

OBJETIVOS

Emplear técnicas que se usan con frecuencia en los procesos de **caracterización de proteínas** y ser capaces de llevar a cabo la identificación de los estados que presenta, carácter de reversibilidad, resistencia al aumento de la temperatura y la determinación e interpretación de los valores termodinámicos de la misma.

LISOZIMA

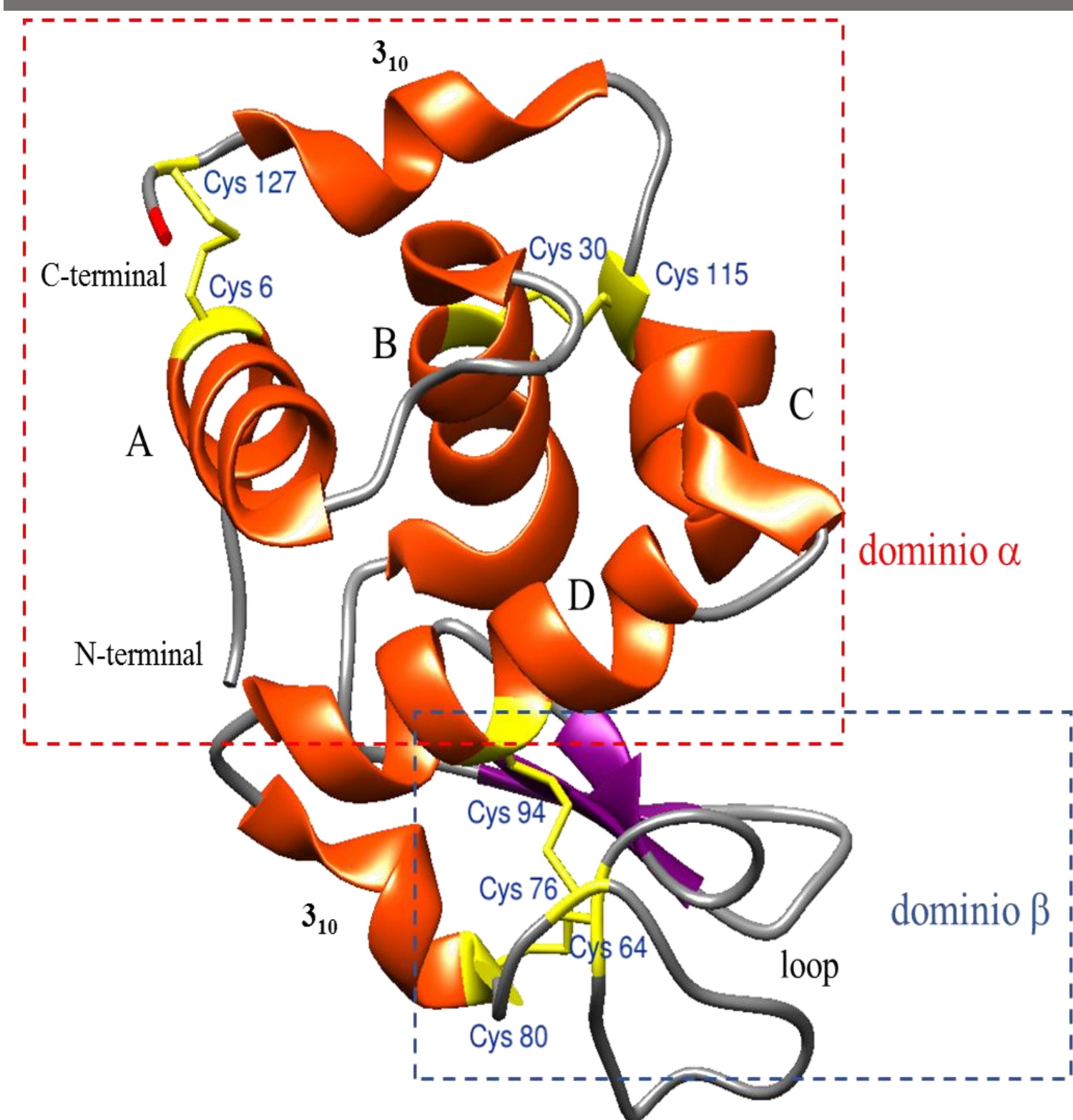


Figura 1. Representación estructural de lisozima nativa (1DPX) con el dominio α conteniendo las α-hélices A-D y la hélice 3₁₀ en el extremo C-terminal y con un dominio β compuesto por 3 láminas β entrecruzadas y una larga región desordenada, "loop".

RESULTADOS DSC/F.

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

CONCLUSIONES

La **lisozima** obedece a un modelo de **dos estados**. Ambas técnicas nos dan **valores similares** de T_m , pero para la **obtención** de los **parámetros termodinámicos** del **proceso de desplegamiento de lisozima** debemos de hacer uso de un **instrumento de DSC**, el cual nos aporta valores de **entalpía** y **entropía** más **certeros**, debido a que la **fluorescencia** hace uso de una **medida indirecta** en su toma de **datos**, además, podemos obtener los valores del **cambio de capacidad calorífica** y de la **capacidad calorífica máxima** mediante **DSC**.

FLUORESCENCIA

La rampa de temperaturas era de 1 °C/min, partiendo desde 35 °C hasta 90-92 °C.

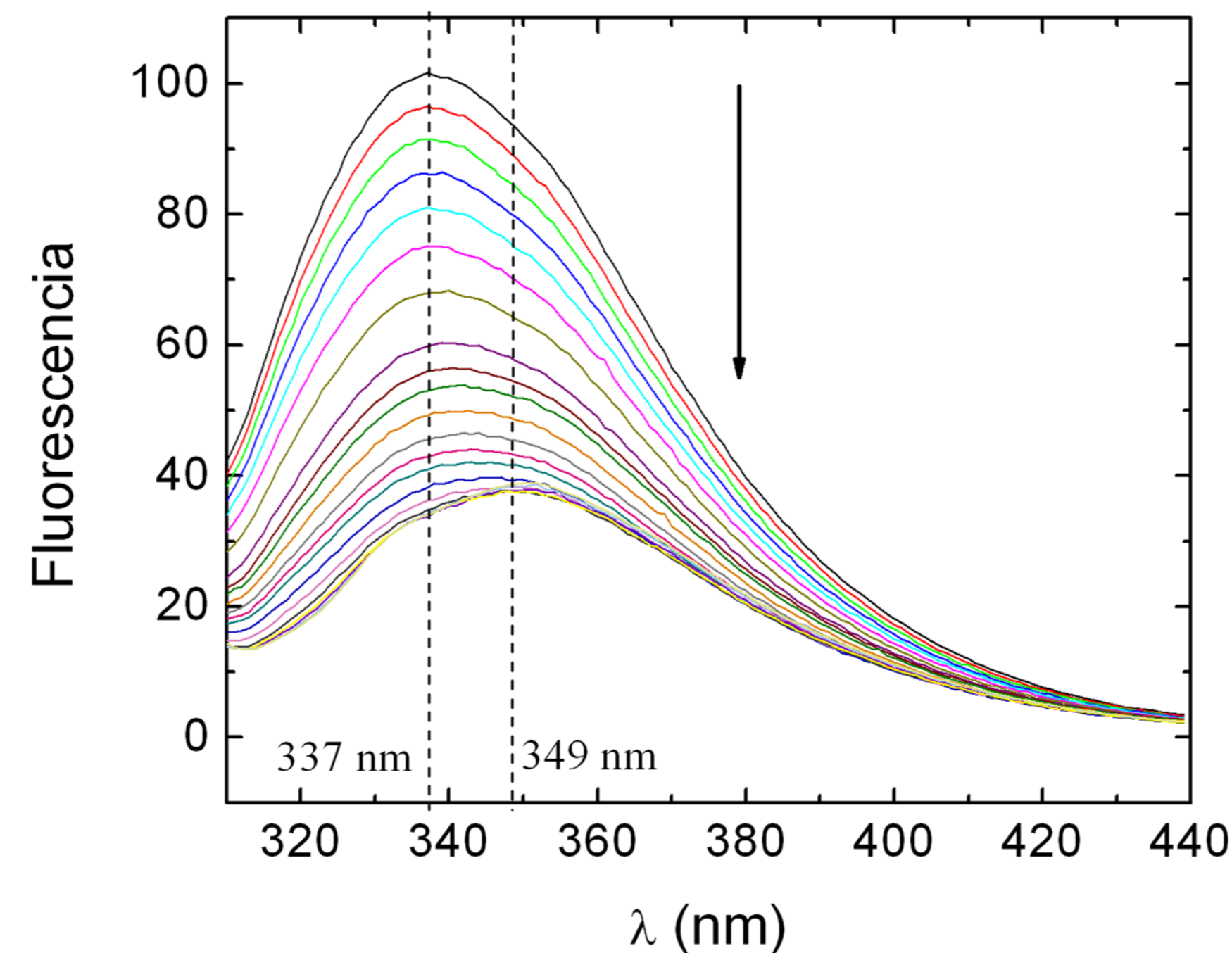


Figura 2. Espectros de emisión de fluorescencia de lisozima a diferentes temperaturas comprendidas entre 35 °C y 92 °C. El sentido de la flecha indica un aumento de temperatura.

La transición térmica puede visualizarse representando la relación entre los valores de fluorescencia a 349 y 337 nm, de cada espectro.

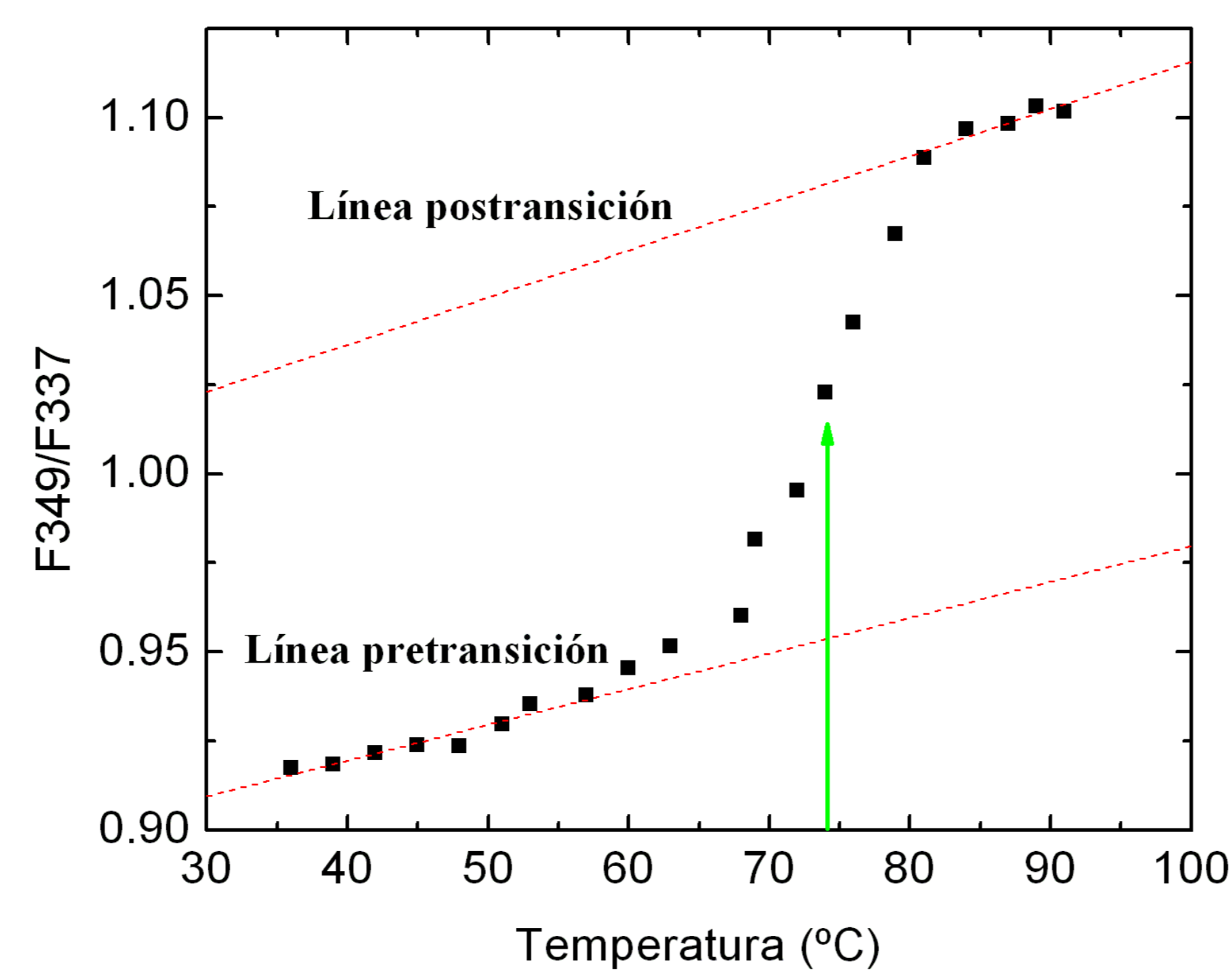


Figura 3. Variación de la relación de fluorescencia (F₃₄₉/F₃₃₇) a distintas temperaturas comprendidas entre 35 y 92 °C.

En la zona de pretransición predominan las moléculas en estado nativo y en la de postransición moléculas desnaturalizadas. Entre ambas zonas, se encuentra la región de la transición de desplegamiento.

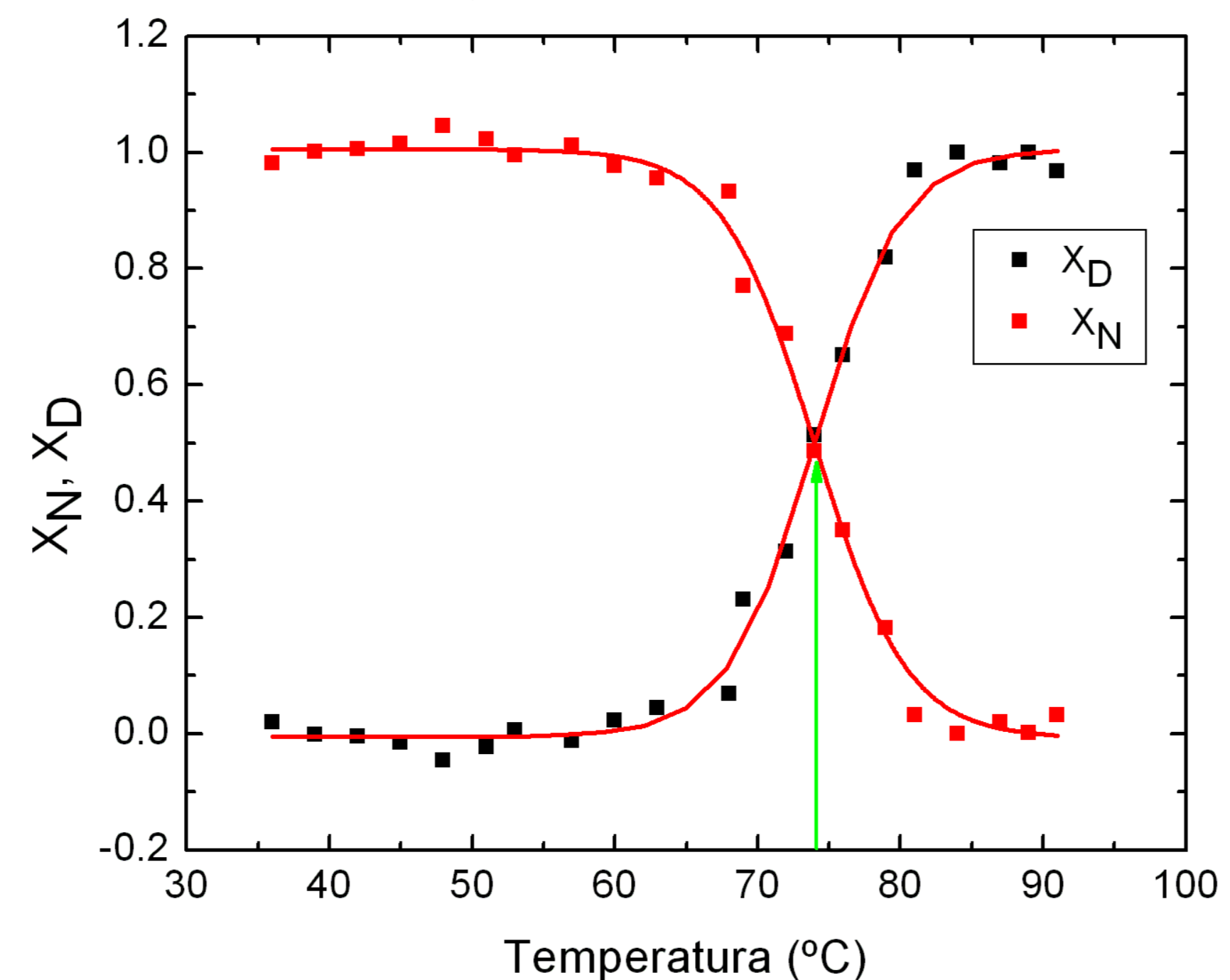


Figura 4. Poblaciones del estado nativo (X_N) y del estado desnaturalizado (X_D) en función de la temperatura. Las líneas continuas representan un ajuste sigmoidal genérico.

El valor de T_m , 74 °C (347,15 K) corresponde al valor de temperatura, donde el número de moléculas de ambos estados están en la misma proporción.

DSC

Se realizaron 3 barridos a la misma velocidad con el mismo intervalo de temperatura, difiriendo únicamente en la concentración de lisozima, se obtuvo el mismo valor de T_m , por lo tanto, el desplegamiento de la proteína es de dos estados.

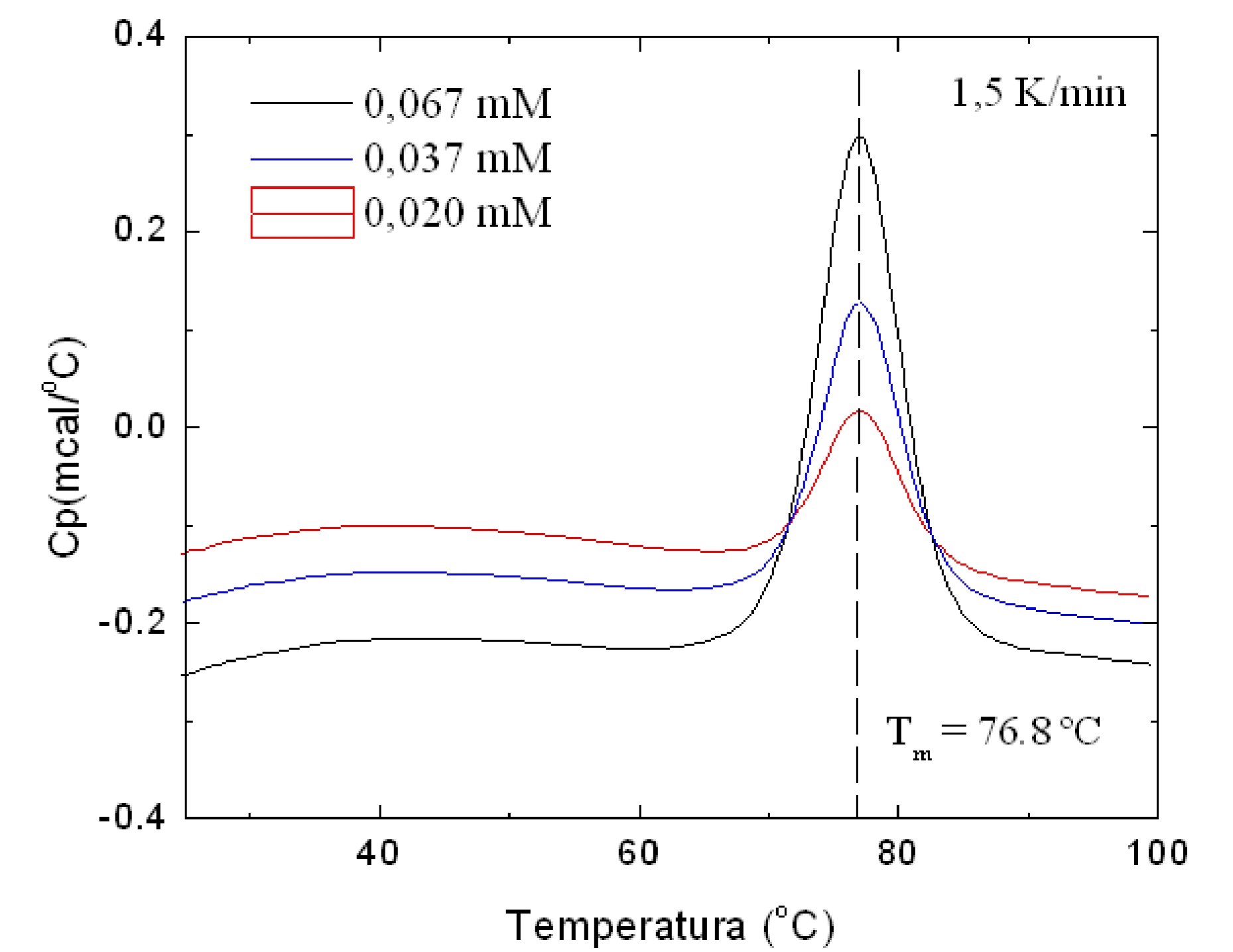


Figura 5. Diferentes barridos de diferentes concentraciones de lisozima en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.

Para el análisis de cualquier traza calorimétrica y deducción de sus parámetros termodinámicos es necesario realizar dos correcciones de línea base: La instrumental (restado de la traza del tampón) y la química.

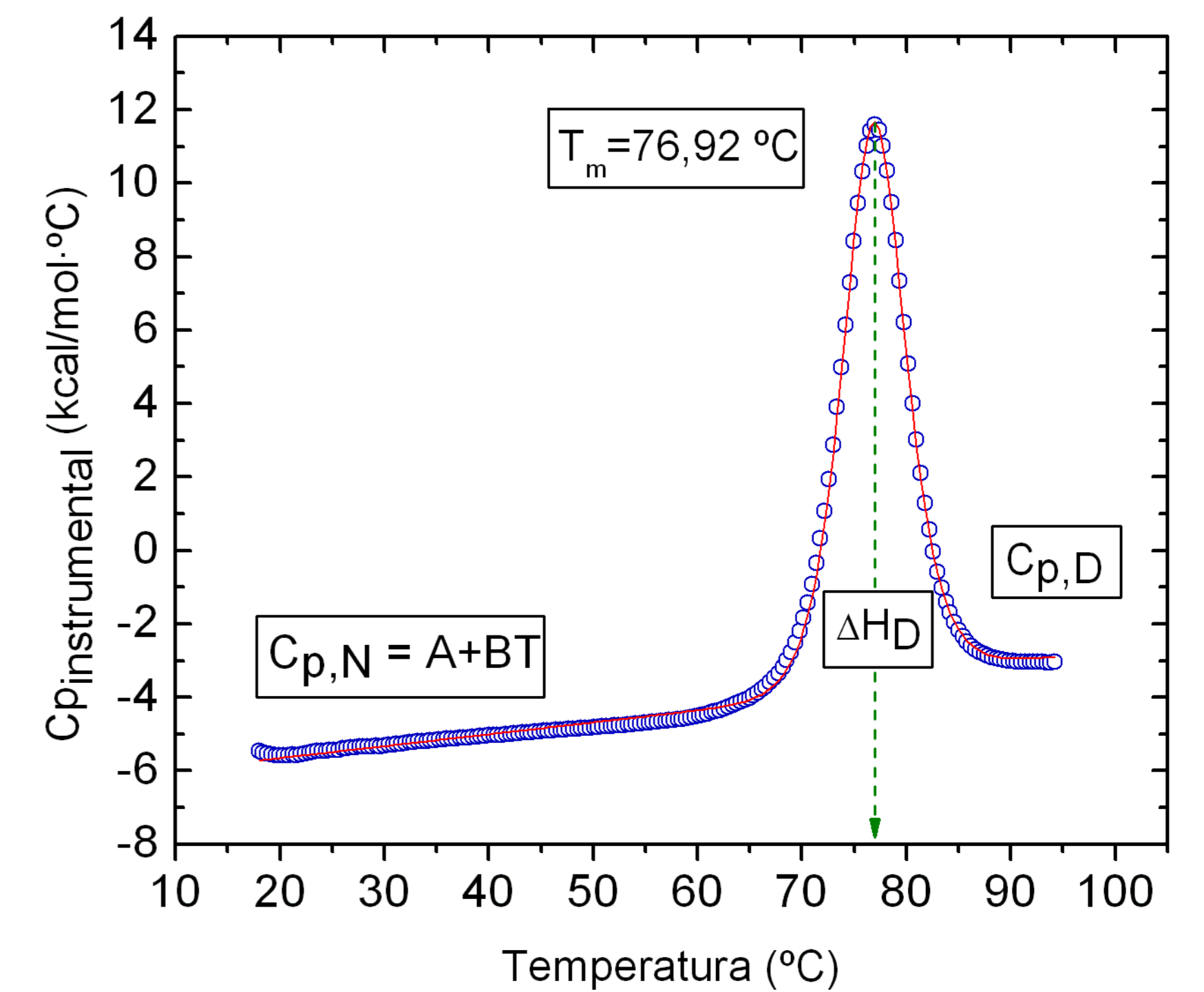


Figura 6. Termograma calorimétrico de lisozima, tras la corrección de la línea base instrumental. La línea continua representa el ajuste a los datos de la traza y que proporciona los parámetros citados en el texto.

La endoterma neta resultante se normaliza y analiza con el software *Micromath Scientist*.

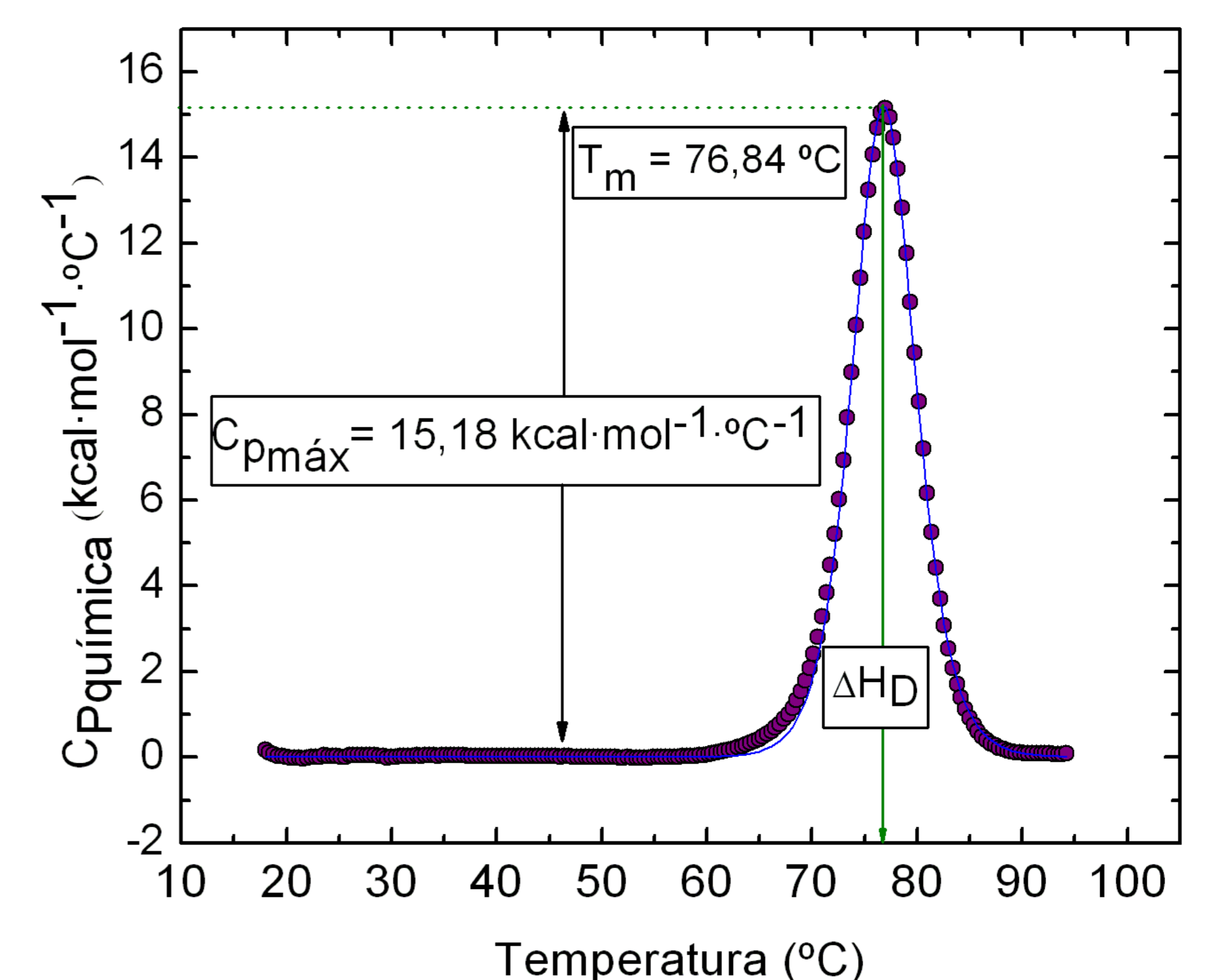


Figura 7. Traza experimental tras la corrección de línea de base instrumental y química.