

## Interacciones de la lisozima con el Pb(II) por viscosimetría y dilatometría de equilibrio de diálisis

J. M. Teijón, M. D. Blanco, A. Rodríguez, J. A. Onrubia e Issa Katime\*

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
28040 Madrid (España)

(Recibido el 6 de marzo de 1986)

J. M. TEIJON, M. D. BLANCO, A. RODRIGUEZ, J. A. ONRUBIA and I. KATIME.  
*Lysozyme-Pb (II) Interactions by Viscometry and Dyalisis Equilibrium Dilatometry.* Rev. esp. Fisiol., 43 (1), 81-86, 1987.

The conformational hen white egg lysozyme in the binary mixture water/Pb<sup>2+</sup> as a function of the binary mixture composition has been studied. Intrinsic viscosity, partial specific volume and preferential adsorption parameter in the 0-0.100 M Pb<sup>2+</sup> concentration range has been experimentally measured. The obtained results suggest that the observed conformational transition is a consequence of the interactions established between lysozyme and Pb<sup>2+</sup> cation.

**Key words:** Conformational change, Dyalisis equilibrium, Preferential adsorption parameter, Partial specific volume.

La importancia fisiológica de los cationes metálicos cuando actúan como ligandos es cada día mayor. Muchas de las funciones que desempeñan dependen de los componentes a los que se unen. De particular importancia es la formación de complejos de estos cationes con péptidos y proteínas (5, 7).

Las interacciones de cationes pequeños con macromoléculas son, por la naturaleza de los enlaces que las soportan, de carácter reversible y pueden estar estrechamente relacionadas con cambios de es-

tructura en las macromoléculas en cuestión, en el ligando o en ambos.

Desde el punto de vista experimental, el estudio de las posibles alteraciones estructurales inducidas por cationes metálicos con proteínas, es abordable por diferentes técnicas que atienden distintos aspectos relacionados con los procesos de interacción. En disolución, que es el caso del presente trabajo, dado que los distintos parámetros conformacionales, tales como el área de superficie accesible, la forma y el volumen molecular, se relacionan con el empaquetamiento de los átomos en la macromolécula, caracterizan propiedades termodinámicas e hidrodinámicas peculiares en las disoluciones que las contienen. Toda técnica con capacidad

\* Correspondencia a Dr. I. Katime: Departamento de Química Física. Grupo de Macromoléculas. Facultad de Ciencias. Universidad del País Vasco. 48080 Bilbao.

para valorar algunas de las propiedades mencionadas estará dando a la vez una medida indirecta de los parámetros conformacionales citados. Tal es el caso de los métodos empleados en este estudio, la viscosimetría y la dilatometría.

### Material y Métodos

La proteína estudiada, lisozima de clara de huevo de gallina (E. C. 3.2.1.17) (6, 9), fue suministrada por los Laboratorios Serva. La enzima altamente purificada liofilizada y libre de sal, y sometida previamente a un control de pureza.

Los distintos sistemas disolventes estaban formados por mezclas binarias agua/acetato de plomo (II) (Probus), en su forma trihidratada y con una riqueza mínima del 99,5%.

Se prepararon trece sistemas disolventes en matraces de un litro, en el intervalo de concentraciones 0,006-0,100 M en Ac<sub>2</sub>Pb. Todas las disoluciones se tamponaron a pH 5, mediante ácido acético.

Las disoluciones de enzima en las trece mezclas disolventes, se prepararon añadiendo a cantidades exactamente medidas de la enzima volúmenes determinados de disolvente mantenido a 298 K. Las concentraciones finales de proteína fueron calculadas evaluando los efectos de volumen mediante las densidades de los disolventes y disoluciones.

Las medidas de viscosidad se realizaron en un viscosímetro Ubbelohde modificado de nivel suspendido (10, 12) inmerso en un baño termostatizado con agua a 298 K, siendo las variaciones de temperaturas de  $\pm 0,01$  K. Este modelo permite hacer medidas independientemente del volumen del líquido y efectuar diluciones *in situ*. Con este aparato se determinan los tiempos de caída de las disoluciones entre dos puntos concretos.

Todas las disoluciones empleadas fueron previamente filtradas en un filtro de vidrio fritado.

El viscosímetro se calibró para determinar las constantes características del mismo, A y B, de la ecuación

$$\eta = A\Delta t - B\Delta t/t$$

para lo cual se midieron los tiempos de caída de algunos líquidos puros de viscosidad,  $\eta$ , y densidad,  $d$ , conocidos a 298 K.

La viscosidad intrínseca,  $[\eta]$ , se define como:

$$\lim_{c \rightarrow 0} \eta_{SP}/c = [\eta]$$

Para el cálculo de este parámetro, se han empleado las ecuaciones empíricas de HUGGINS (8) y KRAEMER (13); estas expresiones permiten obtener el valor de la viscosidad intrínseca de la lisozima:

$$\eta_{SP}/c = [\eta] + K_1 [\eta]^2 c$$

$$\ln \eta_R/c = [\eta] - K_2 [\eta]^2 c$$

Los valores de la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ , se obtuvieron por extrapolación gráfica de  $\eta_{SP}/c$  y  $\ln \eta_R/c$  a concentración cero de lisozima.

Los valores de  $\eta_{SP}/c$  y  $\ln \eta_R/c$  fueron calculados y ajustados por el método de mínimos cuadrados lineales a las ecuaciones en cuestión, mediante un ordenador Commodore CBM-Amiga partiendo de los tiempos de flujo y volúmenes de dilución, teniendo en cuenta las correcciones pertinentes del viscosímetro.

Las densidades de los disolventes y disoluciones se midieron en un picnómetro de vidrio convencional de un solo enrase, que se calibró, determinándose su volumen, para poder calcular las densidades.

El volumen específico parcial de la lisozima,  $\bar{V}_2$ , se calculó a partir de las ecuaciones:

$$\left( \frac{\partial d}{\partial c_2} \right)_{T,P} = 1 - \bar{V}_2 d$$

$$\left( \frac{\partial d}{\partial c_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} = 1 - \Phi'_2 d_0$$

El término  $(\partial d/\partial c_2)_{T, p}$  puede estimarse con la ayuda de la ecuación:

$$d = d_0 + (\partial d/\partial c_2)_{T, p} \cdot \mu^1 \cdot \mu^2 \cdot c_2$$

donde  $d_0$  es la densidad del disolvente, conocidas las densidades y las concentraciones de proteínas de diferentes medidas para cada sistema (14).

La evaluación del parámetro  $\lambda$  requiere conocer  $(\partial d/\partial c_2)_{T, p, \mu_3}$  definido a potencial químico constante del componente 3. Es imprescindible, por tanto, efectuar experimentos de diálisis de las disoluciones de lisozima frente al disolvente, para cada sistema (11).

Para tal fin se dispuso de varios dializadores, construidos por dos piezas metálicas separadas por una membrana semipermeable.

El parámetro de adsorción preferencial,  $\lambda$  se ha calculado empleando la ecuación:

$$\lambda = \frac{1 - c_2 \bar{V}_2}{1 - c_3 \bar{V}_3} \frac{\left(\frac{\partial d}{\partial c_2}\right)_{T, p, \mu_3} - \left(\frac{\partial d}{\partial c_2}\right)_{T, p, m_3}^0}{\left(\frac{\partial d}{\partial c_3}\right)_{T, p, m_2}}$$

a dilución infinita de lisozima ( $c_2 = 0$ ).

Los términos  $(\partial d/\partial c_2)_{T, p, m_3}^0$  y  $(\partial d/\partial c_2)_{T, p, \mu_3}$  se encontraron para cada sistema midiendo las densidades de cinco disoluciones a distintas concentraciones de proteína, antes y después de dializarlas, ajustando ambas series de datos mínimos cuadrados lineales.

El valor de  $(\partial d/\partial c_3)_{T, p, m_2}$  se calculó de igual forma, teniendo en cuenta la concentración de acetato de plomo (en g/ml) y la densidad de cada mezcla disolvente.

La notación que se ha seguido ha sido la de SCATCHARD (15) y la de STOCKMAYER (17).

### Resultados

Se han determinado las viscosidades intrínsecas de la proteína globular lisozima

Tabla I. Constantes de Huggins,  $K_1$ , y Kraemer,  $K_2$ , para las distintas concentraciones de acetato de plomo (II) estudiadas.

(Ac <sub>2</sub> Pb)/M	(Pb <sup>2+</sup> )/M	K <sub>1</sub> + K <sub>2</sub>
0,100	0,069	0,82
0,090	0,063	0,59
0,080	0,058	0,49
0,070	0,052	0,34
0,060	0,046	0,47
0,050	0,041	0,54
0,040	0,034	0,41
0,035	0,031	0,58
0,030	0,027	0,54
0,025	0,024	0,44
0,020	0,019	0,49
0,008	0,008	0,47
0,006	0,006	0,59
0	0	0,32

de clara de huevo de gallina en catorce mezclas disolventes de composiciones en el intervalo 0 a 0,100 M de acetato de plomo (II).

En la tabla I se especifican los valores de la suma de las constantes de HUGGINS y KRAEMER, que en el caso de buenos disolventes deben adoptar valores muy próximos a 0,5. La figura 1 representa la viscosidad intrínseca,  $[\eta]$ , en función de la concentración de acetato de plomo (II). Se puede observar una disposición sinusoidal bien definida, cuyos mínimos están localizados a valores de 0,006, 0,030, 0,035, 0,050 y 0,100 M de acetato de plomo (II); los máximos aparecen aproximadamente entre los valores medios de estos intervalos.

Los valores del parámetro de la adsorción preferencial, para los catorce sistemas estudiados, se han deducido para cada sistema de cinco medidas de densidad a otras tantas concentraciones de lisozima antes y después de someterlas a equilibrio de diálisis. De estos datos, y mediante la ecuación citada anteriormente, se ha obtenido el parámetro de adsorción preferencial (tabla II).

De las pendientes obtenidas se deducen los volúmenes específicos parciales, cuya representación frente a la concentración

Tabla II. Variación del coeficiente de adsorción preferencial,  $\lambda$ , en función de la composición de cada sistema disolvente.

Sistema disolvente M	Coefficiente solvatación $-\lambda_3$
0,100	0,131
0,090	0,123
0,080	0,097
0,070	0,077
0,060	0,101
0,050	0,031
0,040	0,057
0,035	0,081
0,030	0,031
0,025	0,100
0,020	0,130
0,008	0,061
0,006	0,120

de acetato de plomo (II) se dan en la figura 1.

La representación del parámetro de la adsorción preferencial,  $\lambda$ , frente a la concentración de acetato de plomo (II) (figura 2) muestra una curva que presenta similitudes con la obtenida para la viscosidad intrínseca.

### Discusión

En general, las variaciones de las propiedades hidrodinámicas de las proteínas

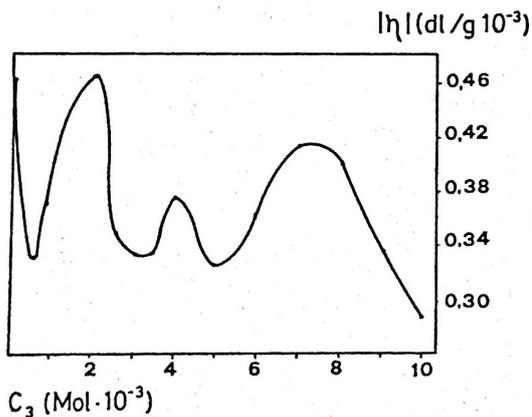


Fig. 1. Variación de la viscosidad intrínseca de la lisozima con la concentración de acetato de plomo (II).

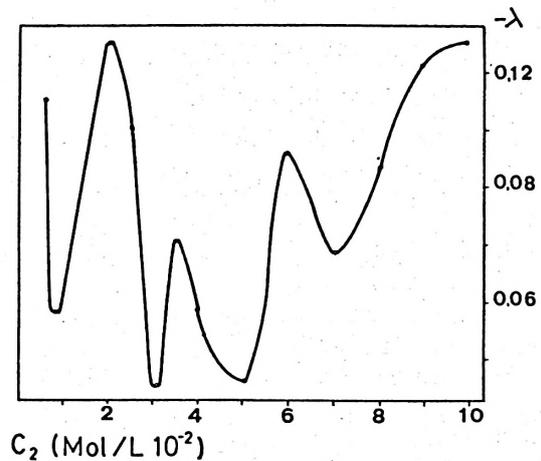


Fig. 2. Variación del coeficiente de adsorción preferencial,  $\lambda$ , en función de la concentración de lisozima.

en contacto con pequeños ligandos pueden ser originadas tanto por alteraciones estructurales, incluidos desplazamientos del equilibrio entre estados conformacionales distintos, como por variación en los estados de agregación.

Para la lisozima se han descrito alteraciones conformacionales dependientes de

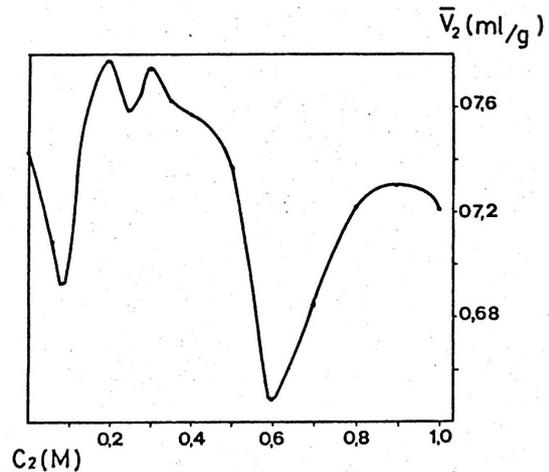


Fig. 3. Volúmenes específicos parciales de la lisozima, según su concentración, en los sistemas igual acetato de plomo (II).

fluctuaciones en el grado de solvatación de la molécula (6) que van acompañadas de aumentos y descensos en la libertad vibracional de la estructura molecular (7).

En el caso del acetato de plomo (II), se observa (fig. 2) una disminución en la solvatación preferencial para el intervalo 0-0,008 M de la sal, lo cual puede ser interpretado en base a la formación de las primeras uniones electrostáticas fuertes entre las formas ionizadas de la sal y los grupos catiónicos y aniónicos de la proteína, lo cual conlleva un desplazamiento de las moléculas de agua, localizadas en esos grupos. Como consecuencia, puede ocurrir un cambio estructural que se traduce en los descensos del volumen específico parcial y de la viscosidad intrínseca reflejados en las figuras 3 y 1, respectivamente.

Como se ha descrito en otros sistemas proteína-catión, un cambio en la pendiente del volumen específico parcial,  $\bar{V}_z$ , puede relacionarse con transiciones conformacionales, y dado el carácter cooperativo de esas transiciones (11), es lógico observar rápidas variaciones de ese parámetro (8). En este sistema aparecen dos cambios bruscos del volumen específico parcial a concentraciones aproximadas de 0,01 y 0,06 M de acetato de plomo (II), que deben guardar relación con transiciones de este tipo.

A la vez, los mínimos en la solvatación preferencial a lo largo de toda la curva de la figura 2 pueden reflejar procesos estructurales de cambio. En sistemas acuosos, tales como los formados por NaCl y KCl en los que la estructura nativa de las proteínas se mantiene, la adsorción preferencial presenta valores elevados. Por el contrario, los procesos de desnaturalización van acompañados de caídas en el mismo parámetro (16).

Para el sistema que se analiza, esto último queda apoyado por los datos de viscosidad. En general, puede decirse que los valores de la viscosidad intrínseca son

proporcionales a la suma del volumen parcial de la proteína, del agua y la sal unida respectivamente. Si la hidratación proteica permanece relativamente constante y no acontecen alteraciones estructurales que varíen el volumen específico parcial, un cambio de viscosidad puede relacionarse con la cantidad de sal unida. Esto puede explicar el hecho de que sin observarse cambios profundos del volumen específico parcial en el intervalo 0,02-0,05 M en acetato de plomo (II) sí los hay para la viscosidad intrínseca en el mismo intervalo. Por contra, el mínimo en la viscosidad intrínseca en torno a 0,05-0,06 M puede estar soportado por el mínimo en el volumen específico parcial en el mismo intervalo.

En la misma línea de razonamiento, si tanto la viscosidad como la adsorción preferencial son función de la estructura macromolecular y de la unión a la misma de componentes del disolvente, se justifica la amplia similitud entre ambas medidas en todo el intervalo considerado de acetato de plomo (II). Se ha comprobado una misma correlación para los sistemas lisozima-Cu (II) y lisozima-Co (II) (1, 2).

En definitiva, los amplios cambios de las pendientes en las curvas de la viscosidad intrínseca, el volumen específico parcial y el coeficiente de solvatación preferencial deben originarse por cambios estructurales importantes en la arquitectura de la lisozima, y las características semejantes con máximos y mínimos compartidos no hacen más que sustentar este punto de vista. Ello debe ser especialmente cierto para valores de concentración total de sal en torno a 0,02 y 0,055 M.

Sin embargo, los mecanismos de desnaturalización por sales son complicados ya que implican interacciones recíprocas entre sal, la proteína y el agua. Una sal puede afectar directa o indirectamente la conformación proteica. La unión del catión  $Pb^{2+}$  a la lisozima podría alterar la energía libre de los estados conformacio-

nales en equilibrio y con distintas características hidrodinámicas y volúmenes parciales. Ello también explicaría los distintos fenómenos de cambio observados en las propiedades medidas.

### Resumen

Se aborda el estudio de los posibles cambios conformacionales de lisozima de clara de huevo de gallina en la mezcla binaria agua/acetato de plomo (II) en función de la composición de la mezcla binaria. Se determina experimentalmente la viscosidad intrínseca, el volumen específico parcial y el coeficiente de adsorción preferencial de diferentes disoluciones, en el intervalo de concentración en acetato de plomo (II) comprendido entre 0-0,100 M. Los resultados obtenidos permiten deducir que en la lisozima se induce un cambio conformacional como consecuencia de la interacción de la proteína con el catión  $Pb^{2+}$ .

**Palabras clave:** Cambio conformacional, Equilibrio de diálisis, Parámetro de solvatación preferencial, Volumen específico parcial.

### Bibliografía

1. Katime, I. y Abad, C.: 75 Aniversario de la Real Sociedad Española de Física y Química. Madrid, 1978.
2. Katime, I., Abad, C. y Campos, A.: *Afinidad*, 40, 257-267, 1983.
3. Baker, L. J., Hansen, A. M. F. y Rao, P. B.: *Biopolymers*, 22, 1637-1640, 1983.
4. Bone, S. y Pethig, R.: *J. Mol. Biol.*, 157, 571-575, 1982.
5. Breslow, E.: En «Inorganic Biochemistry». (G. L. Eichorn, ed.) Elsevier, Nueva York, 1973, Vol. 1, pp. 227-238.
6. Canfield, R. E. y Liu, A. K.: *J. Biol. Chem.*, 240, 1997-2002, 1964.
7. Freeman, H. C.: *Adv. Protein Chem.*, 22, 234-357, 1967.
8. Huggins, M. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 1712-1719, 1942.
9. Jolles, P., Jaurigini, J. y Jolles, J.: *C. R. Acad. Sci.*, 258, 3926-3928, 1964.
10. Katime, I.: En «Química Física Macromolecular». Editorial Del Castillo, Madrid, 1979.
11. Katime, I. y Strazielle, C.: *Makromol. Chem.*, 178, 2295-2305, 1977.
12. Katime, I., Ochoa, J. R. y Teijón, J. M.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 81, 783-788, 1985.
13. Kraemer, E. O.: *Ind. Eng. Chem.*, 30, 1200-1203, 1938.
14. Reisler, E., Haik, Y. y Eisenberg, H.: *Biochemistry*, 16, 197-203, 1977.
15. Scatchard, G. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 2315-2319, 1946.
16. Secemski, I. I. y Lienhard, G. E.: *Biol. Chem.*, 249, 2932-2938, 1974.
17. Stockmayer, W. H.: *J. Chem. Phys.*, 18, 58-61, 1950.