

Este trabajo se realizó en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la asesoría del Dr. Andrés Hernández Arana y la Dra. Silvia Solís Mendiola.

Para la realización de éste trabajo se contó con el apoyo económico de CONACyT a través de la Beca de Doctorado con el número de registro 124872.



Casa abierta al tiempo
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Departamento de Química

**EFFECTOS HOFMEISTER EN LA CINÉTICA
DE DESPLEGAMIENTO DE PROTEINAS:
ESTIMACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL ÁREA
SUPERFICIAL EN LA FORMACIÓN DEL
ESTADO DE TRANSICIÓN**

Tesis que presenta
Leticia López Arenas

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS (QUÍMICA)

Asesores: Dr. Andrés Hernández Arana
Dra. D. Silvia Solís Mendiola

DICIEMBRE 2007

DEDICATORIAS

A mis padres.

A David y a mi hija Jazmín Aquetzalli.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Andrés Hernández Arana y a la Doctora D. Silvia Solís Mendiola por permitirme participar en el presente trabajo.

Al Doctor Maximiliano Asomoza Palacios por todo su apoyo.

A la Doctora Jaqueline Padilla Zúñiga por todo el tiempo dedicado a la realización del artículo.

A todos los profesores del área de Biofísicoquímica.

A todos mis compañeros y amigos del área de Biofísicoquímica.

A todos los que de alguna forma hicieron posible la realización de éste trabajo.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 El agua como solvente	2
1.2 Precipitación salina de proteínas	2
1.3 Desnaturalización	4
1.4 Serie de Hofmeister	5
1.5 El estado de transición (ET)	6
1.6 Proteasas del látex de papaya	8
Capítulo 2. Objetivos	10
2.1 Objetivo general	11
2.2 Objetivos particulares	11
Capítulo 3. Materiales	12
Capítulo 4. Desarrollo Experimental	14
4.1 Dicroísmo circular (DC)	15
4.2 Espectros de dicroísmo circular	16
4.3 Emisión de fluorescencia	17
Capítulo 5. Análisis de datos	18
5.1 Curvas de desplegamiento	19
5.2 Análisis de efectos Hofmeister en la solubilidad de moléculas pequeñas	21
5.3 Construcción de las moléculas de compuestos modelo	23
5.4 Efectos de los cosolutos sobre la constante de velocidad de desplegamiento	23

Capítulo 6. Resultados y discusión	26
6.1 Curvas de transición	27
6.2 Características conformacionales de quimopapína a pH bajo	28
6.3 Cinéticas de desplegamiento	32
6.4 Efectos del cosoluto sobre la constante de velocidad de desplegamiento	38
6.5 Determinación de las constantes que representan la contribución de la sal a la exposición de áreas polar y no polar ($K_{s, \text{pol}}$ y $K_{s, \text{npol}}$)	44
6.6 Estimación de los cambios en el área superficial durante la activación	47
6.7 Apantallamiento electrostático	50
Capítulo 7. Conclusión	51
Referencias	53
APÉNDICE I	62
APÉNDICE II	64

CAPÍTULO 1

Introducción

1. Introducción

1.1 El agua como solvente.

Las proteínas son polímeros de aminoácidos. Una proteína típica está compuesta de cientos de aminoácidos. Las cadenas laterales de los aminoácidos varían mucho en su tendencia a interactuar con el agua, ya que pueden tener grupos no polares, polares neutros y polares con carácter ácido o básico. Es la distribución de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos en la superficie de la proteína lo que determina su solubilidad. El agua hidrata la superficie de la proteína a través de interacciones ion-dipolo con grupos iónicos y dipolo-dipolo con grupos polares de la proteína [1].

1.2 Precipitación salina de proteínas.

La solubilidad de las proteínas depende de la concentración de sales (fuerza iónica) de la solución, ya que los iones salinos compiten por las moléculas de agua. La alteración de la solubilidad por la presencia de sales depende tanto de la naturaleza de la sal como del tipo de proteína [2]. La Figura 1 representa una curva de solubilidad en la que se observa que a baja fuerza iónica la solubilidad aumenta con el incremento de la sal, fenómeno conocido como “*salting in*”. Sin embargo, a medida que la concentración de sal sigue en aumento, se alcanza un punto de máxima solubilidad. Con incrementos adicionales, la fuerza iónica tiene un efecto opuesto sobre la solubilidad; por ejemplo, la solubilidad decrece exponencialmente con el incremento de la fuerza iónica, fenómeno conocido como “*salting-out*” [3].

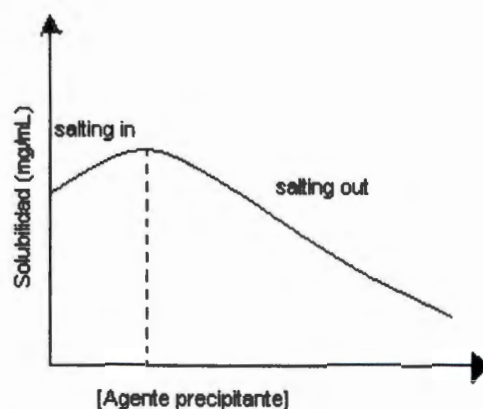


Figura 1. Curva de solubilidad.

El fenómeno “salting out” depende principalmente de la hidrofobicidad de la proteína. Las zonas hidrofóbicas de la superficie proteica están protegidas por moléculas de agua dispuestas en una estructura ordenada. Si se agrega una sal, los iones de la misma se solvatan. Por lo tanto, a medida que la concentración de sal se incrementa, las moléculas de agua libres se hacen más escasas y hay una “deshidratación” de las moléculas de proteína, lo que quiere decir que hay una tendencia a que se pierda el agua ordenada alrededor de las zonas hidrofóbicas. Esto lleva a que las zonas hidrofóbicas queden expuestas, interactúen entre sí y se formen entonces agregados proteicos. En cambio el fenómeno conocido como “salting in” depende más de la distribución de cargas superficiales de la proteína y de las interacciones polares con el solvente, en este fenómeno los iones actúan para proteger a las moléculas de proteína de las cargas opuestas de las otras moléculas [2].

Setchenow se interesó en investigar el efecto de las sales sobre la solubilidad del CO_2 para entender su transporte en la corriente sanguínea. Encontró que el logaritmo de la solubilidad varía linealmente con la concentración de sal. Esto se representa con la siguiente ecuación

$$\log [c_M/c_M(0)] = -K_s c_i$$

donde c_M es la solubilidad del soluto en estudio en presencia de sal, $c_M(0)$ es la solubilidad del soluto en ausencia de sal, c_i es la concentración de la sal y K_s es la constante “salting out” [4].

Las soluciones concentradas de sal tienen grandes efectos sobre la estructura y propiedades de la proteína, incluyendo su solubilidad y desnaturalización. Debido a la complejidad de las proteínas pueden ocurrir una variedad de diferentes interacciones con las sales y es difícil determinar cuáles interacciones son importantes para las propiedades de las proteínas. Una aproximación para la investigación de esos problemas es determinar los efectos de las sales sobre la energía libre de compuestos modelo, los cuales contienen componentes de proteínas tales como grupos peptídicos o grupos no polares. Una suposición de esta aproximación es que los efectos de las sales sobre los componentes de compuestos modelo son similares a sus efectos sobre aquellos componentes en las proteínas [5, 6].

Además de la fuerza iónica existen otros factores que pueden afectar la solubilidad de una proteína, tales como la temperatura [7] y el pH [8, 9]. La solubilidad normalmente aumenta con el incremento de la temperatura, pero en proteínas es posible tener una conducta inversa [3]. En cuanto al pH las proteínas poseen una mínima solubilidad en el punto isoelectrico, ya que en estas condiciones las fuerzas de repulsión son mínimas. A valores de pH por encima o por debajo del punto isoelectrico la proteína tiene carga neta negativa o positiva, respectivamente; por lo tanto, a fuerza iónica constante, la solubilidad de una proteína aumenta tanto a valores de pH menores o mayores que su punto isoelectrico [8]. En este trabajo se mantienen constantes tanto el pH como la temperatura para poder observar el efecto de la fuerza iónica de los electrolitos sobre el desplegamiento de la proteína.

1.3 Desnaturalización.

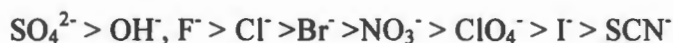
El proceso de desnaturalización de una proteína puede ser desencadenado por un cambio en las condiciones del entorno de la molécula, como un aumento en la temperatura, un aumento o disminución del valor del pH o la presencia de algún agente desnaturalizante (como urea o cloruro de guanidinio (GdnCl)) [10, 11]. La desnaturalización es una consecuencia de la unión preferencial de los componentes del solvente a la proteína, es decir, de una solvatación preferencial. Los agentes estabilizantes son excluidos preferencialmente del dominio de la proteína, mientras que los agentes desestabilizantes

(como el GdnCl), se unen preferencialmente a la proteína. En consecuencia, la acción de un agente cualquiera se define exclusivamente por el balance entre las afinidades de la proteína con el agua y con el agente particular, y puede variar desde la preferencia fuerte por el agua hasta la preferencia fuerte por el cosoluto [11].

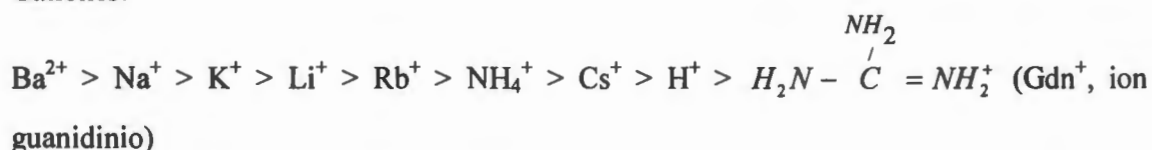
1.4 Serie de Hofmeister.

Hofmeister definió la serie de aniones y cationes que llevan su nombre cuando midió la concentración necesaria de varias sales para precipitar proteínas de la clara de huevo de gallina, encontrando el siguiente orden en cuanto al poder precipitante de los iones de las sales [12, 13]:

Aniones:



Cationes:



Hofmeister también demostró que los aniones son más efectivos que los cationes en la precipitación de proteínas [14]. Recientemente, esta serie fue probada en estudios de cristalización y solubilidad sobre la lisozima de la clara de huevo de gallina [15, 16], demostrándose que la solubilidad de la lisozima se afecta más por los aniones que por los cationes. Desde su descubrimiento por Hofmeister en 1888 esta serie ha sido ampliamente estudiada [17].

De acuerdo a la serie de Hofmeister de cationes y aniones, el NaCl se considera que es el punto medio de efecto precipitante. Sales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ comúnmente precipitan proteínas y sales como GdnCl se sabe que solubilizan proteínas [4, 18].

La acción desnaturalizante de los iones de Hofmeister del tipo de SCN^- o el ion guanidinio (Gdn^+) resulta del hecho de que ellos solubilizan grupos peptídicos, y en consecuencia interactúan más fuertemente con la forma desplegada de una proteína que con su forma nativa, por lo que producen la reacción de desplegamiento [18]. El “punto nulo” separa desnaturalizantes y estabilizantes de proteínas, y es el resultado de un balance entre dos clases de interacciones opuestas: precipitación de grupos no polares y solubilización de grupos peptídicos.

1.5 El estado de transición (ET).

En general, se supone que el estado de transición (ET) tanto para el plegamiento como para el desplegamiento es, en una primera aproximación, una forma distorsionada de alta energía de la conformación nativa [19]. Esta energía elevada se debe probablemente a la necesidad de romper simultáneamente un gran número de las interacciones que estabilizan el estado nativo (N). La estructura del estado de transición para el plegamiento parece ser, por consiguiente, parecida a la del estado nativo, con una proporción elevada de estructura secundaria y con interacciones significativas en el núcleo hidrofóbico [20, 21].

Como el estado de transición (ET) (o el conjunto de conformaciones que lo representan) es un estado transitorio muy poco poblado, la única manera de inferir cual será su posible conformación (o conformaciones) es a través de estudios de la cinética de desplegamiento. Sería de esperar que la concentración de iones H^+ o de otros iones, así como afectan el equilibrio $\text{N} \leftrightarrow \text{U}$ (donde N representa el estado nativo y U el estado desplegado), alteren también la barrera de energía libre entre N y ET; de esta forma, dichos cosolutos tendrán en general un efecto sobre la cinética de desplegamiento. El punto importante, sin embargo, radica en obtener información estructural acerca del ET a partir de los cambios cinéticos observados en presencia de algún ion.

En la última década se han realizado grandes esfuerzos para estudiar las barreras de energía libre de la transición plegamiento-desplegamiento de proteínas. Se han usado aproximaciones experimentales y computacionales para realizar descripciones termodinámicas y estructurales del estado de transición, es decir, del ensamble de estados que conectan a los estados nativo (N) y desplegado (U) de moléculas de proteína [22, 23].

Generalmente se obtiene información experimental sobre el ET estudiando las velocidades de plegamiento y desplegamiento como función de la temperatura o de la concentración de desnaturalizante. De este tipo de estudios es posible estimar el área molecular promedio expuesta en el ET relativo al área expuesta en el estado nativo (N) [24, 25]. Para obtener características estructurales del ET se requieren pruebas detalladas, las cuales se basan en introducir mutaciones selectivas que permiten analizar el efecto que sobre las velocidades de plegamiento y desplegamiento tiene la substitución de aminoácidos individuales [26]. Para residuos con cadenas laterales ionizables, un cambio en el pH puede modificar la naturaleza de su carga. Así debido a que las interacciones carga-carga afectan fuertemente las constantes de protonación de grupos ionizables [27, 28], la dependencia con el pH mostrada por las constantes de velocidad de desplegamiento [29, 30] o replegamiento [31, 32] han sido empleadas para monitorear el grado de rompimiento o consolidación de interacciones electrostáticas cuando el ET se forma ya sea partiendo de N o de U. La contribución de las interacciones electrostáticas a las barreras de las transiciones conformacionales de proteínas también ha sido estudiada por análisis de “efectos salinos” sobre los correspondientes eventos cinéticos [18, 33]. Sin embargo, se debe recalcar que existen diferentes mecanismos por los cuales las sales pueden afectar las velocidades de reacción, así como también el equilibrio conformacional [34-37]. Aparte de ejercer el bien conocido “apantallamiento electrostático”, los iones pequeños en solución acuosa también afectan la estabilidad (y solubilidad) de proteínas debido a una interacción preferencial con, o una exclusión de, la superficie macromolecular [11]. Los efectos salinos de la clase anterior son notablemente diferentes dependiendo de los aniones y cationes que constituyen la sal y comúnmente se les denomina interacciones de Hofmeister [4, 34, 35].

Un notable ejemplo de tal distinción entre diferentes efectos salinos fue realizado por Scholtz y col. [38] en su estudio de cómo tres diferentes sales afectan la estabilidad de una pequeña hélice polipeptídica sin carga. Se encontró que a valores altos de fuerza iónica las interacciones específicas de las sales de tipo Hofmeister que dirigen ya sea la estabilización o desestabilización de la hélice son predominantes. Además por substracción de los efectos Hofmeister de datos experimentales a baja fuerza iónica, los autores aislaron un efecto hélice-estabilizante no específico que fue atribuido al “apantallamiento electrostático” del macrodipolo de la hélice por el electrolito.

1.6 Proteasas del látex de papaya.

En este trabajo se estudió el efecto de tres electrolitos sobre la reacción de desplegamiento de quimopapaína (E. C. 3. 4. 22. 6), enzima que pertenece a la familia de la papaína. El látex de papaya (*Carica papaya*) es el origen de varias proteínas: papaína, quimopapaína y caricaína [39]. Pertenecen a la familia de enzimas denominadas proteasas sulfhidrúlicas vegetales, o proteasas cisteínicas, que tienen una actividad proteolítica que depende del grupo tiol de un residuo de cisteína [40]. Tienen una elevada homología en sus secuencias de aminoácidos; al comparar pares de proteínas se encuentra que el porcentaje de residuos idénticos va del 40 al 90 % [41].

Los miembros de la familia de las proteasas cisteínicas de *Carica papaya* tienen masas moleculares similares (≈ 24 kDa) y puntos isoelectricos básicos (8.75 – 11.0) [42]. La estructura primaria de la quimopapaína contiene 218 residuos de aminoácido, cuenta con ocho residuos de cisteína, seis que forman tres enlaces disulfuro (Cys 22-63, 56-95 y 153-204), y dos que se encuentran como cisteína libre (Cys 25 y 117). La quimopapaína no contiene sitios de unión de carbohidratos, presenta un punto isoelectrico de 10.6 y una masa molecular de 24 kDa [43]. En la Figura A1 (Apéndice I) se muestra la secuencia de aminoácidos de la quimopapaína.

Estudios de rayos X determinaron que la estructura tridimensional de la quimopapaína consta de dos dominios estructurales de aproximadamente 100 residuos cada uno. El primer dominio está conformado principalmente por hélices α , mientras que el otro dominio consiste esencialmente de hebras β antiparalelas. El sitio catalítico, que se encuentra en la hendidura interdominio, está formado por tres aminoácidos: cisteína del primer dominio, histidina y asparagina del segundo. En este sitio, el grupo sulfhídrico de la cisteína interacciona fuertemente con el imidazol de la histidina, que a su vez se relaciona con el carbonilo de la cadena lateral de la asparagina [44]. En la Figura 2 se representa la estructura tridimensional de la quimopapaína.

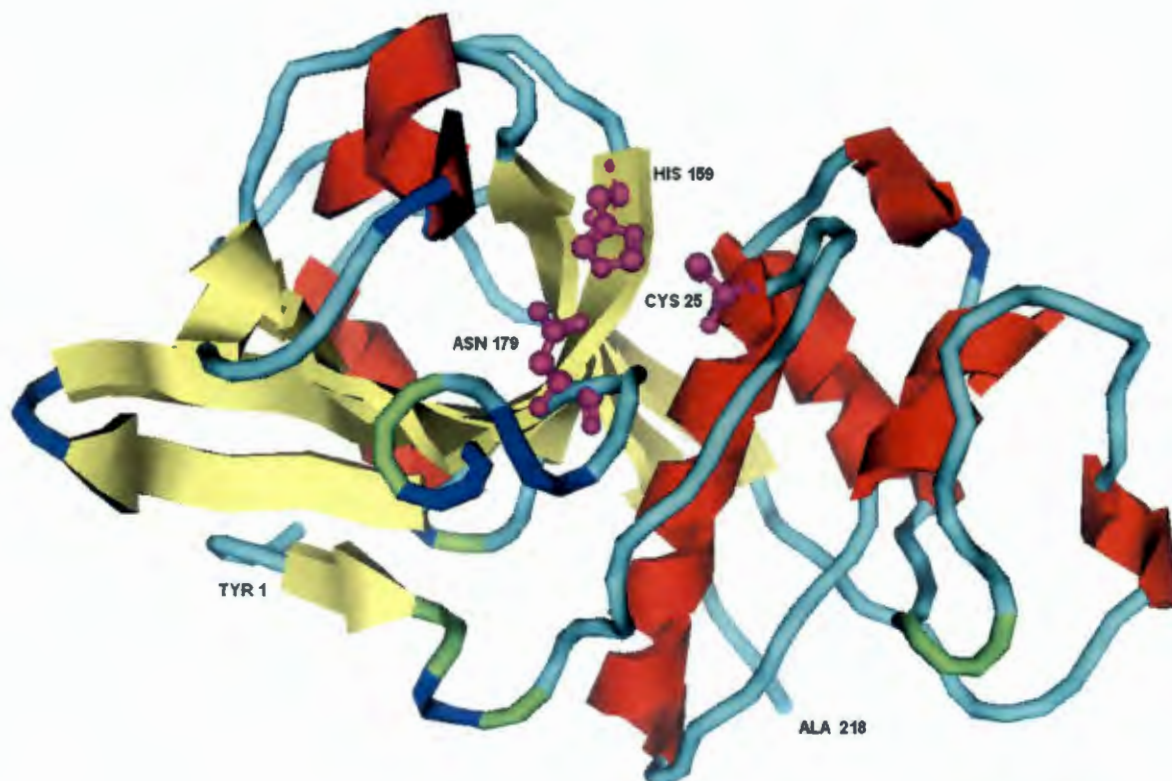


Figura 2. Esquema de la estructura tridimensional de la quimopapaína en la que los listones rojos representan hélices α y los listones amarillos hebras β . En rosa se indican los aminoácidos del sitio activo.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Obtener una interpretación molecular del efecto que ciertos electrolitos tienen sobre la energía libre de activación ($\Delta G^\ddagger$) del desplegamiento de la quimopapaína, para posteriormente caracterizar el estado de transición (ET).

2.2 Objetivos particulares

- Con la técnica de dicroísmo circular estudiar la estabilidad cinética de la quimopapaína, realizando estudios cinéticos de desnaturalización (a pH y temperatura constantes) en presencia de diferentes concentraciones de electrolitos, tales como cloruro de guanidinio (GdnCl), Na_2SO_4 y LiCl, así como con urea ($\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$), un compuesto no iónico.
- Determinar, primeramente en forma cualitativa, el modelo o modelos fisicoquímicos que expliquen el comportamiento cinético observado. En segundo término, plantear dichos modelos en una forma cuantitativa de manera que sea posible inferir ciertas propiedades estructurales del estado de transición, comparativamente con la estructura del estado nativo.

CAPÍTULO 3

Materiales

3. Materiales.

Se utilizó quimopapaína parcialmente purificada de la marca Sigma. La forma más abundante de la enzima contenida en esta preparación se separó y purificó por cromatografía líquida de intercambio catiónico de alta resolución hasta obtener una solución homogénea, de acuerdo con la metodología reportada por diversos autores [45]. Para impedir la autólisis durante la purificación, el sitio activo de la quimopapaína se bloqueó irreversiblemente con iodoacetamida [46]. Para comprobar la pureza de la proteína fueron aplicadas dos técnicas distintas: cromatografía líquida de intercambio iónico de alta resolución (HPLC) y electroforesis de SDS-PAGE. La concentración de la proteína se determinó espectrofotométricamente a 280 nm utilizando como coeficiente de extinción $A_{280\text{ nm}} = 1.85\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [42, 47]. Se preparó una solución concentrada de ANS (sal de amonio del ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico) 0.018 M de la marca Sigma en regulador de glicina-HCl 0.05 M ajustada a pH 1.5 y 7.0, la cual se usó posteriormente para obtener espectros de emisión de fluorescencia de la mezcla quimopapaína-ANS. La concentración de ANS se determinó usando un coeficiente de extinción de $\epsilon = 5000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ a 350 nm [48].

También se utilizó glicina de la marca J. T. Baker. La urea (calidad para electroforesis) se obtuvo de Sigma; cabe mencionar que las soluciones de esta sustancia se prepararon el mismo día en que fueron usadas. El cloruro de guanidinio de grado ultra puro que se empleó fue adquirido de ICN Biomedicals y su concentración fue determinada por medio del índice de refracción [49]. El cloruro de litio y sulfato de sodio fueron de la marca Merck. Todas las soluciones se filtraron después de su preparación y se midió nuevamente el valor del pH. Para todos los experimentos se utilizó agua destilada y desionizada.

CAPÍTULO 4

Desarrollo experimental

4. Desarrollo experimental.

4.1 Dicroísmo circular (DC).

Se estudió el efecto de varias sales sobre el proceso de desplegamiento de la quimopapaína. Para esto se utilizó un espectropolarímetro JASCO J-715 con una lámpara de Xe con 150 W de potencia, usando una celda de 1.00 cm de trayectoria óptica y un sistema de control de temperatura tipo PELTIER, modelo PTC-348WI. El espectropolarímetro usado está equipado con un agitador magnético para lograr la rápida homogeneidad de la mezcla.

Para determinar el pH adecuado para realizar los estudios cinéticos de la quimopapaína se realizaron curvas de transiciones térmicas en regulador de glicina 0.05M, pH 2.0 y 1.5, a una velocidad de calentamiento de 3°C/min y 2°C/min, respectivamente, desde 25°C hasta 80°C. La señal de DC se midió a 227 nm, longitud de onda a la cual se logró obtener una relación razonable señal-ruido. Estos perfiles térmicos se obtuvieron con el fin de saber en que valor de pH el desplegamiento (irreversible) de la proteína ocurría en una escala de tiempo adecuada para su medición experimental, con la metodología a nuestro alcance, cuando la temperatura fuera cercana a los 40°C.

Era importante fijar la temperatura de los estudios alrededor de los 40°C, en razón de la forma prevista para analizar los efectos tipo Hofmeister que fueran observados. Como se verá más adelante, el método propuesto en esta tesis se basa en un modelo en el cual se propone que el efecto de una sal dada sobre el potencial químico de un soluto se origina de la cantidad de área, polar y no polar, que presenta la molécula de soluto en contacto con la solución acuosa. Esta forma de análisis descansa en resultados de estudios previos de solubilidad de diversos derivados de aminoácidos, resultados que fueron obtenidos a temperaturas de 0, 25 y 40°C. Por lo tanto, la temperatura de nuestros estudios no debía ser muy superior a los 40°C para evitar introducir un error importante en el análisis. Por otra parte, vimos que la elección de un valor de temperatura inferior a 40°C (e.g. 25°C) implicaría fijar un valor de pH muy bajo (menor a 1.5), lo cual acarrearía el problema del ajuste de este parámetro y el de la poca estabilidad de la enzima en tales condiciones.

La temperatura exacta para realizar los estudios cinéticos se determinó siguiendo el proceso de desplegamiento de la proteína acelerado por un agente desestabilizante, cloruro

de guanidinio (GdnCl), y en ausencia del mismo. El desplegamiento se observó a diversas concentraciones de desnaturalizante en regulador de glicina 0.05M, pH 1.5 a 227 nm. Para cada concentración de desnaturalizante se probaron algunas temperaturas cercanas a 40°C (46.6°C, 45°C y 44°C). Encontramos que a 44 °C, era posible estudiar la desnaturalización en un intervalo de concentración de GdnCl de 0 a 1.6 M, el cual se consideró adecuado.

Posteriormente se realizaron los estudios cinéticos de desnaturalización de la quimopapaína en soluciones conteniendo diferentes concentraciones de GdnCl (0–1.6 M), urea (0–2 M), Na₂SO₄ (0–0.5 M) y LiCl (0–0.8 M), manteniendo constantes el pH (1.5) y la temperatura (44°C). Para realizar los experimentos se colocó en la celda de 1.00 cm de trayectoria óptica una solución del electrolito o urea disuelta en regulador de glicina 0.05M, pH 1.5, permitiendo que se estabilizara la temperatura a 44°C; una vez alcanzada esta temperatura se añadió en la celda óptica la cantidad necesaria de solución concentrada de quimopapaína para obtener una concentración final de 0.02 mg mL⁻¹ y se siguió la señal de elipticidad a 227 nm. Durante las cinéticas las muestras se mantuvieron en agitación constante por medio de un agitador magnético para lograr que la proteína en solución y la solución de electrolito o urea se mezclaran rápidamente.

Siguiendo el mismo procedimiento también se estudió la cinética de desplegamiento de la quimopapaína en ausencia de electrolitos a las condiciones ya mencionadas.

4.2 Espectros de dicroísmo circular.

Se obtuvieron espectros de dicroísmo circular (DC) de la estructura nativa a 20°C en regulador de glicina-HCl 0.05M, ajustando el pH a 1.5 o 7.0. En el ultravioleta lejano (200–250 nm) se usó una celda de 0.10 cm de recorrido óptico y la concentración de proteína fue 0.2 mg mL⁻¹. Cada espectro se corrigió restándole la señal del amortiguador.

4.3 Emisión de fluorescencia.

Espectroscopía de fluorescencia. Se utilizó un espectrofluorómetro de conteo de fotones PCI ISS (Champaign, IL, USA) con una lámpara de Xe, con 300 W de potencia. Este instrumento fue equipado con una chaqueta de circulación de agua para control de temperatura.

Al igual que con la técnica de DC, se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia a 20°C en regulador de glicina-HCl 0.05M, ajustando el pH a 1.5 o 7.0. La concentración de proteína fue 0.04 mg mL⁻¹. Para la fluorescencia intrínseca de la proteína, la excitación se realizó a 280 nm y la emisión se registró de 300 a 450 nm la intensidad de fluorescencia (IF) se corrigió restándoles la (IF) del amortiguador. Por otro lado, para la fluorescencia de ANS la excitación fue a 380 nm y el espectro de emisión se siguió entre 400 y 600 nm en este caso la intensidad de fluorescencia (IF) fue corregida restándoles la (IF) de la mezcla del amortiguador y el ANS; en ambos casos los anchos de banda (slit width) fueron de 16 y 8 nm para la excitación y emisión, respectivamente. La relación molar proteína: ANS fue 1:100.

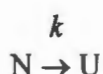
CAPÍTULO 5

Análisis de datos

5. Análisis de datos.

5.1 Curvas de desplegamiento.

Los estudios cinéticos permiten obtener considerable información, donde el proceso de desplegamiento depende del tiempo. El plegamiento y desplegamiento de las proteínas monoméricas son procesos intramoleculares. Por tanto, las cinéticas de esas reacciones pueden ser descritas en términos de ecuaciones de primer orden. Esto significa que la concentración de una especie dada es descrita por una suma de uno o más términos exponenciales. Si se considera que se trata de un modelo simple de dos estados, y se asume que inicialmente sólo proteína nativa está presente, para la reacción



la constante de velocidad k puede ser obtenida, a partir de datos experimentales, de la siguiente manera:

Si se mide una propiedad física “ y ”;

$$\begin{array}{ll} & y = (y_N - y_U) \exp(-kt) + y_U \\ \text{Pero} & y_N - y_U = A, \\ \text{por lo que,} & y = A \exp(-kt) + y_U \end{array} \quad (1)$$

La ecuación (1) también se puede expresar como una función de y_N :

$$\begin{array}{ll} \text{Si} & y_U = y_N - A \\ & y = A (\exp(-kt) - 1) + y_N \end{array} \quad (2)$$

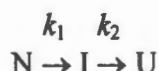
“ y ” es una propiedad física que cambia durante la transición y para la técnica de DC se representa por la elipticidad (θ). Por lo que las ecuaciones (1) y (2) pueden ser escritas de la siguiente manera

$$\theta_t = A \exp(-kt) + \theta_U \quad (3)$$

$$\theta_t = A (\exp(-kt) - 1) + \theta_N \quad (4)$$

Donde θ_t , θ_N y θ_U son el valor de la elipticidad de la proteína medida a un tiempo dado, en el estado nativo y en el estado desplegado, respectivamente, A representa la amplitud de la fase ($\theta_N - \theta_U$), t es el tiempo y k es la constante de velocidad de la reacción de desplegamiento.

Cuando los datos cinéticos no se ajustan a un modelo simple de dos estados, se puede emplear el modelo de dos reacciones consecutivas con un intermediario, I [50]:



Para este modelo los datos cinéticos pueden ser analizados empleando una ecuación exponencial doble,

$$\theta_t = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) + \theta_U \quad (5)$$

O en función de θ_N :

$$\theta_t = A_1 (\exp(-k_1 t) - 1) + A_2 (\exp(-k_2 t) - 1) + \theta_N \quad (6)$$

La elipticidad característica de cada especie se denota como θ_N , θ_I , y θ_U , y las amplitudes observadas para cada fase, son dadas por

$$A_1 = (\theta_N - \theta_I) + k_2 (\theta_I - \theta_U) / (k_2 - k_1) \quad (7)$$

$$A_2 = -k_1 (\theta_I - \theta_U) / (k_2 - k_1) \quad (8)$$

las cuales son usadas para calcular los cambios en la elipticidad correspondientes a cada paso cinético de la reacción (es decir, $\theta_N - \theta_I$ y $\theta_I - \theta_U$). k_1 y k_2 son las constantes de

velocidad de cada una de las fases cinéticas. Muchas de las curvas cinéticas de este trabajo se ajustaron a una ecuación de decaimiento exponencial doble. Cuando no ocurrió así, fue necesario emplear una ecuación de decaimiento exponencial triple.

$$\theta_t = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) + A_3 \exp(-k_3 t) + \theta_U \quad (9)$$

$$\theta_t = A_1 (\exp(-k_1 t) - 1) + A_2 (\exp(-k_2 t) - 1) + A_3 (\exp(-k_3 t) - 1) + \theta_N \quad (10)$$

5.2 Análisis de efectos Hofmeister en la solubilidad de moléculas pequeñas.

De acuerdo al modelo de interacciones débiles, la variación en el potencial químico (μ_M) de un soluto M por alguna sal adicionada (o algún otro cosoluto), i , está dada por el parámetro de interacción $\beta_{M,i}$ [4]:

$$\beta_{M,i} = (\partial \mu_M / \partial c_i)_{T, p, c_M}$$

A bajas concentraciones del soluto M (e. g. una proteína) su coeficiente de actividad usualmente es igual a 1 y un cambio en su potencial químico (μ_M) se puede escribir en términos de su concentración molar y la concentración de cosoluto:

$$(d\mu_M)_{T, p} = RT d(\ln c_M) + \beta_{M,i} dc_i$$

En un experimento de “salting out” (precipitación), ocurre un equilibrio del soluto, M, presente tanto en la solución como en el precipitado (fase sólida). Por tanto, en las soluciones donde se alcanza la máxima solubilidad de M, μ_M permanece constante mientras que c_M y c_i varían, con lo que la ecuación de arriba conduce a $d(\ln c_M) = -(\beta_{M,i}/RT) dc_i$. Si $\beta_{M,i}$ se asume como independiente de la concentración de cosoluto se obtiene la ecuación de Setchenow [4],

$$\log [c_M/c_M(0)] = -(\beta_{M,i}/2.303RT) c_i = -K_s c_i \quad (11)$$

donde K_s es la constante “salting-out”. Estudios de solubilidad de aminoácidos (con sus grupos amino y carboxilo bloqueados) [5, 6] han demostrado que las constantes “salting-out” son proporcionales al número de átomos de carbono y, por tanto, al área superficial accesible de la molécula. Sin embargo, las sales también producen “salting-in” (solubilización) de grupos peptídicos [4] en una forma que parece ser sal-específica y también proporcional al número de tales grupos.

En este trabajo postulamos que los valores de K_s para aminoácidos bloqueados (es decir, el efecto “salting-out” o “salting-in” de una sal dada) pueden ser representados de acuerdo con un modelo de efectos aditivos, en términos de las áreas polares y no polares del compuesto expuestas al solvente:

$$K_s = K_{s, pol} (A_{pol}) + K_{s, npol} (A_{npol}) \quad (12)$$

donde A_{pol} y A_{npol} son el área superficial polar y no polar accesible al solvente de una molécula, respectivamente. Por tanto, $K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$ pueden obtenerse por regresión lineal de mínimos cuadrados si se conocen los valores de K_s , A_{pol} y A_{npol} de las moléculas en cuestión. Este modelo permite obtener datos de K_s para compuestos modelo aplicables a proteínas.

Una manera alternativa para obtener $K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$ es dividir la ecuación 12 entre A_{pol} o A_{npol} :

$$\begin{aligned} K_s/A_{pol} &= K_{s, pol} + K_{s, npol} (A_{npol}/A_{pol}) \\ y &= b + m x \end{aligned} \quad (12a)$$

donde “b” es la ordenada al origen de la cual se obtiene $K_{s, pol}$ y “m” es la pendiente obteniéndose el valor de $K_{s, npol}$.

Ya que a la fecha se han determinado los valores de K_s para varios compuestos modelo [5, 6], para determinar los valores de A_{pol} y A_{npol} fue necesario construir las moléculas de cada compuesto estudiado experimentalmente, y determinar los valores correspondientes de A_{pol} y A_{npol} .

5.3 Construcción de las moléculas de compuestos modelo.

Se crearon las moléculas con sustituyentes N-acetil y etil ester en los extremos de gly, gly-gly, gly-gly-gly, ala, val, leu, phe, β -ala, nor-val y nor-leu. Esa construcción se realizó en una computadora Silicon Graphics Índigo 2 con el programa de edición molecular Biograf (Molecular Simulations). La geometría de cada molécula cumplió con la de una cadena plana y completamente extendida. Las áreas expuestas al solvente se calcularon con el programa NACCESS (Simon Hubbard, University Collage, United Kingdom) con un radio de prueba de 1.4 Å y un incremento de 0.05 Å. La contribución de cada tipo de átomo al área expuesta fue obtenida por un programa doméstico y clasificada como área polar, para los átomos de oxígeno y nitrógeno, y no polar, para los átomos de carbono.

5.4 Efectos de los cosolutos sobre la constante de velocidad de desplegamiento.

Intentando separar efectos generales de efectos específicos (tipo Hofmeister) de los iones de las sales, se siguió el procedimiento usado por Scholtz y col. [38] en el estudio de la influencia de las sales sobre la estabilidad de una hélice polipeptídica. En ese procedimiento se asume que los efectos específicos de los iones son predominantes a concentraciones altas de electrolitos y que en esas condiciones la diferencia en energía libre entre dos estados de una macromolécula puede ser representada como una función lineal de la concentración de sal. Tal dependencia lineal está implícita en la ecuación de Setchenow y es común encontrarla en estudios de desplegamiento de proteínas inducido por GdnCl o urea [51, 52].

La relación entre la constante de velocidad (k) y la energía libre de activación ($\Delta G^\ddagger$) para una reacción simple de un paso es: $k = E \exp(-\Delta G^\ddagger/RT)$. En presencia de un electrolito adicionado, la ecuación anterior puede ser escrita como sigue [53]:

$$\ln k = \ln E - \Delta G_0^\ddagger/RT - \Delta G_{\text{elec}}^\ddagger/RT - (m^\ddagger_i/RT) I_i \quad (13)$$

donde la suma de los dos primeros términos en el lado derecho es el valor de $\ln k$ en ausencia de electrolitos; R es la constante de los gases; T la temperatura y según la teoría de Arrhenius E es un factor preexponencial que es aproximadamente igual a kT/h , donde k es la constante de Boltzmann y h la de Planck [54]; $\Delta G_{\text{elec}}^{\ddagger}$ representa la contribución del “apantallamiento electrostático” a la energía libre de activación; $m_i^{\ddagger}$ es un parámetro específico para cada electrolito cuya concentración molar es c_i (y su fuerza iónica I_i), y representa el cambio inducido en $\Delta G^{\ddagger}$ por unidad de concentración de sal. Según el modelo de interacciones débiles [4], $m_i^{\ddagger}$ estaría dado por la diferencia entre los parámetros de interacción para el estado de transición ($\beta_{\text{ET}, i} = \partial\mu_{\text{ET}}/\partial c_i$) y el estado nativo ($\beta_{\text{N}, i} = \partial\mu_{\text{N}}/\partial c_i$):

$$m_i^{\ddagger} = (\beta_{\text{ET}, i} - \beta_{\text{N}, i}) \quad (14)$$

Podemos considerar que la diferencia de parámetros de interacción, $\beta_{\text{ET}} - \beta_{\text{N}}$, se compone de dos términos:

$$m^{\ddagger} = \beta_{\text{ET}} - \beta_{\text{N}} = \beta_{\text{pol}} \Delta\text{ASA}_{\text{pol}} + \beta_{\text{npol}} \Delta\text{ASA}_{\text{npol}} \quad (15)$$

Por otra parte recordemos que β_{pol} y β_{npol} para cada sal, pueden obtenerse de los valores de $K_{s, \text{pol}}$ y $K_{s, \text{npol}}$, de compuestos modelo según lo indican las ecuaciones 11 y 12.

Los valores de $m_i^{\ddagger}$ pueden, entonces, ser usados para estimar la cantidad de área superficial polar ($\Delta\text{ASA}_{\text{pol}}$) y no polar ($\Delta\text{ASA}_{\text{npol}}$) expuesta al solvente cuando el estado de transición (ET) se forma.

Con respecto a la acción desnaturalizante de GdnCl, se sabe que ésta correlaciona linealmente con el área superficial total expuesta al solvente durante el desplegamiento de proteínas. En un análisis de datos de desplegamiento Pace y col. [51] encontraron que el valor de m para GdnCl es dado por:

$$m = 0.28 \Delta\text{ASA} \quad (16)$$

También encontraron que el valor de m para urea es dado por $m = 0.14 \Delta\text{ASA}$, sin embargo para este trabajo no se considera esta relación, ya que la urea es un compuesto no

iónico que no presenta una atmósfera iónica alrededor de la proteína como lo hacen GdnCl, Na₂SO₄ y LiCl. Además dicha relación fue obtenida de experimentos realizados a valores de pH cercanos a la neutralidad, por lo que el efecto del poder de carga no es tan marcado como en los experimentos que se realizaron en este trabajo. Por otro lado el valor obtenido de ΔASA utilizando esta relación será muy grande por lo que no se puede comparar con los obtenidos con los electrolitos empleados.

CAPÍTULO 6

Resultados y discusión

6. Resultados y discusión.

6.1 Curvas de transición.

Los estudios cinéticos se realizaron a una temperatura que fuera lo mas cercana posible a 40°C debido a las razones expuestas en el capítulo 4, sección 4.1. El objetivo de este trabajo era seguir las cinéticas de desplegamiento de la quimopapaína en presencia y ausencia de electrolitos, por lo que el pH seleccionado debería permitir realizar los estudios cinéticos a temperatura cercana a 40°C. Para determinar los valores adecuados de temperatura y pH se realizaron barridos térmicos a pH 2.0 y 1.5 desde una temperatura de 25°C hasta 80°C. En la Figura 3 se observa que el pH que permite acercarnos lo mas posible a la temperatura deseada (40°C) es 1.5, ya que a este pH el mayor cambio en la fracción de moléculas desplegadas ($f_U = (\theta_N - \theta_t)/(\theta_N - \theta_U)$) se presenta aproximadamente a partir de 40°C, en cambio a pH 2.0, dicho cambio se presenta a temperaturas mayores.

Para determinar la temperatura exacta a la cual sería posible realizar los estudios cinéticos de la quimopapaína a pH 1.5, se estudió el proceso de desplegamiento de la proteína acelerado por un agente desestabilizante, cloruro de guanidinio (GdnCl). El desplegamiento se observó a diversas concentraciones de desnaturalizante en regulador de glicina 0.05M, pH 1.5 a 227 nm. Para cada concentración de desnaturalizante se probaron algunas temperaturas cercanas a 40°C (46.6°C, 45°C y 44°C), Se observo que a 44°C el desplegamiento de la proteína se completaba (en un 95%) en tiempos que iban desde varias horas (en ausencia de GdnCl) hasta unos pocos minutos (en presencia de GdnCl ≈ 1.6 M). Ya que tales escalas de tiempo son accesibles para un adecuado registro de con el instrumento usado, se eligió entonces la temperatura de 44°C para todos los estudios posteriores. A una temperatura menor que 44°C, la reacción en ausencia de GdnCl hubiera tomado más de una jornada de trabajo para completarse, con los correspondientes problemas que eso acarrea.

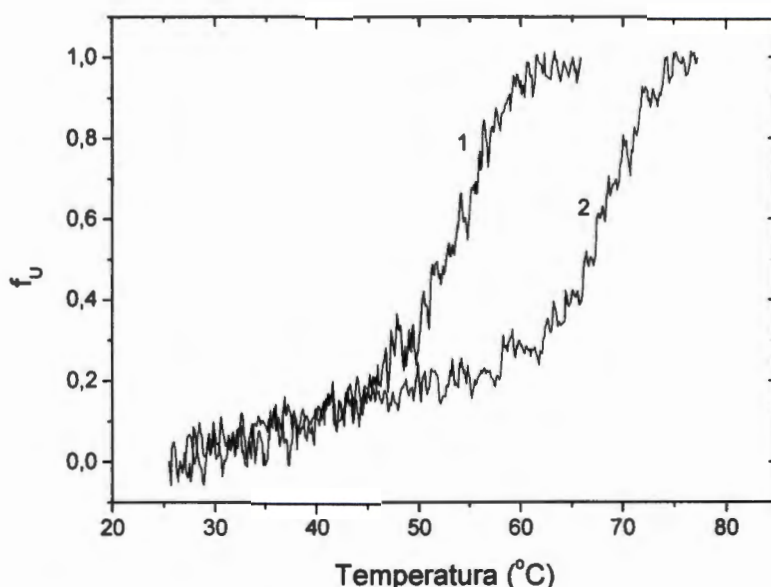


Figura 3. Curvas de transición térmica de la quimopapaína a concentración de 0.02 mg mL⁻¹ seguidas por los cambios de elipticidad a 227 nm, en regulador de glicina 0.05M, pH 1.5 (curva 1) y pH 2.0 (curva 2) a velocidad de calentamiento de 2 °C/min y 3 °C/min, respectivamente.

6.2 Características conformacionales de quimopapaína a pH bajo.

Ya que a pH muy bajo es posible que la proteína ya haya perdido parte de su estructura secundaria, fue necesario investigar si se presentan cambios conformacionales considerables en la proteína a pH 1.5. A 20°C la quimopapaína tiene suficiente estabilidad para permitir la caracterización espectral de la proteína plegada, por lo que se obtuvo el espectro de dicroísmo circular (DC) de la proteína a 20°C y pH 7 (Figura 4a), ya que a este pH se sabe que la proteína permanece nativa [45], para posteriormente compararlo con el espectro obtenido también a 20°C pero a pH 1.5 (Figura 4a) (a este pH la desnaturalización de la proteína toma varias horas). Cada espectro fue corregido restándole la señal del amortiguador. En dichos espectros se observa que la proteína sí presenta algunos cambios en su estructura secundaria a pH 1.5; sin embargo, por medio de un análisis del contenido de estructura secundaria realizado con el método K2d [55] se observó que esos cambios

estructurales son relativamente pequeños ya que sólo aproximadamente 5.0% de la hélice se transforma en estructura β a dicho pH

También se obtuvieron espectros de fluorescencia intrínseca a los valores de pH ya mencionados, en los cuales se observó que el pH más bajo (1.5) conduce a un apagamiento significativo de la fluorescencia intrínseca de la proteína (Figura 4b); sin embargo, en la emisión máxima no se observó del todo un corrimiento al rojo. Similarmente, el espectro de emisión de la mezcla ANS–quimopapaína (Figura 5) no puntualizó la presencia de “parches” hidrofóbicos expuestos al solvente [56] cuando el pH disminuyó, ya que la intensidad de fluorescencia es mucho menor a este pH. En conclusión, todas las evidencias espectroscópicas sugieren que la molécula de quimopapaína retiene gran parte de su estructura nativa en solución a pH 1.5; por lo anterior se puede decir que en los estudios realizados no se encontraron estructuras desplegadas parcialmente o transformaciones a un estado de glóbulo fundido.

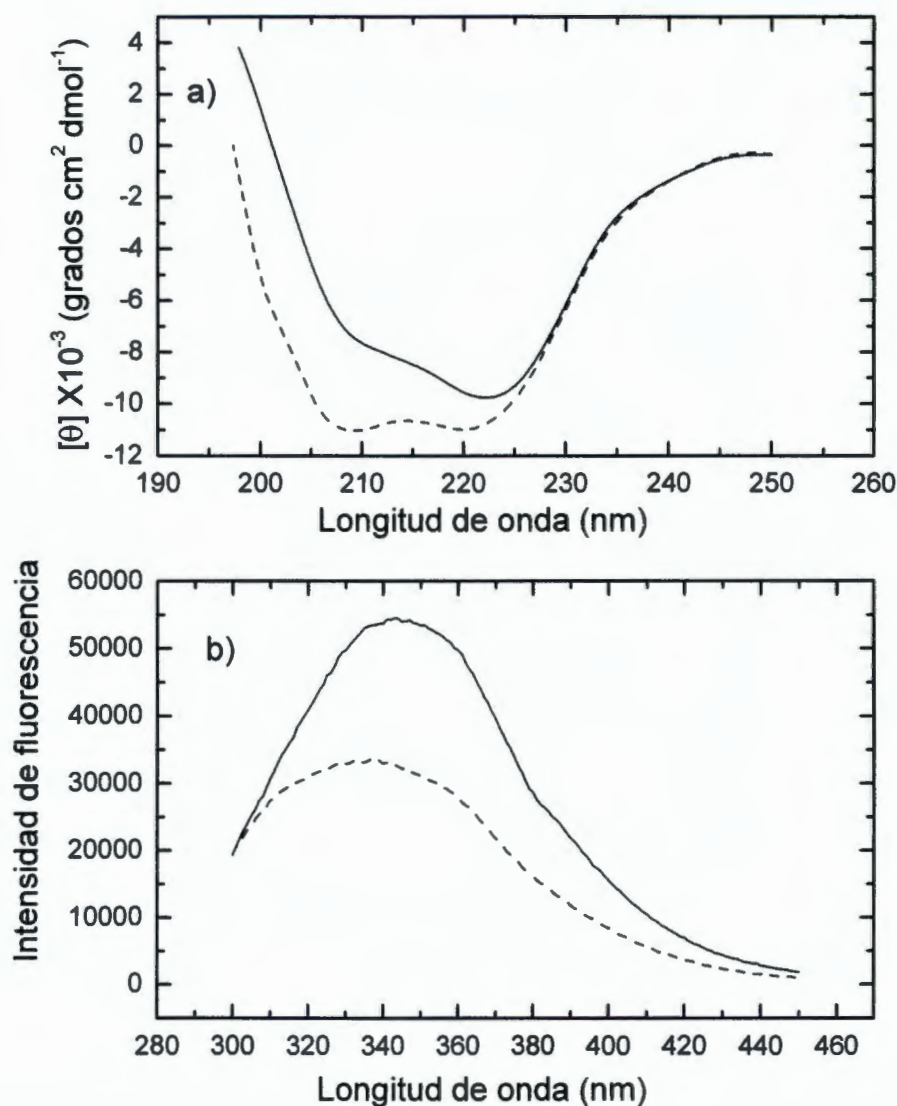


Figura 4. Características espectroscópicas de quimopapaína a pH ácido y neutro. Espectros de (a) DC en la región del UV lejano y (b) fluorescencia intrínseca a pH 1.5 (---) y pH 7.0 (—). Los espectros fueron obtenidos a 20°C. Para DC se utilizaron soluciones de quimopapaína a una concentración de 0.2 mg mL⁻¹ y una celda de 0.10 cm de recorrido óptico, los espectros fueron corregidos restándoles la señal del amortiguador. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron a una concentración de enzima de 0.04 mg mL⁻¹ en una celda de 1.00 cm de recorrido óptico, la intensidad de fluorescencia (IF) fue corregida restándole la IF del amortiguador.

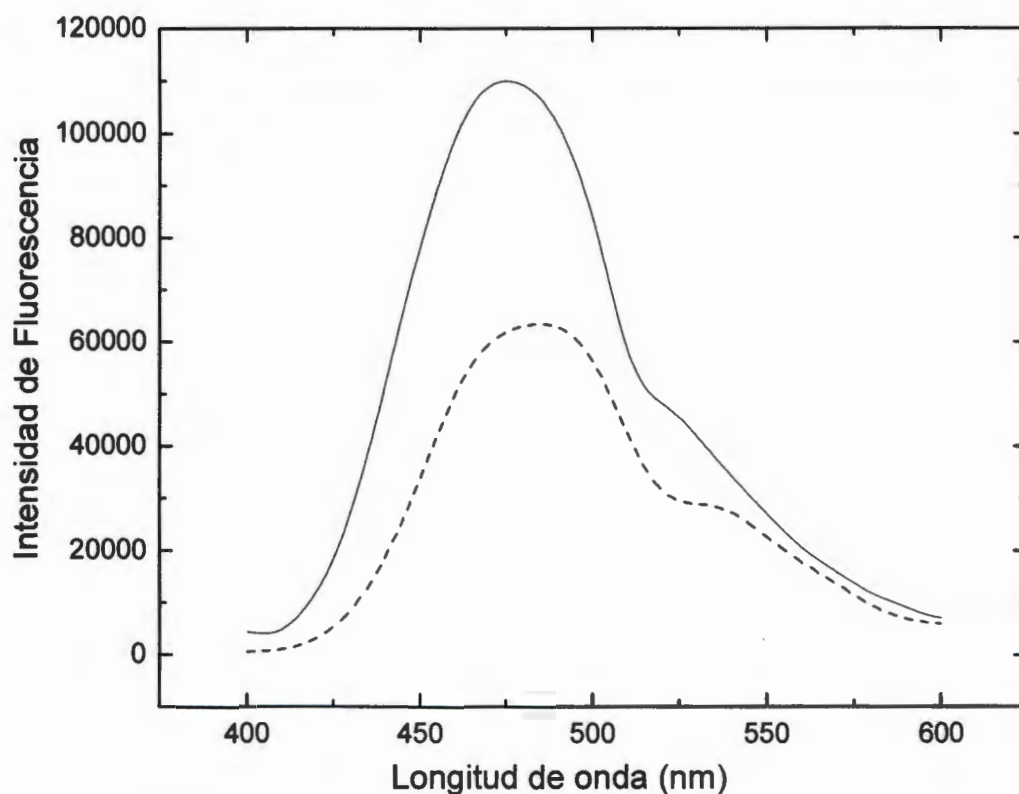


Figura 5. Espectros de emisión de fluorescencia de la mezcla ANS–quimopapaína a pH 1.5 (---) y pH 7.0 (—). Se utilizó una celda de 1.00 cm de recorrido óptico y los espectros fueron obtenidos a una concentración de la enzima de 0.04 mg mL^{-1} con una relación quimopapaína: ANS de 1:100, la intensidad de fluorescencia (IF) fue corregida restándole la IF de la mezcla del amortiguador y el ANS.

6.3 Cinéticas de desplegamiento.

El proceso de desplegamiento de la quimopapaína se observó en presencia y ausencia de GdnCl, LiCl, Na₂SO₄ y urea, manteniendo constantes el pH (1.5) y la temperatura (44°C). La Figura 6 muestra trazos cinéticos del desplegamiento de quimopapaína en regulador de glicina a pH 1.5; también se muestran los trazos en presencia de diferentes concentraciones de GdnCl. El cambio en la elipticidad se siguió a 227 nm. Se observó que a altas concentraciones de GdnCl la pérdida de la señal de elipticidad es muy rápida, lo que implica que esta sal acelera el proceso de desplegamiento de la proteína. Todas las cinéticas de desplegamiento de quimopapaína fueron analizadas tanto con una ecuación de decaimiento exponencial simple (ec. 4) como con una de decaimiento exponencial doble (ec. 6), obteniéndose un mejor ajuste con el análisis realizado con la segunda ecuación. De este análisis se obtuvieron las constantes de velocidad k_1 y k_2 del proceso de desplegamiento de la proteína, cuyos valores se incrementaron con la concentración de desnaturalizante (Tabla A3, Apéndice II).

Aunque el cambio total observado en la elipticidad fue casi independiente de la concentración de GdnCl, la fracción $(\theta_N - \theta_I)/(\theta_N - \theta_U)$ aumentó al aumentar la concentración de desnaturalizante, (inserto en la Figura 6). Simultáneamente al progreso de la desnaturalización de quimopapaína seguida por los cambios en la elipticidad a 227 nm, se registró el voltaje aplicado al fototubo, el cual es proporcional a la absorbancia de la muestra, observándose que cuando el desnaturalizante esta presente a 0.10 M o concentraciones más altas, los cambios en la elipticidad son acompañados sólo por pequeñas variaciones en la absorbancia de la solución de proteína (5.0% o menos). Dichos cambios se sabe que ocurren debido a alteraciones en la estructura secundaria, y en menor grado a la estructura terciaria, de proteínas y polipéptidos [57]. Sin embargo, a 0.05 M que fue la concentración más baja que se probó se encontró un aumento del 20.0% en la absorbancia asociado a la fase cinética más lenta detectada en DC; este aumento en la absorbancia fue aún más grande en ausencia de desnaturalizante. Probablemente este fenómeno tiene su origen en la dispersión de luz por agregación de moléculas de proteína desplegadas.

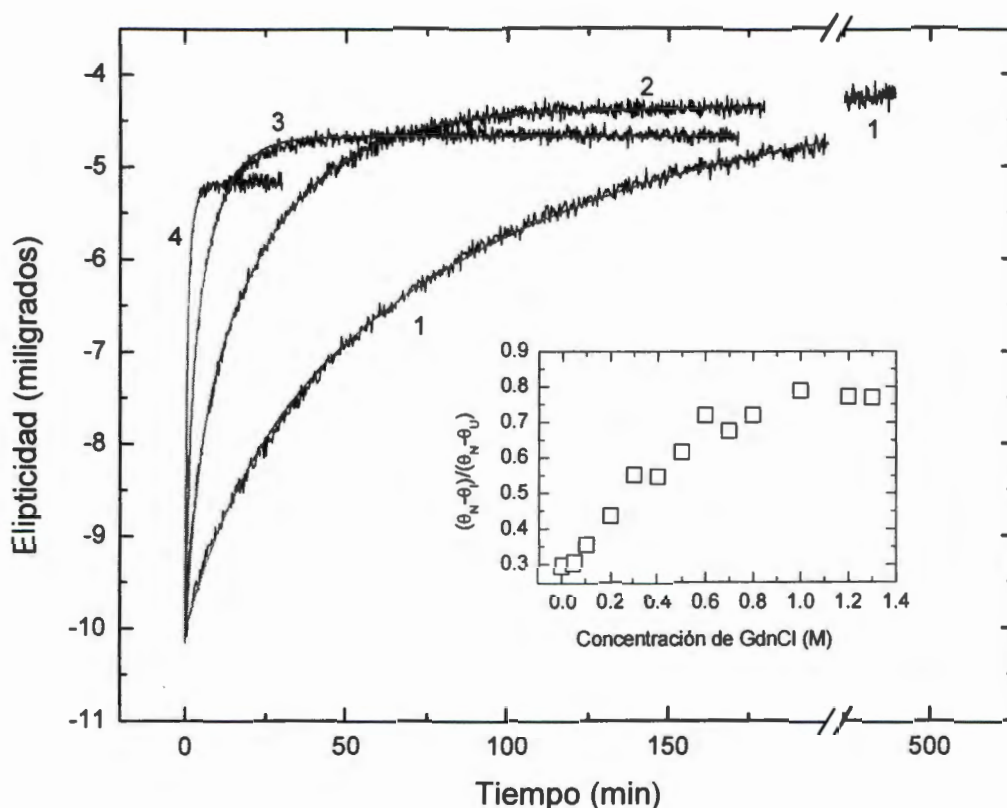


Figura 6. Curvas de la cinética de desplegamiento de quimopapaína en presencia de diferentes concentraciones de GdnCl: 0 (curva 1), 0.10 (curva 2), 0.40 (curva 3) y 1.30 M (curva 4). Las soluciones se prepararon en regulador de glicina 0.05 M, pH 1.5. Todos los experimentos se registraron a 44°C, empleando solución de proteína de 0.02 mg mL⁻¹ en celda de 1.00 cm de recorrido óptico. Los cambios de elipticidad se siguieron a 227 nm. Las líneas continuas representan el ajuste a una ecuación de decaimiento exponencial doble (ec 6). En el inserto se muestra la variación de la fracción $(\theta_N - \theta_I)/(\theta_N - \theta_U)$ de las curvas de desplegamiento de GdnCl con su concentración.

En estudios realizados sobre el desplegamiento de papaína inducido por temperatura y GdnCl a pH < 2.6 se han encontrado curvas de transición bifásicas [58]. El estado intermediario entre la forma nativa (N) y la desplegada (U) de la proteína parece estar

formado principalmente por hojas β . Por tanto, se ha propuesto que el dominio N-terminal de la molécula es menos estable que el dominio C-terminal. De acuerdo a esto, sería razonable asociar la conducta cinética bifásica del desplegamiento de quimopapaína a una estabilidad diferente de sus dos dominios. El modelo más simple que explique las cinéticas bifásicas sería aquel en el cual dos unidades plegadas cooperativamente, correspondientes a cada dominio estructural, se despliegan independientemente una de la otra; en este caso, las amplitudes A_1 y A_2 reflejarían la pérdida de estructura secundaria en cada dominio, y su relación A_1/A_2 o la fracción $(\theta_N - \theta_I)/(\theta_N - \theta_U)$ se esperaría que variara poco con la concentración de desnaturalizante, lo cual contrasta con los resultados mostrados en el inserto de la Figura 6. Una alternativa para explicar los resultados obtenidos es el modelo cinético de dos reacciones consecutivas con un intermediario, I:



Las ecuaciones 7 y 8 son usadas para calcular $\theta_N - \theta_I$ y $\theta_I - \theta_U$. El valor de $\theta_N - \theta_I$ expresado como una fracción del cambio total $((\theta_N - \theta_I)/(\theta_N - \theta_U))$, se incrementa monotónicamente de aproximadamente 0.34 en ausencia de GdnCl a 0.70-0.77 a las concentraciones más altas. De acuerdo a estos resultados la especie intermediaria que aparece en la desnaturalización de quimopapaína estaría más desplegada cuando la concentración de GdnCl se incrementa.

En los estudios cinéticos realizados cuando el agente desnaturalizante fue urea (un compuesto no iónico), también se presentaron curvas cinéticas de desplegamiento bifásicas (Figura 7). Detectándose que al igual que con GdnCl el proceso de desplegamiento de la proteína se ve acelerado por este compuesto. Tanto la urea como el GdnCl actúan como desestabilizantes. Como en el caso de GdnCl el valor relativo de A_1 se incrementa con la concentración de desnaturalizante; la fracción de los cambios de elipticidad $((\theta_N - \theta_I)/(\theta_N - \theta_U))$, alcanza un valor de 0.60 en urea 2.0 M.

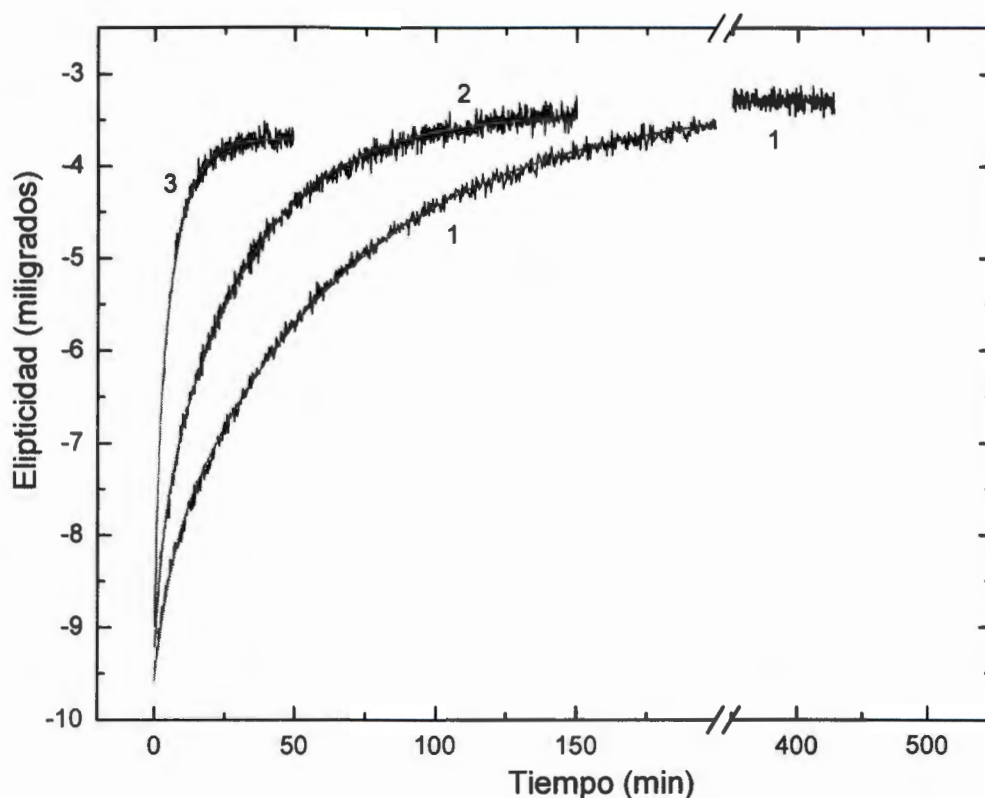


Figura 7. Curvas de la cinética de desplegamiento de quimopapaína en presencia de diferentes concentraciones de urea: 0.10 (curva 1), 0.50 (curva 2) y 1.40 M (curva 3). Las condiciones experimentales fueron las mismas que se emplearon en la figura anterior. Las líneas continuas representan el ajuste a una ecuación de decaimiento exponencial doble (ec. 6).

El desplegamiento de quimopapaína en presencia de LiCl o Na₂SO₄ difiere en algunos aspectos de los resultados obtenidos con GdnCl y urea, ya que a 0.05 M de LiCl la cinética permaneció bifásica pero a 0.10 M y concentraciones más altas se observó una tercera fase más lenta (Figura 8a). A 0.05 M de electrolito la amplitud de la tercera fase (A_3) fue la más pequeña. En esta fase se tiene gran dispersión de luz. En 1.00 M de LiCl se presentó un gran decremento en la absorbancia, junto con la formación de grandes agregados de proteínas que fueron visibles a simple vista. Esas observaciones sugieren que

el decremento en la elipticidad durante la tercera fase se debe a una reducción en el número de moléculas de proteína dentro de la celda que están interactuando con el rayo de luz del espectropolarímetro. Un apoyo para esta idea viene de estudios donde el cosoluto adicionado fue Na_2SO_4 , el cual es un buen precipitante de proteínas; en estos experimentos se observó disminución de la absorbancia aparente y también la formación de grandes agregados a concentraciones tan bajas como 0.30 M; al mismo tiempo la elipticidad se aproximó lentamente al valor de referencia del regulador más la sal (0.81-0.98 miligrados) (Figura 8b). Los valores de $(\theta_N - \theta_I)/(\theta_N - \theta_U)$ variaron sólo ligeramente con la cantidad de cualquiera de las dos sales adicionadas: de 0.34 en ausencia de sal a 0.46 en 0.80 M de LiCl , y cercana a 0.40 en 0.50 M de Na_2SO_4 .

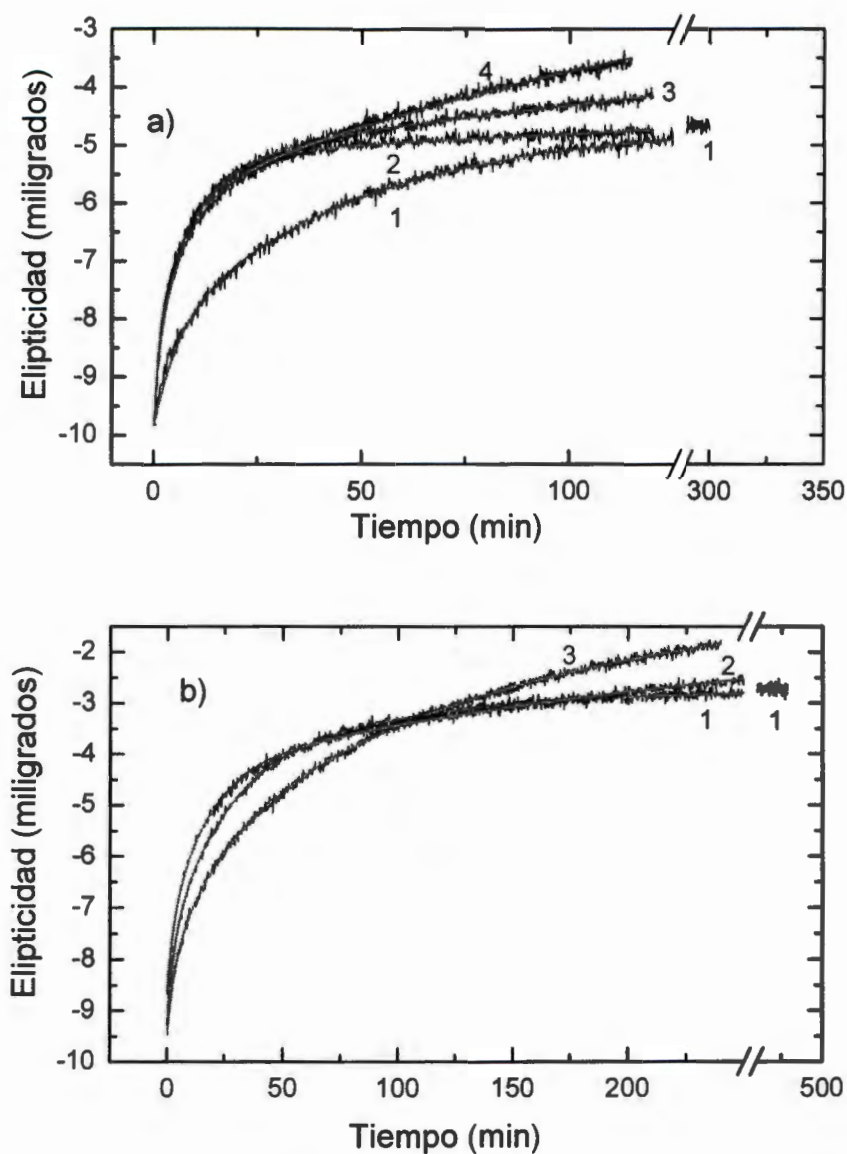


Figura 8. Curvas de la cinética de desplegamiento de quimopapaína en presencia de (a) LiCl y (b) Na₂SO₄. En (a) las curvas del 1 al 4 corresponden a 0.05, 0.50, 0.70 y 0.80 M de LiCl, respectivamente. En (b) las curvas del 1 al 3 corresponden a 0.02, 0.15 y 0.40 M de Na₂SO₄, respectivamente. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se usaron anteriormente. Los datos experimentales se ajustaron ya sea a una ecuación de decaimiento exponencial bifásica (ec. 6) o trifásica (ec. 10) (líneas continuas).

6.4 Efectos del cosoluto sobre la constante de velocidad de desplegamiento.

A partir de los ajustes realizados a los datos cinéticos de desplegamiento de quimopapaína se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad k_1 y k_2 del proceso de desplegamiento de quimopapaína en presencia de LiCl, Na₂SO₄, GdnCl y urea, los cuales se muestran en las Tablas A1, A2, A3 y A4, respectivamente (Apéndice II).

En la Figura 9 se ilustra la conducta de las constantes de velocidad k_1 y k_2 como función de la fuerza iónica (I) de la solución. Se observa la presencia de dos zonas. En la primera zona (I baja) se tiene que independientemente del tipo de sal el comportamiento es similar ya que preferentemente hay una tendencia ascendente de la constante de velocidad con la fuerza iónica de la solución, lo cual puede atribuirse a un “apantallamiento electrostático” general debido a la atmósfera iónica alrededor de la macromolécula. Pero para valores mayores que 0.40-0.45 M existe un comportamiento que depende de la naturaleza de cada electrolito, sugiriendo que se presentan efectos particulares de tipo Hofmeister. En el caso de GdnCl, ambas constantes de velocidad se incrementan marcadamente, comportándose el ion guanidinio (Gdn^+) como un desestabilizante de la estructura nativa en comparación con el estado de transición. Por otro lado, el LiCl se comporta como un desestabilizante “suave” de la estructura nativa incrementando apenas ligeramente ambas constantes de velocidad, lo que es razonable según la serie de Hofmeister, ya que los iones Li^+ y Cl^- son colocados a la mitad de la serie y se consideran preferentemente como iones neutros; en contraste, según la serie de Hofmeister el ion sulfato presenta un poder estabilizante estructural [59] lo que explica la observación de que el Na₂SO₄ desacelera las reacciones comportándose como un agente que estabiliza la estructura nativa en comparación con el estado de transición.

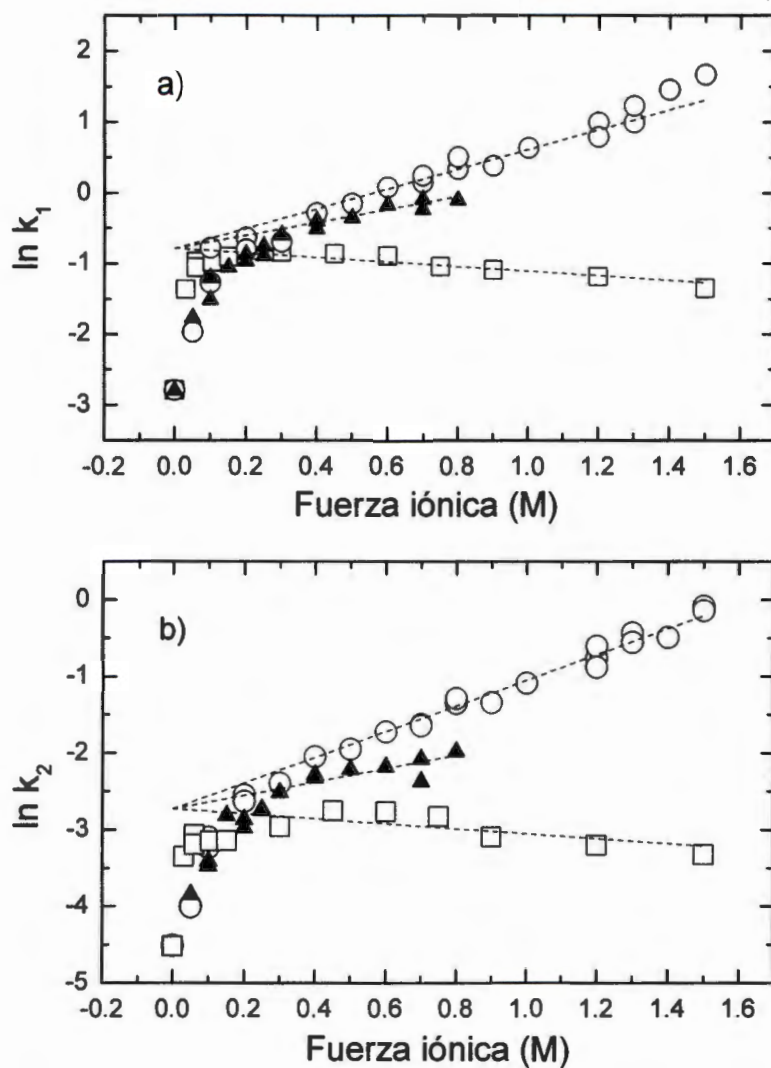


Figura 9. Variación de las constantes de velocidad de la primera (k_1) y segunda (k_2) fase de la cinética de desplegamiento de quimopapaína con la fuerza iónica. Los valores de k_1 , panel (a), y k_2 panel (b) se determinaron de experimentos realizados con GdnCl (○), LiCl (▲) o Na₂SO₄ (□). Las líneas punteadas representan ajustes lineales con valores que corresponden a fuerzas iónicas de 0.40 M y mayores (ver ec. 13).

En los resultados obtenidos con urea, un compuesto polar no iónico, se encontró un apoyo para la idea de una contribución de “apantallamiento electrostático”. Como se puede ver en la Figura 10, la gráfica de $\ln k_1$ contra la concentración de urea muestra una curvatura menor que las observadas en la primera región de la Figura 9; aún más, la gráfica de $\ln k_2$ no muestra una curvatura aparente lo que implica que no se presenta un “apantallamiento electrostático” importante, lo cual era de esperarse ya que la urea es un compuesto no iónico. Además con este cosoluto también se observaron efectos de Hofmeister, ya que la urea al igual que GdnCl se comporta como desnaturalizante.

Los datos para $\ln k_1$ o $\ln k_2$ correspondientes a valores altos de I ($I \geq 0.4$), fueron usados para ajustar un conjunto de tres ecuaciones lineales con un intercepto común a $I = 0$, ya que en este punto no hay efecto de las sales (las rectas para los diferentes electrolitos debían tocar el mayor número de puntos de la Figura 9, teniendo las rectas un intercepto común en $I = 0$) de acuerdo a la ec. 13, la cual representa la ecuación de una recta:

$$\ln k = [(\ln E - \Delta G_0^\ddagger/RT) - \Delta G_{\text{elec}}^\ddagger/RT] + [-(m_i^\ddagger/RT)] I_i \quad (13)$$

$$y = \quad \quad \quad b \quad \quad \quad + \quad \quad \quad m \quad \quad x$$

Donde “b” es la ordenada al origen

“m” es la pendiente

Del mejor ajuste (líneas punteadas en la Figura 9) se determinaron valores de $m_i^\ddagger$ (pendientes de las líneas punteadas en la Figura 9) para cada electrolito (Tabla 2), los cuales son usados en la ec. 13 para calcular $\Delta G_{\text{elec}}^\ddagger$:

$$-\Delta G_{\text{elec}}^\ddagger/RT = \ln k - (\ln E - \Delta G_0^\ddagger/RT) + (m_i^\ddagger/RT) I_i$$

Como ya se mencionó en la sección de análisis de datos $(\ln E - \Delta G_0^\ddagger/RT)$ es el valor de $\ln k$ en ausencia de electrolitos

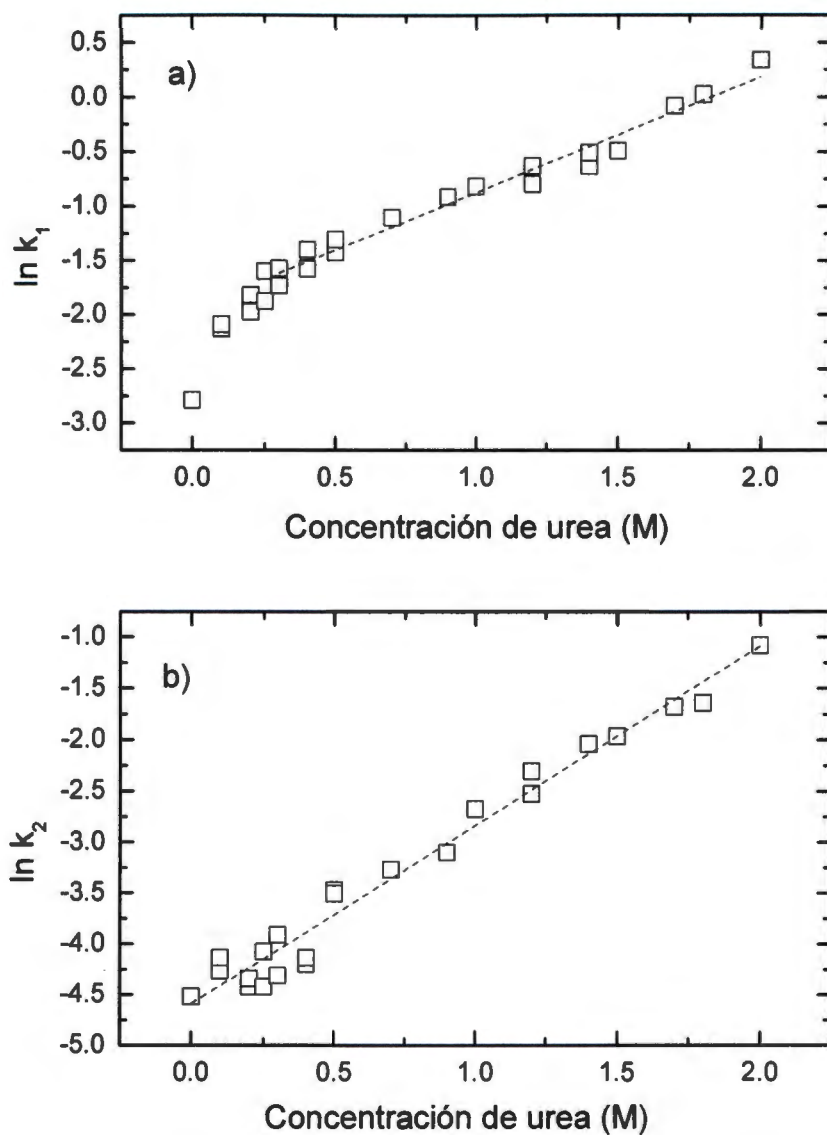


Figura 10. Variación de las constantes de velocidad para la primera (a) y segunda (b) fases cinéticas del desplegamiento de quimopapaína con la concentración de urea. Los datos se obtuvieron de experimentos realizados con las mismas condiciones de la Figura 6. Las líneas punteadas representan ajustes lineales.

Como se ve en la Figura 11, el valor de $\Delta G_{\text{elec}}^{\ddagger}$ así obtenido fue similar para los tres electrolitos; de este modo, se apoya la idea de una contribución de “apantallamiento electrostático” no-específico a la energía libre de activación. Con relación al efecto de urea sobre las velocidades de desplegamiento, debe mencionarse que para este cosoluto los valores de $m^{\ddagger}$ fueron similares a aquellas observadas con GdnCl (ver la Tabla 2). Aunque es usual pensar que el último es mucho más fuerte como desnaturizante de proteínas, se ha demostrado que su fuerza relativa desnaturizante depende del estado de carga de la macromolécula [60, 61]. Por ejemplo, en el desplegamiento de polipéptidos análogos a “coiled-coil”, Monera y col. [60] encontraron que la relación de m_{GdnCl} a m_{urea} varía de 2.5, cuando las interacciones electrostáticas estabilizan el estado nativo del polipéptido, a 1.2 cuando aquellas interacciones son repulsivas y desestabilizantes. En quimopapaína cuyo punto isoeléctrico es mayor que 10, las repulsiones electrostáticas deberían ser realmente muy importantes a pH 1.5. Además, es probable que interacción de iones Gdn^+ a grupos en la superficie macromolecular pueda ser impedida en parte por la alta densidad de carga positiva a pH bajo, reduciendo así la fuerza desnaturizante de GdnCl.

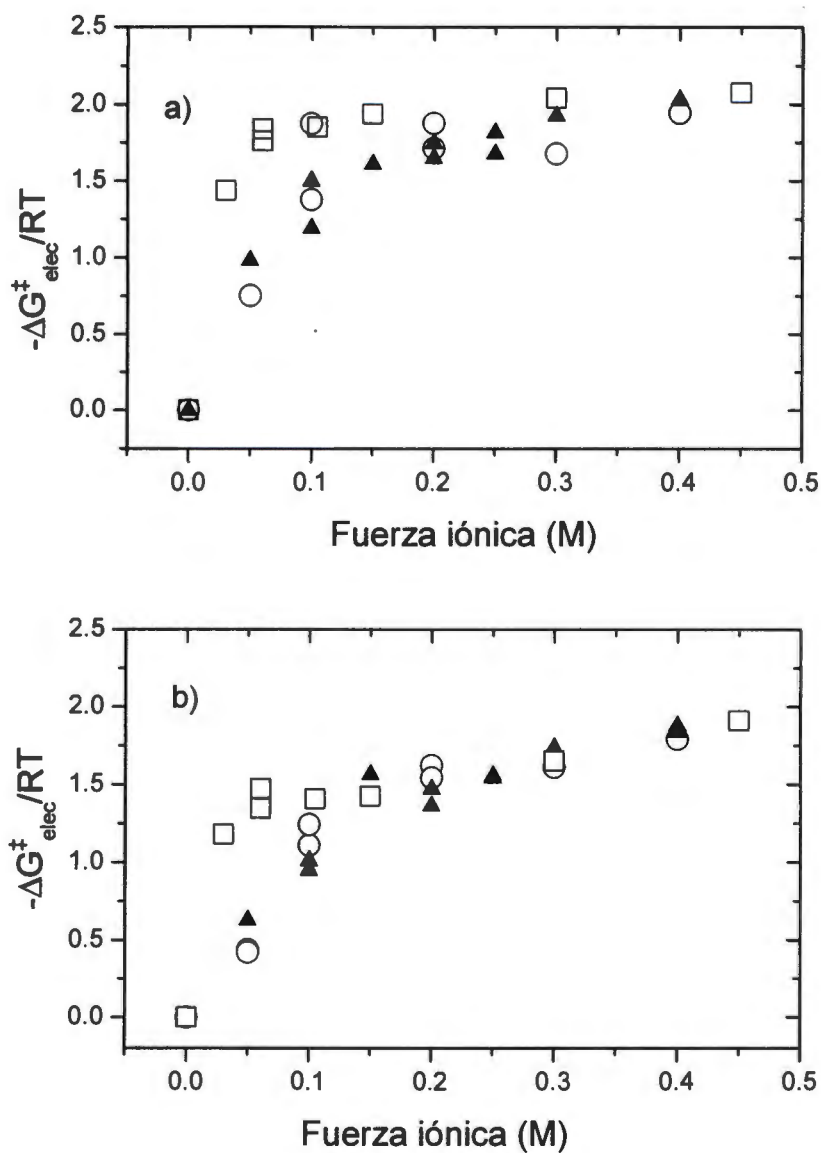


Figura 11. Contribución del “apantallamiento electrostático” a la energía libre de activación ($\Delta G_{\text{elec}}^{\ddagger}$) para el desplegamiento de quimopapaína (ver ec. 13) en presencia de GdnCl (○), LiCl (▲) o Na₂SO₄ (□). El $\Delta G_{\text{elec}}^{\ddagger}$ para (a) la primera y (b) la segunda fase cinética del desplegamiento fueron obtenidos como se indica en el texto.

6.5 Determinación de las constantes que representan la contribución de la sal a la exposición de áreas polar y no polar ($K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$).

El trabajo realizado en esta tesis permite la aplicación de datos de K_s para compuestos derivados de aminoácidos a estudios de proteínas. Para lograr esto se generaron computacionalmente las moléculas con sustituyentes N-acetil y etil ester en los extremos de gly, gly-gly, gly-gly-gly, ala, val, leu, phe, β -ala, nor-val y nor-leu. Se calcularon sus áreas polar y no polar accesibles al solvente (como ya se explicó en el capítulo 5, sección 5.3); los valores obtenidos se muestran en la Tabla A5, Apéndice II. Contando con esta información, se analizaron los datos reportados de K_s para aminoácidos bloqueados [5, 6] en términos de su área superficial polar (A_{pol}) y no polar (A_{npol}) accesible al solvente, esto es, se utilizó el modelo propuesto anteriormente (ec. 12) para calcular el efecto “salting-out” o “salting-in”, de una sal dada. Usando dicha ecuación y valores reportados de K_s [5, 6] a 25°C que caracterizan el efecto de cinco diferentes sales (Na_2SO_4 , NaCl, LiCl, NaClO_4 y NaSCN) sobre la solubilidad de las moléculas creadas, se obtuvieron $K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$ para cada sal. Cabe mencionar que los cálculos también se realizaron con los datos de K_s a 40°C [5, 6], pero en este caso el conjunto de datos se restringió a sólo seis compuestos modelo. Los valores de $K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$ a ambas temperaturas se muestran en la Tabla 1.

Los valores calculados de K_s para cada sal a 25°C fueron usados para comprobar la exactitud del modelo propuesto (ec. 12). La Figura 12 muestra la gráfica de K_s (calculada) contra K_s (experimental) observándose una pendiente de 0.99 ± 0.01 y un coeficiente de correlación de 0.99. Aunque se cuenta con datos reportados de K_s para aminoácidos bloqueados a 25°C, los estudios cinéticos no se realizaron a esta temperatura, ya que a estas condiciones la proteína es muy estable, por eso fue necesario realizarlos a temperatura cercana a 40°C.

$K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$ también pueden ser obtenidas usando la ec.12a. En la Figura 13 se muestra la gráfica de K_s/A_{pol} contra A_{npol}/A_{pol} para Na_2SO_4 a 40°C obteniéndose $K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$ de la ordenada al origen y la pendiente, respectivamente. Cabe mencionar que los valores obtenidos de esta manera difieren aproximadamente en un 1% de los obtenidos con el modelo propuesto (ec. 12).

Tabla 1. Componente polar ($K_{s, \text{pol}}$) y no polar ($K_{s, \text{npol}}$) de la constante “salting-out” (K_s) para diferentes sales^a.

	$K_{s, \text{pol}} (\text{M}^{-1} \text{\AA}^{-2})$		$K_{s, \text{npol}} (\text{M}^{-1} \text{\AA}^{-2})$	
	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C
Na ₂ SO ₄	-0.0023 (±0.0004)	-0.0023 (±0.0003)	0.0028 (±0.0001)	0.0027 (±0.0001)
LiCl	-0.0015 (±0.0001)	-0.0012 (±0.0001)	0.00081 (±0.00002)	0.00076 (±0.00004)
NaCl	-0.0015 (±0.0002)	-0.0016 (±0.0001)	0.0010 (±0.00005)	0.0010 (±0.00004)
NaSCN	-0.00187 (±0.0002)	-0.0013 (±0.0002)	0.00033 (±0.00006)	0.00018 (±0.00007)
NaClO ₄	-0.0025 (±0.0002)	-0.0018 (±0.0002)	0.00055 (±0.00005)	0.00034 (±0.00006)

^a $K_{s, \text{pol}}$ y $K_{s, \text{npol}}$ fueron calculadas del ajuste con la ec. 12 empleando datos de solubilidad reportados en las referencias 5 y 6.

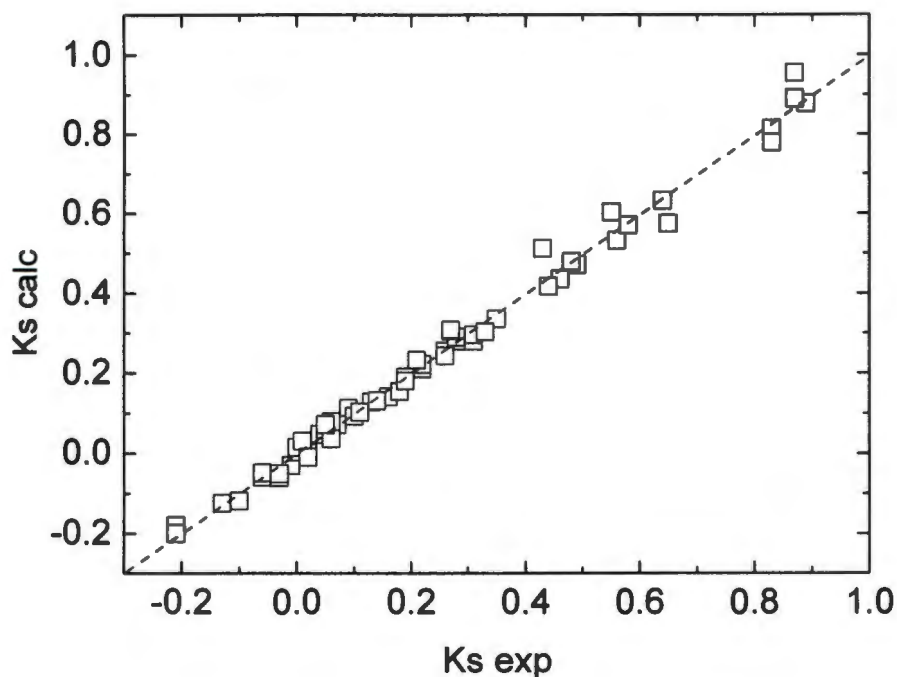


Figura 12. Correlación entre la constante salting-out calculada (K_s , calc) y experimental (K_s , exp) para compuestos modelo. Los valores de K_s , exp (a 25°C) se reportan en las referencias 5 y 6 y se resumen los efectos de seis diferentes sales sobre la solubilidad de varios derivados de aminoácidos (ver el texto para detalles). Por medio de la ec. 12 y el área superficial polar (A_{pol}) y no polar (A_{npol}) de compuestos modelo se obtuvieron $K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$ (Tabla 1) los cuales, a su vez, se usaron para obtener K_s , calc.

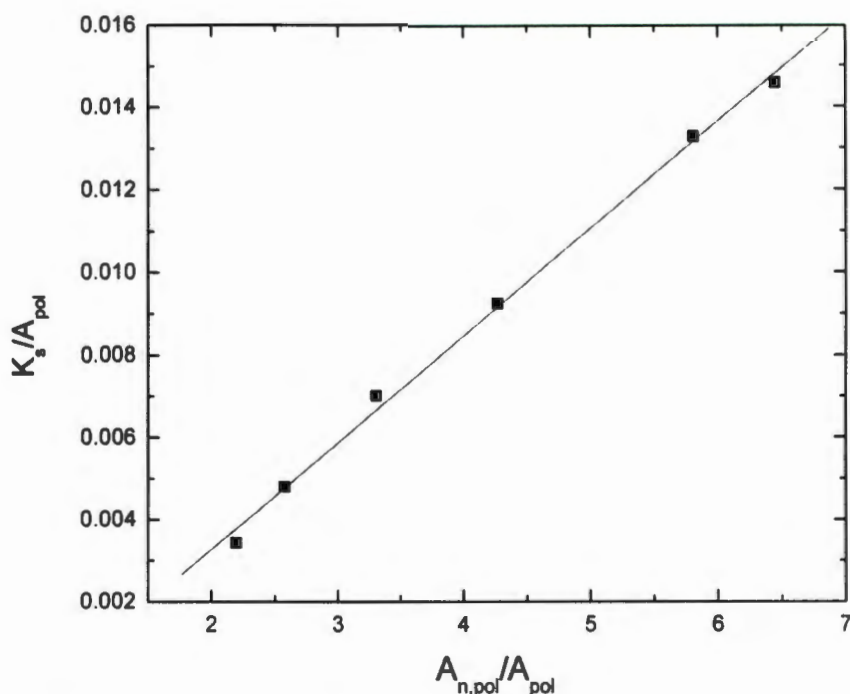


Figura 13. Usando la ec. 12a también es posible obtener $K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$. Gráfica de K_s/A_{pol} contra $A_{n,pol}/A_{pol}$ para Na_2SO_4 a $40^\circ C$. $K_{s, pol}$ y $K_{s, npol}$ se obtienen de la ordenada al origen y la pendiente, respectivamente.

6.6 Estimación de los cambios en el área superficial durante la activación.

Los valores de $m_i^\ddagger$ correspondientes a $LiCl$ y Na_2SO_4 (Tabla 2) se usaron para estimar la cantidad de área superficial polar (ΔASA_{pol}) y no polar (ΔASA_{npol}) expuesta al solvente cuando el estado de transición (ET) se forma. Esto se realizó empleando la ec. 15 con la cual se formularon dos ecuaciones lineales cuya solución da los valores de ΔASA mostrados en la Tabla 2.

$$m^\ddagger (LiCl) = \beta_{pol} (LiCl) \Delta ASA_{pol} + \beta_{npol} (LiCl) \Delta ASA_{npol}$$

$$m^\ddagger (Na_2SO_4) = \beta_{pol} (Na_2SO_4) \Delta ASA_{pol} + \beta_{npol} (Na_2SO_4) \Delta ASA_{npol}$$

donde β_{pol} y β_{npol} para cada sal se obtienen de los valores de $K_{s, \text{pol}}$ y $K_{s, \text{npol}}$ de la Tabla 1 y de las ecuaciones 11 y 12, observándose que:

$$\beta_{\text{pol}} = -K_{s, \text{pol}} (2.303RT)$$

$$\beta_{\text{npol}} = -K_{s, \text{npol}} (2.303RT)$$

Los resultados indican una exposición de cantidades similares de área polar y no polar en la formación de ET. El ΔASA total para cada paso sería sólo alrededor de 8.0% del área total teórica expuesta durante el desplegamiento de toda la molécula de quimopapaína ($23,660 \text{ \AA}^2$, el cual se calculó con el programa NACCESS). Estos resultados están de acuerdo con la noción de un estado de transición relativamente compacto para el desplegamiento, lo cual ha sido propuesto por varios autores [62].

El ΔASA total para experimentos en GdnCl se calculó usando la ec. 16, encontrándose cambios mayores del área superficial en la formación del estado de transición para ambos pasos cinéticos, es decir del 13 al 16% del área total expuesta por el desplegamiento (Tabla 2).

No obstante, debemos recordar que los resultados obtenidos con LiCl y Na_2SO_4 no son directamente comparables con los de GdnCl porque un conjunto de resultados se obtuvo usando datos de compuestos pequeños, mientras que el otro depende de estudios de desplegamiento de proteínas. Además, las propiedades del estado de transición pueden variar dependiendo de las perturbaciones del medio ambiente que afectan la estabilidad de la proteína [62].

Tabla 2. Valores estimados de $m^\ddagger/RT$, $\Delta ASA^\ddagger_{pol}$, $\Delta ASA^\ddagger_{npol}$, y $\Delta ASA^\ddagger_{tot}$ en presencia de diferentes cosolutos^a.

Cosoluto	Primera etapa (k_1)				Segunda etapa (k_2)			
	$m^\ddagger/RT$ (M^{-1})	$\Delta ASA^\ddagger_{pol}$ ($\text{\AA}^2$)	$\Delta ASA^\ddagger_{npol}$ ($\text{\AA}^2$)	$\Delta ASA^\ddagger_{tot}$ ($\text{\AA}^2$)	$m^\ddagger/RT$ (M^{-1})	$\Delta ASA^\ddagger_{pol}$ ($\text{\AA}^2$)	$\Delta ASA^\ddagger_{npol}$ ($\text{\AA}^2$)	$\Delta ASA^\ddagger_{tot}$ ($\text{\AA}^2$)
LiCl	-0.91 (0.09)	927	944	1871	-0.87 (0.11)	896	918	1814
Na ₂ SO ₄	0.96 (0.14)	927	944	1871	0.96 (0.14)	896	918	1814
GdnCl	-1.40 (0.10)			3160	-1.68 (0.06)			3790
Urea	-1.06 (0.05)			4778	-1.75 (0.06)			7889

^a Los valores de $m^\ddagger/RT$ se obtuvieron de la pendiente de las líneas de las Figuras 9 y 10; entre paréntesis se indican las desviaciones estándar. Los $\Delta ASA^\ddagger$ s determinados de experimentos en presencia de LiCl y Na₂SO₄ fueron calculados de las ecuaciones 11, 12 y 14, y los datos de la Tabla 1 (ver texto para detalles). El $\Delta ASA^\ddagger_{tot}$ de experimentos en GdnCl se obtuvo de la relación $m = 0.28 \Delta ASA$. Aunque se muestra el valor de $\Delta ASA^\ddagger_{tot}$ de experimentos en urea, dicho valor no es comparable con los valores obtenidos para GdnCl, Na₂SO₄ y LiCl, por las razones que ya se mencionaron en el capítulo 5, sección 5.4.

6.7 Apantallamiento electrostático.

En la Figura 11 se observa que a fuerza iónica baja todos los electrolitos disminuyen la energía libre de activación; esto quiere decir que los iones en solución estabilizan el estado de transición con respecto al estado nativo. En general, la atmósfera iónica incrementa o disminuye el potencial químico de un macroion dependiendo de si las interacciones electrostáticas netas en el macroion son atractivas o repulsivas [35]. En una molécula de proteína este efecto se espera que sea mayor para el estado más compacto (es decir, el estado nativo) porque las cadenas laterales cargadas estarán a sus distancias más cortas; para un estado expandido, tal como el estado de transición, el efecto será menor.

Debido a la alta densidad de carga positiva de las moléculas de quimopapaína a pH bajo, la fuerza iónica estabilizaría preferentemente el estado nativo sobre el estado de transición, reduciendo la velocidad de reacción. Esto nos lleva entonces a que deben existir ciertas interacciones electrostáticas atractivas (es decir, pares iónicos) cuya desestabilización debido a la atmósfera iónica pesa más que la contraparte repulsiva.

Un análisis de la estructura tridimensional de quimopapaína (PDB [63] código 1 YAL) revela que 11 de sus 14 cadenas laterales ácidas están colocadas a menos de 5 Å de uno o más grupos cargados positivamente. Se forman pares iónicos muy cortos con E35, E50, E52, D55, D57, E118, y E187; todos estos grupos se localizan cerca de la superficie molecular pero con poca o ninguna exposición al solvente. Probablemente algunos de estos grupos ácidos permanecen desprotonados a pH 1.5 y pueden formar pares iónicos que son críticos para la estabilidad de la molécula nativa [64].

CAPÍTULO 7

Conclusión

7. Conclusión

En este trabajo se estudió el efecto de tres electrolitos (LiCl , Na_2SO_4 y GdnCl) y un cosoluto polar (urea) sobre el proceso de desplegamiento de quimopapaína. Se observaron dos efectos de la concentración de electrolitos sobre los procesos de desplegamiento: 1) a baja fuerza iónica se observa que hay un incremento en las velocidades de reacción independiente del tipo de ion presente, este efecto es atribuido a un “apantallamiento electrostático” general debido a la atmósfera iónica alrededor de la macromolécula, este efecto es casi imperceptible cuando el cosoluto es una molécula polar, pero sin carga, tal como la urea; 2) a valores altos de fuerza iónica, cada electrolito ejerce un efecto particular de tipo Hofmeister. Esto es, ambas constantes de velocidad fueron muy altas para el experimento con GdnCl (un conocido desnaturalizante de proteínas), pero sólo ligeramente por LiCl ; en contraste, el Na_2SO_4 (un buen precipitante) decrece el valor de ambas constantes de velocidad. Además fue posible analizar los efectos Hofmeister de los electrolitos estudiados y explicarlos en función de los cambios en las áreas superficiales polares y no polares que se exponen durante la formación del estado de transición en la desnaturalización de quimopapaína. De acuerdo a los resultados, el estado de transición expone cantidades similares de ambos tipos de superficies durante el cambio conformacional, lo cual indica la presencia de un estado de transición relativamente compacto en el desplegamiento efectuado por los diferentes electrolitos. Tal tipo de análisis podría también ser aplicado a otros procesos que involucran cambios conformacionales de proteínas.

REFERENCIAS

Referencias

1. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. y Cox, M. M. (1993) Principios de Bioquímica, segunda edición, Omega, Barcelona, España.
2. Ying-Chou Shih, J. M Prausnitz, and H. W Blanch, Some characteristics of protein precipitation by salts, *Biotechnol. and Bioengin.* 40 (1992) 1155-1164.
3. A. Moreno Cárcamo, (2005) Crecimiento de Cristales de Biomoléculas, Sociedad Mexicana de Cristalografía A. C. pp 24-40.
4. R. L. Baldwin, How Hofmeister ion interactions affect protein stability, *Biophys. J.* 71 (1996) 2056-2063.
5. P. K. Nandi, D. R. Robinson, The effects of salts on the free energy of the peptide group, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 1299-1308.
6. P. K. Nandi, D. R. Robinson, The effects of salts on the free energy of nonpolar groups, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 1308-1315.
7. W. Melander, C. Horvath, Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series, *Arch. Biochem. Biophys.* 183 (1977) 200-215
8. K. U. Linderström-Lang, On the ionization of proteins. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* 15 (1924) 1-29.
9. K. U. Linderström-Lang, Molecular weight by solubility measurements, *Arch. Biochem.* 11 (1946) 191-197

10. P. L. Privalov, Stability of proteins, small globular proteins, Adv. Protein Chem. 33 (1979) 167-241.
11. S. N. Timasheff, The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22 (1993) 67-97.
12. F. Hofmeister, Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 24 (1888) 247-260.
13. S. Lewith, Zur Lehre der Wirkung der Salze. Erste Mittheilung, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 24 (1888) 1-16.
14. C. Carbonnaux, M. Ries-Kautt, A. Ducruix, Relative effectiveness of various ions on the solubility of acidic *Hipoderma lineatum* collagenase at pH 7.2, Protein Sci. 4 (1995) 2123-2128.
15. M. Ries-Kautt, A. Ducruix, Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. J. Biol. Chem. 264 (1989) 745-748.
16. J. P. Guilloteau, M. Ries-Kautt, A. Ducruix, Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts. J. Crystal Growth 122 (1992) 223-230.
17. K. D. Collins and M. W. Washabaugh, The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces, Q. Rev. Biophys. 18 (1985) 323-422.
18. C. Nishimura, V. N. Uversky, A. L. Fink, Effects of salts on the stability and folding of staphylococcal nuclease, Biochemistry 40 (2001) 2113-2128.

19. D. P. Goldenberg, and T. E. Creighton, Energetics of protein structure and folding, *Biopolymers* 24 (1985) 167-182.
20. T. E. Creighton, Toward a better understanding of protein folding pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5082-5086.
21. A. R. Fersht, J. T. Kellis, A. Matouschek, and L. Serrano, Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering, *Nature* 334 (1990) 601-602.
22. O. Bilsel, C. R. Matthews, Barriers in protein folding reactions, *Adv. Prot. Chem.* 53 (2000) 153-207.
23. J. N. Onuchic, H. Nymeyer, A. E. García, J. Chahine, N. D. Socci, The energy landscape theory of protein folding: insights into folding mechanisms and scenarios, *Adv. Prot. Chem.* 53 (2000) 87-152.
24. M. J. Parker, M. Lorch, R. B. Sessions, A. R. Clarke, Thermodynamic properties of transient intermediates and transition states in the folding of two contrasting protein structures, *Biochemistry* 37 (1998) 2538-2545.
25. O. Bieri, T. Kiefhaber, In *Frontiers in Molecular Biology. Mechanisms of Protein Folding*; Pain, R. H., Ed.; Oxford University Press: New York, 2000; pp 34-64.
26. A. Fersht, In *Structure and Mechanisms in protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*; W. H. Freeman and Company: New York, 1999; pp 540-570.
27. B. E. García-Moreno, Probing structural and physical basis of protein energetics linked to protons and salts, *Methods Enzymol.* 259 (1995) 512-538.

28. W. Schaller, A. D. Robertson, pH ionic strength, and temperature dependences of ionization equilibria for the carboxyl groups in turkey ovomucoid third domain, *Biochemistry* 34 (1995) 4714-4723.
29. S. Cavagnero, D. A. Debe, Z. H. Zhou, M. W. Adams, S. I. Chan, Kinetic role of electrostatic interactions in the unfolding of hyperthermophilic and mesophilic rubredoxins, *Biochemistry* 37 (1998) 3369-3376.
30. L. López-Arenas, S. Solís-Mendiola, A. Hernández-Arana, Estimating the degree of expansion in the transition state for protein unfolding: analysis of the pH dependence of the rate constant for caricain denaturation, *Biochemistry* 38 (1999) 15936-15943.
31. M. O. Oliveberg, A. R. Fersht, Formation of electrostatic interactions on the protein-folding pathway, *Biochemistry*. 35 (1996) 2726-2737.
32. D. L. Luisi, D. P. Raleigh, pH-dependent interactions and the stability and folding kinetics of the N-terminal domain of L9. Electrostatic interactions are only weakly formed in the transition state for folding, *J. Mol. Biol.* 299 (2000) 1091-1100.
33. D. E. Otzen, M. Oliveberg, Salt-induced detour through compact regions of the protein folding landscape, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (1999) 11746-11751.
34. R. Perez-Jimenez, R. Godoy-Ruiz, B. Ibarra-Molero, J. M. Sanchez-Ruiz, The efficiency of different salts to screen charge interactions in protein: a Hofmeister effect?, *Biophys. J.* 86 (2004) 2414-2429.
35. B. N. Dominy, D. Perl, F. X. Schmid, Ch. L. Brooks III, The effects of ionic strength on protein stability: the cold shock protein family, *J. Mol. Biol.* 319 (2002) 541-554.

36. D. W. Bolen, M. Yang, Effects of guanidine hydrochloride on the proton inventory of proteins: implications on interpretations of protein stability, *Biochemistry* 39 (2000) 15208-15216.
37. D. L. Luisi, C. D. Snow, Jo-Jin Lin, Z. S. Hendsch, B. Tidor, D. P. Raleigh, Surface salt bridges, double-mutant cycles, and protein stability: an experimental and computational analysis of the interaction of the Asp 23 side chain with the N-terminus of the N-terminal domain of the ribosomal protein L9, *Biochemistry* 42 (2003) 7050-7060.
38. J. M. Scholtz, E. J. York, J. M. Stewart, R. L. Baldwin, A neutral, water-soluble, α -helical peptide: the effect of ionic strength on the helix-coil equilibrium, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 5102-5104.
39. T. Dubois, A. Jacquet, A. G. Schneck, and Y. Looze, The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. I. Fractionation, purification, and preliminary characterization, *Biological Chemistry* . 369 (1988) 733-740.
40. B. S. Baines, and K. Brocklehurst, Characterization of papaya peptidase A as a cysteine proteinase of *Carica papaya* L. with active-centre properties that differ from those of papain by using 2, 2'-dipyridyl disulphide and 4-chloro-7-nitrobenzofurazan as reactivity probes, *Biochem. J.* 205 (1982) 205-211.
41. Padilla Zúñiga, A. J. (1993) Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Depto. de Química.
42. G. W. Robinson, Isolation and characterization of papaya peptidase A from commercial chymopapain, *Biochemistry* 14 (1975) 3695-3700.
43. A. Jacquet, T. Kleinschmidt, A. G. Schnek, Y. Looze, and G. Braunitzer, The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. III. The primary structure of chymopapain, *Biological Chemistry Hoppe Seyler* 370 (1989) 425-434.

44. D. Maes, J. Bouckaert, F. Poortmans, L. Wyns, and Y. Looze, Structure of chymopapain at 1.7 Å resolution, *Biochemistry* 35 (1996) 16292-16298.
45. S. Solís-Mendiola, A. Arroyo-Reyna, A. Hernández-Arana, Circular dichroism of cysteine proteinases from papaya latex. Evidence of differences in the folding of their polypeptide chains, *Biochim. Biophys. Acta* 1118 (1992) 288-292.
46. S. Solís-Mendiola, R. Zubillaga-Luna, A. Rojo-Domínguez, A. Hernández-Arana, Structural similarity of chymopapain forms as indicated by circular dichroism, *Biochem. J.* 257 (1989) 183-186.
47. L. Polgár, Isolation of highly active papaya peptidases A and B from commercial chymopapain, *Biochim. Biophys. Acta* 658 (1981) 262-269.
48. R. Khurana, J. B. Udgaonkar, Equilibrium unfolding studies of barstar: evidence for an alternative conformation which resembles a molten globule, *Biochemistry* 33 (1994) 106-115.
49. C. N. Pace, B. A. Shirley, J. A. Thomson, In *Protein Structure: A Practical Approach*; Creighton, T.E., Ed.; IRL Press: Oxford, 1989; pp 311-330.
50. C. R. Cantor, and P. R. Schimmel, The behaviour of biological macromolecules, *Biophysical Chemistry, Part III*, W. H. Freeman, Nueva York, (1980) pp. 1075-1107.
51. J. K. Myers, C. N. Pace, J. M. Scholtz, Denaturant *m* values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein Sci.* 4, (1995) 2138-2148.
52. C. N. Pace, Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Methods Enzymol.* 131 (1986) 266-280.

53. L. López-Arenas, S. Solís-Mendiola, J. Padilla-Zúñiga, A. Hernández-Arana, Hofmeister effects in protein unfolding kinetics: Estimation of changes in surface area upon formation of the transition state, *Biochim. Biophys. Acta* 1764 (2006) 1260-1267.
54. Laidler K. J. (1979) *Cinética de Reacciones Homogéneas en Fase Gaseosa*, ed. Alhambras.
55. M. A. Andrade, P. Chacón, J. J. Merelo, F. Morán, Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network, *Protein Eng.* 6 (1993) 383-390.
56. L. S. Itzhaki, P. A. Evans, C. M. Dobson, S. E. Radford, Tertiary interactions in the folding pathway of hen lysozyme: kinetic studies using fluorescent probes, *Biochemistry* 33 (1994) 5212-5220.
57. K. E. van Holde, W. C. Johnson, P. S. Ho, In *Principles of Physical Biochemistry*; Prentice Hall International: New Jersey, 1998; pp 380-417
58. F. Edwin, M. V. Jagannadham, Sequential unfolding of papain in molten globule state, *Biochemi. Biophys. Res. Commun.* 252 (1998) 654-660.
59. T. E. Creighton, In *Proteins Structures and Molecular Properties*; W. H Freeman and Company: New York, 1993; pp 138-169.
60. O. D. Monera, C. M. Kay, R. S. Hodges, Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interaction, *Protein Sci.* 3 (1994) 1984-1991.

61. B. Ibarra-Molero, V. V. Loladze, G. I. Makhatadze, J. M. Sanchez-Ruiz, Thermal versus guanidine-induced unfolding of ubiquitin. An analysis in terms of the contributions from charge-charge interactions to protein stability, *Biochemistry* 38 (1999) 8138-8149.
62. V. Dagget, A. R. Fersht, In *Frontiers in Molecular Biology. Mechanisms of Protein Folding*; Pain, R. H., Ed.; Oxford University Press: Oxford, 2000; pp 175-211.
63. F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, The protein data bank:a computer-based archival file for macromolecular structures, *J. Mol. Biol.* 112 (1977) 535-542.
64. S. Solís-Mendiola, L. H. Gutiérrez-González, A. Arroyo-Reyna, J. Padilla-Zúñiga, A. Rojo-Domínguez, A. Hernández-Arana, pH dependence of the activation parameters for chymopapain unfolding: influence of ion pairs on the kinetic stability of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1388 (1998) 363-372.

APÉNDICE I

APÉNDICE I

Figura A1. Secuencia de aminoácidos de la quimopapaína.

1	5	10	15	20
-Tyr-Pro-Glu-	Ser-Ile-Asp-Trp-	Arg-Ala-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly		
	25	30	35	40
-Ala-Cys-Gly-Ser-Cys-Trp-Ala-	Phe-Ser-Thr-Ile-Ala-	Thr-Val-Glu-Gly-	Ile-Asn-Lys-Ile	
	45	50	55	60
-Val-Thr-Gly-Asn-Leu-Leu-Glu-Leu-Ser-Glu-Gln-Glu-Leu-Val-Asp-Cys-Asp-Lys-His-Ser				
	65	70	75	80
-Tyr-Thr-Cys-Lys-Gly-Gly-Tyr-Gln-Thr-Thr-Ser-Leu-Glu-Tyr-Val-Ala-Asn-Asn-Gly-Val				
	85	90	95	100
-His-Thr-Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Tyr-	Gln-Ala-Lys-Gln-Tyr-Lys-Cys-Arg-Ala-Thr-Asp-Lys			
	105	110	115	120
-Pro-Gly-Pro-Lys-Val-Lys-Ile-	Thr-Gly-Tyr-Lys-Arg-Val-	Pro-Ser-Asn-Cys-	Glu-Thr-Ser	
	125	130	135	140
-Phe-Leu-Gly-Ala-Leu-Ala-Asn-Gln-Pro-Leu-Ser-Val-Leu-Val-Glu-Ala-Gly-Gly-Lys-Pro				
	145	150	155	160
-Phe-Gln-Leu-Tyr-Lys-Ser-Gly-Val-Phe-Asp-Gly-Pro-Cys-Gly-Thr-Lys-Leu-Asp-His-Ala				
	165	170	175	180
-Val-Thr-Ala-Val-Gly-Tyr-Gly-Thr-Ser-Asp-Gly-	Lys-Asn-	Tyr-Ile-Ile-	Ile-Lys-Asn-Ser	
	185	190	195	200
-Trp-Gly-Pro-Asn-Trp-Gly-Glu-Lys-Gly-Tyr-Met-Arg-Leu-Lys-Arg-Gln-Ser-Gly-Asn-Ser				
	205	210	215	
-Pro-Gly-Thr-Cys-Gly-Val-Tyr-Lys-	Ser-Ser-Tyr-Tyr-	Pro-Phe-Lys-Gly-Phe-Ala		

APÉNDICE II

APÉNDICE II

Tabla A1. Constantes de velocidad de la primera (k_1) y segunda (k_2) fase de la cinética de desplegamiento de quimopapaína en regulador de glicina 0.05M, pH 1.5 a 44°C a diversas concentraciones de LiCl.

pH 1.5, T= 44°C		
LiCl (M o I)	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)
0	0.061	0.011
0.05	0.170	0.022
0.10	0.220	0.031
0.10	0.300	0.033
0.15	0.350	0.060
0.20	0.380	0.057
0.20	0.420	0.051
0.25	0.470	0.064
0.25	0.410	0.065
0.30	0.550	0.081
0.40	0.670	0.098
0.40	0.600	0.102
0.50	0.700	0.109
0.60	0.840	0.113
0.70	0.790	0.093
0.70	0.910	0.125
0.80	0.900	0.138

La desviación estándar de k_1 y k_2 es de aproximadamente 6% y 3%, respectivamente.

Tabla A2. Constantes de velocidad de la primera (k_1) y segunda (k_2) fase de la cinética de desplegamiento de quimopapaína en regulador de glicina 0.05M, pH 1.5 a 44°C a diversas concentraciones de Na_2SO_4 .

pH 1.5, T= 44°C		
Na_2SO_4 (I)	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})
0	0.061	0.011
0.03	0.256	0.035
0.06	0.380	0.047
0.06	0.350	0.041
0.105	0.380	0.043
0.15	0.406	0.043
0.30	0.432	0.052
0.45	0.423	0.064
0.60	0.411	0.063
0.75	0.353	0.059
0.90	0.336	0.045
1.20	0.307	0.041
1.50	0.260	0.036

La desviación estándar de k_1 y k_2 es de aproximadamente 8% y 5%, respectivamente.

Tabla A3. Constantes de velocidad de la primera (k_1) y segunda (k_2) fase de la cinética de desplegamiento de quimopapaína en regulador de glicina 0.05M, pH 1.5 a 44°C a diversas concentraciones de GdnCl.

pH 1.5, T= 44°C			
GdnCl (M o I)	k_1 (min ⁻¹)	GdnCl (M o I)	k_2 (min ⁻¹)
0	0.061	0	0.011
0.05	0.140	0.05	0.019
0.05	-	0.05	0.018
0.10	0.280	0.10	0.039
0.10	0.460	0.10	0.045
0.20	0.530	0.20	0.078
0.20	0.450	0.20	0.072
0.30	0.500	0.30	0.091
0.40	0.750	0.40	0.129
0.50	0.860	0.50	0.142
0.60	1.080	0.60	0.178
0.70	1.160	0.70	0.197
0.70	1.280	0.70	0.193
0.80	1.400	0.80	0.267
0.80	1.660	0.80	0.259
0.80	-	0.80	0.276
0.90	1.470	0.90	0.261
1.00	1.890	1.00	0.338
1.20	2.700	1.20	0.467
1.20	2.200	1.20	0.545
1.20	-	1.20	0.414
1.30	2.700	1.30	0.650
1.30	3.420	1.30	0.575
1.40	4.280	1.40	0.611
1.50	5.300	1.50	0.917
1.50	-	1.50	0.868

La desviación estándar de k_1 y k_2 es de aproximadamente 7% y 4%, respectivamente. Algunas constantes de velocidad presentaron una desviación estándar muy grande por lo que no fueron consideradas.

Tabla A4. Constantes de velocidad de la primera (k_1) y segunda (k_2) fase de la cinética de desplegamiento de quimopapaína en regulador de glicina 0.05M, pH 1.5 a 44°C a diversas concentraciones de urea.

pH 1.5, T= 44°C		
Urea (M o I)	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)
0	0.061	0.011
0.10	0.120	0.014
0.10	0.124	0.016
0.20	0.162	0.012
0.20	0.140	0.013
0.25	0.153	0.017
0.25	0.202	0.012
0.30	0.207	0.013
0.30	0.180	0.020
0.40	0.206	0.015
0.40	0.246	0.016
0.50	0.240	0.031
0.50	0.270	0.030
0.70	0.330	0.038
0.90	0.400	0.045
1.00	0.440	0.069
1.20	0.450	0.080
1.20	0.530	0.100
1.40	0.530	0.130
1.40	0.600	0.130
1.50	0.610	0.140
1.70	0.920	0.187
1.80	1.020	0.194
2.00	1.400	0.340

La desviación estándar de k_1 y k_2 es de aproximadamente 10% y 5%, respectivamente.

Tabla A5. Área polar y no polar de las moléculas creadas con sustituyentes N-acetil y etilester en los extremos N y C^a.

Molécula	A _{pol} (Å ²)	A _{n pol} (Å ²)
AG ₁ E	77.046	254.693
AG ₂ E	116.873	301.144
AG ₃ E	157.602	345.834
AAE	66.040	281.806
AnVE	58.764	341.357
AnLE	56.247	362.461
AVE	57.610	328.035
ALE	47.500	359.682
APE	57.165	390.455
AβAE	80.091	272.595

^aLa abreviatura para los aminoácidos con grupos N-acetil etil ester en los extremos N y C son: AG₁E N-acetil glicina etil ester, AG₂E N-acetil diglicina etil ester, AG₃E N-acetil triglicina etil ester, AAE N-acetil-L-alanina etil ester, AnVE N-acetil-L-norvalina etil ester, AnLE N-acetil-L-norleucina etil ester, AVE N-acetil-L-valina etil ester, ALE N-acetil-L-leucina etil ester, APE N-acetil-L-fenilalanina etil ester, AβAE N-acetil-β-alanina etil ester [5, 6].

Hofmeister effects in protein unfolding kinetics: Estimation of changes in surface area upon formation of the transition state

Leticia López-Arenas, Silvia Solís-Mendiola, Jaqueline Padilla-Zúñiga, Andrés Hernández-Arana *

Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa D. F. 09340, México

Received 2 March 2006; received in revised form 17 May 2006; accepted 22 May 2006

Available online 3 June 2006

Abstract

We studied the effect of three electrolytes (LiCl, Na₂SO₄, GuHCl) on the unfolding reaction of chymopapain, a two-domain protein belonging in the papain family of cysteine proteinases. Due to methodological reasons, these studies were carried out at pH 1.5 where the protein unfolds following biphasic kinetics. We have observed the presence of two different effects of electrolyte concentration on the unfolding reactions. At low ionic strength, the ionic atmosphere brought about an increase in reaction rates, regardless of the type of ions being present; this effect is attributed to a general “electrostatic screening” of charge–charge interactions in the macromolecule. At high ionic strength, each electrolyte exerted a distinctively different effect: both rate constants were largely increased by GuHCl (a well-known protein denaturant), but only slightly by LiCl; in contrast, Na₂SO₄ (a good precipitant) decreased the value of both unfolding rates. These ion-specific (Hofmeister) effects were further used to estimate changes in accessible surface area (Δ ASA) upon formation of the transition states (TS) for unfolding. Results obtained with LiCl and Na₂SO₄, which we analyzed by means of a parameterization derived from published solubility data of amino acid derivatives, are consistent with Δ ASA increments (for each phase) of about 8.0% of the total theoretical Δ ASA for complete unfolding of the chymopapain molecule. Results in the presence of GuHCl, which were analyzed by using a previous parameterization of protein unfolding data, gave larger Δ ASAs of activation, equivalent to 13 and 16% of the total unfolding Δ ASA.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Transition state; Unfolding reaction; Hofmeister effect; Salt effect; Electrostatic screening

1. Introduction

Over the last decade, increasing efforts have been devoted to the study of the barriers in protein folding–unfolding transitions. Both experimental and computational approaches have been used to achieve thermodynamic and structural descriptions of the main transition state ensemble (TS) connecting native (N) and unfolded (U) states of protein molecules [1,2]. Experimental information on TS is usually obtained by studying folding and unfolding rates as functions of temperature or denaturant concentration. From this type of studies it is possible to estimate the average molecular surface area exposed in TS, relative to the surface area exposed in N [3,4]. Detailed probing

of the structural features of TS requires application of mutational methods in order to analyze the effect of individual amino acid substitutions on unfolding and refolding rates [5].

For residues with ionizable side chains, however, modification of their charged nature can be attained simply by changing pH. Thus, because charge–charge interactions strongly affect protonation constants of ionizable groups [6,7], the pH dependence shown by unfolding [8,9] or refolding [10,11] rate constants has been employed to monitor the degree of disruption or consolidation of electrostatic interactions when TS is formed either from N or U. The contribution of electrostatic interactions to barriers in protein conformational transitions has also been addressed by examination of “salt effects” on the corresponding kinetic events [12,13]. It should be recalled, however, that there exist different mechanisms by which salts can affect reaction rates, as well as conformational equilibria [14–17]. Besides exerting the well-known “electrostatic screening”, small ions in aqueous solution also affect the stability (and

Abbreviations: ANS, 8-Anilino-1-naphthalene sulfonic acid; DC, circular dichroism; TS, transition state; Δ ASA, changes in accessible surface area

* Corresponding author. Fax: +52 55 5804 4666.

E-mail address: aha@xanum.uam.mx (A. Hernández-Arana).

solubility) of proteins because of preferential interaction with, or exclusion from, the macromolecular surface [18]. Salt effects of the latter kind, which are distinctively different depending on the anions and cations constituting the salt, are usually referred to as Hofmeister interactions [14,15,19].

A remarkable example of such a distinction between different salt effects was achieved by Scholtz et al. [20] in their study of how three different salts affect the stability of a small, uncharged helical polypeptide. At high ionic strength values, salt-specific Hofmeister interactions, leading to either stabilization or destabilization of the helix, were found to be predominant. Furthermore, by subtracting Hofmeister effects from experimental data at low ionic strength, the authors isolated a nonspecific helix-stabilizing effect that was ascribed to “electrostatic screening” of the helix macrodipole by the electrolyte.

In this work, we studied the effect of three electrolytes on the unfolding reaction of chymopapain (E. C. 3. 4. 22. 6), a papain-related cysteine protease, at pH 1.5. This pH value was chosen because the unfolding rate could be measured at temperatures close to 40 °C, allowing us to employ reported values of salting-out constants for model compounds [21,22] in the analysis of the dependence of the rate constants on salt concentration; besides, under the experimental conditions used, we were able to study the effect of different electrolytes ranging from the strongly denaturant Guanidine hydrochloride (GuHCl) to the highly stabilizing Na₂SO₄. The unfolding process of chymopapain involved two kinetic phases in which the secondary structure is lost, followed by a third phase in which strong aggregation of unfolded molecules took place. Overall, our results point out to the presence of two main salt effects on the unfolding reactions: general “electrostatic screening”, which stabilizes the transition state over the native state of the macromolecule; and Hofmeister effects that alter unfolding rates according to the known structure “stabilizing” or “destabilizing” properties of the particular ions. Following the work of Scholtz et al. [20], we separated one effect from the other; Hofmeister effects were further used to estimate the amount of area exposed to solvent on formation of the transition states.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Partially purified chymopapain was purchased from Sigma (St. Louis, MO). The most abundant enzyme form contained in this preparation was separated and purified to homogeneity by cation-exchange liquid chromatography as described previously [23]. To avoid autolysis during denaturation, the active-site thiol group in chymopapain was irreversibly blocked with iodoacetamide [24]. Protein homogeneity was confirmed by both HPLC and SDS-PAGE. Protein concentration was determined by means of the specific absorbance, $A_{280\text{ nm}} = 1.85\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [25,26]. 8-Anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) was purchased from Sigma. Stock solutions of ANS were prepared in 0.05 M glycine-HCl buffer adjusted to pH 1.5 and 7.0 and used further. Concentration of ANS was determined using an extinction coefficient of $\epsilon = 5000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 350 nm [27].

Urea (electrophoresis reagent) was obtained from Sigma and used in freshly prepared solutions. Guanidine hydrochloride (ultra pure) was obtained from ICN Biomedicals, and its concentration was determined from refractive index measurements [28]. Lithium chloride and sodium sulfate were obtained from

Merck, and used without further purification. All solutions were filtered after preparation and their pH values were checked after filtration. Distilled, deionized water was used in all experiments.

2.2. Circular Dichroism

Circular dichroism (CD) measurements were carried out in a JASCO J-715 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD). The spectropolarimeter was equipped with a PTC-348WI Peltier-type cell holder for temperature control and magnetic stirring. CD spectra were recorded at 20 °C in a 1.00-mm cell with protein solutions of approximately 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Protein solutions were prepared in 0.05 M glycine-HCl buffer adjusted to pH 1.5 and 7.0.

2.3. Denaturation kinetics

Kinetic studies of chymopapain denaturation were performed in solutions containing different concentrations of GuHCl (0–1.6 M), urea (0–2 M), Na₂SO₄ (0–0.5 M) and LiCl (0–0.8 M), prepared in 0.05 M glycine-HCl buffer adjusted to pH 1.5. The progress of chymopapain denaturation (at 44 °C) was followed by changes in ellipticity at 227 nm, wavelength at which a reasonable signal to noise ratio was achieved. The voltage applied to the phototube, which is proportional to the sample absorbance, was simultaneously recorded. Cells of 1.00-cm path length were filled up to 95–99% of their total volume (3.1 mL) with the buffer solution containing different concentrations of salt, and placed in the spectropolarimeter to allow equilibration at the temperature of the experiment. Temperature within the cell was measured with the external probe of the Peltier accessory. The necessary amount of concentrated solution of chymopapain was then injected to complete the cell volume. Final protein concentration was approximately 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Samples were vigorously stirred to promote rapid mixing and temperature equilibration. Under these conditions the dead time of experiments was less than 10 s. Most of the kinetic curves were adjusted to a double exponential decay equation,

$$\theta_t = \theta_N + A_1(\exp(-k_1 t) - 1) + A_2(\exp(-k_2 t) - 1) \quad (1)$$

where θ_t is the ellipticity measured at time t , θ_N represents the corresponding value at zero time. A_1 and A_2 are the amplitudes of both kinetic phases, and the corresponding rate constants are given by k_1 and k_2 .

2.4. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectroscopy experiments were made in a PCI spectrofluorometer from ISS (Champaign, IL, USA). This instrument was equipped with a water-jacketed cell holder for temperature control.

2.5. Analysis of Hofmeister effects in the solubility of small molecules

According to the weak interaction model, the variation in the chemical potential of a solute M by any added salt (or any other cosolute), i , is given by the interaction parameter: $\beta_{M,i} = (\partial\mu_M/\partial c_i)_{T,p}$ [19]. At low concentrations of solute its activity coefficient is usually set equal to 1, and a change in μ_M can be written in terms of its molar concentration and the concentration of cosolute: $(d\mu_M)_{T,p} = RT d(\ln c_M) + \beta_{M,i} dc_i$.

For a salting-out experiment, where μ_M remains constant as c_M and c_i both vary, the above equation leads to $d(\ln c_M) = -(\beta_{M,i}/RT) dc_i$. If $\beta_{M,i}$ is taken as independent of cosolute concentration, the well-known Setchenow's equation is obtained,

$$\log[c_M/c_M(0)] = -(\beta_{M,i}/2.303RT)c_i = -K_s c_i \quad (2)$$

where K_s is the salting-out constant. Solubility studies of blocked amino acids [21,22] have shown that salting-out constants are proportional to the number of carbon atoms, and thus to the accessible-surface area of the molecule. However, salts also produce salting-in of peptide groups [19] in a way that seems to be salt-specific and also proportional to the number of peptide groups.

To make published K_s data for model compounds applicable to protein studies, we have analyzed K_s values for blocked amino acids [21,22] in terms of

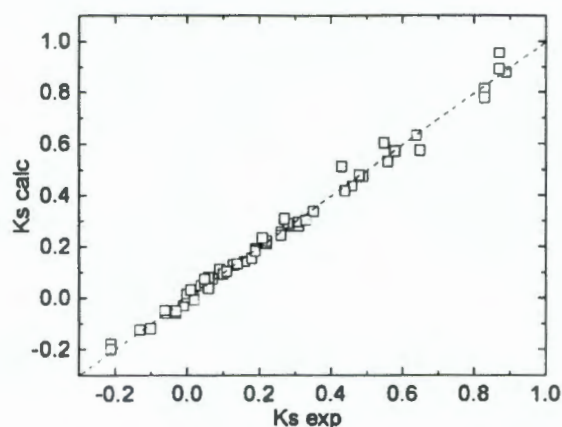


Fig. 1. Plot showing the correlation between calculated ($K_{s, \text{calc}}$) and experimental ($K_{s, \text{exp}}$) salting-out constant for model compounds. Values of $K_{s, \text{exp}}$ (at 25 °C) are reported in [21,22] and summarize the effect of six different salts on the solubility of several amino-acid derivatives (see text for details). These experimental constants were parameterized in terms of the polar and nonpolar surface area of the model compounds (Eq. (3)) to obtain $K_{s, \text{pol}}$ and $K_{s, \text{npol}}$ (Table 1), which were used in turn to calculate $K_{s, \text{calc}}$.

their nonpolar and polar solvent-accessible surface areas; that is, the salting-out, or salting-in, effect of a given salt is approximated as

$$K_s = K_{s, \text{pol}}(A_{\text{pol}}) + K_{s, \text{npol}}(A_{\text{npol}}) \quad (3)$$

where A_{pol} and A_{npol} are, respectively, the polar and nonpolar solvent-accessible surface areas of a molecule. To test the general validity of this approach we used reported K_s values [21,22] (at 25 °C) that characterize the effect of six different salts (Na_2SO_4 , KF, NaCl, LiCl, NaClO_4 , and NaSCN) on the solubilities of N-acetyl ethyl esters of gly, gly-gly, gly-gly-gly, ala, val, leu, phe, β -ala, nor-val, and nor-leu. Solvent-accessible areas for the fully extended conformation of each molecule were calculated with NACCESS (Simon Hubbard, University College, UK), an implementation of the Lee and Richards algorithm [29] using a probe radius of 1.4 Å. Oxygen and nitrogen atoms were considered polar, and carbon atoms were taken as nonpolar. For each salt, $K_{s, \text{pol}}$ and $K_{s, \text{npol}}$ were obtained by least-squares linear regression. The overall accuracy of the model in reproducing experimental values of K_s can be appreciated from Fig. 1; the plot of K_s (calculated) vs. K_s (experimental) showed a slope of 0.99 ± 0.01 and a correlation coefficient of 0.99. Calculations were also done with K_s data at 40 °C [21,22], albeit in this case the reported data set is restricted to only six model compounds. Values of $K_{s, \text{pol}}$ and $K_{s, \text{npol}}$ at both temperatures, are shown in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. Conformational characteristics of chymopapain at low pH

Comparison of far-UV CD spectra at pH 7.0 and pH 1.5 (Fig. 2a) indicates that the protease suffers some changes in its

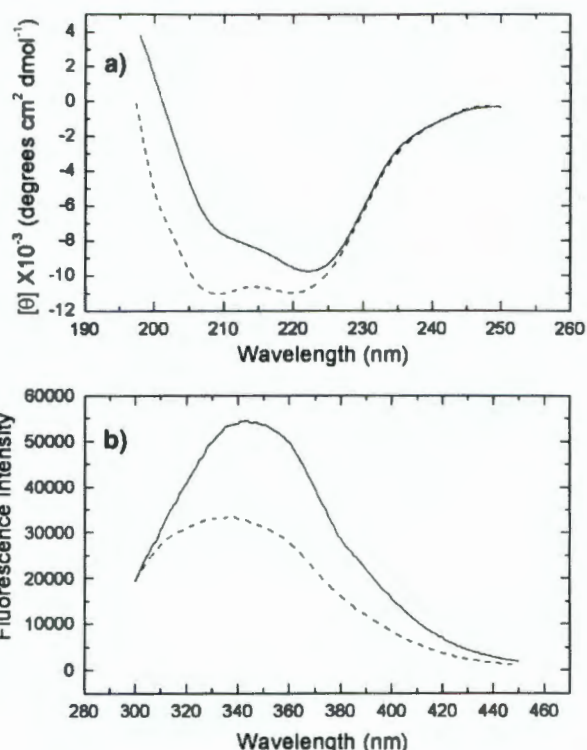


Fig. 2. Spectroscopic characteristics of chymopapain at acid and neutral pH. (a) Far UV-CD and (b) fluorescence spectra at pH 1.5 (dashed lines) and pH 7.0 (solid lines). Spectra were recorded at 20 °C. At this temperature, chymopapain has enough stability (even at pH 1.5, its denaturation takes several hours) to allow spectral characterization of the folded protein. Chymopapain solutions of 0.20 mg mL^{-1} (0.10 cm cell) and 0.04 mg mL^{-1} (1.00 cm cell) were used for CD and fluorescence, respectively.

secondary structure when placed in acid solution. However, these structural changes seem to be relatively minor, as judged from results of an analysis of the content of secondary structures by means of method K2d [30]. Apparently, about 5.0% of helix is transformed to β -structure at pH 1.5.

Lowering the pH lead to significant quenching of the intrinsic fluorescence of chymopapain (Fig. 2b), but the emission maximum showed no red-shift at all. Therefore, although some alterations in the tryptophan environment do occur at pH 1.5, there is no indication of an increase in the exposure to solvent of these residues [31]. Similarly, emission spectra of ANS–chymopapain mixtures (not shown) did not point out to the appearance of solvent-exposed hydrophobic “patches” [32] when pH was decreased. In conclusion, all the spectroscopic evidence

Table 1
Polar ($K_{s, \text{pol}}$) and nonpolar ($K_{s, \text{npol}}$) components of the salting-out constants for different salts^a

	$K_{s, \text{pol}} (\text{M}^{-1} \text{Å}^{-2})$		$K_{s, \text{npol}} (\text{M}^{-1} \text{Å}^{-2})$	
	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C
Na_2SO_4	−0.0023 (± 0.0004)	−0.0023 (± 0.0003)	0.0028 (± 0.0001)	0.0027 (± 0.0001)
LiCl	−0.0015 (± 0.0001)	−0.0012 (± 0.0001)	0.00081 (± 0.00002)	0.00076 (± 0.00004)
NaCl	−0.0015 (± 0.0002)	−0.0016 (± 0.0001)	0.0010 (± 0.00005)	0.0010 (± 0.00004)
NaSCN	−0.00187 (± 0.0002)	−0.0013 (± 0.0002)	0.00033 (± 0.00006)	0.00018 (± 0.00007)
NaClO_4	−0.0025 (± 0.0002)	−0.0018 (± 0.0002)	0.00055 (± 0.00005)	0.00034 (± 0.00006)

^a $K_{s, \text{pol}}$ and $K_{s, \text{npol}}$ calculated from fitting Eq. (3) to solubility data reported in references [21] and [22].

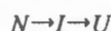
suggests that the chymopapain molecule retains most of its native structure in solutions of pH 1.5; certainly, no signs of partial unfolding or transformation to a molten globule state were found in our studies.

3.2. Unfolding kinetics

Kinetic traces of chymopapain unfolding in the glycine buffer alone (pH 1.5, 0.05 M) and in the presence of different GuHCl concentrations were obtained by following the ellipticity at 227 nm. Fig. 3 shows some representative recordings. We found that for all of the curves a double exponential-decay equation (Eq. (1)) was necessary for adequate data fitting. Although the total ellipticity change observed was nearly independent of GuHCl concentration, the ratio of amplitude values (A_1/A_2) increased as a function of the denaturant concentration (inset to Fig. 3). Rate constants k_1 and k_2 also increased with denaturant concentration, as can be seen from the plots in Fig. 5. Simultaneous recording of the phototube voltage indicated that when denaturant is present at 0.10 M or higher concentration, changes in ellipticity are accompanied by only small changes (5.0% or less) in the absorbance of the protein solution. Such small changes are known to occur due to alterations in the secondary and, to a less extent, the tertiary structure of proteins and polypeptides [33]. However, at the lowest denaturant concentration tested (0.05 M) a relatively large absorbance increment (approximately 20.0% of the protein absorbance) was found associated to the slower CD-detected kinetic phase; this rise in absorbance was even larger in the absence of denaturant. Most likely this phenomenon has its origin in the scattering of light by aggregates of unfolded protein molecules.

Studies [34] on the temperature and GuHCl-induced unfolding of papain at pH < 2.6 have found biphasic transition curves. The

state intermediate between the native (N) and the unfolded (U) forms of the protein seems to be formed mainly by β -strands. Therefore, it has been proposed that the N-terminal domain of the molecule is less stable than the C-terminal domain. It would be reasonable, therefore, to attribute the biphasic kinetic behavior of chymopapain unfolding to a different stability of its two domains. The simplest model accounting for biphasic kinetics would be that in which two cooperative folding units, corresponding approximately to each structural domain, unfold independently from each other; in this case, amplitudes A_1 and A_2 would be reflecting the loss of secondary structure in each domain, and its ratio, A_1/A_2 , would be expected to vary little with denaturant concentration, which is in contrast with results shown in the inset to Fig. 3. An alternative kinetic model is that of two consecutive reactions with one intermediate, I:



Equations describing the time course of the concentration of each species involved are well known [35]; by denoting the characteristic ellipticity of each species as θ_N , θ_I , and θ_U , it can be shown that the observed amplitudes are given by

$$A_1 = (\theta_N - \theta_I) + k_2(\theta_I - \theta_U)/(k_2 - k_1) \quad (4a)$$

$$A_2 = -k_1(\theta_I - \theta_U)/(k_2 - k_1) \quad (4b)$$

which were used to compute ellipticity changes corresponding to each step of the reaction (i.e., $\theta_N - \theta_I$ and $\theta_I - \theta_U$). The value of $\theta_N - \theta_I$, expressed as a fraction of the total change, monotonically increased from approximately 0.34, in the absence of GuHCl, to 0.70–0.77 at the highest concentrations. According to these results, the intermediate form appearing in chymopapain denaturation becomes more unfolded as the concentration of GuHCl increases.

Biphasic unfolding kinetics was also observed when urea, a non-ionic compound, was the denaturant agent (results not shown). As in the case of GuHCl, the relative value of A_1 increased with denaturant concentration; the fractional ellipticity change of the first phase, calculated by means of equations 4a and 4b, reached a value of 0.60 at 2.00 M urea. Up to a concentration of 0.20 M, significant absorbance increments occurred simultaneously with the second kinetic phase.

Unfolding of chymopapain in the presence of LiCl or Na_2SO_4 differed in some aspects from results presented above. In LiCl, the kinetics was still biphasic at 0.05 M, but at 0.10 M and higher concentration a third, slower phase was clearly discerned (Fig. 4). The amplitude of the third phase, A_3 , was the smallest up to 0.50 M electrolyte; at higher concentration, A_3 notably increased. Strong light scattering accompanied this phase. In 1.00 M LiCl, the light scattering period was followed by one in which a large decrement in absorbance took place, together with the formation of large protein aggregates that were visible to the naked eye. These observations suggest that the decrease in ellipticity during the third phase is due to a reduction in the number of protein molecules interacting with the light beam in the cuvette of the spectropolarimeter. Support for this idea came from studies wherein Na_2SO_4 , a good protein precipitant, was the added cosolute; with this salt, decrease of

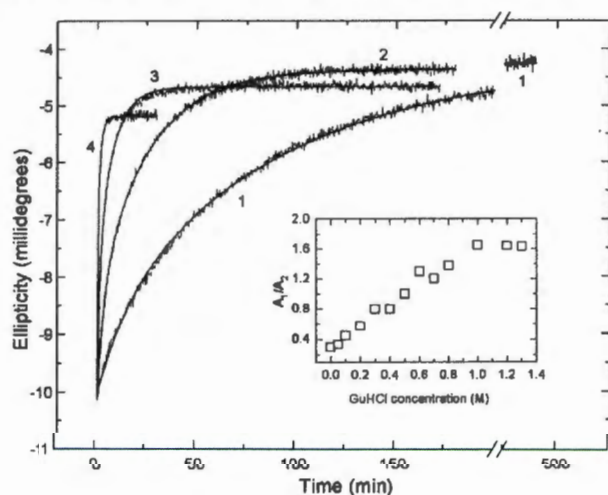


Fig. 3. Kinetics of chymopapain unfolding in the presence of GuHCl in different concentrations: 0 (curve 1), 0.10 (curve 2), 0.40 (curve 3), and 1.3 M (curve 4). Solutions were prepared in 0.05 M glycine buffer, pH 1.5. All tracings were registered at 44 °C, employing protein solutions of approximately 0.020 mg mL⁻¹ in cells of 1.00 cm. Ellipticity changes were followed at 227 nm. Smooth lines are double-exponential decay equations (Eq. (1)) fitted to experimental data. Shown in the inset is the variation of the ratio of kinetic amplitudes (A_1/A_2) with [GuHCl].

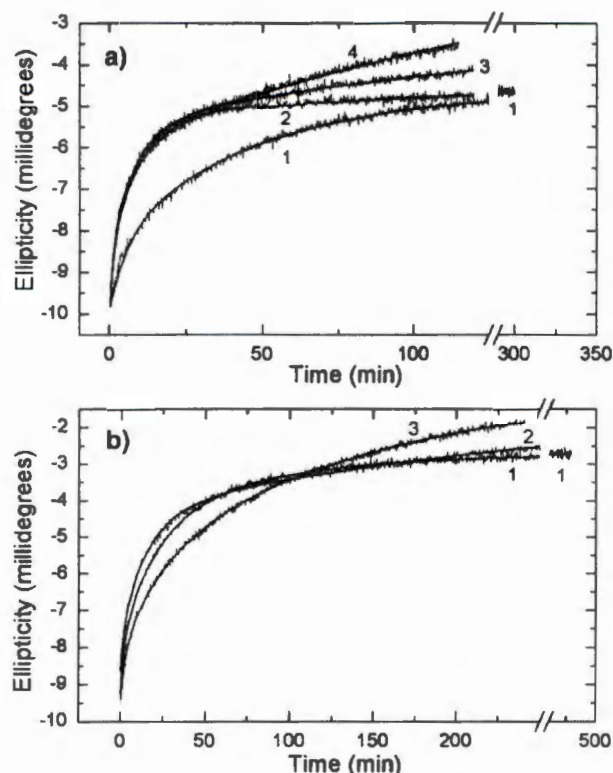


Fig. 4. Kinetics of chymopain unfolding in the presence of LiCl (a) and Na_2SO_4 (b). In (a), curves 1 to 4 correspond, respectively, to 0.05, 0.50, 0.70, and 0.80 M LiCl. In (b), curves 1 to 3 correspond to 0.02, 0.15, and 0.40 M Na_2SO_4 . Other experimental conditions were the same as for Fig. 3. Data were fitted to either biphasic or triphasic exponential decay equations (smooth lines).

the apparent absorbance and formation of large aggregates occurred at concentrations as low as 0.30 M; at the same time, the ellipticity slowly approached the reference value of the buffer plus salt (Fig. 4). Values of $(\theta_N - \theta_I)/(\theta_N - \theta_U)$ varied only slightly with the amount of either of the two added salts: from 0.34, in the absence of salt, to 0.46 in 0.8 M LiCl, and close to 0.40 in 0.50 M Na_2SO_4 .

3.3. Effects of cosolutes on the unfolding rate constants

Fig. 5 illustrate the behavior of the unfolding constants, k_1 and k_2 , as functions of the ionic strength (I) of the solution. At low I , there is a rather sharp increase of rate constants with I , regardless of the electrolyte being present in the solution. At I values higher than 0.4–0.45 M, each electrolyte exerts a distinctly different effect: GuHCl markedly increases both unfolding rates, whereas LiCl induces rather modest increments; in contrast, Na_2SO_4 decelerates the reactions. These results are thus consistent with two main physicochemical mechanisms taking place at molecular level: a general “electrostatic screening” by the ionic atmosphere surrounding the macromolecule, and ion-specific Hofmeister effects. Support for a contribution from “electrostatic screening” was found in results obtained with urea, a polar, non-ionic compound. As can be seen in Fig. 6, the plot of $\ln k_1$ versus urea concentration shows a much smaller curvature than that observed in curves of Fig. 5, whereas the plot of $\ln k_2$ displays no apparent curvature at

all. On the other hand, Hofmeister effects brought about by the cosolutes are in accord with the well known denaturant character of GuHCl and urea, and with the structure stabilizing power of the sulfate ion; Li^+ and Cl^- , being placed at the middle of Hofmeister series, are regarded as rather neutral ions [36].

Attempting to separate general from ion-specific effects, we followed the procedure used by Scholtz et al. [20] in their study of the influence of salts on the stability of a helical polypeptide. In that procedure it is assumed that ion-specific effects are predominant at high electrolyte concentration, and that under these conditions the free energy difference between two states of a macromolecule can be approximated as a linear function of salt concentration. As mentioned in Materials and methods, such a linear dependence is implicit in Setchenow's equation; it is also currently found in studies of protein unfolding induced by GuHCl or urea [37,38]. From the relationship between the rate constant and the free energy of activation ($\Delta G^\ddagger$) for a simple kinetic step, $k = E \exp(-\Delta G^\ddagger/RT)$, it follows that in the presence of added electrolyte,

$$\ln k = \ln E - \Delta G_0^\ddagger/RT - \Delta G_{\text{elec}}^\ddagger/RT - (m_i^\ddagger/RT)c_i \quad (5)$$

where the sum of the first two terms in the right-hand side stands for the value of $\ln k$ in the absence of electrolyte; $\Delta G_{\text{elec}}^\ddagger$ represents the contribution of “electrostatic screening” to the activation free energy; $m_i^\ddagger$ is a parameter specific for each

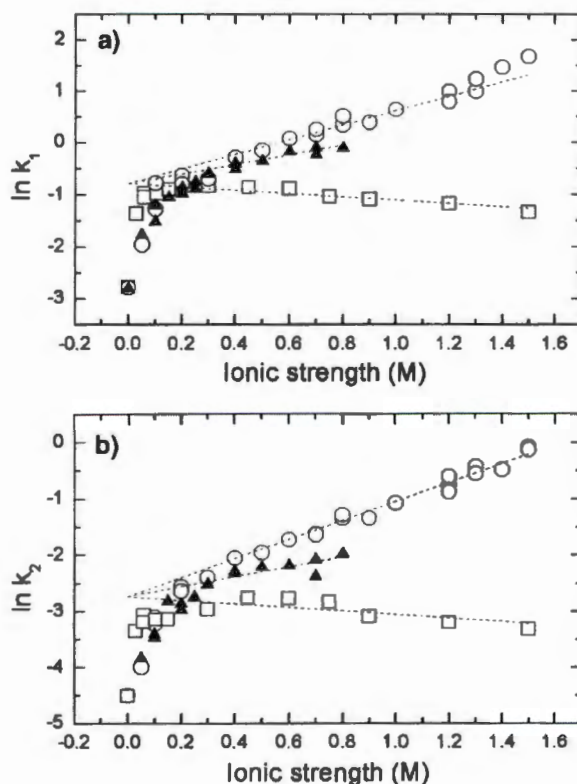


Fig. 5. Ionic strength-dependence of the rate constants for the first (k_1) and second (k_2) phases of chymopain unfolding kinetics. Values of k_1 , panel (a), and k_2 , panel (b), were determined from experiments carried out in GuHCl (—), LiCl (▲), or Na_2SO_4 (□). Dotted lines are linear fits to values corresponding to ionic strengths of 0.4 M and higher (see Eq. (5)).

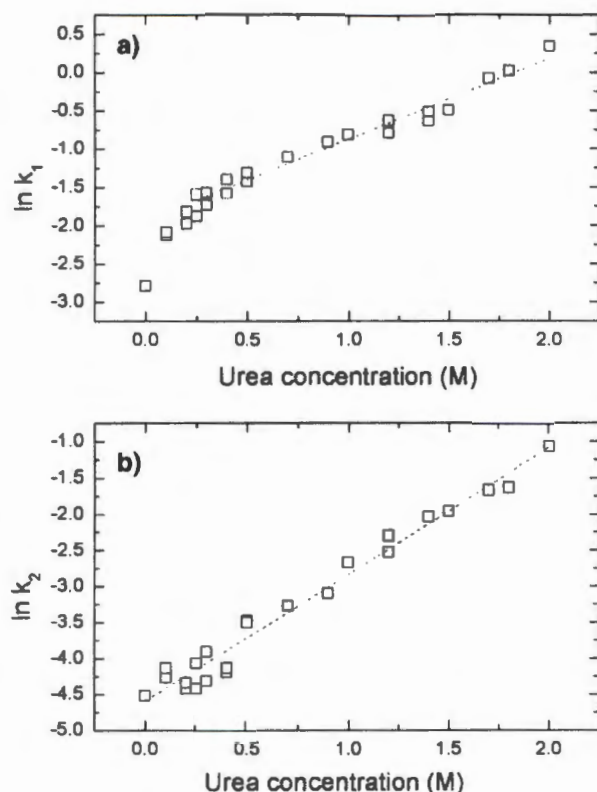


Fig. 6. Variation of the rate constants for the first (a) and second (b) kinetic phases of chymopain unfolding with urea concentration. Data obtained from experiments performed under the same conditions as for Fig. 3. Dotted lines are linear fits.

electrolyte whose molar concentration is c_i . In the weak interaction model, $m_i^\ddagger$ would be given by the difference between interaction parameters for the transition state ($\beta_{TS,i} = \partial\mu_{TS}/\partial c_i$) and the native state ($\beta_{N,i} = \partial\mu_N/\partial c_i$):

$$m_i^\ddagger = (\beta_{TS,i} - \beta_{N,i}) \quad (6)$$

According to Eq. (5), we used data for $\ln k_1$ or $\ln k_2$, corresponding to high I values, to fit a set of three linear equations with a common intercept at $I=0$, as required by the assumption that ion-specific effects dominate the behavior of $\ln k$ above a certain value of I ($I=0.4$ M in our case). Best fits (dotted lines in Fig. 5) gave estimated values of $m_i^\ddagger$ for each electrolyte (Table 2), which were in turn used in Eq. (5) to compute $\Delta G_{elec}^\ddagger$. As seen in Fig. 7, the value

of $\Delta G_{elec}^\ddagger$ so obtained was similar for the three electrolytes, thus supporting the idea of a non-specific “electrostatic screening” contribution to the activation free energy. Regarding the effect of urea on unfolding rates, it must be mentioned that $m^\ddagger$ values for this cosolute (slopes of lines in Fig. 6) were similar to those observed with GuHCl (see Table 2). Although it is usually thought that the later is much stronger as protein denaturant, it has been shown that their relative denaturation strength depends on the charge state of the macromolecule [39,40]. For instance, in the unfolding of coiled-coil polypeptide analogs, Monera et al. [39] found that the ratio of m_{GuHCl} to m_{urea} varies from 2.5, when electrostatic interactions stabilize the native state of the polypeptide, to 1.2 when those interactions are repulsive and destabilizing. In chymopain, whose isoelectric point is higher than 10, electrostatic repulsion should be indeed very important at pH 1.5. Besides, it is likely that “binding” of Gu^+ ions to groups at the macromolecular surface may be impeded in part by the high positive charge density at low pH, thus reducing the denaturing strength of GuHCl.

3.4. Estimating surface area changes upon activation

Values of $m_i^\ddagger$ pertaining to LiCl and Na_2SO_4 were further used to estimate the amount of polar (ΔASA_{pol}) and nonpolar (ΔASA_{npol}) surface area exposed to solvent when the transition state (TS) is formed. That is, the difference of interaction parameters, $\beta_{TS} - \beta_N$, was regarded as composed of two terms:

$$m_i^\ddagger = \beta_{TS} - \beta_N = \beta_{pol} \Delta ASA_{pol} + \beta_{npol} \Delta ASA_{npol} \quad (7)$$

β_{pol} and β_{npol} for each salt can be computed from the corresponding values of $K_{s,pol}$ and $K_{s,npol}$ (Table 1) by means of Eqs. (2) and (3). Two linear equations were thus formulated (for each kinetic step) whose solutions gave the $\Delta ASAs$ shown in Table 2. These results indicate an exposure of similar amounts of polar and nonpolar area upon formation of TS. The total ΔASA for each step would be only about 8.0% of the total theoretical area exposed upon unfolding of the whole chymopain molecule (23,660 Å², as calculated with NACCESS). Therefore, our estimations of ΔASA are in accord with the notion of a relatively compact transition state for unfolding that has been proposed by several authors [41].

It is interesting to compare the $\Delta ASAs$ that resulted from the above procedure with similar parameters derived from the effect of GuHCl on the unfolding kinetics. As it is well known, the denaturant action of the later cosolute correlates

Table 2
Estimated values of $m^\ddagger/RT$, $\Delta ASA_{pol}^\ddagger$, $\Delta ASA_{npol}^\ddagger$, and $\Delta ASA_{tot}^\ddagger$ in the presence of different cosolutes^a

Cosolute	First step (k_1)				Second step (k_2)			
	$m^\ddagger/RT$ (M ⁻¹)	$\Delta ASA_{pol}^\ddagger$ (Å ²)	$\Delta ASA_{npol}^\ddagger$ (Å ²)	$\Delta ASA_{tot}^\ddagger$ (Å ²)	$m^\ddagger/RT$ (M ⁻¹)	$\Delta ASA_{pol}^\ddagger$ (Å ²)	$\Delta ASA_{npol}^\ddagger$ (Å ²)	$\Delta ASA_{tot}^\ddagger$ (Å ²)
LiCl	-0.91 (0.09)	927	944	1871	-0.87 (0.11)	896	918	1814
Na ₂ SO ₄	0.96 (0.14)	927	944	1871	0.96 (0.14)	896	918	1814
GuHCl	-1.40 (0.10)			3160	-1.68 (0.06)			3790
Urea	-1.06 (0.05)				-1.75 (0.06)			

^a Values of $m^\ddagger/RT$ were calculated from the slopes of lines in Figs. 5 and 6; standard deviations indicated in parenthesis. $\Delta ASA_{pol}^\ddagger$ determined from experiments in the presence of LiCl and Na₂SO₄ were calculated from Eqs. (2), (3) and (6), and data in Table 1 (see text for details). $\Delta ASA_{tot}^\ddagger$ from experiments in GuHCl were obtained from the relationship $m=0.28 \Delta ASA$ [37].

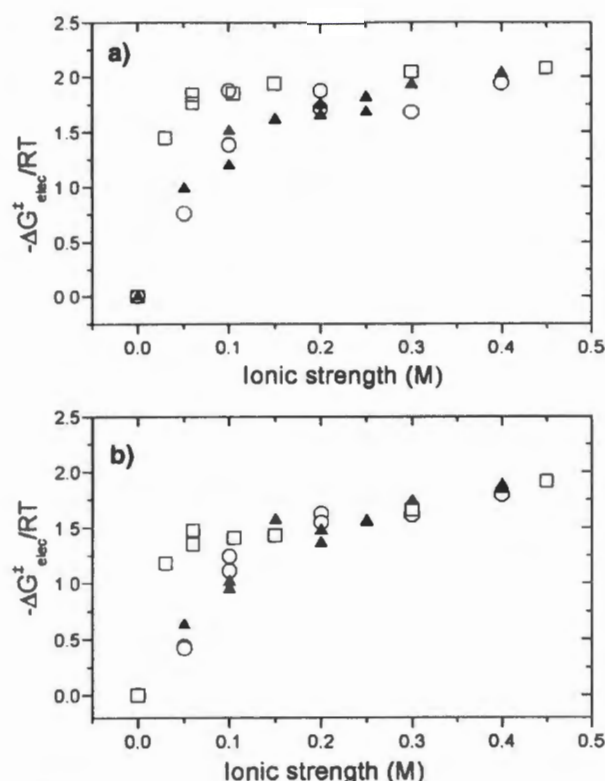


Fig. 7. “Electrostatic screening” contribution ($\Delta G^{\ddagger}_{\text{elec}}$) to the activation free energy for chymopapain unfolding (see Eq. (5)). $\Delta G^{\ddagger}_{\text{elec}}$ for the first (a) and second (b) kinetic steps of unfolding were computed as indicated in text.

linearly with the total surface area exposed on protein unfolding. In a comprehensive analysis of unfolding data, Pace et al. [37] found that the m value for GuHCl is given by: $m=0.28 \Delta \text{ASA}$. Using this coefficient, larger changes of surface area on TS formation are found for both activation steps (i.e., 13 to 16% of the total area exposed on unfolding; Table 2). This discrepancy in ΔASA values might be a reflection of differences in TS ensembles, whose structures change depending on the environmental perturbations the protein is subjected to [41]. Nevertheless, we must remind that results obtained with the two types of cosolutes (i.e., salts vs. GuHCl) are not directly comparable, because one data set is gauged by data from small model compounds, whereas the other relies on studies of protein unfolding. Furthermore, there is an evident bias in our parameterization derived from solubilities of amino acid derivatives, inasmuch as in the available data the polar area component is represented only by O and N atoms of amide and ester bonds. In this regard, it would be important to complete solubility data with values for the twenty natural amino acids. An analysis based on the additivity of individual group transfer free energies might turn out to be more appropriate, as Bolen and coworkers have found in studies of a number of osmolytes [42,43]. In any case, our results point out that the study of salt effects on protein unfolding reactions may provide information that complements that which is obtained by using ordinary protein denaturant.

3.5. Electrostatic screening

As it is seen in Fig. 7, at low ionic strength all of the electrolytes cause reduction of the activation free energy; that is, there is an stabilization of the transition state relative to the native state brought about by the ions in solution. In general, the ionic atmosphere would increase or decrease the chemical potential of a macroion depending on whether the net electrostatic interactions in the macroion are attractive or repulsive [15]. In a protein molecule, this effect is expected to be larger for the most compact state (i.e., the native state) because charged side chains will be at their closest distances; for an expanded state, such as the transition state, the effect will be smaller. Owing to the high positive charge density of chymopapain molecules at low pH, the ionic strength would preferentially stabilize the native state over the transition state, thus reducing the reaction rate. It follows, therefore, that there must exist certain attractive electrostatic interactions (i.e., ion pairs) whose destabilization by the ionic atmosphere overbalances the repulsive counterpart. An analysis of the three-dimensional structure of chymopapain (PDB [44] code 1 YAL) indeed reveals that 11 out of its 14 acid side chains are positioned less than 5 Å away from one or more positively charged groups. In particular, very short ion pairs are formed by E35, E50, E52, D55, D57, E118, and E187; furthermore, all these groups are located close to the molecular surface, but with little or none area exposed to the solvent. Some of these acid groups may probably remain unprotonated even at pH 1.5 (titration studies of chymopapain [45] suggested the presence of four groups with pK lower than 1.5), and might form ion pairs that are critical for the stability of the native molecule [45].

4. Concluding remarks

Our results show that small ions in solution affect the unfolding kinetics of chymopapain in a dual manner: firstly, when present in low concentration, different electrolytes cause a similar increase of the reaction rate, phenomenon that is likely due to “electrostatic screening” of charged groups in the macromolecule; this effect is barely noted when the cosolute is a polar but uncharged molecule, such as urea. Secondly, at high electrolyte concentration, ion-specific effects are clearly manifested in a way that agrees with the Hofmeister character of each particular ion.

Furthermore, we have shown that an study of Hofmeister effects can be helpful to extract information on the amount of surface area exposed to the solvent on formation of a transition state. Clearly, such a kind of analysis could also be applied to other processes involving conformational changes of proteins.

Acknowledgment

This work was supported by CONACYT, México (Convenio SEP-2003-C02-44681).

References

- [1] O. Bilsel, C.R. Matthews, Barriers in protein folding reactions, *Adv. Protein Chem.* 53 (2000) 153–207.

- [2] J.N. Onuchic, H. Nymeyer, A.E. Garcia, J. Chahine, N.D. Socci, The energy landscape theory of protein folding: insights into folding mechanisms and scenarios, *Adv. Protein Chem.* 53 (2000) 87–152.
- [3] M.J. Parker, M. Lorch, R.B. Sessions, A.R. Clarke, Thermodynamic properties of transient intermediates and transition states in the folding of two contrasting protein structures, *Biochemistry* 37 (1998) 2538–2545.
- [4] O. Bieri, T. Kiefhaber, In *Frontiers in Molecular Biology*, in: R.H. Pain (Ed.), *Mechanisms of Protein Folding*, Oxford Univ. Press, New York, 2000, pp. 34–64.
- [5] A. Fersht, *Structure and Mechanisms in protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W.H. Freeman and Company, New York, 1999, pp. 540–570.
- [6] B.E. Garcia-Moreno, Probing structural and physical basis of protein energetics linked to protons and salts, *Methods Enzymol.* 259 (1995) 512–538.
- [7] W. Schaller, A.D. Robertson, pH ionic strength, and temperature dependences of ionization equilibria for the carboxyl groups in turkey ovomucoid third domain, *Biochemistry* 34 (1995) 4714–4723.
- [8] S. Cavagnero, D.A. Debe, Z.H. Zhou, M.W. Adams, S.I. Chan, Kinetic role of electrostatic interactions in the unfolding of hyperthermophilic and mesophilic rubredoxins, *Biochemistry* 37 (1998) 3369–3376.
- [9] L. López-Arenas, S. Solís-Mendiola, A. Hernández-Arana, Estimating the degree of expansion in the transition state for protein unfolding: analysis of the pH dependence of the rate constant for caricain denaturation, *Biochemistry* 38 (1999) 15936–15943.
- [10] M.O. Oliveberg, A.R. Fersht, Formation of electrostatic interactions on the protein-folding pathway, *Biochemistry* 35 (1996) 2726–2737.
- [11] D.L. Luisi, D.P. Raleigh, pH-dependent interactions and the stability and folding kinetics of the N-terminal domain of L9. Electrostatic interactions are only weakly formed in the transition state for folding, *J. Mol. Biol.* 299 (2000) 1091–1100.
- [12] D.E. Otzen, M. Oliveberg, Salt-induced detour through compact regions of the protein folding landscape, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 11746–11751.
- [13] C. Nishimura, V.N. Uversky, A.L. Fink, Effects of salts on the stability and folding of staphylococcal nuclease, *Biochemistry* 40 (2001) 2113–2128.
- [14] R. Perez-Jimenez, R. Godoy-Ruiz, B. Ibarra-Molero, J.M. Sanchez-Ruiz, The efficiency of different salts to screen charge interactions in protein: a Hofmeister effect? *Biophys. J.* 86 (2004) 2414–2429.
- [15] B.N. Dominy, D. Perl, F.X. Schmid, Ch.L. Brooks III, The effects of ionic strength on protein stability: the cold shock protein family, *J. Mol. Biol.* 319 (2002) 541–554.
- [16] D.W. Bolen, M. Yang, Effects of guanidine hydrochloride on the proton inventory of proteins: implications on interpretations of protein stability, *Biochemistry* 39 (2000) 15208–15216.
- [17] D.L. Luisi, C.D. Snow, J.-J. Lin, Z.S. Hendsch, B. Tidor, D.P. Raleigh, Surface salt bridges, double-mutant cycles, and protein stability: an experimental and computational analysis of the interaction of the Asp 23 side chain with the N-terminus of the N-terminal domain of the ribosomal protein L9, *Biochemistry* 42 (2003) 7050–7060.
- [18] S.N. Timasheff, The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22 (1993) 67–97.
- [19] R.L. Baldwin, How Hofmeister ion interactions affect protein stability, *Biophys. J.* 71 (1996) 2056–2063.
- [20] J.M. Scholtz, E.J. York, J.M. Stewart, R.L. Baldwin, A neutral, water-soluble, α -helical peptide: the effect of ionic strength on the helix-coil equilibrium, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 5102–5104.
- [21] P.K. Nandi, D.R. Robinson, The effects of salts on the free energy of the peptide group, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 1299–1308.
- [22] P.K. Nandi, D.R. Robinson, The effects of salts on the free energy of nonpolar groups, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 1308–1315.
- [23] S. Solís-Mendiola, A. Arroyo-Reyna, A. Hernández-Arana, Circular dichroism of cysteine proteinases from papaya latex. Evidence of differences in the folding of their polypeptide chains, *Biochim. Biophys. Acta* 1118 (1992) 288–292.
- [24] S. Solís-Mendiola, R. Zubillaga-Luna, A. Rojo-Domínguez, A. Hernández-Arana, Structural similarity of chymopapain forms as indicated by circular dichroism, *Biochem. J.* 257 (1989) 183–186.
- [25] L. Polgár, Isolation of highly active papaya peptidases A and B from commercial chymopapain, *Biochim. Biophys. Acta* 658 (1981) 262–269.
- [26] G.W. Robinson, Isolation and characterization of papaya peptidase A from commercial chymopapain, *Biochemistry* 14 (1975) 3695–3700.
- [27] R. Khurana, J.B. Udgankar, Equilibrium unfolding studies of barstar: evidence for an alternative conformation which resembles a molten globule, *Biochemistry* 33 (1994) 106–115.
- [28] C.N. Pace, B.A. Shirley, J.A. Thomson, in: T.E. Creighton (Ed.), *Protein Structure: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989, pp. 311–330.
- [29] B. Lee, F.M. Richards, The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 379–380.
- [30] M.A. Andrade, P. Chacón, J.J. Merelo, F. Morán, Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network, *Protein Eng.* 6 (1993) 383–390.
- [31] F.X. Schmid, in: T.E. Creighton (Ed.), *Protein Structure: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989, pp. 251–285.
- [32] L.S. Itzhaki, P.A. Evans, C.M. Dobson, S.E. Radford, Tertiary interactions in the folding pathway of hen lysozyme: kinetic studies using fluorescent probes, *Biochemistry* 33 (1994) 5212–5220.
- [33] K.E. van Holde, W.C. Johnson, P.S. Ho, *Principles of Physical Biochemistry*, Prentice Hall International, New Jersey, 1998, pp. 380–417.
- [34] F. Edwin, M.V. Jagannadham, Sequential unfolding of papain in molten globule state, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252 (1998) 654–660.
- [35] A.G. Marshall, *Biophysical Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, 1978, pp. 277–299.
- [36] T.E. Creighton, *Proteins Structures and Molecular Properties*, W. H. Freeman and Company, New York, 1993, pp. 138–169.
- [37] J.K. Myers, C.N. Pace, J.M. Scholtz, Denaturation m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein Sci.* 4 (1995) 2138–2148.
- [38] C.N. Pace, Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Methods Enzymol.* 131 (1986) 266–280.
- [39] O.D. Monera, C.M. Kay, R.S. Hodges, Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interaction, *Protein Sci.* 3 (1994) 1984–1991.
- [40] B. Ibarra-Molero, V.V. Loladze, G.I. Makhatadze, J.M. Sanchez-Ruiz, Thermal versus guanidine-induced unfolding of ubiquitin. An analysis in terms of the contributions from charge–charge interactions to protein stability, *Biochemistry* 38 (1999) 8138–8149.
- [41] V. Dagget, A.R. Fersht, in: R.H. Pain (Ed.), *Frontiers in Molecular Biology. Mechanisms of Protein Folding*, Oxford Univ. Press, Oxford, 2000, pp. 175–211.
- [42] M. Auton, D.W. Bolen, Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 15065–15068.
- [43] M. Auton, D.W. Bolen, Additive transfer free energies of the peptide backbone unit that are independent of the model compound and the choice of concentration scale, *Biochemistry* 43 (2004) 1329–1342.
- [44] F.C. Bernstein, T.F. Koetzle, G.J.B. Williams, E.F. Meyer, M.D. Brice, J.R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures, *J. Mol. Biol.* 112 (1977) 535–542.
- [45] S. Solís-Mendiola, L.H. Gutiérrez-González, A. Arroyo-Reyna, J. Padilla-Zúñiga, A. Rojo-Domínguez, A. Hernández-Arana, pH dependence of the activation parameters for chymopapain unfolding: influence of ion pairs on the kinetic stability of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1388 (1998) 363–372.