



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

"Caracterización termodinámica del reconocimiento de  
ligandos hidrofóbicos por la  $\beta$ -lactoglobulina"

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JOSÉ NORBERTO ZAMUDIO OCADIZ

ASESOR:

DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ



FACULTAD DE  
CIENCIAS

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Hoja de Datos del Jurado

## 1. Datos del alumno

Zamudio  
Ocadiz  
José Norberto  
56 92 12 94  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
403080191

## 2. Datos del Tutor

Dr.  
Enrique  
García  
Hernández

## 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Marietta  
Tuena  
de Gómez Puyou

## 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Daniel Alejandro  
Fernández  
Velasco

## 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Roberto Alejandro  
Arreguín  
Espinosa de los Monteros

## 6. Datos del sinodal 4

Biól.  
Miguel  
Hernández  
Alva

## 7. Datos del trabajo escrito

Caracterización termodinámica del reconocimiento de ligandos  
hidrofóbicos por la b-lactoglobulina  
43 p.  
2010

# Agradecimientos

*A mis padres, por su apoyo incondicional durante toda la carrera.*

*A mis amigos de la facultad de ciencias, por las horas de vida compartidas.*

*A Enrique, por su paciencia, sus conocimientos y sus consejos.*

*Al proyecto CONACYT 47097 y al proyecto PAPIIT-UNAM IN204609 por el apoyo otorgado al desarrollo de esta tesis.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida.*

*Al Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina, por el tutorial en el manejo del programa Pymol.*

*Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández en el departamento de Bioquímica, dentro del Instituto de Química de la UNAM.*

# ÍNDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. ANTECEDENTES	6
3.1. Reconocimiento de moléculas hidrofóbicas por la $\beta$ -lactoglobulina	11
3.2. Transición de Tanford	12
3.3. Función Biológica	14
3.4. El Efecto Hidrofóbico	15
3.5. El Efecto Hidrofóbico No-Clásico	18
3.6. Calorimetría de Titulación Isotérmica	19
3.7. Modelo de unión de sitios idénticos e independientes para complejos con estequiometría 1: $\eta$	20
4. OBJETIVOS	27
5. HIPÓTESIS	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
8. BIBLIOGRAFÍA	41

## RESUMEN

La interacción de las proteínas de la superfamilia de las lipocalinas con ligandos hidrofóbicos se caracteriza por estar dirigida en la mayoría de los casos por el efecto hidrofóbico clásico. Sin embargo, estudios hechos por medio de la técnica de calorimetría de titulación isotérmica han mostrado que la unión de proteínas de ésta familia por sus ligandos también puede estar guiada entálpicamente, correspondiendo esto a una interacción de tipo hidrofóbico no-clásico. En este estudio, presentamos la caracterización calorimétrica de la interacción de ligandos hidrofóbicos de cadena alifática con la proteína  $\beta$ -lactoglobulina, uno de los miembros más prominentes de las lipocalinas. La descomposición de la energía libre de unión en los términos entálpico y entrópico muestra que la unión de la  $\beta$ -LG variedades A y B con laurato está guiada entrópicamente, y que la unión de  $\beta$ -LG variedad B con SDS está guiada entálpicamente. Además, para todos los complejos estudiados se obtuvo un incremento en la capacidad calorífica, lo cual es atípico para la formación de complejos de proteína con lípidos. Se ofrece una posible explicación molecular de los datos obtenidos.

## INTRODUCCIÓN

La  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LG) es una proteína que tiene una masa de 18 kDa. Pertenece a la superfamilia de las lipocalinas, y se encuentra dentro de la subclase de las calicinas. Los miembros de esta superfamilia de proteínas se caracterizan por su habilidad para unir moléculas hidrofóbicas pequeñas, como el retinol y los ácidos grasos, así como por el hecho de que la mayoría de las proteínas que la conforman son extracelulares. Todas las lipocalinas tienen una estructura similar, la cual incluye una cavidad hidrofóbica formada por un barril de hojas  $\beta$ -antiparalelas, dentro de la cual se une el ligando. Estas proteínas tienen un nivel bajo de similaridad en su secuencia de aminoácidos, pero comparten la presencia de 3 motivos estructurales (Flower *et al.*, 1993). Las lipocalinas forman complejos covalentes y no-covalentes con macromoléculas solubles (por ejemplo la proteína unidora de retinol, la  $\alpha$ -1 microglobulina) así como con receptores unidos a la membrana (la proteína urinaria mayor), algunos de los cuales son de potencial importancia clínica.

La superfamilia de las lipocalinas puede subdividirse en dos grupos, las nucleares y las de la periferia; esta clasificación se basa en la presencia de los tres motivos estructurales, o de solo uno o dos de ellos. La existencia de esta superfamilia está probada por un patrón de plegamiento común y conservado en todas las estructuras tridimensionales determinadas a alta resolución por medio de la cristalografía de rayos X (Akerstrom *et al.*, 2000).

## ANTECEDENTES

La  $\beta$ LG se encuentra en la leche de la mayoría de los mamíferos, especialmente de los rumiantes, como la vaca, pero no en la de humanos, así como tampoco en roedores, como el ratón, ni en lagomorfos, como el conejo. Ha sido ampliamente estudiada debido a su relativa abundancia (3 g/litro de leche). Estudios en solución realizados *in vitro* han demostrado que la  $\beta$ LG une variedad de moléculas hidrofóbicas, entre ellas ácidos grasos y dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus

siglas en inglés). Su función biológica es incierta, aunque se ha postulado que ayuda en la digestión de la leche durante el periodo neonatal de los rumiantes, ya que facilita la actividad de una lipasa pregástrica mediante el secuestro de los ácidos grasos conforme son producidos por esta última proteína (Perez *et al.*, 1992). Otra función podría ser la facilitación en la captación de vitaminas, ya que se ha visto que  $\beta$ LG se une a un receptor en la superficie celular e incrementa la interacción de dicho receptor con el retinol.

En las diferentes especies de rumiantes, la  $\beta$ LG es producida bajo el control de alelos codominantes, por lo cual la proteína aislada de una vaca heterocigota para el gen de  $\beta$ LG contiene dos tipos de cadenas polipeptídicas (Sawyer y Kontopidis, 2000). Las variantes genéticas más comunes de la  $\beta$ LG son la A y la B, que difieren sólo en dos posiciones: 64(Asp<sub>A</sub>->Gly<sub>B</sub>) y 118(Val<sub>A</sub>->Ala<sub>B</sub>) (Figura 1). Se han reportado en estudios por Western Blot de la leche de *Bos taurus* (vaca) hasta una docena de variantes diferentes. Se han encontrado variantes genéticas en todas las especies en las cuales la proteína ha sido observada, aunque hasta ahora no hay reportes de ello en la  $\beta$ LG caprina.

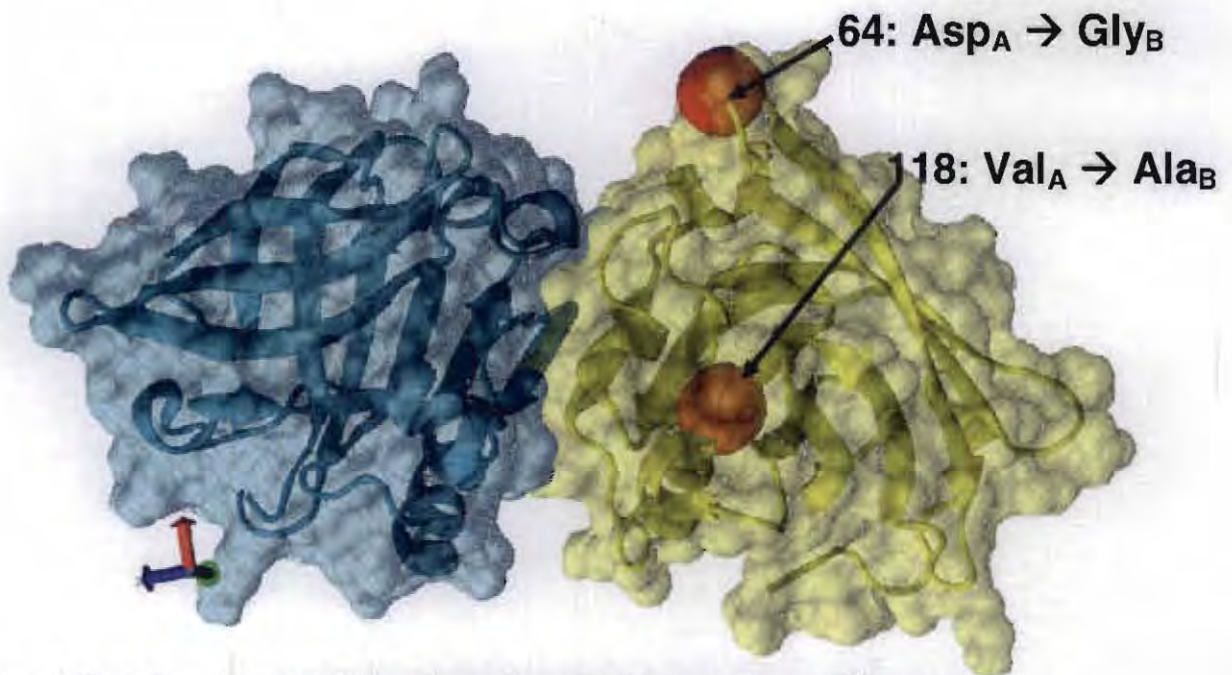
En las especies no rumiantes, la variación en  $\beta$ LG es debida al producto de diferentes genes y no de alelos del mismo gen. Por lo tanto, la relación que existe entre las secuencias de nucleótidos de  $\beta$ LG-I y  $\beta$ LG-II que se encuentran en la leche del gato, es menor que la que existe entre las  $\beta$ LG-I del gato, del perro y del caballo (Sawyer y Kontopidis, 2000).

Por medio de diferentes métodos espectroscópicos, como dicroísmo circular, así como por medio de cristalografía por rayos X, diversos grupos de investigación han llegado a la conclusión de que la estructura nativa de la  $\beta$ LG se compone de 15% de  $\alpha$ -hélices, 50% de hojas  $\beta$ , y 30% de arreglos no repetitivos.

La  $\beta$ LG bovina existe normalmente como dímero, cada monómero se compone por 162 residuos de aminoácidos, con un residuo de cisteína libre y dos puentes

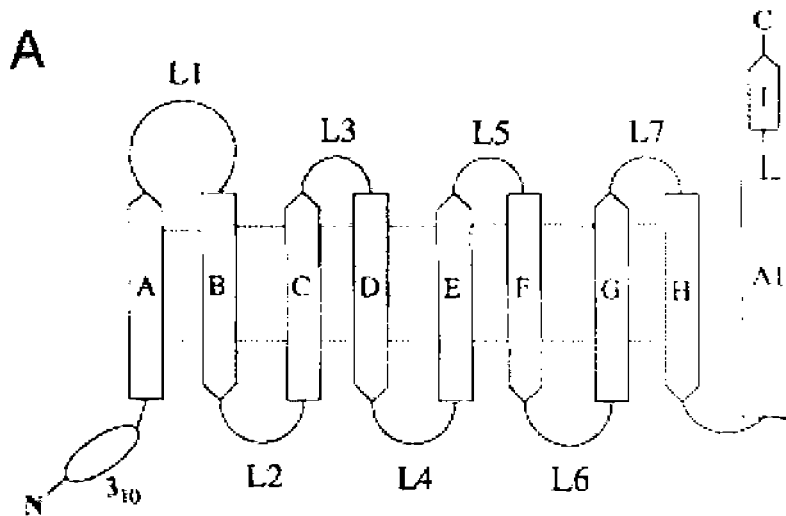


disulfuro (Figura 3). La  $\beta$ LG de la mayoría de las otras especies estudiadas es monomérica. Los puentes disulfuro entre los residuos Cys 66 y Cys 160, y entre los residuos Cys 106 y Cys 119 fueron establecidos por estudios de mapeo convencional y confirmados posteriormente por estudios de cristalografía de rayos X. Además,  $\beta$ LG tiene un barril  $\beta$  estable que consiste de 2 hojas  $\beta$ -antiparalelas y una hélice alfa en el extremo carboxilo. Las hebras que conforman las hojas  $\beta$  se denominan con las letras de la A a la H. Las hebras B-D y la mitad N-terminal de la hebra A forman una hoja del barril, mientras que las hebras E-H y la mitad C-terminal de la hebra A forman la otra hoja.



**Figura 1. Residuos de aminoácidos diferentes entre las variantes genéticas A y B**

Existe una novena hebra beta, denominada I, la cual es antiparalela a la primera hebra A, y por el lado contrario al que interacciona con la hebra H, es usada en la formación del dímero. La única hélice es de tipo 3-10, y se localiza en la superficie externa del barril  $\beta$ , justo entre las hebras G y H.

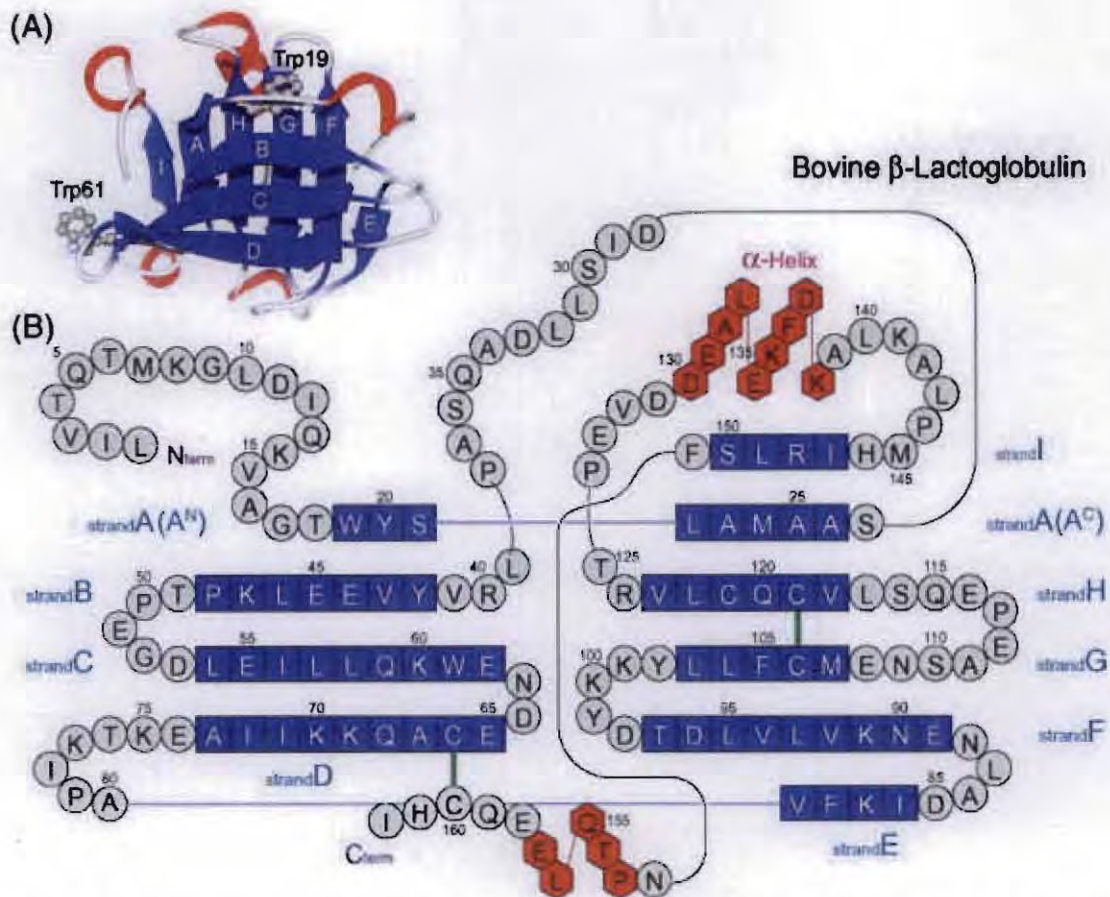


**Figura 2.** Plegamiento general de una lipocalina. Las hojas  $\beta$  son mostradas como flechas y se denominan con las letras A-H, los loops o asas se denominan como L1 a L7.

Esta proteína contiene solamente dos residuos de triptófano: Trp 19, que se localiza en la hebra A y Trp 61 que se localiza en la hebra C. El primer residuo se halla escondido en el núcleo hidrofóbico, mientras que el segundo residuo está expuesto al solvente en la estructura nativa, por lo cual el primero es útil para realizar pruebas de monitoreo de cambios conformacionales sitio-específicos.

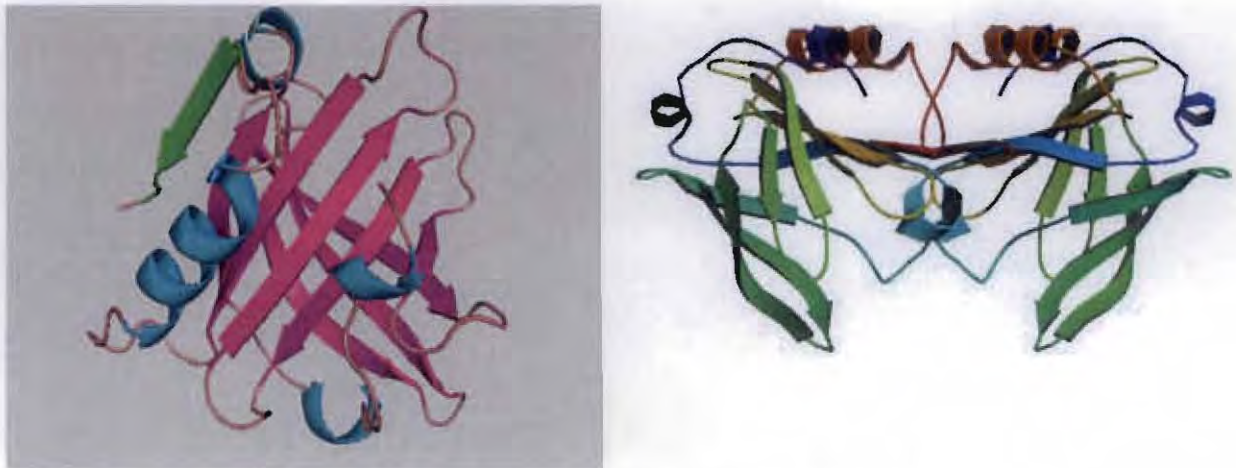
Los loops o asas que conectan a las hebras  $\beta$  y que se encuentran en el extremo cerrado del cáliz se denominan BC, DE y FG, y son más cortas que las que se hallan en el extremo abierto del cáliz, las cuales son AB, CD, EF y GH; éstas últimas asas a su vez son más flexibles.

El sitio de unión de la proteína urinaria mayor presenta la homología estructural más alta con respecto a  $\beta$ LG. Los residuos de aminoácidos que conforman el interior del cáliz de la  $\beta$ LG son: Lys69, Val41, Met107, Phe105, Leu46, Val94, Leu103, Ile56, Met107, Ile84, Ile71 y Lys 60.



**Figura 3.** La estructura 3D y la secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ LG bovina. A) diagrama de un monómero de  $\beta$ -LG. Las hebras  $\beta$  están marcadas con letras y los residuos de triptófanos están representados como bolas y bastones. B) Esquema de la secuencia de residuos de aminoácidos de la  $\beta$ -lactoglobulina. Los residuos que conforman las hélices  $\alpha$ , las hojas  $\beta$  y las asas son representadas como hexágonos rojos, cuadrados azules y círculos grises, respectivamente. Las líneas verdes indican las posiciones de los puentes disulfuro en la estructura (Tomado de Sakurai *et al.*, 2009).

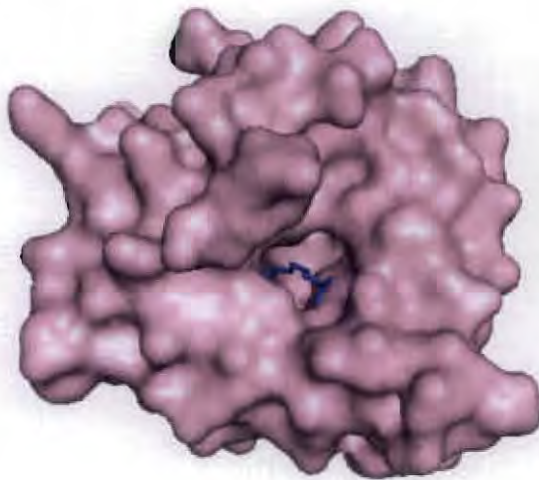
El pH influye en la habilidad de  $\beta$ LG para formar dímeros. Por arriba de pH 3.5,  $\beta$ LG se comporta como un homodímero. Por debajo de pH 3.5, el dímero se disocia en monómeros debido a la repulsión electrostática. En la variante A, una fracción de los monómeros forma octámeros entre pH 3.5 y 5.5 a 4°C. En la variedad B, el dímero es la estructura cuaternaria más compleja que se ha encontrado. Ya que la variedad A contiene Asp en la posición 64 en lugar de una Gly, los octámeros podrían ser establecidos por la presencia de interacciones carboxilo/carboxilato.



**Figura 4. Monómero (izquierda) y dímero (derecha) de la  $\beta$ -lactoglobulina**

### **Reconocimiento de moléculas hidrofóbicas por la $\beta$ LG**

Históricamente, se postularon dos sitios de unión en  $\beta$ LG para moléculas pequeñas hidrofóbicas: una cavidad interior dentro del barril  $\beta$  y un surco superficial localizado entre la hélice alfa y el barril beta. El surco fue reportado por Monaco *et al.* (1987), en base a un mapa de densidades de diferencias electrónicas no refinado.



**Figura 5. Vista en superficie de  $\beta$ LG-A con una molécula de palmitato unida dentro del cáliz.**

Las estructuras obtenidas por medio de rayos X, así como por Resonancia Magnética Nuclear de  $\beta$ LG formando complejos con el ácido 12-bromododecanoico y el palmitato finalmente indicaron que los ácidos grasos se

unen dentro de la cavidad central de la proteína, que recibe el nombre de “cáliz” (Wu *et al.*, 1998).

Sin embargo se ha observado un segundo sitio de unión para la vitamina D3, en una estructura cristalográfica de este ligando con  $\beta$ LG (Yang *et al.*, 2007).

## Transición de Tanford

Se denomina así al rearrreglo del asa EF que es desencadenado por la titulación de la cadena lateral carboxílica del residuo de aminoácido E89, y ocurre a un pH de alrededor de 7.

Estudios mediante centrifugación, rotación óptica, titulación y unión de ligandos revelaron que existe un cambio reversible en la rotación óptica entre pH 6 y 8, durante el cual un grupo carboxilo es titulado y el grupo tiol se vuelve más accesible; a estos efectos combinados también se les conoce como la transición N-R. Ya que este cambio conformacional no se refleja en el espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, se dice que el cambio es sutil pero se considera importante, ya que ocurre alrededor de pH fisiológico.

Experimentos de centrifugación hechos por Pedersen, en 1936, revelaron que los coeficientes de sedimentación de  $\beta$ LG disminuían conforme se incrementaba el pH en el rango de 6-8. Groves *et al.*, en 1951, reportaron un incremento en la levorotación óptica de  $\beta$ LG al incrementar el pH. Este resultado fue posteriormente visto en otras variantes de  $\beta$ LG. Tanford *et al.* (1959) descubrieron una conducta anómala durante la titulación de  $\beta$ LG y propusieron que ésta se debía a un grupo carboxilo con un  $pK_a = 7.5$ , el cual estaba oculto a un pH ácido pero que era expuesto al cambiar a un pH básico. Recientemente se han observado cambios dependientes del pH en la conducta térmica de  $\beta$ LG: un pico en el termograma que está presente a pH 6.75 desaparece a pH 8.05. Otro fenómeno relacionado con el pH, es el descrito por Dunnill y Green (1965), quienes observaron que el

grupo sulfidrilo libre de  $\beta$ LG reacciona más fácilmente con agentes que contienen iones  $\text{Hg}^{2+}$  a pH por arriba de 6.7.

En un estudio realizado por resonancia magnética heteronuclear (Sakurai *et al.*, 2009), la secuencia de eventos que se propone para la transición de Tanford fue resuelta recientemente:

Primero, el grupo carboxilo de Glu 89 es desprotonado. Posteriormente ocurre una fluctuación en los puentes de hidrógeno que existen entre los átomos de la cadena principal de los residuos Ile 84, Asn 90 y Glu 108. Finalmente, ocurre el desplegamiento de la hebra D y de las asas EF y GH. Aunque la desprotonación inicial vuelve más estable a la conformación abierta de la proteína, la conversión hacia este estado no puede ocurrir simultáneamente debido a que el segundo y el tercer paso tienen diferentes factores limitantes, y las poblaciones de las moléculas en cada uno de los estados conformacionales está determinada por mecanismos que unen a estos estados, los cuales en su conjunto describen esta transición dependiente del pH.

## **Unión de ligandos**

El pH influye en la habilidad de  $\beta$ LG para unir ácidos grasos. La comparación de la estructura de rayos X de  $\beta$ LG a pH neutro con la estructura de NMR a pH 2.6 muestra que al bajar el pH, se perturba un puente salino entre la cadena lateral de Lys83 y la cadena lateral de Glu74, relajando así la parte de la estructura de la molécula cercana a la entrada del ligando.

La pérdida del puente salino, junto con la repulsión electrostática de cargas positivas, puede desencadenar la liberación del ligando. Un mecanismo similar ha sido propuesto recientemente para la proteína de unión de ácidos grasos (FABP por sus siglas en inglés) de corazón de bovino. La reversibilidad de la disociación del complejo proteína-ligando es una característica remarcable de este sistema y

no es una tendencia común; por ejemplo, se ha reportado que las formas holo de las proteínas de unión de ácidos grasos del intestino y del hígado (iFABP y IFABP) no unen de nuevo su ligando una vez que el pH cae por debajo de 5.1

## **Función Biológica**

Debido a que  $\beta$ LG es una lipocalina, se ha sugerido que tiene una función de transporte, en analogía con otros miembros de esta familia cuya función es conocida. Tal función es posible, en vista de la estabilidad en las condiciones fisiológicas del estómago y de los receptores de retinol que han sido identificados en el intestino de ternera recién nacida. Sin embargo, la  $\beta$ LG de caballo y la  $\beta$ LG de cerdo no unen ácidos grasos, lo cual es una evidencia en contra de ésta función (Puyol *et al.*, 1991). Además, el retinol se encuentra asociado no sólo con la  $\beta$ LG sino con otras proteínas de la leche, por lo cual ésta interacción podría ser inespecífica.

Otra hipótesis acerca de su función es que facilite la absorción de ligandos como el retinol y los ácidos grasos, más que transportarlos. Se ha visto que actúa como un modulador enzimático, ya que incrementa la actividad de una lipasa pregástrica al remover los ácidos grasos que son producidos por ésta última proteína.

Otra posibilidad es que la  $\beta$ -lactoglobulina proporciona péptidos activos a las crías, similares a las endorfinas que son producidas endógenamente. Se sabe que las caseínas producen péptidos parecidos a opiodes, llamados casomorfina y casoquininas, por lo cual no fue sorprendente que péptidos bioactivos hallan sido encontrados en la secuencia de  $\beta$ LG. Sin embargo, esto podría ser fortuito.

## **Estructura de los Ácidos grasos**

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de número par de átomos de carbono. El número par deriva del modo de biosíntesis, que se realiza a través de

apositiones sucesivas de unidades C-C de dos átomos de carbono. Podemos distinguir (a) el grupo carboxilo -COOH, que al pH de los medios biológicos aparece normalmente disociado como  $\text{-COO}^-$  y (b) la cadena hidrocarbonada  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-...}$ . Ésta última es fuertemente hidrofóbica, mientras que el grupo carboxilo interacciona fácilmente con el agua. Esto da a los ácidos grasos un cierto carácter anfipático (es decir, que en la misma molécula coexisten zonas hidrofílicas e hidrofóbicas).

Cuando la cadena hidrocarbonada está constituida solamente por carbonos  $\text{sp}^3$ , es decir, está plenamente saturada, hablamos de ácidos grasos saturados; pero muy a menudo se presentan insaturaciones en forma de dobles enlaces  $\text{C}=\text{C}$ : hablamos entonces de ácidos grasos insaturados. Estos últimos tienen puntos de fusión más bajos que los saturados. Por eso los lípidos ricos en ácidos grasos saturados suelen ser sólidos a la temperatura ambiente (grasas) mientras que los insaturados son líquidos (aceites).

### **Dodecil Sulfato de Sodio**

Esta sustancia es más conocida por sus siglas en inglés SDS( Sodium Dodecyl Sulfate) o por laurilsulfato sódico. Su fórmula es  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ . La molécula posee una cola de 12 átomos de carbono, adosada a un grupo sulfato, dotando a la molécula de las propiedades anfipáticas requeridas para todo detergente.

Esta molécula la utilizamos en este estudio debido a que su estructura es muy similar a la del ácido laurico, ya que posee también 12 carbonos, y un extremo hidrofílico, que está dado por el grupo sulfato.

### **El efecto Hidrofóbico**

La  $\beta\text{lg}$  tiene la capacidad de unir una amplia variedad de ligandos hidrofóbicos con alta afinidad. Por tanto, es un excelente modelo para estudiar las bases



moleculares de la interacción proteína-lípido, y así poder entender la importancia que tiene el efecto hidrofóbico en este tipo de complejos.

Muchas sustancias son no polares, por lo cual no son solubles en agua, la cual es polar. El efecto hidrofóbico se refiere al hecho de que las sustancias o grupos no polares tienden a juntarse, para así evitar el contacto con el agua. Esto se debe a que las sustancias no polares no pueden formar puentes de hidrógeno con el agua. En su lugar, la estructura del agua es alterada para formar “cajas” alrededor de los grupos no polares. Este ordenamiento del agua resulta en una disminución de la entropía de la mezcla. Por lo tanto, es entrópicamente favorable el agrupamiento de los grupos hidrofóbicos, debido a que rodear con una sola “caja” de agua dos moléculas agrupadas requiere menos moléculas de agua que el rodear dos grupos separados con dos “cajas” de agua (Herzfeld y Olbris, 2002).

El efecto hidrofóbico tiene una contribución mayor a la estabilidad de las proteínas globulares. Típicamente, las proteínas contienen residuos de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas, como Phe, Ile, y Leu. Cuando una proteína está desplegada, éstas cadenas laterales están en contacto con el agua, lo que causa un ordenamiento de las moléculas del agua alrededor de los grupos no polares. Después del plegamiento, estas cadenas laterales están escondidas dentro de la proteína, liberando las moléculas de agua e incrementando la entropía del sistema (proteína+agua). Este incremento en entropía constituye una contribución favorable a la energía libre de plegamiento, estabilizando así a la proteína.

En general, el 80% de las cadenas laterales no-polares se encuentran escondidas en el interior de la proteína. El interior se encuentra estrechamente empaçado, y se parece más a un sólido que a un líquido. Con este fuerte empaçamento, las interacciones de van der Waals son más fuertes entre los grupos dentro de las proteínas plegadas, en comparación cuando la proteína está desplegada. Esto mejora la estabilidad al esconder los grupos no polares, y es una parte importante

del efecto hidrofóbico. Se estima que por cada grupo  $-CH_2-$  escondido durante el plegamiento, la contribución al  $\Delta G$  es de  $-4\text{kJ/mol}$ .

Las interacciones hidrofóbicas están dirigidas entrópicamente, por lo cual el  $\Delta G$  de unión es aproximadamente igual a  $-T\Delta S$ , y surge predominantemente de los cambios entrópicos asociados con la inserción de grupos no polares en la red de puentes de hidrógeno del agua. Para las cadenas laterales de los aminoácidos, las interacciones hidrofóbicas son proporcionales al área hidrofóbica del soluto. Este valor se encuentra usualmente entre  $-20$  y  $-25 \text{ cal/mol/\AA}^2$ .

### Estimación de la fuerza del efecto hidrofóbico

Amino acid	Hydrophobicity	
	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kcal mol <sup>-1</sup> )
Tryptophan	9.41	2.25
Phenylalanine	7.49	1.79
Isoleucine	7.53	1.80
Leucine	7.11	1.70
Cysteine	6.44	1.54
Methionine	5.14	1.23
Valine	5.10	1.22
Tyrosine	4.02	0.96
Proline	3.01	0.72
Alanine	1.30	0.31
Threonine	1.09	0.26
Glycine	0.00	0.00
Serine	-0.17	-0.04
Histidine	0.54	0.13
Glutamine	-0.92	-0.22
Asparagine	-2.51	-0.60
Glutamic acid	-2.68	-0.64
Aspartic acid	-3.22	-0.77
Lysine	-4.14	-0.99
Arginine	-4.23	-1.01

**Tabla 1. Hidrofobicidades de los 20 aminoácidos presentes en las proteínas . Esta tabla está basada en le energía libre de transferencia del octanol al agua (Tomada de Matthews, 2001)**

La forma clásica de estimar la magnitud del efecto hidrofóbico para un compuesto dado es medir la energía libre de transferencia del compuesto,  $\Delta G_{tr}$ , al pasar desde una fase gaseosa, líquida o sólida al agua. Un valor positivo para  $\Delta G_{tr}$  significa que la molécula prefiere un ambiente no-acuoso. En el caso de los aminoácidos, las medidas pueden hacerse con el aminoácido libre o con variantes modificadas con el fin de representar mejor a los aminoácidos incorporados dentro de la cadena polipeptídica.

Además de escoger a los compuestos a ser investigados, uno tiene que decidir cuál es el medio de transferencia que mejor imita el interior de la proteína. Por esta razón están disponibles muchas escalas de hidrofobicidad diferentes, como la que se muestra en la Tabla 1. Es el valor relativo de la hidrofobicidad el que es

relevante. Por esta razón a menudo es conveniente definir a la hidrofobicidad de la glicina como cero y expresar los valores para los otros aminoácidos de manera relativa a esta referencia.

Los aminoácidos con cadenas laterales largas no-polares o mayoritariamente no-polares como la leucina y el triptófano son los más hidrofóbicos. Los aminoácidos menos hidrofóbicos son aquellos que están cargados, y aquellos como la asparagina, que son en gran medida polares.

### **Características particulares del Efecto Hidrofóbico**

En el efecto hidrofóbico clásico, la fuerza impulsora para la asociación de las moléculas no polares es la entropía, reflejada en la liberación de moléculas de agua de la superficie del soluto. La firma termodinámica del efecto hidrofóbico está caracterizada por una entalpía pequeña, ya sea ésta positiva o negativa, y una entropía favorable (positiva). El valor grande y negativo de  $\Delta C_p$  surge de la liberación de moléculas de agua que solvatan a los grupos no polares, y por lo tanto es otro indicador útil de las interacciones hidrofóbicas.

### **El Efecto Hidrofóbico No-Clásico**

Se ha observado en múltiples ocasiones que la interacción entre moléculas hidrofóbicas es favorecida entálpicamente, mientras que la entropía juega un papel minoritario o incluso desfavorable. A este fenómeno se le ha denominado como efecto hidrofóbico no clásico. Como ejemplo podemos citar el artículo de Seeling *et al.*, (1991) donde se estudió la transferencia de cuatro moléculas anfifílicas (TNS, TBP, dibucaína y amlodipina) desde la fase acuosa a membranas lipídicas. Se encontró que los cambios en la energía libre estuvieron en el rango de  $-6$  a  $-9$  kcal/mol, y que la entalpía de transferencia fue la fuerza impulsora de la unión de las moléculas a la membrana.

En una comunicación de Syme *et al.*, (2007) se muestran los resultados de la unión de la proteína urinaria mayor de ratón de tipo recombinante (rMUP) con diferentes tipos de alcoholes. La asociación de rMUP con pequeños ligandos hidrofóbicos se caracteriza por estar guiada entálpicamente, es decir, la fuerza predominante es el efecto hidrofóbico no clásico. En el estudio se concluye que el cambio negativo en la capacidad calorífica está determinado por la desolvatación del ligando, y en menor medida por la desolvatación de la proteína.

## **Calorimetría de Titulación Isotérmica**

La medición de parámetros termodinámicos es importante porque todas las interacciones biomoleculares reversibles, como la unión de una proteína y su ligando, involucran una redistribución de enlaces no covalentes. El término "isotérmica" indica que los experimentos son llevados a cabo a una temperatura constante, y el término "titulación" indica que el ligando es añadido de manera creciente a la macromolécula. Mediante ésta técnica se puede medir el calor intercambiado cuando un ligando se une a una proteína. También se puede obtener la constante de equilibrio y la estequiometría de las moléculas que interactúan, así como todos los parámetros termodinámicos que caracterizan la reacción de unión, como  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  y el  $\Delta C_p$ .

En la actualidad contamos con los microcalorímetros VP-ITC (VP-Isothermal Titration Calorimeter), que son equipos de alta precisión y nos facilitan la caracterización termodinámica de sistemas proteicos. Este microcalorímetro consiste de dos celdas idénticas fabricadas con una aleación de níquel altamente conductora y resistente a la corrosión, las cuales están rodeadas de una chaqueta adiabática. Las dos celdas se encuentran conectadas por medio de un circuito termopar cuya función es detectar pequeñas diferencias de temperatura entre las celdas. De igual forma este sistema regula la diferencia térmica entre las celdas y la pared adiabática. La celda de reacción se llena con la solución de macromolécula a estudiar que contiene el sitio de reconocimiento, a menudo a

esta molécula se le denomina como receptor. Una jeringa externa que se conecta a dicha celda inyecta alícuotas de ligando de manera automatizada. Antes de que ocurra la primera inyección se aplica una pequeña potencia constante a la celda de referencia, activándose la alimentación a la celda de muestreo para mantenerla bajo un régimen de microcalentamiento. Dicha señal constituye la línea base. Una vez estabilizada la línea base, la inyección de una alícuota del reactante en la celda de reacción inducirá el equilibrio químico dentro de la celda de reacción.

En una reacción exotérmica, la temperatura de la celda donde se lleva a cabo la reacción (celda de la muestra) aumenta, induciendo una disminución de la potencia alimentada a través de las resistencias termopar, para mantener el equilibrio térmico entre las dos celdas del equipo. Por el contrario, en el caso de una reacción endotérmica, la potencia administrada por el equipo se incrementa, de tal manera que ambas celdas (la de referencia y la de reacción) se equilibren a una sola temperatura nuevamente. El valor observable en un experimento de CTI como el descrito, corresponde a la diferencia de potencia medida en cada segundo. La integración de esta diferencia de potencia con respecto al tiempo nos permite determinar los calores intercambiados en cada inyección de ligando.

### **Modelo de unión de sitios idénticos e independientes para complejos con estequiometría de 1: $\eta$**

En la teoría del equilibrio químico, la interacción entre una proteína y un ligando determinado, puede ser descrita como:



Donde  $\eta$  es el número de sitios de unión disponibles en la proteína (P) para un ligando determinado (L), es decir, la estequiometría. En el caso de que los sitios de unión del receptor sean idénticos e independientes, la constante de afinidad resultante es:

$$K_a = \frac{[PL]^\eta}{[P][L]^\eta} \quad [2]$$

Donde las especies moleculares resultantes de la reacción de equilibrio están delimitadas por corchetes.

Sabemos que la concentración total de sitios de unión ( $[S_T]$ ) en la molécula receptora de ligandos, depende exclusivamente de la cantidad de moléculas de ligando que puede asociar, de tal manera que podemos calcular  $[S_T]$  a partir de la concentración total de la molécula receptora  $[P_T]$  y la relación estequiométrica que mantiene con el ligando:

$$[S_T] = \eta[P_T] \quad [3]$$

A su vez, podemos describir la concentración total de los sitios de unión y del ligando ( $[L_T]$ ) a partir de los siguientes balances de materia:

$$[S_T] = [S] + [SL] \quad [4]$$

$$[L_T] = [L] + [SL] \quad [5]$$

donde  $[S]$  y  $[L]$  son las concentraciones de los sitios de unión y de moléculas de ligando libres, respectivamente, y  $[SL]$  corresponde a la concentración de complejo formado. Así, la constante de equilibrio expresada exclusivamente en función de la concentración de los sitios de unión del receptor y de la concentración de ligando puede ser escrita como:

$$K_s = \frac{[SL]}{[S][L]} \quad [6]$$

La ecuación 4 a su vez puede ser escrita en términos de la fracción de sitios ocupados ( $\theta$ ) y la fracción de sitios libres ( $1-\theta$ ) como:

$$1 = \theta + \frac{[S]}{[S_T]} \quad [7]$$

$$[L_T] = [L] + [P_T]\theta \quad [8]$$

De tal manera que podemos reescribir el término de  $K_s$ , en términos de las fracciones de sitios ocupados y sitios libres:

$$K_s = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[L]} \quad [9]$$

Si sustituimos la ecuación 8 en 9 y reordenamos, tenemos que:

$$\Theta^2 - \Theta \left[ 1 + \frac{[L_T]}{[P_T]} + \frac{1}{K_s[P_T]} \right] + \frac{[L_T]}{[P_T]} = 0 \quad [10]$$

La ecuación 10 implica que el calor absorbido o liberado ( $q$ ) es proporcional a la concentración de complejo recién formado dentro de la celda de reacción (de volumen fijo,  $V_0$ ) luego de una inyección, de tal manera que la entalpía molar involucrada puede conocerse a partir de:

$$q = V_0 \Delta H [P_T] \Theta \quad [11]$$

Resolviendo la ecuación cuadrática 10 para  $\theta$  y substituyendo el resultado en la ecuación 11, tenemos que:

$$q = \frac{V_0 \Delta H [P_T]}{2} \left[ 1 + \frac{[L_T]}{[P_T]} + \frac{1}{K_s [P_T]} - \sqrt{\left( 1 + \frac{[L_T]}{[P_T]} + \frac{1}{K_s [P_T]} \right)^2 - 4 \frac{[L_T]}{[P_T]}} \right] \quad [12]$$

La ecuación 12 nos permite determinar el calor intercambiado en el proceso de unión, a partir de las concentraciones totales de receptor y de ligando, teniendo a la estequiometría, a la entalpía y a la constante de unión como parámetros de ajuste para las curvas de titulación calorimétrica.

Finalmente, los valores del  $\Delta H_u$  y la  $K_u$  obtenidos directamente de los datos experimentales, permiten a través de las ecuaciones 14 y 15 determinar directamente los valores del  $\Delta G_u$  y el  $\Delta S_u$ , disminuyendo con ello la incertidumbre asociada con los valores termodinámicos obtenidos mediante la experimentación

con técnicas espectroscópicas. Para la descripción termodinámica completa de los eventos de reconocimiento molecular, se requiere del conocimiento del valor en el cambio de la capacidad calorífica de la unión ( $\Delta C_{p_u}$ ). Esto se logra determinando la dependencia térmica de  $\Delta H_u$ , de acuerdo con la ecuación [18].

La constante de unión, K, está definida como la proporción entre la concentración del complejo [ML], con respecto al producto de las concentraciones del ligando libre [L], y la macromolécula libre, [M].

$$K = \frac{[ML]}{[L]*[M]} \quad [13]$$

El valor de la constante de unión define a la diferencia en la energía libre de Gibbs estándar, dada por la ecuación 14, donde R es la constante de los gases y T es la temperatura en grados Kelvin.

$$\Delta G = - RT \ln K \quad [14]$$

La energía libre de Gibbs también puede expresarse en términos de los cambios en entalpía y entropía,  $\Delta H$  y  $\Delta S$ , por lo que G depende de la temperatura a través de S.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad [15]$$

Una de las fuerzas conductoras de la unión del ligando es el efecto hidrofóbico. Una de las características de dicho efecto es la fuerte dependencia que presentan el H y el S con respecto a la temperatura. Una ecuación de la energía libre de Gibbs que refleja esta dependencia es la siguiente:

$$\Delta G^\circ = [\Delta H_{R^\circ} + \Delta C_p(T-T_R)] - T(\Delta S_{R^\circ} + \Delta C_p \ln T/T_R) \quad [16]$$

La fracción de sitios de unión que están ocupados por un ligando, está dada por la ecuación [17]



$$O = K [L] / 1 + K [L] \quad [17]$$

La dependencia térmica de  $\Delta H_u$  y  $\Delta S_u$  (ecuación 18) nos permite calcular el valor del cambio de la capacidad calorífica de unión ( $Cp_u$ ). En el estudio del plegamiento de proteínas, este valor ha sido relacionado molecularmente a los cambios que se observan en la hidratación de superficies de las especies químicas involucradas, contribuyendo con cerca del 95% de su valor global (Gómez *et al.*, 1995)

$$\Delta Cp_u = \frac{\Delta H}{\Delta T} = \frac{\Delta S}{\Delta \ln T} \quad [18]$$

### **Determinación de las constantes de unión, los cambios de entalpía y cambios en la capacidad calorífica.**

Cuando la constante de unión del ligando por la macromolécula es alta, todo el ligando inyectado en la celda se une a la macromolécula hasta que todos los sitios de unión están ocupados. Bajo esta condición, llamada unión estequiométrica, el calor intercambiado de una inyección antes de la presaturación puede ser dividido por el número de moles de ligando inyectado para obtener la entalpía de unión; sin embargo, la constante de unión no puede ser determinada bajo éstas condiciones.

Cuando la constante de unión es menos alta (típicamente menor a  $10^8$ ) habrá inyecciones para las cuales los sitios de unión y el ligando libre estén en equilibrio. Con una creciente concentración del ligando, una mayor fracción de los sitios de unión es ocupada hasta que todos son ocupados a una concentración dada. El rango de concentraciones requerido para saturar los sitios de unión está determinado por K y la concentración de la macromolécula. Para determinar de manera correcta una constante de unión, el producto de la constante de unión y la concentración de la macromolécula debe de estar entre los valores de 100 y 1000.

Los experimentos de titulación pueden ser llevados a cabo bajo diferentes condiciones de temperatura, pH, salinidad, etc. Cuando la temperatura varía, el  $\Delta H$  es de manera usual una función lineal de la temperatura, donde  $T$  es la temperatura experimental,  $T_R$  es la temperatura de referencia, y  $\Delta C_p$  es el cambio en la capacidad calorífica.

$$\Delta H_T = \Delta H^{\circ}_R + \Delta C_p(T - T_R) \quad [19]$$

Podemos ver en la ecuación 19, que la pendiente de la recta es igual al  $\Delta C_p$ .

### Cambio en el área expuesta al solvente

Los modelos de áreas superficiales relacionan el cambio en la capacidad calorífica con el área accesible al solvente. La partición más común usada en estos modelos empíricos para el  $\Delta C_p$  incluye las contribuciones de los grupos polares y apolares

$$\Delta C_p = \Delta C_{p_p} + \Delta C_{p_{ap}} = \Delta C_{p_p} \Delta A_p + \Delta C_{p_{ap}} \Delta A_{ap} \quad [20]$$

Asimismo, las interacciones agua-soluto pueden ser estimadas a través del área superficial accesible al solvente (ASA). Existe un algoritmo para calcular el ASA a partir de estructuras tridimensionales de las moléculas, en el cual se toma una esfera de radio finito (generalmente se utiliza un radio igual al del agua, 1.4 Å), que se hace rodar sobre la superficie de las macromoléculas. En general, los cambios en el área superficial accesible al solvente ( $\Delta ASA$ ) son determinados como la diferencia de ASA del estado final y ASA del estado inicial. Para un proceso de unión del ligando a una proteína, el cambio sería la diferencia entre el ASA del complejo y la suma del ASA de la proteína y el ligando. En todos los casos, el  $\Delta ASA$  de la ecuación [20] es de signo negativo, ya que siempre se oculta área al agua cuando ocurre la formación del complejo. Posteriormente el  $\Delta ASA$  es dividido en contribuciones de tipo polar (O, N y P) y no polar (C y S), definiendo de manera sencilla que tipos de átomos constituyen la superficie. Los átomos de oxígeno,

nitrógeno y fósforo son tomados como polares y todos los átomos de carbono como no polares. Si no existen cambios conformacionales ligados a la asociación, entonces la interacción se denomina de tipo “cuerpo rígido”, y los modelos de área superficial son aplicables a estos sistemas. Para poder asumir que la asociación es de tipo cuerpo rígido”, la unión del ligando debe de verificarse mediante otros métodos para comprobar que no existen rearrreglos conformacionales que contribuyan a la energética de la asociación.

## Objetivo General

Esclarecer las bases moleculares del reconocimiento de ligandos hidrofóbicos por la proteína  $\beta$ -lactoglobulina, como un modelo de la superfamilia de las lipocalinas.

## Objetivos Particulares

A) Caracterizar la unión de  $\beta$ LG-A y  $\beta$ LG-B con laurato y de  $\beta$ IgB con SDS mediante calorimetría de titulación isotérmica

B) Comparar las propiedades termodinámicas de unión entre las dos variedades de la  $\beta$ IgB con laurato y SDS, de manera que sea posible estudiar la importancia del grupo polar del ligando en la interacción.

## Hipótesis

Se ha visto que en las interacciones proteína-lípido, la fuerza intermolecular predominante no siempre es el efecto hidrofóbico, sino que también interviene el efecto hidrofóbico no clásico. Dado que se ha detectado que las interacciones de la  $\beta$ -lactoglobulina con una variedad de lípidos son del tipo hidrofóbico no-clásico, se busca mediante la sustitución en el ligando de un grupo polar por uno no polar, esclarecer los mecanismos moleculares que subyacen en una interacción guiada por el efecto hidrofóbico no clásico.

## Materiales y Métodos

### Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)

$\beta$ -lactoglobulina liofilizada, variantes A y B, (Sigma-Aldrich, Inc.) fueron disueltas por separado en un buffer de fosfatos a la concentración deseada, la cual fue determinada espectrofotométricamente usando el coeficiente de extinción molar en el pico de absorción ( $\epsilon_{279 \text{ nm}} = 0.97 \text{ ml/mg}$ ). El SDS y el ácido laurico fueron disueltos en el mismo buffer de fosfatos.

La solución de proteína se degasificó y posteriormente fue colocada en la celda de reacción de un calorímetro Microcal VP-ITC. La solución con el ligando fue cargada en la jeringa de inyección.

Posteriormente se llevaron a cabo titulaciones de la  $\beta$ LG-A con la solución de ácido laurico a tres temperaturas diferentes: 30, 37 y 45°C. Por otra parte se efectuaron titulaciones de la  $\beta$ LG-B con laurato a las siguientes temperaturas: 35, 40 y 45°C. También se efectuaron titulaciones de  $\beta$ LG-B con SDS a las temperaturas: 20, 25, 30 y 35 °C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el panel A de la Figura 6 podemos ver los trazos calorimétricos crudos de la titulación de  $\beta$ LG-A con Laurato a 30 °C. Se puede apreciar que los calores asociados con la unión del ligando son positivos, lo cual corresponde a una reacción endotérmica. Conforme se va añadiendo mayor cantidad de ligando a la celda de reacción, se va saturando la proteína, y el calor asociado con la reacción de reconocimiento va disminuyendo, lo cual puede verse gráficamente en la disminución del tamaño de los picos.

En el panel B de la Figura 6 podemos ver la isoterma de titulación generada a partir de graficar los calores generados en cada adición (normalizados por el número de moles de ligando adicionado) contra el cociente de las concentraciones totales de ligando y proteína.

Se efectuaron “experimentos blanco” para cada experimento de titulación independiente, con la finalidad de eliminar la contribución calórica generada por la dilución del Laurato en la solución amortiguadora. Posteriormente, estos calores de dilución fueron sustraídos a los valores de unión entre la proteína y el ligando.

Se obtuvieron adicionalmente curvas de titulación a 37 y 45 °C para el complejo  $\beta$ LG-A y Laurato (Figura 7).

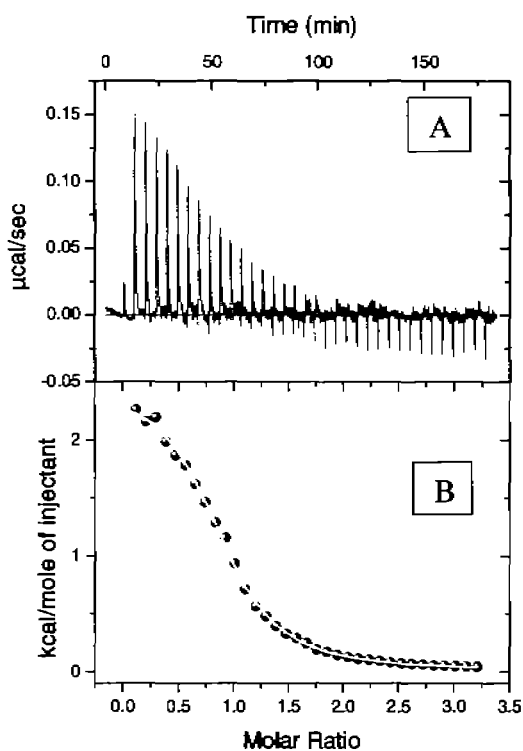
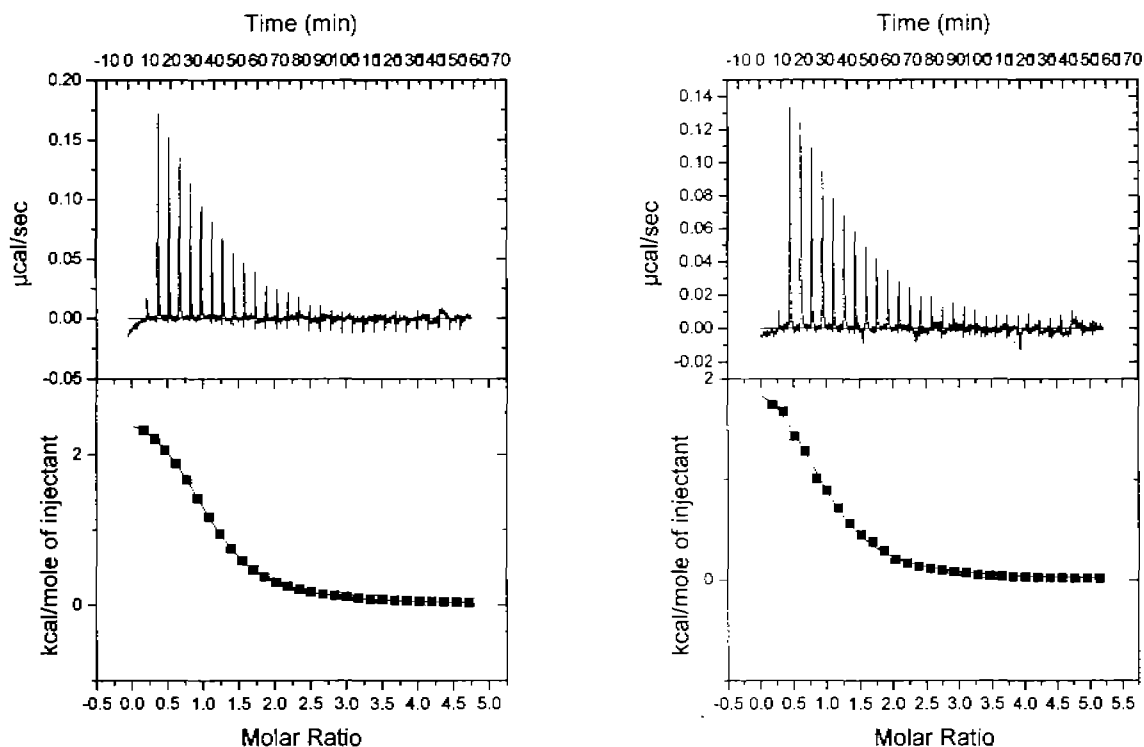


Figura 6. Termograma de asociación de  $\beta$ LG-A con Laurato a 30°C. Panel A. Diferencia de potencia vs tiempo. Cada uno de los trazos representa la diferencia de potencia asociado con la reacción de unión del ligando con la proteína. Panel B. Isotherma de titulación, construida mediante la integración de cada uno de los picos registrados en el panel A, así cada círculo representa el valor integrado del calor liberado al sistema en cada inyección del ligando. La línea amarilla representa el ajuste de los datos, el cual se efectuó mediante la ecuación 16.



**Figura 7.** Perfil calorimétrico de la titulación de  $\beta$ LGA con laurato a 37 (izquierda) y 45 (derecha)  $^{\circ}$ C. En el panel superior de cada figura se observan los trazos calorimétricos crudos del experimento de titulación. En el panel inferior se observa la curva de unión, donde podemos ver la saturación progresiva del sitio de reconocimiento. La línea continua corresponde al mejor ajuste de los datos experimentales a un modelo de unión de un solo tipo de sitios.

La magnitud de los parámetros  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$  y  $\eta$  obtenidos del ajuste de cada una de las isotermas son mostrados en la Tabla 4. Se puede observar que mientras que la reacción es entrópicamente guiada, el componente entálpico es desfavorable. Todas las estequiometrias resultaron muy cercanas a la unidad. Esto demuestra la alta sensibilidad del calorímetro y que su margen de error es pequeño comparado con el de otras técnicas, por ejemplo con la fluorescencia. La estequiometría obtenida de manera experimental concuerda con la estequiometría propuesta de un solo sitio de unión, la cual fue obtenida a partir de la resolución de la estructura tridimensional del complejo de  $\beta$ IgA uniendo palmitato, y de la de  $\beta$ IgB uniendo ácido bromododecanoico (Qin *et al.*, 1998).

$\beta$ LG-A Laurato			
Temperatura	30°C	37°C	45°C
N	$0.906 \pm 0.0077$	$0.904 \pm 0.0046$	$1.02 \pm 0.011$
Ka	$5.37E5 \pm 2.7E4$	$1.82E5 \pm 2.0E3$	$1.99E5 \pm 5.6E3$
$\Delta H$	$2504 \pm 28.5$	$4601 \pm 29.1$	$6229 \pm 88.1$
$\Delta S$	34.5	38.9	43.8
T $\Delta S$	10453.5	12059	13928.4
$\Delta G$	-7949	-7458	-7699.4

$\beta$ LG-B Laurato			
Temperatura	35°C	40°C	45°C
N	$0.992 \pm 0.0091$	$0.955 \pm 0.017$	$1.06 \pm 0.08$
Ka	$3.67E5 \pm 3.2E4$	$4.13E5 \pm 2.7E4$	$4.9E5 \pm 3.4E4$
$\Delta H$	$1620 \pm 42.2$	$2260 \pm 53.2$	$2763 \pm 240$
$\Delta S$	30.7	32.9	34.7
T $\Delta S$	9302.1	10297.7	11034.6
$\Delta G$	-7682.1	-8037.7	-8271.6

$\beta$ LG-B SDS				
Temperatura	20°C	25°C	30°C	35°C
N	$0.971 \pm 0.0032$	$0.931 \pm 0.01$	$0.99 \pm 0.0$	$0.980 \pm 0.008$
Ka	$1.45E6 \pm 3.7E4$	$9.88E5 \pm 7.8E4$	$5.79E5 \pm 6.3E4$	$2.95E5 \pm 4.1E4$
$\Delta H$	$-5289 \pm 23.5$	$-4804 \pm 90.8$	$-4215 \pm 91.8$	$-3446 \pm 121$
$\Delta S$	10.1	11.3	12.5	13.8
T $\Delta S$	2954.3	3367.4	3787.5	4250.4
$\Delta G$	-8248.3	-8171.4	-8002.5	-7696.4

**Tabla 4. Parámetros termodinámicos obtenidos mediante CTI.**

En la Figura 8 se muestran las isotermas obtenidas para la unión de  $\beta$ LG-B con laurato a diferentes temperaturas. Los parámetros termodinámicos correspondientes son mostrados en la Tabla 4. Se observa que la formación de este complejo también está guiada entrópicamente, aunque la ganancia es menor que la observada con la variedad A, en tanto que la entalpía resultó ser menos



desfavorable. No obstante, las dos variedades unen con afinidad semejante al laurato, indicando una completa cancelación en las variaciones de entalpía y entropía entre los dos complejos.

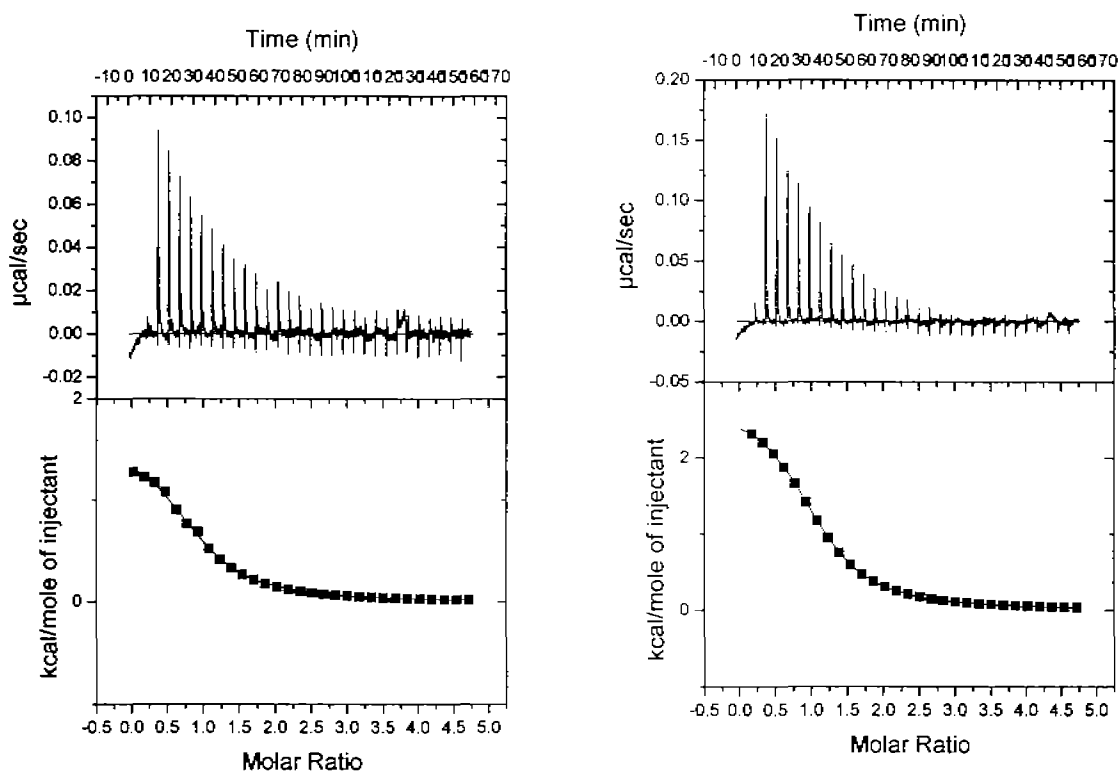
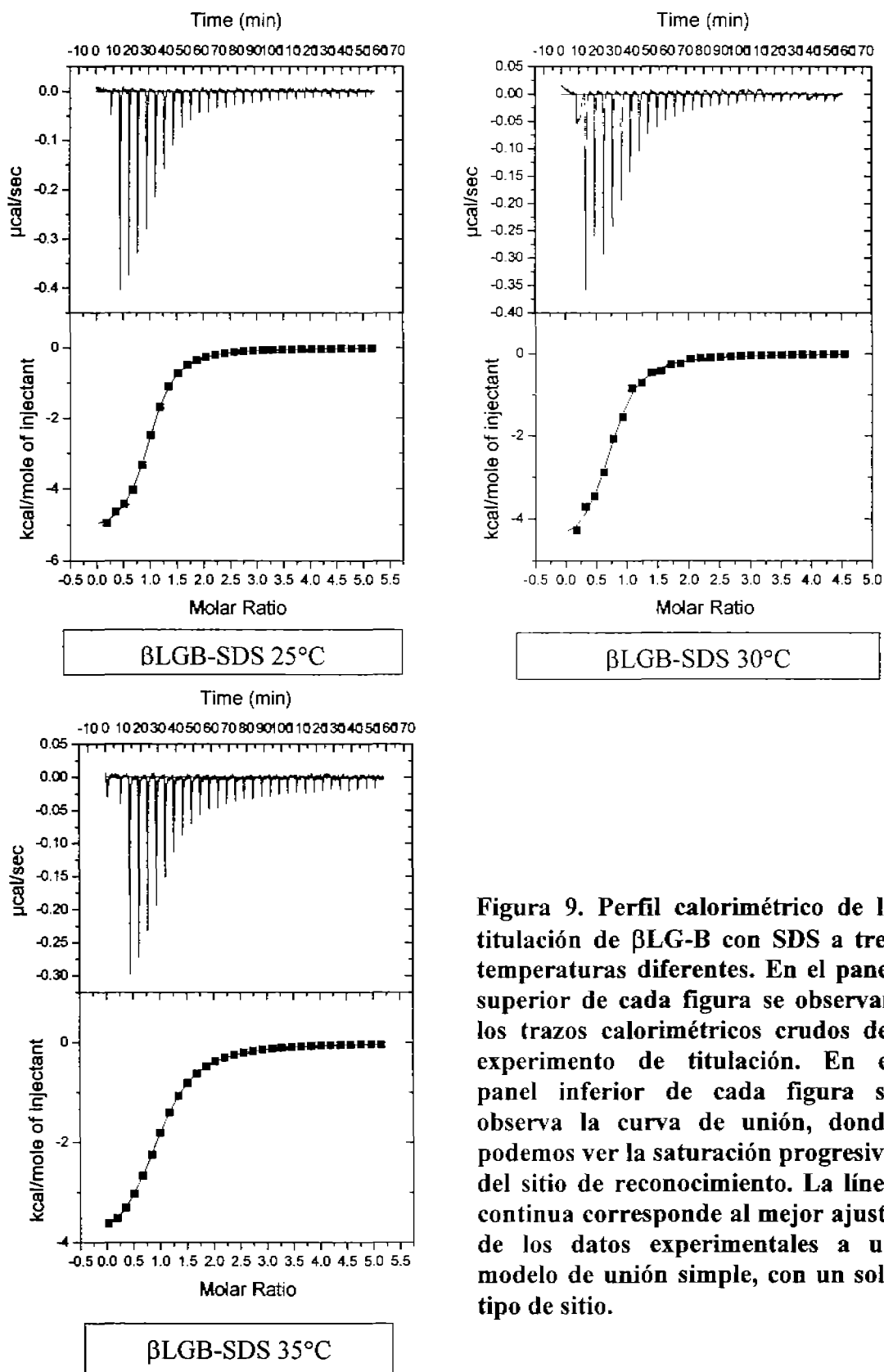


Figura 8. Perfil calorimétrico de la titulación de  $\beta$ LG-B con laurato a 35 (izquierda) y 45 (derecha) °C.

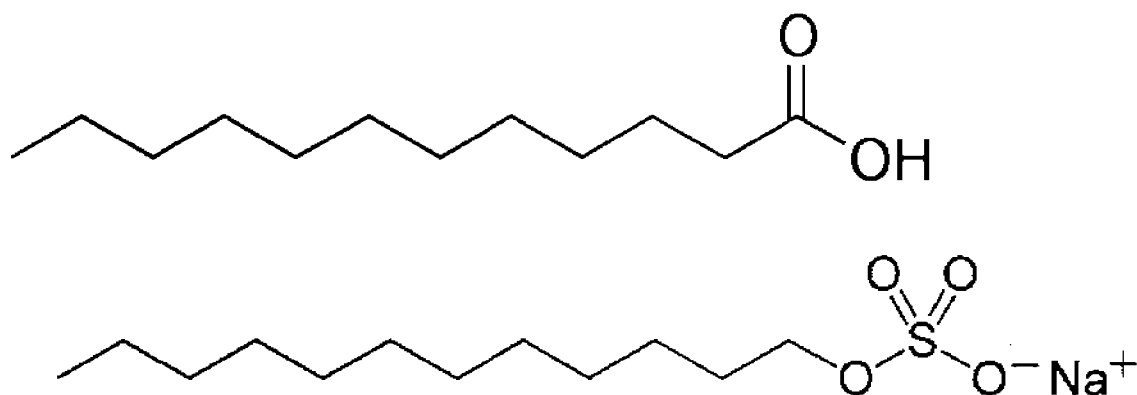
En la Figura 9 podemos observar los resultados de las titulaciones de  $\beta$ LG-B con SDS a diferentes temperaturas. Se observa que los calores asociados con la unión del ligando son negativos. En la Tabla 4 se muestran los valores de unión para este complejo. A diferencia de la interacción con el laurato, la unión de SDS también está favorecida entálpicamente. En cuanto al componente entrópico, aunque es favorable, la ganancia es casi tres veces menor que la observada para la misma variedad uniendo al ácido graso. Estos resultados indican claramente que existe una diferencia importante en el modo de interacción del laurato y del SDS con la  $\beta$ lgB. Como se muestra en la Figura 10, estos dos ligandos difieren tan sólo en su grupo polar, en tanto que comparten la misma cadena hidrofóbica policarbonada (C12). Por tanto, las notables diferencias en las propiedades termodinámicas entre los complejos  $\beta$ lgB-laurato y  $\beta$ lgB-SDS pueden tomarse

como firme evidencia de que el grupo polar juega un papel muy importante en el



**Figura 9. Perfil calorimétrico de la titulación de  $\beta$ LG-B con SDS a tres temperaturas diferentes. En el panel superior de cada figura se observan los trazos calorimétricos crudos del experimento de titulación. En el panel inferior de cada figura se observa la curva de unión, donde podemos ver la saturación progresiva del sitio de reconocimiento. La línea continua corresponde al mejor ajuste de los datos experimentales a un modelo de unión simple, con un solo tipo de sitio.**

reconocimiento de los ligandos por parte de la  $\beta$ IgB. En el complejo de  $\beta$ LG-B con SDS el cambio en la entalpia fue negativo, y el valor de  $T\Delta S$  fue positivo, por lo cual podemos decir que este proceso fue tanto entálpica como entrópicamente dirigido. Como se mencionó en la introducción, a los procesos de asociación proteína-lípido, en donde el término entálpico es muy favorable, se les nombra como efecto hidrofóbico no-clásico. En contraste, los complejos formados con el laurato son entrópicamente dirigidos. En este caso vemos los componentes del efecto hidrofóbico clásico.

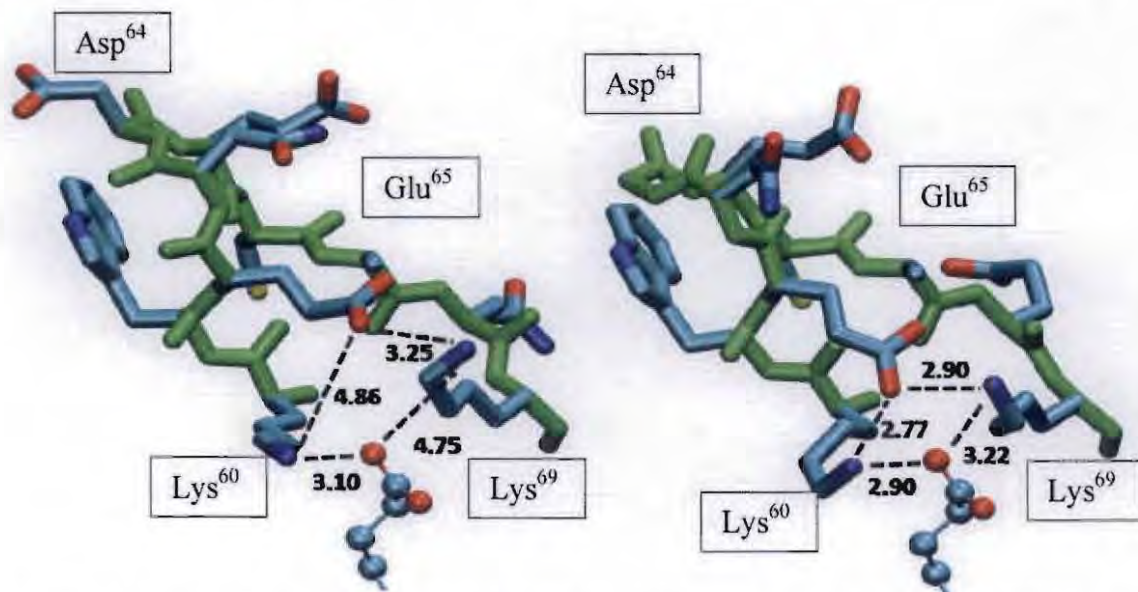


**Figura 10. Estructura del laurato (parte superior) y del dodecil sulfato de sodio (parte inferior).**

Como se mencionó anteriormente, se ha resuelto la estructura tridimensional de los complejos  $\beta$ IgA-palmitato y  $\beta$ IgB-ácido 12-bromododecanoico mediante cristalografía de rayos X (Qin *et al.*, 1998). La Figura 11 muestra el sitio de interacción de estos complejos. Se observa que en el caso de la variedad A, la proteína sólo forma un puente de hidrógeno con el ligando, a través de la lisina 60, en tanto que en la variedad B, las lisinas 60 y 69 hacen contacto simultáneo con el carboxilato del ácido graso. Además, en esta variedad las dos lisinas se encuentran estabilizadas haciendo contacto simultáneo con el glutámico 65. En cambio, en la  $\beta$ IgA este último residuo sólo hace contacto con la lisina 69. En resumen, la Figura 11 sugiere que la  $\beta$ IgB une al laurato formando una red de puentes de hidrógeno que no es observada con  $\beta$ IgA. Estas diferencias estructurales pueden explicar el por qué la interacción de laurato con  $\beta$ IgA es menos favorable que con  $\beta$ IgB. A su vez, el  $\Delta S$  menos favorable de interacción de

$\beta$ lgB podría deberse a que, al haber mayor número de contactos con el ligando, un mayor número de enlaces rotables se pierden al formarse el complejo.

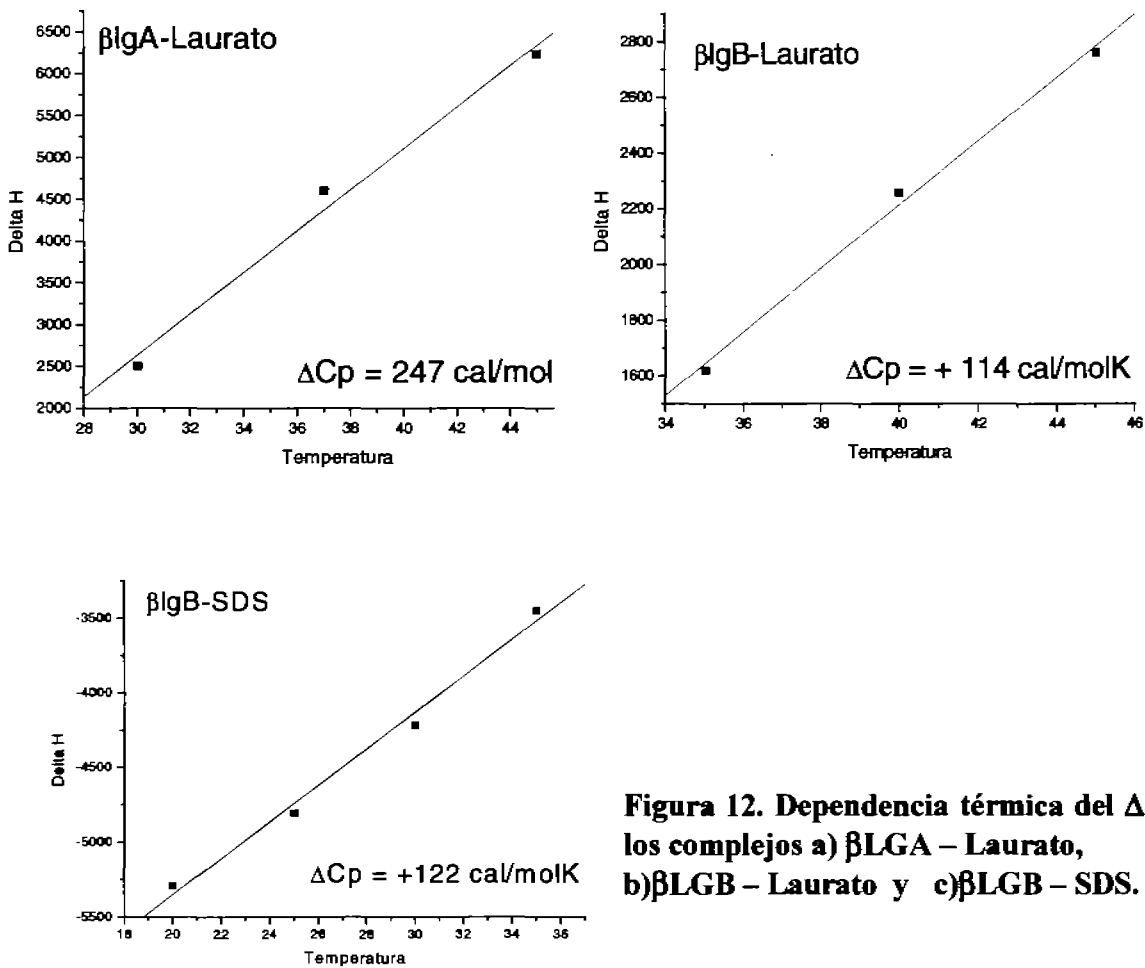
No se ha resuelto hasta el momento la estructura tridimensional de la  $\beta$ lg con SDS. No obstante, dado que el SDS posee un grupo polar más voluminoso, y con mayor capacidad de aceptar hidrógenos, se puede hipotetizar que esta molécula es capaz de formar enlaces no covalentes adicionales con la proteína. De esta manera, se explicaría el que la unión de este ligando sea exotérmica. Además, al formarse más contactos, se esperaría una disminución adicional de la entropía, que es justo lo que se observa experimentalmente.



**Figura 11. Distancias interatómicas entre los residuos Lys60, Lys69 y Glu65 con respecto al ligando en  $\beta$ LG-A(izquierda) y  $\beta$ LG-B(derecha).**

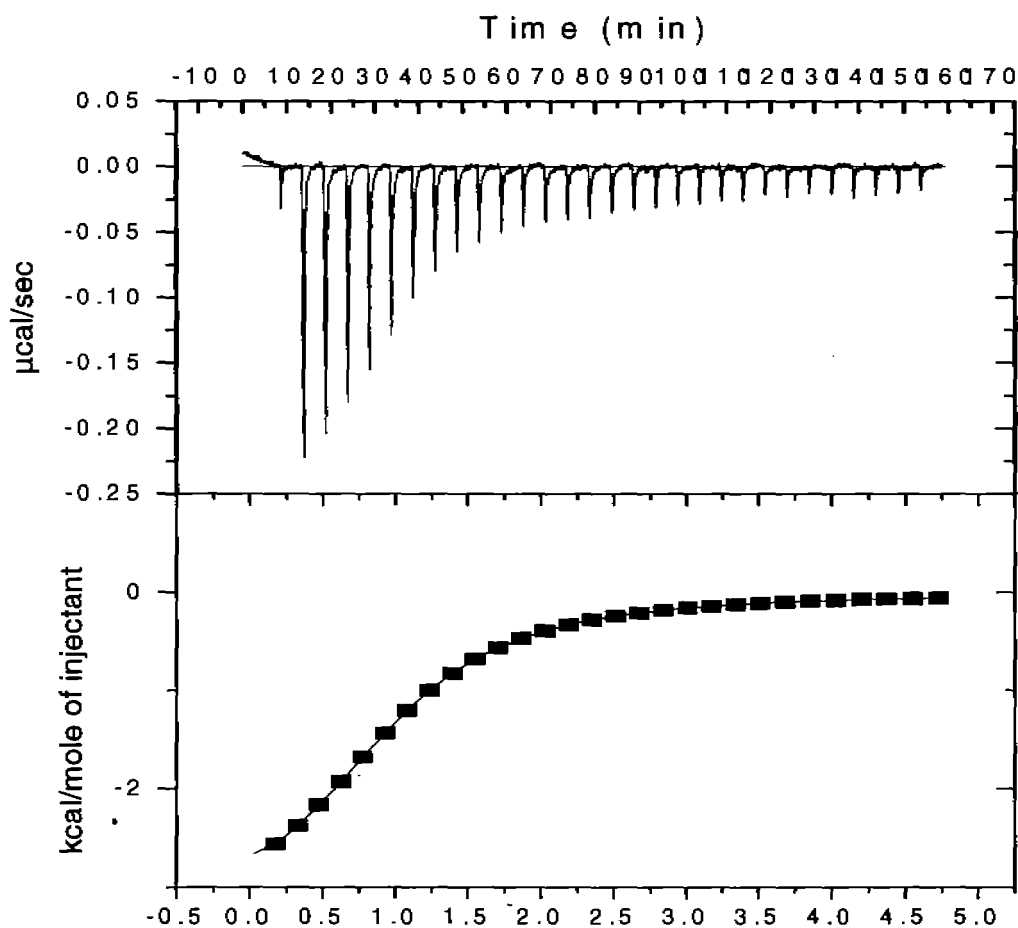
En la Figura 12 se muestran las gráficas de la variación del  $\Delta H$  con respecto a la temperatura para cada uno de los complejos estudiados. El ajuste de los datos a una recta puede observarse en cada caso como una línea roja, y es de notar que las pendientes de todas las rectas son positivas. Es muy poco común observar valores de  $\Delta C_p$  positivos para la formación de un complejo proteína-ligando. No obstante, es de notar que al incrementarse la temperatura, el  $\Delta S$  también incrementa su valor, indicando también un valor positivo para el  $\Delta C_p$ . Además, el

hecho de que hayamos observado un comportamiento semejante para las dos variedades de la  $\beta$ lg con el mismo ligando, y para la misma isoforma con dos ligandos diferentes, nos hace pensar que el valor positivo de  $\Delta C_p$  obtenido no es un artefacto. Además, es de observarse que las variantes de la  $\beta$ lg muestran valores de  $\Delta C_p$  muy diferentes al unir laurato, en tanto que las uniones de SDS y de laurato a  $\beta$ lgB se acompañan de un valor muy semejante. Por tanto, se puede decir que al igual que el  $\Delta H$  y el  $\Delta S$ , también existe una diferencia significativa de  $\Delta C_p$  entre las dos variedades de  $\beta$ lg.



**Figura 12. Dependencia térmica del  $\Delta H$  de los complejos a)  $\beta$ LG A – Laurato, b)  $\beta$ LG B – Laurato y c)  $\beta$ LG B – SDS.**

Las diferencias termodinámicas observadas entre  $\beta$ lgA y  $\beta$ lgB para la unión de laurato se relacionan con las dos mutaciones que les diferencian. Como puede observarse en la Figura 13, tanto la mutación Val(118)Ala como la de Asp(64)Gly en  $\beta$ lgA y  $\beta$ lgB, respectivamente, se ubican en una posición distante del ligando. No obstante, en el caso del residuo 64, este se encuentra formando parte del asa CD, de la cual forman parte las lisinas 60 y 69 arriba señaladas. Por lo tanto, parece muy factible que esta mutación sea la principal causante de las diferencias de unión entre las dos variedades.



**Figura 13. Distancias interatómicas entre el ligando(palmitato) y las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos cambiantes entre la variedad A y B de  $\beta$ LG.**

Para tratar de entender el origen atípico del  $\Delta C_p$  observado, hicimos uso de modelos de área superficial. Un modelo ampliamente utilizado (Murphy y Freire, 1992) establece que el  $\Delta C_p$  de unión es una función simple del cambio de áreas de tipo polar ( $\Delta A_p$ ) y apolar ( $\Delta A_{ap}$ ):

$$\Delta C_p = -0.26\Delta A_p + 0.45\Delta A_{ap} \quad [21]$$

donde los coeficientes tienen unidades de cal/molKÅ<sup>2</sup>. A partir de las estructuras cristalográficas de βlgA-palmitato y βlgB-Bromododecanoico, generamos las estructuras uniendo laurato, mediante la simple eliminación de los átomos extras. La Tabla 5 muestra los cambios de área superficial para la formación de estos complejos, los cuales fueron calculados mediante el programa NACCESS (Hubbard, 1993). Usando estos cambios de área en la ecuación 21, se obtienen valores de ΔCp que son muy diferentes a los observados experimentales, siendo de signo negativo. El cambio calculado para el complejo βLG-A con laurato es de -241 cal/molK. Para el caso del complejo βLG-B con laurato, el valor calculado es de -231 cal/molK. Ambos valores son muy diferentes a los observados experimentalmente, tanto en magnitud como en signo.

**Tabla 5. Cambios en las áreas superficiales accesibles al solvente de los complejos βLG-B y βLG-A uniendo Laurato con respecto a sus formas libres.**

	βLG-B con Laurato	βLG-B	Laurato	βLG-A con Laurato	βLG-A	Laurato
Área no polar	4739.90	4900.88	385.15	4658.24	4842.72	386.37
Área polar	3269.99	3248.23	76.02	3618.23	3602.22	76.70
Área total	8009.89	8149.12	461.18	8276.48	8444.94	463.07
Cambio de área en la formación del complejo	dÁreanopolar = -546.13			dÁreanopolar = -570.9		
	dÁreapolar = -54.2			dÁreapolar = -60.7		
ΔCp calculado con NACCESS	-231			-241		
ΔCp experimental	247			114		

Las discrepancias entre la capacidad calorífica obtenida de manera experimental y la calculada a partir de los complejos  $\beta$ LG-A laurato y  $\beta$ LG-B laurato pueden ser debidas a varios factores. La opción más común al encontrar este tipo de discrepancias, es que ocurran cambios conformacionales mayores en el proceso de unión. No obstante, esta posibilidad se puede descartar, ya que en las estructuras cristalográficas obtenidas de  $\beta$ LG unida a diversos ligandos, y a diferentes valores de pH, se observa que la unión dentro del cáliz no está acompañada por cambios conformacionales mayores (Qin *et al.*, 1998). Los mismos resultados se obtienen a partir de estudios de la unión del palmitato realizados con resonancia magnética nuclear (Ragona *et al.*, 2000).

En las diversas estructuras cristalográficas en las que se ha resuelto a la  $\beta$ lg en su forma apo, consistentemente en el sitio de unión no aparecen moléculas de agua. Debido a que las moléculas de agua deslocalizadas pueden escapar a la detección por la difracción de rayos X, se han utilizado técnicas de dispersión de relajación mediante RMN usando los isótopos  $^{17}\text{O}$  y  $^2\text{H}$  (Qvist *et al.*, 2008). Los espectros de la forma apo de  $\beta$ GL y la forma holo con palmitato unido en el cáliz no son estadísticamente diferentes, lo cual puede interpretarse como una ausencia de moléculas de agua en la forma apo de la proteína, o bien como un tiempo de residencia de las moléculas de agua en el rango de subnanosegundos. En un estudio computacional efectuado por Qvist *et al.* (2008), se encontró que el tiempo de residencia de las moléculas de agua en el sitio de unión de la  $\beta$ -lactoglobulina está en el orden de nanosegundos. Para efectos prácticos, estos estudios demuestran que el cáliz de la  $\beta$ lg se encuentra previamente deshidratado a la unión del ligando. Si asumimos que la mitad del cambio de área no polar en la Tabla 5 es aportado por el ocultamiento de áreas hidrofóbicas del cáliz, podríamos descontar el efecto de tener al sitio previamente deshidratado. En este caso, el  $\Delta C_p$  calculado sería de  $-108$  para  $\beta$ LGA y de  $-112$  para  $\beta$ LGB. Si bien este valor es más cercano al experimental, es claro que la estimación sigue siendo mala, por



lo que sugiere la posibilidad de que fenómenos adicionales pudieran estar ocurriendo.

En un estudio previo en nuestro laboratorio (Bello *et al.*, 2008), se demostró que la formación del dímero de  $\beta$ IgA ocurre con la incorporación de un elevado número de moléculas de agua. Esta incorporación genera un  $\Delta C_p$  experimental mucho más negativo que el que se esperaría por la simple deshidratación de las superficies de contacto entre las dos subunidades del dímero. Por tanto, surge la hipótesis de que al formarse los complejos de  $\beta$ Ig con laurato o SDS, se pudiera dar la liberación de moléculas de agua estructurales que se encuentren en alguna zona de la molécula diferente al sitio de unión. Esto se podría probar realizando experimentos de estrés osmótico, al igual que como se hizo para la formación del dímero de  $\beta$ IgA (Bello *et al.*, 2008). Dicho estudio queda como una perspectiva a futuro de esta tesis.

## BIBLIOGRAFÍA

Akerstrom B., Flower D., y Attwood T.K. (2000). Lipocalins: unity in diversity, *Biochimica et Biophysica Acta* 1482, 1-8.

Bello M., Pérez-Hernández G., García-Hernández E. (2008). Energetics of protein homodimerization: Effects of water sequestering on the formation of  $\beta$ -lactoglobulin dimer, *Proteins*, 70, 1475-1487.

Bingham R. J., Findlay J.B., Hsieh, S., Kalverda A.P., Kjellber A., Perazzolo C., Phillips S.E.V., Seshadri K., (2004). Thermodynamics of Binding of 2-Methoxy-3-isopropylpyrazine and 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine to the Major Urinary Protein, *J.Am. Chem. Soc.*, 126, 1675-1681.

Chavelas E.A. (2008). Desarrollo de un modelo energético-estructural para estimar el valor del  $\Delta C_p$  en el reconocimiento Proteína-Carbohidrato. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Collini M., D'Alfonso L., Molinari H., Ragona L., Catalano M., Baldini G. (2003). Competitive binding of fatty acids and the fluorescent probe 1-8-anilinonaphthalene sulfonate to bovine  $\beta$ -lactoglobulin, *Protein Science*, 12, 1596-1603.

Dong A., Matsuura J., Allison D., Chrisman E., Manning M.C., Carpenter J. F. (1996). Infrared and Circular Dichroism Spectroscopic Characterization of Structural Differences between  $\beta$ -lactoglobulin A and B, *Biochemistry*, 35, 1450-1457.

Dunnill P., Green D.W. (1965) *Journal of Molecular Biology* 15, 147-151.

Flower D. R., North A.C.T., Attwood T.K. (1993). Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins., *Protein Science* 2, 753-761.

Gómez J., Hilser V.J., Xie D., y Freire E. (1995) The heat capacity of proteins. *Prot. Struct. Funct. Genet.* 22, 404-412.

Groves M.L., Hipp N.J., McMeekin T.L. (1951) *Journal of American Chemical Society* 73, 2790-2793.

Hanhoff, T., Lücke C., Spener F. (2002). Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins, *Molecular and Cellular Biochemistry* 239, 45-54.

Herzfeld J., Olbris, D. (2002). Hydrophobic Effect, *Encyclopedia of Life Sciences*.

Hubbard S.J. y Thornton J.M. (1993). NACCESS Computer Program. London U.K: Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College.

- Qin B., Y., Bewley, M.C., Creamer L.K., Baker H. M., Jameson G.B. (1998). Structural Basis of the Tanford Transition of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin, *Biochemistry* 37, 14014-14023.
- Qin B., Creamer L., Baker E., Jameson G. (1998). 12-Bromododecanoic acids binds inside the calyx of bovine  $\beta$ -lactoglobulin, *FEBS Letters* 438, 272-278.
- Qvist J., Davidovic M., Hamelberg D., Halle B., A dry ligand-binding cavity in a solvated protein, *PNAS* 105, 6296-6301.
- Matthews, B.W. (2001) Hydrophobic interactions in Proteins, *Encyclopedia of life sciences*, John Wiley & Sons.
- Monaco H.L., Zanotti G., Spadon P., Bolognesi M., Sawyer L., Eliopoulos E.E. (1987). *Journal of Molecular Biology* 197, 695-706.
- Murphy K.P., Freire E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Protein Chem.*; 43:313–361.
- Pedersen K.O. (1936). Ultracentrifugal and electrophoretic studies on the milk proteins: the lactoglobulin of Palmer. *Biochemical Journal* 30, 961-970.
- Perez M.D., Sanchez L., Aranda P., Ena J.M., Oria R., Calvo M., (1992). Effect of  $\beta$ -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk, *Biochimica et Biophysica Acta* 1123, 151-155.
- Puyol P., Pérez M.D., Ena J.M., Calvo M. (1991). *Agric. Biol. Chem* 55, 2515-2520.
- Ragona L., Fogolari F., Zetta L., Pérez D.M., Puyol P., De Kruif K., Löhr F., Rüterjans H., Molinari H. (2000) Bovine  $\beta$ -lactoglobulin: interaction studies with palmitic acid, *Protein Science* 9, 1347-1356.
- Sakurai K., Konuma T., Yagi M., Goto Y. (2009). Structural dynamics and folding of  $\beta$ -lactoglobulin probed by heteronuclear NMR, *Biochimica et Biophysica Acta* 1790, 527-537.
- Sawyer L., Kontopidis G. (2000). The core lipocalin, bovine  $\beta$ -lactoglobulin, *Biochimica et Biophysica Acta* 1482, 136-148.
- Seeling J., Ganz P.,(1991) Nonclassical Hydrophobic Effect in Membrane Binding Equilibria, *Biochemistry* 30, 9354-9359.
- Syme N. R., Dennis C., Phillips S., Homans S.W. (2007). Origin of Heat Capacity Changes in a "Nonclassical" Hydrophobic Interaction. *ChemBioChem* 8, 1509-1511.

Wu S., Pérez M.D., Puyol P., Sawyer L. (1999)  $\beta$ -Lactoglobulin Binds Palmitate within Its Central Cavity, *The Journal of Biological Chemistry* 274, 170-174.

Yagi M., Sakurai K., Kalidas C., Batt C., Goto Y.(2003). Reversible Unfolding of Bovine Lactoglobulin Mutants without a Free Tilo Group. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No.47, pp. 47009-47015.

Yang M., Guan H., Liu M., Lin Y., Yang J., Chen W., Chen C., Mao S. (2007) Crystal structure of a secondary vitamin D3 binding site of milk  $\beta$ -lactoglobulin, *Proteins* 71, 1197-1210.