

# ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE EL EFECTO HIDROFÓBICO DE ALANINA DISUELTA EN AGUA.

## INCIDENCE OF THE TEMPERATURE ON THE HYDROPHOBIC EFFECT OF ALANINE DISSOLVED IN WATER.

**D.G. Renzi, C.O. Stoico, and F. Vericat\***

Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Rosario

Bv. Ovidio Lagos y Ruta 33 - (2170) - Casilda - Argentina

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario

Suipacha 531 - (2000) - Rosario - Argentina

Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB) - Universidad Nacional de La Plata - CONICET

Calle 59 N° 789 - (1900) - La Plata - Argentina

Grupo de Aplicaciones Matemáticas y Estadísticas de la Facultad de Ingeniería (GAMEFI)

Universidad Nacional de La Plata - (1900) - La Plata - Argentina

*e-mail: vericat@iflysib.unlp.edu.ar*

El efecto hidrofóbico ocupa un lugar central en el estudio del plegamiento de las proteínas desde mediados del siglo pasado, cuando W. Kauzmann lo propuso como el principal responsable del colapso de éstas a su conformación nativa compacta, bajo condiciones fisiológicas normales. Experimentalmente se observa, que al variarle la temperatura al sistema se puede desplegar y replegar a una proteína, sin intervención de ningún otro elemento externo. Esto revela la importancia que presenta estudiar la influencia de la temperatura sobre ambos aspectos del efecto hidrofóbico: la hidratación hidrofóbica (estructura del agua alrededor de un aminoácido apolar) y la interacción hidrofóbica (el efecto neto que el medio acuoso ejerce sobre dos aminoácidos apolares disueltos en él). En este trabajo consideramos un sistema formado por alanina disuelta en agua y calculamos las funciones de distribución radial alanina-agua y alanina-alanina, para cuatro temperaturas diferentes (4C, 25C, 50C y 75C). Para esto, utilizamos dos técnicas distintas y a la vez complementarias: (1) una teoría mecánico-estadística de líquidos clásicos, y (2) simulación numérica mediante dinámica molecular. De nuestros resultados se observa que al aumentar la temperatura, la hidratación disminuye y la interacción hidrofóbica alanina-alanina se hace más intensa.

**Palabras Claves:** Hidrofobicidad, aminoácidos apolares, plegamiento de proteínas, soluciones acuosas.

The hydrophobic effect has played a central role in the study of proteins folding since W. Kauzmann proposed it as the main responsible for their collapse to the compact native conformation under normal physiological conditions. By changing the medium temperature a protein can be unfolded and folded again to its native conformation, without any other external action. This reveals the importance of studying the influence of the temperature on both aspects of the hydrophobic effect: the hydrophobic hydration and the hydrophobic interaction. In this work we consider a system formed by alanine residues dissolved in water and calculate the alanine-water and alanine-alanine radial distribution functions, at four different temperatures (4C, 25C, 50C and 75C). We use two complementary theoretic techniques: (1) a statistical mechanics theory of classical liquids, and (2) numerical simulations by molecular dynamics. From our results we conclude that when temperature is increased then the residue hydration diminishes and the alanine-alanine hydrophobic interaction becomes more intense.

**Key Word:** Hydrophobicity, non polar amino acids, protein folding, aqueous solutions.

### I. INTRODUCCIÓN

En trabajos anteriores<sup>(1)</sup>, calculamos las funciones de distribución radial residuo-agua y residuo-residuo a partir de la teoría semiempírica desarrollada por L. Pratt y D. Chandler<sup>(2)</sup> para moléculas apolares disueltas en agua ( $\rho_A \rightarrow 0$ ), y la aplicamos a los residuos de aminoácidos apolares. Esto nos permitió estudiar distintos aspectos del efecto hidrofóbico asociado a los aminoácidos apolares en condiciones fisiológicas normales, esto es, presión de 1 atm y temperatura igual a 300 K.

En esta ocasión, utilizamos el mismo modelo teórico para estudiar cómo afectan los cambios de temperatura a la hidratación e interacción hidrofóbica, del aminoácido apolar más simple (alanina).

### II. TEORÍA Y MODELO

En nuestro modelo consideramos tanto a las moléculas de alanina como a las de agua, esferas que interactúan entre sí a través de un potencial  $u(r)$  que depende solamente de la distancia  $r = |\vec{r}| = |\vec{r}_A - \vec{r}_k|$  entre ellas. Designamos con el subíndice "A" al residuo de alanina,

\* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

con “w” a las moléculas de agua y con “k” tanto a una molécula de alanina como a una de agua. Nuestro objetivo es determinar las funciones de distribución radial de pares  $g_{Ak}(r)$ , que representan una medida de la probabilidad de encontrar a una molécula de tipo  $k$  separada una distancia  $r$  de una molécula de alanina  $A$ . El modelo se completa dando el potencial de interacción directa entre pares de moléculas. Para esto, elegimos un potencial Lennard-Jones del tipo 12-6 de la forma,

$$u_{Ak}(r) = 4\varepsilon_{Ak} \left[ \left( \frac{\sigma_{Ak}}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{Ak}}{r} \right)^6 \right] \quad (1)$$

donde los parámetros  $\varepsilon_{Ak}$  y  $\sigma_{Ak}$  se definen a través de las relaciones usuales,

$$\begin{aligned} \sigma_{Ak} &= (\sigma_A + \sigma_k)/2 \\ \varepsilon_{Ak} &= \sqrt{\varepsilon_A \varepsilon_k} \end{aligned} \quad (2)$$

Los valores usados son:  $\sigma_A = 3,794 \text{ \AA}$  y  $\varepsilon_A/k_B = 148 \text{ K}$  para alanina, y  $\sigma_w = 3,166 \text{ \AA}$  y  $\varepsilon_w/k_B = 78,2 \text{ K}$  para el agua.

Las funciones de distribución radial se obtienen resolviendo ecuaciones del tipo Ornstein-Zernike con sus correspondientes clausuras,

$$h_{Aw}(r) = c_{Aw}(r) + \rho_w \int d\vec{r}' c_{Aw}(|\vec{r} - \vec{r}'|) h_{ww}(r') \quad (3a)$$

$$h_{AA}(r) = c_{AA}(r) + \rho_w \int d\vec{r}' c_{Aw}(|\vec{r} - \vec{r}'|) h_{Aw}(r') \quad (3b)$$

$$c_{Ak}(r) = 0 \quad r > \sigma_{Ak} \quad (3c)$$

$$h_{Ak}(r) = -1 \quad r < \sigma_{Ak} \quad (3d)$$

donde la función  $h_{ww}(r) = g_{ww}(r) - 1$  usada en la ecuación (ver ec.(3a)) es la función de correlación oxígeno-oxígeno para agua pura.

Para llevar a cabo los cálculos, necesitamos conocer la función de correlación de agua pura para diferentes valores de temperatura. En este trabajo, utilizamos funciones provenientes de dos procedimientos diferentes: (1) funciones obtenidas mediante difracción de rayos X<sup>(3)</sup>, (2) funciones obtenidas mediante simulación con dinámica molecular (DM)<sup>(4)</sup>. Con la opción (1) tenemos el privilegio de contar con funciones determinadas experimentalmente, pero estamos limitados a unos pocos valores de temperatura. La opción (2) nos brinda la posibilidad de realizar el cálculo para cualquier temperatura, y eventualmente, observar con mayor resolución o detalle algún intervalo de temperaturas que pudiera resultar particularmente interesante.

Para determinar a las funciones de distribución radial agua-agua de simulación, utilizamos una caja rectangular con 1024 moléculas de agua (modelo SPC/E<sup>(5)</sup>), condiciones periódicas de borde, un paso temporal de 2 fs, 200 ps para equilibrar al sistema y un tiempo total 1 ns con el que recolectamos 5000 configuraciones. En el cálculo de las funciones de distribución radial alanina-agua mediante DM, el sistema estuvo formado por 1

molécula de alanina y 1023 moléculas de agua. Los restantes parámetros de simulación fueron iguales a los de agua pura.

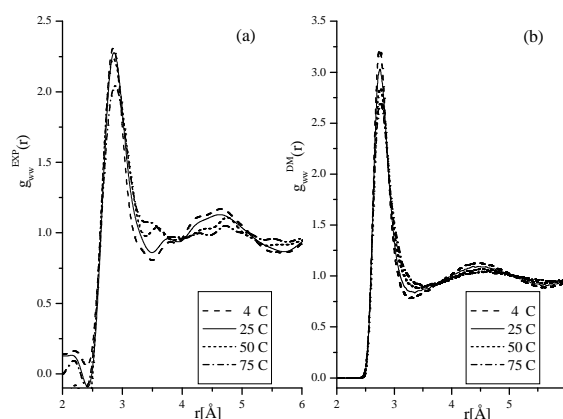
Calculamos la Interacción Hidrofóbica  $W_{AA}^{HH}(r)$  entre residuos de alanina, a partir del potencial de fuerza media y la interacción directa:

$$W_{AA}^{HH}(r) = W_{AA}(r) - u_{AA}(r) \quad (4)$$

donde  $W_{AA}(r) = -k_B T \ln g_{AA}(r)$  y  $u_{AA}(r)$  es el potencial de Lennard-Jones (ver ec.(1)).

### III. RESULTADOS

En la figura 1, presentamos a las funciones de



distribución radial de agua pura obtenidas en forma experimental y mediante simulación.

Figura 1. funciones de distribución radial de agua pura. (a) Experimental. (b) Dinámica Molecular.

La función de distribución radial  $g_{Aw}(r)$  da cuenta de la estructura que presentan las moléculas de agua alrededor del residuo de alanina. En primer lugar, determinamos esta función mediante simulación con Dinámica Molecular para cuatro temperaturas: 4C, 25C, 50C y 75C.

Luego, con la teoría mecánico-estadística descripta, calculamos la función de distribución radial alanina-agua para esas mismas temperaturas, y para ambas funciones de distribución radial de agua pura (la obtenida en forma experimental y mediante simulación). En la figura 2, mostramos las gráficas correspondientes a estas funciones.

En la figura 3, observamos las curvas correspondientes a la interacción hidrofóbica entre dos residuos de alanina, para las cuatro temperaturas estudiadas y las dos funciones de agua pura utilizada.

### IV. DISCUSIÓN

En la figura 1, vemos que las funciones de distribución radial para agua pura, “pierden” estructura a medida que la temperatura aumenta, esto es, el pico principal y el secundario disminuyen su altura, mientras que el primer mínimo de la función crece tendiendo rápidamente a uno.

En la figura 2, observamos las gráficas de las funciones de distribución radial  $g_{Aw}(r)$  obtenidas mediante: (a) simulación con DM, (b) teoría con la  $g_{ww}^{exp}(r)$ , y (c) teoría con la  $g_{ww}^{DM}(r)$ . No queremos abundar en gráficas, pero mencionamos que las funciones

(b) y (c) son obtenidas ajustando el parámetro  $\rho_w$  hasta que el número de coordinación coincida (<1%) con el de (a). Las densidades ajustadas varían entre  $0,029 \text{ \AA}^{-3}$  y  $0,032 \text{ \AA}^{-3}$ , según la temperatura.

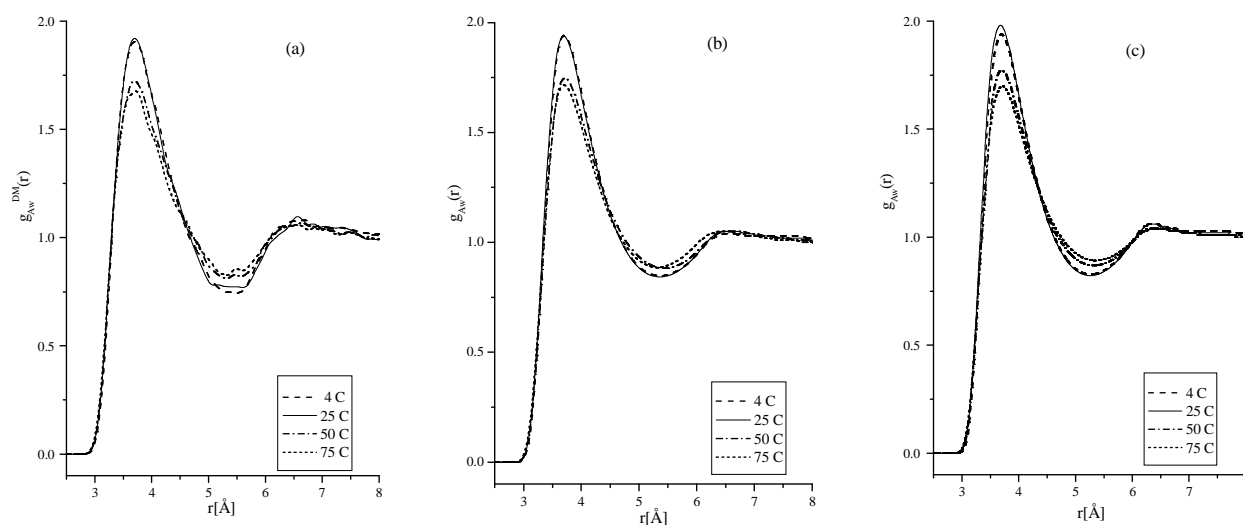


Figura 2. funciones de distribución radial de alanina-agua. (a) Simulación mediante Dinámica Molecular. (b) Calculada mediante el modelo teórico con la función de agua pura experimental. (c) Calculada mediante el modelo teórico con la función de agua pura de DM.

En todos los casos observamos que el pico principal de la  $g_{Aw}(r)$  disminuye cuando la temperatura aumenta por encima de los 25C. Esta disminución en la hidratación del residuo de alanina cuando la temperatura aumenta, concuerda con los resultados experimentales obtenidos por otros autores, a partir de mediciones termodinámicas, que relacionan a la hidratación con la solubilidad y el coeficiente de absorción de Ostwald<sup>(6)</sup>.

mínimo al contacto y la altura de la barrera se mantiene prácticamente constante  $\Delta W_{AA}^{IH} \approx 0,85 k_B T$ .

De acuerdo con estos resultados, cuando la temperatura aumenta el agua pura cambia hacia una estructura menos ordenada ( $g_{ww}(r,T)$ ), disminuye la hidratación del residuo de alanina ( $g_{Aw}(r,T)$ ), y consecuentemente, aumenta la interacción hidrofóbica ( $W_{AA}^{IH}(r,T)$ ).

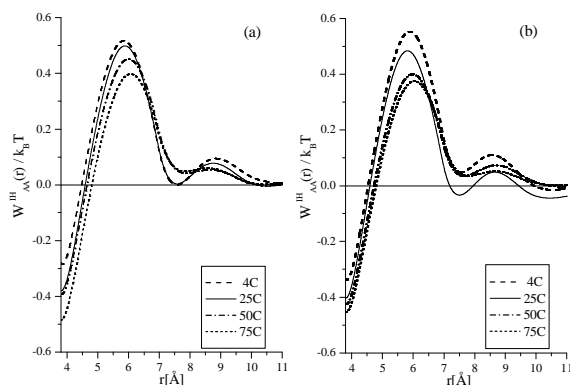


Figura 3. Interacción Hidrofóbica alanina-alanina. (a) Calculada con el modelo teórico y la función de agua pura experimental. (b) Calculada con el modelo teórico y la función de agua pura de DM.

En cuanto a la interacción hidrofóbica, observamos en las curvas de la figura 3, que el valor de  $W_{AA}^{IH}(r,T)$  cuando los residuos están en contacto ( $r = \sigma_{AA}$ ) disminuye a medida que la temperatura aumenta. Es interesante notar que la diferencia  $\Delta(W_{AA}^{IH}/k_B T)$  entre el

## V. REFERENCIAS

- 1 - Renzi, D.G. Tesis Doctoral: "Soluciones diluidas de aminoácidos en agua. Teoría y simulación.", Universidad Nacional de La Plata, (2004). Renzi, D.G., C.O. Stoico and F. Vericat, J. Chem. Phys., **123**, 104502, 1-10, (2005).
- 2 - Pratt, L.R. and D. Chandler, J. Chem. Phys., **67**, 3683, (1977).
- 3 - Narten, A.H. and H.A. Levy, J. Chem. Phys., **55**, 2263, (1971).
- 4 - van der Spoel, D., E. Lindhal, B. Hess, A.R. van Buuren, E. Apol, P.J. Meulenhoff, D.P. Tieleman, A.L.T.M. Sijbers, K.A. Feenstra, R. van Drunen and H.J.C. Berendsen, Gromacs User Manual version 3.2, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org) (2004).
- 5 - Berendsen, H.J.C., J.R. Grigera and T.P. Straatsma, J. Phys. Chem., **91**, 6269, (1987).
- 6 - Widom, B., P. Bhimalapuram and K. Koga, Phys. Chem. Chem. Phys., **5**, 3085, (2005).