
Propiedades Termodinámicas del Efecto Hidrofóbico en la Estabilidad Proteica

Thermodynamic Properties of Hydrophobic Effect in Protein Folding

Ricardo Espinosa Silva ^a

^aCentro de Química Inorgánica (CEQUINOR), CONICET, Universidad Nacional de la Plata, 47 Esq. 115, (1900).
La plata, Argentina.

Recibido: 10/6/2015; revisado: 26/6/2015; aceptado: 10/7/2015

Ricardo Espinosa Silva: Propiedades Termodinámicas del Efecto Hidrofóbico en la Estabilidad Proteica. *Jou.Cie.Ing.* 7 (1): 1-9, 2015. ISSN 2145-2628.

Resumen

Cuando hablamos de desnaturalización proteica evocamos la paradoja de Levinthal y reconocemos que la edad del universo no es suficiente para muestrear la probabilidad de conformaciones estructurales que puede optar una proteína. Con el avance de las técnicas experimentales logramos determinar estados estructurales de la conformación proteica, más aun no es posible predecir a partir de una secuencia lineal de aminoácidos, cual sera su estructura 3D funcional. Algunos autores proponen que más allá de la importancia de las interacciones proteína-proteína, son las interacciones con el agua las que organizan la estructura terciaria funcional y que fuerzas no covalentes como el efecto hidrofóbico y las interacciones de van der Waals podrían tener un efecto sinérgico que medien las conformaciones nativas de mínima energía de una proteína.

Palabras Clave: Efecto hidrofóbico, desnaturalización, fuerzas no covalentes, estructura nativa.

Abstract

When we talk about protein denaturation remember the Levinthal paradox and recognize that the age of the universe is not enough to sample the probability of structural conformations that may choose a protein. With the advancement of the experimental techniques we determine structural states of the protein conformation, even more cannot be predicted from a linear sequence of amino acids which will be functional 3D structure. Some authors propose that beyond the importance of protein-protein interactions are interactions with water who completing tertiary functional organization and non-covalent forces such as hydrophobic effect and van der Waals interactions could have an effect mediate synergistic native minimum energy conformations of a protein.

Keywords: Hydrophobic effect, unfolding, non-covalent interactions, native state.

1. Introducción

Tal vez uno de los retos más importantes que afronta la Biofísica actualmente, es el que refiere al plegamiento proteico. Con los avances en dispersión de rayos X [1] y resonancia magnética nuclear (RMN) [2], se han logrado describir niveles de organización mo-

lecular característicos durante el plegamiento proteico, antes de la formación de la estructura funcional nativa. A pesar, de las distinciones estructurales (estructura primaria, secundaria, terciaria, cuaternaria) que puede tener una proteína en su cinética de plegamiento, hasta ahora no ha sido posible una caracterización dinámica que permita predecir de forma global cual sera la orga-

nización geométrica que optara una proteína funcional.

Al respecto Levinthal señala, que dado el alto número de grados de libertad de una cadena polipeptídica, una proteína puede adquirir una gran cantidad de configuraciones estructurales, 5×10^{47} configuraciones para una cadena polipeptídica de 100 aminoácidos, y que si dichas configuraciones son muestreadas a razón de 1013 por segundo, se requerirán 1027 años para obtener una estructura nativa. De lo anterior, Levinthal concluye que las búsquedas aleatorias no son una forma eficaz de encontrar el estado correcto de plegamiento proteico [3]. Por tanto, debe existir un mecanismo direccionador que conlleve a que los tiempos de plegamiento sean reducidos a escalas de microsegundos.

La paradoja de Levinthal, expuesta anteriormente, solo tiene presente dentro de sus variables conformacionales las interacciones entre aminoácidos. Como sabemos las proteínas están inmersas en una matriz soluble, agua, que en condiciones fisiológicas presentan una concentración de iones y pH importantes para su estructura.

Para comprender la dinámica de plegamiento proteico, algunos autores abordaron esta problemática analizando los perfiles termodinámicos de la desnaturalización proteica. De igual forma, dado que la vida que conocemos se lleva a cabo predominantemente en presencia de agua, el entendimiento de las interacciones macromoleculares con agua ha sido durante varias décadas uno de los desafíos más importantes de la biofísica molecular, generándose interrogantes como: ¿cuál es el rol del agua en la estabilización de estructuras moleculares? ¿Cuáles son las fuerzas que dominan en la organización estructural? ¿Cuáles son los mecanismos dinámicos que rige los movimientos de organización agua-macromolécula y sus fluctuaciones estructurales?. En otras palabras ¿cuál es el aporte del agua al paisaje de energía libre en el autoensamble y organización estructural de macromoléculas? [4]

Para dar respuestas a estos interrogantes es necesaria una descripción termodinámica, cinética y estructural de las propiedades microscópicas de las interfaces agua-macromoléculas. Entonces, al abordar el nivel microscópico encontramos que la temperatura es uno de los parámetros más importantes que definen el comportamiento de la materia viviente, por ejemplo, una proteína estable puede ser desnaturalizada por altas ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) o bajas (entre 0 y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperaturas [5, 6]. Aunque el término "desnaturalización" es ampliamente entendido para la desnaturalización por calor, aquella que ocurre por bajas temperaturas es conocida como "desnaturalización en frío" que también puede ser inducida por alta presión [6, 7]. Sin embargo, en las últimas décadas en el campo de la biología, la presión hidrostática

se ha convertido en una importante herramienta fisicoquímica para el estudio de macromoléculas de interés biológico. A pesar de que a nivel microscópico, presiones por debajo de 10 kbar, raramente rompen los enlaces covalentes, los efectos predominantes de la presión están implicados en las conformaciones macromoleculares que son mantenidas, en condiciones normales, por fuerzas débiles tales como puentes de hidrogeno, fuerzas de van der Waals y efecto hidrofóbico [8]. En este último, haremos una vital énfasis dados los paradigmas que encierran su definición y modo de acción.

De esta manera, la presente revisión tiene como finalidad contextualizar al lector en la problemática, las definiciones, los modelos y las teorías que engloban el estudio de las fluctuaciones estructurales en función de la presión y la temperatura centrándonos principalmente en las proteínas.

2. El Efecto hidrofóbico

El término efecto hidrofóbico o también llamada interacción hidrofóbica denota la tendencia, relativamente no polar de las moléculas de permanecer juntas en soluciones acuosas. Estas interacciones son importantes en procesos de interacción enzima-sustrato, ensamble de lípidos en biomembranas, agregación de surfactantes, formación de micelas, lamelas, vesículas, efectos cinéticos del solvente, específicamente en soluciones de agua donde predominantemente gobierna dicho efecto.

A temperatura y presión moderada, los solutos no polares son insolubles en agua. Al introducir estos compuestos en agua, esta forma una red extendida de puentes de hidrógeno, conduciendo inevitablemente a la reorganización de las moléculas de agua cercanas a la superficie de la molécula no polar. Es importante resaltar que el agua es el único solvente con la capacidad de formar una red molecular de coordinación tetraédrica, que al estar en contacto con una partícula hidrofóbica envuelve dicha partícula optimizando entre sí sus puentes de hidrógeno, formando simultáneamente, una red molecular de coordinación hexagonal. Es por estas razones que el agua es considerada un solvente pobre para compuestos no polares [9].

Uno de los primeros modelos propuestos, que después se convertiría en el primer prototipo para los subsecuentes estudios en el efecto hidrofóbico; fue propuesto por Frank y Evans en 1945 [10]. El modelo, generalmente conocido como el modelo del Iceberg, explica la inusual pérdida de la entropía de los gases no polares en agua, en términos de la estructuración de las moléculas de agua cercanas a estos soluto. Esta idea

sería interpretada en estudios posteriores, como una esfera de hidratación rígida sobre los solutos no polares, originando estructuras en forma de clatratos. Fenómeno referido como hidratación hidrofóbica.

Podríamos decir entonces, que la interacción de moléculas de agua con solutos no polares es entrópicamente desfavorable, lo que supondría, contra intuitivamente, que la agregación de estos en soluciones acuosas es un proceso altamente entrópico. En 1959 Kauzmann [11], introduce el concepto de interacción hidrofóbica, en el sugiere que las interacciones atractivas entre moléculas no polares en soluciones acuosas son producto del solvente, resultando de la superposición destructiva de las estructuras formadas durante la hidratación hidrofóbica, lo que implica la liberación de moléculas de agua desde la esfera de hidratación (Shell) hacia el agua bulk (aguas afuera de la región de hidratación) [9] (Ver figura 1). En conclusión, el concepto de hidrofobicidad está definido en términos netamente termodinámicos.

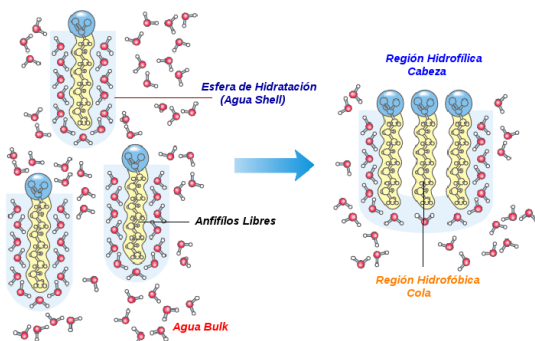


Fig. 1. Esquema representativo del efecto hidrofóbico en la agregación de anfifilos. En la gráfica se observa la hidratación de la zona polar (Región hidrofílica) y no polar (Región hidrofóbica). En esta última, las moléculas de agua se ordenan formando un red ordenada de hidratación (Agua Shell) que disminuye la entropía del sistema. Al aumentar la concentración de anfifilos estos se agregan liberando moléculas de agua hacia la región de aguas bulk, fuera de la esfera de hidratación aumentando la entropía del sistema.

3. Estabilidad y conformación de proteínas

Durante casi un siglo el plegamiento y estabilidad de proteínas nativas ha recorrido un arduo y extenso camino de investigación. En la actualidad, es ampliamente aceptado que el efecto hidrofóbico juega un papel importante en la estabilidad del plegamiento estructural de proteínas solubles en agua [12]. Es así como la dis-

tribución espacial de los aminoácidos no polares, dentro de una proteína nativa, se organizan en un núcleo hidrofóbico que minimiza la exposición al solvente, a lo que, como vimos anteriormente, Kauzmann llamaría interacción hidrofóbica [9–11] en relación a las interacciones entre cadenas de aminoácidos no polares, determinantes en la estabilidad de biopolímeros.

Con este concepto Kauzmann causaría controversia y abre el debate de si la estabilidad de las estructuras proteicas es causada por las interacciones de van der Waals entre cadenas hidrofóbicas o si es el agua la que induce la formación del núcleo no polar [9]. Al respecto, Privalov [12] argumenta que la interacción hidrofóbica representa la acción combinada de los dos procesos.

De igual forma, dentro de la estructura nativa existe una variedad de fuerzas intermoleculares entre residuos aminoácidos que estabilizan la proteína. La primera contribución a la estabilidad de proteínas la provee los enlaces covalentes, los cuales determina la estructura y estabilidad del esqueleto de proteico. Sin embargo, las energías asociadas con los enlaces covalentes no presentan diferencias significativas en los estados nativo y desnaturado [13].

La contribución dominante a la estabilidad de las proteínas involucra fuerzas no covalentes como [9, 13]:

- Interacciones electrostáticas de largo alcance, que pueden ser intraproteicas, de agua-proteína y de proteína con especies iónicas presentes en el solvente. Estas últimas de vital importancia en la superficie proteica. Dependiendo del signo y la orientación de los patrones de interacción estas pueden ser atractivas o repulsivas.
- Los puentes de hidrógeno que presentan una gran especificidad en su interacción, pueden ser intraproteicos, estabilizando las estructuras secundarias hélices α y hojas β , además de la estructura terciaria. Los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua alrededor de la proteína definen las propiedades de la esfera de hidratación, mientras que, los puentes de hidrógeno entre grupos proteicos y el agua, internos y superficiales, repercuten ampliamente en la flexibilidad de la proteína.
- Interacciones de atracción y repulsión de corto alcance tipo van der Waals.
- Las interacciones hidrofóbicas que están fuertemente correlacionadas con la estructura del agua, ocasionando cambios en el volumen del sistema y una disminución de los grados de libertad configuracionales de las moléculas. Así, el número de puentes de hidrógeno por molécula de agua con el soluto no polar es bajo cerca de la esfera de hidratación. Por tanto, estas moléculas de agua son estructuralmente

restrictivas, ya que maximizan el número de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua vecinas. Este aumento en la estructuración disminuye la densidad al rededor de la esfera de hidratación en un 30 %. Entonces por razones entrópicas, el secuestro de grupos no polares al interior de la proteína es energéticamente favorable.

- Los dipolos permanentes e inducidos, que generalmente son cuantificados como fuerzas de van der Waals, también son importantes en la estabilización de la estructura nativa.

Una considerable contribución a los parámetros termodinámicos en la conformación proteica son los cambios en la estructura del agua que rodea los grupos polares y no polares, ya que ambos estructuran las moléculas de agua a su alrededor de manera diferente. Por ejemplo, el campo electrostático al rededor de los grupos polares ordena las moléculas de agua en interacciones ion-dipolo y dipolo-dipolo. Por tanto, la energía de solvatación es favorable y la contribución a esta es principalmente entálpica. Sin embargo, estudios por difracción de neutrones de alta energía muestran que las cargas iónicas son disruptivas, lo que lleva a una disminución en el número de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua. No obstante, el ordenamiento de las moléculas de agua asociadas a la partícula polar está asociada con una reducción en la entropía que contribuye a la energía del proceso. Por su parte, en los residuos no polares se ordena la estructura del agua y se optimizan los puentes de hidrógeno entre las guas. Se crea un fuerte entorno de hidratación donde la autodifusión y la reorientación de las moléculas de agua disminuye alrededor de un 20 %, reduciendo la entropía [13].

Finalmente en la superficie de hidratación, es posible encontrar moléculas de agua internas que contribuyen en la estabilidad de la proteína, proveyendo la flexibilidad necesaria para sus actividades biológicas [14].

4. Algunos aspectos termodinámicos

Para comprender los aspectos termodinámicos que estabilizan una proteína, en ciertos casos, es suficiente con describir la transición entre dos estados, el estado nativo N y el estado desnaturalizado D . Las transiciones $N - D$ en proteínas están dadas por procesos altamente cooperativos. Un modelo simple para expresar la estabilidad en las proteínas es aquel que considera el estado plegado-desplegado como una transición de fase. Así, los cambios en la energía libre están asociados con la transición $\Delta G = G_D - G_N$. Sin embargo, hay múltiples maneras de inducir la transición en DG, lo que lo

convierte en una función multidimensional donde todos sus parámetros pueden estar variando independientemente en un experimento, e.j. temperatura T , presión P , cosolvente x , concentración del cosolvente c_x , pH , etc., entonces:

$$\Delta G = \Delta G_0 + f(T, P, c, pH, \dots) \quad (1)$$

donde ΔG_0 depende solamente del estado de referencia. La función f , contiene todos los parámetros del sistema que caracterizan la transición de desnaturalización de una proteína en agua, es decir, cambios de entropía, compresibilidad, calor específico, expansión térmica, etc. Si estos parámetros no dependen fuertemente de las condiciones experimentales (P, T, etc) una expansión de segundo orden en términos de los parámetros de control P, T , etc., es suficiente para describir que el límite de la fase está determinado por la condición $\Delta G = 0$.

Ahora, de los parámetros asociados con el solvente, consideremos que son constantes y solo analicemos las variaciones en P y T . Entonces, la transición estaría caracterizada por el calor latente, y consecuentemente estará gobernada por la ecuación de Clausius-Clapeyron.

$$dP/dT = \Delta S/\Delta V \quad (2)$$

ΔS y ΔV son los cambios de entropía y volumen asociados con la transición, donde ambos valores son dependientes de P y T . Por tanto, con la primera derivada del volumen con respecto a P y T obtendremos ΔV , donde los cambio en volumen respecto a la presión y la temperatura están fuertemente relacionados con la compresibilidad y la expansión térmica de la proteína, respectivamente. En igual orden de ideas, la derivada de la entropía con respecto a P y T estará asociada con la expansión térmica y la capacidad calórica $C_P = T(\partial S/\partial T)$, respectivamente.

Si ΔS y ΔV en la Ec. 2 depende linealmente de T y P , la ecuación puede ser integrada, resultado una curva de segundo orden en P y T que puede ser de forma elíptica, parabólica, o hiperbólica:

$$aP^2 + bT^2 + 2cPT + 2fP + 2gT + const = 0 \quad (3)$$

Los coeficientes a, b, c , etc., están relacionados con los cambios en los parámetros del sistema, $\Delta\beta_T, \Delta\alpha, \Delta C_p, \Delta V$ y ΔS a lo largo de la transición N-D [13].

5. Estabilidad vs. altas temperaturas

Durante la transición al estado desnaturalizado inducido por la temperatura, la proteína pasa de un estado estructuralmente bien organizado a otro con características aleatorias, en el que por ejemplo, los aminoácidos hidrofóbicos pueden estar en contacto con el agua. Como hemos venido observando, las moléculas hidrofóbicas en contacto con agua, ordenan la estructura de la misma en lo que denominamos iceberg. Este ordenamiento local es caracterizado por una baja entropía, así como, una baja entalpía dado el alineamiento geométrico de los puentes de hidrógeno. Como consecuencia, estas estructuras están asociadas con un alto calor específico, requiriendo energía para fundirlas. Así, los cambios en el calor específico asociados con la transición N-D están dados por $\Delta C_p = C_{pD} - C_{pN}$, donde se asume que este valor es generalmente positivo. Entonces, si $\Delta C_p > 0$, la diferencia en entalpía, ΔH , en los estados N - D incrementa con la temperatura acorde con $\Delta H(T) = H(T_c) + \Delta C_p(T - T_c)$. Al mismo tiempo, la diferencia en la entropía, ΔS , incrementa mientras la estructura del solvente se funde. De esta forma a una temperatura crítica o de transición $T = T_c$, el término entálpico, ΔH , y el entrópico, $-T\Delta S$, se cancelan y el cambio en ΔG es igual a cero. En altas temperaturas, $T = T_c$ y la transición al estado desnaturalizado es energéticamente más favorable [12, 13].

6. Estabilidad vs. bajas temperaturas

Un argumento similar al anteriormente expuesto, podría ser utilizado para explicar la desnaturalización por bajas temperaturas. En este caso denominaremos a la temperatura crítica de desnaturalización, T_d . Así T_d , por ende, a bajas temperaturas el término entálpico decrece llegando a ser negativo y compensando el término entrópico, $T\Delta S$, que se hace positivo al disminuir la entropía. Esto se observa mejor en la figura 2, donde el comportamiento de ΔG para una proteína cualquiera, indica la presencia de dos fases de transición para $\Delta G(T) = 0$. Dichas transiciones corresponden a $T = T_c$, para altas temperaturas y $T = -30^\circ\text{C}$ (T_d), para bajas temperaturas [13-15].

En proteínas "típicas" como la analizada en la figura 2, la desnaturalización en frío ocurre a temperaturas inferiores al punto de congelación del agua, lo cual es una característica indeseable desde el punto de vista de los estudios experimentales, que para evitar este inconveniente utilizaban anticongelantes, mutaciones puntuales en la proteína, desnaturalizantes químicos, altas presio-

nes etc. [16, 17], modificando cualitativamente los T_c y T_d de las proteínas. Sin embargo, hace poco se descubrió que la Frataxina, Yfh1 [18], tiene la capacidad de desnaturalizar a 0°C en condiciones fisiológicas, obteniendo un mejor perfil termodinámico del proceso.

Siguiendo un poco con lo analizado en la figura 2, la desnaturalización en frío en proteínas puede ser interpretada desde el punto de vista del efecto hidrofóbico. Por ejemplo, la transferencia de moléculas hidrofóbicas en estado líquido al agua pueden ser entendidas en términos de la energía libre de Gibbs como: $G = G_{\text{Agua}} - G_{\text{Soluta}}$. Si ΔG es positivo, los solutos no polares se organizan unos con otros, evitando las moléculas de agua, de esta forma cuando más positivo es el término ΔG , hay una mayor tendencia de los solutos a agregarse. Si ΔG es negativo, implica que las moléculas de soluto son solubles en agua.

Un ejemplo de esto lo podemos ver con la energía de transferencia, $21,9 \text{ kJ mol}^{-1}$, de moléculas de metano en agua a 25°C . Donde la contribución entálpica al ΔG es negativo, $-4,3 \text{ kJ mol}^{-1}$, mientras que la contribución entrópica, $-T\Delta S$, es positiva, $28,7 \text{ kJ mol}^{-1}$. En otras palabras, la hidratación de solutos no polares se caracteriza por un pequeño valor favorable de entalpía y un elevado valor desfavorable de entropía [12, 15].

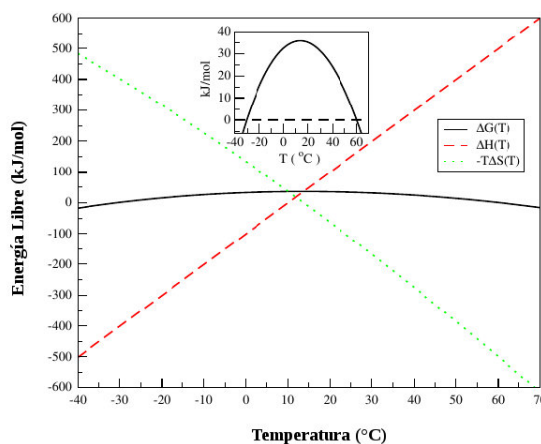


Fig. 2. Energía libre de Gibbs $\Delta G(T)$ dependiente de la temperatura. $-T\Delta S(T)$ y $\Delta H(T)$ hacen referencia a la energía entrópica y entalpía de una proteína nativa. En el recuadro superior se observa la energía libre de Gibbs en estado nativo y desnaturalizado para T_c y T_d , que se explican en el texto. Tomado de [12].

Simplificando, en la hidratación hidrofóbica, la primera esfera de hidratación (Shell Water) es más ordenada y forma más puentes de hidrogeno que las aguas fuera de esta esfera (Bulk Water). La formación de cajas

de clatrato minimizan la energía libre de las aguas en la shell, aunque, esta energía libre es mayor comparada con las aguas del bulk, por lo cual la energía libre de hidratación es positiva. Cuanto más solutos son agregados al agua estos se agrupan reduciendo en número de aguas en la shell. De esta manera en la interacción hidrofóbica, la agregación de solutos incrementa la entropía y la entalpía del sistema (Ver figura 1). Sin embargo, esta es estabilizada por la entropía y desestabilizada por la entalpía. Asimismo, no debemos olvidar que la interacción hidrofóbica se debilita con la disminución de la temperatura, lo cual es algo contra-intuitivo si tenemos presente que la interacción entre átomos incrementa cuando la energía térmica disminuye. Al enfriar una proteína, el efecto estabilizante de la entropía y el desestabilizante de la entalpía, incrementan, indicando que las diferencias entre el agua bulk y shell aumentan con el descenso de la temperatura. Aun así, los términos entrópicos y entálpicos no tienen la misma tasa de cambio. La penalidad entálpica incrementa más rápido con el enfriamiento, conllevando al debilitamiento de la interacción hidrofóbica [15].

De lo anterior, Privalov expone que en el microestado, el mecanismo de desnaturalización en frío, es explicado por la solvatación de los residuos de aminoácidos presentes en el núcleo proteico, favorecida por la contribución entálpica en la hidratación de los aminoácidos polares y no polares [12, 18, 19]. Sin embargo, Muller argumenta que la compensación entálpica realmente implica la optimización de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua presentes en la interface agua-solutos hidrofóbicos [20].

Recientemente, Dias y colaboradores [21], tratan de dar una descripción atómica del mecanismo de desnaturalización en frío dependiente de la temperatura, modelando homopolímeros no polares utilizando el modelo de agua Mercedes-Benz (MB) [22]. Las moléculas de agua interactúan con un potencial de van der Waals y la interacción de los puentes de hidrógenos son modelados con un potencial Gaussiano, favoreciendo la distancia y orientación entre moléculas de agua. Los resultados de las simulaciones muestran que la energía de los puentes de hidrógeno es mayor en las aguas shell que las aguas bulk. En este modelo, en soluciones congeladas es energéticamente más favorable el incremento de la superficie proteica expuesta al solvente, induciendo la desnaturalización proteica. De esta forma, las moléculas de agua forman cajas ordenadas al rededor de los residuos de la proteína por interacciones fuertes en sus puentes de hidrógeno, disminuyendo la entropía del agua e incrementando la entropía asociada con el desplegamiento proteico, aun así, la entropía total del siste-

ma decrece.

7. Estabilidad vs. alta presión.

El referirnos a la desnaturalización por presión, nos lleva a 1914 cuando Bridgman reporta el efecto de la presión en la coagulación de albumina [23]. En este artículo, el autor describe cualitativamente los efectos de la desnaturalización por presión, analizando además, el efecto aditivo que tienen las bajas temperaturas en el fenómeno. De esta forma, cuando se somete la albumina a 6000 atm a 0 °C ocasiona una rigidez mayor en la estructura proteica en relación a la producida por el sistema a 20 °C. Tal vez, lo más interesante del trabajo de Bridgman es el interrogante que se abre al final del mismo cuando expone:

“No he hecho ningún intento en determinar si la naturaleza de la coagulación producida por presión es igual a la producida por calor. Sí uno puede juzgar por las apariencias, los dos pueden ser diferentes.”

Después de esto, esta nueva e inadvertida problemática se mantuvo inactiva casi por medio siglo. En 1976, Weber y colaboradores, demuestran que la desnaturalización por presión de la lisozima y el quimiotripsinógeno no ocurren a través de una simple transición, sino por una pluralidad de procesos. Esto propuso la primera evidencia que contradecía el dogma de la desnaturalización proteica; en el cual, la desnaturalización está representada por los estados de reacción plegado-desplegado [8, 24].

En proteínas, la presión puede inducir cambios que van desde pequeños efectos conformacionales, variaciones en la compresibilidad y la fluctuación en la población de estados intermediarios, hasta la completa pérdida del estado nativo. Sin embargo, la estructura secundaria no es sensitiva a la presión, ya que los puentes de hidrógeno en las hélices α y las hojas β son altamente incompresibles, incluso a presiones cercanas a 10 kbar [8].

Con el paso del tiempo, muchos autores han propuesto teorías para la desnaturalización por alta presión, llegando a un desacuerdo en lo que respecta a la acción de la presión en la organización de los microestados proteicos.

Algunos autores proponen la disminución del efecto hidrofóbico con el aumento de la presión, es decir, se desestabiliza el sistema solvente-proteína y se exponen los residuos no polares al solvente [25–27]. Mientras que para otros, las proteínas en alta presión son penetra-

das por el solvente, así las interacciones de corto alcance entre aminoácidos son reemplazadas por interacciones con el agua [28]. Esto último, implica que la formación de estructuras nativas sea extremadamente dependiente de la formación de cavidades excluyentes de moléculas de agua [29].

Un ejemplo termodinámico simple, respecto al debate anteriormente expuesto, del efecto de la presión en la constatación de equilibrio K de un proceso, está dado por:

$$\left(\frac{\partial (\ln [K])}{\partial p} \right) = - \frac{\Delta V}{RT} \quad (4)$$

donde ΔV es el cambio de volumen, R la constante universal de los gases, T la temperatura y P la presión. Entonces, un proceso en el que sea favorecido el aumento de la presión tendría como resultado la disminución del volumen del sistema ($-\Delta V$). Para el caso de la interacción hidrofóbica, la esfera de hidratación cercana a la superficie de los solutos no polares trasciende de un estado de baja a alta densidad, lo que hace pensar que la presión optimiza la interacción hidrofóbica. Esta afirmación solo es aplicable en valores moderados de presión, ya que eventualmente con el aumento de la presión la interacción hidrofóbica se ve debilitada. De esta forma, en altas presiones la región de hidratación de estructuras no polares, está compuesta principalmente por agua de alta densidad. Como consecuencia la asociación de partículas no polares y la liberación de las moléculas de agua de la esfera de hidratación no ofrece ninguna ganancia entrópica, lo que desfavorece la interacción hidrofóbica [27].

8. Diagrama de fase proteico T-P

Generalmente, para un determinado valor de T y P , los sistemas tienden a minimizar la energía libre de Gibbs, que en nuestro caso viene dado por el balance de energía libre entre las moléculas de agua y los residuos proteicos. De esta forma, la diferencia entre los estados $\Delta G = G_D - G_N$, está dada por:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0, \quad (5)$$

donde $\Delta H = H_D - H_N$ y $\Delta S = S_D - S_N$. Ahora bien, la variación total en la entropía del sistema está dada por $\Delta S = S_p + S_w$, donde S_p y S_w hacen referencia a la variación entrópica de los residuos proteicos y las moléculas de agua, respectivamente. Para la desnaturalización, la entropía incrementa $\Delta S_p > 0$. De igual manera, la contribución al ΔH es positiva, $\Delta H > 0$; que como hemos venido analizando, la entalpía de las proteínas aumenta al desplegarse. Por tanto, la contri-

bución al ΔG , por parte del $H_p - T\Delta S_p$, puede ser positivo o negativo dependiendo de la variación relativa de la temperatura, lo cual no garantiza que la Ec. 5 sea satisfecha. De allí la importancia del agua en el modelo.

Los datos experimentales del diagrama de fase de estabilidad proteica en el plano de P - T , es consistente con la forma elíptica que se muestra en la figura 3, según el trabajo presentado en 1971 por Hawley [30]. En relación a este trabajo, es posible calcular el ΔG del sistema proteína-agua asumiendo los dos estados $N - D$. Sí tenemos en cuenta que la energía interna U del sistema, podemos expresar la variación infinitesimal dU , como función de dos cantidades termodinámicas. Así, si asumimos que el proceso de desnaturalización puede ser descrito por una transformación infinitesimal cuasi-estática, aplicando la primera ley de la termodinámica, tenemos:

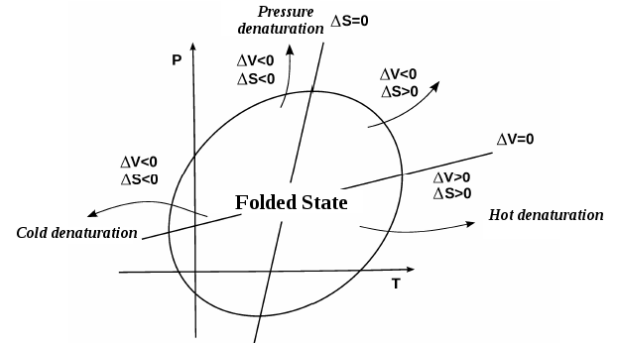


Fig. 3. Proyección en el plano $P - T$, que representa el diagrama de fase elíptico de una proteína. Dentro del elipse la proteína conserva su condición nativa. Fuera de esta la proteína puede ser desnaturalizada por el aumento en T (Hot denaturation) y P (Pressure Denaturation) y por el descenso en T (Cold denaturation). Cada proceso $N - D$, está caracterizado por diferentes variaciones en ΔS y ΔV . Tomado de [31].

$$\delta U = \delta Q - \Delta W, \quad (6)$$

donde ΔQ y ΔW , son el calor infinitesimal absorbido y el trabajo infinitesimal hecho por el sistema, respectivamente, a lo largo de la transformación. Ya que a T y P constante, $Q = T dS$ y $\Delta W = PdV$, la variación de energía interna para un número constante de partículas N , puede ser expresada de la forma:

$$dU = TdS - PdV \equiv dU(S, V). \quad (7)$$

A diferencia de $H = U + PV$, obtenemos,

$$\begin{aligned} dH &= dU + PdV + VdP \\ &= TdS + PdV \equiv dH(S, V), \end{aligned} \quad (8)$$

y a diferencia de $G = H - TS$, finalmente obtenemos,

$$\begin{aligned} dG &= dH - TdS - SdT \\ &= -SdT + VdP \equiv dG(S, V). \end{aligned} \quad (9)$$

Por tanto,

$$d\Delta G = -\Delta SdT + \Delta VdP \quad (10)$$

con $\Delta S = S_D - S_N$, y $\Delta V = V_D - V_N$. Asumiendo que ΔS y ΔV son T y P dependientes, obtenemos:

$$\begin{aligned} \Delta S &= \Delta S_0 + \left(\frac{\partial \Delta S_0}{\partial T} \right)_P (T - T_0) \\ &\quad + \left(\frac{\partial \Delta S_0}{\partial P} \right)_T (P - P_0), \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \Delta V &= \Delta V_0 + \left(\frac{\partial \Delta V_0}{\partial T} \right)_P (T - T_0) \\ &\quad + \left(\frac{\partial \Delta V_0}{\partial P} \right)_T (P - P_0), \end{aligned} \quad (12)$$

integrando las ecuaciones 11 y 12:

$$\begin{aligned} \Delta G(P, T) &= \frac{\Delta \beta}{2} (P - P_0)^2 + \\ &2\Delta \alpha (P - P_0) (T - T_0) - \Delta C_p [(T - T_0) \\ &- T_0 \ln(T - T_0) + \Delta V_0 (P - P_0) \\ &- \Delta S_0 (T - T_0) \\ &+ \Delta G_0 \end{aligned} \quad (13)$$

Así, obtenemos una expresión de la forma predicha en la Ec. 3, donde ΔG_0 , ΔV_0 , y ΔS_0 , son las condiciones de referencia cuando P_0 (0.1 MPa) y T_0 (298 K). Se asume que los parámetros de segundo orden $\Delta \alpha$, $\Delta \beta$, C_p son independientes de la presión y la temperatura.

De esta manera y retornando nuevamente a la figura 3, la presión máxima a la cual se estabiliza la proteína, $d\Delta G/dT = \Delta S = 0$, y a la temperatura máxima a la cual se estabiliza la proteína $d\Delta G/dP = \Delta V = 0$. Así, basados en la teoría de Hawley es posible hacer predicciones generales acerca de los cambios en ΔV y ΔS , tal como se muestra en la figura 3.

9. Conclusiones

Como hemos notado el plegado y desplegado proteico esta caracterizado termodinamicamente. El problema real radica en la interpretación de los microestados estructurales de las proteínas y su relación con las conformaciones adoptadas por el solvente. Por tanto, aun no se logra un modelo unánime que determine, según

los aportes del ΔS y ΔH , cuales serán dichas configuraciones estructurales. Si fuera posible conocer las variaciones conformacionales ocasionadas en el diagrama de fase para un determinado valor T-P, podríamos incorporar a los algoritmos de predicción de estructuras proteicas información valiosa que ayudara a entender cómo funciona el plegamiento estructural de las proteínas nativas.

Agradecimientos

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), el Centro de Estudios Avanzados (CEA), el Centro de Física y el Laboratorio de Física Estadística de Sistemas de Desordenados por facilitar la infraestructura requerida para la realización de este trabajo.

Referencias

- [1] Haydyn DT Mertens and Dmitri I Svergun. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle x-ray solution scattering. *Journal of structural biology*, 172(1):128–141, 2010.
- [2] David R Shortle. Structural analysis of non-native states of proteins by nmr methods. *Current opinion in structural biology*, 6(1):24–30, 1996.
- [3] Robert Zwanzig, Attila Szabo, and Biman Bagchi. Levinthal's paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(1):20–22, 1992.
- [4] Wolfgang Doster and Marcus Settles. Protein–water displacement distributions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1749(2):173–186, 2005.
- [5] Miquel Adrover, Veronica Esposito, Gabriel Martorell, Annalisa Pastore, and Piero Andrea Temussi. Understanding cold denaturation: the case study of yfh1. *Journal of the American Chemical Society*, 132(45):16240–16246, 2010.
- [6] Cristiano L Dias, Tapio Ala-Nissila, Jirasak Wong-ekkabut, Ilpo Vattulainen, Martin Grant, and Mikko Karttunen. The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. *Cryobiology*, 60(1):91–99, 2010.
- [7] Gerhard Hummer, Shekhar Garde, Angel E García, Michael E Paulaitis, and Lawrence R Pratt. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4):1552–1555, 1998.
- [8] Jerson L Silva, Andrea C Oliveira, Tuane CRG Vieira, Guilherme AP de Oliveira, Marisa C Suarez, and Debora Foguel. High-pressure chemical biology and biotechnology. *Chemical reviews*, 114(14):7239–7267, 2014.
- [9] Wilfried Blokzijl and Jan BFN Engberts. Hydrophobic effects. opinions and facts. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(11):1545–1579, 1993.
- [10] Henry S Frank and Marjorie W Evans. Free volume and entropy in condensed systems iii. entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes. *The Journal of Chemical Physics*, 13(11):507–532, 1945.

- [11] W Kauzmann. Some factors in the interpretation of the protein denaturation. *Advances in protein chemistry*, 14:1, 1959.
- [12] Peter L Privalov. Cold denaturation of protein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 25(4):281–306, 1990.
- [13] Christina Scharnagl, Maria Reif, and Josef Friedrich. Stability of proteins: temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1749(2):187–213, 2005.
- [14] Kazufumi Takano, Jun Funahashi, Yuriko Yamagata, Satoshi Fujii, and Katsuhide Yutani. Contribution of water molecules in the interior of a protein to the conformational stability. *Journal of molecular biology*, 274(1):132–142, 1997.
- [15] CL Dias, T Ala-Nissila, J Wong-ekkabut, I Vattulainen, M Grant, and M Karttunen. The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. *Cryobiology*, 60(1):91, 2010.
- [16] Annalisa Pastore, Stephen R Martin, Anastasia Politou, Kalyan C Kondapalli, Timothy Stemmler, and Piero A Temussi. Unbiased cold denaturation: low-and high-temperature unfolding of yeast frataxin under physiological conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 129(17):5374–5375, 2007.
- [17] Piero Andrea Temussi. Cold denaturation and protein stability. In *Supramolecular Structure and Function 10*, pages 75–85. Springer, 2011.
- [18] Miquel Adrover, Gabriel Martorell, Stephen R Martin, Dunja Urosev, Petr V Konarev, Dmitri I Svergun, Xavier Daura, Pierandrea Temussi, and Annalisa Pastore. The role of hydration in protein stability: Comparison of the cold and heat unfolded states of yfh1. *Journal of molecular biology*, 417(5):413–424, 2012.
- [19] Domenico Sanfelice, Rita Puglisi, Stephen R Martin, Lorenzo Di Bari, Annalisa Pastore, and Piero Andrea Temussi. Yeast frataxin is stabilized by low salt concentrations: cold denaturation disentangles ionic strength effects from specific interactions. 2014.
- [20] Norbert Muller. Search for a realistic view of hydrophobic effects. *Accounts of Chemical Research*, 23(1):23–28, 1990.
- [21] Cristiano L Dias, Tapio Ala-Nissila, Mikko Karttunen, Ilpo Vattulainen, and Martin Grant. Microscopic mechanism for cold denaturation. *Physical review letters*, 100(11):118101, 2008.
- [22] A Ben-Naim. Statistical mechanical study of hydrophobic interaction. ii. interaction among a set of m identical, spherical, and nonpolar solute particles. *The Journal of Chemical Physics*, 54(9):3696–3711, 1971.
- [23] P.W. Bridgman. The coagulation of albumen by pressure. *The Journal of Biological Chemistry*, (1):511–512, 1914.
- [24] Thomas M Li, John W Hook III, Harry G Drickamer, and Gregorio Weber. Plurality of pressure-denatured forms in chymotrypsinogen and lysozyme. *Biochemistry*, 15(25):5571–5580, 1976.
- [25] W. Kauzmann. Thermodynamics of unfolding. *Nature*, (325):763–764, 1987.
- [26] Tohru Yamaguchi, Hiroaki Yamada, and Kazuyuki Akasaka. Thermodynamics of unfolding of ribonuclease a under high pressure. a study by proton nmr. *Journal of molecular biology*, 250(5):689–694, 1995.
- [27] J Raúl Grigera and Andres N McCarthy. The behavior of the hydrophobic effect under pressure and protein denaturation. *Biophysical journal*, 98(8):1626–1631, 2010.
- [28] Gerhard Hummer, Shekhar Garde, Angel E Garcia, Michael E Paulaitis, and Lawrence R Pratt. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pages 1552–1555, 1998.
- [29] Julien Roche, Jose A Caro, Douglas R Norberto, Philippe Barthe, Christian Roumestand, Jamie L Schlessman, Angel E Garcia, Catherine A Royer, et al. Cavities determine the pressure unfolding of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(18):6945–6950, 2012.
- [30] SA Hawley. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 10(13):2436–2442, 1971.
- [31] Filip Meersman, Christopher M Dobson, and Karel Heremans. Protein unfolding, amyloid fibril formation and configurational energy landscapes under high pressure conditions. *Chemical Society Reviews*, 35(10):908–917, 2006.