



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Efecte de cations i alcohols damunt l'estabilitat i agregació del lisozim

Catalina Rigo Rigo

Grau de Química

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43230843C

Treball tutelat per Miquel Adrover Estelrich

Departament de Química



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Lisozim, agregació, fibres amiloides

Índex

Introducció	4
1. El lisozim.....	4
1.1. Funció biològica	4
1.2. Seqüència i analogia seqüencial entre variants.....	5
1.3. Estructura.....	6
1.4. Mutacions, agregació i implicacions patològiques.....	6
2. Factors que influeixen l'estabilitat estructural del lisozim.....	7
2.1. L'efecte del pH damunt l'estat de ionització dels residus.....	7
2.2. El pH i els enllaços d'hidrogen	7
2.3. El pH i les interaccions electrostàtiques.....	7
2.4. El pH i els enllaços covalents.....	7
3. Fibres amiloides	8
3.1. Importància.....	9
3.2. Estructura.....	9
3.3. Mecanisme de formació	10
3.4. Fibres de lisozim	12
4. Objectiu	13
5. Materials i mètodes.	14
5.1. Materials.....	14
5.2. Preparació de dissolucions	14
5.3. Espectroscòpia IR.....	14
5.4. Deconvolució d'espectres IR.....	15
5.5. Calorimetria diferencial d'escombratge (DSC).....	16
5.6. Estudis de fluorescència	17
6. Resultats	19
6.1. Efecte de diferents alcohols i de seva concentració sobre l'estructura secundària del HEWL ..	19
6.2. Efecte de diferents cations i la seva concentració sobre l'estructura secundària del HEWL	21
6.3. Efecte de diferents tipus d'alcohols sobre l'estabilitat tèrmica de la lisozim.....	22
6.4. Efecte de diferents cations sobre l'estabilitat tèrmica del lisozim.....	24
6.5. Efecte de diferents tipus alcohols sobre la cinètica d'agregació del lisozim.....	27
7. Conclusions	31
8. Bibliografia.....	32

Introducció

1. El lisozim

1.1. Funció biològica

El lisozim és una proteïna, en concret un enzim, que pertany al grup de les glucosidases. Es troba present a secrecions mucoses com les llàgrimes o la saliva i també es troba en abundància al blanc d'ou. Biològicament actua com a barrera de protecció en front a infeccions bacterianes i aquesta funció, la duu a terme mitjançant la ruptura catalítica dels peptidoglicans que conformen les parets de les cel·lules bacterianes. Concretament, catalitza la hidròlisi dels enllaços *o*-glucosídics $\beta(1\rightarrow4)$ establerts entre l'àcid *N*-acetilmuràmic (NAM) i la *N*-acetil-D-glucosamina (NAG) (**Figura 1**).^{1,2,3} [Mestecky, 2004]

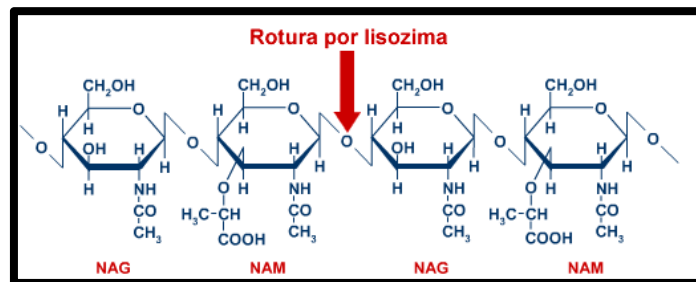


Figura 1. Peptidoglicà bacterià NAG-NAM. Amb la fletxa vermella s'assenyala el punt d'acció del lisozim.¹

L'acció enzimàtica del lisozim es desenvolupa una vegada s'ha format el complex enzim-substrat. Aquest darrer s'acobla al centre actiu de l'enzim gràcies a una obertura que té el lisozim a la superfície de la seva estructura i que la travessa de cara a cara. Així, tal i com es mostra a la **Figura 2**, el centre actiu reconeix sis residus de la cadena de polisacàrid, els quals interaccionen amb la proteïna mitjançant la formació de diferents ponts d'hidrogen amb varis residus proteics.

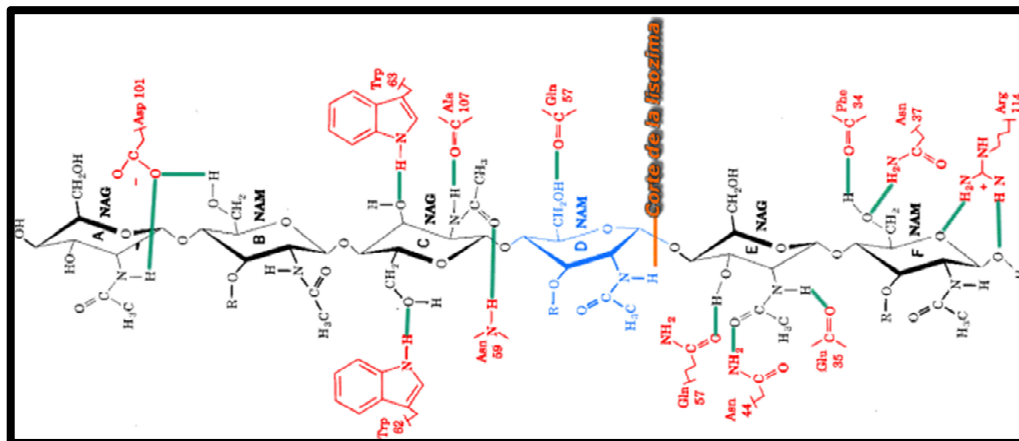


Figura 2. Esquema del procés d'interacció entre el lisozim i el peptidoglicà.¹

Una vegada unit el peptidoglicà, el lisozim catalitza la hidròlisi de l'enllaç que uneix els anells D→E, és a dir, l'enllaç *o*-glucosídic situat entre el quart i el cinquè anell (**Figura 2**). El mecanisme és el d'una catàlisi àcid-base, on hi intervenen dos aminoàcids de caràcter àcid (Glu35 i Asp52) que es

¹<http://gmein.uib.es/otros/enzimas/Jmoldesarrollo/lysozimjmol/lysozimjmol.htm>

²<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=9>

³ <http://lysozyme.co.uk/>

troben situats a cares oposades de l'enllaç que s'hidrolitzarà. L'entorn que envolta cada un d'aquests aminoàcids és diferent. L'Asp52 es troba envoltat de grups polars, fet que fa que el seu pK_a sigui el típic d'un àcid dèbil i per tant, a pH fisiològic es troba ionitzat. El cas contrari és el del Glu35, localitzat a una regió hidròfoba, fet que fa que a pH fisiològic es trobi essencialment protonat. Es per això, que en el cas del lisozim, l'entorn dels residus catalítics es clau en el desenvolupament de la catalisi. Així, el mecanisme catalític del lisozim implica les següents etapes:⁴¹

a) A la primera, el lisozim s'uneix a la paret bacteriana de manera que l'hexasacàrid amb seqüència NAG-NAM-NAG-NAM-NAG-NAM queda fixat en al centre actiu. En aquest procés, el quart residu D (NAM) es distorsiona agafant una conformació de semi-cadira per així evitar les repulsions que es produïrien entre el grup CH_2OH (del C_6) i la cadena proteica en el cas que es retingués la conformació original en forma de cadira.

b) Posteriorment, el Glu35 transfereix el H^+ del seu grup àcid al O_1 de l'anell D, rompent-se així l'enllaç *o*-glucosídic i formant-se un carbaníó que s'estabilitza per efecte ressonant. A la vegada, el grup carboxilat de l'Asp52 estabilitza mitjançant interaccions electrostàtiques el carbaníó.

c) Finalment, l'enzim allibera l'anell E hidrolitzat, alhora que el carbaníó es atacat per un grup hidroxil d'una molècula d'aigua del dissolvent, quedant així protonat el Glu35 i alliberant-se l'anell D.

1.2. Seqüència i analogia seqüencial entre variants

El lisozim humà és una proteïna monomèrica, formada per una cadena de 130 aminoàcids i que presenta la funció d'actuar com a barrera protectora en front a infeccions bacterianes. Malgrat això, tots els organismes superiors presenten també aquest enzim integrat en el seu mecanisme de defensa⁴. La evolució, ha fet que la llargària i seqüència d'aquest enzim variï d'un ésser viu a un altre, encara que els aminoàcids que formen el centre actiu estan fortament conservats. Així, al comparar les seqüències del lisozim humà amb el de pollastre (HEWL, *Hen Egg White Lysozyme*) es pot veure que aquest darrer té un aminoàcid menys a la seva estructura primària, mentre que són diversos els residus que s'han modificat com a resultat de l'evolució (**Figura 3**). Es per això, que el lisozim humà presenta una temperatura de desnaturalització major i, per tant, una menor tendència a agregar-se.

sp P00698 LYSC_CHICK	MRSLLILVLCFLPLAALGKVFRCCELAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQA
sp P61626 LYSC_HUMAN	MKALIVLGLVLLSVTVQGVKVFRCCELARTLKRLGMDGYRGISLANWMCLAKWESGYNTRA
	::*:* * : * :. **** ***** ::* *:* ** **:*:* *:*:* *:*:*
sp P00698 LYSC_CHICK	TNRN-IDGSTDYGILQINSRWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNCARKIVSD
sp P61626 LYSC_HUMAN	TNYNAGDRSTDYGIQINSRYWCNDGKTPGAVNACHLSCSALLQDNIADAVACARKVVRD
	** * * *****:*****:*****: * *.: *****.:*: * *:*:* * *
sp P00698 LYSC_CHICK	GNGMNAWVAWRNRCRGTDVQAWIRGCRL
sp P61626 LYSC_HUMAN	PQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQCGV
	*: *****: ** :***** :

Figura 3. Comparació de la seqüència primària entre el HEWL i el lisozim humà. El codi de colors fa referència al grup al qual pertanyen (hidrofòbics, hidrofílics, carregats positivament, ...). El codi de punts i asteriscs representa la similitud entre la seqüència d'aminoàcids entre les dues variants de lisozim. El símbol "*" indica el mateix residu; ":" l'aminoàcid no és el mateix però és similar pel que fa a les seves propietats físiques; "." els aminoàcids només presenten una similitud marginal. Si no es troba cap símbol en una determinada posició indica que no existeix cap semblança entre els dos residus.

¹<http://gmein.uib.es/otros/enzimas/Jmoldesarrollo/lisozimjmol/lisozimjmol.htm>

⁴<http://www.piercenet.com/product/lysozyme>

1.3. Estructura

El HEWL és una proteïna monomèrica que presenta un pes molecular de 14331 daltons. Presenta dos dominis estructurals, l'alfa i el beta (**Figura 4**). El domini α es troba format per 4 hèlixs α , dues pròximes a l'extrem N-terminal i dues a l'extrem C-terminal, on també presenta una hèlix 3_{10} . Per la seva part, el domini β compta amb 2 làmines β antiparal·leles i una hèlix 3_{10} . La hèlix 3_{10} es caracteritza per presentar una longitud menor que les hèlixs α i conté uns 3 residus per volta. El HEWL presenta també 4 ponts disulfur que establertes entre les C6-C127, C30-C115, C64-C86 i C76-C94, enllaços que donen una gran estabilitat i rigidesa a l'estructura. [Bradley, 2007]

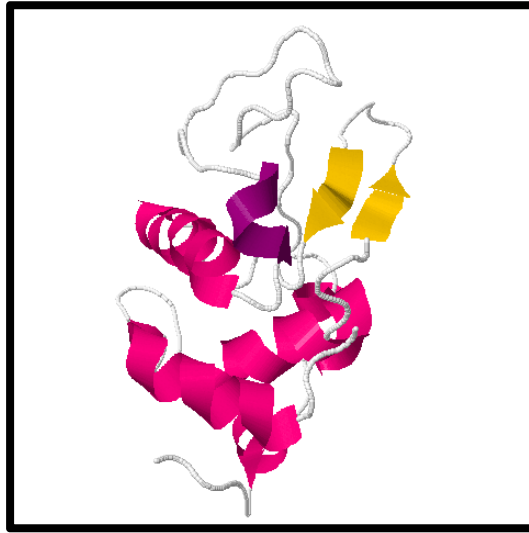


Figura 4. Estructura cristal·logràfica del HEWL (còdi pdb: 1E8L).

1.4. Mutacions, agregació i implicacions patològiques

L'estat natiu del HEWL té una elevada estabilitat tèrmica (la seva temperatura de desnaturalització en condicions fisiològiques és d'aproximadament 75°C [Venkataramani, 2013]) i, per tant, una baixa tendència a sofrir canvis conformacionals que puguin exposar al solvent regions hidròfobes que induïrien a l'agregació. A més, s'ha observat també que la seva temperatura de desnaturalització presenta una gran dependència del medi en que es troba el HEWL. Així s'ha vist que aquesta augmenta de manera proporcional al pH del medi. [Cooper, 2010]

Malgrat la seva elevada estabilitat, s'han detectat diferents mutacions del lisozim humà *in vivo* que fan que la seva estabilitat estructural baixi, facilitant el seu desplegament i la posterior agregació en forma d'unes estructures fibril·lars [Goda, 2000] de les que parlarem més endavant. La formació i depòsit d'aquestes fibres és responsable d'una gran nombre de malalties, tant a humans com a animals.

Totes les mutacions naturals descobertes al lisozim humà es troben localitzades al domini β de la proteïna excepte una d'elles que es troba a la hèlix D del domini α però sempre conjuntament amb la mutació del domini β T70N. Malgrat aquestes mutacions, la cristal·lografia de raigs X ha demostrat que els HEWL que presenten les mutacions I56T, D67H o T70N posseeixen la mateixa estructura que el HEWL natiu i que tots els ponts disulfur es troben correctament formats. A més aquestes variants mutades, també són funcionals ja que presenten una activitat molt similar a la proteïna nativa. [Dumoulin, 2006]

2. Factors que influeixen l'estabilitat estructural del lisozim

Tal i com es pot entendre del que s'ha exposat abans, l'estabilitat estructural té una gran rellevància al lisozim, tant a l'hora de desenvolupar la seva funció enzimàtica, com a l'hora de donar-li la integritat estructural que impossibilita el seu desplegament i posterior agregació. El pH és un factor clau a l'hora de definir l'estabilitat del lisozim [Bradley, 2007], ja que aquest afecta en gran mesura a les interaccions que condicionen la seva estructura. Aquest efecte ha estat amplament estudiat [Cooper, 2010] i en aquest apartat es descriurà com pot afectar la variació del pH damunt les diferents forces que guien l'estructura del lisozim.

2.1. L'efecte del pH damunt l'estat de ionització dels residus

Els aminoàcids es poden trobar en tres formes ionitzades en funció del pH de l'entorn (carregats positivament, neutres o carregats negativament). Algunes de les cadenes laterals dels aminoàcids tenen la capacitat d'acceptar o perdre protons, de manera que l'estat de ionització que presenta un residu concret vendrà determinat pel pH del medi. Òbviament aquest fet condicionarà les interaccions de cada residu amb els seus veïns i, conseqüentment, l'estructura global proteica. [Bradley, 2007]

2.2. El pH i els enllaços d'hidrogen

A pH molt elevat la majoria dels aminoàcids es trobaran desprotonats, mentre que a pH extremadament àcid estaran protonats. En funció dels canvis de pH, els enllaços d'hidrogen es rompran i es formaran a diferents zones de la proteïna afectant a la seva estructura. Un exemple d'aquest efecte és que, a pH neutre, un Asp no pot ser donador de pont d'hidrogen, mentre que si el pH baixa pot arribar a convertir-se en donador/acceptor. [Bradley, 2007]

2.3. El pH i les interaccions electrostàtiques

L'efecte principal del pH damunt l'estabilitat proteica és dona arrel de la seva influència damunt les interaccions electrostàtiques entre dos residus carregats. Si el pH es veu alterat pot resultar en la pèrdua de la càrrega d'un dels residus o d'ambdós, perdent-se així la naturalesa electrostàtica de la interacció. Com més intensa és la interacció electrostàtica, més difícil és que es vegi afectada per canvis en el pH. Aquestes interaccions presenten la característica de modificar el valor dels pK_a dels aminoàcids implicats. Si les variacions del pK_a són molt grans respecte dels valors de pK_a corrents és un fet indicatiu d'una interacció molt forta. [Bradley, 2007]

2.4. El pH i els enllaços covalents

La incubació d'una proteïna a alta temperatura i baix valors de pH dona com a resultat la hidròlisi dels enllaços peptídics en posicions Asp-X i X-Asp (essent X qualsevol aminoàcid). Alguns dels mecanismes proposats per explicar la hidròlisi proteica es mostren a la **Figura 5**. En els mecanismes A i B es produeix un atac nucleòfil amb catàlisi àcida i s'obté com a intermedi un anhidric cíclic. Aquest pot sofrir una hidròlisi rompent-se així l'enllaç peptídic. La única diferència entre els dos mecanismes radica en que, al mecanisme A la cadena lateral és la que actua com a nucleòfil, mentre que en el B és la cadena lateral protonada és la que ho fa. Al mecanisme C es dona un atac nucleòfil de la cadena lateral sobre el grup carbonil (del *backbone*) protonat. Seguidament, es

produeix una transferència protònica cap el grup sortint. S'assumeix que la forma reactiva és la cadena lateral no ionitzada de l'àcid carboxílic. El mecanisme D implica l'atac nucleòfil amb catàlisi àcida d'una molècula d'aigua damunt el carbonil peptídic n+1. Per altre banda, el mecanisme E presenta una catàlisi bàsica general on la cadena lateral desprotonada actua com una base per catalitzar l'atac d'una molècula d'aigua sobre el carbonil de l'amida.

La hidròlisi que s'explica en aquest apartat tan sols es pot aplicar als residus d'Asp. El HEWL presenta set residus Asp, encara que la possibilitat de que tots ells sofreixin una hidròlisi no és la mateixa degut a que no tots ells presenten el mateix entorn ni es troben igualment exposats al solvent. [Bradley, 2007]

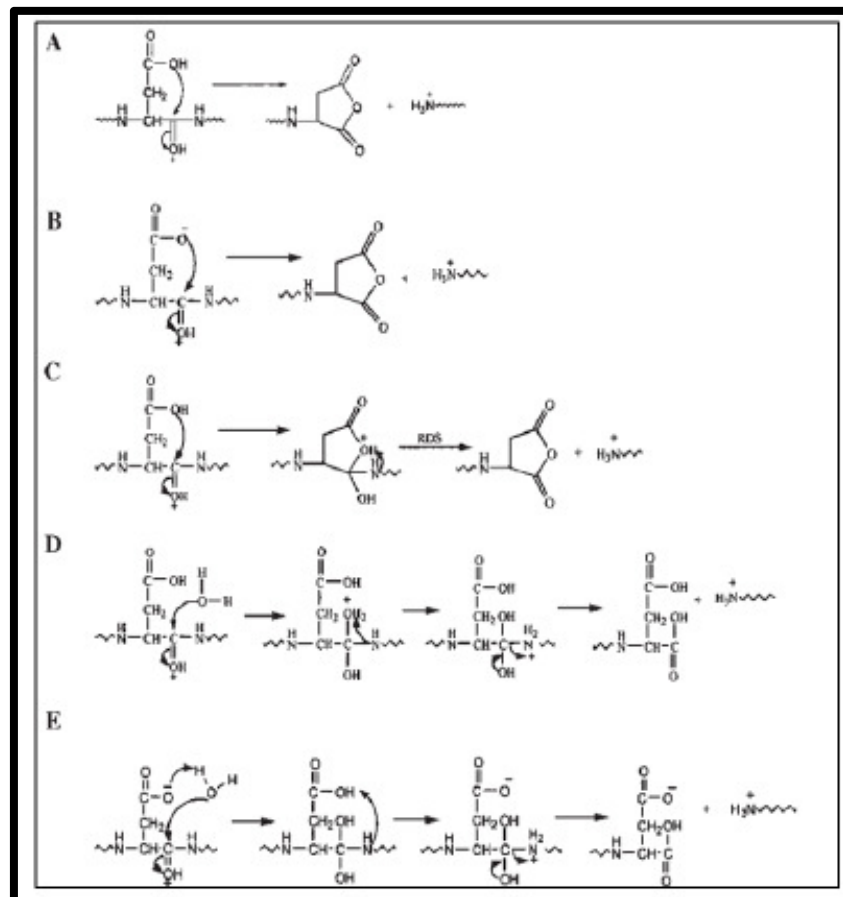


Figura 5. Cinc dels mecanismes proposats per la hidròlisi d'un enllaç peptídic en les posicions Asp-X en una cadena polipeptídica. [Bradley, 2007]

3. Fibres amiloides

Les fibres amiloides apareixen tant *in vitro* com *in vivo* com a resultat del canvi conformacional i la posterior agregació proteica. Per lo general són estructures lineals, filamentoses i llargues, insolubles i resistents a les proteases. Es poden formar a partir de moltes proteïnes diferents, les quals es poden trobar *in vivo* tant en forma plegada com en forma desplegada (proteïnes intrínsecament desplegades). Tal com hem dit, el factor que esdevé clau a la formació de fibres amiloides és la desestabilització estructural, la qual es pot induir *in vitro* variant el pH, la pressió, la temperatura, la constant dielèctrica, la força iònica o induint modificacions químiques o mutacions. Aquest darrer efecte és el més important *in vivo*. [Bradley, 2007]

3.1. Importància

Les fibres amiloides representen un gran interès en els àmbits científic i mèdic degut a que la seves estructures es troben relacionades amb el desenvolupament de gran nombre de malalties, essencialment neuronals (**Taula 1**). La malaltia més coneguda de totes elles és l'Alzheimer. Concretament, apareix com a resultat de la agregació i depòsit sobre les neurones de petits pèptids coneguts com els pèptids A β (majoritàriament l'A β -40 i l'A β -42). [Bradley, 2007]

Taula 1. Malalties conegudes relacionades amb el depòsit de fibres amiloides (*esquerra*) i la corresponent proteïna associada a aquest fet (*dreta*). [Bradley, 2007]

Malaltia	Proteïna associada
Alzheimer	Proteïnes A β (plaques), Proteïna Tau (embolic)
Encefalopaties espongiformes	Proteïnes prions (tota la longitud o fragments)
Malaltia de Parkinson	A-synucleïna (WT o mutants)
Amiloïdosi sistèmica senil	Transtiretina (tota la longitud o fragments)
Polineuropatia amiloide famial	Transtiretina (~45 mutants)
Amiloïdosi relacionada amb l'hemodiàlisi	Microglobulina β -2
Diabetis tipus II	Amilina (fragments)
Amiloïdosi localitzada	Insulina
Amiloïdosi atrial	Factor Natriurètic Atrial
Amiloïdosi del lisozim	Lisozima

La malaltia relacionada amb la proteïna estudiada és l'amiloïdosi del lisozim, descrita per primera vegada al 1993 com una forma no neuropàtica de l'amiloïdosi hereditària. Tan sols existeixen nou publicacions que parlen d'aquest desordre i els casos coneguts han afectat a set famílies sense relació entre elles. En els estudis realitzats a quatre famílies diferents que sofrien aquesta malaltia [Granel, 2006] s'observà que prestaven els següents símptomes: una d'elles presentà la disfunció renal de la malaltia, la segona i la tercera presentaven problemes gastrointestinals, mentre que la darrera sofrí hemorràgies importants degut a la ruptura dels ganglis limfàtics abdominals.

3.2. Estructura

Encara que les proteïnes que donen lloc a la formació de fibres i al consegüent desenvolupament de les malalties amiloides són molt variades, les estructures fibril·lars resultants de la seva agregació són molt similars. Les característiques estructurals que defineixen les fibres amiloides són: a) presenten una llargària d'entre 1.000-16.000 Å i el seu diàmetre es troba entre 80-100 Å; b) existeix un límit superior de llargària ja que, a mesura que creixen, el risc de ruptura en fragments més petits augmenta. Aquests petits nous fragments constitueixen la llavor que possibilita el creixement de noves fibres; c) les fibres amiloides es troben compostes d'unitats més petites que reben el nom de protofibres, les quals consisteixen en làmines β antiparal·leles apilades de forma perpendicular a l'eix de la fibra (**Figura 6**). [Bradley, 2007]

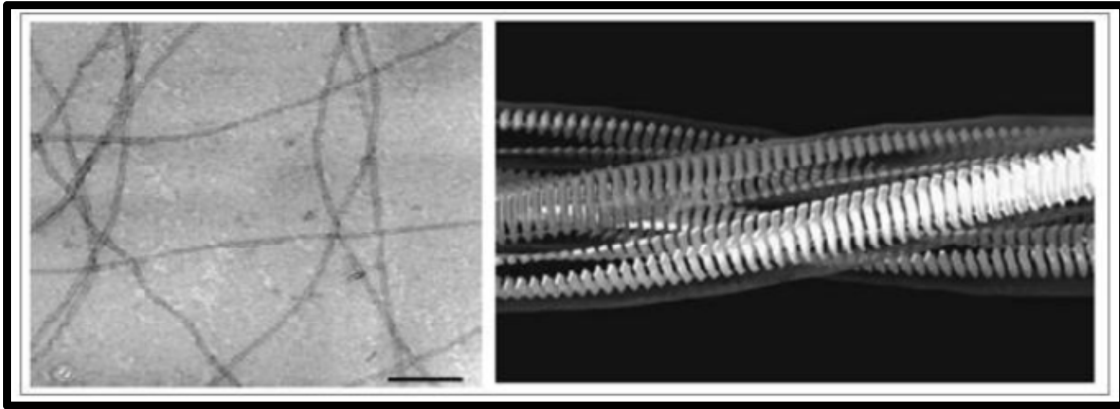


Figura 6. Imatge TEM de fibres amiloides del lisozim humà, la barra de color negre representa 400 nm (esquerra). Model de fibra amiloide amb quatre protofilaments enrotllats entre ells, on es veuen les làmines β responsables del procés d'agregació. [Bradley, 2007]

3.3. Mecanisme de formació

El procés de formació de les fibres amiloides s'ajusta a un procés típic de polimerització, el qual implica les següents etapes:

- Iniciació.
- Elongació/propagació.
- Terminació.

També es pot donar el procés de fragmentació quan una fibra presenta una longitud massa gran per mantenir-se intacta. La fragmentació formarà moltes fibres de petita longitud que poden dirigir-se cap a altres molècules proteiques i afavorir el desenvolupament de noves fibres (**Figura 7**).

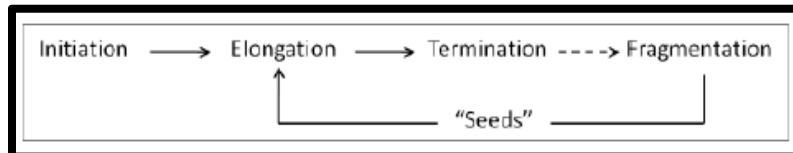
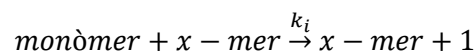
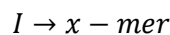


Figura 7. Esquema de les etapes que es donen en el procés de formació de fibres. [Bradley, 2007]

L'etapa d'iniciació es pot descriure com,



On I és l'iniciador, x-mer és la longitud desconeguda del polímer i k_i la constant de polimerització.

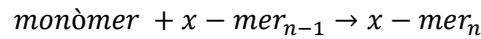
La velocitat de la reacció d'iniciació ve definida per la següent equació:

$$v_I = k_i[I]$$

L'elongació té lloc quan els monòmers s'adjunten als x-mers existents,



De forma que es pot obtenir una equació general,



I la velocitat de reacció d'aquest procés ve determinada per la següent equació:

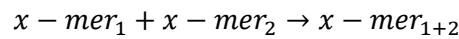
$$v_E = k_p[\text{monòmer}][x - \text{mer}]$$

Si assumim que la reacció és molt ràpida, la velocitat a la qual la concentració total de fibres creix és la mateixa a la velocitat de pas determinant d'iniciació. Derivant s'obté la següent expressió:

$$\frac{d[x - \text{mer}]}{dt} = 2\Phi k_i[I]$$

On Φ representa el rendiment de la primera etapa, la fracció de monòmers que aconseguen iniciar una cadena.

La fibra continuarà creixent fins que finalment es rompi, que es pot representar de la següent forma,



S'assumeix que la velocitat de terminació és independent de la longitud de la cadena. L'equació de velocitat d'aquest pas s'expressa de la següent forma,

$$v = k_T[x - \text{mer}]^2$$

Derivant aquesta expressió obtenim la velocitat de variació de la concentració de x-mer per aquest procés:

$$\frac{d[x - \text{mer}]}{dt} = -2k_T[x - \text{mer}]^2$$

Les fibres amiloides que es formen in vitro mostren una corba de creixement sigmoïdal (**Figura 8**). Comença per l'etapa d'iniciació, on la proteïna perd el seu plegament. En el moment en el que un nombre crític de molècules de proteïna es troben desplegadas, aquestes comencen a interaccionar entre sí, formant-se les fibres a velocitat exponencial. Aquesta és coneguda com la etapa de polimerització i té lloc fins que totes les molècules de proteïna s'han incorporat a estructures fibril·lars. [Bradley, 2007]

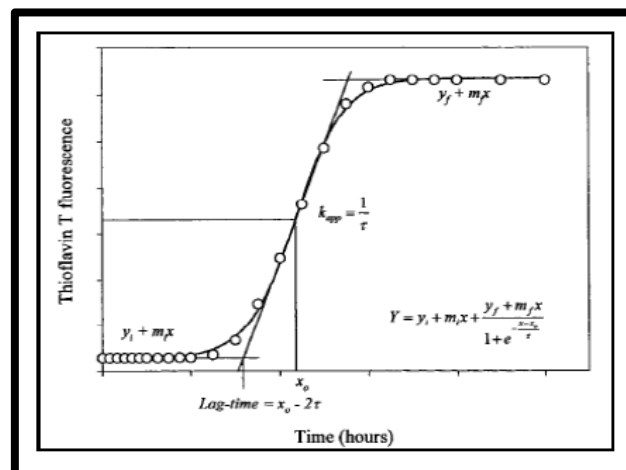


Figura 8. Progressió típica de la formació de fibres amiloides. [Bradley, 2007]

3.4. Fibres de lisozim

Les fibres amiloides de HEWL presenten les característiques típiques de les fibres amiloides i apareixen com a resultat de la desestabilització estructural. Així es sap que el mecanisme que condueix la formació de fibres a partir del HEWL implica la formació d'un intermediari parcialment plegat que és el que inicia el procés d'agregació (**Figura 9**). S'ha vist que factors tals com el pH, la polaritat del medi, la força iònica o la presència i concentració d'un determinat tipus d'ió són claus a l'hora de induir el desplegament i agregació del HEWL. [Goda, 2000][Nemzer, 2013]

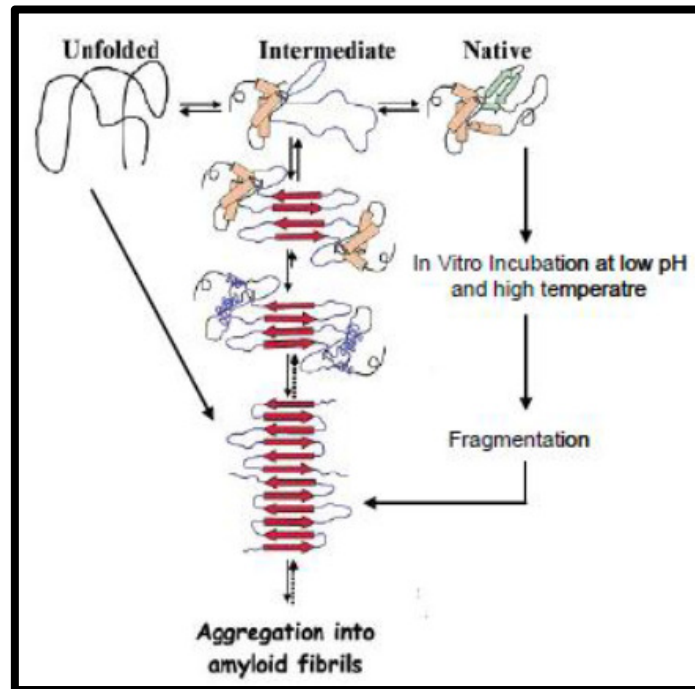


Figura 9. Mecanisme proposat per la formació de fibres amiloides en el HEWL. [Bradley, 2007]

4. Objectiu

Aquesta treball de fi de grau presenta l'objectiu general d'estudiar l'efecte de diferents tipus d'alcohols i cations i la seva concentració, damunt l'estructura secundària del HEWL, la seva estabilitat tèrmica i la seva tendència a formar fibres amiloides.

5. Materials i mètodes.

5.1. Materials

-Lisozim de gallina (HEWL)	-LiCl
-Lisozim humana	-NaCl
-Dissolució de HCl 0.01 M (pH 2.0)	-KCl
-Dissolució Tioflavina-T (ThT)	-MgCl ₂
-Metanol	-CaCl ₂
-Etanol absolut	-BaCl ₂
-2-propanol (isopropanol)	

5.2. Preparació de dissolucions

En tots els experiments realitzats s'utilitzà com a dissolvent una dissolució de HCl 0.01 M. Aquesta es preparà a partir de HCl concentrat i el seu pH s'ajustà fins arribar 2.0. Aquestes condicions es triaren perquè es sap que a pH 2.0 el HEWL es capaç de formar fibres amiloides de forma relativament ràpida. [Bradley, 2007]

Per fer els estudis de DSC es preparà una dissolució mare de HEWL (1 mM), utilitzant com a dissolvent la dissolució de HCl 0.01 M (pH 2). A partir d'aquesta s'agafà l'alíquota corresponent per obtenir la concentració desitjada. En el cas dels vials preparats pels estudis de fluorescència i de IR no s'operava a partir d'aquesta, si no que es pesà directament la quantitat de proteïna que calia.

Per seguir la cinètica de formació de fibres amiloide s'usà la Tioflavina-T com a compost sonda. Per això es preparà una dissolució de concentració 50 mM.

Les dissolucions de proteïna es van preparar també en presència de diferents sals: LiCl, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ i BaCl₂, i a diferents concentracions: 1 M, 0.8 M, 0.6 M, 0.4 M i 0.2 M. El pH de les dissolucions es mantingué sempre a 2.0.

Adicionalment, les dissolucions de proteïna es prepararen en presència de diferents alcohols. Els alcohols usats foren el metanol, l'etanol i l'isopropanol en els següents percentatges en volum: 5, 10, 20, 40, 50 i 60%.

5.3. Espectroscòpia IR

L'espectròmetre utilitzat per obtenir els espectres IR fou el *Vertex 80v* i el programa que s'usà per obtenir les dades experimentals fou l'*OPUS 6.5*. Els espectres s'obtingueren des de 2200 cm⁻¹ fins a 1000 cm⁻¹ com a resultat de la mitjana de 32 scans. La resolució fou d'1 cm⁻¹, l'obertura del detector de 6 mm i la velocitat de l'escàner de 10 kHz. Les mostres utilitzades per l'anàlisi presentaren una concentració de 5 mM de HEWL. En el cas dels alcohols, s'utilitzà com a dissolvent una dissolució de HCl a pH 2 que ja tenia el % d'alcohol desitjat. En el cas dels diferents cations, el dissolvent fou la dissolució que contenia la concentració corresponent de catió. En cada cas es registra el blanc de cada mostra i a continuació, la mostra, obtenint l'espectre IR del lisozim a cada condició experimental.

5.4. Deconvolució d'espectres IR

L'adquisició dels espectres IR es realitzà per obtenir el perfil de la banda amida I. La banda amida I és la banda d'absorció més intensa a les proteïnes. Apareix als espectres IR entre 1600-1700 cm^{-1} . Es troba associada amb la vibració d'extensió del grup C=O (en un 70-85%) i amb la dels grups C-N (en un 10-20%), trobant-se directament relacionada amb la conformació del *backbone* d'una proteïna i amb el seu patró d'enllaços d'hidrogen.⁵

Una vegada adquirides les bandes amida I foren deconvolucionades en les diferents bandes individuals que la conformen, cada una d'elles associada a una estructura secundària concreta, i que es troben solapades i no es poden distingir. Mitjançant un procediment iteratiu d'ajust de les diferents bandes es pot quantificar quina és l'àrea de cada una de les bandes individuals que representa un tipus d'estructura secundària concret. La banda amida I es pot descompondre en vuit bandes cada una d'elles associades a una estructura secundària concreta (**Taula 2**).

Taula 2. Bandes característiques del HEWL i estructura associada a cada una d'elles. [Frare, 2009]

Nombre d'ona, ν (cm^{-1})	Estructura
1615.69	Làmina β agregada
1632.20	Làmina β antiparal·lela
1640.27	Corbes/Desordenat
1650.93	Hèlix α
1658.63	Girs
1666.96	Girs
1674.30	Làmina β antiparal·lela
1688.09	Làmina β agregada

Inicialment es realitza la deconvolució de la banda amida I del lisozim obtinguda a pH 2.0 en absència de cations i alcohols. Per això es varen col·locar diferents bandes, de manera que la posició de cada una d'elles es pot associar a una estructura secundària concreta. Una vegada s'obtingué un bon ajust, es fixà la posició de les bandes i per a la deconvolució de les mostres que contenien cations o alcohols únicament es deixaren lliures per la deconvolució l'alçada i l'amplada de les bandes.

Les bandes que conformen la banda amida I IR foren deconvolucionades emprant la funció Gaussiana + Lorentziana (**Figura 10**), tal i com ja s'havia fet a altres treballs publicats [Frare, 2009]. La deconvolució es feu emprant el programa *PeakFit v4.0*.

⁵http://jenalib.fli-leibniz.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html

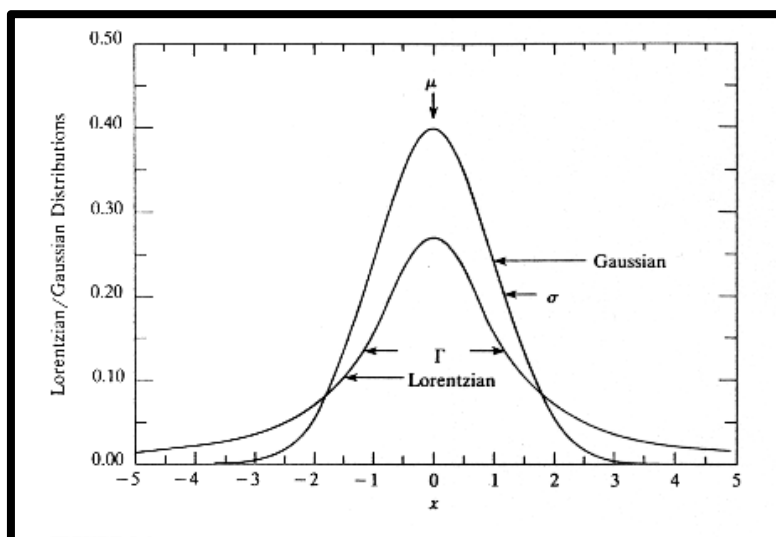


Figura 10. Distribució Gaussiana i Lorentziana.⁶

La funció Lorentziana es defineix amb la següent equació:

$$F(v - v_0) = (\pi^{-1})\gamma[(v - v_0)^2 + \gamma^2]^{-1}$$

On γ és l'altura de la banda a la meitat de l'altura màxima, v_0 defineix la posició mitjana de la banda i $F(v-v_0)$, la funció de distribució de freqüències.

I la funció de distribució Gaussiana es pot ajustar a la següent equació:

$$F(v - v_0) = (a\pi^{-\frac{1}{2}})\exp[-a^2(v - v_0)^2]$$

On v_0 és la freqüència del màxim de la banda i a^{-1} és proporcional a l'amplària de la banda. [Costa, 2005]

S'introdueixen dins l'arxiu d'entrada els valors experimentals obtinguts entre 1580 i 1720 cm^{-1} i es selecciona el tipus de funció que es vol emprar a l'ajust, en aquest cas, *Gaussiana+Lorentziana Amp*, la qual ha estat emprada per deconvolucionar espectres IR [Frare, 2009]. El programa optimitza de forma iterativa els valors disminuint la diferència entre les dades experimentals i les corbes obtingudes per la funció de distribució *Gauss+Lor Amp* després de cada iteració. És va determinar que l'ajust fou correcte quan la corva i les dades experimentals diferiren només en un 2%. [Adrover, 2005]

5.5. Calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)

L'instrumental utilitzat per obtenir les dades associades a l'estabilitat del lisozim fou el *Nano DSC Differential Scanning Calorimeter*. A l'estudi de l'efecte de les cations damunt la estabilitat proteica la concentració de HEWL utilitzada en totes les mesures experimentals va esser 50 μM , excepte en el cas dels alcohols, on la concentració de proteïna fou de 0.1 mM. Una vegada preparades les mostres, es desgasificaren durant 10 minuts per eliminar les bombolles d'aire que poguessin influir en la mesura. Per mesurar el calor específic de la proteïna en presència de diferents cations i dels alcohols en concentracions de 5%, 10% i 20% es dugueren a terme els següents cicles de temperatura: a) una primera fase on s'encalenteix la mostra de 25 a 35°C; b) una segona, on es refreda de 35 a

⁶http://www.phys.unsw.edu.au/~mgb/pg_mod3_lec5/node16.html

25°C; i c) una darrera, de la qual s'obtenen les dades experimentals, on s'augmenta la temperatura de la mostra de 25 a 100°C. En presència d'alcohols a elevades concentracions (40%, 50% i 60%) es varen modificar els intervals de temperatures de cada fase, ja que la temperatura de desplegament del HEWL descendí considerablement. Les que s'utilitzaren a aquestes mesures foren: a) una primera fase on s'augmenta la temperatura de la mostra de 5 a 10°C; b) a la segona, la temperatura es baixa de 10 a 5°C; i, finalment, c) en la qual s'augmenta la temperatura de la mostra de 5 a 60°C.

Una vegada obtingudes les dades experimental s'integraren utilitzant el programa *NanoAnalyze*. La corba experimental s'ajustà a una funció sigmoide usant el model *TwoStateScaled*. Aquesta es basa en el model d'equilibri entre dos estats: un plegat i un desplegat, el qual s'ajusta al comportament del HEWL [Cooper, 2010]. Assumeix que tan sols dos estats es troben poblats de forma significativa: la forma nativa (N) i la forma desplegada o desnaturalitzada (U). $N \leftrightarrow U$ [Muñoz, 2008]

Els resultats experimentals s'ajusten a la funció del model *TwoStateScaled*:

$$T = Temp(i) + 273.15$$

$$T_m^0 = T_m + 273.15$$

$$dH^0 = dH \cdot 1000$$

$$k = \exp\left(-dH^0 \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m^0}\right) / (cR \cdot T)\right)$$

$$C_p = (dH^0 \cdot dH^0) / (cR \cdot T \cdot T) \exp\left(dH^0 \cdot \frac{-T_m^0 + T}{T_m^0 \cdot T \cdot cR}\right) / ((1 + k) \cdot (1 + k)) \cdot aw$$

$$Y = Cp/1000$$

$$i = i + 1$$

Realitzat l'ajust s'obtenen els valors de Aw , T_m i ΔH . El terme Aw és un factor d'escala que té en compte errors en la concentració activa o el pes molecular de la macromolècula. El valor que hauria de prendre és 1.0 si es coneix el pes molecular, la concentració activa exacta, el 100% de la molècula està plegada i participa en la transició termal. Si existeixen errors en aquests paràmetres cal esperar que el valor de Aw s'allunyi de 1. T_m es correspon amb la temperatura de desequilibri entre la proteïna plegada i desplegada i és la temperatura a la qual es troben igual de poblats els dos estats de la proteïna: la forma nativa i la forma desnaturalitzada. Per últim, el terme ΔH expressa l'entalpia de desnaturalització, és a dir, l'energia necessària perquè es dugui dur a terme el desplegament de la proteïna.

5.6. Estudis de fluorescència

Els estudis de les cinètiques d'agregació es centraren en el lisozim de pollastre (HEWL) i com aquestes es veien afectades per la presència d'alcohols. El fluorímetre usat fou el model *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer*, de la marca *Varian*. El programa emprat per obtenir les dades experimentals fou el *Cary Eclipse*.

Les mostres de HEWL preparades per mesurar la cinètica d'agregació fibril·lar foren d'una concentració de 1 mM. El procediment experimental que es seguí és el següent: es pesà la proteïna en un vial, s'addicionà el volum corresponent de dissolució de HCl i d'alcohol i es dissolgué el HEWL. S'agregaren 10 µl de la dissolució de ThT i es traspassaren les dissolucions a les cubetes. De cada una de les mostres es preparà el blanc corresponent i les mesures es realitzaren per duplicat. Com a compost sonda per avaluar la formació de fibres amiloides s'utilitzà la Tioflavina-T. La mesura de la fluorescència de la ThT en una dissolució de lisozim és una de les formes més utilitzades per seguir la reacció de formació de fibres amiloides, ja que quan s'uneix a estructures que presenten làmines β augmenta considerablement la seva fluorescència.⁷ Els espectres de fluorescència foren adquirits excitant a 440 nm i adquirint a 485 nm, mantenint una temperatura constant de 60°C, amb la finalitat d'accelerar el procés d'agregació. Els alcohols utilitzats i el seu percentatge es mostren a la **Taula 3**.

Taula 3. Alcohols i percentatges estudiats en les mesures de la cinètica d'agregació del HEWL per fluorescència.

Alcohol	% (en volum)
Etanol	5-10-20-80
Metanol	5-10-20-30-40-50
Isopropanol	5-10-20

⁷<http://www.assay-protocol.com/biochemistry/protein-fibrils/thioflavin-t-spectroscopic-assay>

6. Resultats

6.1. Efecte de diferents alcohols i de seva concentració sobre l'estructura secundària del HEWL

Inicialment es va estudiar si la presència d'alcohols afectava a l'estructura secundària del HEWL. Per això, es varen adquirir els espectres IR de diferents dissolucions de HEWL en presència d'alcohols a diferent concentració. Una vegada adquirits, es va analitzar la banda amida I (1580-1720 cm^{-1}), essent aquesta deconvolucionada tal i com s'ha descrit a la part experimental. Així, i a mode d'exemple, a les **Figures 11 i 12** es mostren dues de les deconvolucions realitzades, on es poden veure els valors experimentals de la banda amida I, el resultat de l'ajust i els vuit pics en els qual s'ha desglosat la banda.

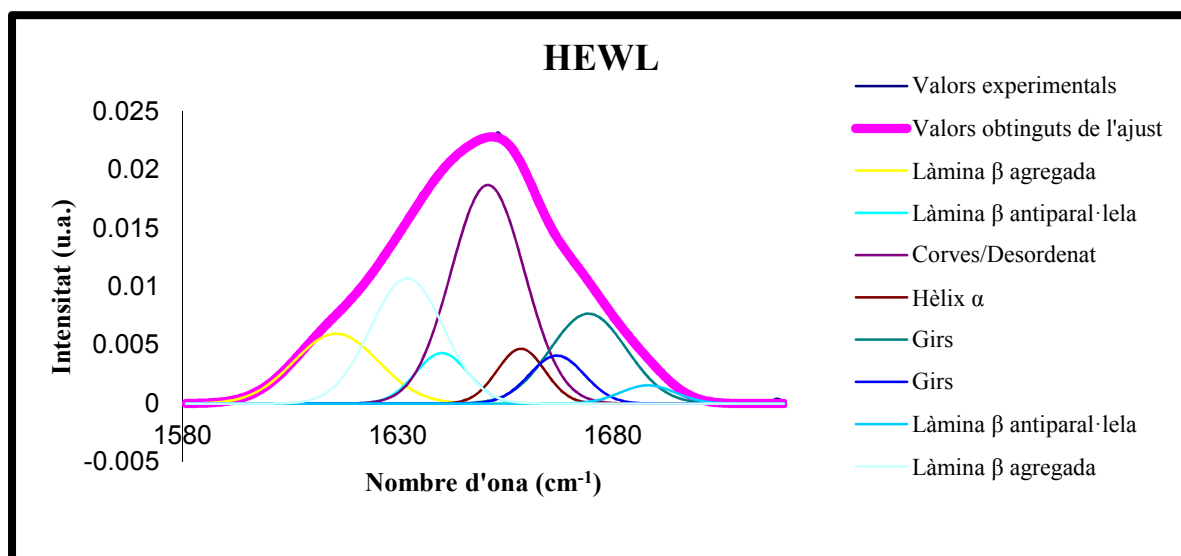


Figura 11. Deconvolució de la banda amida I de l'espectre IR del HEWL natiu.

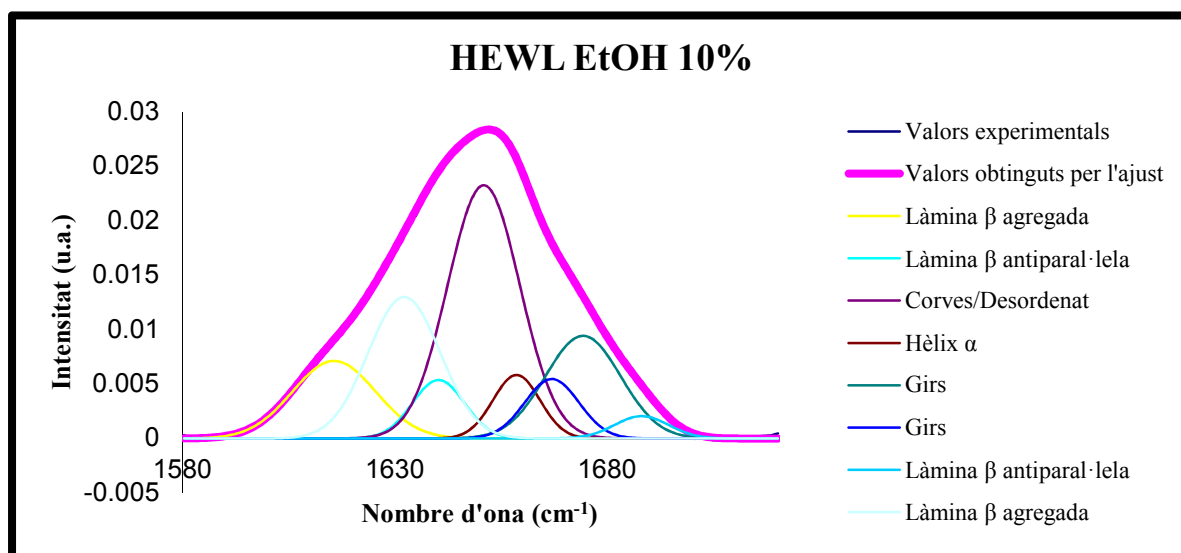


Figura 12. Deconvolució de la banda amida I de l'espectre IR del HEWL en una dissolució que contenia un 10% d'etanol.

A la **Taula 4** es mostren els resultats obtinguts del procés de deconvolució per a cada una de les diferents condicions experimentals utilitzades. Els percentatges indiquen la contribució de cada banda al total de la banda amida I i, per tant, el tant per cent d'estructura secundària a la qual s'associa la banda.

Taula 4. Percentatges d'estructura secundària del HEWL en presència de diferents alcohols a diferent concentració.

Estructura	0	MeOH (%)						EtOH (%)						Isopropanol (%)					
		5	10	20	40	50	60	5	10	20	40	50	60	5	10	20	40	50	60
Làmina β agregada	13	14	13	13	9	10	16	14	12	10	9	11	11	11	12	10	11	13	15
Làmina β antiparal·lela	20	19	19	19	15	18	18	19	19	18	18	19	17	19	19	18	20	20	20
Corbes/Desordenat	6	7	6	6	7	4	4	7	6	6	5	6	8	6	6	6	7	8	6
Hèlix α	34	32	34	34	36	35	31	32	34	36	36	35	36	34	34	35	34	31	34
Girs	6	5	6	6	5	6	5	5	6	6	6	5	5	6	6	6	6	7	5
Girs	6	6	6	6	6	7	7	6	6	7	7	6	5	6	6	7	6	7	6
Làmina β antiparal·lela	15	14	14	15	18	16	15	14	15	16	16	16	15	15	15	15	15	12	13
Làmina β agregada	2	2	2	2	4	4	4	2	2	3	3	3	3	2	2	3	2	2	3

La deconvolució de la banda amida I de la proteïna obtinguda a partir d'una dissolució en absència d'alcohol mostra que les bandes amb un major percentatge són les corresponents a l'hèlix α i a la làmina β , tal i com es d'esperar tenint en compte l'estructura tridimensional nativa del HEWL (codi pdb: 1E8L). El percentatge de corbes/desordenat presenta un valor baix, ja que existeixen poques zones desordenades al HEWL.

Per altre banda, l'anàlisi de l'efecte dels diferents alcohols sobre l'estructura secundària del HEWL mostra variacions estructurals molt subtils però rellevants. Així, el percentatge d'hèlix α augmenta a mesura que augmenta el % de metanol fins a un 40%. Malgrat aquest augment, quan s'arriben a percentatges de metanol superiors al 50% s'observa una disminució del percentatge d'hèlix α . En el cas de l'etanol, el percentatge d'hèlix α també augmenta en relació al percentatge d'alcohol. Aquesta tendència es manté fins un 20% d'etanol i, posteriorment, per més que s'augmenti el percentatge d'alcohol el percentatge d'estructura tipus hèlix α no varia. Per l'isopropanol, el contingut en hèlix α no varia, per tant, no es veu afectat per la presència d'aquest alcohol.

Respecte al tant per cent d'estructura desordenada, el que es pot observar és que únicament en presència de percentatges molt grans de metanol, aquest tipus de estructura varia el seu percentatge.

La lleugera disminució dels percentatges d'estructura hèlix α i desordenada associada a l'increment de metanol, es veu compensada per un augment del percentatge d'estructura làmina β .

Aquests resultats demostren que com major és el moment dipolar de l'alcohol que hi adicionem (metanol 1.70D; etanol 1.68D; isopropanol 1.58D⁸), major és la seva capacitat d'induir canvis estructurals damunt el HEWL.

⁸<http://physicalchemistryrosamonte.wordpress.com/material-balances/material-balances-on-a-crystallizer/physical-properties-of-pure-methanol/dipole-moment/>

6.2. Efecte de diferents cations i la seva concentració sobre l'estructura secundària del HEWL

Una vegada estudiat l'efecte de diferents tipus d'alcohols i de la seva concentració sobre la estructura del HEWL, es va estudiar com diferents cations i la seva concentració influïen damunt la proteïna. Amb la finalitat de poder atribuir els possibles canvis estructurals únicament a l'efecte de la presència d'un determinat catió, s'empraren sals amb el mateix contraió clorur. Així s'empraren sals de tres cations monovalents (Li^+ , Na^+ i K^+) i sals de tres divalents (Mg^{2+} , Ba^{2+} i Ca^{2+}).

De la mateixa manera que en el cas dels alcohols, s'adquirien els espectres IR de les dissolucions resultants i es deconvolucionà la banda amida I. Els resultats obtinguts arrel de les diferents deconvolucions es mostren a les **Taules 5 i 6**.

Taula 5. Percentatges d'estructura secundària del HEWL obtingut a diferents concentracions de LiCl, NaCl i KCl.

Estructura	0	Li^+ (mM)					Na^+ (mM)					K^+ (mM)				
		200	400	600	800	1000	200	400	600	800	1000	200	400	600	800	1000
Làmina β agregada	13	12	13	13	14	15	13	13	13	12	11	13	13	13	13	12
Làmina β antiparal·lela	20	20	20	20	20	20	19	19	20	19	20	19	19	19	19	18
Corbes/Desordenat	6	5	5	5	4	5	6	6	6	7	5	6	6	6	5	7
Hèlix α	34	36	36	35	34	33	34	34	34	33	35	34	34	34	32	32
Girs	6	4	4	5	7	6	5	6	5	5	5	6	6	6	8	6
Girs	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6	7
Làmina β antiparal·lela	15	15	15	14	14	14	15	14	15	15	14	15	15	15	15	15
Làmina β agregada	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Taula 6. Percentatges d'estructura secundària del HEWL obtingut a diferents concentracions de MgCl_2 , CaCl_2 i BaCl_2 .

Estructura	0	Mg^{2+} (mM)					Ca^{2+} (mM)					Ba^{2+} (mM)				
		200	400	600	800	1000	200	400	600	800	1000	200	400	600	800	1000
Làmina β agregada	13	13	16	18	18	17	12	13	15	13	15	13	13	13	12	12
Làmina β antiparal·lela	20	20	21	21	21	21	19	19	20	20	20	19	19	19	19	19
Corbes/Desordenat	6	6	6	7	6	4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Hèlix α	34	34	33	30	34	32	34	34	33	34	33	34	33	33	34	33
Girs	6	5	5	7	5	9	6	6	5	5	5	6	6	6	6	5
Girs	6	6	5	5	1	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Làmina β antiparal·lela	15	14	13	12	15	12	14	14	14	14	14	15	15	15	15	15
Làmina β agregada	2	2	1	0	1	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

En el cas dels cations monovalents (**Taula 5**), es pot observar que a baixes concentracions de Li^+ el percentatge d'hèlix α augmenta lleugerament, mentre que el K^+ pareix induir l'efecte contrari, ja que el percentatge d'hèlix α disminueix a elevades concentracions d'aquest ió. Per altre banda, la presència de Na^+ pareix que no afecta al percentatge d'hèlix α .

Els ions divalents pràcticament no indueixen cap canvi estructural al HEWL a mesura que s'incrementa la seva concentració (**Taula 6**). Malgrat aquesta conclusió general, s'observa que la

deconvolució de la banda amida I del HEWL obtinguda en presència d'una concentració 600mM de Mg^{2+} únicament presenta un 30% d'hèlix α , el que podria ésser atribuïble a un error experimental.

En general, la presència de diferents cations mono- o divalents i la variació en la seva concentració, no afecta al percentatge d'estructura desordenada o de làmina beta. Malgrat això, s'ha vist que el Mg^{2+} és l'únic capaç de fer augmentar lleugerament el percentatge d'estructura β a mesura que s'incrementa la seva concentració.

Aquests resultats mostren que els cations pràcticament no modifiquen l'estructura secundària del HEWL, fins i tot quan la seva concentració augmenta notablement. Malgrat això, cal dir també que són els cations monovalents són els que presenten una major capacitat d'alteració estructural.

6.3. Efecte de diferents tipus d'alcohols sobre l'estabilitat tèrmica de la lisozim

Una vegada analitzat l'efecte de diferents tipus d'alcohols i cations sobre l'estructura del HEWL, s'estudià com aquests alteraven la seva estabilitat tèrmica. Per a la realització d'aquest estudi es varen adquirir les corbes calorimètriques emprant diferents condicions experimentals i aquestes, s'ajustaren al model teòric de dos estats descrit a la part metodològica.

Així, com exemple, a la **Figura 13** es mostra la corba calorimètrica del HEWL en absència d'alcohols i cations, i l'ajust d'aquestes dades experimentals al model de dos estats ($N \leftrightarrow U$). El valor de la temperatura al centre de la corba es correspon amb el valor teòric de T_m i és la temperatura a la qual coexisteix el mateix percentatge de proteïna en la seva forma nativa (plegada) i desnaturalitzada (desplegada).

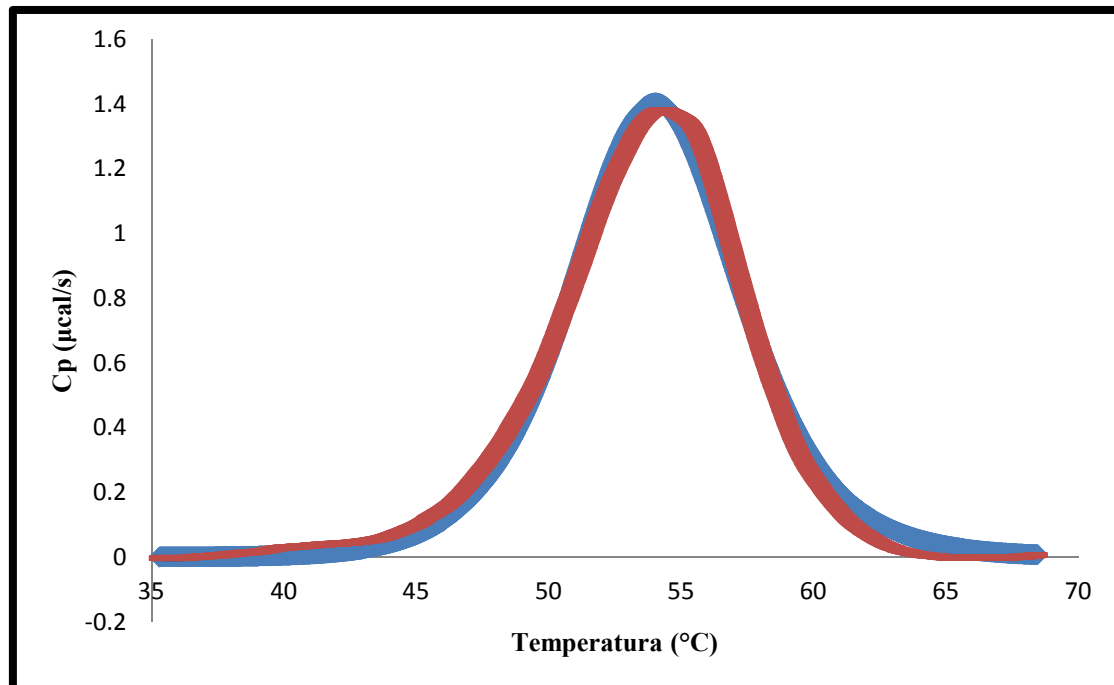


Figura 13. Corba calorimètrica del HEWL. Les línies vermelles representen els valors experimentals obtinguts (dades experimentals) i en blau es troba representat l'ajust (fet en base al model teòric de dos estats).

Les corbes calorimètriques foren adquirides en presència de diferent tipus d'alcohols i a diferents concentracions, per tal d'avaluar el seu efecte damunt el procés de desplegament tèrmic del HEWL. Tal i com es pot observar a la **Figura 14**, per qualsevol dels alcohols estudiats (metanol, etanol i isopropanol), un augment en el percentatge d'alcohol dugué associat una disminució significativa de la temperatura de desplegament de la proteïna (T_m) i, per tant, a una desestabilització de la mateixa. És a dir, una major concentració d'alcohol facilità considerablement la desestabilització del HEWL. Els valors de la T_m de les mostres de HEWL en presència d'un 60% d'etanol, i un 50% i 60% d'isopropanol, no es varen poder determinar ja que presentaven un valor més baix que l'interval d'adquisició.

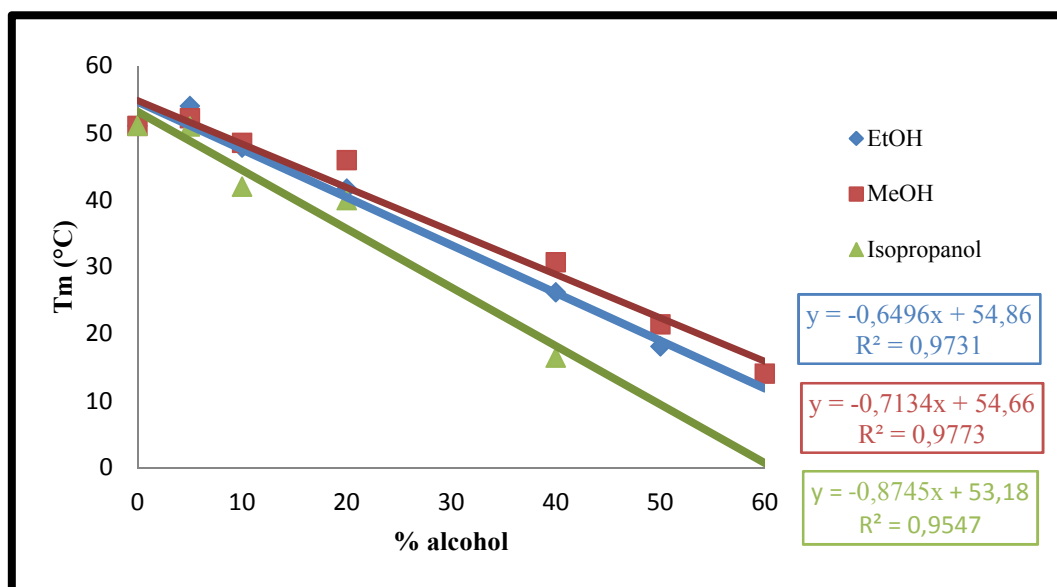


Figura 14. Valors de la T_m del HEWL en presència de diferent tipus i percentatge d'alcohol. La sèrie de dades corresponent a cada alcohol s'ha ajustat a una equació lineal.

A més, les dades obtingudes mostren que l'efecte desestabilitzant de l'isopropanol és més accentuat que el de l'etanol i que el del metanol. Aquest efecte es pot correlacionar inversament amb la diferent polaritat dels alcohols (metanol 1.70D; etanol 1.68D; isopropanol 1.58D), de manera que a major polaritat menor defecte desestabilitzant.

Tal i com es mostra a la **Taula 7**, aquesta diferent polaritat duu associada una variació notable de la constant dielèctrica del mitjà, de forma que el valor de T_m del lisozim disminueix de manera més dràstica amb la concentració de l'alcohol que més afecta a la disminució de la constant dielèctrica.

Taula 7. Constants dielèctriques de les dissolucions de proteïna en diferents percentatges dels alcohols estudiats.

% d'alcohol	ϵ Metanol [Wohlfarth, 2008]	ϵ Etanol [Moriyoshi, 1990]	ϵ Isopropanol [Seleim, 2014]
5	76.75	76.45	70.50
10	75.12	74.49	60.72
20	71.73	70.70	58.00
40	66.32	64.07	51.00
50	63.57	60.44	42.00
60	60.97	57.31	34.35

En canvi, l'efecte dels diferents tipus d'alcohols i la seva concentració sobre l'entalpia de desplegament del HEWL es pràcticament nul (**Figura 15**). Únicament s'observa una variació considerable a les mostres de HEWL en presència d'un 5% i un 10% d'isopropanol, encara que no s'ha pogut determinar el motiu d'aquesta variació.

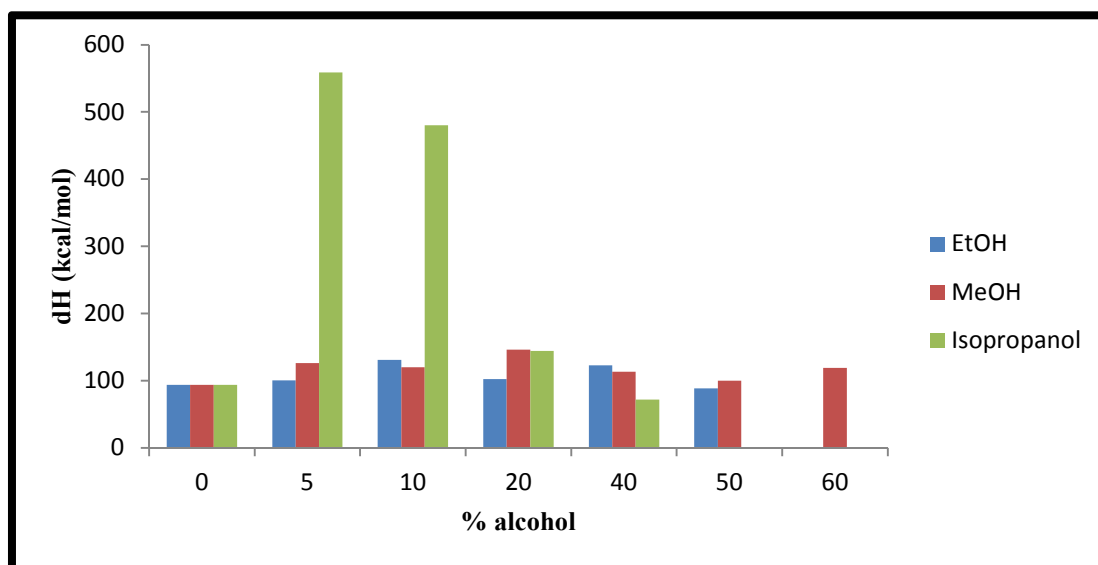


Figura 15. Valors de l'entalpia de desnaturalització obtinguts en funció del tipus i percentatge d'alcohol estudiat.

Per altre banda, els valors obtinguts pel factor de correcció A_w es mouen entre 0.1-0.6 per totes les mesures experimentals realitzades.

Els resultats obtingut mostren que els alcohols, malgrat no afectin a la estructura del HEWL, disminueixen l'estabilitat tèrmica del HEWL de manera proporcional a la seva concentració. Aquesta disminució es pot atribuir a la reducció de la constant dielèctrica del mitjà, la qual influeix directament sobre la fortalesa de les interaccions hidròfobes existents a l'interior del HEWL, les quals defineixen la seva estructura i l'hi confereixen estabilitat.

6.4. Efecte de diferents cations sobre l'estabilitat tèrmica del lisozim

Una vegada estudiat l'efecte dels alcohols, es va estudiar l'efecte de diferents cations i de la seva concentració damunt l'estabilitat del lisozim. Els resultats obtinguts mostren que l'efecte dels cations és, en general, molt diferent al dels alcohols, ja que no s'observa una tendència tan clara.

Analitzant els cations monovalents estudiats (**Figura 16**), es pot veure de manera general que el Na^+ presenta una caràcter estabilitzant del HEWL, de manera que el seu valor de T_m augmenta de forma proporcional amb l'increment de la concentració de Na^+ . El Li^+ mostra també en general un efecte estabilitzant, encara que aquest no es pot correlacionar amb la concentració d'aquest ió. Tampoc, s'ha observat un efecte depenent de la concentració al addicionar K^+ a la dissolució, encara que sí es pot concloure que aquest catió és capaç de desestabilitzar el HEWL.

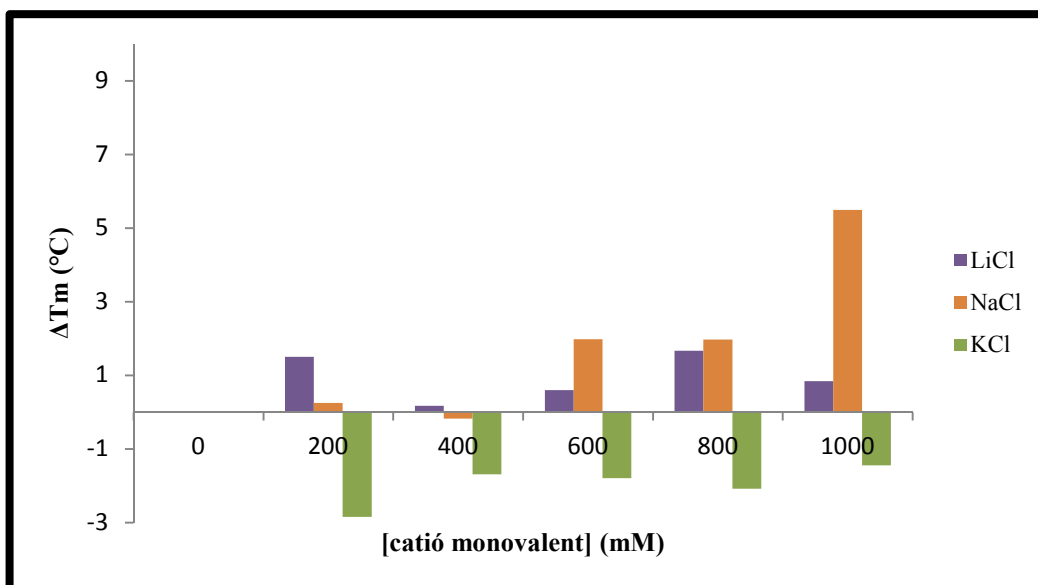


Figura 16. Valors de ΔT_m del HEWL en funció de la concentració de catió monovalent.

Per una altra banda, s'observà també que els cations foren capaços de modificar l'entalpia de desplegament del HEWL. Així, el Li^+ fou capaç de disminuir el valor de ΔH quan presentà una concentració superior a 200mM (**Figura 17**), mentre que el Na^+ generalment l'augmentà. No es pot observar una tendència clara de l'efecte del K^+ damunt la ΔH , encara que pareix que a concentracions majors de 800mM l'augmenta.

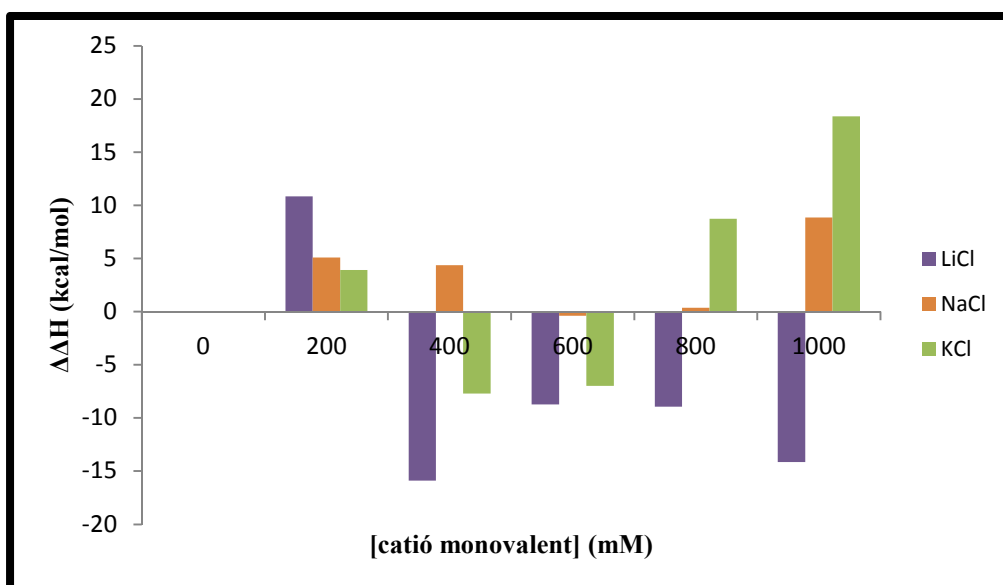


Figura 17. Increment de l'entalpia de desnaturalització del HEWL en funció de la concentració de catió monovalent.

Una vegada analitzat l'efecte dels diferents cations monovalents damunt el valor de T_m del lisozim i damunt l'entalpia de desplegament, es passà a estudiar l'efecte dels cations divalents sobre aquests paràmetres. Es va observar, que la presència de Mg^{2+} , Ca^{2+} o Ba^{2+} incrementà l'estabilitat del lisozim (exceptuant el Ba^{2+} en una concentració de 200 mM) (**Figura 18**). Tant pel Mg^{2+} com pel Ca^{2+} , es va observar un efecte dependent de la concentració, mentre que pel Ba^{2+} no es va poder establir aquesta correlació.

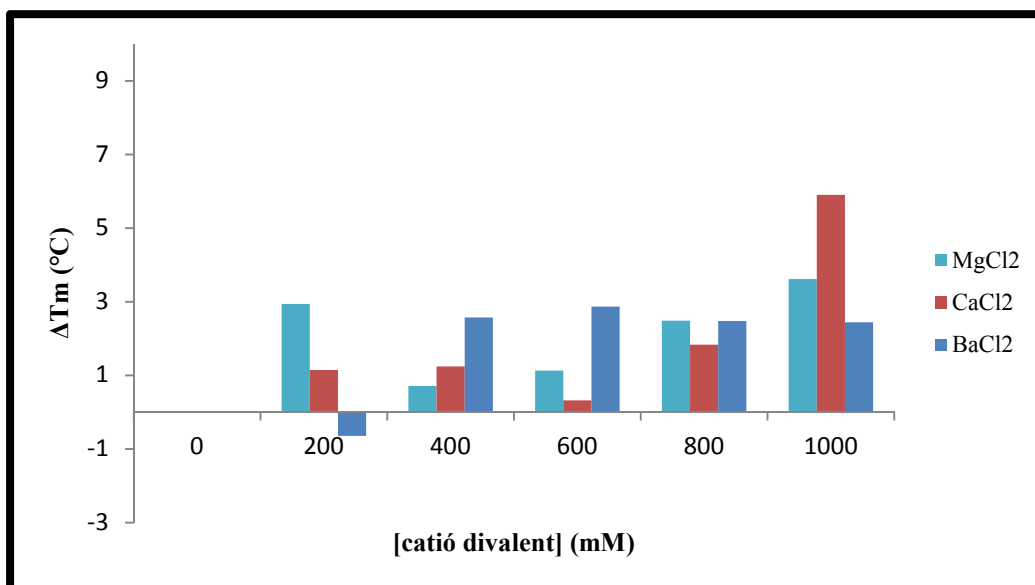


Figura 18. Valors de ΔT_m del HEWL en funció de la concentració de catió divalent.

Per altre banda, s'ha observat que l'entalpia de desplegament del HEWL disminueix notablement en presència de Ba^{2+} de manera proporcional a la seva concentració (a excepció de quan aquest catió es troba a una concentració 1M). Contràriament, el Ca^{2+} incrementà el valor de ΔH del HEWL, al igual que ho feu el Mg^{2+} a concentracions superior a 800mM, mentre que aquest mateix ió disminuí l'entalpia de desnaturalització a baixes concentracions (**Figura 19**).

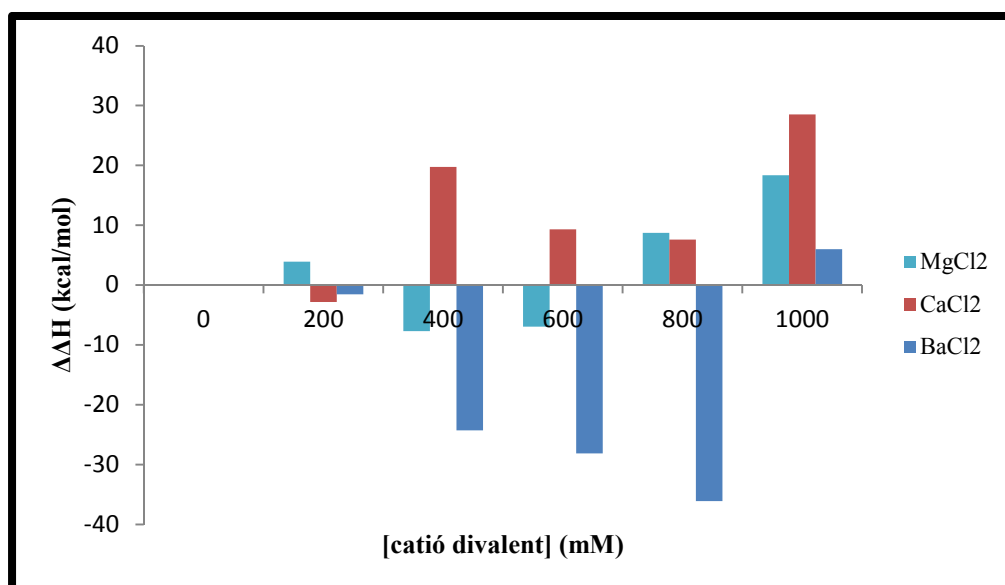


Figura 19. Increment de l'entalpia de desnaturalització del HEWL en funció de la concentració de catió divalent.

Els resultats obtinguts mostren que malgrat la presència de diferents cations a elevada concentració no sigui capaç de modificar l'estructura del HEWL, poden modificar l'estabilitat tèrmica. Mentre que els cations divalents incrementen l'estabilitat estructural, l'efecte dels monovalents no és tan clar. Únicament el K^+ es capaç de disminuir el valor de T_m del HEWL, mentre que el Li^+ o el Na^+ generalment l'incrementen.

6.5. Efecte de diferents tipus alcohols sobre la cinètica d'agregació del lisozim

Els resultats presentats anteriorment mostren que la presència d'alcohols és capaç de desestabilitzar tèrmicament l'estructura del HEWL sense que això alteri de forma considerable la seva estructura. Aquest fet, juntament amb la variació de la constant dielèctrica del mitjà associada a l'addició d'alcohols, ha d'afectar indubtablement a la cinètica d'agregació fibril·lar del HEWL, ja que aquest procés ve motivat per un canvi conformacional previ a l'agregació dirigida per interaccions hidròfobes, fortalesa de les quals depèn de la constant dielèctrica del mitjà.

Així s'emprà la fluorescència de la ThT per monitoritzar la formació de fibres amiloides a partir de dissolucions de HEWL incubat a pH 2.0 i a 60°C a diferents intervals de temps i en presència de diferents alcohols. Així, inicialment s'estudià la cinètica d'agregació del HEWL a pH 2.0 en absència d'alcohol i es comparà amb els resultats obtinguts quan s'utilitzà lisozim humà (**Figura 20**). Tal i com s'ha mencionat anteriorment, el HEWL presenta una estabilitat inferior al lisozim humà el que motiva una major tendència a l'agregació baix les mateixes condicions experimentals i dins el mateix interval de temps.

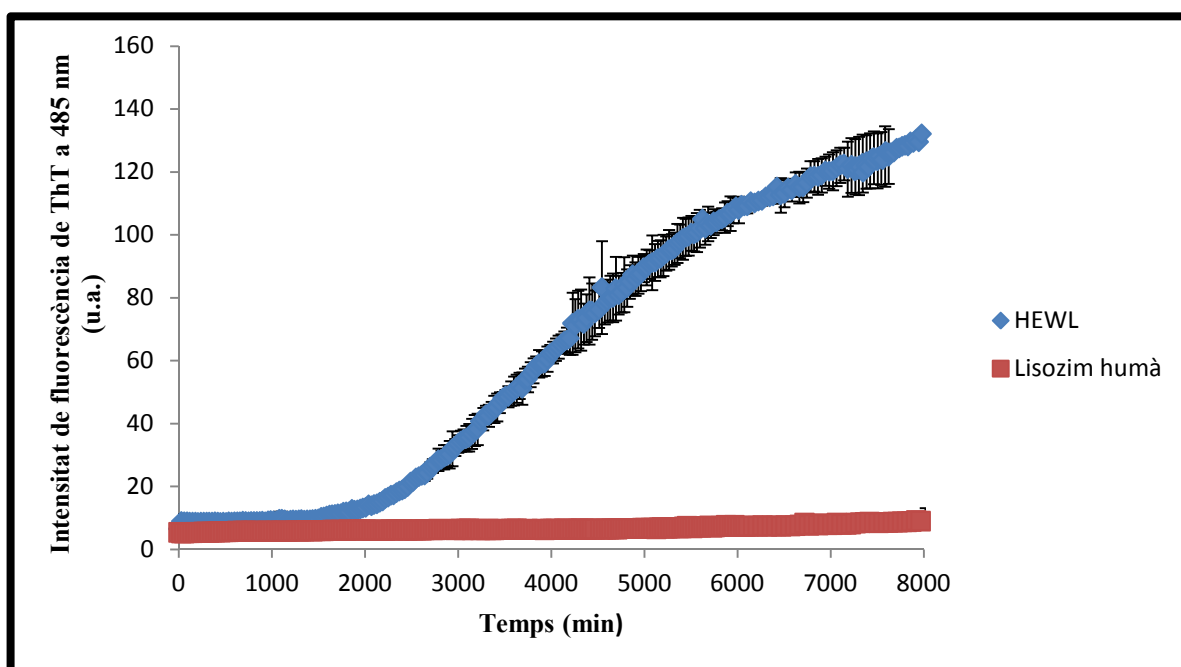


Figura 20. Corba d'agregació del HEWL i del lisozim humà. Les barres d'error s'obtenen a partir dels duplicats. ($\lambda_{exc}=440$ nm)

Posteriorment es varen estudiar les cinètiques d'agregació del HEWL en presència de metanol, etanol i isopropanol, a diferents concentracions d'alcohol. Tal i com es pot veure a les **Figures 21 i 22**, la presència d'alcohols no alterà el perfil sigmoïdal típic d'una corba associada a una cinètica de fibrilització. En canvi, si va tenir un efecte notable damunt el temps d'inducció i sobre l'amplitud de la corba, la qual es pot associar amb la quantitat de fibres amiloides formades.

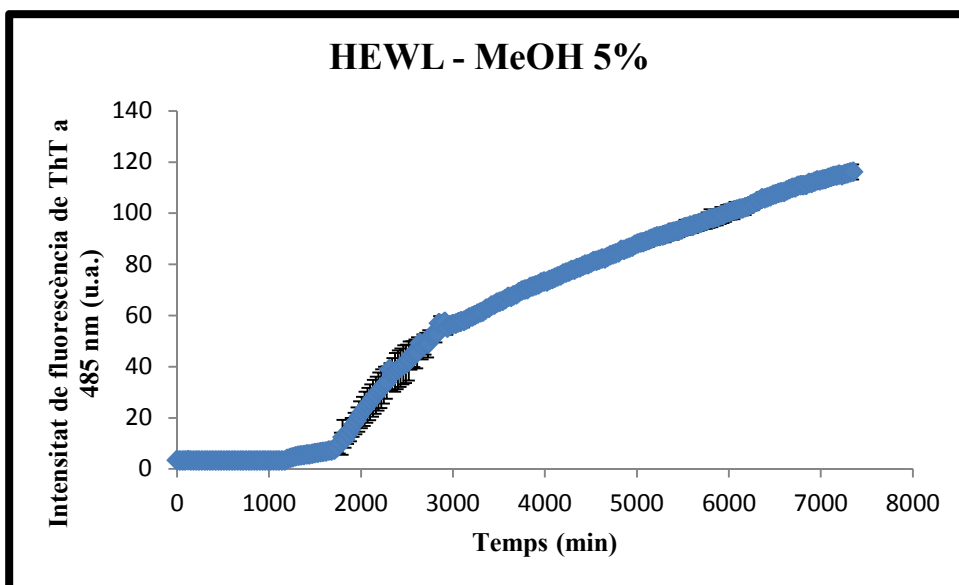


Figura 21. Corba d'agregació del lisozim de pollastre (HEWL) en un 5% de metanol. ($\lambda_{exc}=440$ nm)

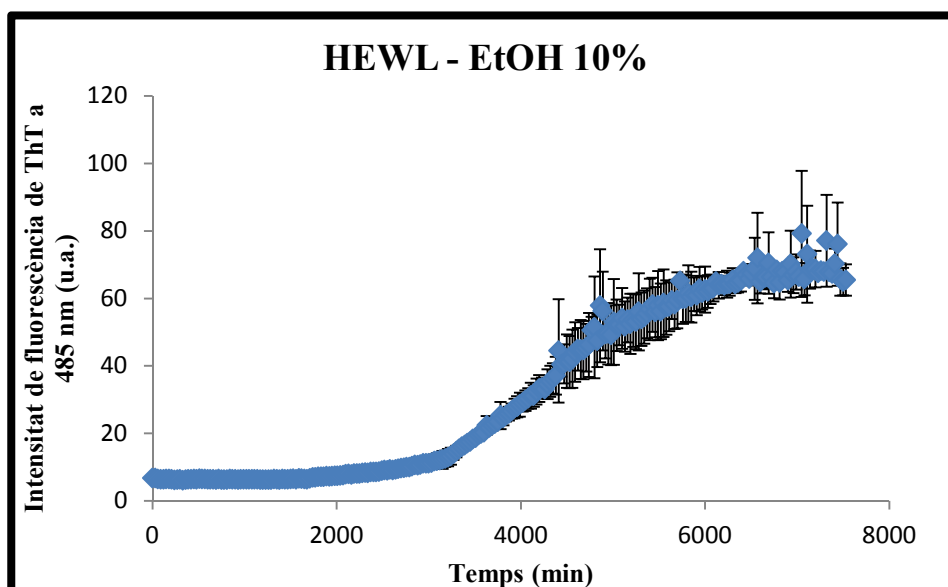


Figura 22. Corba d'agregació del lisozim de pollastre (HEWL) en un 10% d'etanol. ($\lambda_{exc}=440$ nm)

Així, per tots els alcohols estudiats, el temps d'inducció fibril·lar disminuí notablement al adicionar un 5% d'alcohol en comparació al que presentà el HEWL en absència d'alcohol (**Figura 23**). Aquest fet es pot atribuir perfectament a l'efecte desestabilitzant dels alcohols damunt l'estructura del HEWL i a que la constant dielèctrica del mitjà disminueix molt lleugerament en comparació a la de l'aigua ($\epsilon=80.4^9$)(**Taula 7**). Per percentatges d'alcohol superior al 5% el temps d'inducció augmenta amb el percentatge d'alcohol. Així, pel metanol s'observa que el temps d'inducció fibril·lar augmenta linealment entre 5 i 20%, mentre que a percentatges majors del 20% la linealitat es perd fins arribar a un punt en que pràcticament no s'incrementa el temps d'inducció per molt de metanol que s'addicioni. El mateix comportament fou observat per l'etanol i l'isopropanol, encara que no es detectà la formació de fibres amiloides a percentatges d'aquests alcohols majors al 20%. Tal i com s'observa a la **Taula 7**, aquests dos alcohols tenen una major capacitat de disminuir la constant dielèctrica del mitjà que la del metanol. Per tant, és normal que a baixa constant dielèctrica, les interaccions

⁹<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/tables/diel.html>

hidròfobes que guien la formació de fibres amiloides no es donin. És per tant, el compromís entre l'efecte desestabilitzant de l'alcohol i la constant dielèctrica del mitjà el que crea un balanç per afavorir/inhibir la formació d'agregats del lisozim (**Figura 24**).

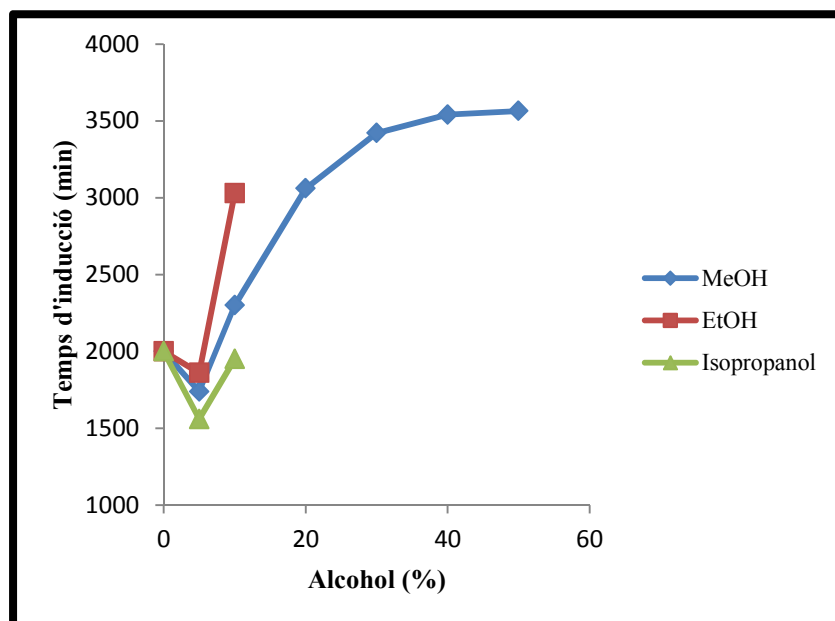


Figura 23. Temps d'inducció en funció del tipus i percentatge d'alcohol.

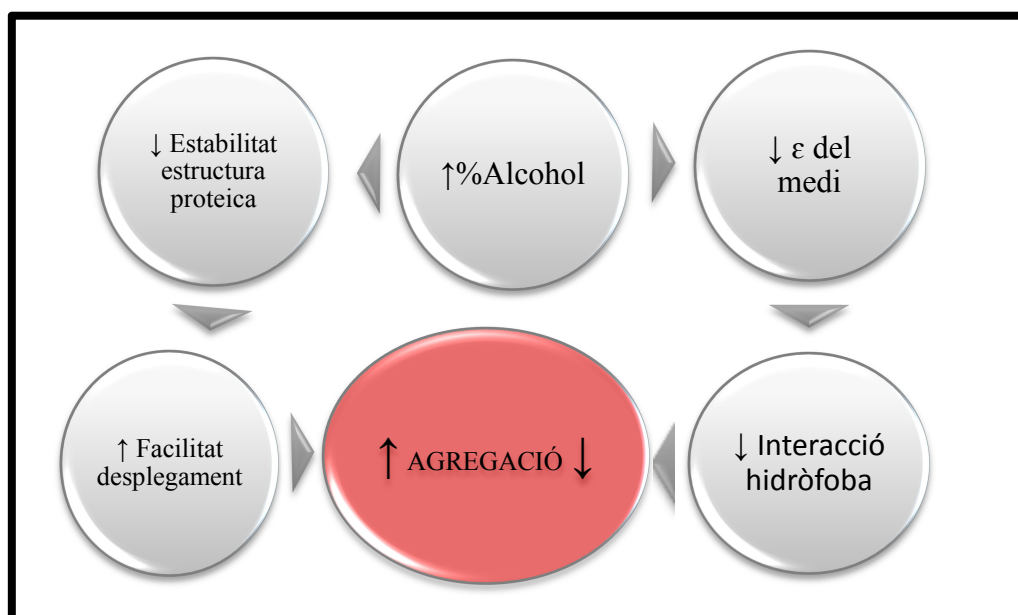


Figura 24. Esquema d'agregació de la lisozim en funció del percentatge d'alcohol i la ϵ .

Per altre banda, la intensitat màxima de fluorescència, és a dir, l'amplada de la corba sigmoïdal proporcional al nombre fibres, disminueix a mesura que s'incrementa el percentatge d'alcohols. Per tant, els alcohol posseeixen també la capacitat de reduir el nombre de fibres formades, ja que la disminució de la constant dielèctrica no afavoreix l'assemblatge dels monòmers desplegats (**Figura 25**). La disminució menys pronunciada en la formació de fibres s'observa per l'increment en el percentatge del metanol, d'acord al seu major moment dipolar i el seu menor efecte sobre la constant dielèctrica. La formació de fibres disminueix més dràsticament al ésser l'etanol o sobretot l'isopropanol l'alcohol addicionat, de forma coherent al seu menor moment dipolar i el seu major

impacte sobre la disminució de la constant dielèctrica del mitjà. Malgrat això, la mostra que contenia un 5% d'isopropanol és una excepció, ja que conté la major formació de fibres amiloides, fet que no s'ha pogut explicar.

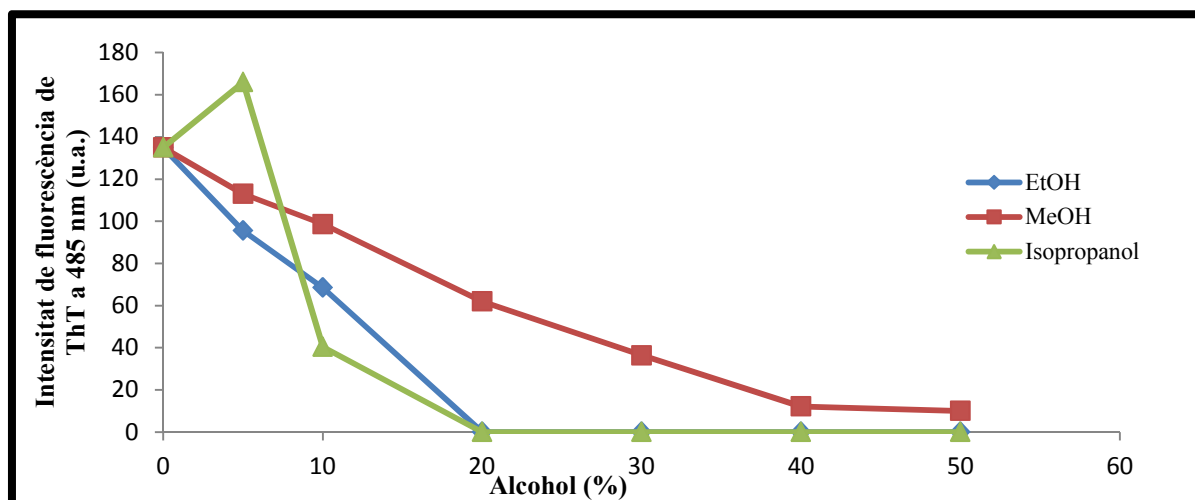


Figura 25. Intensitat màxima de fluorescència que presenten els agregats en funció de l'alcohol i percentatge estudiats. ($\lambda_{exc}=440$ nm)

7. Conclusions

A partir de les dades experimentals obtingudes es poden obtenir les següents conclusions sobre l'efecte que produeixen diferents alcohols i cations damunt l'estructura secundària del HEWL. Pel que fa als alcohols, quan major és el valor del moment dipolar de l'alcohol que s'addiciona a la proteïna la capacitat que presenta per provocar canvis estructurals és major. Respecte als cations estudiats, es pot concloure que pràcticament no provoquen modificacions en l'estructura secundària del lisozim ni tan sols quan la concentració d'aquests s'augmenta de forma considerable. No obstant, la capacitat d'alteració de l'estructura és major en el cas dels cations monovalents que dels divalents.

Pel que fa a l'estabilitat tèrmica del HEWL, l'efecte que produeixen els alcohols és considerable: a una major concentració d'alcohol disminueix de forma significativa la temperatura de desplegament de la proteïna, és a dir, un augment de la concentració d'alcohol condueix a una major desestabilització de la proteïna. A més, l'efecte desestabilitzant es troba relacionat amb la polaritat de l'alcohol de la següent forma: a major polaritat menor efecte desestabilitzant. Pel contrari, l'entalpia de desplegament no es veu pràcticament afectada per la variació de la concentració i tipus d'alcohol. La disminució de l'estabilitat es troba condicionada per la disminució de la constant dielèctrica del mitjà que es troba directament relacionada amb la fortalesa de les interaccions hidròfobes existents a l'interior de l'estructura proteica i que són les que l'hi donen estabilitat estructural. Respecte a l'efecte produït pels cations, s'observa que els cations divalents augmenten l'estabilitat estructural mentre que l'efecte dels monovalents no es pot observar de forma tan clara.

Amb referència a la tendència a formar fibres amiloides les conclusions que s'obtenen dels resultats és que en un 5% d'alcohol el temps d'inducció fibril·lar disminueix de forma considerable respecte al que presentava la proteïna en absència d'alcohol, fet que s'atribueix a la disminució de la constant dielèctrica del mitjà i l'efecte desestabilitzant dels alcohols. A percentatges superiors al 5% el temps d'inducció augmenta a mesura que s'incrementa el percentatge d'alcohol. Aquesta tendència no s'observa en l'etanol i l'isopropanol que a percentatges superiors al 20% no formaren fibres amiloides i això és degut a que disminueixen en major mesura que el metanol la constant dielèctrica del medi fent que les interaccions hidròfobes que indueixen la forma de fibres amiloides no siguin tant fortes. D'aquesta manera existeix un compromís entre l'efecte desestabilitzant provocat per l'alcohol i la constant dielèctrica del mitjà que produeix un balanç per afavorir o inhibir el procés de formació d'agregats de HEWL. Pel que fa al nombre de fibres formades l'addició d'alcohol provoca una disminució d'aquest nombre a mesura que augmenta el seu percentatge. Cal destacar que, a més, aquest fet es troba relacionat amb la constant dielèctrica del medi i, per tant, amb el moment dipolar de l'alcohol. La formació de fibres disminueix de forma dràstica quan és l'isopropanol l'alcohol addicionat i de forma una mica menys brusca quan és l'etanol degut a que el seus moments dipolars són menors que el del metanol i provoquen una menor disminució de la constant dielèctrica del medi. En el cas del metanol la disminució del nombre de fibres és menor perquè és l'alcohol que presenta un major moment dipolar i la constant dielèctrica del medi es veu menys afectada.

8. Bibliografía

- [Adrover, 2005] Adrover M. Procesos fotoinducidos en vitámeros B6 y estudio cinético de su reacción con glucosa. Memoria de Investigación presentada para la obtención del DEA (2005).
- [Bradley, 2007] Bradley J. Amyloid Fibre Formation In Hen Lysozyme. First Year Transfer Report. University College Dublin (2007).
- [Cooper, 2010] Cooper A. Protein Heat Capacity: An Anomaly that Maybe Never Was. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1, 3298-3304 (2010).
- [Costa, 2005] Costa J.M. Diccionario de Química Física. p. 244. Díaz De Santos Ediciones.
- [Dumoulin, 2006] Dumoulin M., Kumita J.R., Dobson C.M. Normal and Aberrant Biological Self-Assembly: Insights from Studies of Human Lysozyme and Its Amyloidogenic Variants. *Acc. Chem. Res.*, 39, 603-610 (2006).
- [Frare, 2009] Frare E., Mossuto M. F., Polverino de Laureto P. Characterization of Oligomeric Species on the Aggregation Pathway of Human Lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 387, 17-27 (2009).
- [Goda, 2000] Goda S., Takano K., Yamagata Y. Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution. *Protein Science*, 9, 369-375 (2000).
- [Granel, 2006] Granel B., Valleix S., Serratrice J. Lysozyme amyloidosis: report of 4 cases and a review of the literatura. *Medicine (Baltimore)*, 85, 66-73 (2006).
- [Mestecky, 2004] Mestecky J., Lamm M. E., Strober W. Mucosal Immunology. p. 75. Third Edition. Elsevier Academic Press.
- [Moriyoshi, 1990] Moriyoshi T., Ishii T., Tamai Y., Tado M. Static Dielectric Constants of Water + Ethanol and Water + 2-Methyl-2-propanol Mixtures from 0.1 to 300 Mpa at 298.15. *J. Chem. Eng. Data*, 35, 17-20 (1990).
- [Muñoz, 2008] Muñoz V. Protein Folding, Misfolding and Aggregation. Classical Themes and Novel Approaches. p. 93. RSC Publishing.
- [Nemzer, 2013] Nemzer L.R., Flanders B. N., Schmit J. D. Ethanol shock and lysozyme aggregation. *Soft Matter*, 9, 2187-2196 (2013).
- [Seleim, 2014] Seleim S.M., Ahmed A.M., El Adl F. Electroplating in Steel in Presence of Isopropanol-Water Mixture. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 9, 2016-2018 (2014).
- [Venkataramani, 2013] Venkataramani S., Truntzer J., Coleman D.R. Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: A Fourier Transform Infrared Study. *J. Pharm Bioallied Sci.*, 5, 148-153 (2013).
- [Wohlfarth, 2008] Wohlfarth Ch. Dielectric constants of the mixture (1) wáter; (2) methanol. *Supplement to IV/6, Landolt-Börnstein – Group IV Physical Chemistry*, 17, 507-510 (2008).