \Delta G_w(pH) - m_{1/2} \cdot C \quad (5)$$

$$\Delta G_w(pH) = a + b \cdot (pH - pH_{ref}) \quad (6)$$

siendo pH_{ref} un pH de referencia. Si tenemos en cuenta que el efecto del pH sobre ΔG viene dado por (Alberty, 1969; Plaza del Pino y Sanchez-Ruiz, 1995):

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial pH} \right)_{T,C} = (\ln 10) \cdot RT \cdot \Delta v \quad (7)$$

donde Δv es el número de protones que toma la proteína del disolvente debido al desplegamiento, entonces tendremos que el parámetro b en la ecuación (6) es igual a $[(\ln 10) \cdot RT \cdot \Delta v]$.

La subrutina de análisis utilizada en el MLAB fue:

```

M1= READ("nombre del fichero pH 1.75", número de filas, 2)
M2= .....
. ....
. ....
M6= READ("nombre del fichero pH 4.26", número de filas, 2)
FUNCTION I1(C)=(IN1(C)+ID1(C)·exp(-G1(C)/RT))/(1+exp(-G1(C)/RT))
FUNCTION IN1(C)=I∞1(C)-(I∞1(C)-I01[1])·exp(-h[1]·C)
FUNCTION I∞1(C)= d[1]+f[1]·C
FUNCTION ID1(C)= a[1]+b[1]·C
FUNCTION G1(C)= Gw(1.75)-m[1]·C

```

FUNCTION I2(C)=.....

.

.

.

FUNCTION I6(C)=.....

FUNCTION $G_w(\text{pH})=t+v\cdot(\text{pH}-p)$

FIT(I_0 , h, d, f, a, b, m, t, v), I1 TO M1, I2 TO M2, I3 TO M3, I4 TO M4, I5 TO M5, I6 TO M6

Z1=....

.

.

Z6=....

Si repetimos el ajuste global fijando pH_{ref} igual a cada uno de los valores de pH para los que hemos caracterizado nuestros perfiles de desnaturalización, entonces obtendremos en cada caso el valor correspondiente de ΔG_w a ese pH con su correspondiente error. Además para obtener el parámetro $C_{1/2}$ de cada curva y su correspondiente error basta con repetir el ajuste modificando ligeramente la ecuación que nos da el cambio de energía de Gibbs con C como sigue:

FUNCTION $G1(C)=G_w(1.75) - (G_w(1.75)/s[1]) \cdot C$

En la Figura 5 hemos representado el resultado del ajuste global a todas las curvas; como se observa fue excelente en todos los casos. Además debemos señalar que la diferencia entre los análisis individuales y el global no es significativa. Así en la siguiente tabla se muestra el valor de los parámetros más característicos de las curvas de desnaturalización inducida por guanidina obtenidos por ambos procedimientos (para cada uno, la primera columna proviene del ajuste individual y la segunda del global):

pH	$C_{1/2}$ (M)		$m_{1/2}$ (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)		ΔG_w (kJ·mol ⁻¹)	
1.75	3.61±0.08	3.59±0.06	8.01±1.69	7.49±0.83	28.83±6.24	26.78±3.02
2.25	3.70±0.07	3.73±0.08	6.65±0.64	6.98±0.54	24.65±2.71	25.98±2.21
2.85	3.77±0.05	3.80±0.07	6.03±0.54	6.58±0.45	22.75±2.24	24.90±1.79
3.36	3.82±0.09	3.80±0.07	6.98±1.42	6.34±0.57	26.69±5.69	23.96±2.18
3.78	3.69±0.12	3.75±0.10	5.56±1.08	6.23±0.73	20.56±4.37	23.20±2.85
4.26	3.90±0.21	3.72±0.17	8.35±2.69	6.04±0.97	32.07±11.27	22.30±3.78

Tabla 1: Valores de $C_{1/2}$, $m_{1/2}$ y ΔG_w correspondientes al equilibrio de desnaturalización de ubiquitina bovina a diferentes pHs, inducido por guanidina y estudiado mediante medidas de fluorescencia.

Los errores que aparecen asociados a cada parámetro son los elementos diagonales de la matriz covarianza. Representan un límite inferior de manera que probablemente la incertidumbre asociada a dichos parámetros sea algo mayor.

Del análisis global obtenemos que Δv vale (-0.3±0.4) mol H⁺/mol de proteína.

4.2 ESTUDIO MEDIANTE MEDIDAS DE DICROÍSMO CIRCULAR DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDO POR GUANIDINA

En general, mediante experimentos de dicroísmo circular (CD) en la zona del UV cercano obtenemos información acerca de la estructura terciaria de la molécula mientras que de la región del UV lejano es posible obtener información sobre su estructura secundaria.

Hemos estudiado el desplegamiento inducido por guanidina de ubiquitina de eritrocitos bovinos y de levadura, a diferentes pHs y 25 °C, siguiendo el cambio en elipticidad a 222 nm (a

esta longitud de onda básicamente estaremos observando cambios en el contenido helicoidal de la molécula). Las diferencias en cuanto a composición aminoacídica entre ambas proteínas son sólo tres residuos en posiciones 19, 24 y 28 (Ozkaynak et al., 1984) y según el estudio de Wilkinson et al. (1986) no se observa ningún cambio en la estructura de ubiquitina o en su actividad como consecuencia de esta diferencia. Así la conformación de la proteína de levadura es similar a la bovina a juzgar por los espectros de CD, sensibilidad a la tripsina y radio de Stokes. No obstante, ubiquitina de levadura es menos estable y por tanto nos va a permitir ampliar el pH de trabajo hacia valores superiores.

4.2.1 Procedimiento experimental

Los tampones utilizados para dializar la proteína fueron glicina 10 mM/HCl (para los experimentos a pH 2.0 y 3.0), acetato sódico 10 mM/ ácido acético (para pH 4.0), según las condiciones dadas por Wintrode et al. (1994), y citrato sódico/ ácido cítrico 5 mM (para pH 5.5) preparados según se indica en 2.2.1.1. Las disoluciones concentradas de guanidina (en torno a 8 M) y NaCl (en torno a 4 M) a los diferentes pHs se prepararon según se describe en 2.2.1.2, procedimiento B. Las muestras de proteína en presencia de diferentes concentraciones de codisolvente se prepararon mezclando los volúmenes necesarios de tampón, codisolvente y proteína de manera que la concentración final de ésta fuera de 0.1 mg/mL. Una vez preparadas se dejaron incubando a 25 °C.

En todos los casos se registró el espectro completo en el UV lejano utilizando para ello cubetas rectangulares de 1 mm de paso de luz (debido a que en esta región del UV los valores de absorbancia y elipticidad de la muestra son altos). La muestra permaneció durante unos diez minutos en el portacubetas termostatzado a 25 °C. Sistemáticamente hicimos acumulaciones de

al menos tres espectros en el rango de 260 a 200 nm para la proteína en tampón acuoso y entre 260 y 215 nm cuando en el medio existía algún codisolvente (el fotomultiplicador se saturaba por debajo de 215 nm). En la Figura 7 se muestran los espectros de dicroísmo circular correspondientes a ubiquitina de glóbulos rojos bovinos en presencia de distintas concentraciones de guanidina.

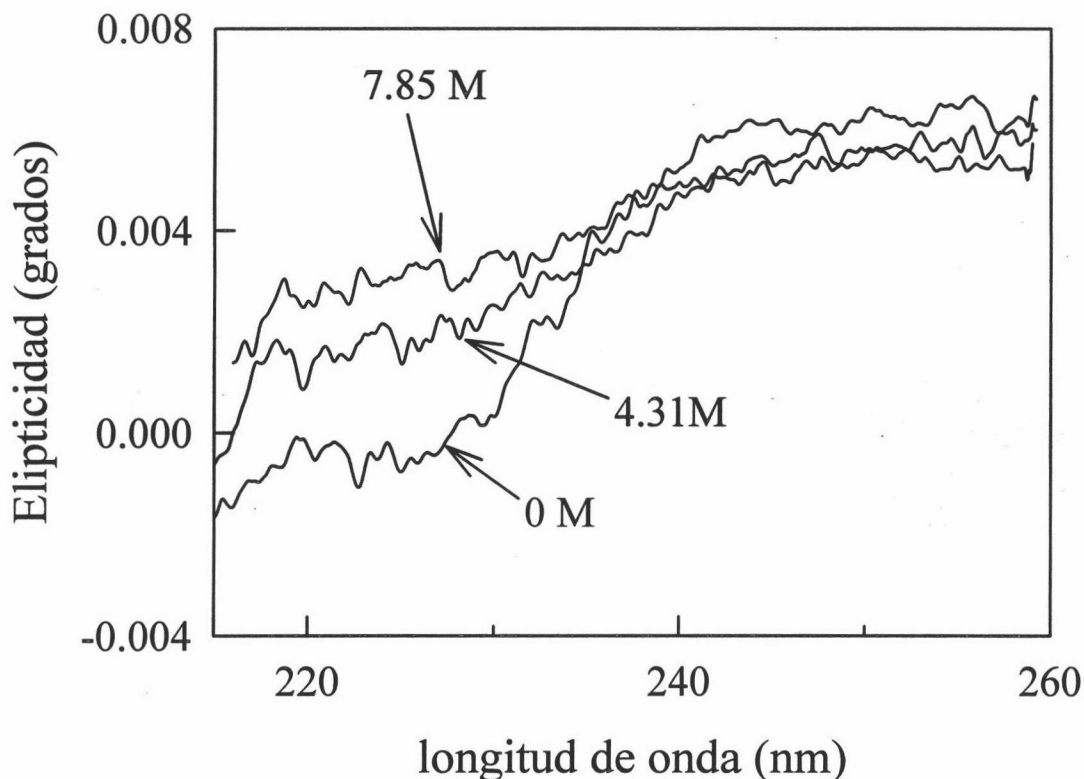


Figura 7: Espectros originales de dicroísmo circular en el UV lejano, de ubiquitina de glóbulos rojos bovinos en tampón glicina 10 mM/HCl pH 3.0 y diferentes concentraciones de guanidina. La concentración de proteína fue de 0.1 mg/mL. Los espectros se registraron a 25 °C, en una cubeta de 1 mm de paso de luz.

4.2.2 Análisis según el modelo de dos estados

Nos interesa seguir el cambio, por efecto de la adición de codisolventes, en la elipticidad a 222 nm; dado que disponemos de varios espectros en las mismas condiciones el valor más apropiado será la media de todos ellos. Debido probablemente a que el dicrógrafo que utilizamos para los experimentos era antiguo tuvimos algunos problemas en determinar el valor medio a 222 nm ya que en ocasiones los espectros se encontraban desplazados ligeramente, en sentido vertical, unos con respecto a otros. Para salvar este problema escribimos un programa en lenguaje BASIC que corregía los espectros al mismo nivel trazando línea base entre 260 y 250 nm (en esta zona no existe señal debida a la proteína) y calculaba el valor de θ_{222} con la correspondiente desviación estándar.

Es importante destacar que en ningún caso hemos restado la contribución del control (tampón o tampón/codisolvente) a la elipticidad de la muestra. Previamente registramos los espectros de disoluciones de diferente concentración de codisolvente (guanidina y NaCl) en ausencia de proteína sin observar un cambio apreciable en θ_{222} con la concentración de aquel. Puesto que el valor de la elipticidad del control permanece constante y lo que realmente nos interesa son los *cambios* en θ_{222} como consecuencia de variaciones en la estructura secundaria de la proteína, no creemos necesario registrar y restar en cada caso la contribución correspondiente al control.

Siguiendo el procedimiento descrito hemos determinado los perfiles de θ_{222} *versus* guanidina / NaCl en el rango de pH de 2.0 - 4.0 para ubiquitina de glóbulos rojos bovinos y entre 2.0 - 5.5 para ubiquitina de levadura (ver Figuras 8 y 9).

Realizamos un análisis global, según el modelo de dos estados, de los perfiles de desplegamiento obtenidos a diferentes pHs y para cada una de las proteínas en estudio. Hemos

considerado las líneas base nativa y desplegada lineales con la concentración de desnaturalizante [ecuación (3.8)] y una variación de ΔG_w lineal con el pH [ecuaciones (5) y (6)]; se utilizó el programa comercial MLAB de manera que fue necesario en cada caso escribir la subrutina de ajuste concreta:

```
M1= READ("nombre del fichero pH 2", número de filas, 2)
```

```
M2= .....
```

```
. .....
```

```
. .....
```

```
FUNCTION I1(C)=(IN1 (C)+ID1 (C)· exp(-G1(C)/RT))/(1+exp(-G1(C)/RT))
```

```
FUNCTION IN1(C)=d[1]+e[1]·C
```

```
FUNCTION ID1(C)= r[1]+s[1]·C
```

```
FUNCTION G1(C)= Gw(2)-m[1]·C
```

```
FUNCTION I2(C)=.....
```

```
.
```

```
.
```

```
.
```

```
FUNCTION Gw(pH)=t+v·(pH-p)
```

```
FIT(d, e, r, s, m, t, v), I1 to M1, I2 TO M2, I3 TO M3...
```

```
Z1=....
```

```
.
```

```
.
```

Si repetimos el ajuste global fijando pH_{ref} igual a cada uno de los valores de pH para los que hemos caracterizado nuestros perfiles de desnaturalización, entonces obtendremos en cada caso el valor correspondiente a ΔG_w para ese pH con su correspondiente error. Además para obtener el parámetro $C_{1/2}$ de cada curva y su correspondiente error basta con repetir el ajuste modificando ligeramente la ecuación que nos da el cambio de energía de Gibbs con C como sigue:

```
FUNCTION G1(C)=Gw (2) - (Gw (2)/a[1]) ·C
```

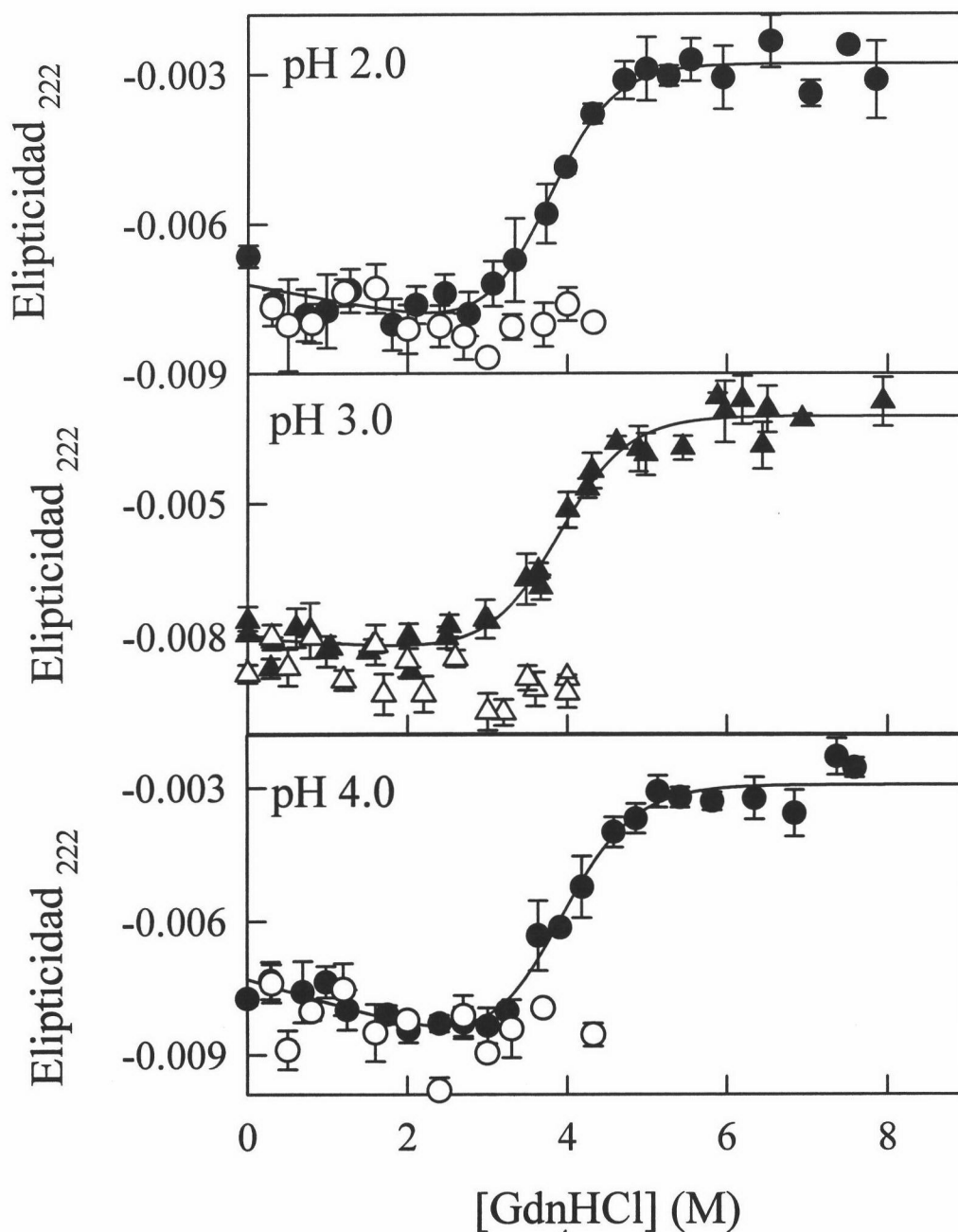



Figura 8: Perfiles correspondientes al cambio de elipticidad a 222 nm en función de la concentración de sal, a pHs 2.0, 3.0 y 4.0 para ubiquitina bovina. Los símbolos rellenos corresponden a experimentos hechos en presencia de guanidina y los huecos con NaCl. En cada caso el valor de θ_{222} resulta de la media de al menos tres espectros. Las barras representan la desviación estándar asociada. Las líneas continuas corresponden al ajuste simultáneo de la ecuación (3.8), considerando ΔG_w lineal con el pH, a los perfiles de desnaturalización inducida por guanidina a los diferentes pHs. En todos los casos la concentración de proteína fue de 0.1 mg/mL y la temperatura 25 °C.

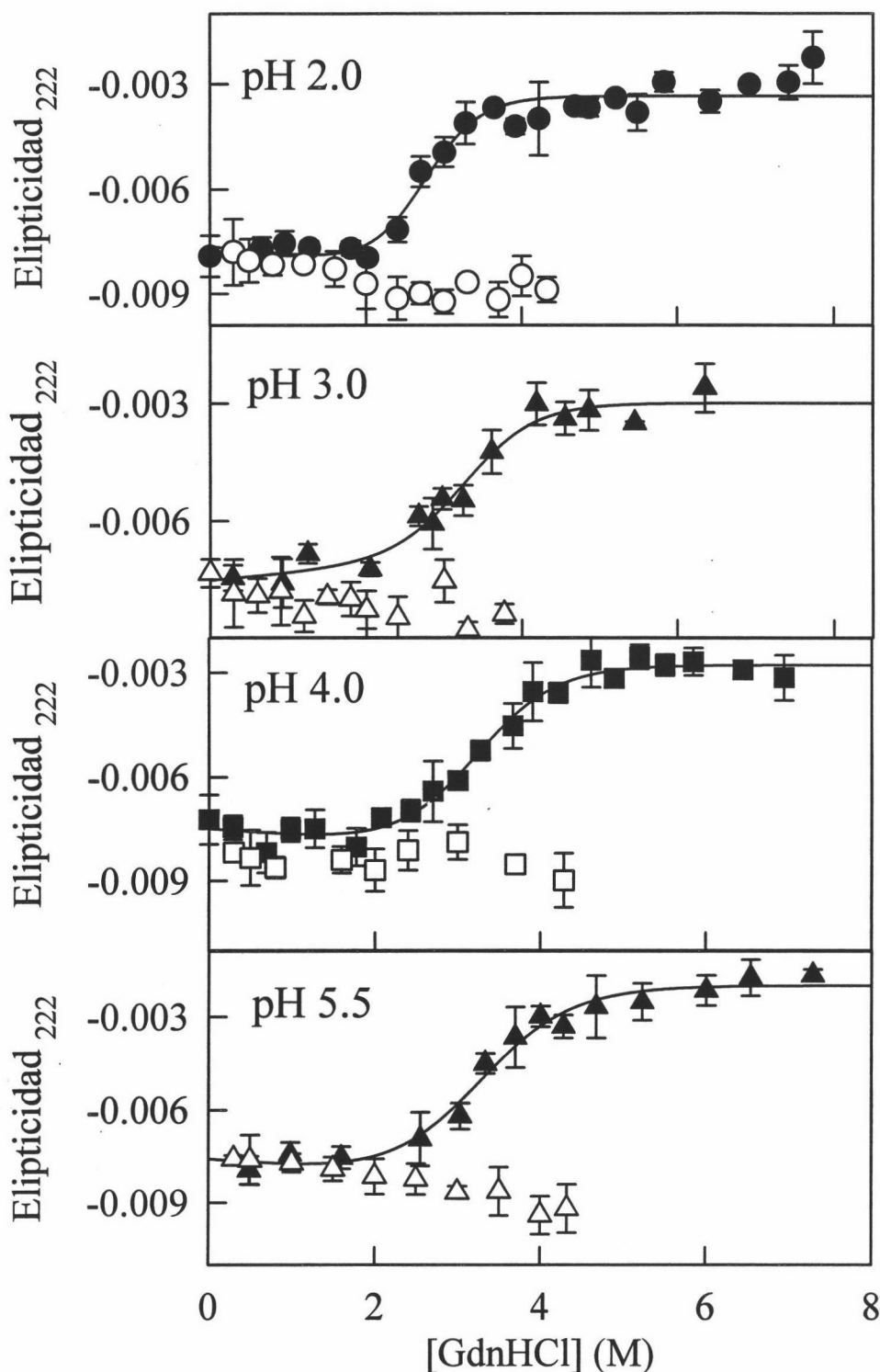


Figura 9: Perfiles correspondientes al cambio de elipticidad a 222 nm en función de la concentración de sal, a pHs 2.0, 3.0, 4.0 y 5.5 para ubiquitina de levadura. Los símbolos rellenos corresponden a experimentos hechos en presencia de guanidina y los huecos con NaCl. En cada caso el valor de θ_{222} resulta de la media de al menos tres espectros. Las barras representan la desviación estándar asociada. Las líneas continuas corresponden al ajuste simultáneo de la ecuación (3.8), considerando ΔG_w lineal con el pH, a los perfiles de desnaturalización inducida por guanidina a los diferentes pHs. En todos los casos la concentración de proteína fue de 0.1 mg/mL y la temperatura 25 °C.

En las Figuras 8 y 9 se observa que el ajuste derivado de este tipo de análisis es bueno en todos los casos. En las siguientes Tablas se recogen los parámetros más significativos obtenidos:

Tabla 2: Valores de $C_{1/2}$, $m_{1/2}$ y ΔG_w correspondientes al equilibrio de desnaturalización de ubiquitina bovina inducido por guanidina, estudiado mediante CD

pH	$C_{1/2}$ (M)	$m_{1/2}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)	ΔG_w ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
2.0	3.74 ± 0.10	6.12 ± 0.99	22.87 ± 4.02
3.0	3.88 ± 0.08	5.64 ± 0.55	21.87 ± 2.29
4.0	3.86 ± 0.10	5.40 ± 0.77	20.79 ± 3.33

Tabla 3: Valores de $C_{1/2}$, $m_{1/2}$ y ΔG_w correspondientes al equilibrio de desnaturalización de ubiquitina de levadura inducido por guanidina, estudiado mediante CD

pH	$C_{1/2}$ (M)	$m_{1/2}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)	ΔG_w ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
2.0	2.73 ± 0.14	7.02 ± 1.51	19.15 ± 4.71
3.0	3.28 ± 0.24	5.42 ± 0.93	17.65 ± 3.14
4.0	3.19 ± 0.15	5.15 ± 0.74	16.39 ± 2.61
5.5	3.22 ± 0.30	4.47 ± 0.99	14.36 ± 4.27

Los errores que aparecen asociados a cada parámetro son los elementos diagonales de la matriz covarianza. Representan un límite inferior de manera que probablemente la incertidumbre asociada a dichos parámetros sea algo mayor.

A partir de la pendiente de la dependencia de ΔG con el pH y según la expresión (7) obtenemos del análisis global un valor de Δv igual a (-0.18 ± 0.50) para ubiquitina bovina y (-0.24 ± 0.35) para la de levadura.

Por último debemos destacar la buena concordancia que existe entre los perfiles de elipticidad obtenidos en presencia de NaCl y de guanidina en el rango de 0-3 M (ver Figuras 8 y 9). El hecho de que no llegue a detectarse en CD ninguna transición a baja concentración de sal confirma la idea de que la aparente transición observada en este rango de concentración en los perfiles de fluorescencia (Figura 5) no se debe a un cambio conformacional sino que es debida al efecto de la sal sobre el pK del grupo que atenúa la fluorescencia de la Tyr 59. Cuando la concentración es lo suficientemente alta entonces sería el efecto desnaturante del catión guanidinio el predominante.

4.3 ESTUDIO DE LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE UBIQUITINA EN PRESENCIA DE GUANIDINA

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido de ubiquitina de eritrocitos bovinos se realizaron utilizando el microcalorímetro modelo **VP-DSC**, que como ya hemos comentado anteriormente es el más moderno de la casa MicroCal, Inc.

Se obtuvieron los termogramas a pH 2, 3 y 4 en presencia de diferentes concentraciones de guanidina en el rango de 0 a 4 M. Los tampones utilizados para dializar la proteína en cada caso (preparados según se indica en la sección 2.2.1.1) fueron 10 mM glicina/HCl (para pH 2 y 3) y 10 mM acetato sódico/ácido acético (para pH 4) siguiendo las condiciones dadas en el trabajo de Wintrode et al. (1994). La disolución concentrada de desnaturante (en torno a 8 M) se preparó según el procedimiento B) descrito en 2.2.1.2.

La velocidad de barrido fue de 1.5 K/min en todos los casos y la concentración de proteína varió entre 1 y 5.2 mg/mL. Para los detalles acerca de la preparación de la experiencia

calorimétrica ver 2.2.2.3 A).

Sistemáticamente se registró un segundo barrido de la muestra inmediatamente después del enfriamiento del primero. Comprobamos que la desnaturalización inducida por temperatura de ubiquitina es altamente reversible en nuestras condiciones de trabajo, incluso cuando el primer barrido finalizaba a 110 °C (en este caso la reversibilidad estaba en torno al 60%).

4.3.1 Análisis de las trazas según el modelo de equilibrio de dos estados: desnaturalización caliente y fría

En el apartado 2.2.2.4 se detalla el proceso de análisis preliminar de los datos obtenidos con el VP-DSC (corrección de línea base instrumental, normalización, corrección dinámica...). En este sentido sólo destacar que en ningún caso corregimos línea base química. La razón es que debido a la gran reproducibilidad de las líneas base instrumentales obtenidas con este calorímetro entendemos que las líneas base de la pre- y post-transición reflejan realmente la capacidad calorífica del estado nativo y desplegado, respectivamente, hecho que se tuvo en cuenta en el procedimiento de análisis.

Todas las trazas se analizaron de acuerdo a un mecanismo de desnaturalización de dos estados (ver sección 2.2.2.5.1) utilizando el programa MLAB.

Como veremos a continuación, a alta concentración de guanidina y en nuestras condiciones de trabajo los termogramas muestran el final de una segunda transición a baja temperatura, indicando que ubiquitina también desnaturaliza por frío. Ya se vio en la sección 2.2.2.5.1 que en general la curva que muestra el cambio de energía de Gibbs en función de la temperatura presenta un máximo cuando $\Delta S=0$ llamado *temperatura de máxima estabilidad*.

Calentando por encima de esta temperatura o enfriando por debajo estaremos desestabilizando la proteína. En la mayoría de los casos la desnaturalización fría no es accesible experimentalmente. Así, para ubiquitina no existen referencias previas en la literatura acerca de la detección experimental de su desnaturalización fría debido a que es una proteína altamente termoestable con una T_m elevada en solución acuosa (ver Tabla 2) y con una T_m^* predicha en estas condiciones claramente por debajo de 0 °C. No obstante, desnaturalizantes como la urea o guanidina van a desplazar la curva de estabilidad hacia valores menores disminuyendo así T_m e incrementado T_m^* (Figura 2.8B); si además los valores para el cambio de entropía y entalpía de desplegamiento cambian de signo en torno a 20 °C (como sugiere el análisis de Wintrode et al. 1994), entonces es posible detectar la desnaturalización fría de ubiquitina a valores por encima de 0 °C.

Según se evidencie una o dos transiciones en el termograma el procedimiento de análisis los perfiles de capacidad calorífica en función de la temperatura varía ligeramente:

-una sola transición correspondiente a la desnaturalización caliente de ubiquitina

El formalismo termodinámico para el ajuste se plantea en términos de T_m (temperatura a la cual $\Delta G=0$) como sigue. La ecuación (2.16) nos da la dependencia de la capacidad calorífica de exceso (tomando el estado nativo de referencia) con T , de manera que si pasamos el término C_p^N al segundo miembro y tenemos en cuenta que

$\partial K/\partial T=K \cdot (\partial \ln K/\partial T)=K \cdot \Delta H/(RT^2)$ resulta:

$$C_p = C_p^N + \frac{K}{(1+K)} \cdot \Delta C_p + \frac{K}{(1+K)^2} \cdot \frac{\Delta H^2}{RT^2} \quad (8)$$

Además consideramos que ΔC_p depende de la temperatura de la forma:

$$\Delta C_p(T) = \Delta C_{p,m} + \alpha \cdot (T - T_m) \quad (9)$$

y sustituyendo esta expresión en (2.18) y (2.19) e integrando obtendremos las dependencias de ΔH y ΔS con la temperatura:

$$\Delta H(T) = \Delta H_m + \Delta C_{p,m} \cdot (T - T_m) \quad (10)$$

$$\Delta S(T) = \frac{\Delta H_m}{T_m} + \Delta C_{p,m} \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \quad (11)$$

Obsérvese que para obtener estas últimas dependencias se ha considerado $\alpha=0$ ya que aunque ΔC_p parece cambiar mucho en rangos pequeños de temperatura en torno a T_m , las extrapolaciones en rangos grandes de temperatura, considerando el cambio de capacidad calorífica lineal con T , pueden conducir a errores importantes en la determinación de ΔH y ΔS si tenemos en cuenta que la línea que determina C_p^D se curva a bajas temperaturas (Makhatadze y Privalov, 1995).

Por último debemos indicar que se ha considerado la capacidad calorífica del estado nativo dependiente linealmente con T :

$$C_p^N = a + b \cdot T \quad (12)$$

Así pues, incluyendo las expresiones (9), (10), (12) en (8) y teniendo en cuenta (3.7) y (2.20) llevamos a cabo el ajuste a nuestros datos experimentales. En total tenemos 6 parámetros ajustables que definen la traza calorimétrica: pendiente y ordenada en el origen para la línea de

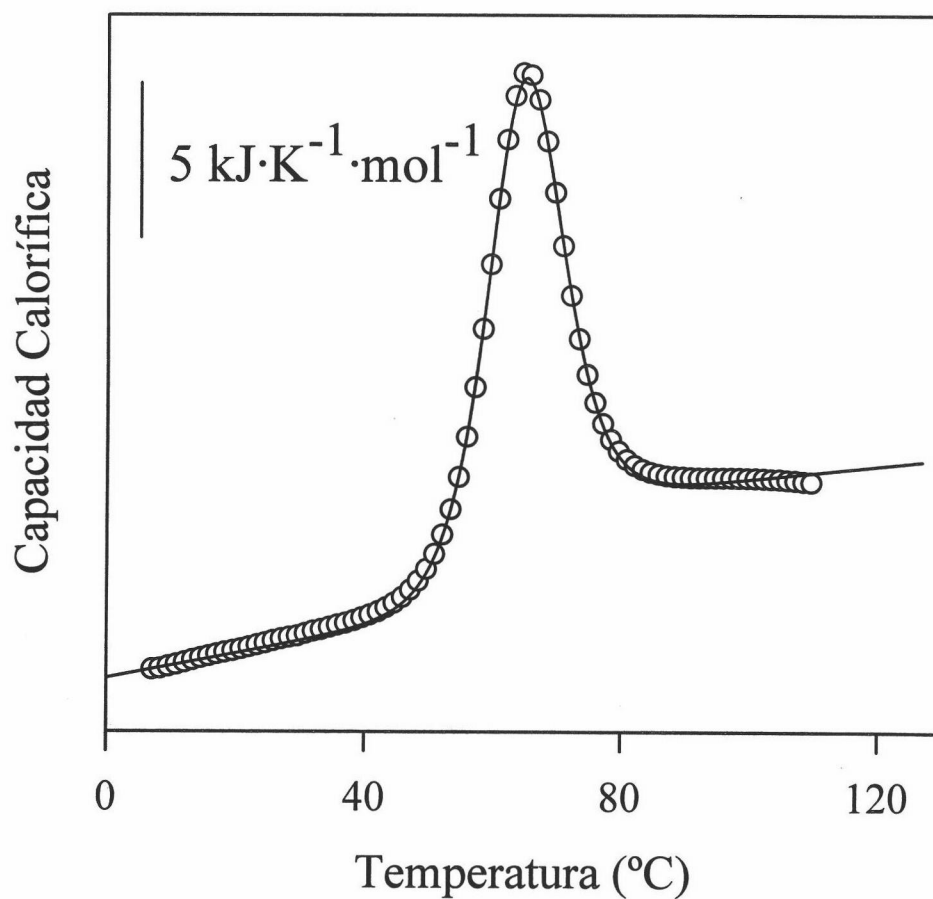


Figura 10: Capacidad calorífica en función de la temperatura correspondiente a lisozima en 0.11 M guanidina, tampón glicina pH 2.0. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y la línea continua representa el ajuste según el modelo de equilibrio de desnaturalización de dos estados a dichos datos. Se observa cómo la línea base que refleja la capacidad calorífica para el estado desplegado, obtenida del ajuste no reproduce adecuadamente la pendiente de los datos experimentales.

capacidad calorífica del nativo, T_m , $\Delta C_{p,m}$, ΔH_m y el parámetro α que da como varía ΔC_p con T .

No obstante, al llevar a cabo este análisis encontramos un problema sistemático a la hora de ajustar la pendiente de la línea base correspondiente a la post-transición; atendiendo al criterio de mínimos cuadrados, el programa lograba un buen ajuste pero no llegaba a fijar correctamente la pendiente (ver Figura 10). Obviamente, una ligera variación en ésta se va a reflejar en un error significativo en la determinación de $\Delta C_{p,m}$ al extrapolar las líneas base de la pre- y post-transición hasta la T_m . Puesto que en general el ajuste del pico calorimétrico era bueno en todos los casos, decidimos salvar este problema calculando nosotros el valor del cambio de capacidad calorífica a la T_m , extrapolando las líneas de capacidad calorífica del estado desplegado y nativo a esta temperatura y midiendo la diferencia entre ambas. Se trata por tanto de un problema relativo al análisis que no hemos resuelto por el momento pero sobre el que pensamos trabajar más adelante.

A continuación mostramos los resultados obtenidos del análisis de las trazas calorimétricas a diferentes pHs y entre 0 y 2 M guanidina:

** pH 2*

Disponemos de dos tandas de experimentos que difieren en la concentración de proteína. Las muestras más concentradas estaban en torno a 4 mg/mL (exceptuando la de 0 M guanidina cuya concentración fue 3 mg/mL) y se recogen en la Figura 11. En la siguiente Tabla se muestran los parámetros más característicos resultado del análisis:

Tabla 4: Parámetros termodinámicos correspondientes a la desnaturalización térmica de ubiquitina bovina en presencia de guanidina, pH 2.0 (concentración de proteína en torno a 4 mg/mL)

[Guanidina] (M)	0	0.11	1.72	2.21
T_m (°C)	55.33±0.02	64.07±0.02	65.61±0.04	59.95±0.05
ΔH_m (kJ·mol ⁻¹)	200.3±0.2	237.5±0.3	203.1±0.4	166.1±0.5
$\Delta C_{p,m}$ (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	3.2	3.5	3.6	5.4

Por otro lado las muestras más diluidas, en torno a 1 mg/mL, se representan en la Figura 12. Los resultados del ajuste fueron:

Tabla 5: Parámetros termodinámicos correspondientes a la desnaturalización térmica de ubiquitina bovina en presencia de guanidina, pH 2.0 (concentración de proteína en torno a 1 mg/mL)

[Guanidina] (M)	0.10	0.24	0.52	0.98	1.51	1.98	2.52
T_m (°C)	63.98 ±0.04	68.59 ±0.05	69.90 ±0.03	69.54 ±0.05	66.79 ±0.04	61.49 ±0.07	57.29 ±0.12
ΔH_m (kJ·mol ⁻¹)	229.9 ±0.5	252.4 ±0.4	247.9 ±0.3	232.1 ±0.5	212.5 ±0.3	173.3 ±0.9	149.7 ±0.9
$\Delta C_{p,m}$ (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	3.31	2.10	4.57	3.83	4.13	4.10	2.35

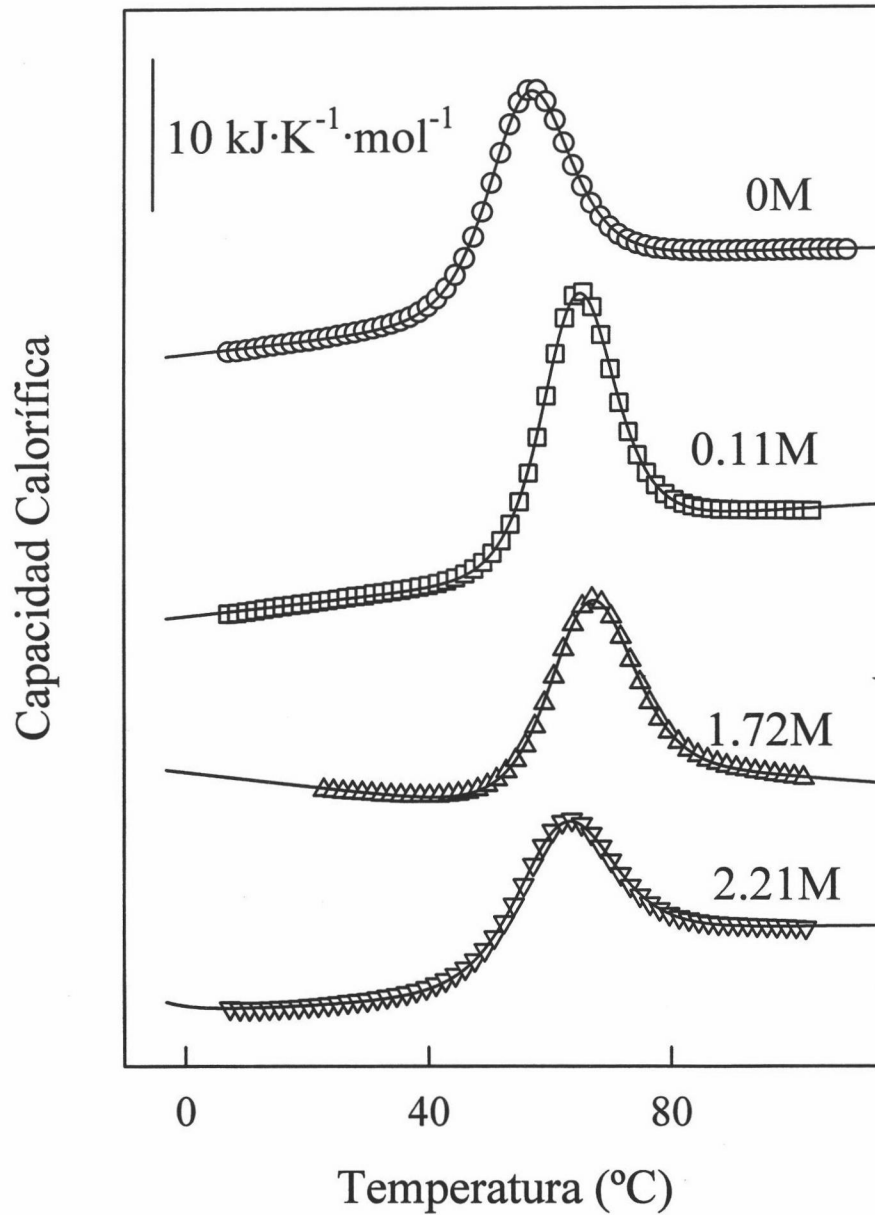


Figura 11: Perfiles de capacidad calorífica versus temperatura obtenidos mediante experimentos de DSC correspondientes al desplegamiento de ubiquitina bovina en tampón glicina 10 mM/HCl, pH 2.0 a las concentraciones de guanidina que se indican en la figura. La concentración de la proteína fue de 4 mg/mL (exceptuando la de 0 M guanidina que se hizo a 3 mg/mL); la velocidad de barrido fue de 1.5 K/min. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas el mejor ajuste del modelo de equilibrio de dos estados a dichos datos (ver texto para más detalles).

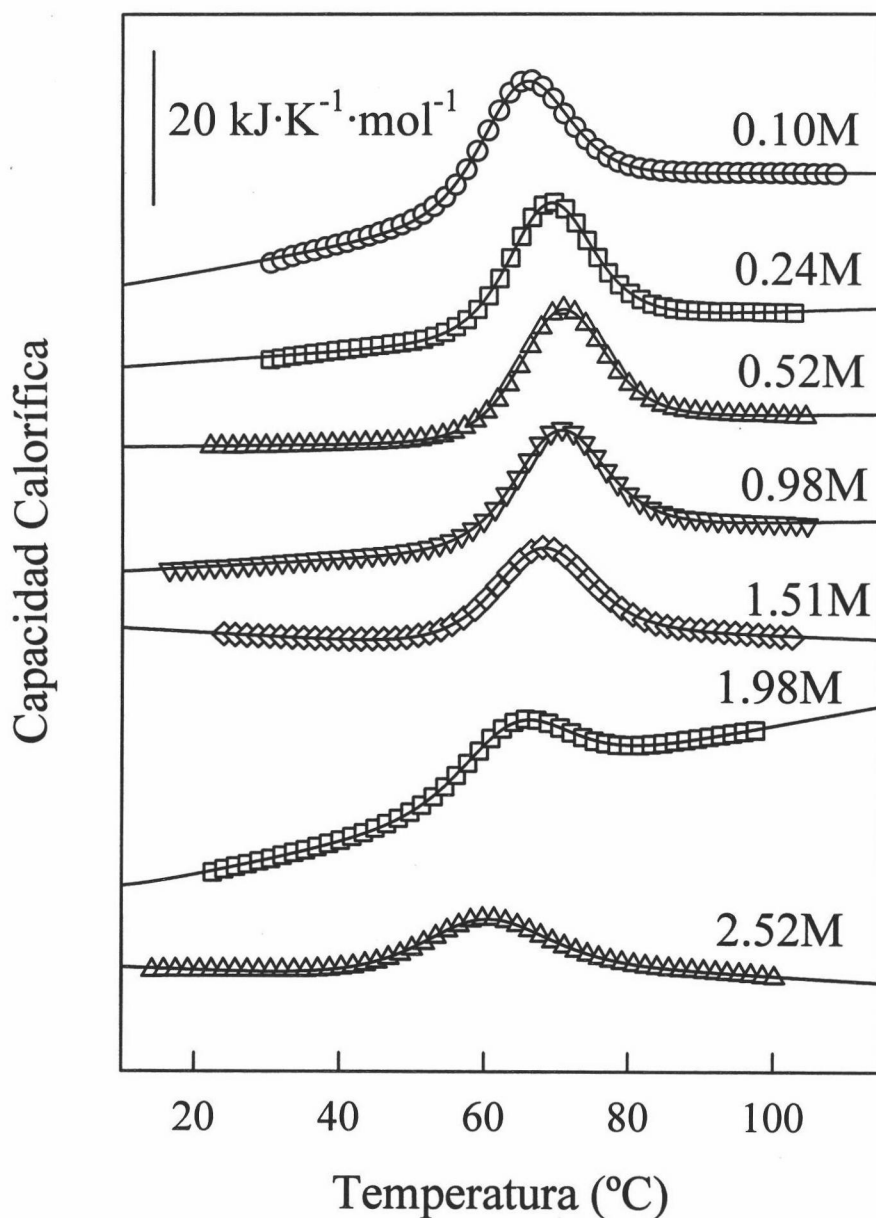


Figura 12: Perfiles de capacidad calorífica versus temperatura obtenidos mediante experimentos de DSC correspondientes al desplegamiento de ubiquitina bovina en tampón glicina 10 mM/HCl, pH 2.0 a las concentraciones de guanidina que se indican en la figura. La concentración de la proteína fue de 1 mg/mL y la velocidad de barrido de 1.5 K/min. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas el mejor ajuste del modelo de equilibrio de dos estados a dichos datos (ver texto para más detalles).

* pH 3

A este pH sólo disponemos del termograma en tampón acuoso. La concentración de proteína en la muestra estaba en torno a 1.4 mg/mL. El resultado del análisis según el modelo de dos estados fue muy bueno como se observa en la Figura 13:

$$T_m = (73.32 \pm 0.2) \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\Delta H_m = (253.8 \pm 0.4) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$\Delta C_{p,m} = (2.54 \pm 0.07) \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$$

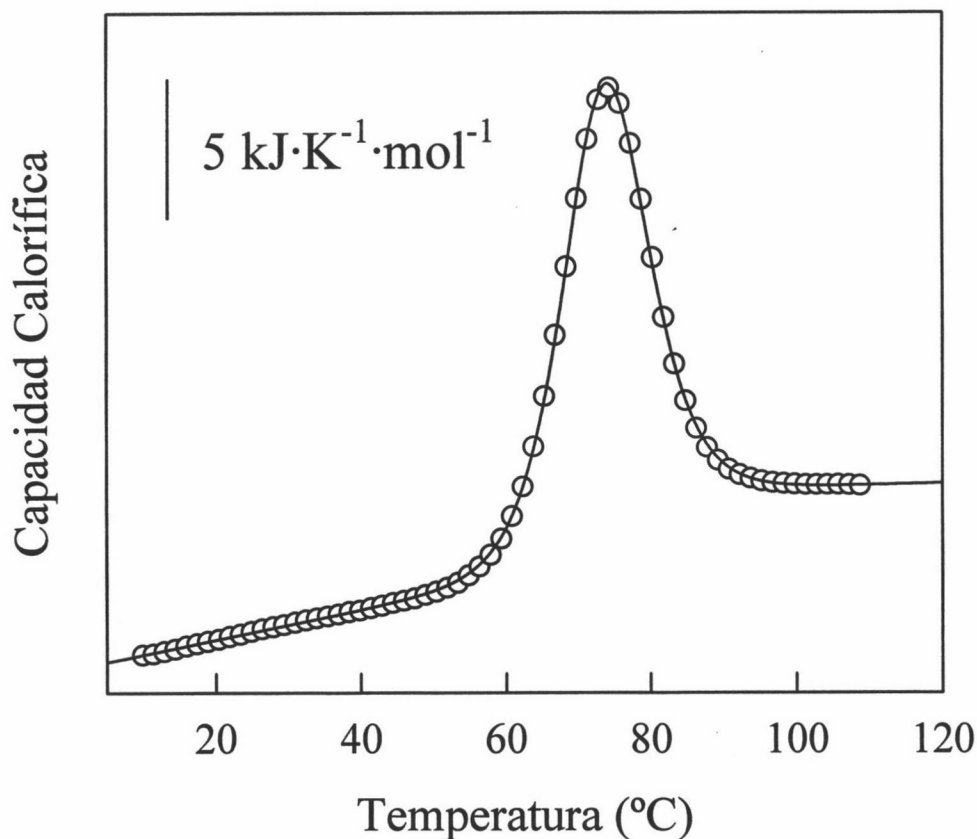


Figura 13: Dependencia de la capacidad calorífica con la temperatura de ubiquitina bovina en tampón glicina 10mM/HCl pH 3.0. La concentración de proteína fue de 1.4 mg/mL y la velocidad de barrido 1.5 K/min. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas el mejor ajuste del modelo de equilibrio de dos estados a dichos datos (ver texto para más detalles).

* pH 4

La concentración de proteína en estos experimentos estuvo en torno a los 2 mg/mL.

En la Figura 14 se representan los perfiles de C_p versus T siendo los ajustes excelentes en todos los casos. A continuación mostramos los parámetros más característicos obtenidos:

Tabla 6: Parámetros termodinámicos correspondientes a la desnaturalización térmica de ubiquitina bovina en presencia de guanidina, pH 4.0

[Guanidina] (M)	0	0.52	1.01	2.04
T_m (°C)	90.00±0.01	84.38±0.01	80.92±0.02	71.71±0.04
ΔH_m (kJ·mol ⁻¹)	296.5±0.1	284.1±0.1	260.7±0.2	204.8±0.3
$\Delta C_{p,m}$ (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	2.94	3.82	3.23	3.58

- dos transiciones correspondientes a las desnaturalizaciones caliente y fría

En los casos en los que en la traza exista evidencia de desnaturalización fría no resulta muy correcto plantear el análisis en términos de T_m ya que es posible que este parámetro no tenga significado físico. Es decir, puede ocurrir que la curva de estabilidad de la proteína en esas condiciones no llegue a cortar la línea de $\Delta G=0$, adoptando valores negativos en todo el rango de temperaturas, con lo que T_m no existiría. Por tanto hemos planteado el análisis de dichas trazas en términos de la temperatura de inversión de la entropía (T_s) considerando además $\Delta C_{p,s}$ independiente de la temperatura de manera que las dependencias de ΔH y ΔS con la temperatura resultan:

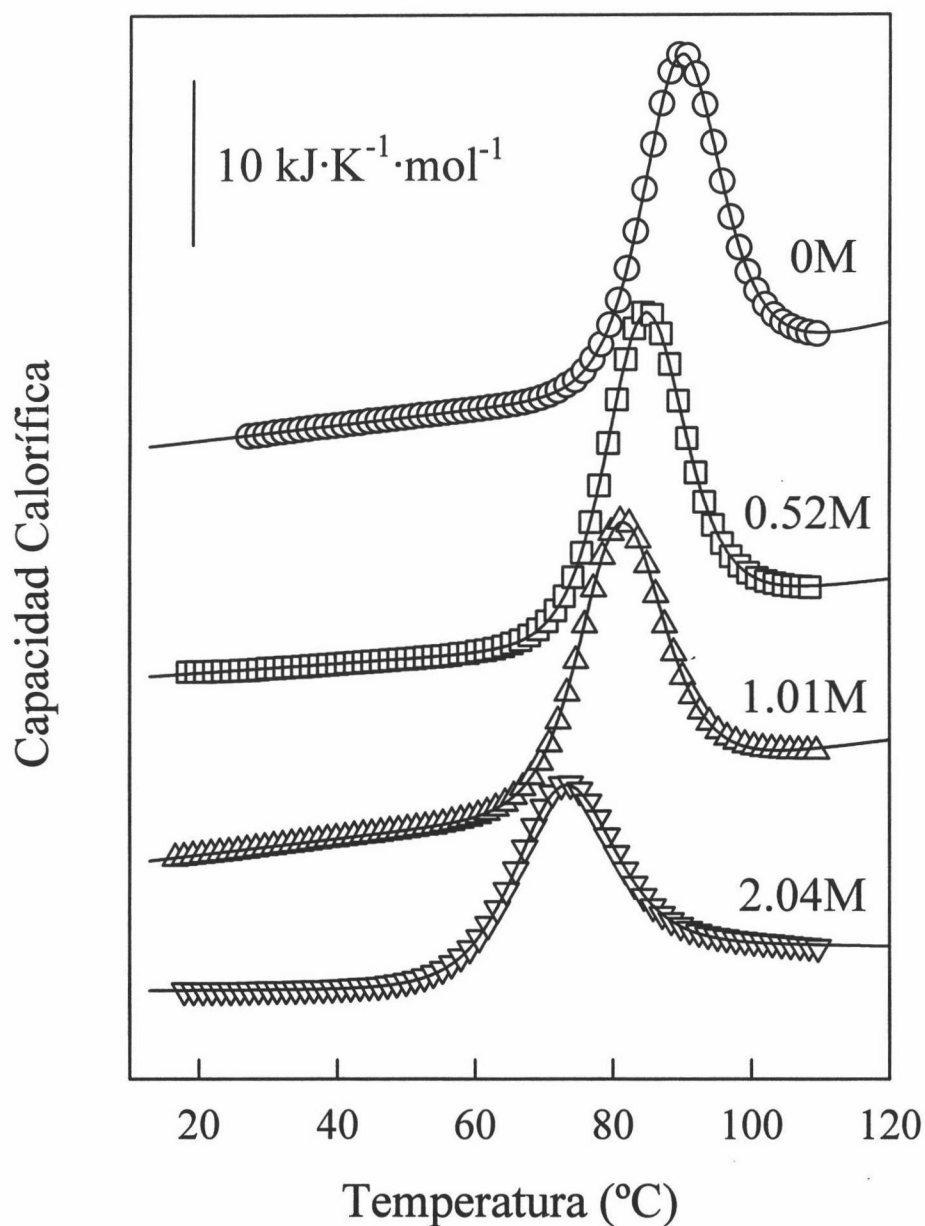


Figura 14: Perfiles de capacidad calorífica versus temperatura obtenidos mediante experimentos de DSC correspondientes al desplegamiento de ubiquitina bovina en tampón acetato sódico 10mM/acético, pH 4.0 a las concentraciones de guanidina que se indican en la figura. La concentración de la proteína fue de 2 mg/mL y la velocidad de barrido de 1.5 K/min. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas el mejor ajuste del modelo de equilibrio de dos estados a dichos datos (ver texto para más detalles).

$$\Delta H(T) = \Delta H_S + \Delta C_{p,S} \cdot (T - T_s) \quad (13)$$

$$\Delta S(T) = \Delta C_{p,S} \cdot \ln\left(\frac{T}{T_s}\right) \quad (14)$$

Dado que no existe información experimental directa sobre C_p^N , escribimos:

$$C_p^N = C_p^D - \Delta C_{p,S} \quad (15)$$

y si consideramos lineal con T la capacidad calorífica correspondiente al estado desplegado:

$$C_p^D = a + b \cdot T \quad (16)$$

Así pues tenemos 5 parámetros ajustables: la pendiente y ordenada en el origen de la línea de C_p^D , T_s , ΔH_S y $\Delta C_{p,S}$ que definen la traza calorimétrica. En los casos en los que se evidencia desnaturalización fría $\Delta C_{p,S}$ va a estar muy bien determinado a partir del ajuste.

A continuación mostramos los resultados de los análisis de las trazas calorimétricas en las que se evidencia desnaturalización fría (en el rango de 3 a 4 M guanidina, aproximadamente):

* pH 2

La concentración de proteína fue de 4 mg/mL. En la Figura 15 se muestran los ajustes a cada traza. Como se observa fueron excelentes en todos los casos, apoyando así el modelo de desnaturalización de dos estados propuesto originalmente:

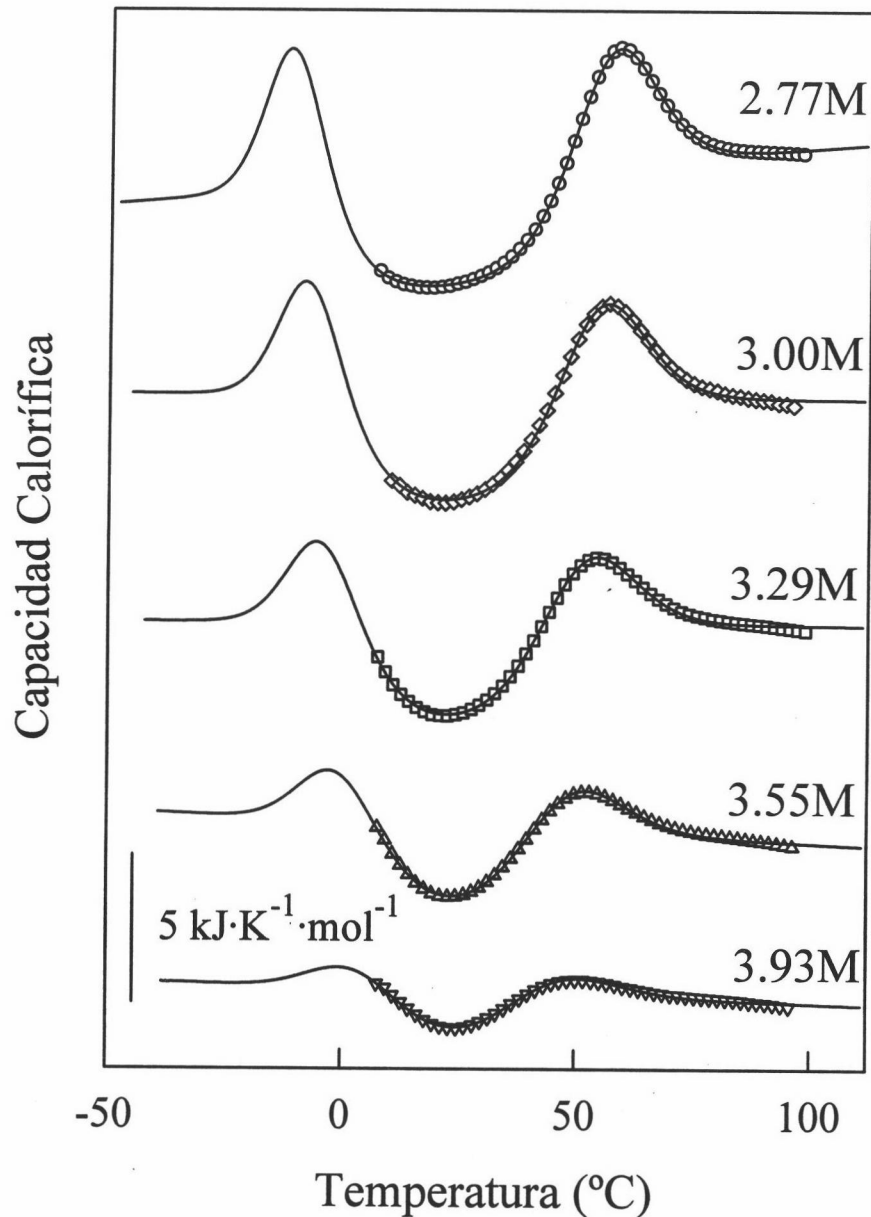


Figura 15: Dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica de ubiquitina bovina en tampón glicina 10 mM/HCl, pH 2.0 a las concentraciones de guanidina que se indican en la figura. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas el mejor ajuste del modelo de equilibrio de dos estados a dichos datos (ver texto para más detalles). Se ha representado el pico completo debido a la desnaturalización fría con propósitos ilustrativos.

Tabla 7: Parámetros termodinámicos correspondientes a la desnaturalización térmica de ubiquitina bovina en presencia de guanidina, pH 2.0. Evidencia de desnaturalización fría.

[Guanidina] (M)	2.77	3.00	3.29	3.55	3.93
T_s (°C)	21.94	22.73	23.04	23.30	23.42
	±0.02	±0.04	±0.01	±0.02	±0.03
ΔH_s (kJ·mol ⁻¹)	6.02	4.52	2.86	0.84	-1.93
	±0.03	±0.05	±0.02	±0.02	±0.03
$\Delta C_{p,s}$ (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	3.98	4.10	4.08	4.06	3.90
	±0.05	±0.01	±0.05	±0.01	±0.02

* pH 4

En estos experimentos la concentración de proteína estuvo en torno a los 2 mg/mL, exceptuando la traza a 3.82 M guanidina en la que la proteína estaba a 5.2 mg/mL. En la Figura 16 se representan los ajustes a las trazas. Los parámetros obtenidos son:

Tabla 8: Parámetros termodinámicos correspondientes a la desnaturalización térmica de ubiquitina bovina en presencia de guanidina, pH 4.0. Evidencia de desnaturalización fría.

[Guanidina] (M)	3.00	3.50	3.82
T_s (°C)	25.23±0.04	26.32±0.01	27.24±0.02
ΔH_s (kJ·mol ⁻¹)	6.66±0.06	2.98±0.02	0.03±0.02
$\Delta C_{p,s}$ (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	3.93±0.01	4.13±0.01	4.16±0.01

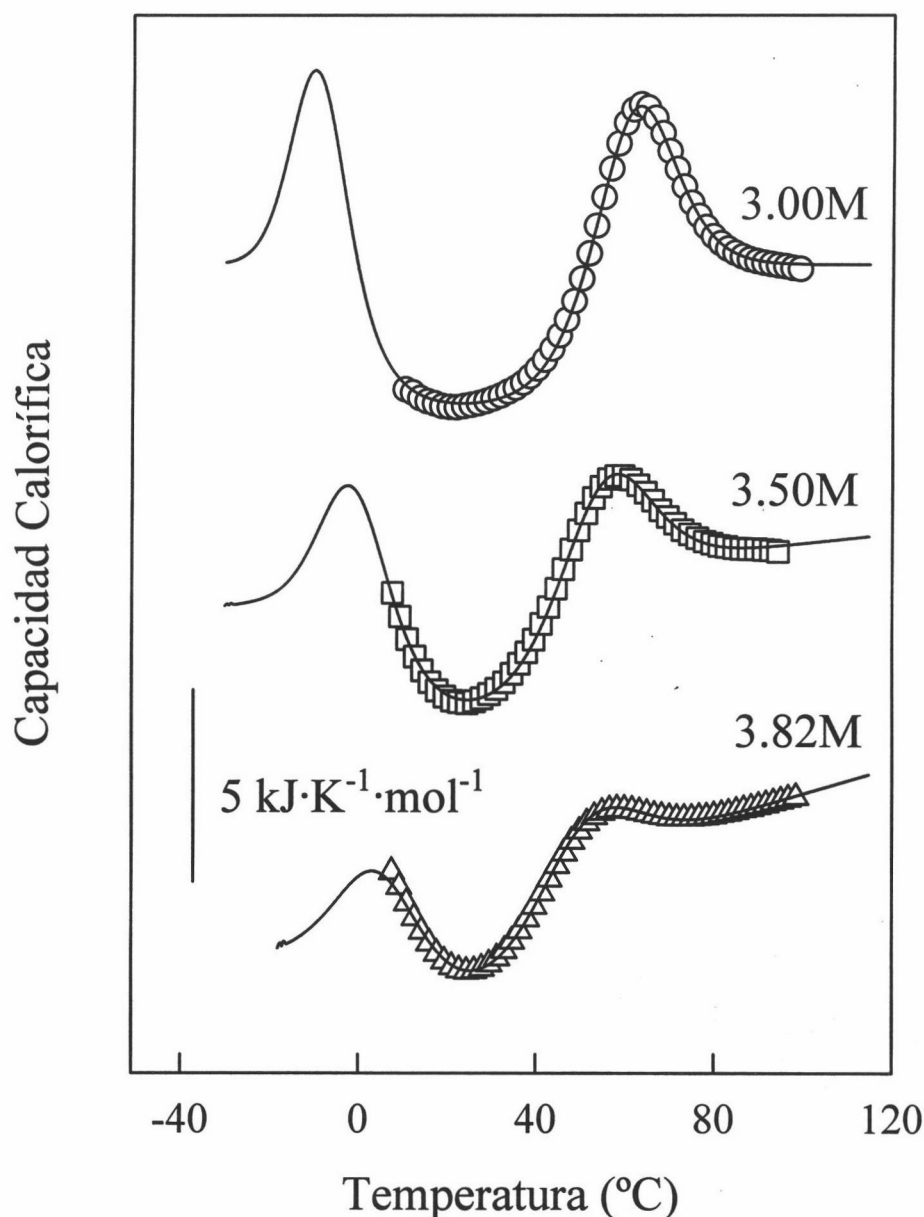


Figura 16: Dependencia con la temperatura de la capacidad calorífica de ubiquitina bovina en tampón acetato sódico 10 mM/acético, pH 4.0 a las concentraciones de guanidina que se indican en la figura. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas el mejor ajuste del modelo de equilibrio de dos estados a dichos datos (ver texto para más detalles). Se ha representado el pico completo debido a la desnaturalización fría con propósitos ilustrativos. La concentración de proteína fue de 2 mg/mL (exceptuando la traza obtenida a 3.82 M guanidina en la que la concentración fue de 5.2 mg/mL) y la velocidad de barrido 1.5 K/min.

4.3.2 Efecto de la guanidina sobre los valores del cambio de entalpía y de capacidad calorífica de desnaturalización. Cálculo de curvas de estabilidad a diferentes concentraciones de desnaturalizante.

En la Figura 17A hemos representado los valores para el cambio de entalpía de desnaturalización correspondientes a las trazas obtenidas a pH 4 a diferentes concentraciones de guanidina, en función de la temperatura; es importante señalar que dichos valores corresponden a diferentes temperaturas y diferentes concentraciones de guanidina. Además hemos representado en la misma figura los datos de ΔH versus T publicados por Wintrode et al. (1994), a 0 M guanidina, obtenidos de experimentos de DSC a diferentes pHs. Como se observa en la Figura 17A para una temperatura dada en el rango de 60 a 80 °C, ΔH determinado en presencia de guanidina es menor que aquel obtenido en su ausencia. Este resultado es consistente con los cambios de entalpía negativa asociados a la interacción del cloruro de guanidinio con proteínas (Makhatadze y Privalov, 1992).

Encontramos un resultado similar al representar los valores del cambio de entalpía de desnaturalización obtenidos para las trazas a pH 2 (ver Figura 17B). Vemos como los valores correspondientes a concentraciones hasta aproximadamente 1 M guanidina concuerdan bastante bien con los datos de Wintrode et al. (1994) a diferentes pHs. Sin embargo, a concentraciones mayores de guanidina empieza a ser importante el efecto de ésta y los valores de ΔH disminuyen (debido a la interacción de la guanidina con la proteína) hasta confluir en la línea determinada por los valores a pH 4.0.

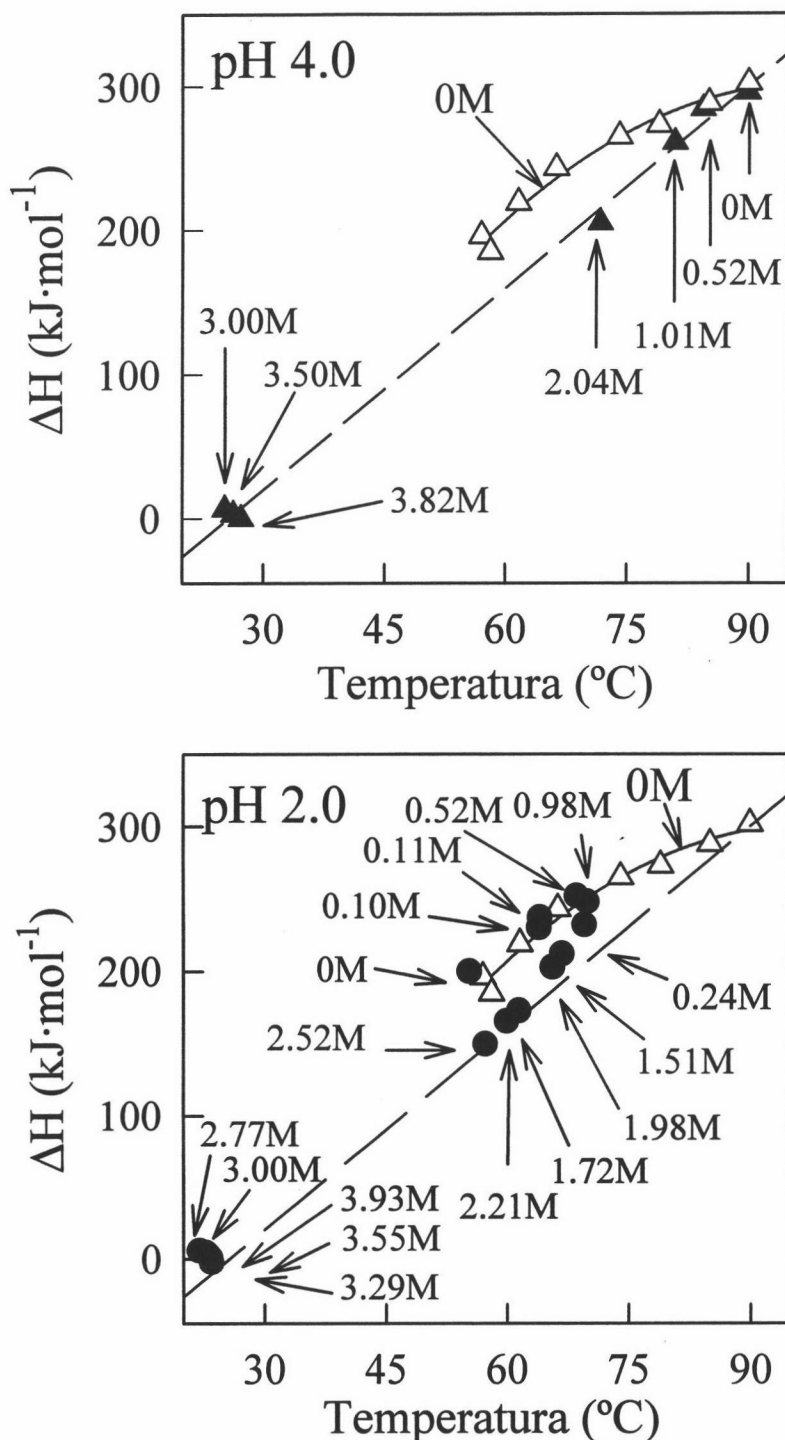


Figura 17: Dependencia con la temperatura de ΔH de desplegamiento de ubiquitina bovina, a pH 4.0 (gráfica superior) y 2.0 (gráfica inferior). En ambos casos los símbolos huecos representan datos tomados del estudio calorimétrico de Wintrade et al. (1994) a diferentes pHs en tampón acuoso; los símbolos rellenos corresponden a los datos obtenidos de nuestros experimentos de DSC en presencia de diferentes concentraciones de guanidina (mostradas en la Figura). La línea continua es el mejor ajuste de un polinomio cuadrático a los datos de Wintrade et al. (1994) y la línea discontinua representa el ajuste lineal a nuestros datos a pH 4.0. Vemos cómo esta dependencia describe adecuadamente nuestros datos a pH 2.0 a concentraciones superiores a 1.5 M guanidina.

Los valores para el cambio de capacidad calorífica de desplegamiento derivados de nuestros experimentos de DSC a pH 2 y 4 se recogen en la Figura 18; de nuevo debemos destacar que corresponden a diferentes temperaturas y concentración de guanidina. También hemos incluido la dependencia con la temperatura del cambio de capacidad calorífica a 0 M guanidina publicada por Wintrode et al. (1994) y calculada como:

$$\Delta C_p = C_p^D - C_p^N \quad (17)$$

en donde C_p^N se ha extrapolado linealmente a partir de datos a baja temperatura cuando no se dispone de datos experimentales y C_p^D se ha obtenido a partir de la composición de aminoácidos de ubiquitina como:

$$C_p^D = (N-1) \cdot C_p(-CHCONH) + \sum_{i=1}^N C_p(-R_i) \quad (18)$$

donde N es el número de aminoácidos, $C_p(-CHCONH-)$ representa la contribución a la capacidad calorífica de la unidad peptídica y $C_p(-R_i)$ la contribución de la cadena lateral del residuo i (Makhatadze y Privalov, 1980). Obviamente los valores para ΔC_p obtenidos haciendo uso de las ecuaciones (17) y (18) deben interpretarse como valores correspondientes al desplegamiento *completo* de la proteína en 0 M guanidina. La comparación que se muestra en la Figura 18 indica que a concentraciones menores a 2 M y en el rango de temperatura de 70 a 90 °C aproximadamente, no hay un efecto significativo de la concentración de guanidina en ΔC_p de manera que se observa una buena concordancia entre nuestros datos experimentales (a diferentes concentraciones de guanidina) y los valores calculados (a 0 M guanidina) usando las ecuaciones (17) y (18). Por otro lado nuestros datos de ΔC_p a concentraciones mayores de guanidina y en

torno a 25 °C (es decir, los valores de unos 4 kJ·K⁻¹·mol⁻¹ derivados del análisis de los termogramas de DSC en los que había evidencias de desnaturalización por frío) son significativamente menores a los calculados (en torno a 6 kJ·K⁻¹·mol⁻¹; ver Figura 18). Este es un resultado sorprendente ya que existen evidencias del comportamiento contrario según los estudios calorimétricos sobre la interacción de urea y guanidina con varias proteínas globulares publicados por Makhatadze y Privalov, (1992). Estos autores señalaron que la presencia de desnaturalizantes aumenta la capacidad calorífica parcial de las proteínas, especialmente la del estado desplegado debido al efecto de solvatación del desnaturalizante (Pfeil y Privalov, 1976). No obstante debemos subrayar que los experimentos de DSC de Makhatadze y Privalov (1992) expanden el rango de concentración de desnaturalizante de 0 a 2 M mientras que la discrepancia mostrada en la Figura 18 se observa a concentraciones de guanidina en torno a 3 M y mayores. La diferencia encontrada (unos 2 kJ·K⁻¹·mol⁻¹) difícilmente puede ser atribuida a una incertidumbre experimental asociada a la determinación de ΔC_p a partir de termogramas de DSC o a distorsiones causadas por velocidades bajas de plegamiento-desplegamiento a altas concentraciones de guanidina. Así en cuanto a la primera de las opciones, es de esperar que los valores de ΔC_p determinados a partir de termogramas en los que es aparente la desnaturalización fría sean muy precisos. De hecho si fijamos en la rutina de análisis $\Delta C_p=6$ kJ·K⁻¹·mol⁻¹ el ajuste a un modelo de dos estados no es bueno. Respecto a la segunda opción, como ya comentamos anteriormente, las cinéticas de plegamiento-desplegamiento de ubiquitina en presencia de altas concentraciones de guanidina son rápidas de manera que para su estudio es necesario disponer de técnicas de stopped-flow (Khorasanizadeh et al., 1993). Creemos que la explicación más simple para la diferencia encontrada en valores de ΔC_p sería que, a alta concentración de guanidina y temperatura ambiente los residuos de la cadena polipeptídica no estén totalmente expuestos al

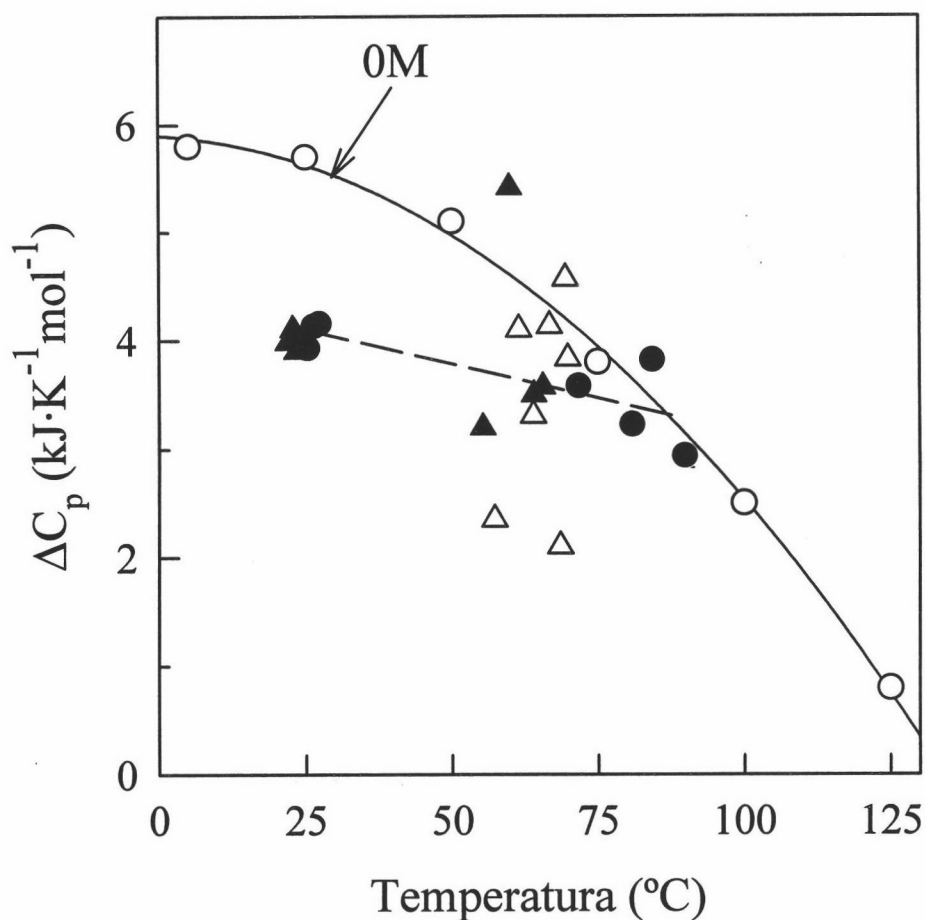


Figura 18: Efecto de la temperatura sobre los valores de ΔC_p de desnaturalización de ubiquitina bovina. El significado de los símbolos es el siguiente: (O) datos tomados del estudio calorimétrico de Wintrode et al. (1994) a diferentes pHs en tampón acuoso, (●) datos obtenidos de nuestros experimentos calorimétricos a pH 4.0 y diferentes concentraciones de guanidina, (▲) datos obtenidos de nuestros experimentos calorimétricos a pH 2.0, concentración de proteína en torno a 4 mg/mL y diferentes concentraciones de guanidina, (Δ) datos obtenidos de nuestros experimentos calorimétricos a pH 2.0, concentración de proteína en torno a 1 mg/mL y diferentes concentraciones de guanidina. La línea continua es el mejor ajuste de un polinomio cuadrático a los datos de Wintrode et al. (1994) y la línea discontinua representa el ajuste lineal a todos nuestros datos de ΔC_p (pH 2.0 y 4.0).

disolvente en el estado desplegado, reflejando quizás una restricción conformacional como consecuencia de la “unión” de moléculas de desnaturizante (Makhatadze y Privalov, 1992).

Por supuesto es posible proponer otras explicaciones plausibles; así el menor valor de ΔC_p encontrado en presencia de guanidina podría resultar de una alteración inducida por la misma guanidina en las propiedades termodinámicas del agua que determinan la interacción hidrofóbica. También debemos tener en cuenta la posibilidad de que el menor valor de ΔC_p obtenido sea un artefacto debido a desviaciones del mecanismo de dos estados en la desnaturización fría (sólo detectamos parte de la transición: ver Figura 15 para pH 2 y Figura 16 para pH 4).

Hemos calculado las curvas de estabilidad (ΔG versus T) para las diversas concentraciones de guanidina estudiadas a pH 2 y 4 usando:

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \cdot \frac{T_m - T}{T_m} + \int_{T_m}^T \Delta C_p \cdot dT - T \cdot \int_{T_m}^T \Delta C_p \cdot \frac{dT}{T} \quad (19)$$

para las trazas en las que sólo se detecta desnaturización caliente, y

$$\Delta G(T) = \Delta H_s + \int_{T_s}^T \Delta C_p \cdot dT - T \cdot \int_{T_s}^T \Delta C_p \cdot \frac{dT}{T} \quad (20)$$

cuando se evidencia la desnaturización fría. En principio la aplicación de las ecuaciones (15) y (16) requiere el conocimiento de la dependencia con la temperatura de ΔC_p a cada concentración de desnaturizante, mientras que nuestros valores de ΔC_p corresponden a una concentración de guanidina dada para cada temperatura (ver Figura 18). Para el cálculo del cambio de energía de Gibbs [ecuaciones (19) y (20)] hemos supuesto que el ajuste lineal a

nuestros datos de ΔC_p versus T_m (ver Figura 18) puede ser tomado como la dependencia con la temperatura de ΔC_p a todas las concentraciones de guanidina:

$$\Delta C_p(T) = 7.857 - 0.0126 \cdot T \quad (21)$$

donde la temperatura va expresada en K y ΔC_p en $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Los perfiles resultantes de ΔG versus temperatura a pH 2 y 4 se muestran en la Figuras 19 y 20, respectivamente; a pH 4 vemos claramente el efecto desestabilizante de la guanidina al desplazar la curva de estabilidad hacia valores menores de energía de Gibbs. Curiosamente a pH 2 y baja concentración de guanidina se observa un efecto estabilizante de ésta, desplazando la T_m hacia valores mayores (ver Figura 19).

Ya vimos en la sección 2.2.2.5 cómo algunos de los parámetros característicos de la curva de estabilidad de una proteína son las temperaturas de inversión de la entropía y entalpía (T_S y T_H) además de T_m y T_m^* . En la Figura 21 hemos representado los valores de estos cuatro parámetros correspondientes a la desnaturalización térmica de ubiquitina en presencia de diferentes concentraciones de guanidina a pH 4. T_m y T_m^* se han obtenido del corte de las diferentes curvas de estabilidad con la línea de $\Delta G=0$ y T_S de la representación de ΔS versus T . Por último para obtener la expresión que nos da T_H basta sustituir $T=T_H$ en la ecuación (13):

$$\Delta H_H = \Delta H_S + \Delta C_{p,S} \cdot (T_H - T_S) \quad (22)$$

y teniendo en cuenta que a la T_H , ΔH se hace cero entonces resulta que:

$$T_H = T_S - \frac{\Delta H_S}{\Delta C_{p,S}} \quad (23)$$

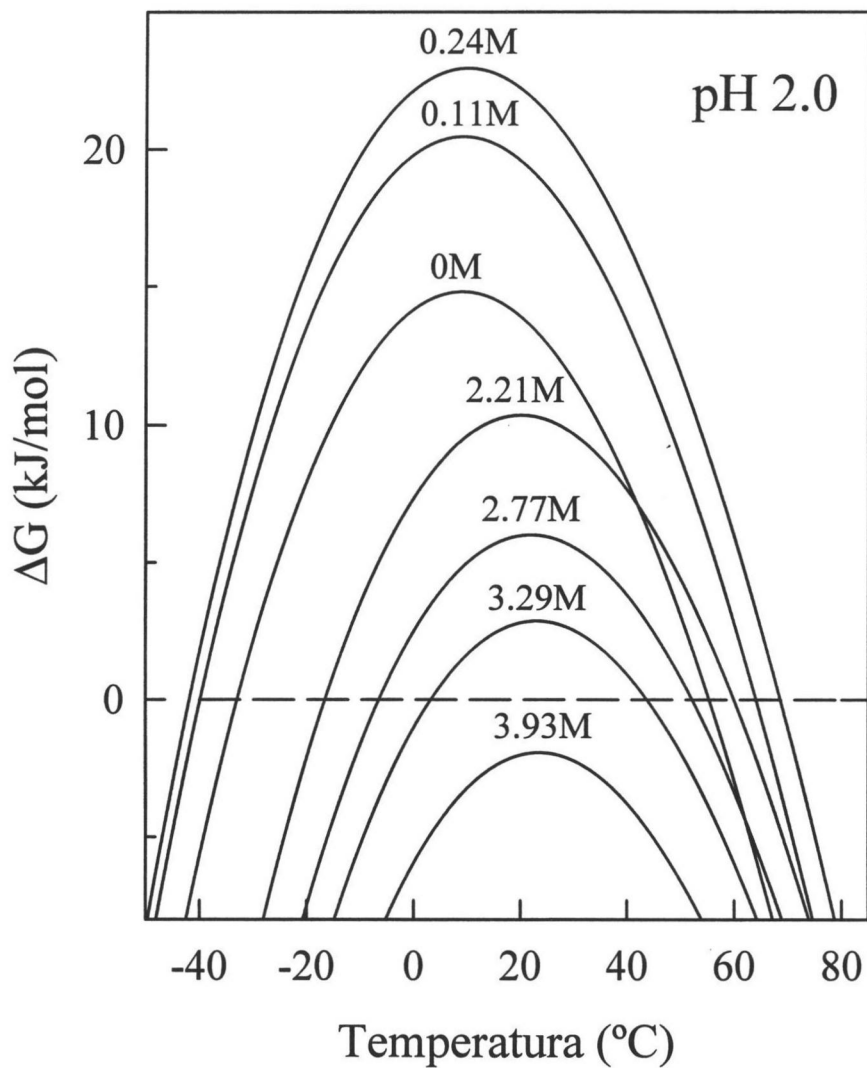


Figura 19: Curvas de estabilidad correspondientes a ubiquitina bovina en tampón glicina 10 mM/HCl pH 2.0 y diferentes concentraciones de guanidina (se indican en la Figura), calculadas a partir de las expresiones (20) o (19) según se evidencie o no la desnaturalización fría, respectivamente (ver Figuras 11, 12 y 15). La dependencia de ΔC_p con la temperatura viene dada por la ecuación (21). Se observa un efecto estabilizante de la guanidina a baja concentración.

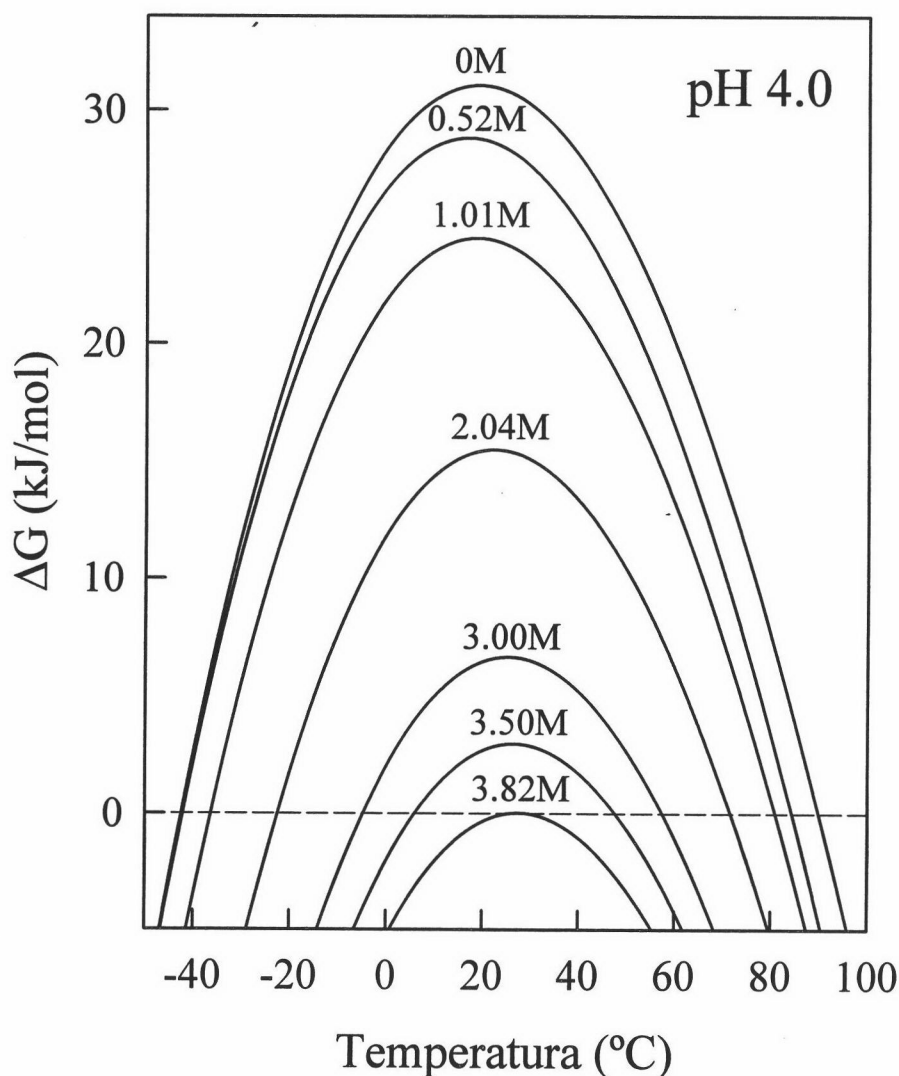


Figura 20: Efecto de la concentración de guanidina en la curva de estabilidad de ubiquitina bovina en tampón acetato sódico 10 mM/acético pH 4.0. Se observa cómo al aumentar la concentración de desnaturizante la curva se desplaza hacia valores de ΔG menores, indicando que la proteína es menos estable en esas condiciones. Las diferentes curvas de estabilidad fueron calculadas haciendo uso de las expresiones (20) o (19) según se evidencie o no la desnaturización fría, respectivamente (ver Figuras 14 y 16). La dependencia de ΔC_p con la temperatura viene dada por la ecuación (21).

Estrictamente aquí se está considerando ΔC_p constante con la temperatura. Esto es una aproximación bastante razonable dado que T_H y T_S son valores muy próximos y por tanto la extrapolación es muy corta. Según se ve en la Figura 21 no se observa un efecto significativo de concentración de guanidina en la temperatura de inversión de la entropía (T_S).

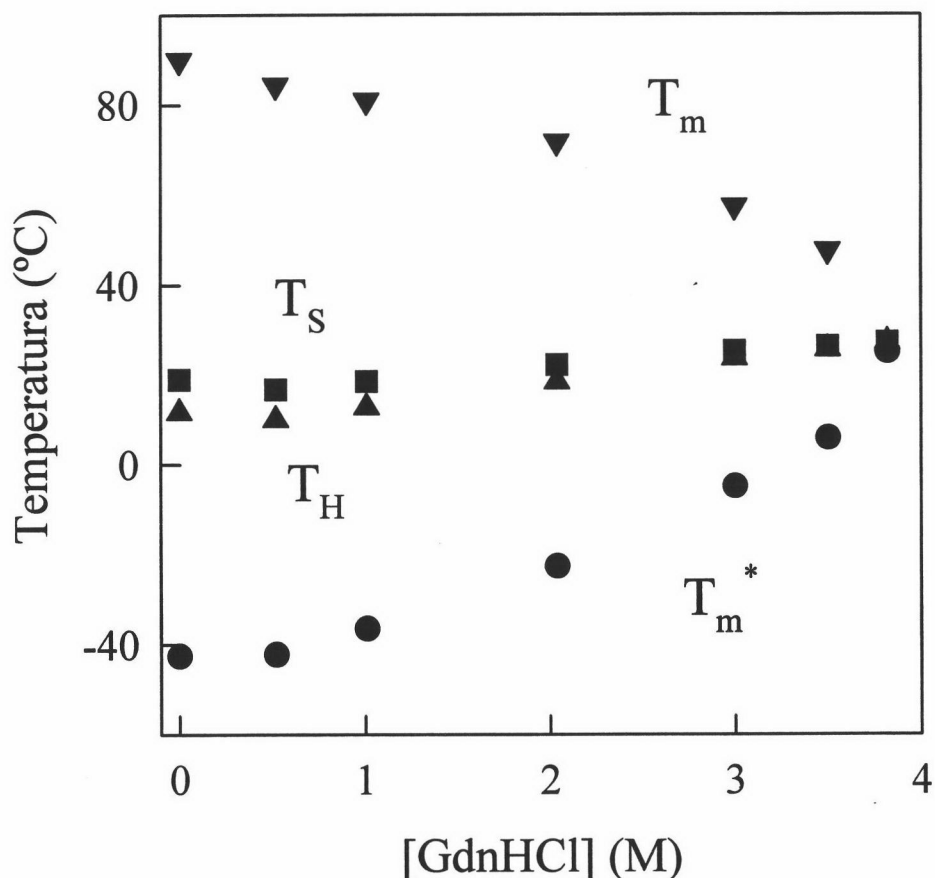


Figura 21: Variación de las temperaturas de desnaturalización caliente (T_m), de desnaturalización fría (T_m^*), de inversión de la entalpía (T_H) y de la entropía (T_S) con la concentración de guanidina, para ubiquitina en tampón acetato, pH 4.0. T_m , T_m^* y T_S se obtuvieron a partir de los puntos de corte de la correspondiente curva de estabilidad (ver Figura 20) con la línea de $\Delta G=0$ y del máximo de dicha curva, respectivamente; para el cálculo de T_H a cada concentración de guanidina se hizo uso de la expresión (23).

4.3.3 Dependencia de $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ con la concentración de guanidina. Cálculo de $m_{1/2}$

Hemos calculado los valores para el cambio de energía de Gibbs a 25 °C correspondientes a diferentes concentraciones de guanidina a pH 2 y 4. Haciendo uso de los valores de ΔH_m y T_m o ΔH_s y T_s resultado de los análisis de las correspondientes trazas calorimétricas (ver Tablas 4-8) y de la dependencia de ΔC_p con la temperatura dada por la expresión (21), hemos integrado las expresiones (19) y (20) entre 298.145 K y T_m o T_s obteniendo los valores que se recogen en la Figura 22A.

Para pH 4 vemos como la dependencia de ΔG con la concentración de desnaturizante es aproximadamente lineal en todo el rango de concentración, obteniéndose un valor para $m_{1/2}$ de $8.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ que coincide bastante bien con el determinado mediante medidas de fluorescencia y dicroísmo circular (Figura 23). No obstante para pH 2 la situación es diferente. Así, vemos como ΔG varía linealmente con C en el rango de 1-4 M mientras que por debajo de 1 M ocurren desviaciones fuertes de dicha linealidad hacia valores menores de energía de Gibbs. En este caso pues la aplicación de LEM conduciría a una sobre estimación del valor de ΔG_w .

Para ilustrar la dependencia encontrada del cambio de energía de Gibbs con la concentración de desnaturizante hemos calculado los valores de $m_{1/2}$ a cada concentración de guanidina estudiada haciendo uso de la expresión (3.23). Para las trazas en las que se evidencia la desnaturalización fría, T_m se determinó a partir de la curva de estabilidad correspondiente [considerando la expresión (21) que da la dependencia de ΔC_p con la temperatura] y ΔH_m de la dependencia lineal que se observa en la Figura 17. Claramente observamos en la Figura 22B cómo el perfil de $m_{1/2}$ correspondiente a pH 4 permanece plano en todo el rango de concentración, indicando que ΔG es lineal con la concentración de guanidina. Por otro lado vemos como a pH 2, $m_{1/2}$ permanece constante hasta aproximadamente 1 M y disminuye bruscamente a

concentraciones menores reflejando una dependencia no lineal de ΔG con C .

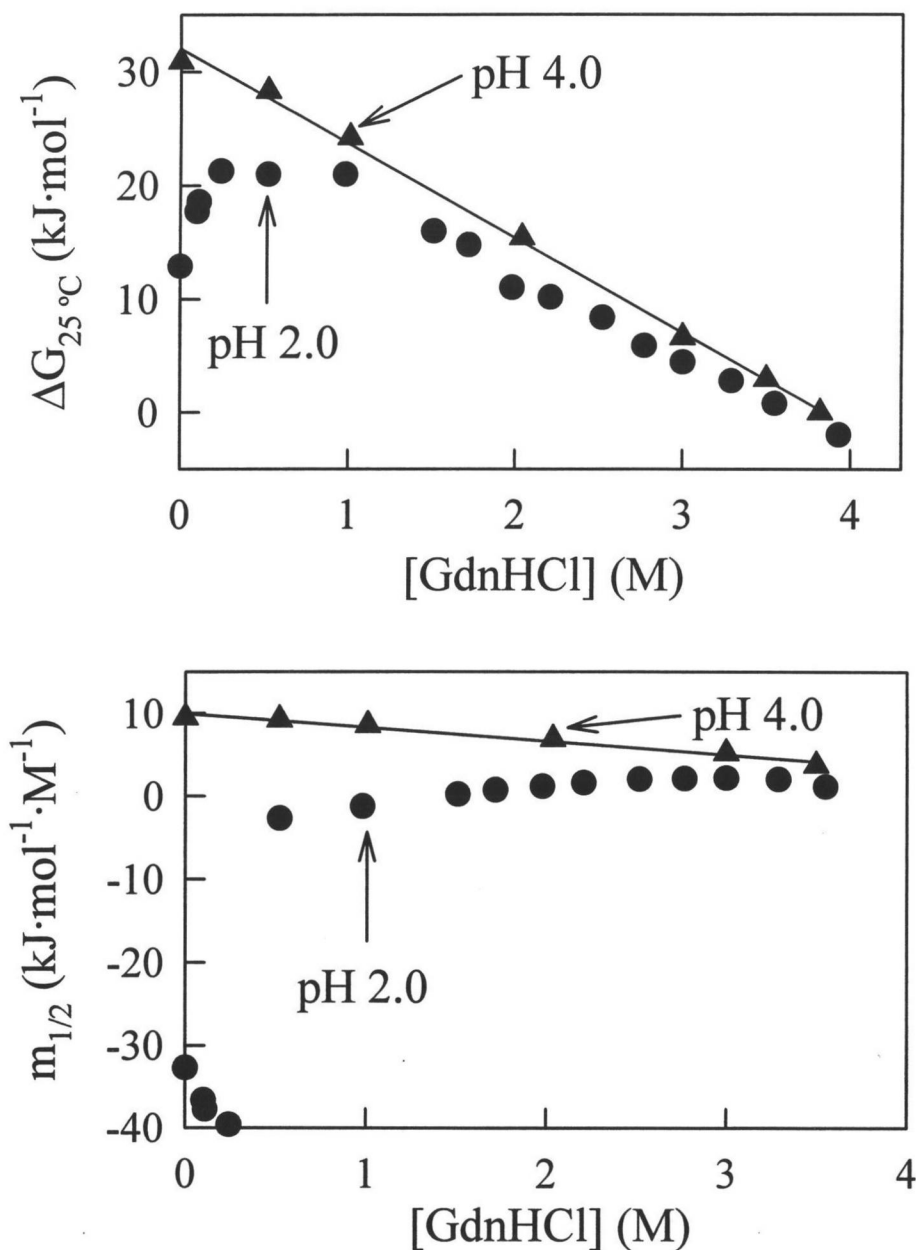


Figura 22: En la gráfica superior se representan los valores de $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ de ubiquitina bovina, en función de la concentración de guanidina, calculados a partir de las curvas de estabilidad a pH 2.0 (●) y 4.0 (▲) en presencia de diferentes concentraciones de guanidina (ver Figuras 19 y 20). La línea continua representa el ajuste lineal a los datos de pH 4.0. Vemos cómo el perfil correspondiente a pH 2.0 se desvía de la linealidad a concentraciones de guanidina menores a 1 M. En la parte inferior se representan los valores de $m_{1/2}$ en función de la concentración de guanidina, calculados según la expresión (3.23), a pHs 2.0 y 4.0. A pH 4.0 el perfil es casi plano (la línea continua representa el ajuste lineal a los datos) indicando que ΔG es lineal con C , mientras que a pH 2.0 $m_{1/2}$ disminuye abruptamente por debajo de 1 M guanidina como consecuencia de las desviaciones de la linealidad que tienen lugar.

4.4 COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE ΔG DE DESNATURALIZACIÓN POR GUANIDINA OBTENIDOS POR EXTRAPOLACIÓN LINEAL Y EXPERIMENTOS DE DSC A DIFERENTES pHs

En las Figuras 23 y 24 mostramos los valores de $C_{1/2}$, $m_{1/2}$ y ΔG_w (obtenidos estos mediante extrapolación lineal) que se derivan del análisis de los perfiles de desplegamiento inducido por guanidina (seguidos por fluorescencia y CD) de ubiquitina de glóbulos rojos bovinos y levadura, respectivamente. Al observar estos perfiles se llega a un resultado sorprendente y es que ninguno de estos parámetros parece cambiar con el pH, es decir, prácticamente permanecen constantes al variar éste.

Llegados a este punto interesa estudiar la relación entre los valores del cambio de energía de Gibbs de desnaturalización determinados a partir de datos de desplegamiento inducido por guanidina con la contribución electrostática a la estabilidad de ubiquitina, como ya hicimos con lisozima. Para ello necesitamos además valores de ΔG obtenidos de experimentos de DSC, técnica que como ya hemos comentado nos permite conocer la energética de la proteína de manera muy precisa.

A.- Para ubiquitina de glóbulos rojos bovinos:

- Determinación de valores de $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ a partir de los experimentos de DSC de Wintrode et al. (1994)

Usando los resultados obtenidos de experimentos de DSC a diferentes pHs publicados por Wintrode et al. (1994) hemos calculado los valores de $\Delta G_{w, 25^\circ\text{C}}$ para ubiquitina de eritrocitos bovinos mediante dos procedimientos:

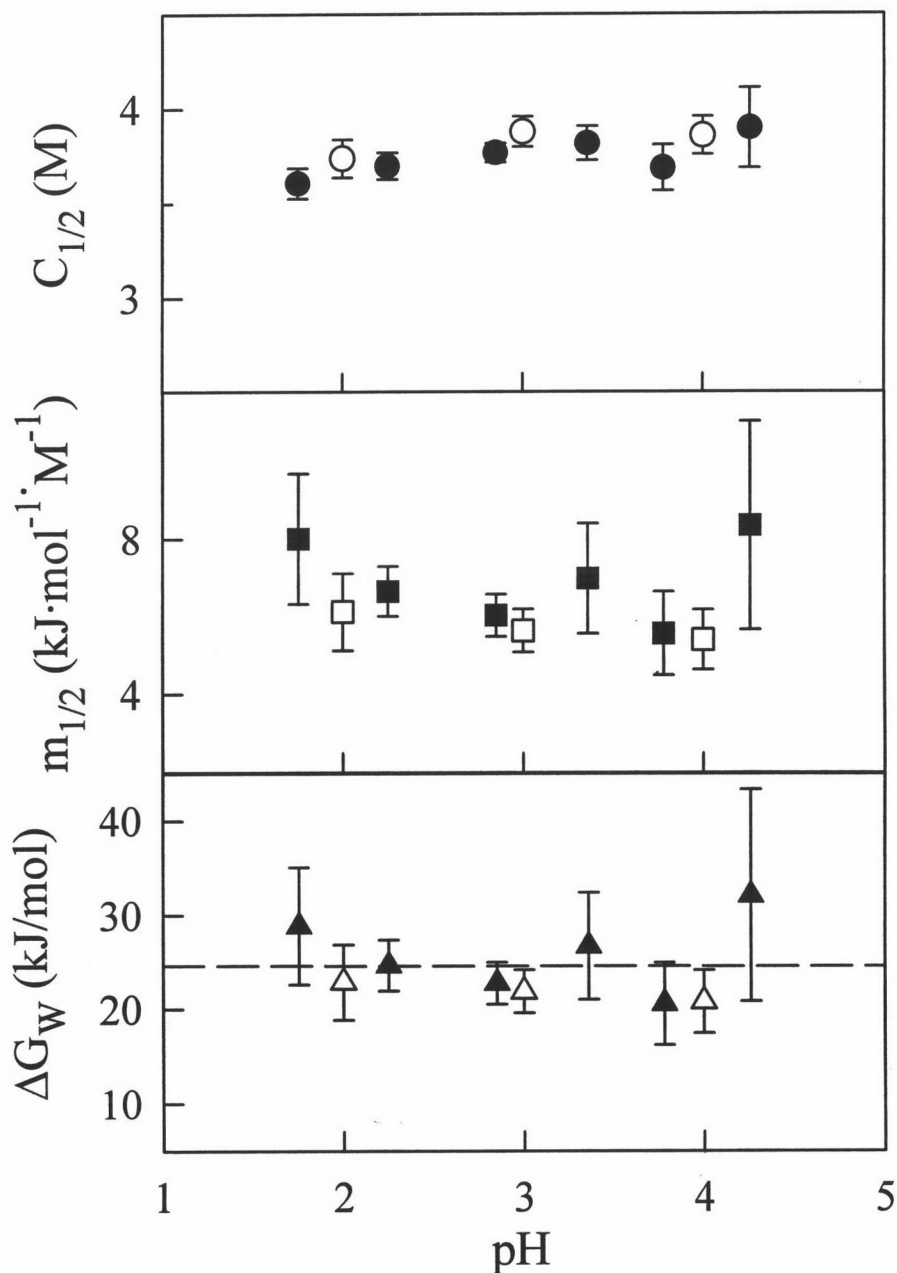


Figura 23: Efecto del pH sobre los parámetros $C_{1/2}$, $m_{1/2}$ y ΔG_w (obtenidos mediante extrapolación lineal) correspondientes al desplegamiento inducido por guanidina de ubiquitina bovina. Los símbolos rellenos proceden del análisis individual de los perfiles de fluorescencia (ver Figura 5) y los huecos del ajuste simultáneo de los perfiles de dicroísmo circular, considerando ΔG lineal con el pH (ver Figura 8). Las barras representan las desviaciones estándar asociadas a cada parámetro, obtenidas del programa MLAB. La línea discontinua representa el ajuste lineal a todos los datos de energía de Gibbs.

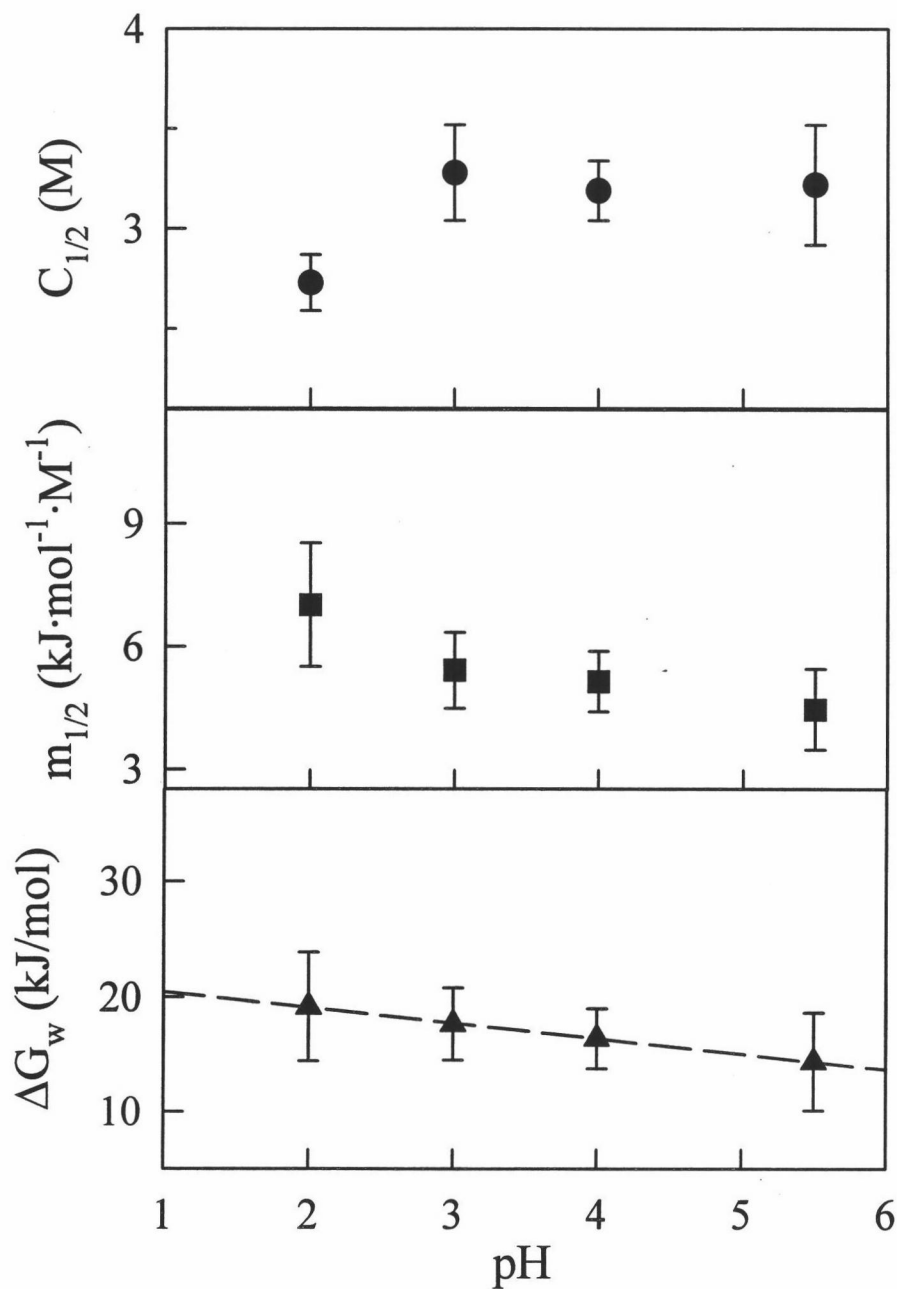


Figura 24: Efecto del pH sobre los parámetros $C_{1/2}$, $m_{1/2}$ y ΔG_w (obtenidos mediante extrapolación lineal) correspondientes al desplegamiento inducido por guanidina de ubiquitina de levadura, estudiado mediante dicroísmo circular (ver Figura 9). Las barras representan las desviaciones estándar asociadas a cada parámetro resultado del análisis global realizado con el programa MLAB. La línea discontinua representa el ajuste lineal a los datos de energía de Gibbs.

1- En primer lugar hemos obtenido la dependencia de ΔC_p con la temperatura a partir de los datos que figuran en la Tabla III del citado trabajo. El siguiente polinomio de segundo grado es el que mejor se ajusta a dichos datos como se observa en la Figura 18:

$$\Delta C_p = -15.678 + 0.1614 \cdot T - 3.019 \cdot 10^{-4} \cdot T^2 \quad (24)$$

donde T se expresa en K y ΔC_p en $\text{kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$. Tomando los valores de T_m y ΔH_{cal} en el rango de pH entre 2 y 4 que aparecen en la Tabla II del trabajo de Wintrode et al. (1994) y teniendo en cuenta la dependencia del cambio de capacidad calorífica con la temperatura [ecuación (24)] calculamos $\Delta H_{25^\circ\text{C}}$, $\Delta S_{25^\circ\text{C}}$ y finalmente $\Delta G_{w, 25^\circ\text{C}}$ haciendo uso de las ecuaciones (2.18), (2.19) y (2.20) respectivamente.

2- A partir de la Figura 3 del citado trabajo de Wintrode et al. (1994) obtenemos la dependencia del cambio de entalpía con la temperatura:

$$\Delta H = -6504.514 + 35.763 \cdot T - 0.04687 \cdot T^2 \quad (25)$$

donde T se expresa en K y ΔH en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Teniendo en cuenta esta última expresión e integrando la ecuación de Gibbs-Helmholtz (3.20) entre T y T_m , obtenemos la dependencia de ΔG con la temperatura:

$$\frac{\Delta G}{T} = -6504.51 \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - 35.763 \cdot \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) + 0.04687 \cdot (T - T_m) \quad (26)$$

y sustituyendo en cada caso la T_m por su valor y $T=298.15$ K obtendremos $\Delta G_{w,25^\circ\text{C}}$ a ese pH.

En la Figura 26 hemos representado los valores que se derivan de aplicar ambos procedimientos sin observarse diferencia significativa.

- Determinación de valores de $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ a partir de nuestros experimentos de DSC

Hemos utilizado los dos procedimientos que acabamos de describir para obtener los valores de $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ correspondientes a nuestros experimentos calorimétricos. Brevemente:

- con la dependencia de $\Delta C_p(T)$ dada por la expresión (24) y con nuestros valores de T_m y ΔH_m obtenidos del análisis de las trazas a pH 2, 3 y 4 en ausencia de guanidina calculamos $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ en cada caso.

- según la variación de ΔH con T dada por la expresión (25) e integrando la ecuación de Gibbs-Helmholtz entre 298.15 K y nuestra T_m en cada caso, obtenemos $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ a ese pH.

En la Figura 26 vemos como nuestros datos, obtenidos según estos dos procedimientos, concuerdan bastante bien con los de Wintrobe et al. (1994). Además hemos representados los valores de $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ que se derivan de las curvas de estabilidad a pH 2 y 4, en 0 M guanidina (ver Figuras 19 y 20), encontrando también un buen acuerdo.

B.- Para ubiquitina de levadura disponemos de datos de T_m y ΔH_m en el rango de pH de 2 a 4 (ver Figura 25) que amablemente fueron puestos a nuestra disposición por el Dr. Makhatadze (Texas Tech University, Lubbock, USA). El mejor ajuste a estos datos resultó:

$$\Delta H = -7648.52 + 43.759 \cdot T - 0.06073 \cdot T^2 \quad (27)$$

Teniendo en cuenta (27) integramos la ecuación de Gibbs-Helmholtz entre 298.15 y T_m y obtuvimos $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ a cada pH (ver Figura 27).

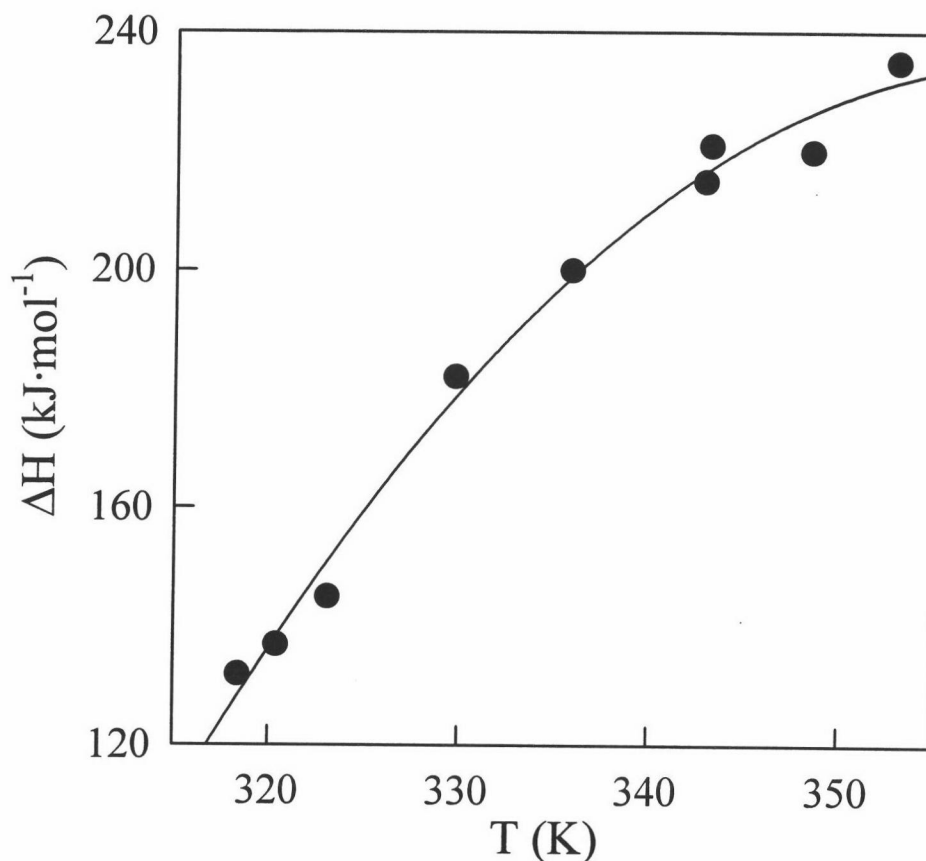


Figura 25: Dependencia del cambio de entalpía de desnaturalización para ubiquitina de levadura con la temperatura, obtenida de experimentos calorimétricos en el rango de pH de 2.0 a 4.0. Estos datos fueron amablemente cedidos por el Dr. Makhatadze. La línea continua representa el mejor ajuste de una cuadrática a dichos datos.

En la Figura 26 hemos representado conjuntamente los valores de $\Delta G_{w, 25^{\circ}\text{C}}$ obtenidos mediante extrapolación lineal y experimentos de DSC a diferentes pHs (obtenidos según los dos procedimientos descritos) para ubiquitina bovina. Sorprende en primer lugar la fuerte dependencia con el pH de los datos de DSC frente a los obtenidos mediante LEM. Además vemos cómo ambas series de datos se cortan en un punto en torno a pH 3.3. Este es un resultado muy interesante que apoya la hipótesis que planteamos en la sección 3.8 según la cual la diferencia entre los valores derivados de la extrapolación lineal y aquellos que proceden de experimentos de DSC, arroja una estimación de la contribución carga-carga a la estabilidad de la proteína

($\Delta\Delta G^{q-q}$). Así para ubiquitina bovina vemos como esta diferencia cambia de signo dentro del rango de pH estudiado (Figura 26). Como es de esperar $\Delta\Delta G^{q-q}$ es positiva (estabilizante) a pH neutros reflejando el hecho de que las cargas positivas y negativas están distribuidas en la superficie de la proteína nativa resultando una atracción coulombica neta, mientras que $\Delta\Delta G^{q-q}$ toma valores negativos (desestabilizante) a pHs ácidos debido a la neutralización de cargas negativas y a la concomitante repulsión entre las remanentes positivas. Este razonamiento justifica el comportamiento que encontramos en la Figura 22A estudiando la dependencia de los valores de ΔG con C. A pH ácido la contribución debida a la interacción entre cargas tiene signo negativo por lo que ocurren desviaciones negativas de la linealidad. Por el contrario a pHs mayores dicha contribución cambia de signo gradualmente hasta encontrar desviaciones positivas de la linealidad de manera que LEM nos daría un valor de ΔG subestimado. En nuestro caso a pH 4 no se llega a detectar esa situación (todavía estamos muy cerca del punto de corte; ver Figura 26) aunque es de esperar que a pHs mayores sí se observe. Obviamente estamos limitados por la elevada estabilidad de la proteína que nos impide trabajar a pHs mayores.

Este mismo comportamiento lo observamos en ubiquitina de levadura de manera más clara (Figura 27). Al ser menos estable que la bovina hemos podido incrementar el rango de pH de trabajo hacia valores mayores con lo que el cambio de signo de $\Delta\Delta G^{q-q}$ se aprecia claramente en la Figura 27.

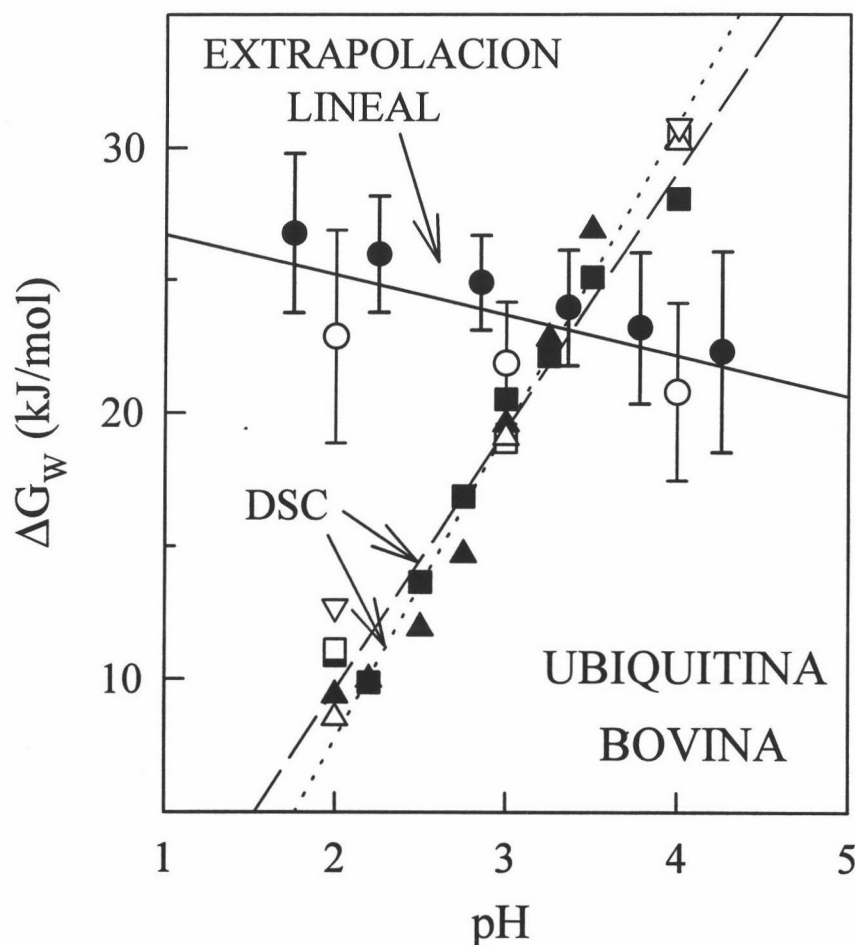


Figura 26: Efecto del pH sobre ΔG_w de ubiquitina de glóbulos rojos bovinos: (●) valores obtenidos a partir de los perfiles de desnaturalización inducida por guanidina a diferentes pHs caracterizados por fluorescencia (ver Figura 5), mediante extrapolación lineal; (○) valores obtenidos a partir de los perfiles de desnaturalización inducida por guanidina a diferentes pHs caracterizados por CD (ver Figura 8), mediante extrapolación lineal. Las barras representan la desviación estándar dada por el programa MLAB. La línea continua corresponde al ajuste lineal a los datos de ΔG_w de fluorescencia y CD. (■) valores calculados teniendo en cuenta la dependencia de ΔC_p con T que se deriva de los datos de Winthrode et al. (1994) [ecuación (24)]. La línea (---) representa el ajuste lineal a estos datos. (▲) valores calculados teniendo en cuenta la dependencia de ΔH con T dada por Winthrode et al. (1994) e integrando a continuación la ecuación de Gibbs-Helmholtz. La línea (····) corresponde al ajuste lineal a estos datos. (□) valores calculados a partir de nuestros experimentos de DSC en tampón acuoso considerando que ΔC_p varía con T según la cuadrática que describe los datos de Winthrode et al. (1994) a diferentes pHs (ver Figura 18); (△) valores calculados a partir de nuestros experimentos de DSC en tampón acuoso considerando la dependencia de ΔH con T dada por Winthrode et al. (1994) e integrando a continuación la ecuación de Gibbs-Helmholtz; (▽) valores obtenidos de la curva de estabilidad a 0 M guanidina (ver Figuras 19 y 20). Se observa una buena concordancia entre los valores de ΔG_w calculados a partir de nuestros experimentos de DSC con aquellos que proceden de datos de Winthrode et al. (1994).

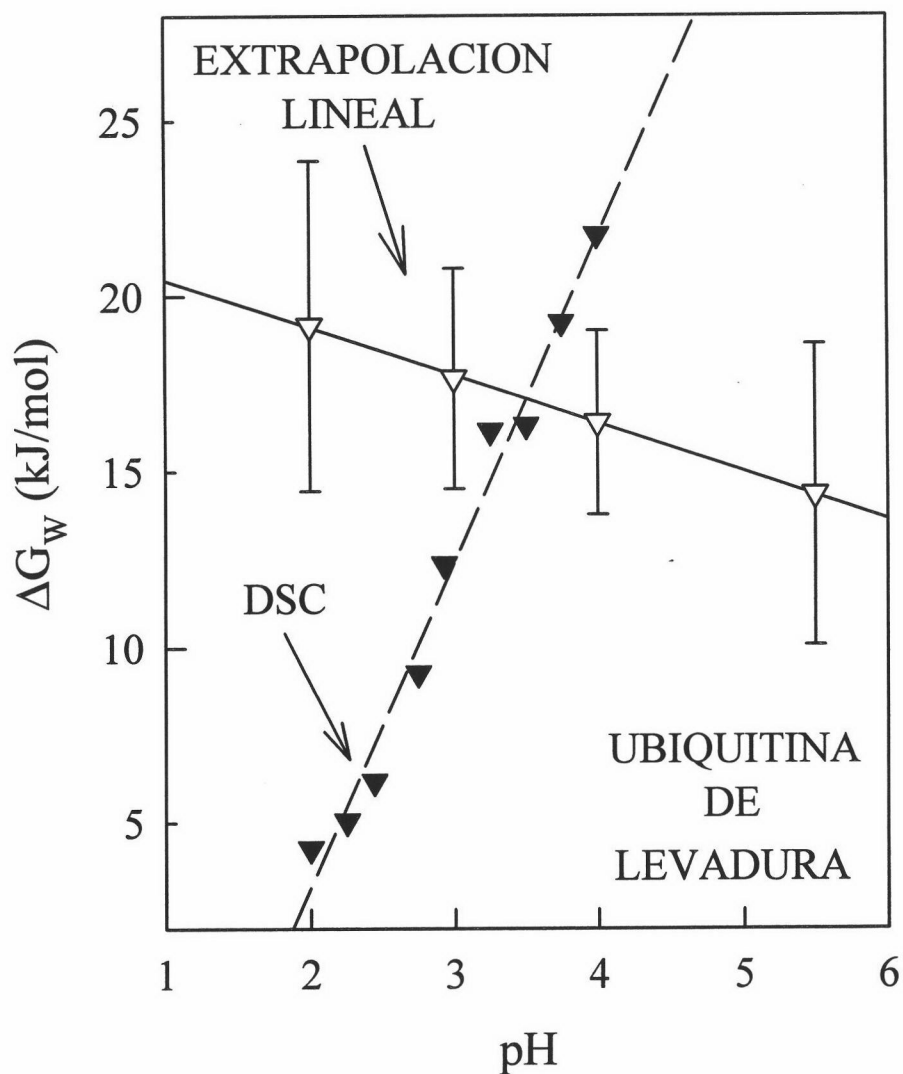


Figura 27: Efecto del pH sobre ΔG_w de ubiquitina de levadura: (∇) valores obtenidos a partir de los perfiles de desnaturalización inducida por guanidina a diferentes pHs caracterizados por CD (ver Figura 9), mediante extrapolación lineal. Las barras representan la desviación estándar dada por el programa MLAB. La línea continua corresponde al ajuste lineal a estos datos; (\blacktriangledown) valores calculados a partir de datos de ΔH en función de T_m [expresión (27)], integrando la ecuación de Gibbs-Helmholtz. La línea discontinua corresponde al ajuste lineal a dichos datos.

4.5 CÁLCULO TEÓRICO DE LA CONTRIBUCIÓN ELECTROSTÁTICA A LA ESTABILIDAD DE UBIQUITINA BOVINA

En este punto del trabajo nos planteamos comprobar nuestra hipótesis sobre la relación entre las desviaciones de la linealidad en el perfil de ΔG versus C y la contribución electrostática a la estabilidad, mediante cálculos teóricos. Para ello se utilizó el programa TITRA, de desarrollo reciente, escrito por P. Martel y S. Petersen (Universidad de Aalborg, Dinamarca). Los cálculos fueron amablemente realizados por el Dr. Peter Fojan (Universidad de Aalborg, Dinamarca).

En primer lugar, describiremos brevemente los procedimientos más usuales para abordar el estudio de las interacciones electrostáticas de una manera teórica o computacional [ver Warshel y Papazyan (1998) para una revisión reciente sobre el tema]; a continuación, veremos cómo simular el efecto del pH en proteínas según los modelos continuos y por último nos centraremos en el programa que usamos en nuestros cálculos: TITRA.

Existen dos tipos de enfoques para describir, desde un punto de vista teórico, las interacciones electrostáticas en sistemas químicos y bioquímicos:

- el basado en la electrostática continua: corresponden a éste los primeros modelos que obviaban la descripción a nivel atómico de la molécula, tratando el soluto y el disolvente como medios de constante dieléctrica homogénea, en los que las cargas están distribuidas de manera discreta o continua.

- el basado en cálculos a partir de simulaciones a nivel atómico: dinámica molecular y simulaciones de Monte Carlo. Estos empezaron a desarrollarse a medida que se dispuso de computadores más potentes y avanzaban las técnicas de alta resolución de estructuras

moleculares. La información detallada a nivel atómico que proporcionan estos métodos originó un cierto abandono de los modelos continuos; no obstante, el desarrollo de nuevos métodos computacionales y numéricos ha hecho posible que se alcance un nivel cuantitativo en los cálculos basados en electrostática continua, hecho que ha favorecido su resurgimiento (un ejemplo reciente lo constituye el precisamente el programa TITRA). A partir de ahora nos referiremos a ellos en nuestro trabajo.

El enfoque más simplista a la hora de estudiar las interacciones electrostáticas en proteínas consiste en suponer que las cargas interactúan en un medio con una única constante dieléctrica y que todas las interacciones pueden ser descritas por la ley de Coulomb. No obstante este planteamiento es erróneo ya que la proteína y el disolvente tienen diferentes propiedades dieléctricas de manera que las interacciones no pueden ser descritas usando la ley de Coulomb. La ecuación de Poisson-Boltzmann se considera una buena aproximación ya que tiene en cuenta tanto las diferentes constantes dieléctricas de la proteína y el disolvente (considera la proteína como una cavidad de constante dieléctrica baja inmersa en un medio continuo de constante alta) como la fuerza iónica del medio (Honig, 1995).

4.5.1 Simulación del efecto del pH en proteínas

El resultado directo de un cambio de pH es la modificación de las concentraciones en equilibrio de las formas protonada y desprotonada de los grupos titulables, lo que conlleva un cambio en la carga media de dichos grupos. De esta manera, las interacciones electrostáticas son las fuerzas principales que intervienen en los fenómenos dependientes del pH. Como consecuencia el desarrollo del método de Poisson-Boltzmann para el cálculo detallado del campo

electrostático dentro y alrededor de las macromoléculas ha contribuido enormemente al desarrollo de teorías de fenómenos dependientes del pH (Yang et al., 1993; Antosiewicz et al., 1994; Yang et al., 1994; Meeker et al., 1996).

A primera vista, explicar y predecir estos cambios electrostáticos dependientes del pH podría parecer trivial. Así, dado el pK_a de un residuo titulable, es fácil decir si dicho grupo está o no cargado a un pH determinado. No obstante, la situación es más complicada debido a que las otras cargas y el ambiente local en la proteína pueden desplazar el valor del pK_a incluso varias unidades de pH. Por tanto, en este contexto el concepto usual de pK_a se hace inapropiado por lo que definiremos los siguientes términos (siguiendo la nomenclatura de Bashford y Karplus, 1990) que serán de gran utilidad:

pK^{model} : es el pK_a de un grupo titulable en un compuesto modelo, supuestamente libre de la acción de otros grupos titulables. Se puede medir por RMN u otro método de titulación cualquiera. En la siguiente Tabla se recogen los valores típicos correspondientes a grupos titulables en proteínas:

Group	Model compounds (pK^{model})	Usual range in proteins
Amino acid α -COOH	3.6	
Aspartate (COOH)	4.0	2-5.5
Glutamate (COOH)	4.5	
Histidine (imidazole)	6.4	5-8
Amino acid α -NH ₂	7.8	~8
Lysine (ϵ -NH ₂)	10.4	~10
Arginine (guanidine)	~12	—
Tyrosine (OH)	9.7	9-12
Cysteine (free SH)	9.1	8-11

^a T. E. Creighton, "Proteins: Structure and Molecular Properties." W. H. Freeman & Company, New York, 1993.

^b A. Fersht, "Enzyme Structure and Mechanism." W. H. Freeman & Company, New York, 1985.

Tabla 9: Valores de pK_a de los grupos titulables en proteínas determinados a partir de compuestos modelo.

pK^{int} : es el pK_a de un grupo titulable cuando los otros grupos ionizables en la proteína están neutralizados. Depende no sólo del tipo de residuo sino también de su localización en la proteína. Es independiente del pH.

pK^{eff} : es el pK_a aparente de un grupo a un pH dado cuando la proteína está cargada. Su valor cambia con el pH durante la titulación debido a las interacciones mutuas entre grupos.

$pK_{1/2}$: pH al que la fracción de protonación del residuo es 0.5.

El valor de pK_a medido en solución para el compuesto modelo (pK^{model}), generalmente Gly-X-Gly, donde X es el residuo en cuestión, refleja un ambiente acuoso para dicho residuo, considerado completamente accesible al disolvente. No obstante, cuando el residuo titulable se transfiere del compuesto modelo a un sitio específico en la proteína, entonces hay que considerar nuevos términos que contribuyen a la energética de su titulación:

- el término de desolvatación: representa el cambio de energía libre en la reacción de protonación como resultado de enterrar el residuo en un medio de baja constante dieléctrica (la proteína).

- término que describe el cambio de energía libre resultante de la interacción de dicho residuo con otras cargas no-titulables de la proteína (dipolos del enlace peptídico y átomos polares).

Ambos términos constituyen la diferencia entre pK^{int} y pK^{model} .

Un tercer término energético describe la interacción del residuo con el resto de residuos titulables en la proteína, y es dependiente del pH. Las tres contribuciones a las que hemos hecho mención pueden ser calculadas usando la forma lineal de la ecuación de Poisson-Boltzmann.

El valor de pK_a resultante de la inserción de un residuo aminoacídico en la proteína neutra se refiere generalmente como pK_a intrínseco, pK^{int} , y viene dado por:

$$pK^{int} = pK^{model} + \frac{1}{2.3k_B T} \Delta\Delta G^{env} \quad (28)$$

donde $\Delta\Delta G^{env}$ es el cambio de energía libre debido a la transferencia de un residuo desde agua a la forma neutra de una proteína.

La manera en la que el pK_a de un sitio dado se ve afectado por un grupo cercano depende de si este último está cargado o no. Pero a su vez, el estado de protonación de este segundo grupo también depende de la protonación del primero. Es decir, una proteína con s sitios titulables tiene 2^s posibles estados de protonación y para caracterizar el equilibrio de protonación de uno de los grupos debemos especificar las poblaciones de cada una de las dos formas de las 2^s estados de la proteína a cada pH. Para tener en cuenta las interacciones adicionales de un aminoácido con otros sitios cargados en la proteína, se define el pK_a efectivo (pK^{eff}):

$$pK^{eff} = pK^{int} + \frac{1}{2.3k_B T} \Delta\Delta G^{inter} \quad (29)$$

donde $\Delta\Delta G^{inter}$ es la contribución electrostática debida a la interacción con otros residuos cargados, calculada con cargas medias (de manera aproximada). Dado que el término de interacción es dependiente del pH, el pK^{eff} también lo es y no puede ser igualado con el pH correspondiente a la mitad de la protonación ($pK_{1/2}$).

4.5.2 Comparación de los valores teóricos y experimentales de la contribución electrostática a la estabilidad de ubiquitina

TITRA es un programa que permite el cálculo de curvas de titulación en proteínas y la determinación de pK_a s. El algoritmo empleado se basa en el modelo de esfera de Tanford-Kirkwood (1957) para el estudio de las interacciones carga-carga y en la aproximación de campo medio iterativo de Tanford-Roxby (1972) para el cálculo del estado medio de protonación de los sitios titulables. TITRA necesita el fichero PDB de la proteína en cuestión además de las accesibilidades atómicas o de las cadenas laterales (para esto se utiliza el programa ACC_RUN con el fichero PDB correspondiente). A partir de estos ficheros calcula los pK^{int} para cada sitio tituable según el modelo de Tanford-Kirkwood; a continuación y haciendo uso de la ecuación de Tanford-Kirkwood, obtiene los valores de las energías de interacción, W_{ij} , entre pares de cargas unidad positivas i y j , situadas a una cierta distancia de la superficie de una esfera de radio b , siendo a el radio de exclusión de ion y r_{ij} la distancia entre ambas cargas:

$$W_{ij} = R \left[\frac{(A_{ij} - B_{ij})}{b} - \frac{C_{ij}}{a} \right] \quad (30)$$

donde R es una constante que depende de las unidades que se elijan. El significado de los términos A_{ij} , B_{ij} y C_{ij} es como sigue: A_{ij} representa la interacción coulombica directa entre las cargas i y j en un medio de constante dieléctrica ϵ_p , B_{ij} es la interacción entre la carga i y la polarización superficial inducida por la carga j en el límite esférico, y C_{ij} describe la interacción de la carga i con la atmósfera contraiónica de carga j . Si las constantes dieléctricas dentro de la esfera y en el solvente son iguales ($\epsilon_p = \epsilon_s$) e $I=0$, entonces los términos B_{ij} y C_{ij} valen 0 y la ecuación (30) coincide con la ecuación de Coulomb para un medio de constante dieléctrica ϵ_p .

Después de evaluar los términos W_{ij} para todas las parejas (i,j), se determinan los pK_i^{eff} y z_i mediante un proceso de iteración considerando las siguientes ecuaciones:

$$z_i = z_i^0 + \frac{10^{(pK_i^{\text{eff}} - \text{pH})}}{1 + 10^{(pK_i^{\text{eff}} - \text{pH})}} \quad (31)$$

$$pK_i^{\text{eff}} = pK_i^{\text{int}} - \frac{1}{2.303k_B T} \sum_{i \neq j} W_{ij} z_j \quad (32)$$

donde z_i^0 es la carga del sitio i en el estado desprotonado y z_i la carga media de dicho sitio.

Después de que todos los pK^{eff} están actualizados, se inicia un nuevo ciclo. Las interacciones continúan hasta que el cambio en las cargas medias calculado z_i y pK^{eff} se encuentran por debajo de un límite de error predefinido. Todo el proceso se repite para el rango de pH preseleccionado; la carga total y los valores de pK^{eff} a cada pH se almacenan en ficheros de salida.

La contribución electrostática para el estado nativo es calculada como:

$$G_{Elec}^N = \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} W_{ij} z_i z_j \quad (33)$$

Además el programa calcula valores de pK_i^{app} , definido como el pH al que la fracción de protonación del residuo es 0.5.

Hemos aplicado el programa TITRA a ubiquitina bovina, para fuerzas iónicas 0.1 y 0.01 M (esta última coincide aproximadamente con nuestras condiciones experimentales: AcNa o Gly 10 mM) en el rango de pH de 1.0 a 13.0. Como resultado obtenemos en cada caso los valores de los pK^{eff} para cada residuo ionizable y a cada pH, además de los pK_i^{app} y pK_i^{intr} . En la Tabla 10 se

recogen los valores de estos parámetros (pK_i^{app} y pK_i^{intr}) para todos los residuos, dados por TITRA. La dependencia de los pK_i^{eff} de los glutámicos y aspárticos presentes en la molécula con el pH se representa en la Figura 28.

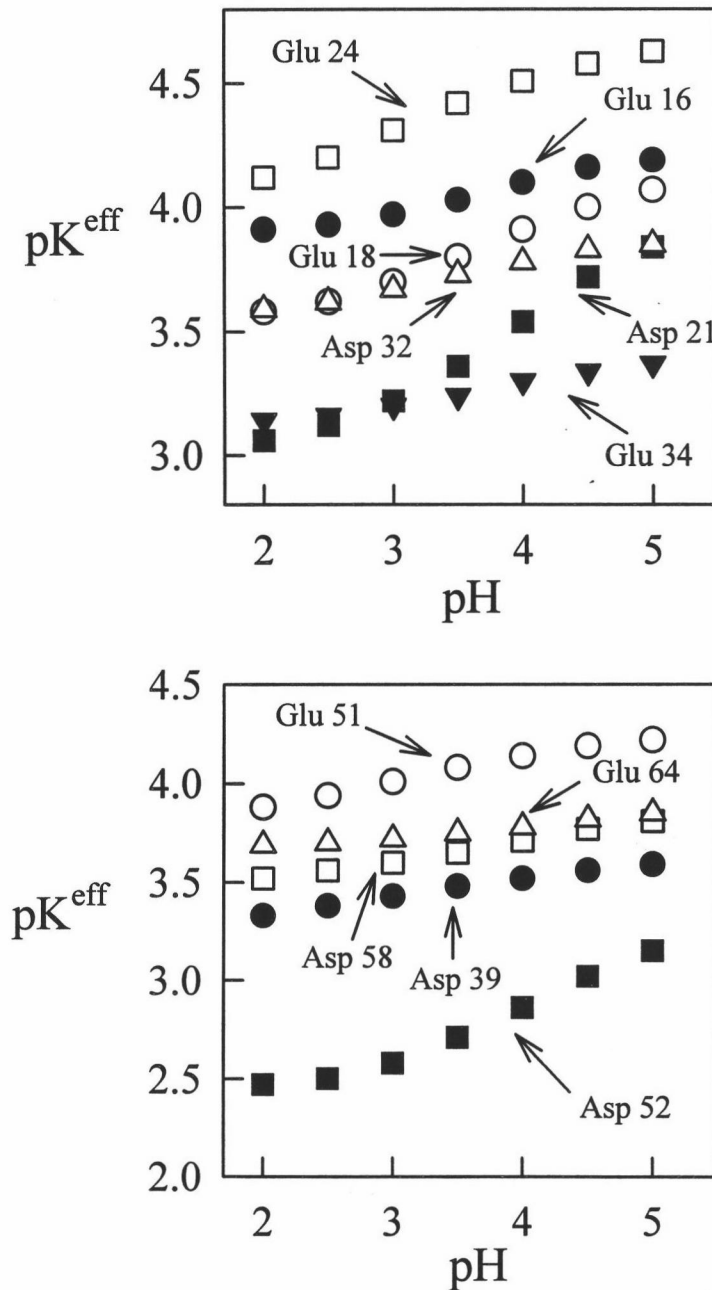


Figura 28: Efecto del pH sobre los valores de pK^{eff} , calculados utilizando el programa TITRA [ecuación (32)], de los grupos carboxilato pertenecientes a los residuos indicados.

**Tabla 10: Valores de pK^{intr} y pK^{app} (para $I=0.01$ y 0.1 M)
correspondientes a cada residuo de ubiquitina bovina, dados
por el programa TITRA**

Residuo	pK^{intr}	pK^{app} ($I=0.01M$)	pK^{app} ($I=0.1M$)
Ntr 1	7.70	8.62	8.45
LYS 6	10.60	10.50	10.57
LYS 11	10.60	11.33	11.26
GLU 16	4.50	4.12	4.19
GLU 18	4.50	3.89	3.97
ASP 21	4.00	3.29	3.54
GLU 24	4.50	4.59	4.60
LYS 27	10.60	12.21	11.72
LYS 29	10.60	11.80	11.37
ASP 32	4.00	3.76	3.83
LYS 33	10.60	10.86	10.75
GLU 34	4.50	3.22	3.55
ASP 39	4.00	3.48	3.60
ARG 42	12.00	12.10	12.03
LYS 48	10.60	10.71	10.70
GLU 51	4.50	4.15	4.24
ASP 52	4.00	2.50	2.88
ARG 54	12.00	13.05	12.73
ASP 58	4.00	3.67	3.81
TYR 59	10.20	10.28	10.25
LYS 63	10.60	11.11	10.99
GLU 64	4.50	3.76	4.02
HIS 68	6.30	5.48	5.79
ARG 72	12.00	12.48	12.32
ARG 74	12.00	12.17	12.14
Ctr 76	3.60	3.56	3.58

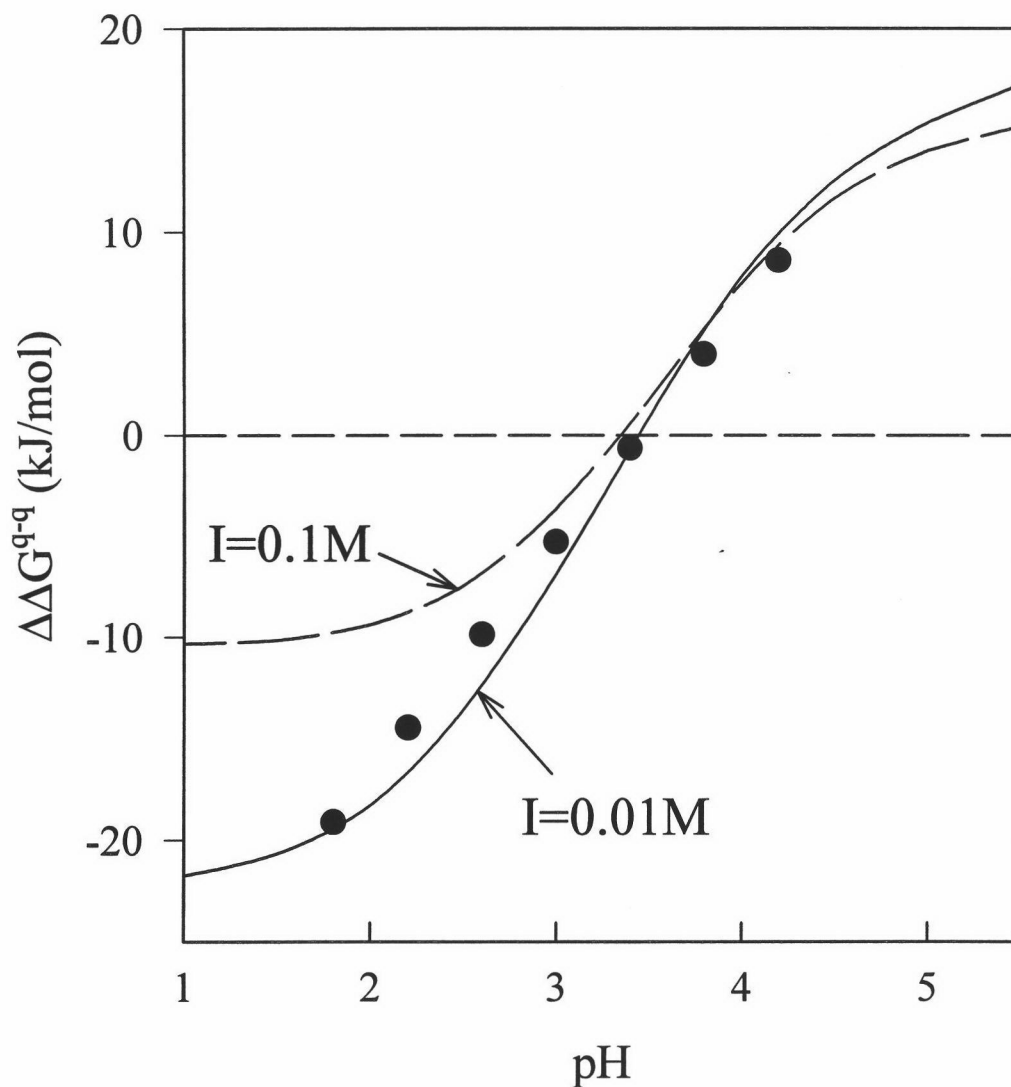


Figura 29: Efecto del pH sobre la contribución de las interacciones carga-carga a la estabilidad de ubiquitina bovina: (●) valores experimentales que proceden de la diferencia de los cambios de energía de Gibbs determinados por DSC y LEM ($\Delta G_{DSC} - \Delta G_{LEM}$), a diferentes pHs; la línea continua representa la estimación teórica de $\Delta\Delta G^{q-q}$ dada, por el programa TITRA, a fuerza iónica 0.01 M mientras que la línea discontinua corresponde a fuerza iónica 0.1 M.

A partir de la expresión (33) y suponiendo que en el estado desplegado la molécula está totalmente extendida y por tanto G_{Elec}^D vale cero, podemos calcular la contribución debida a interacciones electrostáticas ($\Delta\Delta G^{q-q}$) tomando como referencia dicho estado desplegado:

$$\Delta\Delta G^{q-q} = G_{Elec}^D - G_{Elec}^N = -G_{Elec}^N \quad (34)$$

En la Figura 29 se representan los valores obtenidos observándose cierta curvatura del perfil a pHs extremos. Además hemos incluido nuestra estimación experimental de dicha contribución, calculada a partir de la diferencia entre los valores del cambio de energía de Gibbs derivados de experimentos calorimétricos con aquellos obtenidos mediante extrapolación lineal ($\Delta G_{DSC} - \Delta G_{LEM}$) [ver Figura 26]. Como se observa en la Figura 29 la concordancia entre los valores calculados a fuerza iónica 0.01 M y el perfil experimental (que se extiende desde pH 1.7 a 4.3, aproximadamente en la zona lineal del teórico) es excelente, hecho que apoya la validez de nuestra idea acerca de la relación entre desviaciones de la linealidad en el perfil de ΔG versus C y la contribución electrostática a la estabilidad.

4.5.3 Comparación de los valores experimentales y teóricos de Δv debido al desplegamiento

De las dependencias de ΔG_w con el pH obtenidas a partir de experimentos de DSC, dadas en las Figuras 26 y 27 para ubiquitina bovina y de levadura respectivamente, es posible calcular el número de protones tomados del disolvente por la proteína en el proceso de desplegamiento (Δv), haciendo uso de la expresión (7). Además disponemos de los valores para Δv obtenidos de los análisis globales a los datos de fluorescencia (sección 4.1.3) y dicroísmo (4.2.2). Todos ellos se resumen en la siguiente tabla:

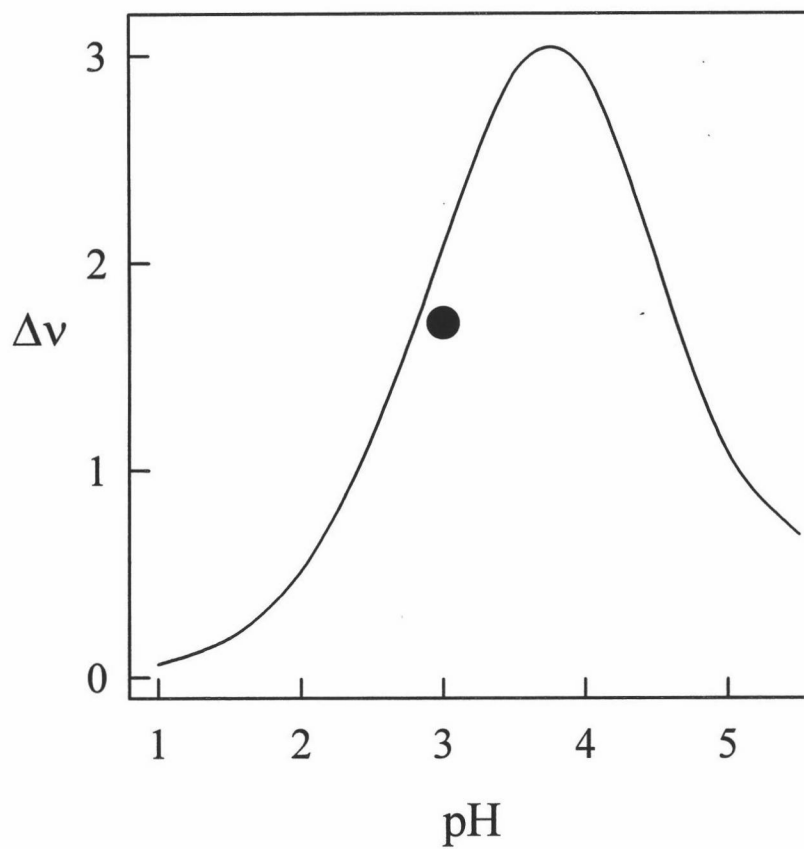


Figura 30: Con línea continua se representa la variación con el pH del número de protones tomados debido al desplegamiento de ubiquitina bovina, calculados a partir del programa TITRA a fuerza iónica 0.01 M; (●) valor experimental que procede de los experimentos de DSC realizados a diferentes pHs.

	Ubq bovina	Ubq levadura
$\Delta v_{\text{LEM}^{\text{fluor}}}$	-0.31	-----
$\Delta v_{\text{LEM}^{\text{CD}}}$	-0.18	-0.23
Δv_{DSC}	1.71	1.62

Los errores que aparecen corresponden a la desviación estándar dada por el programa comercial MLAB.

Vemos como los datos de DSC son consistentes con la toma de unos 2 protones debido al desplegamiento de ubiquitina. Por otro lado y según los cálculos realizados con el programa TITRA, para $I=0.01$ M, se obtiene una dependencia de Δv con el pH como la que se muestra en la Figura 30 (esta variación es lógica si tenemos en cuenta que el perfil teórico de $\Delta\Delta G^{\text{q-q}}$ que aparece en la Figura 29 muestra cierta curvatura a pHs extremos). Hay que tener presente que nuestro valor experimental de Δv procede de un rango de pH muy estrecho y por tanto no podemos apreciar su variación con el pH. Si lo asignamos a un valor de pH intermedio en nuestro rango de trabajo, $\text{pH}=3$, las aproximaciones teórica y experimental concuerdan muy bien, tal y como se observa en la Figura 30.

Por otro lado los datos de ΔG que se obtienen por LEM de perfiles de desnaturalización inducida por guanidina, indican $\Delta v=0$. Dado que $\Delta v=\sum\Delta v_i$ y que $\Delta v_i=\Delta v_D^i-\Delta v_N^i$ y teniendo en cuenta la expresión (31) que relaciona v_i con su correspondiente pK_i^{eff} , entonces este resultado sugiere que los pK_i^{eff} de los residuos ionizables son los mismos en los estados nativo y desplegado de la proteína. Es razonable suponer que en el estado desplegado los pK_i^{eff} concuerdan con los pK^{model} si la molécula se encuentra extendida. Por otro lado, y de manera esquemática podemos decir que el pK de cada residuo ionizable en el estado nativo tiene diferentes contribuciones:

$$pK_i^N = pK_i^{model} + \Delta pK_i^{env} + \Delta pK_i^{q-q} \quad (35)$$

donde ΔpK_i^{env} representa la contribución del ambiente y ΔpK_i^{q-q} la que procede de las interacciones carga-carga. Según nuestra hipótesis, este segundo término se anularía a alta concentración de sal. Por tanto para que los pKs no varíen en los estados nativo y desplegado el término ΔpK_i^{env} debe ser cero, lo que es consistente con la idea de que las cargas se encuentran muy expuestas al disolvente en el estado nativo de la proteína. Esta idea concuerda además con el hecho de que los valores de pK^{int} obtenidos del programa TITRA para cada residuo (que tenían en cuenta el grado de exposición del grupo titulable y eran independientes del pH) difieren muy poco de los pKs modelo.

4.5.4 pK de la Histidina 68

En los cálculos teóricos realizados con el programa TITRA se obtuvo un valor anormalmente bajo para el pK^{app} de la His 68. Concretamente 5.48 (a $I=0.01$ M) y 5.79 (a $I=0.1$ M) frente al $pK^{model} = 6.4$. Pensamos que ésta era una buena oportunidad para comprobar la fiabilidad del programa, de manera que determinamos mediante experimentos de Resonancia Magnética Nuclear el pK de dicho residuo y comparamos el valor teórico y experimental.

Los experimentos de RMN fueron hechos amablemente por el grupo de la Dr. Tasayco (Department of Chemistry, The City College, New York, USA).

Las muestras fueron preparadas disolviendo la proteína (hasta una concentración final de 800 μ M) en tampón 10 mM fosfato potásico en D_2O , pH 8.4. Se añadió TMS (tetrametilsilano) en D_2O como estándar interno del desplazamiento químico del 1H a -0.018 ppm (De Marco, 1977). Se usó una disolución de DCl en D_2O para ajustar los valores de pH en el rango de 8 a 2.

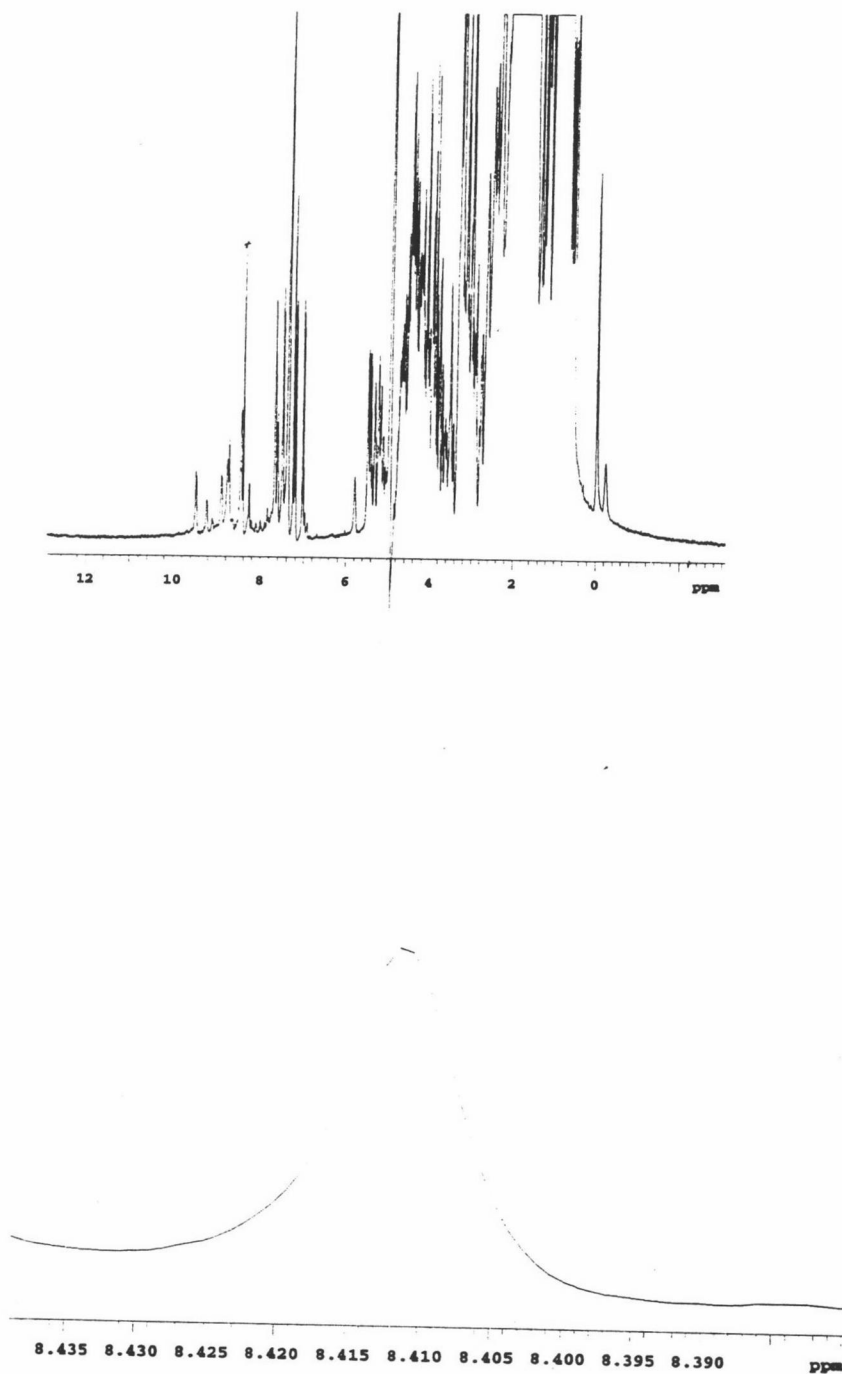


Figura 31: En la parte superior se muestra un espectro monodimensional de ^1H RMN de ubiquitina bovina obtenido a 25°C con un espectrómetro VARIAN UNITYplus de 500 Mhz. La concentración de proteína en la muestra era $800\ \mu\text{M}$ y el pH 5.41; se ha señalado el pico correspondiente al desplazamiento químico de la His 68 ($\text{C}_2\text{-H}$). En la parte inferior, se muestra una ampliación de dicha zona.

Se registraron los espectros monodimensionales a 25 °C usando secuencias de pulso PRESAT, una anchura espectral de 8000 Hz y 90 ° de ángulo de pulso.

La asignación del desplazamiento químico de la His 68 (C₂-H) se basó en experimentos previos de Harding et al., (1991) y Khorasanizadeh et al., (1993). En la Figura 31 se muestra un espectro característico donde se ha señalado el pico correspondiente al desplazamiento químico de la Histidina en estudio. La variación del desplazamiento químico con el pH se recoge en la Figura 32. Este perfil fue analizado según la ecuación (1) utilizando el programa comercial MLAB. El valor que se obtiene para el pK es de 5.52±0.02. Vemos por tanto que las estimaciones teórica y experimental concuerdan perfectamente, hecho que apoya la validez de los algoritmos usados en dicho programa.

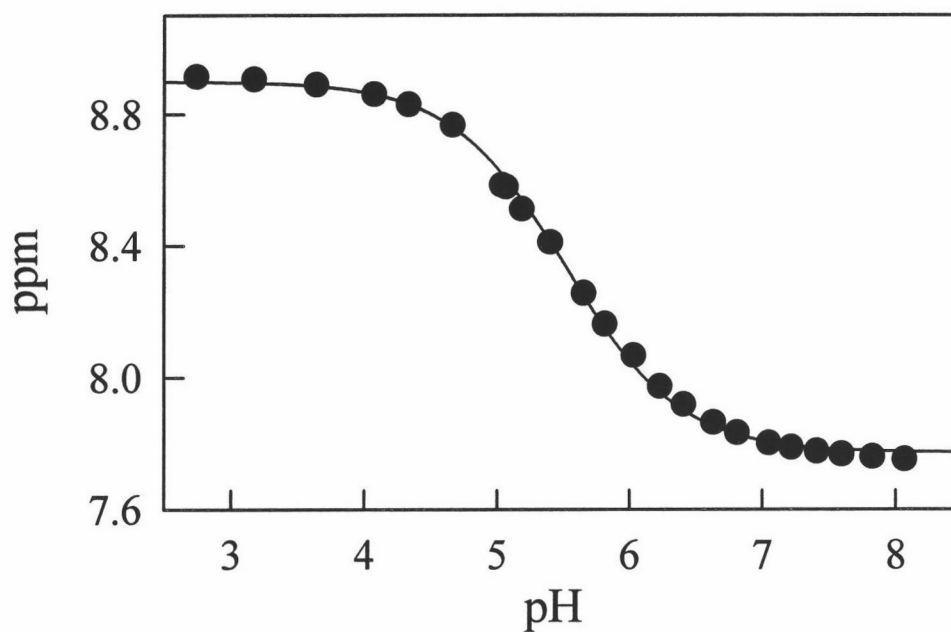


Figura 32: Variación del desplazamiento químico de la His 68 (C₂-H) de ubiquitina bovina con el pH (ver Figura 31). La línea continua representa el mejor ajuste de la ecuación (1) a los datos experimentales.

4.5.5 Residuo responsable de la atenuación de la fluorescencia en ubiquitina

En este punto nos proponemos, a partir de los pK_i^{app} obtenidos con el programa TITRA (ver Tabla 10), identificar *tentativamente* el residuo responsable de la atenuación de la fluorescencia de la Tirosina 59. Veíamos en la sección (4.1.2) que su pK_a depende de la fuerza iónica del medio de manera que a baja concentración de sal tiene un valor anormalmente bajo (ver Figura 4B).

Pues bien, a partir de los pK_i^{app} (que aparecen en la Tabla 10) es posible determinar cuales de los aspárticos o glutámicos tienen un pK_a anómalo y así proponer posibles candidatos. Además hemos tenido en cuenta las distancias que separan a cada uno de éstos con la tirosina, rechazando aquellos residuos que estén más alejados. Según esto, los carboxilatos que podrían estar atenuando la fluorescencia parecen ser los pertenecientes a Asp 52 y Glu 51.

En la Figura 33 hemos representado los valores de pK^{app} para el Asp 52 y el Glu 51 obtenidos mediante el programa TITRA a 0.01 y 0.1 M, junto con el perfil experimental previamente determinado (ver sección 4.1.2). La coincidencia es excelente sugiriendo que realmente es el carboxilato del Asp 52 el responsable del efecto de la atenuación de la fluorescencia.

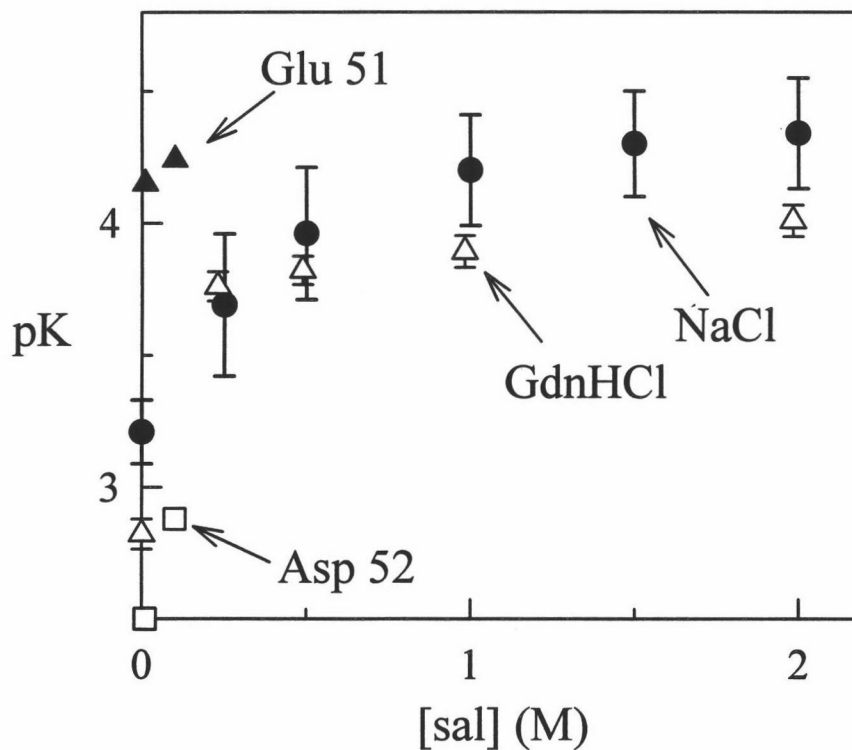


Figura 33: Efecto de la fuerza iónica sobre el pK_a del grupo/s carboxilato responsable/s del efecto de la atenuación de la fluorescencia de la Tyr 59 en ubiquitina: (●, Δ) valores experimentales que proceden de los perfiles de fluorescencia obtenidos a diferentes pHs y en presencia de guanidina y NaCl (ver Figura 4B para más detalles); (▲) valores teóricos correspondientes al pK^{app} del Glu 51 calculados con el programa TITRA; (□) valores teóricos correspondientes al pK^{app} del Asp 52 calculados con el programa TITRA. Estos últimos concuerdan muy bien con el perfil experimental lo que parece sugerir que posiblemente sea el Asp 52 el responsable de tal efecto en la fluorescencia.



5. ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO
INDUCIDO POR UREA
DE LISOZIMA

ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO INDUCIDO POR UREA DE LISOZIMA

En esta última parte de la memoria pretendemos hacer un estudio exhaustivo sobre una de las suposiciones extra-termodinámicas que generalmente se consideran en el análisis de datos de desnaturalización con disolventes: el modelo de desplegamiento de dos estados.

Aprovechamos un trabajo reciente en la literatura (Chen et al., 1996) en el que se sugiere la presencia de un estado intermedio de equilibrio significativamente poblado en el desplegamiento de lisozima inducido por urea, para contrastar resultados. Estos autores, mediante medidas de dispersión de rayos X de bajo ángulo y dicroísmo circular, señalan que la población de intermedio es aproximadamente el 40% a pH 2.9, 5.6 M urea y 20 °C.

Hemos caracterizado el desplegamiento inducido por urea de lisozima en las mismas condiciones dadas por Chen et al. (1996), mediante diferentes procedimientos:

- en la sección 5.1 se estudia el equilibrio de desnaturalización mediante ensayos de desplegamiento.

- el método cinético de los ensayos de replegamiento se describe en la sección 5.2.

- los perfiles cinéticos en la dirección del replegamiento-plegamiento inducidos por saltos en la concentración de urea se estudian en la sección 5.3. Dentro de este apartado se recogen también los experimentos de interrupción del desplegamiento, versión cinética de los ensayos de desplegamiento.

- el estudio por fluorescencia del equilibrio de desnaturalización se detalla en la sección 5.4.

A continuación, en el apartado 5.5, determinamos el perfil de desplegamiento de lisozima inducido por pH, en presencia de 5.6 M urea.

En la sección 5.6 se discute toda la información experimental de que disponemos, en términos de fracción de proteína nativa en función de la concentración de desnaturalizante: nuestros resultados no parecen apoyar la presencia de un estado intermedio significativamente poblado en el equilibrio, lo que por fin nos lleva a reinterpretar los datos de Chen et al. (1996) en la última sección.

5.1 EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR UREA ESTUDIADO MEDIANTE ENSAYOS DE DESPLEGAMIENTO

Mediante el método cinético de los ensayos de desplegamiento seguidos por fluorescencia, descrito en la sección 2.2.3.2, hemos determinado los perfiles de fracción de estado nativo para lisozima en función de la concentración de urea, a 20 °C y para concentraciones de proteína de 7 y 10 mg/mL.

5.1.1 Procedimiento experimental y Análisis global de los perfiles cinéticos

La proteína se dializó exhaustivamente en tampón citrato sódico 100 mM, ClNa 100 mM, pH 2.9 [condiciones empleadas en el trabajo de Chen et al. (1996)] preparado según se describe en la sección 2.2.1.1. La disolución concentrada de urea (aproximadamente 9 M) en el mismo tampón, se preparó siguiendo el procedimiento B) descrito en la sección 2.2.1.2, mientras que la disolución madre de guanidina (en torno a 8 M) en acetato sódico 50 mM pH 4.5, se obtuvo disolviendo el sólido directamente en dicho tampón [procedimiento A); para detalles ver sección 2.2.1.2]. Los parámetros relativos al fluorímetro son los detallados en 2.2.3.1.

Se prepararon diferentes muestras de lisozima en presencia de concentraciones de urea

de 0 a 8 M aproximadamente. Para ello se mezclaron las cantidades adecuadas de proteína en tampón acuoso, disolución madre de urea y tampón de la diálisis, previamente equilibrado con la proteína, para conseguir la concentración de desnaturizante y proteína deseadas. Se hicieron experimentos a concentraciones de proteína de 7 y 10 mg/mL [la concentración usada en el trabajo de Chen et al. (1996) es de 7 mg/mL]. La lectura del pHmetro para estas disoluciones no fue significativamente diferente a la de las disoluciones de partida (menos de 0.06 unidades de pH de diferencia). Estas mezclas se agitaron, muy suavemente, hasta conseguir una composición uniforme en todo el volumen y a continuación se dispusieron en un baño de agua a 20°C hasta asegurarnos que el equilibrio se ha establecido (el tiempo de incubación varió de 2 a 5 horas dependiendo de la concentración de urea presente; ver Chevron, Figura 5A). Pasado este tiempo de incubación se llevaron a cabo ensayos de desplegamiento tal cual se describe en la sección 2.2.3.2. Brevemente, tomamos una alícuota de cada una de las muestras incubadas en presencia de urea y la diluimos en una disolución de guanidina 7.3 M (para los experimentos hechos a 10 mg/mL de proteína) y 8.1 M (en los experimentos a 7 mg/mL de proteína) termostatizada a 20°C en la célula del fluorímetro. La concentración final de proteína en la célula de medida fue 0.046 mg/mL en todos los casos. Después de añadir la proteína, homogeneizamos con la cánula de la pipeta automática y seguimos la cinética de desplegamiento mediante el aumento de la emisión de fluorescencia a 360 nm en el tiempo (ver Figuras 1A y 2A). En estos experimentos nuestro control es una disolución de proteína en tampón acuoso de manera que de la correspondiente cinética de desnaturalización obtendremos la amplitud que equivale al 100% nativo. Además debemos destacar que, al igual que se señaló en la sección 2.2.3.2, para cada ensayo de desplegamiento compensamos la cantidad final de urea en la célula de manera que en todos los casos la concentración de urea presente en la disolución final será siempre la misma,

asegurándose así que el tiempo de relajación no varíe por cambios en la composición del medio.

Una vez acabado el experimento se midió el índice de refracción de cada muestra para conocer la concentración exacta de urea mediante la expresión (2.10).

De los ensayos de desplegamiento realizados tenemos dos juegos de datos (cinéticas de desplegamiento) correspondientes a concentraciones de proteína de 7 y 10 mg/mL. Estos perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo medidos en las mismas condiciones, esto es, igual concentración de guanidina en la célula del fluorímetro e igual concentración de proteína en la disolución original incubada en presencia de urea, fueron analizados simultáneamente. La razón fundamental por la que llevamos a cabo este tipo de análisis se debe al ruido existente en nuestros perfiles cinéticos, que atribuimos al hecho de que en esta zona de pH (en torno a 2.9) la señal de fluorescencia cambia considerablemente al variar ligeramente aquel (ver sección 5.5).

Se usó el programa MLAB para realizar los ajustes globales de los perfiles obtenidos en las mismas condiciones a la ecuación de velocidad de primer orden [ecuación (2.31) con τ , I_{∞} y ΔI como parámetros ajustables] imponiendo como condición que el tiempo de relajación (τ) debe ser el mismo para todos ellos mientras que se permite que cada perfil cinético tenga sus propios valores para I_{∞} y ΔI (ver Figuras 1A y 2A). De esta manera se consigue una mejora sustancial con respecto al ajuste individual de cada cinética por separado. A continuación detallamos la subrutina concreta del ajuste global para n perfiles en el entorno MLAB:

```
M1=READ("nombre del fichero", número de filas,2)
```

```
. . . . .
```

```
Mn=READ (.....)
```

```
FUNCTION I1(t)=a[1]-b[1]*exp(-t/c)
```

```
FUNCTION I2(t)=a[2]-b[2]*exp(-t/c)
```

```

. . . .
. . . .
. . . .
FUNCTION In(t)=a[n]-b[n]*exp(-t/c)

FIT(A, B, c), I1 TO M1, I2 TO M2, ....., In to Mn

Z1=POINTS (I1, valor inicial de tiempo:valor final de tiempo:intervalo entre valores)
Z2=POINTS (I2, .....)
. . . .
. . . .
Zn=POINTS (In, .....)

```

Vemos como en la instrucción FIT figuran como parámetros ajustables A, B y c. Realmente A y B representan vectores formados por los valores de I_{∞} y ΔI respectivamente, correspondientes a cada cinética individual:

$$A = \begin{pmatrix} a[1] \\ a[2] \\ \vdots \\ a[n] \end{pmatrix} \quad B = \begin{pmatrix} b[1] \\ b[2] \\ \vdots \\ b[n] \end{pmatrix}$$

mientras que c es el valor del tiempo de relajación que imponemos constante a todos los perfiles, ya que como hemos indicado las condiciones de los ensayos son exactamente las mismas para todos ellos (ver Chevron, Figura 5A). Antes de aplicar la instrucción FIT debemos dar valores iniciales a todos los parámetros ajustables.

En todos los casos los ajustes a nuestros datos experimentales fueron excelentes (ver Figuras 1A y 2A).

5.1.2 Análisis del perfil ΔI versus C según el modelo de dos estados

El efecto de la concentración de urea, C, presente en la solución original sobre la amplitud (ΔI) de las cinéticas de desplegamiento observadas, cuando la concentración de proteína en la

solución original es 7 mg/mL se muestra en la Figura 1B. Este perfil de ΔI versus C fue analizado de acuerdo a la ecuación (3.9) utilizando el programa comercial MLAB. Los parámetros ajustables son tres: ΔI^0 , $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ y la subrutina del ajuste es similar a la descrita en la sección 3.2.2. Como se observa en la Figura 1B el ajuste fue excelente. Los valores obtenidos para $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ se recogen en la Tabla 1.

Debemos hacer notar que la ecuación (3.9) no implica la utilización de la extrapolación lineal aunque sí un mecanismo de desnaturalización de dos estados; en efecto, sólo se está considerando una dependencia lineal de ΔG con C en la región de la transición y no fuera de ella. No obstante, en este caso, el propósito principal del ajuste de dicha ecuación a los datos de ΔI versus C es la determinación, de manera fiable, del parámetro ΔI^0 (que es igual al valor de ΔI a concentraciones de desnaturalizante claramente por debajo de la zona de la transición, ver Figura 1B). A partir de éste podemos calcular la fracción molar de proteína en estado nativo dado que $x_N = \Delta I / \Delta I^0$ (para detalles ver sección 2.2.3.2). Los valores de x_N así calculados en función de la concentración de urea se representan en la Figura 11. Como ya hemos señalado en este tipo de cálculo **no se supone un modelo de dos estados** para el desplegamiento (Mücke y Schmid, 1994) de manera que constituye un excelente método para comprobar la validez de dicho modelo.

Para una concentración de proteína de 10 mg/mL en las soluciones originales incubadas en urea, sólo realizamos tres ensayos de desplegamiento en el rango de concentración de urea correspondiente a la zona de la transición (4.7, 5.7 y 6.2 M). Como obviamente no podemos disponer del perfil completo de ΔI versus C, en estos casos los valores de ΔI^0 necesarios para el cálculo posterior de x_N los obtuvimos de ensayos control en los que la proteína en tampón acuoso es transferida a las mismas condiciones, fuertemente desnaturalizantes, en la célula del fluorímetro. Los valores obtenidos para x_N aparecen en la Figura 11.

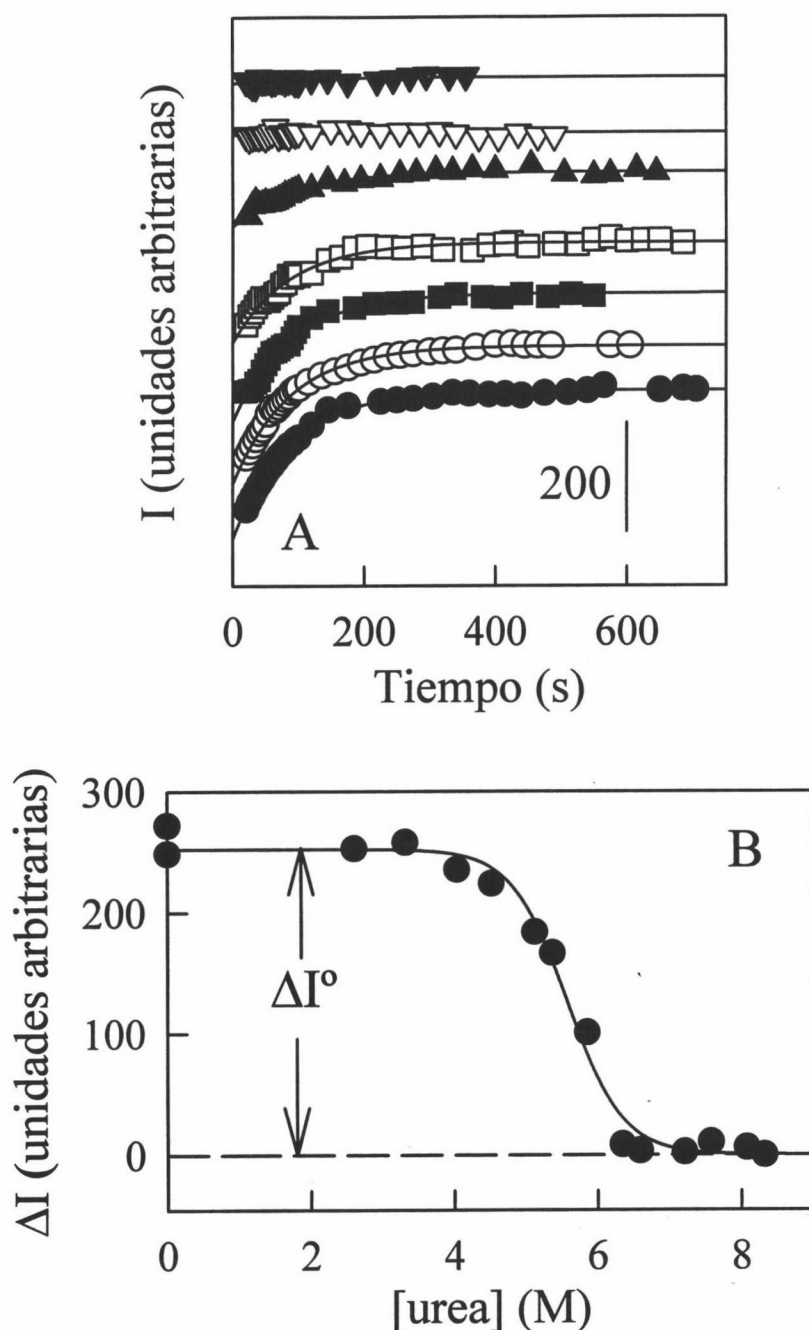


Figura 1: (A) Ejemplos de perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo registrados después de transferir una alícuota de lisozima, previamente incubada a 20 °C en una concentración dada de urea (en tampón citrato, pH 2.9) hasta que el equilibrio se haya establecido, a condiciones fuertemente desnaturizantes (8.1 M guanidina, tampón acetato sódico, pH 4.5, 20 °C). Las concentraciones de urea en las soluciones originales son: (●) 0, (○) 2.6, (■) 4.0, (□) 5.1, (▲) 5.8, (▽) 6.6 y (▼) 7.6 M. La concentración de proteína en la solución original fue de 7 mg/mL en todos los casos, y la concentración final en la célula de medida 0.046 mg/mL. Las líneas representan el mejor ajuste global de la ecuación (2.31) a todos los perfiles cinéticos de desplegamiento; en esta clase de análisis imponemos que el valor de τ debe ser el mismo para todas las cinéticas. (B) Amplitudes de desplegamiento, obtenidas del ajuste global de la ecuación (2.31) a las cinéticas de desplegamiento, en función de la concentración de urea. Estas amplitudes son proporcionales a la cantidad de proteína nativa en las soluciones originales. La línea continua representa el mejor ajuste de la ecuación (3.9) a dichos datos.

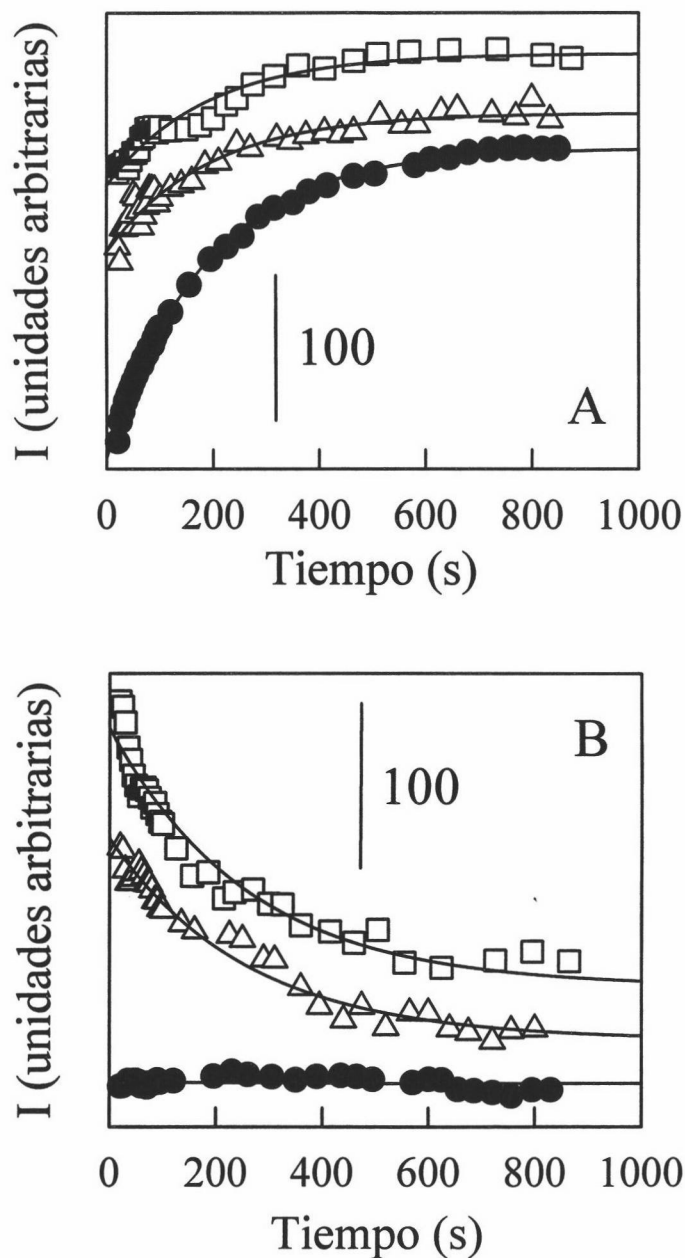


Figura 2: (A) Perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo registrados después de transferir una alícuota de lisozima, previamente incubada a 20 °C en una concentración dada de urea (en tampón citrato, pH 2.9) hasta que el equilibrio se haya establecido, a condiciones fuertemente desnaturizantes (7.3 M guanidina, tampón acetato sódico, pH 4.5, 20 °C). Las concentraciones de urea en las soluciones originales son: (●) 4.7, (Δ) 5.7 y (□) 6.2 M. La concentración de proteína en la solución original fue de 10 mg/mL en todos los casos, y la concentración final en la célula de medida 0.046 mg/mL. Las líneas representan el mejor ajuste global de la ecuación (2.31) a todos los perfiles cinéticos de desplegamiento; en esta clase de análisis imponemos que el valor de τ debe ser el mismo para todas las cinéticas. (B) Perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo registrados después de transferir una alícuota, de cada una de las disoluciones utilizadas en los ensayos de desplegamiento descritos en (A), a condiciones moderadamente nativas (3.2 M guanidina, tampón acetato sódico, pH 4.5, 20 °C). Los símbolos tienen el mismo significado que en (A). Las líneas representan el mejor ajuste global de la ecuación (2.34) a todos los perfiles cinéticos de repliegamiento; en esta clase de análisis imponemos que el valor de τ debe ser el mismo para todas las cinéticas.

5.2 EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR UREA ESTUDIADO MEDIANTE ENSAYOS DE REPLEGAMIENTO

Mediante el método cinético de los ensayos de replegamiento seguidos por fluorescencia, descrito en la sección 2.2.3.3, hemos determinado los perfiles de fracción de estado desplegado para lisozima en función de la concentración de urea, a 20 °C y para concentraciones de proteína de 7 y 10 mg/mL [recordemos que en los experimentos de Chen et al. (1996) la concentración de proteína era de 7 mg/mL].

Es importante destacar que tanto para los ensayos de replegamiento, que a continuación describimos, como para los de desplegamiento, detallados en el apartado anterior, las disoluciones originales fueron las mismas. Esto es, de cada muestra de proteína incubada a 20 °C en presencia de urea se realizaron ensayos de desplegamiento y replegamiento paralelamente.

5.2.1 Procedimiento experimental y Análisis global de los perfiles cinéticos

La lisozima fue dializada en tampón citrato sódico 100 mM, ClNa 100 mM pH 2.9 [condiciones de Chen et al. (1996)], preparado según se indica en la sección 2.2.1.1. La disolución concentrada de urea se preparó en las mismas condiciones, esto es, citrato sódico 100 mM, ClNa 100 mM pH 2.9 según el procedimiento B) explicado en el apartado 2.2.1.2. La disolución de guanidina en acetato sódico 50 mM pH 4.5 se preparó según se indica en 2.2.1.2, procedimiento A). Los parámetros instrumentales se recogen en el apartado 2.2.3.1.

Realizamos ensayos de replegamiento (ver detalles en la sección 2.2.3.3) a muestras de lisozima a 7 mg/mL y 10 mg/mL incubadas en presencia de diferentes concentraciones de urea a 20 °C hasta alcanzarse el equilibrio. En cada caso el ensayo se inicia al diluir una alícuota de cada una de estas muestras a condiciones moderadamente nativas, en concreto 3.2 M guanidina

20 °C en la célula de medida del fluorímetro. En estas condiciones el proceso de replegamiento se describe de manera adecuada mediante el modelo de dos estados ya que los intermedios cinéticos en el replegamiento de lisozima llegan a poblarse significativamente a concentraciones menores a 3.2 M guanidina (ver Figura 3 en Kiefhaber, 1995); es por esto que en nuestro Chevron a 20 °C (Figura 3.19) no llegamos a detectar la presencia de intermedios cinéticos, que se reflejaría en una clara curvatura de la rama correspondiente al proceso de replegamiento.

La concentración final de proteína fue de 0.046 mg/mL en todos los casos. Después de homogeneizar la disolución con la cánula de la pipeta automática seguimos el descenso en la emisión de fluorescencia a 360 nm en función del tiempo (ver Figuras 3A y 2B). En estas condiciones el replegamiento de la proteína previamente incubada en condiciones desnaturizantes de urea se describe mediante una única exponencial, con un tiempo de relajación de varios minutos (ver Chevron, Figura 5A).

En este tipo de experimentos el control, cuya cinética de replegamiento nos dará la amplitud que corresponde al 100% de estado desplegado, es proteína en alta concentración de guanidina (en torno a 7 M). En todos los ensayos se llevó a cabo el sistema de compensación ya comentado, de manera que la cantidad de urea y guanidina final en la célula para todos ellos fuera la misma.

Una vez acabado el experimento se midió el índice de refracción de cada muestra para conocer la concentración exacta de urea mediante la expresión (2.10).

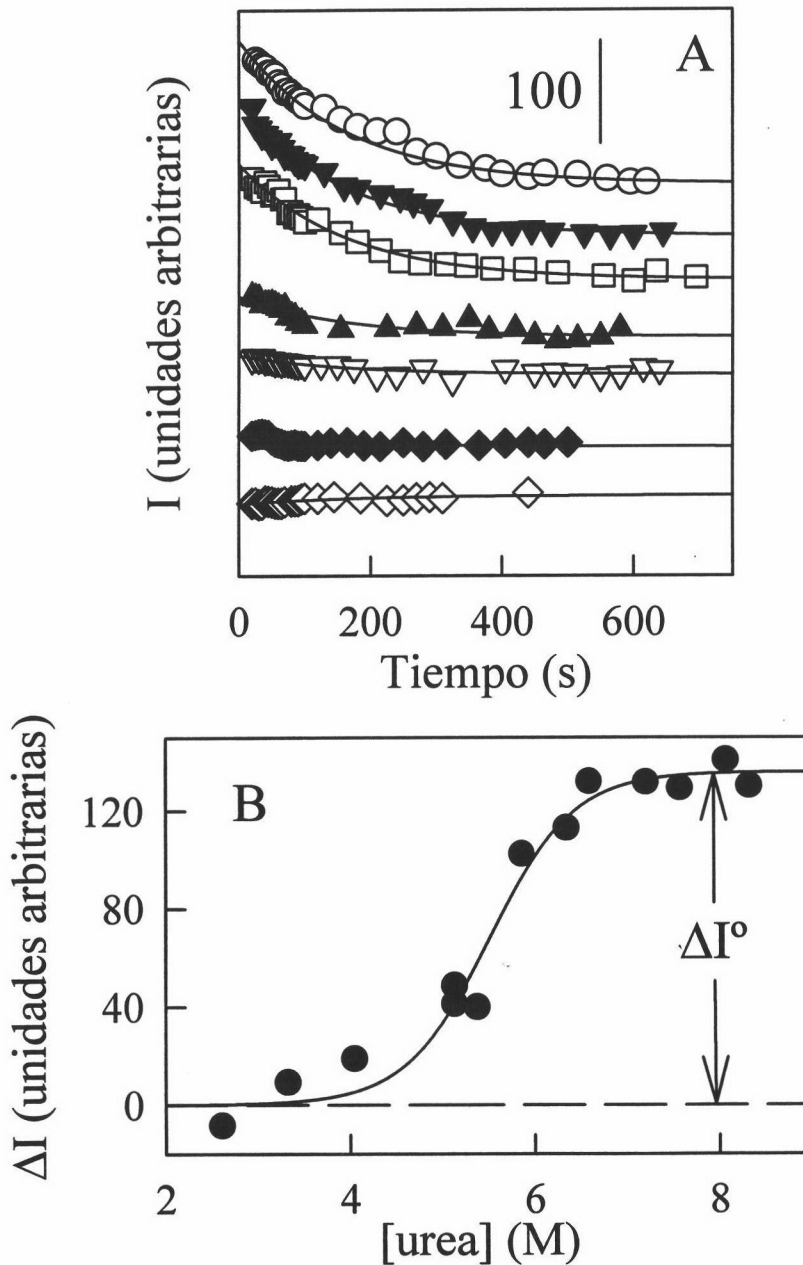


Figura 3: (A) Ejemplos de perfiles de intensidad de fluorescencia en función del tiempo registrados después de transferir una alícuota de lisozima, previamente incubada a 20 °C en una concentración dada de urea (en tampón citrato, pH 2.9) hasta que el equilibrio se haya establecido, a condiciones moderadamente nativas (3.2 M guanidina, tampón acetato sódico, pH 4.5, 20 °C). Las concentraciones de urea en las soluciones originales son: (\blacktriangledown) 7.6, (\square) 6.3, (\blacktriangle) 5.4, (∇) 4.0, (\blacklozenge) 3.3 y (\diamond) 2.6 M. Los datos representados como (\circ) corresponden a un experimento control en el que la proteína había sido incubada en presencia de una alta concentración de guanidina (7.5 M) en tampón acetato sódico, pH 4.5. La concentración de proteína en la solución original fue de 7 mg/mL en todos los casos, y la concentración final en la célula de medida 0.046 mg/mL. Las líneas representan el mejor ajuste global de la ecuación (2.34) a todos los perfiles cinéticos de replegamiento; en esta clase de análisis imponemos que el valor de τ debe ser el mismo para todas las cinéticas. (B) Amplitudes de replegamiento obtenidas del ajuste global de la ecuación (2.34) a las cinéticas de replegamiento, en función de la concentración de urea. La línea continua representa el mejor ajuste de la ecuación (1) a dichos datos.

Así pues disponemos de dos juegos de datos (cinéticas de replegamiento) correspondientes a 7 y 10 mg/mL respectivamente. Al igual que hicimos en los ensayos de desplegamiento (ver sección 5.1.1) llevamos a cabo un análisis simultáneo de todos los perfiles de intensidad de fluorescencia *versus* tiempo obtenidos en las mismas condiciones finales y para cada concentración de urea según la ecuación de velocidad de primer orden (2.34); así se minimiza de alguna manera el ruido en nuestros perfiles debido, creemos, a que en torno al pH de trabajo pequeños cambios en éste ocasionan una gran variación en la señal de fluorescencia (ver sección 5.5). La subrutina del análisis global dentro del entorno MLAB es similar a la descrita para los ensayos de desplegamiento (ver sección 5.1.1) con la salvedad de que en el caso del proceso de replegamiento la fluorescencia disminuye con el tiempo de manera que la ecuación de velocidad de primer orden se verá modificada ligeramente.

5.2.2 Análisis del perfil de ΔI versus C según el modelo de dos estados

El perfil de los valores de ΔI resultantes del ajuste global *versus* concentración de urea para las muestras a 7 mg/mL de proteína (Figura 3B) fue analizado de acuerdo al modelo de dos estados según la siguiente ecuación:

$$\Delta I = \frac{\Delta I^0 e^{m_{1/2}(C-C_{1/2})/RT}}{1 + e^{m_{1/2}(C-C_{1/2})/RT}} \quad (1)$$

siendo $m_{1/2}$, $C_{1/2}$ y ΔI^0 los parámetros ajustables. El objetivo principal de este análisis es determinar el valor de ΔI^0 , la amplitud de replegamiento correspondiente a 100% de estado desplegado, que es igual a ΔI a concentraciones de desnaturizante claramente superiores a la zona de la transición. Como se observa en la Figura 3B el ajuste fue excelente; los valores

obtenidos para $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ se muestran en la Tabla 1. La fracción molar de proteína que se encuentra en estado desplegado en las disoluciones originales se calcula como $x_D = \Delta I / \Delta I^0$ (por supuesto, x_D así calculado puede incluir, quizás, la cantidad de estado intermedio en rápido equilibrio con el “verdadero” estado desplegado en las condiciones del ensayo de replegamiento; ver sección 2.2.3.3). Para comparar con el resto de los resultados experimentales de que disponemos, en la Figura 11 hemos representado $x_N = 1 - x_D$.

Además realizamos tres ensayos de replegamiento a disoluciones de proteína a 10 mg/mL (las mismas que las utilizadas para los ensayos de desplegamiento) en presencia de urea (ver Figura 2B). En estos casos, el valor de ΔI^0 para calcular x_D se obtuvo de la media de diferentes ensayos control.

En la Figura 11 aparecen los correspondientes valores de x_N calculados como $1 - x_D$.

5.3 CINÉTICAS DE PLEGAMIENTO-DESPLEGAMIENTO INDUCIDAS POR SALTOS EN LA CONCENTRACIÓN DE UREA

Hemos caracterizado las cinéticas de replegamiento-desplegamiento inducido mediante saltos a diferentes concentraciones de urea, siguiendo la emisión de fluorescencia a 360 nm de lisozima a 20 °C.

5.3.1 Procedimiento experimental y Análisis de los perfiles cinéticos

La proteína fue dializada exhaustivamente en tampón citrato sódico 100 mM, ClNa 100 mM pH 2.9 preparado según se detalla en la sección 2.2.1.1. Las disoluciones concentradas de urea (en torno a 9 M) y guanidina (sobre 8 M) se prepararon siguiendo el procedimiento B)

descrito en el apartado 2.2.1.2. Las condiciones experimentales relativas al fluorímetro son las detalladas en 2.2.3.1.

Los valores de la constante cinética en función de la concentración de urea se han determinado mediante dos procedimientos:

1. *Caracterización de las cinéticas en la dirección del plegamiento y desplegado por fluorescencia.*

El procedimiento experimental es básicamente el descrito en el apartado 3.3.1. Brevemente; para las *cinéticas en la dirección del desplegado* partimos de una disolución de aproximadamente 1 mg/mL de proteína en tampón acuoso pH 2.9, de manera que transferimos una alícuota a diferentes concentraciones desnaturalizantes de urea (desde la $C_{1/2}$ hasta 9 M aproximadamente) y seguimos el aumento de fluorescencia en el tiempo a 20 °C (ver Figura 4B). En el caso de las *cinéticas en la dirección del replegado* partimos de una disolución de lisozima de concentración 0.54 mg/mL en 8 M urea que ha sido incubada a 20 °C durante unas 2 horas (ver Chevron, Figura 5A). A continuación seguimos el descenso de fluorescencia en función del tiempo a 20 °C después de transferir una alícuota hasta disoluciones de diferente concentración de urea ($C_{1/2}$ -3 M); ver Figura 4A.

La concentración de proteína en la disolución final fue de 0.046 mg/ml todos los casos.

A partir de las cinéticas correspondientes a la dirección del plegamiento y desplegado obtenidas a diferentes concentraciones de urea hemos determinado las constantes de velocidad aparentes de plegamiento-desplegado (k_F - k_D). El análisis de los perfiles cinéticos se llevó a cabo de la manera descrita en el apartado 3.3.1 mediante la ecuación de velocidad de primer

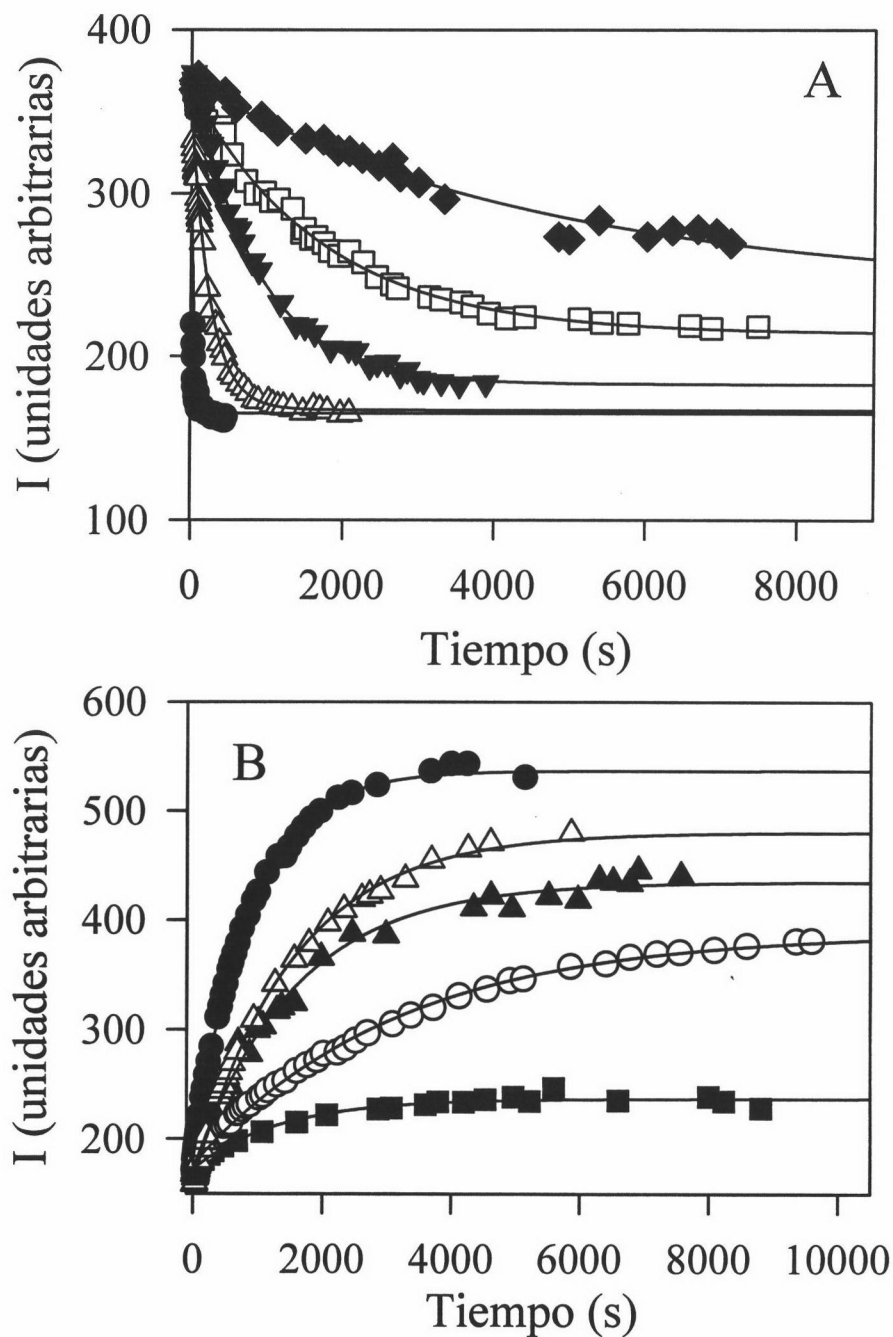


Figura 4: (A) Perfiles cinéticos en la dirección del replegamiento, registrados a 20 °C después de transferir una alícuota de lisozima desplegada en 8 M urea, pH 2.9, 0.54 mg/mL hasta disoluciones de concentración de urea igual a: (●) 2.72, (Δ) 4.16, (▼) 4.76, (□) 5.25 y (◆) 5.6 M. La concentración final de proteína en la célula de medida fue de 0.046 mg/mL. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.34). (B) Perfiles cinéticos en la dirección del desplegamiento registrados a 20 °C después de transferir una alícuota de lisozima nativa (en tampón citrato sódico, pH 2.9, 1 mg/mL) hasta disoluciones de concentración de urea igual a: (■) 5.12, (○) 6.10, (▲) 7.08, (Δ) 7.82 y (●) 8.8 M. La concentración final de proteína en la célula de medida fue de 0.046 mg/mL. Las líneas continuas representan el ajuste a los datos experimentales según la ecuación (2.31).

orden, siendo I_{∞} , ΔI y τ los parámetros ajustables. Los ajustes de dicha ecuación a los datos experimentales de intensidad de fluorescencia en función del tiempo fueron muy buenos en todos los casos (ver Figura 4).

2. Experimentos de interrupción del desplegamiento.

Básicamente se trata de una versión cinética de los ensayos de desplegamiento: la proteína nativa se transfiere a una disolución de urea de una molaridad dada (en concreto hicimos experimentos a 5.49, 5.98, 7.08 y 8.07 M), termostaticada a 20 °C, de manera que la concentración de proteína final sea 7 mg/mL. Homogeneizamos rápidamente con la cánula de la pipeta y realizamos ensayos de desplegamiento a alicuotas de dicha disolución, tomadas a intervalos de tiempo determinados (el tiempo empieza a contar al mezclar la proteína con la disolución de desnaturizante). Cada alicuota se diluye en condiciones fuertemente desnaturizantes en la célula del fluorímetro (en torno a 7.5 M guanidina pH 4.5, 20 °C), para seguir la cinética de desplegamiento mediante medidas de intensidad de fluorescencia en el tiempo como se muestra en las Figuras 6, 7, 8 y 9. La concentración final de proteína en la cubeta fue 0.046 mg/mL en todos los casos. Al igual que en los ensayos de desplegamiento, en este tipo de experimentos es necesario disponer de muestras control (proteína en tampón acuoso) para determinar la amplitud correspondiente al 100% nativo a partir de la cinética de desplegamiento en las mismas condiciones (en torno a 7.5 M guanidina pH 4.5, 20 °C). En todos los casos se compensó la cantidad de urea necesaria para igualar las condiciones finales de los ensayos. Sistemáticamente una vez acabado el experimento se midió el índice de refracción de cada muestra para conocer la concentración exacta de urea mediante la expresión (2.10).

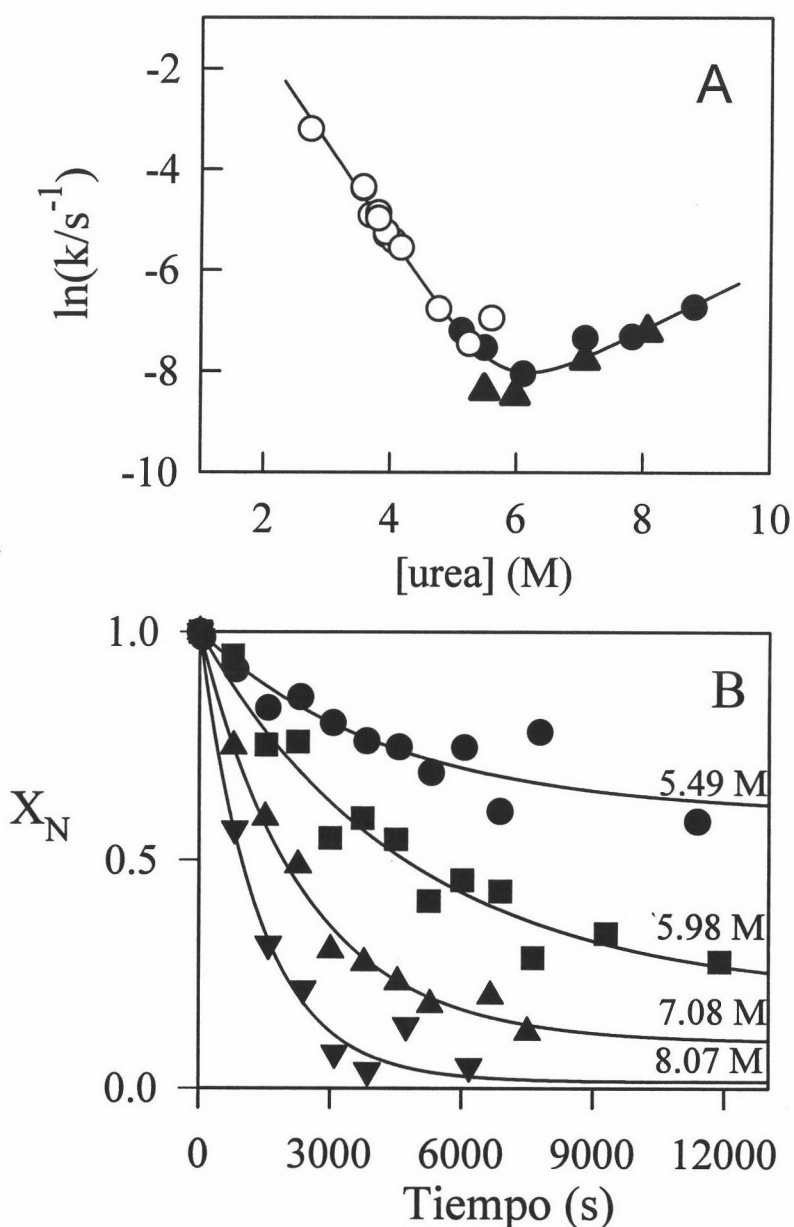


Figura 5: (A) Dependencia de las constantes de velocidad de plegamiento-desplegamiento de lisozima en función de la concentración de urea (representación denominada Chevron), a 20 °C. Los datos se obtuvieron de: (●) experimentos cinéticos en la dirección de desplegamiento (Figura 4B), (○) experimentos cinéticos en la dirección del replegamiento (Figura 4A) y (▲) valores calculados a partir de experimentos de interrupción del desplegamiento que se muestran en (B). La línea continua representa el ajuste de las ecuaciones (3.11), (3.13) y (3.14) a los datos. (B) Cinéticas de desplegamiento inducido por urea, de lisozima en tampón citrato pH 2.9, estudiadas mediante experimentos de interrupción del desplegamiento. Las fracciones molares de proteína nativa (x_N) que se muestran han sido determinadas a partir de ensayos de desplegamiento. Las líneas son los mejores ajustes de la ecuación (2) a los datos; los números junto a los perfiles indican la concentración de urea en la solución original.

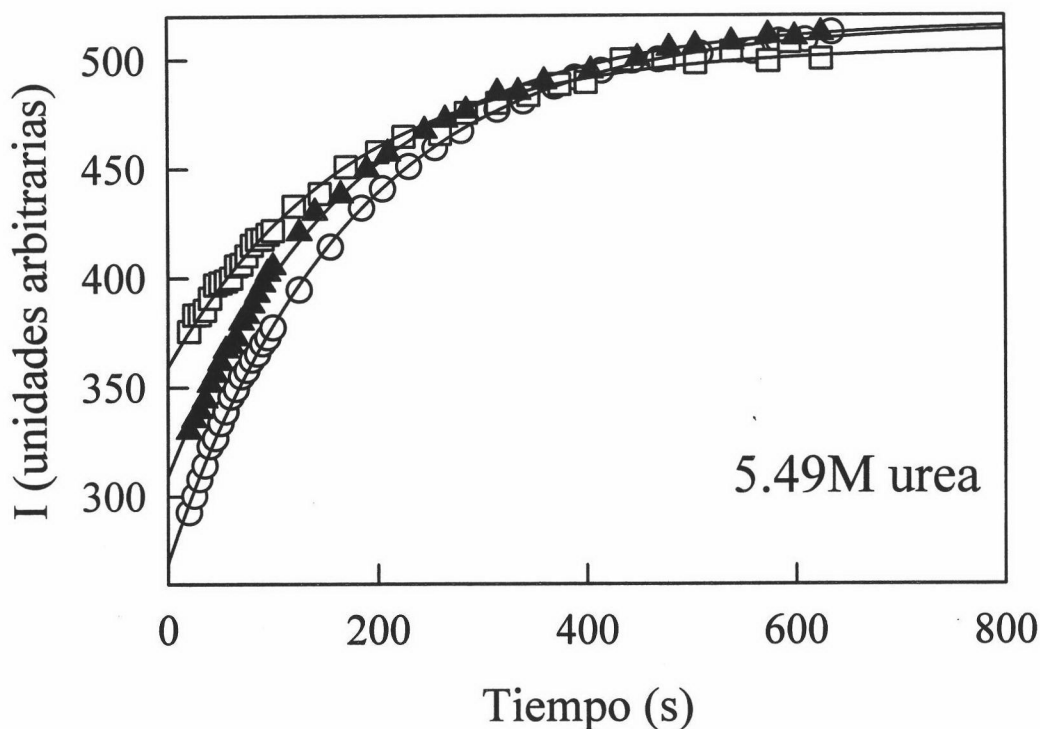


Figura 6: Perfiles cinéticos correspondientes a ensayos de desplegamiento realizados a intervalos de tiempo determinados [(O) 1min 3s, (\blacktriangle) 26min 10s, (\square) 3h 9min 40s] una vez mezclada la lisozima en la disolución 5.49 M urea, tampón citrato pH 2.9, 20 °C. Estas alícuotas se diluyen en condiciones fuertemente desnaturizantes (7.5 M guanidina, pH 4.5, 20 °C, 0.046 mg/mL) para seguir la cinética de desplegamiento. Las líneas continuas representan el ajuste global de la ecuación (2.31) a todos los perfiles cinéticos de desplegamiento; en esta clase de análisis imponemos que el valor de τ debe ser el mismo para todas las cinéticas.

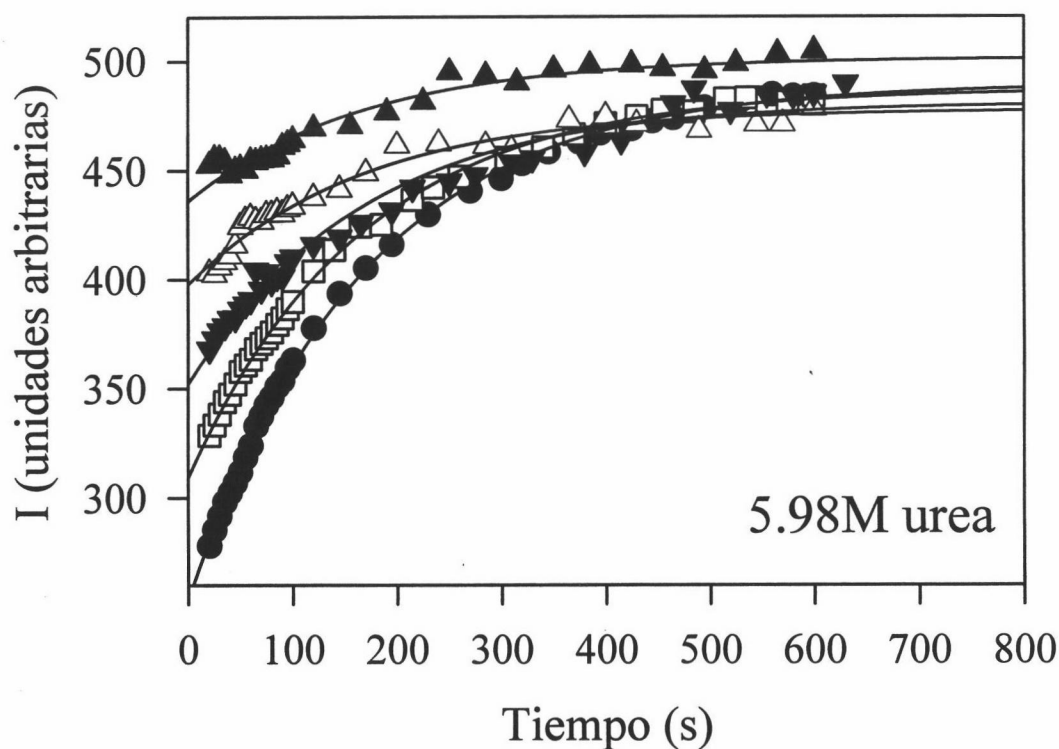


Figura 7: Perfiles cinéticos correspondientes a ensayos de desplegamiento realizados a intervalos de tiempo determinados [(●) 30s, (□) 25min 30s, (▼) 1h 14min 55s, (Δ) 2h 35min, (▲) 3h 18min 10s] una vez mezclada la lisozima en la disolución 5.98 M urea, tampón citrato pH 2.9, 20 °C. Estas alícuotas se diluyen en condiciones fuertemente desnaturizantes (7.5 M guanidina, pH 4.5, 20 °C, 0.046 mg/mL) para seguir la cinética de desplegamiento. Las líneas continuas representan el ajuste global de la ecuación (2.31) a todos los perfiles cinéticos de desplegamiento; en esta clase de análisis imponemos que el valor de τ debe ser el mismo para todas las cinéticas.

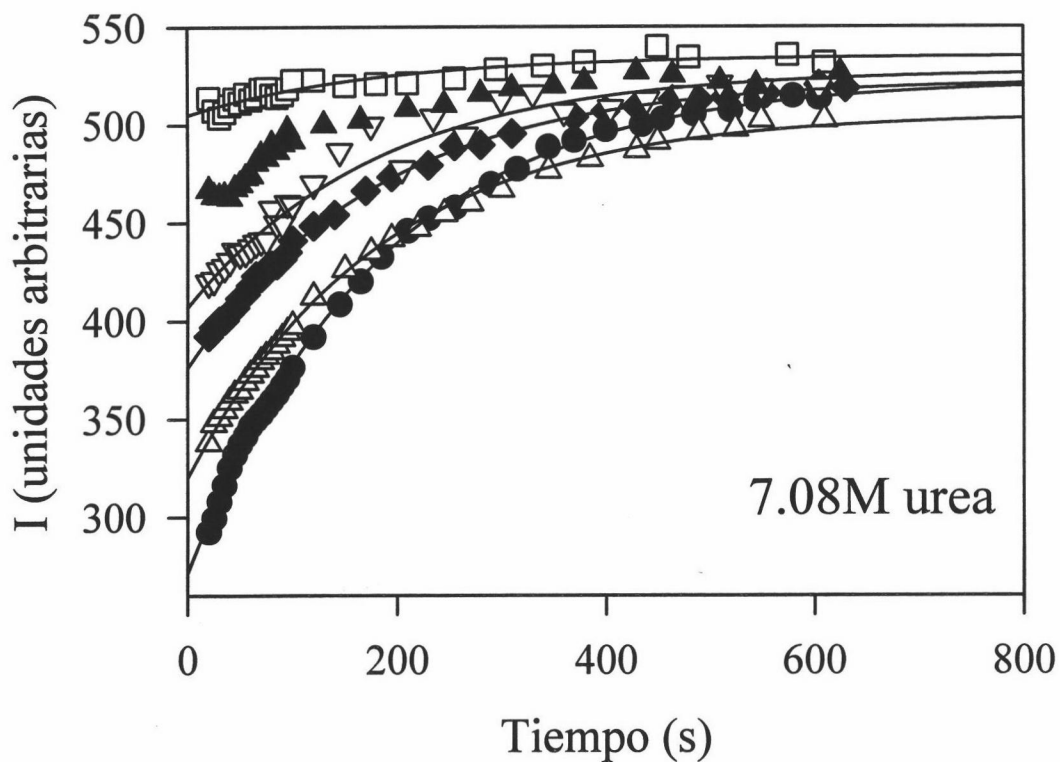


Figura 8: Perfiles cinéticos correspondientes a ensayos de desplegamiento realizados a intervalos de tiempo determinados [(●) 35s, (▲) 13min, (◆) 25min 10s, (▽) 37min 40s, (▲) 50min 10s, (□) 2h 5min 10s] una vez mezclada la lisozima en la disolución 7.08 M urea, tampón citrato pH 2.9, 20 °C. Estas alícuotas se diluyen en condiciones fuertemente desnaturizantes (7.5 M guanidina, pH 4.5, 20 °C, 0.046 mg/mL) para seguir la cinética de desplegamiento. Las líneas continuas representan el ajuste global de la ecuación (2.31) a todos los perfiles cinéticos de desplegamiento; en esta clase de análisis imponemos que el valor de τ debe ser el mismo para todas las cinéticas.

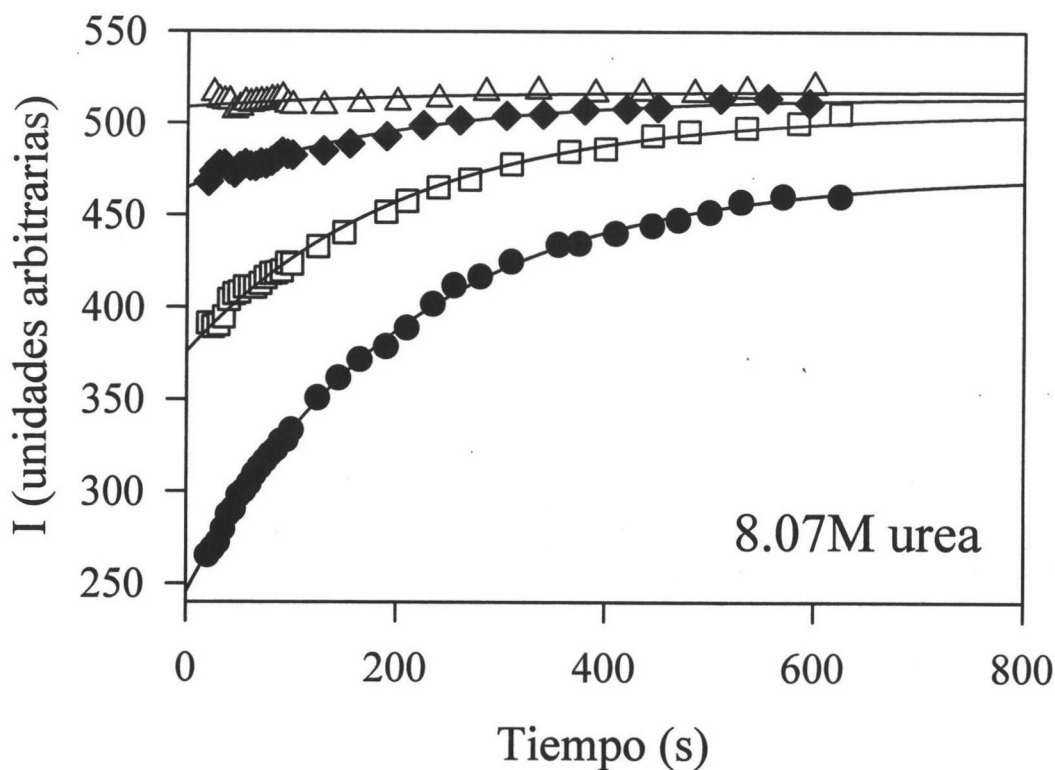


Figura 9: Perfiles cinéticos correspondientes a ensayos de desplegamiento realizados a intervalos de tiempo determinados [(●) 35s, (□) 13min 32s, (◆) 39min 40s, (Δ) 1h 4min 18s] una vez mezclada la lisozima en la disolución 8.07 M urea, tampón citrato pH 2.9, 20 °C. Estas alícuotas se diluyen en condiciones fuertemente desnaturizantes (7.5 M guanidina, pH 4.5, 20 °C, 0.046 mg/mL) para seguir la cinética de desplegamiento. Las líneas continuas representan el ajuste global de la ecuación (2.31) a todos los perfiles cinéticos de desplegamiento; en esta clase de análisis imponemos que el valor de τ debe ser el mismo para todas las cinéticas.

Las cinéticas correspondientes a estos experimentos de interrupción del desplegamiento a una concentración de urea dada, junto con los correspondientes controles (proteína en tampón acuoso), fueron analizadas simultáneamente, según la ecuación (2.31), imponiendo un valor para el tiempo de relajación común a todas ellas, dado que las condiciones finales en la célula del fluorímetro fueron iguales (para detalles del ajuste ver 5.1.1). En las Figuras 6, 7, 8 y 9 se muestran los ajustes de las cinéticas seguidas para 5.49, 5.98, 7.08 y 8.07 M urea, respectivamente. En la siguiente tabla se recogen los valores de τ resultantes del ajuste global realizado para cada concentración de urea. Los ΔI^0 que aparecen son el valor medio de los ΔI , que resultan del análisis global, correspondientes a los distintos experimentos control y representan la amplitud correspondiente al 100% nativo:

[urea]	5.49M	5.98M	7.08M	8.07M
τ (s)	172.11	165.94	180.12	203.91
ΔI^0 (ua)	249.19	235.79	247.11	229.04

En la Figura 5B se muestran los perfiles de x_N (calculada como $\Delta I/\Delta I^0$ en cada caso) *versus* tiempo, obtenidos a partir de los experimentos de interrupción del desplegamiento realizados a distintas concentraciones de urea. Estos fueron analizados de acuerdo a la siguiente ecuación de velocidad de primer orden:

$$x_N(t) = x_{N,\infty} + (1 - x_{N,\infty}) \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

siendo $x_{N,\infty}$ (la fracción molar de estado nativo en el equilibrio) y k los parámetros ajustables. Para el análisis de los datos experimentales se usó el programa comercial MLAB; la subrutina empleada se describe a continuación:

M=READ("nombre del fichero", número de filas, 2)

FUNCTION X(t)=X_N+(1-X_N)·exp(-k·t)

FIT (X_N, k), X TO M

Z=POINTS(X,0:valor final del tiempo:intervalo entre valores de tiempo)

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

[urea]	5.49M	5.98M	7.08M	8.07M
X _{N,∞}	0.60	0.19	0.10	0.02
τ' (s)	4366	4797	2382	1372

En este caso hemos denominado al tiempo de relajación τ' para que no sea confundido con el tiempo de relajación de los ensayos de desplegamiento en alta concentración de guanidina (τ). Así pues $1/\tau'$ dará la constante aparente de velocidad del desplegamiento de lisozima en una concentración dada de urea (ver Figura 5A), como veremos en el siguiente apartado.

5.3.2 Análisis según el modelo cinético de dos estados

En la Figura 5A se muestra la dependencia del logaritmo neperiano de las constantes de velocidad aparentes ($k=1/\tau$ para las cinéticas en la dirección del plegamiento-desplegamiento y $k=1/\tau'$ para los experimentos de interrupción del desplegamiento) obtenidas por los dos procedimientos experimentales descritos en el apartado anterior *versus* tiempo, representación que como ya hemos comentado anteriormente se conoce con el nombre de Chevron (los detalles acerca de las características de esta representación así como el análisis de este perfil según el modelo cinético de dos estados se recogen en la sección 3.3.2). Si lo comparamos con los Chevrons en guanidina (ver Figura 3.19) vemos que existe algo más de ruido, hecho que

atribuimos a que en esta zona de pH (en torno a 2.9) la fluorescencia depende fuertemente de éste, de manera que pequeños cambios en el pH pueden ocasionar grandes variaciones en la señal que medimos (ver sección 5.5).

El ajuste no lineal por mínimos cuadrados de las ecuaciones (3.11), (3.13) y (3.14) a dicho perfil fue excelente como se observa en la Figura 5A. En la Tabla 1 se muestran los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ obtenidos como resultado del análisis del Chevron en urea a 20 °C. Hemos usado dichos valores en las ecuaciones (3.5), (3.7) y (1.8) para determinar el perfil de x_N versus concentración de urea que se incluye en la Figura 11. Las barras de error que aparecen se han calculado mediante propagación lineal de errores a partir de los estimados para $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ (ver Tabla 1).

5.4 ESTUDIO POR FLUORESCENCIA DEL EQUILIBRIO DE DESNATURALIZACIÓN DE LISOZIMA INDUCIDO POR UREA

Hemos estudiado el desplegamiento de lisozima inducido por urea a pH 2.9 y 20 °C, en el equilibrio. Disponemos de datos obtenidos según diferentes enfoques experimentales (en todos ellos la concentración de proteína fue 0.046 mg/mL):

- valores de intensidad de fluorescencia de muestras incubadas en urea medidas una vez se ha alcanzado el equilibrio. El procedimiento experimental es similar al descrito en el apartado 3.1.1. En este caso el tiempo de incubación fue de unas 4 horas (ver Chevron, Figura 5A).

- valores de intensidad de fluorescencia en el infinito, I_∞ , obtenidos del análisis de los perfiles cinéticos correspondientes a la dirección del plegamiento y desplegamiento (ver sección 5.3).

El perfil resultante se analizó siguiendo el modelo de dos estados [ecuación (4.2)].

Para minimizar la incertidumbre asociada con la determinación de las líneas base hemos incluido además en este análisis:

-los valores de intensidad de fluorescencia para el estado desplegado (I_D) calculados mediante extrapolación a tiempo cero de los perfiles cinéticos correspondientes al proceso de replegamiento, inducido por saltos en la concentración de urea desde condiciones desnaturalizantes (8 M urea, pH 2.9) descritos en el apartado 5.3; ver también Figura 3A.

- los valores de intensidad para el estado nativo (I_N) obtenidos por extrapolación a tiempo cero de los perfiles cinéticos correspondientes al proceso de desplegamiento, inducido por saltos en la concentración de urea desde condiciones nativas (tampón acuoso, pH 2.9) descritos en el apartado 5.3; ver además Figura 1A.

De esta manera, la ventaja principal es que los valores de I_N e I_D expanden el rango de concentración de urea en el que tenemos información experimental (ver Figura 10) y es posible tener en cuenta en el análisis la posible no-linealidad de la dependencia de I_D con C . Así pues, hemos realizado dos análisis paralelos, en uno considerando una dependencia lineal de las líneas base nativa y desplegada con la concentración de urea (Figura 10A) y en el otro considerando una línea base cuadrática para el estado desplegado (Figura 10B). Los parámetros ajustables son seis en el primer caso (esto es, cuatro que definen las dos líneas base además de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$) y siete en el segundo.

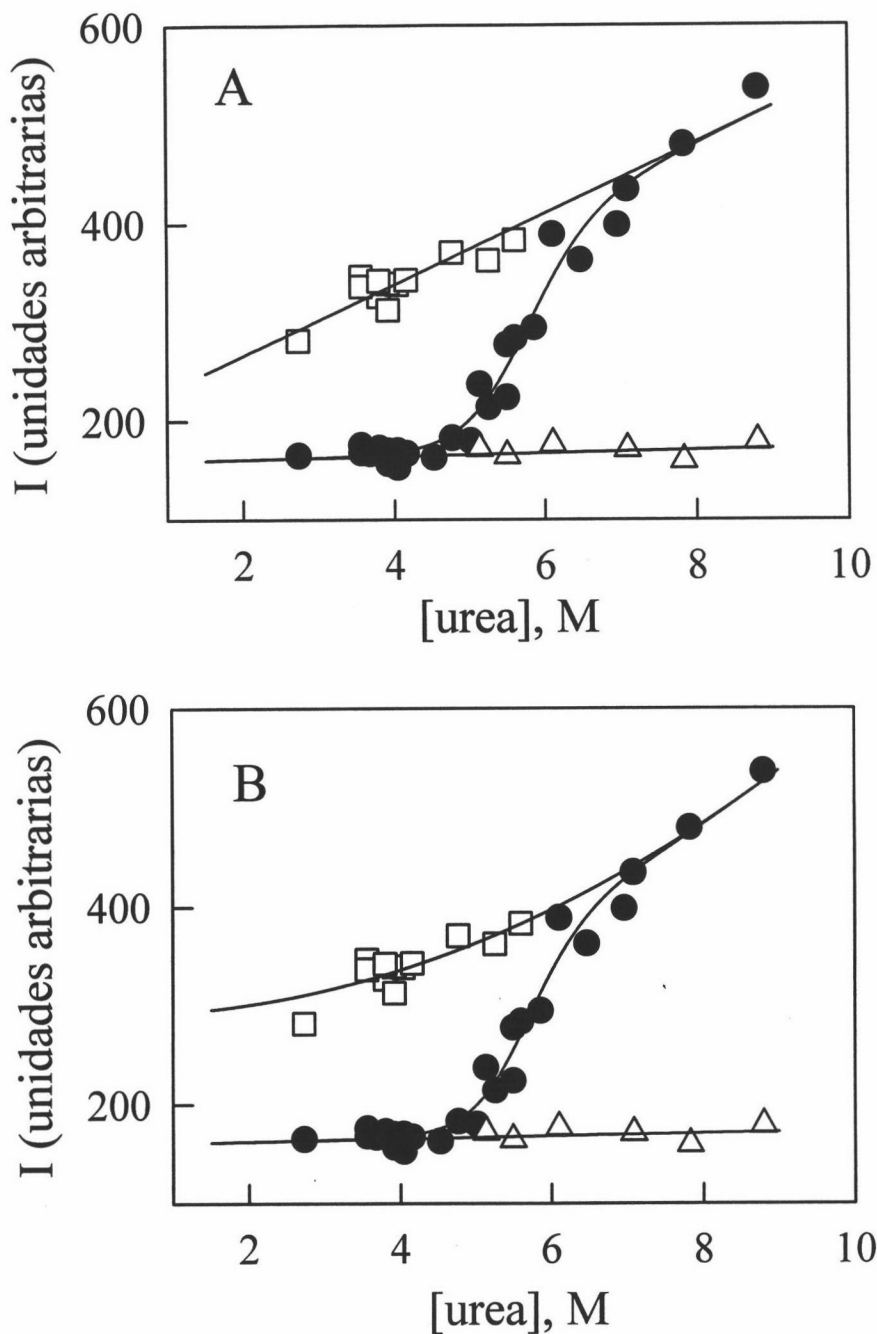


Figura 10: Equilibrio de desplegamiento inducido por urea, de lisozima en tampón citrato pH 2.9, estudiado mediante medidas de emisión de fluorescencia. Los datos que se incluyen son: (●) valores de intensidad de fluorescencia de muestras en el equilibrio, (□) valores de intensidad correspondientes al estado desplegado, calculados como extrapolaciones a tiempo cero de los perfiles cinéticos en la dirección del repliegamiento registrados al transferir la proteína desde condiciones fuertemente desnaturizantes (8 M urea, tampón citrato pH 2.9), (△) valores de intensidad para el estado nativo, calculados como extrapolaciones a tiempo cero de los perfiles cinéticos en la dirección del desplegamiento registrados al transferir la proteína desde condiciones nativas (tampón citrato, pH 2.9, 0 M urea). En todos los casos (●, □, △) la concentración de proteína fue de 0.046 mg/mL. (A) Las líneas continuas representan el mejor ajuste simultáneo de la ecuación (4.2) y las ecuaciones lineales para las líneas base nativa y desplegada a los datos experimentales de I , I_N e I_D , respectivamente. En (B) se muestra el mismo análisis global pero suponiendo una línea base desplegada cuadrática.

Para el análisis global de los datos de equilibrio en el entorno MLAB las ecuaciones fueron las siguientes:

```

M1=READ("fichero de IN por extrapolación a tiempo cero", número de filas, 2)
M2=READ("fichero de ID por extrapolación a tiempo cero", número de filas, 2)
M3=READ("fichero de I en el equilibrio", número de filas, 2)
R=0.008314
FUNCTION IN(C)=a+b·C
FUNCTION ID(C)=d+f·C
FUNCTION I(C)=(IN(C)+ID(C)·K(C))/(1+K(C))
FUNCTION K(X)=EXP(-ΔG(C)/R·293.15)
FUNCTION ΔG(X)=-M·(C-E)
FIT(a, b, d, f, M, E), IN TO M1, ID TO M2, I TO M3
Z1=POINTS (IN, 0:9:0.1)
Z2=POINTS (ID, 0:9:0.1)
Z3=POINTS (I, 0:9:0.1)

```

En el caso en el que consideramos la línea base para el estado desplegado como un polinomio de segundo orden:

```

FUNCTION ID(C)=d+f·C+j·C2
FIT (a, b, d, f, j, M, E), IN TO M1, ID TO M2, I TO M3

```

Los resultados de ambos ajustes globales se muestran en la Figura 10A y B, respectivamente; en la Tabla 1 se recogen los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ que se derivan del análisis de los datos de fluorescencia. Vemos que no hay una diferencia significativa al considerar la línea base para D lineal o cuadrática.

En la Figura 11 se muestra el perfil de x_N versus C calculado usando $x_N=(I_D-I)/(I_D-I_N)$ y considerando I_N e I_D lineales con C.

TABLA 1: Valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ correspondientes al desplegamiento inducido por urea de lisozima a pH 2.9

Tipo de experimento	Concentración de proteína (mg/mL)	$C_{1/2}$ (M)	$m_{1/2}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)
ensayos de desplegamiento	7	5.58 ± 0.04	6.7 ± 0.7
ensayos de desplegamiento	10	5.69 ± 0.14	---a
ensayos de replegamiento	7	5.51 ± 0.07	5.3 ± 0.8
ensayos de replegamiento	10	5.53 ± 0.04	---b
Chevron	0.046	5.75 ± 0.23	6.0 ± 0.5
fluorescencia con línea base lineal	0.046	5.69 ± 0.06	5.6 ± 0.8
fluorescencia con línea base cuadrática	0.046	5.63 ± 0.06	6.3 ± 1.0
análisis global de datos de R_g y CD	---	5.51 ± 0.06	5.3 ± 0.4

^a No se pudo obtener un valor fiable de $m_{1/2}$ ya que sólo disponemos de tres experimentos.

^b Ver Chen et al. (1996) para las concentraciones utilizadas.

Los errores asociados a cada parámetro son los elementos diagonales de la matriz covarianza. Representan un límite inferior de manera que probablemente la incertidumbre asociada a dichos parámetros sea algo mayor.

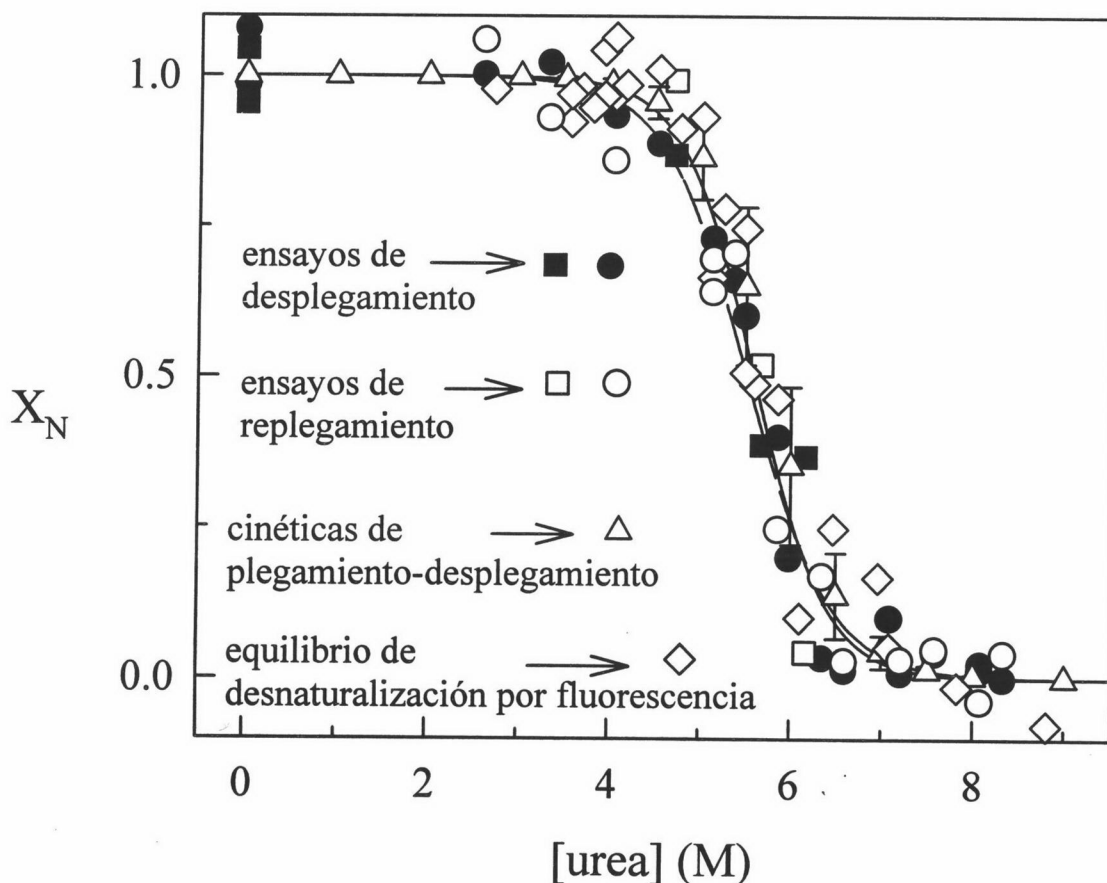


Figura 11: Perfil de fracción molar de proteína nativa en equilibrio versus concentración de urea, para lisozima en tampón citrato, pH 2.9. (●) Valores calculados de ensayos de desplegamiento realizados a disoluciones cuya concentración en proteína era 7 mg/mL, (■) valores que proceden de ensayos de desplegamiento en donde la concentración de proteína era de 10 mg/mL, (○) valores calculados como $(1-x_D)$ de ensayos de replegamiento (Figura 3) con una concentración de proteína en la solución original de 7 mg/mL, (□) valores calculados como $(1-x_D)$ de ensayos de replegamiento con una concentración de proteína en la solución original de 10 mg/mL, (◇) valores calculados a partir del perfil de desplegamiento estudiado mediante medidas de intensidad de fluorescencia (Figura 10) usando $x_N = (I_D - I)/(I_D - I_N)$, donde I_N e I_D vienen dados por las líneas base lineales (el uso de la línea base cuadrática para I conduce básicamente al mismo resultado), (△) valores obtenidos a partir de los datos de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ (Tabla 1) derivados del análisis del Chevron (Figura 5A); las barras representan la desviación estándar asociada, estimadas a partir de las correspondientes a $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$. La línea continua es la dependencia predicha utilizando las medias ponderadas de los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ derivados de los diferentes procedimientos experimentales empleados. La línea discontinua da la dependencia calculada a partir de los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ obtenidos del análisis global (Figura 15) de los datos de Chen et al. (1996). En todos los cálculos de x_N a partir de datos de f_2 y f_1 se han utilizado las expresiones: $\Delta G_{f_2} - m(f_2 - C)$ y $x_N = [1 + \exp(-\Delta G/RT)]^{-1}$.

5.5 DESPLEGAMIENTO DE LISOZIMA INDUCIDO POR pH EN PRESENCIA DE 5.6 M UREA

5.5.1 Procedimiento experimental

La proteína fue dializada en tampón citrato sódico 100 mM, ClNa 100 mM, pH 2.9 preparado como se describe en 2.2.1.1. La urea concentrada se preparó en estas mismas condiciones según el procedimiento B) descrito en 2.2.1.2. Los parámetros experimentales del fluorímetro aparecen detallados en 2.2.3.1.

Hemos estudiado el efecto del pH en la estabilidad de lisozima en 5.6 M urea siguiendo la emisión de fluorescencia a 360 nm. Los distintos valores de pH se consiguieron mezclando volúmenes diferentes de citrato sódico, ClNa 100 mM, urea 5.6 M/ citrato sódico, ClNa 100 mM, 5.6M urea, HCl. El experimento comienza al transferir una alícuota de proteína (a pH 2.9) en una disolución 5.6 M urea y de pH dado termostatizada a 20 °C en la cubeta del fluorímetro. La concentración de proteína final fue de 0.047 mg/mL. En los casos en los que fue posible se siguió la cinética de desnaturalización por medidas de intensidad de fluorescencia en función del tiempo (Figura 12).

Sistemáticamente se midió el pH de la muestra una vez acabado el experimento para comprobar que la alícuota de proteína añadida no lo ha modificado significativamente.

5.5.2 Análisis según el modelo de dos estados

Como se observa en la Figura 13B el perfil de intensidad de fluorescencia, para las muestras en equilibrio, en función del pH muestra una transición muy aguda debido al desplegamiento de la proteína inducido por cambios en el pH. Este perfil fue analizado según la

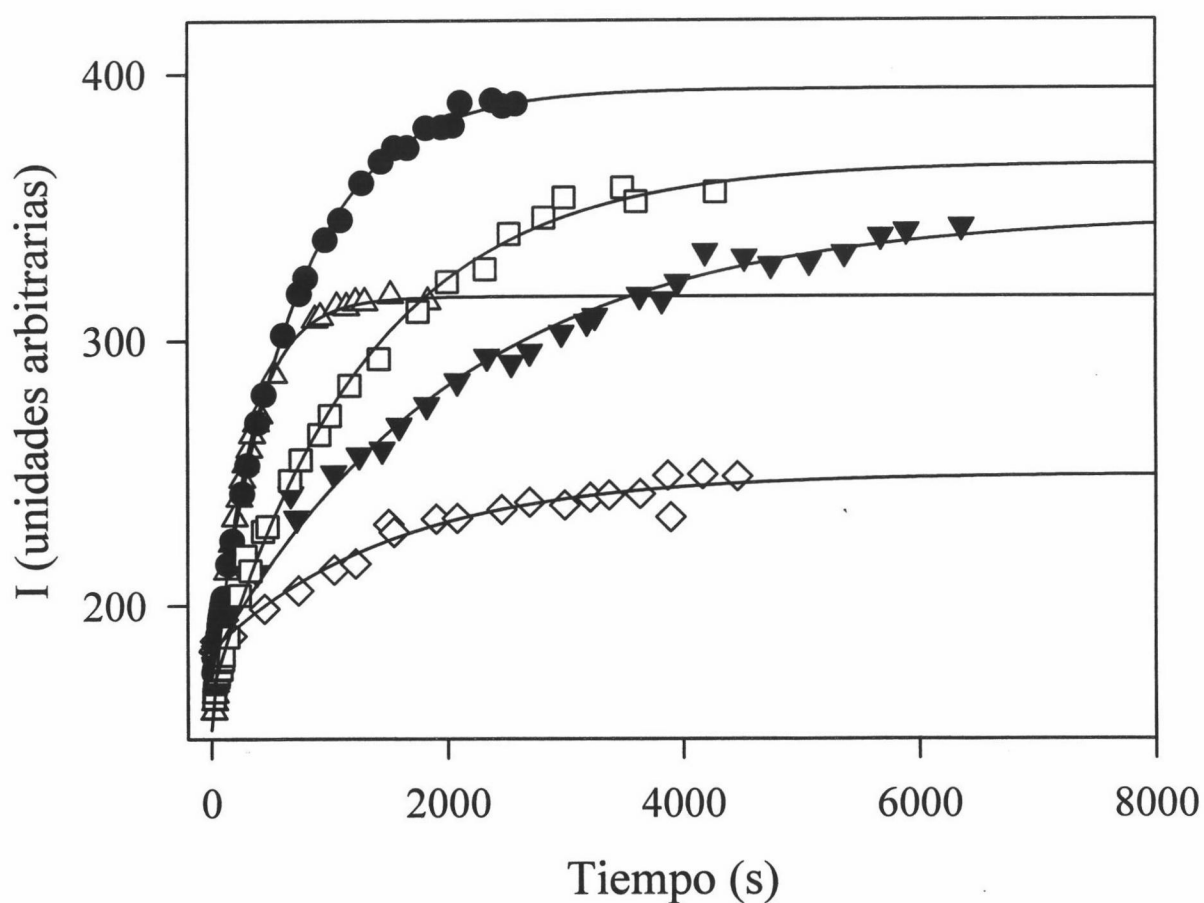


Figura 12: Perfiles cinéticos en la dirección del desplegamiento, registrados a 20 °C después de transferir una alícuota de lisozima nativa (en tampón citrato, pH 2.9) hasta disoluciones 5.6 M urea y pH igual a: (Δ) 1.54, (\bullet) 2.09, (\square) 2.39, (\blacktriangledown) 2.62 y (\diamond) 2.92. La concentración final de proteína fue de 0.047 mg/mL. Las líneas continuas representan los mejores ajustes de la ecuación (2.31) a los datos experimentales.

siguiente ecuación teniendo en cuenta que en este caso son cinco los parámetros ajustables:

$$I = \frac{I_N + I_D \cdot e^{-(\ln 10) \Delta v (pH - pH_{1/2})}}{1 + e^{-(\ln 10) \Delta v (pH - pH_{1/2})}} \quad (3)$$

donde Δv es el número de protones que toma la proteína del disolvente debido al desplegamiento y $pH_{1/2}$ es el valor de pH al que la energía de Gibbs de desplegamiento (ΔG) es cero (según nuestros experimentos $pH_{1/2} \approx 2.9$, ya que $5.6 \text{ M} \approx C_{1/2}$ para pH 2.9; ver Tabla 1). La subrutina de análisis en el programa MLAB se detalla a continuación:

```
M=READ ("nombre del fichero", número de filas, 2)
FUNCTION K(X)=exp(-G(X)/(0.008314*293.15))
FUNCTION G(X)= - (ln10)·N·(x-P)
FUNCTION I(X)=(a+b·K(X))/(1+K(X))
FIT(a, b, N, P), I TO M
```

La ecuación (3) puede ser fácilmente obtenida a partir del efecto del pH sobre ΔG dado por la ecuación (4.7) (Alberty, 1969; Plaza del Pino & Sanchez-Ruiz, 1995) suponiendo que Δv puede tomarse como una constante dentro del estrecho rango en el que ocurre la transición inducida por pH. El ajuste no lineal por mínimos cuadrados de la ecuación (3) al perfil experimental de I versus pH, suponiendo valores para I_N e I_D independientes del pH (ver Figura 13B), da un valor para Δv de (1.9 ± 0.4) moles de H^+ / mol de proteína y $pH_{1/2}$ resulta 2.93 ± 0.05 , tal y como esperábamos.

También hemos incluido en la Figura 13A datos experimentales del efecto del pH en las constantes de velocidad aparentes de plegamiento-desplegamiento [los valores de k_F y k_D se han obtenido a partir del análisis de las cinéticas de plegamiento-desplegamiento inducido por saltos en pH (ver Figura 12), según una ecuación de velocidad de primer orden]. Los datos de $\ln k$ en

función del pH fueron analizados de acuerdo al modelo cinético de dos estados y a la teoría del estado de transición; teniendo en cuenta la expresión (3.12) así como la dependencia del cambio de energía de Gibbs con el pH dada por (4.7) tenemos que:

$$\ln k_N = \ln k_{1/2} - (\ln 10) \cdot \Delta v_{D-\ddagger} \cdot (pH - pH_{1/2}) \quad (4)$$

$$\ln k_D = \ln k_{1/2} - (\ln 10) \cdot \Delta v_{N-\ddagger} \cdot (pH - pH_{1/2}) \quad (5)$$

donde $k_{1/2}$ es el valor de las constantes de velocidad de plegamiento y despleamiento cuando $pH = pH_{1/2}$ y $\Delta v_{N-\ddagger}$ y $\Delta v_{D-\ddagger}$ son las diferencias entre el número de protones unidos al estado de transición y a los estados nativo y despleado, respectivamente. En las ecuaciones (4) y (5) se ha supuesto que $\Delta v_{N-\ddagger}$ y $\Delta v_{D-\ddagger}$ son constantes dentro del estrecho rango en el que tiene lugar la transición inducida por pH. Considerando la ecuación (3.11) entonces resulta que:

$$\ln k = \ln k_{1/2} + \ln [\exp(-(\ln 10) \Delta v_{N-\ddagger} (pH - pH_{1/2})) + \exp(-(\ln 10) \Delta v_{D-\ddagger} (pH - pH_{1/2}))] \quad (6)$$

El número de protones tomados del disolvente por la proteína debido al despleamiento puede calcularse a partir de los valores cinéticos teniendo en cuenta que :

$$\Delta v = \Delta v_{N-\ddagger} - \Delta v_{D-\ddagger} \quad (7)$$

El ajuste de la ecuación (6) a los datos de $\ln k/pH$ implica cuatro parámetros ajustables ($k_{1/2}$, $pH_{1/2}$, $\Delta v_{N-\ddagger}$ y $\Delta v_{D-\ddagger}$) y se llevó a cabo con el programa MLAB (el procedimiento es igual que el descrito en el apartado 3.3.2 en donde se consideró la dependencia de k_F y k_D con la concentración de guanidina). Teniendo en cuenta la relación (7) resulta $\Delta v = 2.4 \pm 0.5$ (ver Figura

13A). Los valores que hemos obtenido para Δv a pH 2.9 y 5.6 M urea (1.9 ± 0.4 y 2.4 ± 0.5) son similares pero algo menores a los publicados por Pfeil y Privalov (1976) en ausencia de urea (en torno a 3.3 a pH 2.9).

La forma de la transición inducida por pH en presencia de 5.6 M urea tiene una consecuencia muy importante: **pequeños cambios de pH en la zona de la transición pueden causar cambios significativos en las cantidades presentes de proteína en estado nativo y desplegado**. En este contexto es importante señalar que según la manera habitual de trabajar en el laboratorio, los valores de pH no pueden generalmente ser medidos y reproducidos con una precisión mayor a varias centésimas de unidades de pH; así, con disoluciones acuosas bien tamponadas las medidas de pH pueden ser reproducidas en torno a 0.02 unidades de pH. Esto, no obstante, requiere un procedimiento operacional muy cuidadoso [ver por ejemplo páginas 422-424 de Bates (1973)]. Por tanto, es lógico pensar que las medidas de pH realizadas según es habitual en el laboratorio llevan asociada una irreproducibilidad mayor. Claramente esta “irreproducibilidad” debida al pH puede ser una fuente significativa de discrepancia entre diferentes perfiles experimentales de desplegamiento. Una imagen bastante ilustrativa de este efecto aparece en la Figura 13C en donde hemos representado el perfil de fracción de estado nativo *versus* pH obtenido a partir de los valores de Δv y $pH_{1/2}$ que resultan del análisis del perfil de desnaturalización inducida por pH (Figura 13B). Sobre esta curva representamos los valores de x_N a 5.6 M urea que se derivan de nuestros experimentos cinéticos (Chevron, ensayos de plegamiento-desplegamiento a 7 y 10 mg/mL de proteína) y de equilibrio. El valor medio resultante para x_N es de 0.48 con una desviación estándar de 0.06 que corresponde a un error de 0.05 en pH. Según esto, entonces la dispersión que observamos en los valores de x_N podría ser explicada razonablemente por una dispersión en el pH de sólo ± 0.05 .

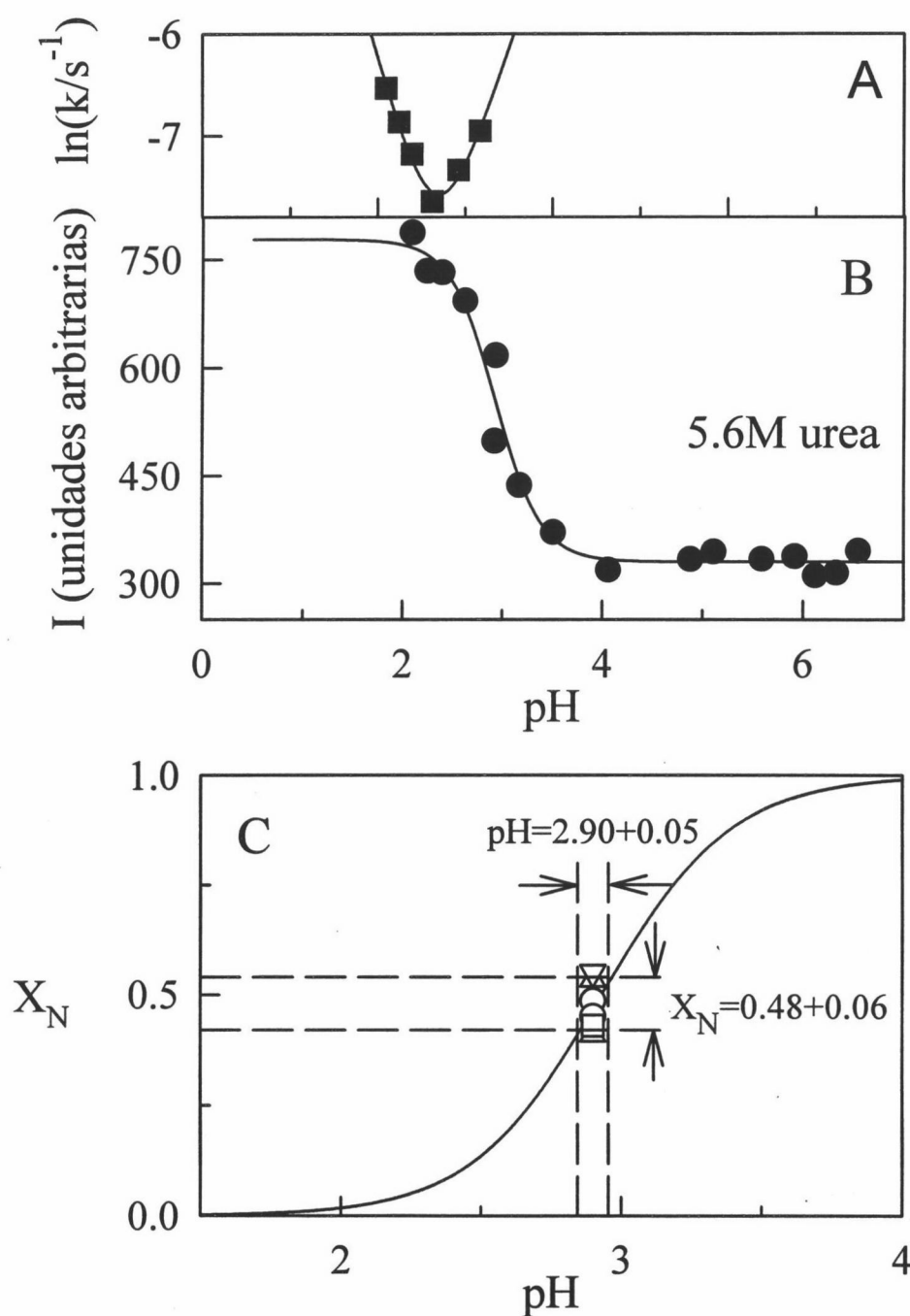


Figura 13: Despliegamiento inducido por pH de lisozima en 5.6 M urea. (A) Constantes de velocidad obtenidas del análisis según la ecuación de velocidad de primer orden de los perfiles cinéticos de despliegamiento estudiados por fluorescencia (Figura 12). La línea continua representa el mejor ajuste de la ecuación (6) a los datos. (B) Perfil de intensidad de fluorescencia de muestras en equilibrio versus pH. La línea representa el mejor ajuste de la ecuación (2) a los datos. (C) Perfil de fracción molar de proteína nativa en función del pH correspondiente a la transición observada en (B). Los símbolos representan valores de x_N a 5.6 M urea y pH 2.9 calculados usando los datos de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ que se recogen en la Tabla 1: (O) ensayos de plegamiento y despliegamiento a 7 mg/mL, (Δ) ensayos de plegamiento y despliegamiento a 10 mg/mL, (\square) chevron, (∇) datos de intensidad de fluorescencia de muestras en equilibrio. La media de todos estos valores resulta $x_N = 0.48 \pm 0.06$. La figura ilustra el hecho de que la dispersión observada en los valores de x_N podría ser explicada mediante una dispersión en el valor del pH de sólo ± 0.05 .

5.6 ¿HAY ESTADOS INTERMEDIOS DE EQUILIBRIO SIGNIFICATIVAMENTE POBLADOS EN EL DESPLEGAMIENTO DE LISOZIMA INDUCIDO POR UREA?

En la Figura 11 se muestra un resumen del conjunto de nuestros datos experimentales (apartados 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4), como perfiles de fracción molar de proteína en estado nativo (x_N) *versus* concentración de urea, correspondientes al desplegamiento de lisozima en citrato sódico 100 mM, NaCl 100 mM, pH 2.9 (los valores de $C_{1/2}$ y $m_{1/2}$ de cada una de las curvas se recogen en la Tabla 1). Resumiendo, los datos de esta Figura se han obtenido a partir de cuatro procedimientos experimentales:

A- Ensayos de desplegamiento a 7 y 10 mg/mL de proteína.

B- Ensayos de replegamiento a 7 y 10 mg/mL de proteína.

C- Análisis de la dependencia con la concentración de urea de las constantes de velocidad aparentes de plegamiento-desplegamiento.

D- Análisis del perfil de fluorescencia correspondiente al equilibrio de desnaturalización inducida por urea.

Con los procedimientos C y D, suponemos un mecanismo de dos estados para el cálculo de x_N mientras que en A y B **no**. También es importante destacar que con los métodos A-C hemos eludido los problemas derivados del trazado de línea base y que éstos se han minimizado con el procedimiento D incluyendo en el análisis los valores de intensidad de fluorescencia para los estados nativo y desplegado que vienen dados mediante extrapolación a tiempo cero de las cinéticas seguidas por fluorescencia de desplegamiento-plegamiento respectivamente (Figura 10).

Como se muestra en la Figura 11, existe una buena concordancia entre los valores de x_N obtenidos a partir de los cuatro procedimientos experimentales descritos previamente. Hemos

representado también con trazo continuo el perfil de fracción de estado nativo que se obtiene considerando $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ igual a $6.11 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ y 5.59 M respectivamente, que son las medias ponderadas de los correspondientes valores obtenidos en nuestros experimentos (A, B, C y D).

No obstante, debemos indicar que la presencia de intermedios puede no ser aparente en las cinéticas de plegamiento-desplegamiento y en los ensayos de replegamiento en el caso de que dichos intermedios estén en rápido equilibrio con el estado desplegado en la escala de tiempos de las cinéticas (Mücke y Schmid, 1994). A pesar de ello y a la vista de la Figura 11, está claro que nuestros resultados no indican la presencia de una población significativa de estado intermedio en el despliegamiento de lisozima inducido por urea a pH 2.9. Concretamente, la información experimental de que disponemos prácticamente permite descartar la presencia significativa en el equilibrio de los siguientes dos tipos de intermedios:

- 1.- Intermedios similares a los encontrados en el replegamiento de lisozima en condiciones fuertemente nativas (Radford et al., 1992). Estos intermedios se caracterizan por interacciones no-nativas entre los residuos de triptófano (Denton et al., 1994; Rothwarf y Scheraga, 1996) que se reflejan en un fuerte atenuación de la fluorescencia del triptófano, de tal manera que la emisión de fluorescencia a 360 nm es mucho menor que la de los estados nativo y desplegado (Itzhaki et al., 1994; Kiefhaber, 1995; Itzhaki y Evans, 1996; Rothwarf y Scheraga, 1996; Lu et al., 1997). Esta es la situación que se ilustra en la Figura 14 tomada del trabajo de Kiefhaber (1995).

Si este tipo de intermedio se comporta como una especie cinética diferente en nuestras condiciones de trabajo, entonces su presencia hubiera sido evidente en los experimentos cinéticos

estudiados por fluorescencia. Por otro lado, incluso si el intermedio está en equilibrio rápido con el estado desplegado en la escala de tiempo de las cinéticas, y no se comporta como una especie cinética distinta, lo habríamos detectado fácilmente: según la Figura 3 del trabajo de Chen et al. (1996) el equilibrio entre el intermedio que proponen estos autores y el estado desplegado se desplaza hacia aquel a concentraciones de urea por debajo de 6 M. Si como decíamos el intermedio y el estado desplegado están en equilibrio rápido a concentraciones desnaturalizantes de urea, entonces en los experimentos de replegamiento llevados a cabo a concentraciones de urea menores a 6 M el intermedio de equilibrio estaría poblado como “burst-intermediate” (formado en el tiempo muerto del instrumento); como resultado, los valores que proceden de la extrapolación a tiempo cero de los perfiles cinéticos en la dirección del replegamiento, disminuirían abruptamente por debajo de 6 M urea, reflejando la baja intensidad de fluorescencia emitida por el intermedio. Esto obviamente no se observó en nuestros datos experimentales (ver Figura 10).

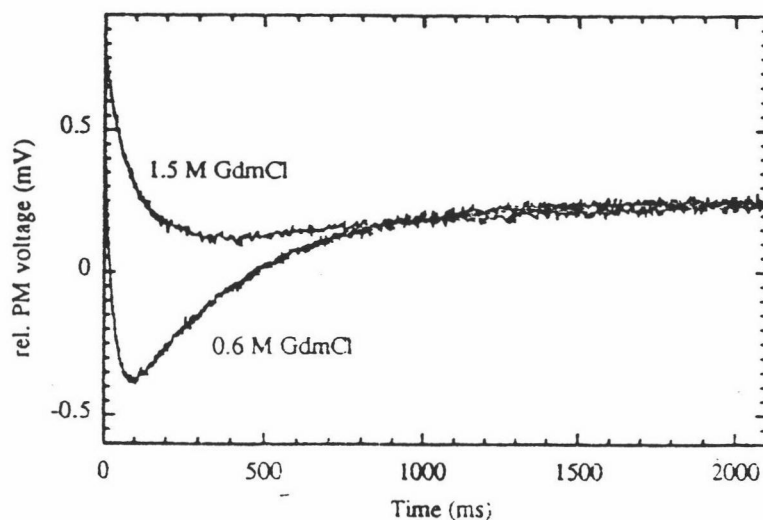


Figura 14: Replegamiento de lisozima en presencia de 0.6 M y 1.5 M guanidina estudiado mediante el cambio de emisión de fluorescencia a 300 nm (excitación a 280 nm) [Figura 1 del trabajo de Kiefhaber (1995)]. Los datos se analizaron según una doble exponencial.

2.- Estados intermedios asociados; trabajos recientes en la bibliografía apoyan la idea que estados intermedios de equilibrio en el desplegamiento térmico o inducido por cambios en el disolvente de proteínas pueden mostrar una fuerte tendencia a asociar (Filimonov y Rogov, 1996; Semitsonov et al., 1996). No obstante, es poco probable que intermedios de este tipo se pueblen significativamente en el desplegamiento de lisozima inducido por urea a pH 2.9, ya que su presencia habría causado una dependencia de los perfiles de desnaturalización con la concentración de proteína; nuestros datos experimentales habrían puesto de manifiesto esta dependencia ya que se extienden en un rango de concentración de 0.046 a 10 mg/mL. Sin embargo, no hemos encontrado un efecto significativo de la concentración de proteína sobre los perfiles de desnaturalización (Figura 11 y Tabla 1).

5.7 REINTERPRETACIÓN DE LOS DATOS DE DISPERSIÓN DE RAYOS X DE BAJO ÁNGULO

El estudio de dispersión de rayos X de bajo ángulo publicado por Chen et al. (1996) sugiere dos evidencias que apoyan la existencia de un intermedio significativamente poblado en el equilibrio de desplegamiento de lisozima inducido por urea a pH 2.9:

1.- Diferencias en los perfiles de desplegamiento seguidos por medidas de radio de giro y difracción circular en el ultravioleta cercano y lejano.

2.- La presencia de una tercera componente en el análisis de Descomposición de Valores Singulares (SVD) de las curvas que muestran la dependencia de la dispersión de rayos X con la concentración de urea.

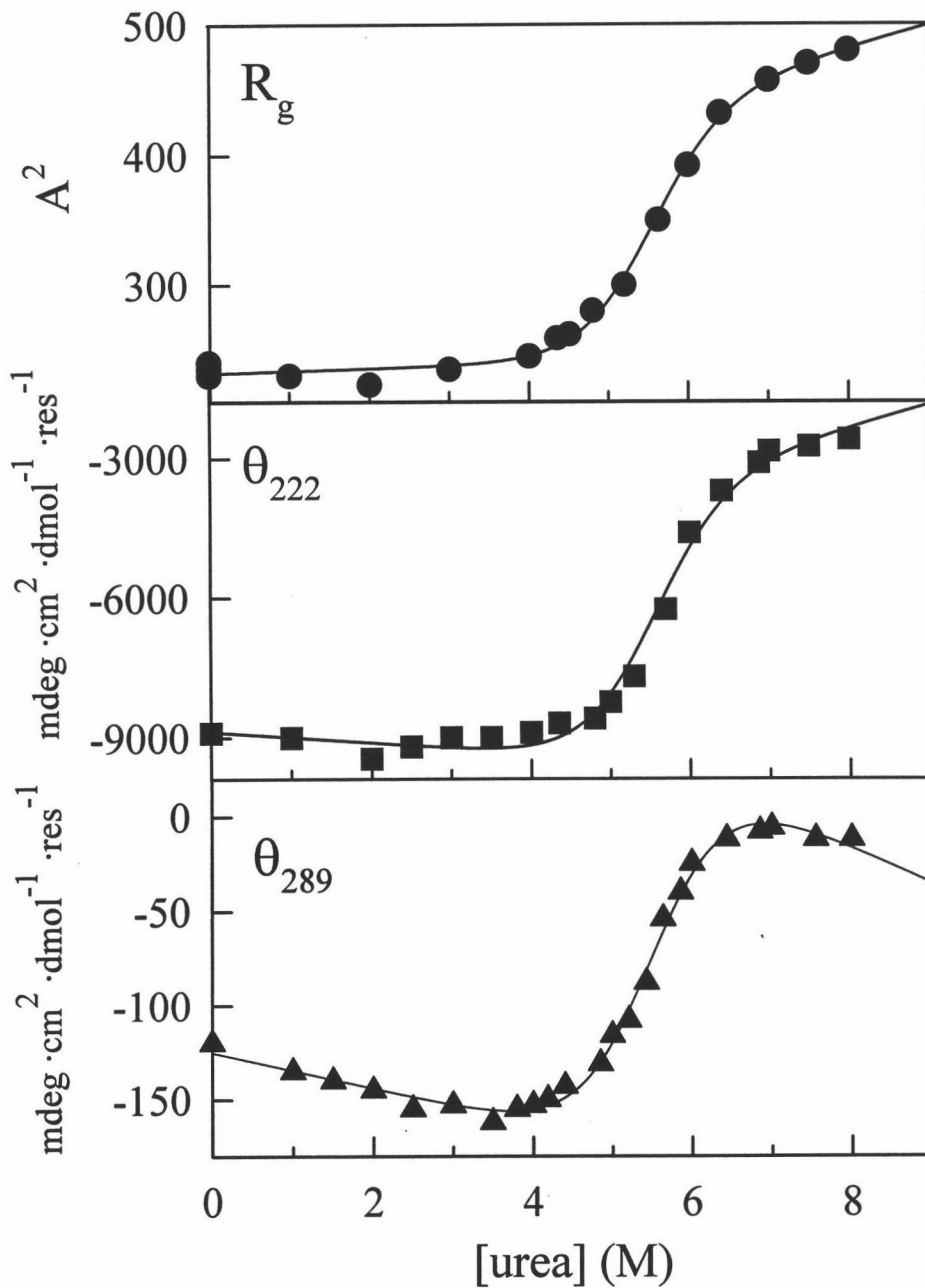


Figura 15: Análisis global de los perfiles de desplegamiento inducido por urea de lisozima a pH 2.9, estudiados mediante medidas del cuadrado del radio de giro, elipticidad a 222 nm y elipticidad a 289 nm [datos tomados del trabajo de Chen et al. (1996)]. Las líneas representan el mejor ajuste simultáneo de la ecuación (8) a los datos, imponiendo que los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ deben ser los mismos para los tres perfiles; las líneas base nativas y desplegadas (tomadas como funciones lineales de la concentración de urea) fueron ajustadas independientemente para cada perfil. El análisis global pesó los datos, de acuerdo a la inversa de la covarianza de cada perfil. Dichas covarianzas fueron estimadas a partir de los residuos del ajuste a una línea recta de los datos entre 0 y 3 M urea.

Creemos que una discrepancia tan pequeña [como la señalada por Chen et al. (1996)] entre los perfiles de desplegamiento seguidos por diferentes propiedades físicas puede ser un efecto aparente debido al trazado de línea base. Para ilustrar este aspecto hemos llevado a cabo un ajuste global de la siguiente ecuación de dos estados a los tres perfiles de desplegamiento publicados por Chen et al. (dependencias del radio de giro al cuadrado, elipticidad a 222 nm y elipticidad a 289 nm con la concentración de urea; ver Figura 15):

$$P = \frac{P_N + P_D \cdot e^{m_{1/2}(C-C_{1/2})/RT}}{1 + e^{m_{1/2}(C-C_{1/2})/RT}} \quad (8)$$

donde P es R_g^2 , θ_{222} o θ_{289} . En el ajuste global se impuso que los valores de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ fuesen los mismos para los tres perfiles, mientras que se dejó que cada curva tuviese sus propias línea base nativa y desplegada (P_N y P_D respectivamente); además el análisis se llevó a cabo con peso (las propiedades físicas varían en rangos diferentes por lo que hay que pesar cada perfil según su error absoluto), de acuerdo a la inversa de la varianza asociada a cada perfil. Las varianzas respectivas se estimaron a partir de los residuos (mínima suma del cuadrado de los residuos) del ajuste a una línea recta de los datos de R_g^2 , θ_{222} y θ_{289} en el rango de 0-3 M urea. De nuevo utilizamos el programa MLAB para el análisis:

```
M1=READ("fichero de  $R_g^2$ ", número de filas, 2)
M2=READ("fichero de  $\theta_{222}$ ", número de filas, 2)
M3=READ("fichero de  $\theta_{289}$ ", número de filas, 2)
FUNCTION PN1(C)=a[1]+b[1]·C
FUNCTION PN2(C)=a[2]+b[2]·C
FUNCTION PN3(C)=a[3]+b[3]·C
FUNCTION PD1(C)=d[1]+e[1]·C
FUNCTION PD2(C)=d[2]+e[2]·C
FUNCTION PD3(C)=d[3]+e[3]·C
FUNCTION K(C)=exp(-G(C)/(0.008314·293.15))
```

```

FUNCTION G(C)=-M·(C-F)
FUNCTION P1(C)=(PN1+PD1·K(C))/(1+K(C))
FUNCTION P2(C)=(PN2+PD2·K(C))/(1+K(C))
FUNCTION P3(C)=(PN3+PD3·K(C))/(1+K(C))
FIT(A, B, D, E, m, f), P1 TO M1, P2 TO M2, P3 TO M3
Z1=POINTS(P1,0:9:0.1)
Z2=POINTS(P2,0:9:0.1)
Z3=POINTS(P3,0:9:0.1)

```

Vemos como en la instrucción FIT figuran como parámetros ajustables entre otros A, B, D y E. Realmente A, B, D y E representan vectores formados por las ordenadas y pendientes que definen las líneas base nativa y desplegada para cada uno de los tres perfiles experimentales:

$$A = \begin{pmatrix} a[1] \\ a[2] \\ a[3] \end{pmatrix} \quad B = \begin{pmatrix} b[1] \\ b[2] \\ b[3] \end{pmatrix} \quad C = \begin{pmatrix} c[1] \\ c[2] \\ c[3] \end{pmatrix} \quad D = \begin{pmatrix} d[1] \\ d[2] \\ d[3] \end{pmatrix}$$

Como se observa en la Figura 15 se obtuvo un buen ajuste considerando una dependencia lineal de las líneas base con la concentración de urea. Este resultado apoya la idea de que los tres perfiles experimentales son consistentes con un mecanismo de desplegamiento de dos estados. Los valores de x_N versus C que se derivan considerando $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ del ajuste global están en excelente concordancia con nuestros resultados experimentales (ver Tabla 1 y Figura 11).

Claramente, la discrepancia puesta de manifiesto por Chen et al. (1996) entre los perfiles de desplegamiento de R_p^2 , θ_{222} y θ_{289} podría ser explicada en términos de un efecto de línea base (Figura 15); además no podemos olvidar que parte de la aparente discrepancia señalada por dichos autores puede deberse al efecto de "irreproducibilidad" en el pH ya comentado (ver Figura 13). En este sentido es importante recordar que los parámetros que caracterizan el proceso de desplegamiento son muy sensibles a las condiciones concretas del medio; como hemos visto en

el apartado 5.5.2 el desplegamiento de lisozima por urea a pH 2.9 va acompañado de la toma de aproximadamente 2 protones del medio, lo que implica que $C_{1/2}$ depende fuertemente del pH en las proximidades de pH 2.9 como se demuestra en la siguiente relación:

$$\left(\frac{dC_{1/2}}{dpH}\right) = \left(\frac{dC}{dpH}\right)_{\Delta G=0} = -\frac{(\partial\Delta G/\partial pH)_C}{(\partial\Delta G/\partial C)_{pH}} = (\ln 10)RT \frac{\Delta v}{m_{1/2}} \quad (9)$$

en donde hemos usado la ecuación (4.7) y algunas propiedades conocidas de las derivadas parciales (Blinder, 1966). Dado que $\Delta v \approx 2$ y $m_{1/2} \approx 5.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, aplicando (9) resulta $dC_{1/2}/dpH = 2 \text{ M/unidad de pH}$. Teniendo en cuenta que los valores de pH no pueden ser reproducidos con una precisión mayor de varias centésimas, si consideramos dos perfiles experimentales de desplegamiento correspondientes a un pH nominal de 2.9 pero obtenidos a partir de disoluciones madre diferentes con ligeras variaciones en el pH, como por ejemplo 2.85 y 2.95, dado que $dC_{1/2}/dpH = 2 \text{ M/unidad de pH}$, los valores de $C_{1/2}$ diferirán en torno a 0.2 M de manera que observaremos una discrepancia significativa entre dichos perfiles.

Así pues, creemos que los perfiles de R_g^2 , θ_{222} y θ_{289} no proporcionan evidencias fiables para asegurar la presencia de una población significativa de intermedio en el equilibrio de desnaturalización inducida por urea de lisozima a pH 2.9. Además, tampoco queda claro que exista una evidencia fiable en el análisis SVD de las curvas de dispersión de rayos X. Así, el coeficiente (b_3) no está bien definido [ver figura 6 en Chen et al. (1996)], y podría deberse a algún efecto debido al ruido (¿quizás asociado con una pequeña dispersión en los valores de pH de algunas disoluciones de urea?). Obviamente, Chen et al. son conscientes de este problema y, en relación con el análisis SVD, afirman que “the fits for b_1 and b_2 were reasonable, where as the result for b_3 was clearly less well defined. Again, the quality of scattering data available at the

present time may not be adequate for a reliable interpretation of the lysozyme unfolding mechanism taken on their own, but, by considering them along with the analysis of the denaturation curves, the reliability of the fits is considerably increased". No obstante, hemos mostrado que las curvas de desnaturalización (Figura 15) pueden ser explicadas en términos de un mecanismo de desplegamiento de dos estados, de manera que la interpretación de tres estados del análisis de SVD queda privada de su principal soporte.

Como alternativa a la presencia del estado intermedio, podríamos considerar la posibilidad [como de hecho hicieron Chen et al. (1996)] de que los datos de SAXS para el desplegamiento de lisozima inducido por urea reflejen una alteración gradual en la estructura media del conjunto de estados desplegados. Para comprobar esta posibilidad hemos sustraído la contribución del estado nativo a los datos de radio de giro de Chen et al. (1996) y hemos calculado el valor medio del cuadrado del radio de giro extendido a todos los estados de la proteína excepto el nativo:

$$\langle R_g^2 \rangle_D = \frac{R_g^2 - x_N \cdot R_{g,N}^2}{1 - x_N} = \frac{R_g^2 - 232.17 \cdot x_N}{1 - x_N} \quad (10)$$

en donde R_g^2 es el cuadrado del radio de giro a una concentración de desnaturalizante dada, x_N la fracción molar de proteína nativa a una concentración de desnaturalizante dada y $R_{g,N}^2$ es el cuadrado del radio de giro para el estado nativo. Este tipo de cálculo ha sido empleado por Smith et al. (1996) en su análisis del desplegamiento inducido por guanidina de dos mutantes de la variante $\beta 1$ (Smith et al., 1994; Smith y Regan, 1995) del dominio B1 de la Proteína G de estreptococo, que contienen Ala y Thr en la posición 53: $\beta 1A$ y $\beta 1T$. Estos son mutantes m^+ y m^- , respectivamente, indicando con ello que poseen un valor de m superior e inferior al de la forma silvestre de la proteína (ver Shortle, 1995). Smith et al. (1996) interpretaron los valores así

calculados como el radio de giro aparente de los estados desplegados [de ahí el subíndice D en la ecuación (10)] y encontraron que dicha magnitud no cambiaba significativamente con la concentración de guanidina para $\beta 1A$, mientras que para $\beta 1T$ (el mutante m⁻) decrecía claramente al aumentar la concentración de guanidina. Este último resultado se consideró como una evidencia directa de una alteración en la estructura del conjunto de estados desplegados como consecuencia de cambios en el disolvente (Smith et al., 1996). Los resultados de aplicar la ecuación (10) a los datos de radio de giro correspondientes al desplegamiento inducido por urea de lisozima a pH 2.9 [Chen et al. (1996)] aparecen en la Figura 16; los valores de x_N que hemos usado son los obtenidos de nuestros ensayos de desplegamiento a 7 mg/mL de lisozima. Además hemos tomado $R_{g,N}^2$ igual a 232.17 \AA^2 que es la media de los datos experimentales de dichos autores en el rango de 0-3 M urea. Vemos cómo los valores así calculados para $\langle R_g^2 \rangle_D$ concuerdan muy bien con la línea base para el estado desplegado obtenida del análisis global según el modelo de dos estados que se muestra en la Figura 15, lo que apoya nuestra interpretación de dos estados de dicho perfil .

Además observamos claramente en la Figura 16 que el radio de giro aparente del estado desplegado cambia comparativamente poco con la concentración de urea lo que sugiere que, en este caso, no ocurren grandes alteraciones en la estructura media del conjunto de estados desplegados en respuesta a cambios en la concentración de urea. Para ilustrar esta idea hemos comparado en la Figura 17 los datos de $(\langle R_g^2 \rangle_D)^{1/2}$ [calculados a partir de la ecuación (10)] en función del cambio en la energía de Gibbs de desnaturalización [calculada según la ecuación (1.7)] para lisozima y para el mutante $\beta 1T$ del dominio B1 de la Proteína G de estreptococo [Smith et al. (1996)].

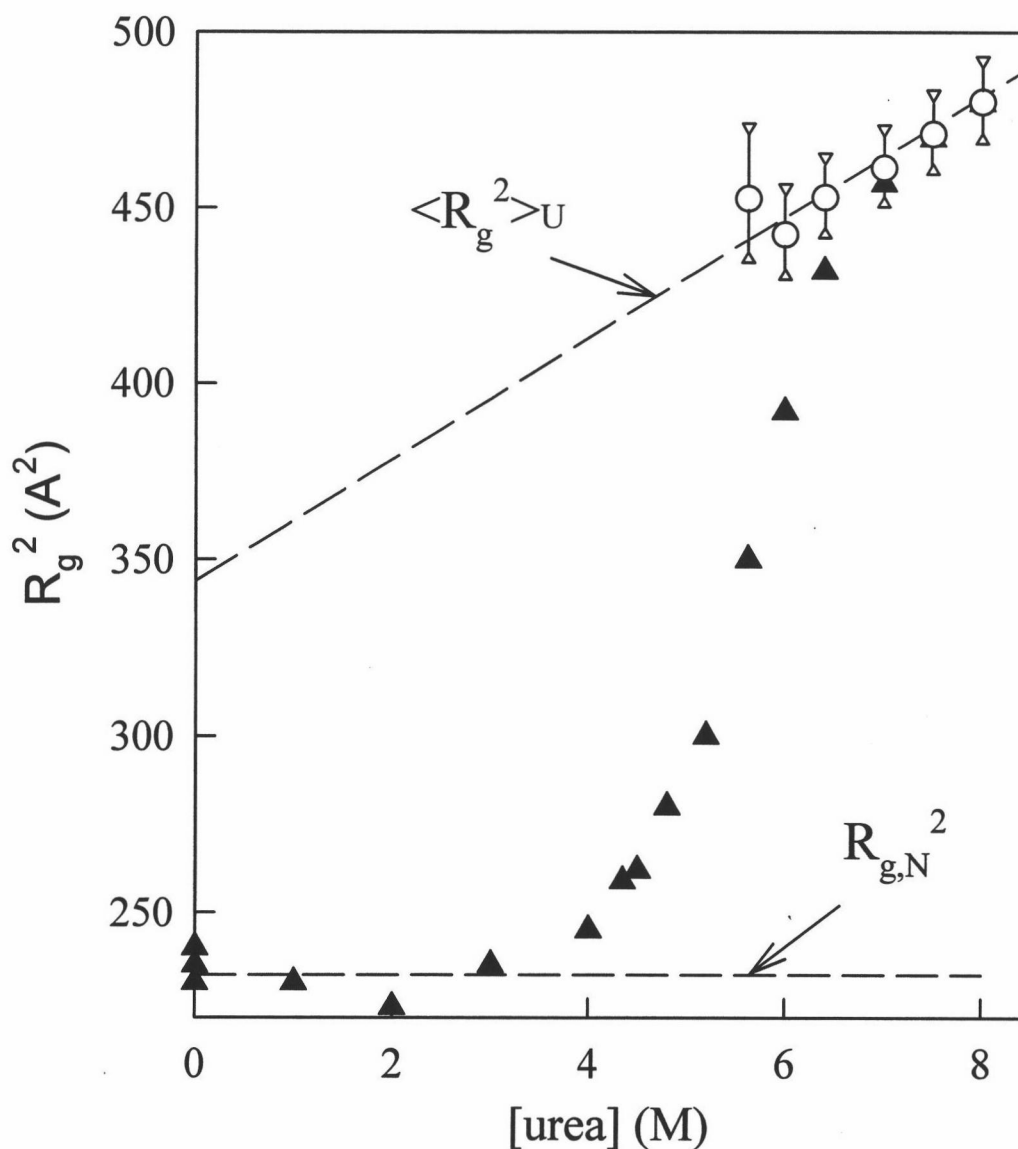


Figura 16: Deconvolución del perfil de desplegamiento estudiado mediante medidas del radio de giro, usando los valores para x_N que se obtienen de los ensayos de despegamiento. (▲) Valores experimentales del radio de giro al cuadrado tomados de Chen et al. (1996) y obtenidos a una concentración de proteína de 7 mg/mL. (○) Valores del cuadrado del radio de giro medio del conjunto de estados desplegados obtenidos mediante la ecuación (9); los valores de x_N que se necesitan para este cálculo se obtuvieron a partir de los datos de $m_{1/2}$ y $C_{1/2}$ (Tabla 1) derivados del análisis de los ensayos de desplegamiento, realizados a disoluciones de concentración de proteína igual a 7 mg/mL; el valor de $R_{g,N}^2$ usado es la media de los valores experimentales en el rango de 0 a 3 M urea. Las barras indican las desviaciones estándar asociadas. La línea discontinua superior corresponde a la línea base desplegada obtenida del análisis global de dos estados mostrado en la Figura 15; la excelente concordancia entre los valores calculados de $\langle R_g^2 \rangle_D$ con esta línea base desplegada apoya la interpretación del perfil de radio de giro en términos de un mecanismo de dos estados.

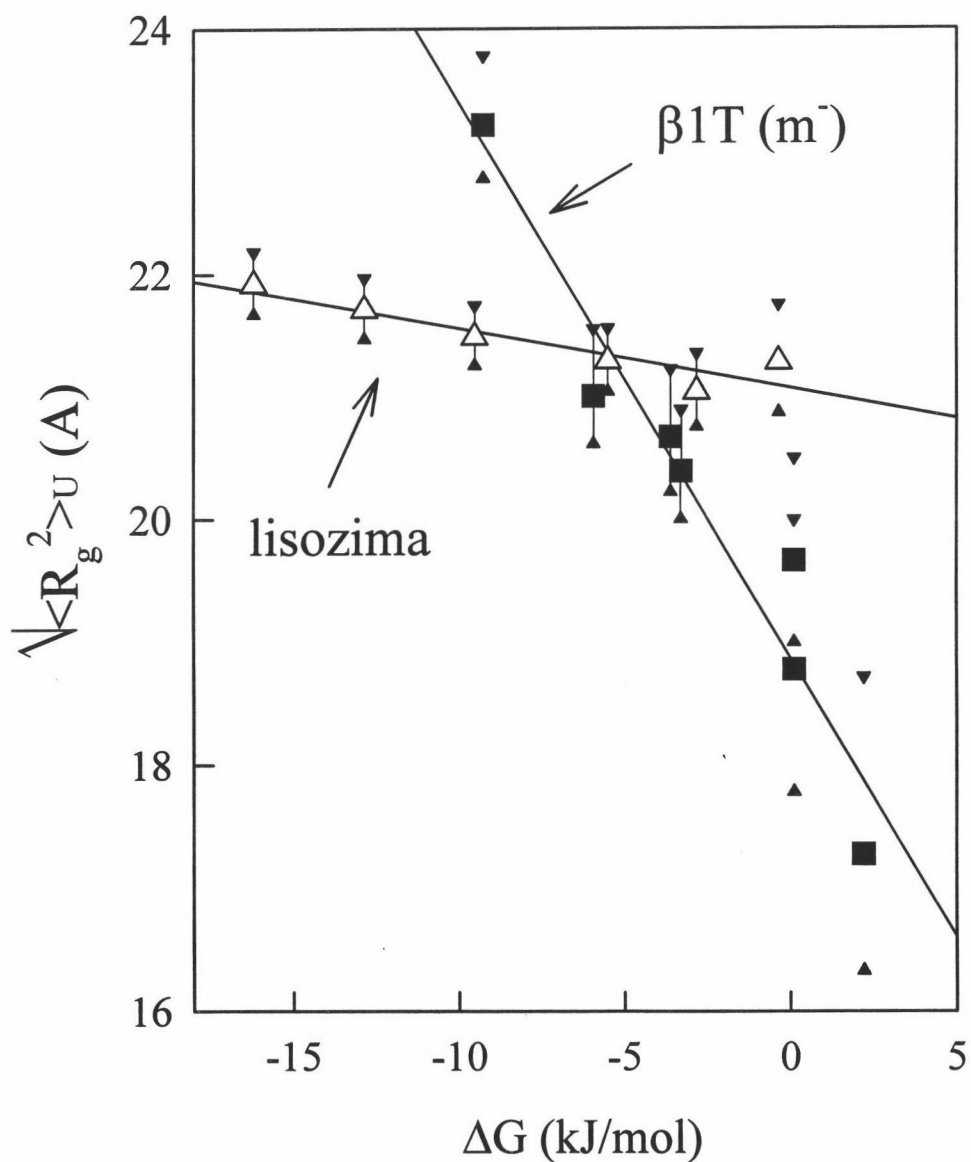


Figura 1: Radio de giro aparente del conjunto de estados desplegados versus ΔG . (Δ) valores correspondientes a lisozima calculados a partir de datos del desplegamiento inducido por urea. (\blacksquare) valores correspondientes al mutante $\beta 1T$ del dominio B1 de la Proteína G de estreptococo (mutante m^-), calculados a partir de los datos de desplegamiento inducido por guanidina publicados por Smith et al. (1996).



6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, F., Taneja, S., Yadav, S. y Haque, S. E. (1994) *J. Biochem.* 115, 322-327.
- Alberty, R. A. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* 91, 3899-3903.
- Alonso, D. O. V. y Dill, K. A. (1991) *Biochemistry* 30, 5974-5985.
- Antosiewicz, J., McCammon, J. A. y Gilson, M. K. (1994) *J. Mol. Biol.* 238, 415-436.
- Aune, K. y Tanford, C. (1969) *Biochemistry* 8, 4586-4590.
- Bashford, D. y Karplus, M. (1990) *Biochemistry* 29, 10219.
- Bates, R. G. (1973) *Determination of pH. Theory and Practice* J. Wiley and Sons. 2° ed., New York.
- Beasty, A. M., Hurle, M. R., Manz, J. T., Stackhouse, T., Onuffer, J. J. y Matthews, C. R. (1986) *Biochemistry* 25, 2965-2974.
- Becktel, W. J. y Schellman, J. A. (1987) *Biopolimers* 26, 1859-1877.
- Blinder, S. M. (1966) *J. Chem. Ed.* 43, 85-92.
- Bolen, D. W. y Santoro, M. M. (1988) *Biochemistry* 27, 8069-8074.
- Brandts, J. F. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 4291-4301.
- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. y Brennan, M. (1975) *Biochemistry* 14, 4953-4963.
- Briggs, M. S. y Roder, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2017-2021.
- Burden, R. L. y Faires, J. D. (1985) *Numerical Analysis*, 3° ed., Wadsworth Inc., Belmont (California).
- Canfield, R. E. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 2691-2697.
- Chen, B. L., Baase, W. A., Nicholson, H. y Schellman, J. A. (1992) *Biochemistry* 31, 1464-1476.
- Chen, B. L., Baase, W. A. y Schellman, J. A. (1989) *Biochemistry* 28:691-699.

- Chen, L., Hodgson, K. O. y Doniach, S. (1996) *J. Mol. Biol.* 261, 658-671.
- Chen, B. L. y Schellman, J. A. (1989) *Biochemistry* 28:685-691.
- Chowdry y Cole (1989) *Trends in Biotechnology* 7, 11-18.
- Cooper y Johnson (1994) *Methods in Molecular Biology* 22, 109-124.
- Cooper y Johnson (1994) *Methods in Molecular Biology* 22, 125-136.
- Daggett, V., Li, A. J., Itzhaki, L. S., Otzen, D. E. y Fersht, A. R. (1996) *J. Mol. Biol.* 257, 430-440.
- De Marco (1977) *J. Magn. Reson.* 26, 527-528.
- Denton, M. E., Rothwarf, D. M. y Scheraga, H. A. (1994) *Biochemistry* 33, 11225-11236.
- Dobson, C. M. (1994) *Curr. Biol.* 4, 636-640.
- Fersht, A. R. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 79-84.
- Filimonov, V. V., Matveyev, S. V., Potekhin, S. A. y Privalov, P. L. (1982) *J. Mol. Biol.* 16, 551-562.
- Filimonov, V. V. y Rogov, V. V. (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 767-777.
- Fink, A. L. (1995) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 495-522.
- Freire, E. (1995) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 141-165.
- Freire, E. (1995) *Methods Enzymol.* 259, 144-168.
- Freire, E. (1995) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 40: *Protein Stability and Folding: Theory and Practice* (Shirley, B. A., ed), Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Freire, E. y Biltonen, R. L. (1978) *Biopolymers* 17, 463-479.
- Freire, E., van Osdol, W. W., Mayorga, O. L., y Sanchez-Ruiz, J. M. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Chem.*, 19, 159-188.
- Gill, S. C., Richey, B., Bishop, G. y Wyman, J. (1985) *Biophys. Chem.* 21, 1-14.

- Gill, S. C., von Hippel, P. H. (1989) *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Griko, Y. V., Freire, E., Privalov, G., Dael, H. V. y Privalov, P. L. (1995) *J. Mol. Biol.* 252, 447-459.
- Haezebrouck, P., Joniau, M., Dael, H. V., Hooke, S. D., Woodruff, N. D. y Dobson, C. M. (1995) *J. Mol. Biol.* 246, 382-387.
- Haihara, Y., Aimoto, S., Fink, A. L. y Goto, Y. (1993) *J. Mol. Biol.* 231, 180-184.
- Hagel, P., Gerding, J. J. T., Fieggen, W. y Bloemendal, H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 243,366.
- Hammond, G. S. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* 77, 334-338.
- Harding et al., (1991) *Biochemistry* 30, 3120-3128.
- Honig, B. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 203-204.
- Honig, B., Sharp, K. y Yang, A. S. (1993) *J. Phys. Chem.* 97, 1101-1109.
- Hu, C. Q., Sturtevant, J. M., Thomson, J. A., Erickson, R. E. y Pace, C. N. (1992) *Biochemistry* 31, 4876-4882.
- Hurle, M. R., Michelotti, G. A., Crisanti, M. M. y Matthews, C. R. (1987) *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 2, 54-63.
- Ibarra-Molero, B. y Sanchez-Ruiz, J. M. (1996) *Biochemistry* 35, 14689-14702.
- Ibarra-Molero, B. y Sanchez-Ruiz, J. M. (1997) *Biochemistry* 36, 9616-9624.
- Imoto, T., Forster, L. S., Rupley, J. A. y Tanaka, F. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* vol. 69, 5, 1151-1155.
- Itzhaki, L. S. y Evans, P. A. (1996) *Protein Sci.* 5, 140-146.
- Itzhaki, L. S., Evans, P. A., Dobson, C. M. y Radford, S. E. (1994) *Biochemistry* 33, 5212-5220.

- Jenson, J., Goldstein, G. y Breslow, E. (1980) *Biochimica et Biophysica Acta* 624, 378-385.
- Johnson, M. J. y Fersht, A. R. (1995) *Biochemistry* 34, 6795-6804.
- Kato, S., Okamura, M., Shimamoto, N. y Utiyama, H. (1981) *Biochemistry* 20, 1080-1085.
- Kato, S., Shimamoto, N. y Utiyama, H. (1982) *Biochemistry* 21, 38-43.
- Khechinashvili, N. N., Privalov, P. L. y Tiktopulo, E. I. (1973) *FEBS Lett.* 30, 57-60.
- Khorasanizadeh, S., Peters, I. D., Butt, T. R. y Roder, H. (1993) *Biochemistry* 32, 7054-7063.
- Kiefhaber, T. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9029-9033.
- Kim, P. S. y Baldwin, R. L. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 51, 459-489.
- Kim, P. S. y Baldwin, R. L. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* 59, 631-660.
- Lechuga, T. (1986) Tesina de Licenciatura, Universidad de Granada.
- López-Mayorga, O. (1983) Tesis Doctoral, Universidad de Granada
- López-Mayorga, O. y Freire, E. (1987) *Biophys. Chem.* 87, 87-96.
- Lu, H., Buck, M., Radford, S. E. y Dobson, C. M. (1997) *J. Mol. Biol.* 265, 112-117.
- Mateo, P. L. (1984) *Thermochemistry and its Applications to Chemical and Biochemical Systems* (R. Da Silva, ed.), pp. 541-568, Reidel, Dordrecht.
- Makhatadze, G. I. y Privalov, P. L. (1980) *J. Mol. Biol.* 213, 375-384.
- Makhatadze, G. I. y Privalov, P. L. (1990) *J. Mol. Biol.* 213, 375-384.
- Makhatadze, G. I. y Privalov, P. L. (1992) *J. Mol. Biol.* 226, 491-505.
- Makhatadze, G. I. y Privalov, P. L. (1993) *J. Mol. Biol.* 232, 639-659.
- Makhatadze, G. I. y Privalov, P. L. (1995) *Adv. Protein Chem.* 47, 307-425.
- Martel, P. Ph. D. Thesis (1996) Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal.

- Matouscheck, A. y Fersht, A. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7814-7818.
- Matouscheck, A., Otzen, D. E., Itzhaki, L. S., Jackson, S. E. y Fersht, A. R. (1995) *Biochemistry* 34, 13656-13662.
- Matthews, J. M. y Fersht, A. R. (1995) *Biochemistry* 34, 6805-6814.
- Matthews, J. B. y Gurd, F. R. (1986) *Methods Enzymol.* 130, 437-453.
- Matthews, C. R. y Hurle, M. R. (1987) *BioEssays* 6, 254-257.
- Mayr, L. M. y Schmid, F. X. (1993) *Biochemistry* 32, 7994-7998.
- Meeker, A. K., Garcia-Moreno, B. y Shortle, D. (1996) *Biochemistry* 35, 6443-6449.
- Monera, O. D., Kay, C. M. y Hodges, R. S. (1994) *Protein Sci.* 3, 1984-1991.
- Mücke, M. y Schmid, F. X. (1994) *Biochemistry* 33, 12930-12935.
- Murphy, K. P., Bakhuni, V., Xie, D. y Freire, E. (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 293-306.
- Murphy, K. P. y Gill, S. J. (1990) *Thermochim. Acta* 172, 11-20.
- Murphy, K. P. y Gill, S. J. (1991) *J. Mol. Biol.* 222, 699-709.
- Myers, J. K., Pace, C. N. y Scholtz, J. M. (1995) *Protein Sci.* 4, 2138-2148.
- Neves Petersen, M. T., Martel, P., Petersen, E. I., Drablfø, F. y Petersen, S. B. (1997) *Methods in Enzymol.* 284, 130-153.
- Nicholson, E. M. y Scholtz, J. M. (1996) *Biochemistry* 35, 11369-11378.
- Nokazi, Y. (1972) In *Methods in Enzymology*. Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N. (eds), Academic Press, New York, Vol. 26, p. 43.
- Ozkaynak, E., Finley, D. y Varshavsky, A. (1984) *Nature (London)* 312, 663-666.
- Pace, C. N. (1986) *Methods in Enzymol.* 131, 266-280.
- Pace, C. N., Laurents, D. V. y Thomson, R. E. (?). (1990) *Biochemistry* 29, 2564-2572.
- Pace, C. N., Laurents, D. V. y Erickson, R. E. (1992) *Biochemistry* 31, 2728-2734.

Pace, C. N., Shirley, B. A. y Thomson, J. A.(?) (1989) in *Protein structure, a practical approach* (Creighton, T. E., Ed.) pp 311-330, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Pace, C. N. y Vandenburg, K. E. (1979) *Biochemistry* 18, 288-292.

Perry, K. M., Onuffer, J. J., Gittelman, M. S., Barnat, L. y Matthews, C. R. (1989) *Biochemistry* 28, 7961-7968.

Pfeil, W. y Privalov, P. L. (1976) *Biophys. Chem.* 4, 41-50.(23-50??)

Plaza del Pino, I. M. y Sanchez-Ruiz, J. M. (1995) *Biochemistry* 34, 8621-8630.

Plotnikov, V. V., Brandts, J. M., Lin, L. N. & Brandts, J. F. (1997) *Analytical Biochemistry* 250, 237-244.

Privalov, P. L. (1979) *Adv. Prot. Chem.* 33, 167-241.

Privalov, P. L. (1980) *Pure Appl. Chem.* 52, 479-497.

Privalov, P. L. (1982) *Adv. Prot. Chem.* 35, 1-104.

Privalov, P. L. (1989) *Annu. Rev. Biophys. Biophys.(?) Chem.* 18, 47-69.

Privalov, P. L. (1996) *J. Mol. Biol.* 258, 707-725.

Privalov, P. L., Griko, Y. V., Venyaminov, S. Y. y Kutysenko, V. P. (1986) *J. Mol. Biol.* 190, 487-498.

Privalov, P. L. y Khechinashvili, N. N. (1974) *J. Mol. Biol.* 86, 665-684.

Privalov, P. L. y Makhatadze, G. I. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 715-723.

Privalov, P. L. y Makhatadze, G. I. (1993) *J. Mol. Biol.* 232, 660-679.

Privalov, P. L., Plotnikov, V. V. y Filimonov, V. V. (1975) *J. Chem. Thermodyn.* 7, 41-47.

Privalov, P. L., Tiktopulo, E. I., Venyaminov, S. Y., Griko, Y. V., Makhatadze, G. I. y Khechinashvili, N. N. (1989) *J. Mol. Biol.* 205, 737-750.

Ptitsyn, O. B. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 74-78.

- Radford, S. E., Dobson, C. M. y Evans, P. A. (1992) *Nature* 358, 302-307.
- Rothwarf, D. M. y Scheraga, H. A. (1996) *Biochemistry* 35, 13797-13087.
- Sanchez-Ruiz, J. M. (1992) *Biophys. J.* 61, 921-935.
- Sanchez-Ruiz, J. M. (1995) *Subcellular Biochemistry*, vol 24, *Proteins: Structure, Function, and Engineering* (Biswas, B. B. y Roy, S., Eds) pp 133-176, Plenum Press, New York.
- Sanchez-Ruiz, J. M., y Mateo, P. L. (1987) *Cell Biol. Rev.* 11, 15-45.
- Santoro, M. M. y Bolen, D. W. (1988) *Biochemistry* 27, 8063-8068.
- Santoro, M. M. y Bolen, D. W. (1992) *Biochemistry* 31, 4901-4907.
- Savitzky, A. y Golay, M. J. E. (1964) *Anal. Chem.* 36, 1627-1639.
- Schellman, J. A. (1978) *Biopolymers* 17, 1305-1322.
- Schellman, J. A. (1987) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16, 115-137.
- Schmid, F. X. (1992) in *Protein Folding* (Creighton, T. E., Ed) pp 197-241, Freeman, New York.
- Segawa, S. I. y Sugihara, M. (1984a) *Biopolymers* 23, 2473-2488.
- Segawa, S. I. y Sugihara, M. (1984b) *Biopolymers* 23, 2489-2498.
- Semitsonov, G. V., Kihara, H., Kotova, N. V., Kimura, K., Amemiya, Y., Wakabayashi, K., Serdyuk, I. N., Timchenko, A. A., Chiba, K., Nikaido, K., Ikura, T. y Kuwajima, K. (1996) *J. Mol. Biol.* 262, 559-574.
- Serrano, L., Kellis, J. T., Cann, P., Matouscheck, A. y Fersht, A. R. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 783-804.
- Shortle, D. (1995) *Adv. Prot. Chem.* 46, 217-247.
- Shortle, D. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 66-74.
- Smith, C. K., Bu, Z., Anderson, K. S., Sturtevant, J. M., Engelman, D. M. y Regan, L.

(1996) *Protein Sci.* 5, 2009-2019.

Smith, C. K. y Regan, L. (1995) *Science* 270, 980-982.

Smith, J. S. y Scholtz, J. M. (1996) *Biochemistry* 35, 7292-7297.

Smith, C. K., Withka, J. M. y Regan, L. (1994) *Biochemistry* 33, 5510-5517.

Spolar, R. S., Livingstone, J. R. y Record, M. R. (1992) *Biochemistry* 31, 3947-3955.

Stark, G. R. (1965) *Biochemistry*, 4, 1030.

Sturtevant, J. M. (1987) *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38, 463-488.

Tanford, C. y Kirkwood, J. G. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5333.

Tanford, C. y Roxby, R. (1972) *Biochemistry* 11, 2192.

Takahashi, K. y Sturtevant, J. M. (1981) *Biochemistry* 20, 6185-6190.

Tanford, C. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 2050.

Tanford, C. (1970) *Adv. Protein Chem.* 24, 1-95.

Van Uitert, L. G., y Fernelius, W. C. (1954) *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 5887.

Van Uitert, L. G., y Haas, C. E. (1953) *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 451.

Wada, A. y Nakamura, H. (1981) *Nature* 293, 757-758.

Warren, J. R. y Gordon, J. A. (1966) *J. Phys. Chem.* 67, 1524.

Warshel, A. y Papazyan, A. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 211-217.

Wilkinson, K. D., Cox, M. J., O'Connor, L. B. y Shapira, R. (1986) *Biochemistry* 25, 4999-5004.

Wintrode, P. L., Makhatadze, G. I. y Privalov, P. L. (1994) *Proteins: Structure, Function, and Engineering* 18, 246-253.

Yang, A. S., Gunner, M. R., Sampogna, R., Sharp, K. y Honig, B. (1993) *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 15, 252-265.

- Yang, A. S. y Honig, B. (1993) *J. Mol. Biol.* 231, 459-474.
- Yang, A. S. y Honig, B. (1994) *J. Mol. Biol.* 237, 602-614.
- Yang, J. T., Wu, C. S., Martínez, H. M. (1986) *Methods in Enzymol.* 130, 208-226.
- Yao, M. y Bolen, D. W. (1995) *Biochemistry* 34, 3771-3781.
- Yu, Y., Makhatadze, G. I., Pace, C. N., Privalov, P. L. (1994) *Biochemistry* 33, 3312-3319.
- Yu, Y., Monera, O. D., Hodges, R. S. y Privalov, P. L. (1996) *Biophys. Chem.* 59, 299-314.



Biblioteca Universitaria de Granada



01052664

