



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M
POSGRADO
Ciencias Bioquímicas

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUIMICA

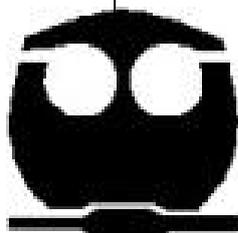
**CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA
DE LA FORMACIÓN DEL HOMODÍMERO
DE LA β -LACTOGLOBULINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

M. en C. MARTINIANO BELLO RAMÍREZ



TUTOR: Dr. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F. Mayo 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.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Dr. Enrique García Hernández por haber dirigido esta investigación y por el apoyo que siempre me ha brindado.

Quiero agradecer también al Dr. Miguel Costas Basin y al Dr. Alejandro Fernández, integrantes de mi comité tutorial, por el interés mostrado y el impulso que recibí de parte de ellos.

Al Dr. Jaime Mas Oliva, al Dr. Alejandro Fernández, al Dr. Ismael Bustos Jaimés, al Dr. Rafael Zubillaga Luna y al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, quienes amablemente accedieron a revisar esta tesis y contribuyeron significativamente a su enriquecimiento.

A CONACYT por las becas otorgadas con números de registro 185513 y 162262. Asimismo a los proyectos PAPIIT-UNAM IN-217505, PAPIIT-UNAM IN-217106-3 y a la Dirección general de estudios de postgrado por las becas otorgadas.

A la Dirección General de Servicios de Computo Académico (DGSCA) por el tiempo de cómputo utilizado en las simulaciones moleculares cuyos resultados se muestran en este trabajo.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
	1.1 LA β -LACTOGLOBULINA.....	1
	1.1.1 ESTRUCTURA.....	1
	1.1.2 LAS VARIEDADES NATURALES DE BLG.....	2
	1.1.3 INTERCARA DEL HOMODÍMERO DE BLG.....	4
	1.1.4 TRANSICIÓN DE TANFORD.....	5
	1.1.5 SITIO DE UNIÓN AL LIGANDO.....	6
II.	OBJETIVOS	8
III.	ENERGÉTICA-ESTRUCTURAL. TEORÍA	9
	3.1 TERMODINÁMICA DE UNIÓN.....	9
	3.2 MODELOS DE ÁREA SUPERFICIAL.....	11
	3.2.1 ÁREA SUPERFICIAL ACCESIBLE AL SOLVENTE.....	12
	3.2.1 CÁLCULO DEL ΔC_{pa}	13
	3.2.2 CÁLCULO DEL ΔH_a	13
	3.2.3 CÁLCULO DEL ΔS_a	15
	3.3 SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR (DM).....	17
	3.3.1 FUNCIÓN DE POTENCIAL.....	18
	3.3.2 INTERACCIONES ENTRE ÁTOMOS ENLAZADOS.....	19
	3.3.2.1 Deformación del enlace.....	19
	3.3.2.2 Deformación del ángulo.....	19
	3.3.2.3 Torsión.....	20
	3.3.3 INTERACCIONES ENTRE ÁTOMOS NO ENLAZADOS.....	20
	3.3.3.1 Interacciones de van der Waals.....	20
	3.3.3.2 Interacción electrostática.....	21
	3.3.4 INTEGRACIÓN DE LAS ECUACIONES DEL MOVIMIENTO.....	21
	3.3.5 MINIMIZACIÓN, CALENTAMIENTO Y EQUILIBRIO DEL SISTEMA.....	22
	3.3.6 INICIALIZACIÓN.....	22
	3.3.7 DESARROLLO DE LA DINÁMICA MOLECULAR.....	23
	3.3.8 DESVENTAJAS DE LAS SIMULACIONES COMPUTACIONALES.....	23
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
	4.1 MATERIALES.....	24
	4.2 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (CTI).....	24
	4.3 CALCULOS DE AREAS SUPERFICIALES ACCESIBLES AL SOLVENTE (ASA).....	27
	4.4 DINÁMICAS MOLECULARES (DM).....	28
	4.4.1 Análisis de las desviaciones cuadráticas medias (RMSD).....	29
	4.4.2 Análisis de las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF).....	29

4.4.3	Puentes de hidrógeno (PH).....	30
4.4.4	Tiempo de residencia (T _r).....	30
V.	RESULTADOS	32
	DISECCIÓN ENERGÉTICO-ESTRUCTURAL DE LA AUTOASOCIACIÓN DEL HOMODÍMERO DE LA BLG.....	32
	EFFECTOS DE PROTONACIÓN.....	36
	EFFECTOS DE HIDRATACIÓN.....	37
	ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y DINÁMICA MOLECULAR DE LA DIMERIZACIÓN DE BLG.....	38
	ANÁLISIS DE HIDRATACIÓN.....	42
	ANÁLISIS DE ÁREA SUPERFICIAL ACCESIBLE AL SOLVENTE (ASA).....	45
	ANÁLISIS DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO EN LA INTERCARA DE ASOCIACIÓN DIMÉRICA.....	46
	DISECCIÓN ENERGÉTICO-ESTRUCTURAL DE LA INTERACCIÓN DE BLG CON EL ÁCIDO LAÚRICO	48
	ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y DE DINÁMICA MOLECULAR DE LA ASOCIACIÓN DE BLG CON EL ÁCIDO LAÚRICO.....	51
VI.	DISCUSIÓN	56
VII.	CONCLUSIÓN	61
VIII.	PERSPECTIVAS	63
IX.	REFERENCIAS	64
X.	ARTÍCULO	74

RESUMÉN

La beta-lactoglobulina bovina (BLG) ha demostrado ser un excelente sistema para investigar la penetración de aguas tras la formación de un homodímero proteico, debido a diferentes peculiaridades en su estructura como son: alto contenido de aminoácidos polares en su interfase de unión proteica, una interfase de unión muy pequeña. Estos dos factores favorecen una alta densidad de aguas, que a su vez mejoran la complementariedad de la interfase. En un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) con la variedad A de la BLG (BLGA), fue mostrado que la incorporación de moléculas de agua ejerce un efecto significativo en los valores de ΔH y ΔC_p de auto-asociación. En el presente estudio, realizamos la caracterización termodinámica de la asociación de la variedad B (BLGB), en las mismas condiciones experimentales que para BLGA, con el objetivo de recabar información acerca del por qué estas 2 variedades, que sólo difieren por 2 mutaciones que ocurren en sitios alejados de la interface de unión, presentan diferencias en diversas propiedades fisicoquímicas, incluyendo la constante de equilibrio de dimerización. En este estudio, encontramos que el término entálpico resultó más negativo para BLGB, en tanto que BLGA es más favorecida entrópicamente. El análisis de la dependencia térmica de la entalpía de formación arrojó un ΔC_p muy parecido para las 2 variantes. No obstante, la K_a de BLGA es ~70% más baja que la K_a de BLGB. Esta diferencia es significativamente menor que la reportada mediante sedimentación al equilibrio, donde reportaron una K_a 3 veces más grande para BLGB que la obtenida mediante ITC a 20 °C. Además, los estudios calorimétricos de estrés osmótico y de dinámica computacional de la variante BLGB muestran una incorporación de moléculas de agua sobre la dimerización muy parecido al observado para BLGA, sugiriendo un mecanismo de hidratación muy similar entre las 2 variantes. Por otra parte, también realizamos estudios calorimétricos de unión de ambas variedades en su forma predominantemente monomérica con el ácido láurico y SDS. Se observó un perfil termodinámico diferente para ambas variedades. Las diferencias en las propiedades de unión son discutidas en términos de las diferencias estructurales de las dos variedades uniendo ácidos grasos.

ABSTRACT

The bovine beta-lactoglobulina (BLG) has demonstrated to be an excellent system to investigate the water penetration after the formation of its homodimer complex, due to different peculiarities in its structure. The β LG have a high content of polar residues in its interface of dimeric association and have an interface of association very small. These two factors favour a high density of waters that improves the complementariness of the interface as well. In a previous study realized in our laboratory by means of isothermal dilution calorimetry (IDC) for BLG dimer variant A, it was shown that the incorporation of waters molecules exerts a significant effect in the energetics of β lgA self-association. In the present study, the homodimerization of BLGB energetic was characterized calorimetrically at neutral pH by means of IDC, under conditions similar to those used previously for the variant A, with the aim of obtain information about why these two variants that only differs by 2 mutations that are beyond the dimer interface zone, present differences in diverse physical-chemical properties, including the equilibrium constant of dimerization. In this study, we found that the formation of the β lgB homodimer was enthalpically more favored, while than β LG A was more entropically favored. Linear regression analysis of enthalpy change versus temperature yielded very similar heat capacity change for the two variants. Three decades ago, it was established via sedimentation equilibrium that BLGB exhibits a larger K_a , with a threefold excess over BLGA (Zimmerman *et al.*, 1970). Our calorimetric measurements are consistent with that picture, although a smaller difference between the two variants was observed (BLGB's K_a ~50% higher). In addition, the calorimetric studies of osmotic stress and computer dynamics reveal that the two homodimers incorporate the same number of structural water molecules, suggesting a mechanism of hydration very similar between the 2 variants. On the other hand, we realized calorimetric studies of binding for both varieties in its predominantly monomeric form with lauric acid and dodecylsulfate. A different thermodynamic profile for both varieties was observed. The differences in the association properties are discussed in terms of the structural differences of the two variants binding fatty acids.

1. INTRODUCCIÓN

La asociación de ligandos a macromoléculas es un elemento clave en prácticamente todas las asociaciones biológicas. El ligando puede ser una molécula pequeña (*v. gr.*, ácido graso, monosacárido, ion metálico, nucleótido) o alguna otra macromolécula (*v. gr.*, proteína, ácido nucleico, polisacárido). Elucidar las bases moleculares de la formación de las asociaciones biológicas implica entender dos factores principales sobre los cuales se establece el reconocimiento molecular: la especificidad y la afinidad. La especificidad involucra la capacidad de discriminar entre ligandos diferentes, y se sustenta en el grado de complementariedad estereoquímica de las superficies moleculares participantes. La afinidad está relacionada con la existencia de interacciones químicas favorables, como lo son: el efecto hidrofóbico, los puentes de hidrógeno, las interacciones electrostáticas y la incorporación de moléculas de agua: las cuales determinan si el proceso es espontáneo. La participación de cada una de las fuerzas involucradas en la asociación dependerá en alta medida de las características fisicoquímicas de las moléculas interactuantes.

Aunque cualitativamente resulta sencillo atribuir preponderancia a las fuerzas involucradas en una asociación biológica determinada, cuantitativamente resulta difícil atribuir un peso específico a cada una de ellas. Por lo tanto, elucidar los mecanismos y parámetros termodinámicos de unión de estos sistemas resulta de interés para ganar una mayor comprensión sobre las bases físicas en las que se sustentan las funciones biológicas.

1.1 LA β -LACTOGLOBULINA

1.1.1 ESTRUCTURA

La β -Lactoglobulina bovina (BLG) es una proteína globular pequeña con una masa molecular de 18350 Da. Posterior a la publicación de la estructura cristalográfica de la proteína transportadora de retinol (PTR) [1], se observó su similitud estructural con la BLG [2], y fue agrupada en la familia de las lipocalinas [3-5]. Estudios cristalográficos muestran que la topología estructural de la BLG consiste de 9 hebras beta antiparalelas (hebras de la A-I), 8 de las cuales se agrupan formando un barril beta en forma de cáliz (hebras de la A-H), una alfa hélice de tres giros que se encuentra orientada hacia el exterior entre las hebras G y H (figura 1A), y la hebra beta I, la cual forma la intercara de unión con la hebra I del otro protómero (figura 1B) [6-9]. La asociación de ambos protómeros da lugar a la formación de un homodímero (figura 1B).

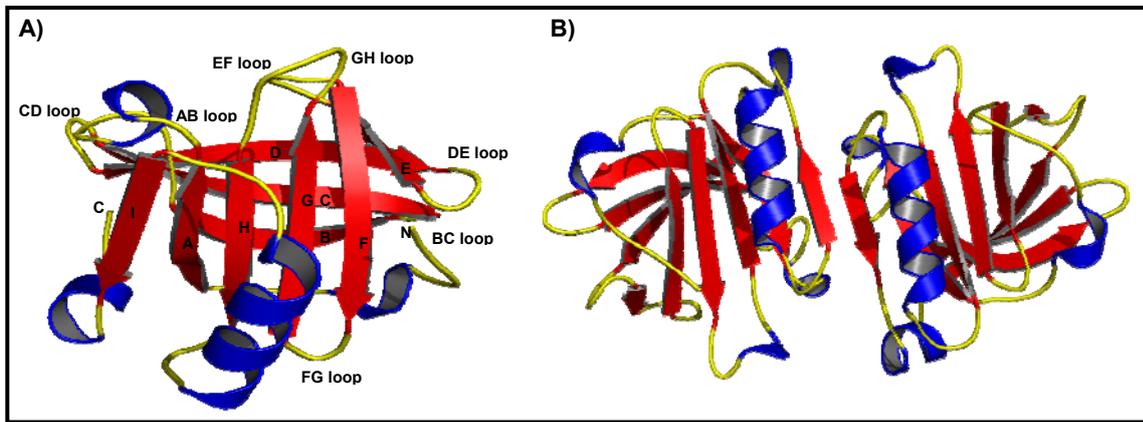


Figura 1. A) Estructura terciaria y B) estructura cuaternaria de BLG. Se representan los diferentes componentes estructurales: hebras β (en rojo), α -hélice (en azul) y los loops (amarillo).

1.1.2 LAS VARIETADES NATURALES DE BLG

Se ha reportado la existencia de 6 variedades de BLG en la leche de vaca. Las variedades A y B son las más predominantes y estudiadas, estas difieren en tan sólo dos posiciones en la cadena polipeptídica (Figura 2).

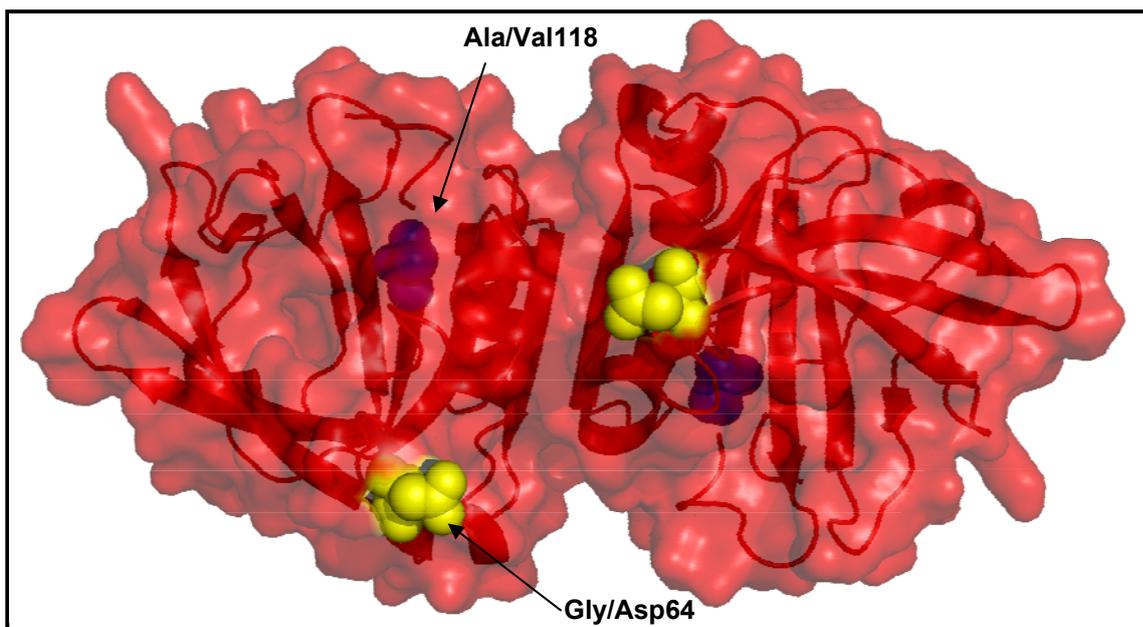


Figura 2. Representación esquemática de la estructura 3D del dímero de BLG, en la que se resalta las mutaciones que diferencian a ambas variedades. Las mutación Asp64/Gly (esferas en amarillo) y Ala/Val118 (esferas en azul).

La sustitución de Val118 (BLGA) por Ala (BLGB) en la hebra H, se encuentra en un ambiente hidrofóbico rodeada por Leu31, Leu39 y Glu120. Esta mutación se localiza en una de las regiones más rígidas de su estructura, como se ha observado por los valores más bajos del factor B para los átomos del residuo 118 [7]. Los dos metilenos menos de la Ala118 no causan rearrreglos considerables en los alrededores de esta mutación, generando una cavidad de $\sim 40 \text{ \AA}^3$

(Figura 3). Basados en esta diferencia estructural, se ha sugerido que BLGB debería ser menos estable que BLGA, debido a la pérdida de 5 contactos hidrofóbicos favorables, lo cual se ha estimado tiene un costo entálpico de $\sim 1.2-1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ [7].

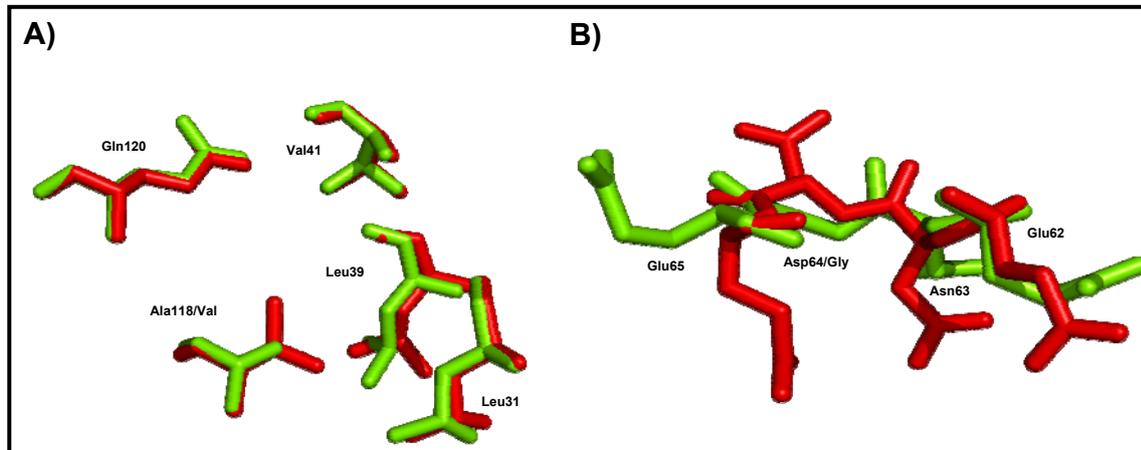


Figura 3. Mutaciones que diferencian a BLGA y BLGB, en color verde y rojo, respectivamente. A) Muestra la mutación Ala118/Val y los residuos que rodean este sitio. B) Resalta la mutación Asp64/Gly y los residuos adyacentes a este sitio.

La segunda mutación Asp64 (BLGA) \rightarrow Gly (BLGB), está localizada en el asa flexible C-D. Esta mutación ocasiona cambios significativos en la cadena principal del loop, lo cual genera que el carbono alfa del residuo 64 de BLGB se encuentre desplazado $\sim 1.0 \text{ \AA}$ con respecto al de BLGA (figura 3B). Esta diferencia se propaga y amplifica dentro de las cadenas laterales, especialmente en las de Glu65, Glu62 y Asn 63 [7]. Diferentes grupos de investigación han sugerido que estas mutaciones podrían ser las responsables de las distintas propiedades biofísicas y bioquímicas observadas entre ambas variantes. Estudios de desplegamiento mediante presión hidrostática muestran que BLGB es $\sim 2 \text{ kcal mol}^{-1}$ más estable que BLGA. Estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) muestran que a baja concentración proteica la BLGA es más estable que BLGB [10, 11], mientras que estudios a alta concentración revelan lo opuesto [12, 13]. Estudios sobre la reactividad de la Cys121, la cual se encuentra libre y expuesta al solvente en ambas variedades, señalan una mayor reactividad para BLGB [14]. La movilidad conformacional de ambas variedades ha sido motivo de controversia. Estudios cristalográficos y de espectroscopía infrarroja de intercambio hidrogeno-deuterio (IR) señalan una mayor movilidad conformacional para BLGA [15]. En tanto que otro grupo de investigación, utilizando de igual manera IR, pero trabajando a alta concentración proteica no observó diferencias de flexibilidad conformacional entre ambas variedades [16].

1.1.3 INTERCARA DEL HOMODÍMERO DE BLG

A temperatura ambiente, BLGA y BLGB, y la mezcla de ambas variantes exhiben una asociación reversible, la cual depende fuertemente de las condiciones del medio. Estudios sobre el comportamiento autoasociativo de esta proteína han sido realizados mediante diferentes técnicas espectroscópicas [17-29] y calorimétricas [29, 30]. Estos estudios sentaron las bases del comportamiento autoasociativo de la BLG. A pH arriba de 3.5 la proteína se comporta como un homodímero cuya fuerza de asociación depende fuertemente del pH [6-9]. Mientras que a pH debajo de 3.5 se favorece predominantemente la especie monomérica debido a la repulsión electrostática, sin que se observen cambios conformacionales significativos detectados por NMR [31, 32]. No obstante, se puede favorecer la formación del dímero con el incremento de la fuerza iónica [20, 23].

Estudios cristalográficos de la especies diméricas de BLGA y BLGB señalan que la intercara dimérica está conformada por las interacciones entre la hebras beta antiparalela I, el asa AB, y un puente salino formado por Asp33-Arg40 (Fig. 4) [6-9]. Cada monómero contribuye al contacto intercatenario con cuatro aminoácidos cargados (Asp28, Asp33, Arg40, Arg148), cuatro polares (His146, Ser150, Asn152, Gln155) y cinco hidrofóbicos (Ile29, Ala34, Ile147, Leu149, Phe151) [6-9]. Los monómeros están asociados mediante doce puentes de hidrógeno distribuidos a lo largo de la intercara de unión. La intercara dimérica oculta es de $\sim 1100 \text{ \AA}^2$ de área, lo cual corresponde a $\sim 6\%$ del total del área superficial accesible al solvente de cada uno de los monómeros. Este valor queda en el nivel más bajo para homodímeros de proteína, sugiriendo una K_a baja [8]. Esta intercara posee un alto contenido de aminoácidos polares, que la hacen salirse del estándar de las intercaras homodiméricas y heterodiméricas estudiadas hasta el momento [33-35]. Esta característica en conjunto con una baja complementariedad de la intercara [36], ocasionan una alta densidad de moléculas de agua que se encuentran mediando y estabilizando la intercara de asociación del homodímero de BLG.

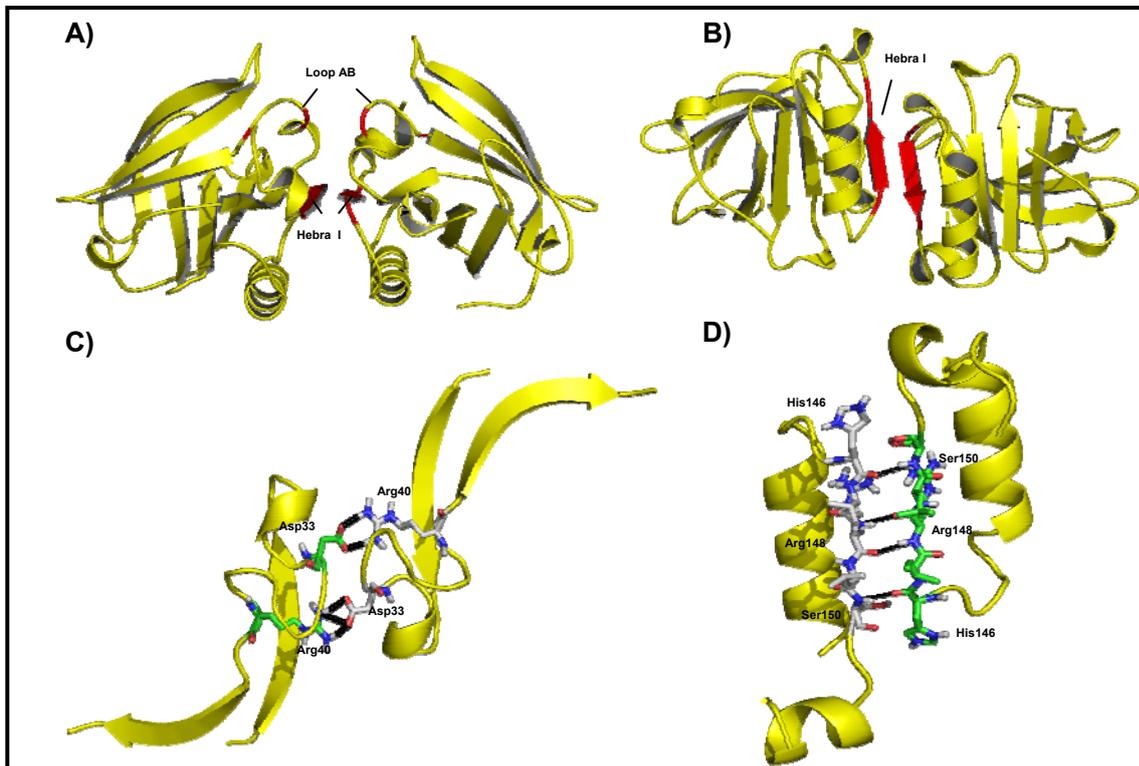


Figura 4. A y B) Representan las regiones involucradas en la intercara dimérica (rojo). C) Los Puentes de hidrógeno entre el asa AB y D) Los puentes de hidrógeno entre la hebra I.

1.1.4 TRANSICIÓN DE TANFORD

En 1959, Tanford *et al.* [37] observaron un comportamiento peculiar durante la titulación de la BLG: El carboxilo de la cadena lateral de un residuo mostró un pKa de ~ 7.3 y parecía estar expuesto al solvente en medio básico, mientras que mostraba estar oculto al solvente en medio ácido. A este rearrreglo estructural se le denominó como transición de Tanford. Evidencias recientes llevaron a la identificación de este carboxilo anómalo situado en Glu89, el cual se localiza en el asa E-F. Qin *et al.* [38] resolvieron la estructura cristalográfica de la BLG a tres diferentes valores de pH (6.3, 7.1 y 8.2). El análisis de RMSD del asa E-F para estas tres estructuras mostró un valor alto. La titulación de la cadena lateral de Glu89 a pH básico involucra un rearrreglo de los puentes de hidrógeno de los residuos Leu87, Glu89, Asn90, Glu108, Asn109, Ser110 y Ser116, promoviendo la apertura del asa E-F y la consecuente exposición al solvente de la cadena lateral de Glu89 (Figura 5). El Glu89 modifica su exposición al solvente de 4 \AA^2 a pH 6.2 a 116 \AA^2 a 7.1 y 136 \AA^2 a pH 8.2 [39]. El cambio en la conformación del asa E-F regula la apertura del cáliz de la BLG, permitiendo la unión de ligandos dentro del cáliz de la proteína.

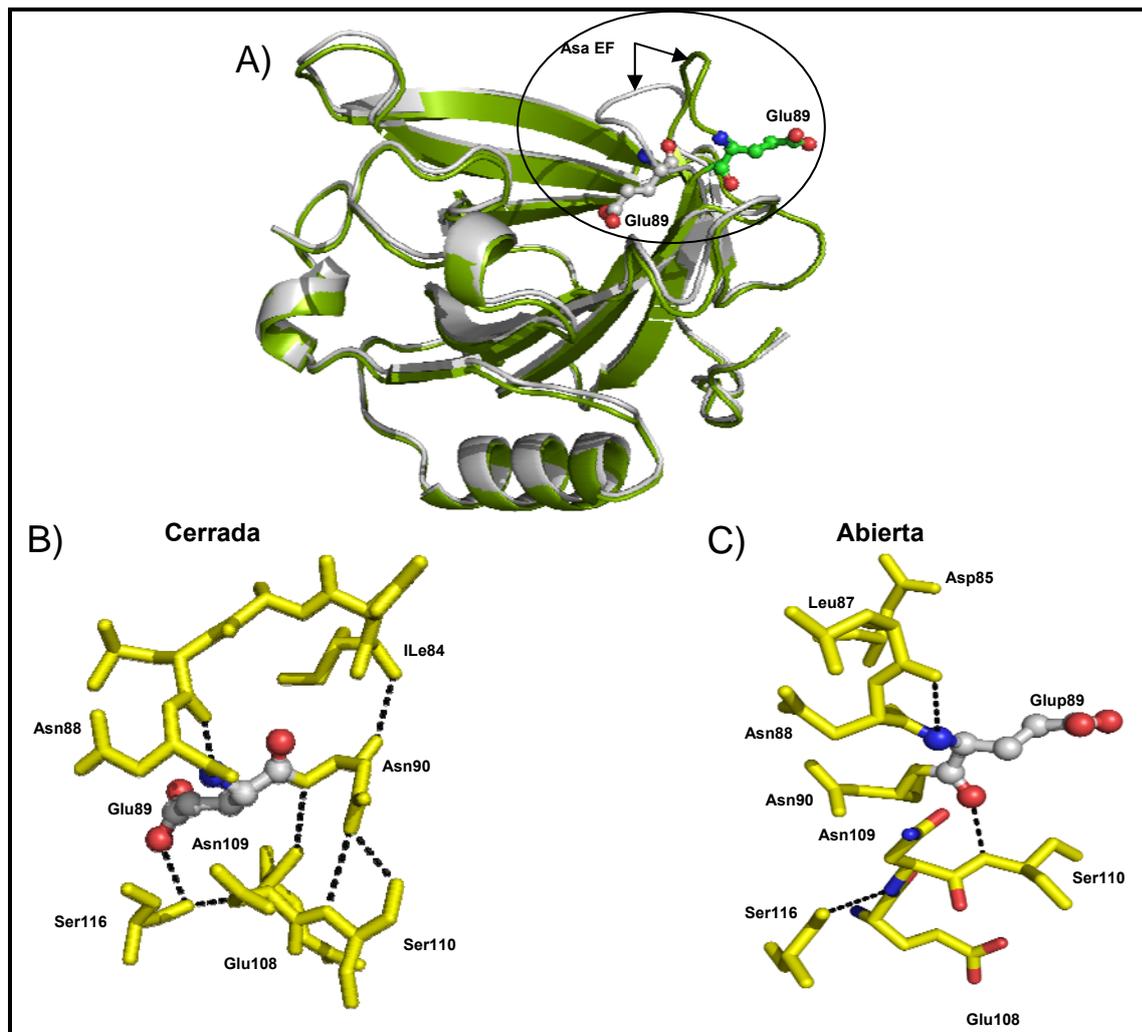


Figura 5. Transición de Tanford. A) Estructura de BLG en su forma cerrada (blanco) y abierta (verde). B) Arreglo de los puentes de hidrógeno de los residuos Leu87, Glu89, Asn90, Glu108, Asn109, Ser110 y Ser116, en la forma cerrada y C) Abierta.

1.1.5 SITIO DE UNIÓN A LIGANDO

La gran mayoría de las lipocalinas poseen la capacidad de unir ligandos hidrofóbicos, y algunas tienen afinidad hacia receptores celulares específicos [40, 41]. Aunque BLG ha sido aislada de la leche de rumiantes formando complejo con ácidos grasos [42] y se ha demostrado *in vitro* [43, 44] que unidos diversos ligandos hidrofóbicos, su función hasta el momento es incierta.

Sólo se conoce la estructura tridimensional de la BLG formando complejo con el ácido palmítico, ácido láurico, retinol y vitamina D3, observándose que el sitio de unión principal es el cáliz [45-49]. Este cáliz es altamente hidrofóbico (figura 6B), y en el complejo los átomos del ligando quedan inmersos en el cáliz y los grupos polares se encuentran expuestos al solvente, estabilizados por residuos de la entrada del cáliz (figura 6B). No obstante, recientemente se demostró que la vitamina D3, además de unirse a la BLG en el cáliz, se une

en un segundo sitio localizado entre la hebra I y la hélice alfa (figura 6A). Además, estudios recientes mediante relajación de dispersión magnética (MRD) y de dinámica molecular (MD) mostraron que este cáliz se encuentra deshidratado en la forma apo y holo, y que el costo de hidratarlo es energéticamente desfavorable [50]. Estos resultados concuerdan con la deshidratación observada mediante estudios cristalográficos [6,7].

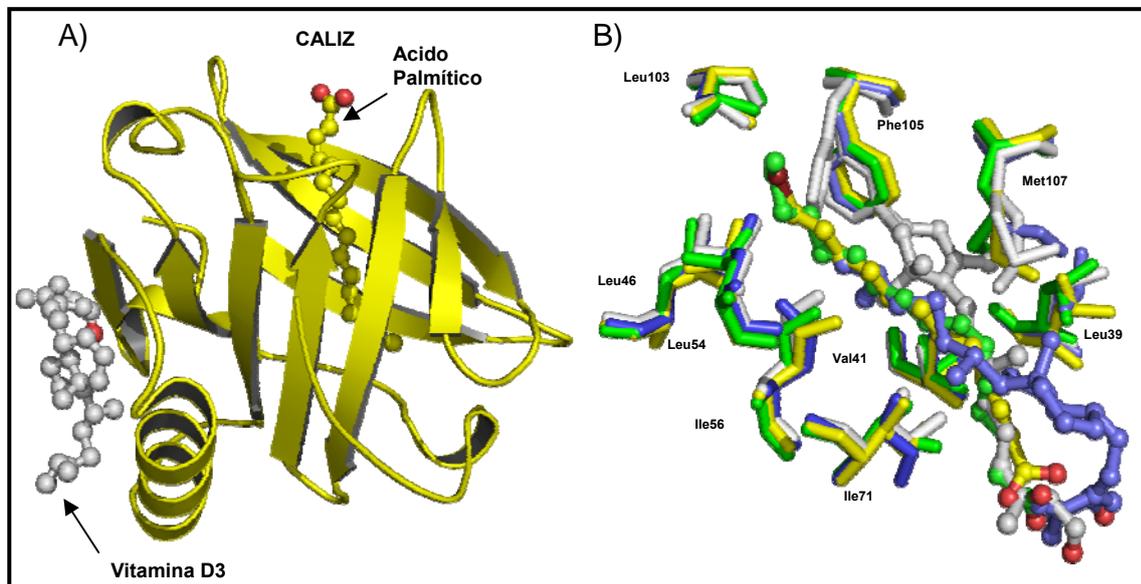


Figura 6. A) Muestra el cáliz de BLG formando complejo con el ácido palmítico y el segundo sitio de unión de la BLG (localizado entre la α -hélice y la hebra beta I). B) Residuos que conforman el cáliz de BLG estabilizando la cadena alifática del ácido palmítico (verde PDB 1B00), ácido láurico (amarillo PDB 1BSO), retinol (blanco PDB 1GX8) y vitamina D3 (azul PDB 2GJ5).

En el presente estudio se realizó una caracterización detallada de la homodimerización y de la unión de ligandos de BLGA y BLGB mediante CTI, análisis estructural y modelado computacional, con el objetivo fue profundizar nuestra comprensión sobre fuerzas que guían la dimerización y la asociación de ambas variedades. Si bien se trata de isoformas naturales que poseen la misma estructura tridimensional, hasta la fecha no es claro el por qué estas dos mutantes exhiben diferentes propiedades bioquímicas y biofísicas.

2. OBJETIVOS

- A. Realizar una caracterización energética-estructural de la dimerización de BLGB de manera similar a la realizada para BLGA.

- B. Realizar un análisis comparativo del comportamiento termodinámico de las dos variantes, con la finalidad de tener una visión más detallada del proceso de auto-asociación.
- C. Estudiar las fluctuaciones conformacionales de ambas variedades en su forma monomérica y dimérica, mediante modelado computacional, con el objetivo de relacionar nuestros resultados experimentales con los obtenidos mediante modelos computacionales.
- D. Caracterizar termodinámicamente la asociación de ambas variedades con el ácido láurico (un ligando afín a ambas variedades), para escudriñar hasta qué punto las mutaciones que diferencian a las dos variedades afectan sus propiedades de unión.
- E. Realizar un estudio de la movilidad conformacional de las especies monoméricas de ambas variedades tanto en su forma libre y asociada con ácido láurico mediante modelado computacional, con el interés de relacionar nuestros resultados experimentales con los obtenidos *in silico*.

3. ENERGÉTICA-ESTRUCTURAL. TEORÍA

3.1 TERMODINÁMICA DE UNIÓN

Cuando estudiamos la termodinámica de las interacciones macromoleculares en reacciones de asociación, dos escenarios pueden ser posibles [51]: Que el complejo se forme por dos

subunidades diferentes (complejo heterodimérico) o que el complejo esté formado por dos subunidades idénticas (complejo homodimérico). Aunque el estudio de ambos tipos de sistemas requiere estrategias experimentales diferentes, ambos casos se rigen por el mismo esquema químico basado en asociaciones reversibles al equilibrio.



donde A y B son las macromoléculas interactuantes. La fuerza de la interacción está dada por la constante de asociación (K_a), o por la constante de disociación (K_d), que determina las abundancias de las especies al equilibrio (ecuación 2).

$$K_a = \frac{[AB]_{eq}}{[A]_{eq}[B]_{eq}} = \frac{1}{K_d} \dots\dots\dots(2)$$

donde $[A]_{eq}$ y $[B]_{eq}$ son las concentraciones de los reactantes libres y $[AB]_{eq}$ es la concentración del complejo en el equilibrio. La espontaneidad de la asociación molecular está dada por la variación en la energía libre de unión (ΔG_a) entre las especies libres y formando el complejo (ecuación 2). Las concentraciones de reactivos y productos se presupone que son 1M, salvo que se especifiquen de forma explícita otros valores.

$$\Delta G_a = -RT \ln K_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \dots\dots\dots(3)$$

$$\Delta G_d = -RT \ln K_d = \Delta H_d - T\Delta S_d \dots\dots\dots(4)$$

donde R es la constante de los gases ($1.9872 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta (Kelvin). Las energías libres de Gibbs de asociación (ΔG_a) o de disociación (ΔG_d), pueden ser expresadas en términos de las contribuciones entálpicas (ΔH_a) y entrópicas (ΔS_a) del proceso, y reflejan los diferentes tipos de interacciones. ΔH_a es igual al cambio en la energía interna, cuyo valor dependerá de los cambios de las interacciones de van der Waals y las interacciones electrostáticas. ΔS_a es el resultado del cambio de los grados de libertad de los solutos (entropía de mezclado y conformacional) y solvente (entropía de solvatación).

Por otro lado, la determinación de ΔH_a a diferentes temperaturas nos permite obtener el cambio en la capacidad calorífica a presión constante, ΔC_{p_a} , que es definido como:

$$\Delta Cp_a = \frac{(\partial \Delta H_a)}{(\partial T)_p} \dots\dots\dots(5)$$

Alternativamente, ΔCp_a puede ser estimado a partir de la dependencia de ΔS_a con respecto a la temperatura:

$$\Delta Cp_a = \frac{(\partial \Delta S_a)}{(\partial \ln T)_p} \dots\dots\dots(6)$$

De esta manera, el ΔG_a se puede especificar a una temperatura dada si se conoce ΔH_a , ΔS_a y ΔCp_a a una temperatura de referencia (T_R).

$$\Delta G_a = \Delta H_{a_{TR}} - T\Delta S_{a_{TR}} + \Delta Cp_{a_{TR}} \left[(T - T_{TR}) - T \ln \left(\frac{T}{T_{TR}} \right) \right] \dots\dots\dots(7)$$

El ΔCp_a es un parámetro termodinámico muy importante en la caracterización termodinámica de las asociaciones moleculares, puesto que actúa como una sonda de los cambios estructurales del solvente debido a la exposición u ocultamiento de área superficial accesible al solvente en una asociación molecular. Existen varios métodos que permiten estudiar la termodinámica de las reacciones biomoleculares como lo son: espectroscopía de fluorescencia, diálisis al equilibrio, ultracentrifugación analítica, resonancia magnética nuclear (RMN) y resonancia de superficie de plasmones (RSP). No obstante, todas estas técnicas sólo proporcionan de manera directa la K_a por experimento, y la obtención de los demás parámetros termodinámicos es de manera indirecta a través del método de van't Hoff, que precisa de la realización de múltiples experimentos a diferentes temperaturas y gasto de recursos. Mientras que la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés) permite determinar con alto grado de precisión y de forma directa el valor de los parámetros termodinámicos.

3.2 MODELOS DE ÁREA SUPERFICIAL

La determinación de la estructura de los complejos biomoleculares genera poca información acerca de la estabilidad y energética de los elementos que conforman la interacción. Mientras

que los parámetros termodinámicas obtenidos para un complejo biomolecular, pero en ausencia de información estructural, son de limitada utilidad. Por lo tanto, la pregunta de cómo los parámetros termodinámicos se relacionan con la información estructural ocupa una posición central en el estudio de la biofísica de macromoléculas. La cuantificación de los efectos termodinámicos implicados en una variación estructural inducida por cambios en el estado de equilibrio (formación de complejo biomolecular o plegamiento proteico), podría generar grandes repercusiones en el diseño de proteínas y fármacos. Por ejemplo, la capacidad de predecir la K_a para un proceso específico, basándonos únicamente en el conocimiento estructural, podría tener beneficios importantes en la industria farmacéutica. A la fecha, se han diseñado numerosos modelos que correlacionan propiedades energético-estructurales. Un punto principal en la construcción de estos modelos ha sido la suposición de la aditividad simple, i.e.,

$$\Delta T = \sum \Delta E_i N_i \dots\dots\dots(8)$$

donde ΔT es una función termodinámica, N_i es el numero de grupos químicos de tipo i , y ΔE_i la contribución específica por tipo de grupo químico [52]. Inicialmente, esta propuesta fue formulada a partir del estudio de la transferencia de moléculas simples entre medios de diferente polaridad, observandose una relación lineal entre la energía libre estándar de transferencia y el número de grupos químicos [53, 54]. Posteriormente, esta observación se exportó al estudio de cambios conformacionales en el plegamiento de proteínas, haciendo uso de datos de transferencia de compuestos modelo de un medio acuoso a una fase no polar, simulando de alguna manera el cambio de ambiente de un grupo en el estado desplegado (totalmente expuesto al solvente) al plegado (inaccesible al solvente). Finalmente, se optó por transformar los datos por grupo químico a su dependencia con respecto al área superficial accesible al solvente [55]. A partir de estos estudios, se demostró que las principales contribuciones al ΔG_a , ΔH_a , ΔS_a y ΔCp_a para el plegamiento y desplegamiento proteico pueden ser descritas en términos de cambios de área superficial accesible al solvente de tipo polar y no polar.

Inicialmente las parametrizaciones empíricas basadas en el cálculo de los cambios de área superficial accesible al solvente fueron aplicadas a la predicción de la energética del plegamiento proteico. Posteriormente, se observó que la naturaleza de las interacciones atómicas involucradas en las reacciones de asociación era similar a lo observado en el

plegamiento proteico, y se sugirió aplicarlo en interacciones proteína-proteína y proteína-ligando.

3.2.1 ÁREA SUPERFICIAL ACCESIBLE AL SOLVENTE

De acuerdo a Lee y Richards [56], el área superficial accesible al solvente (*ASA*) se define como la superficie macromolecular sobre la cual rueda una esfera de prueba con un radio finito (generalmente se usa un radio igual al del agua, 1.4 Å). En general, los cambios en el área superficial accesible al solvente (ΔASA) son determinados como la diferencia entre el *ASA* del estado final e inicial. Para un proceso de asociación molecular, esto es la diferencia en *ASA* del complejo y la suma del *ASA* de las moléculas participantes, obteniendo siempre valores negativos de ΔASA , es decir área oculta. Este ΔASA posteriormente se subdivide en contribuciones de tipo polar y no polar, mediante la asignación de la naturaleza polar ASA_{polar} y no polar ASA_{apolar} de los átomos que conforman la superficie macromolecular. El oxígeno, nitrógeno son considerados polares y todos los átomos de carbono y azufre como no polares. En el caso ideal de contar con información estructural del complejo y de las moléculas participantes en sus formas libres, será posible determinar directamente el cambio conformacional entre el estado final y el inicial. Sin embargo, aún cuando no se observen cambios conformacionales significativos entre ambos estados (asociación tipo cuerpo rígido), es necesario verificarlo mediante otros métodos, ya que pudieran existir rearrreglos conformacionales que afecten la energética de unión, y que no son apreciables en las estructuras estáticas de las moléculas. Por otro lado, para asociaciones que conlleven rearrreglos estructurales significativos, será necesario añadir un modelo de la molécula que experimente este rearrreglo. Este comportamiento ha sido ampliamente observado para asociaciones proteína-péptido, para las cuales se conoce el estado final, pero no el estado inicial del péptido libre [57-58].

3.2.2 CÁLCULO DEL ΔCp_a

La contribución mas importante al ΔCp_a para procesos de unión surge principalmente de los efectos de deshidratación de la superficie de la proteína y el ligando. Con contribuciones negativas debido al ocultamiento de área superficial accesible al solvente de tipo apolar (ΔASA_{apolar}) y contribuciones positivas debido al ocultamiento de área superficial accesible al solvente de tipo polar (ΔASA_{polar}). A partir de estudios de disolución de compuestos modelo sólidos, la siguiente parametrización se ha propuesto [59, 55]:

$$\Delta C p_b = \Delta c_{apolar} \cdot \Delta ASA_{apolar} + \Delta c_{polar} \cdot \Delta ASA_{polar} \dots\dots\dots(9)$$

donde los parámetros Δc_{apolar} y Δc_{polar} son los coeficientes de proporcionalidad que contienen la contribución específica por Å^2 de hidratación superficial de tipo apolar y polar, respectivamente.

3.2.3 CÁLCULO DEL ΔH_a

Las contribuciones principales a la entalpía en los procesos de unión surgen principalmente de dos factores opuestos. Por un lado, se da la pérdida y formación de puentes de hidrógeno, puentes salinos y contactos de van der Waals entre la proteína y el ligando. Por otro lado, ocurre la desolvatación de las superficies de contacto, involucrando tanto la pérdida de contactos solvente-soluto, como cambios en las interacciones solvente-solvente. La parametrización de estas contribuciones a partir de datos de desplegamiento proteico conlleva una regresión lineal de la entalpía de desplegamiento proteico en función de ΔASA_{apolar} y ΔASA_{polar} [55, 59, 60]. Esta regresión lineal se realiza a 60°C, la temperatura media de desplegamiento proteico (T_m), con la finalidad de minimizar el error de extrapolación. La regresión proporciona las contribuciones por Å^2 de superficie polar (Δh_{polar}) y apolar (Δh_{apolar}) a la temperatura de referencia de 60°C:

$$\Delta H_a(60^\circ C) = \Delta h_{apolar} \Delta ASA_{apolar} + \Delta h_{polar} \Delta ASA_{polar} \dots\dots\dots(10)$$

Para determinar el ΔH_a a una temperatura específica T, $\Delta H(T)$ estará dada por la ecuación estándar.

$$\Delta H_a(T) = \Delta H_a(60^\circ C) + \Delta C p(T - 333.15) \dots\dots\dots(11)$$

Las parametrizaciones descritas anteriormente han demostrado ser una valiosa herramienta en la predicción de ΔH_a para la interacción proteína-proteína y proteína-péptido. No obstante, la correlación entre la estructura y el ΔH_a para la interacción de moléculas pequeñas (PM < 800) con macromoléculas biológicas han mostrado resultados inconsistentes. Un primer intento para estudiar la parametrización empírica del ΔH_a para este tipo de sistemas ha sido publicado, como una primera aproximación [61]. El cambio entálpico experimental de unión (ΔH_{exp}) puede considerarse como la combinación de al menos tres términos.

$$\Delta H_{\text{exp}} = \Delta H_{\text{int}} + \Delta H_{\text{solv}} + \Delta H_{\text{prot}} \dots\dots\dots(12)$$

La entalpía intrínseca de unión (ΔH_{int}) refleja la interacción del ligando con la proteína y corresponde a la situación cuando el ligando y la proteína adoptan la misma conformación en los estados libre o unido. Se asume que estas contribuciones a la entalpía son escalables con los cambios en el área superficial accesible que pueden ser parametrizados. La entalpía de solvatación (ΔH_{solv}) refleja el cambio en la hidratación del complejo proteína-ligando y de las especies libres. El ΔH_{prot} está contenido en la ΔH_a , y es producto de los efectos de protonación que surgen en la interacción. Este término necesita ser determinado realizando experimentos con soluciones amortiguadores de diferentes entalpías de ionización. Una vez corregida de los efectos de protonación ΔH_{prot} , el ΔH_a a una determinada temperatura será la suma del término constante ΔH_{int} y el término específico para cada ligando.

$$\Delta H_a(T) = \Delta H_{\text{apolar}(T)} \Delta ASA_{\text{apolar}} + \Delta H_{\text{polar}(T)} \Delta ASA_{\text{polar}} \dots\dots\dots(13)$$

La ΔH_{int} es descrita ahora en términos de ΔASA con $\Delta H_{\text{apolar}(T)}$ y $\Delta H_{\text{polar}(T)}$ como los coeficientes escalables que dan las contribuciones por Å² de superficie polar y apolar, respectivamente.

3.2.4 CÁLCULO DEL ΔS_a

La contribución entrópica total asociada con reacciones de unión puede expresarse como la suma de tres componentes [62]:

$$\Delta S_{\text{total}} = \Delta S_{\text{solv}} + \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{r/t} \dots\dots\dots(14)$$

donde ΔS_{solv} describe el cambio en la entropía como resultado de la liberación de solvente por la unión, ΔS_{conf} es un término configuracional que refleja la reducción de los grados de libertad rotacional alrededor de los ángulos de torsión de la proteína y del ligando. $\Delta S_{r/t}$ conlleva la pérdida de grados de libertad translacional y rotacional cuando se forma el complejo a partir de dos moléculas libres en solución.

Una de las contribuciones más importantes al cambio entrópico surge principalmente del término (ΔS_{solv}), debido principalmente al ocultamiento del área superficial de tipo apolar, y su valor aproximado para una temperatura (T) viene dada por la siguiente ecuación.

$$\Delta S_{solv} = \Delta Cp \ln(T/T_s^*) \dots \dots \dots (15)$$

donde T_s^* es la temperatura a la cual no existe contribución a la entropía por desolvatación de área apolar, y es igual a 385 K [63-65].

El termino entrópico translacional/rotacional $\Delta S_{r/t}$ contempla la reducción del número de partículas en solución y su grado de libertad. Se han estimado diferentes valores para la magnitud de $\Delta S_{r/t}$ [57, 66]. Consideraciones empíricas y teóricas sugieren que este término contribuye con un valor de -4 a -10 cal K⁻¹ mol⁻¹ a la entropía total en un evento de asociación molecular [63, 67, 68].

Finalmente, la entropía conformacional ΔS_{conf} refleja la contribución que surge de los cambios en la entropía conformacional de las cadenas laterales, así como otros rearrreglos estructurales de la proteína y del ligando inducidos por la formación del complejo.

La contribución al ΔS_{conf} de las cadenas laterales involucradas en un proceso de unión puede ser estimada, considerando una contribución promedio de -4.3 cal K⁻¹ mol⁻¹ por residuo al [57, 65, 69]. Asumiendo que la contribución entrópica configuracional por parte del ligando es pequeña, un estimado del número de aminoácidos (X_{res}) que participan en la interacción se determina mediante:

$$X_{res} = \frac{\Delta S_{conf}}{-4.3 cal K^{-1} mol^{-1}} \dots \dots \dots (16)$$

Si se conoce por estudios teóricos o experimentales el numero de cadenas laterales que participan en el proceso de unión, es posible calcular la contribución al ΔS_{conf} , como la suma de todos los residuos involucrados en la asociación [70-73]. Un proceso de unión involucra 2 contribuciones al ΔS_{conf} : (i) restricciones alrededor de los ángulos de torsión de las cadenas laterales y (ii) inmovilización del esqueleto peptídico. Si la asociación no involucra cambios conformacionales significativos, sólo aplicaría la contribución de las cadenas laterales. Entonces, la contribución de las cadenas laterales se calcula asumiendo que la entropía es cero, cuando están totalmente ocultas al solvente y escala linealmente con ΔASA . Dando como resultado un valor máximo cuando están totalmente expuestas al solvente. Por lo tanto, el término $\Delta S_{oculto-expuesto}$ debe de ser introducido para considerar la ganancia entrópica debida a esta transición, lo cual difiere para cada residuo:

$$\Delta S_{conf} = \sum_i \frac{\Delta ASA_{sc,i}}{\Delta ASA_{AXA,i}} \Delta S_{oculto-expuesto,i} \dots\dots\dots(17)$$

donde $\Delta ASA_{sc,i}$ es el ΔASA de la cadena lateral i en la asociación, y $\Delta ASA_{AXA,i}$ es el ΔASA de las cadenas laterales en un tripéptido extendido (Ala-X-Ala) [74]. La suma se realiza sobre todas las cadenas laterales involucradas en la asociación. Los valores de $\Delta ASA_{sc,i}$ se calculan a partir de datos estructurales, y los estimados para $\Delta ASA_{AXA,i}$ y $\Delta S_{oculto-expuesto}$ están disponibles [74].

Alternativamente el ΔS_{total} puede determinarse experimentalmente, y ΔS_{solv} y $\Delta S_{r/t}$ pueden ser estimadas, por lo que ΔS_{conf} puede calcularse a partir de.

$$\Delta S_{conf} = \Delta S_{total} - \Delta S_{solv} - \Delta S_{r/t} \dots\dots\dots(18)$$

3.3 SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR (DM)

El incremento significativo del número de estructuras depositadas en el PDB (protein data bank) en conjunto con el poder de cómputo y la disponibilidad de métodos teóricos incluidos en sofisticados programas de simulación, han ampliado la aplicabilidad de la aproximación computacional a los sistemas biológicos. La expansión es de tal magnitud que en el campo de la bioquímica, las herramientas computacionales se utilizan frecuentemente para dilucidar la estructura secundaria de algunas proteínas a partir de su secuencia (predicción de estructura), hacer modelados de macromoléculas cuya estructura tridimensional no ha sido resuelta (modelado por homología), estudiar la geometría y fisicoquímica del acoplamiento proteína-ligando (docking), realizar un diseño racional de proteínas y para estudiar el comportamiento a nivel atómico de las proteínas o biomoléculas en un ambiente acuoso (DM). Actualmente, la DM representa una herramienta valiosa para realizar estudios más allá de la accesibilidad experimental, puesto que los métodos experimentales que a la fecha se han desarrollado para observar propiedades dinámicas de las proteínas, resultan muy costosos y requieren gran cantidad de tiempo.

Las simulaciones de dinámica molecular se basan en la resolución de las ecuaciones de movimiento de Newton (ecuación 19).

$$F_i = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \dots\dots\dots(19)$$

donde $r_i(t) = (x_i(t), y_i(t), z_i(t))$ es la posición vectorial de la partícula i , F_i es la fuerza aplicada a una partícula i en el tiempo t , y m_i es la masa de la partícula i .

Las fuerzas son las derivadas negativas de una función de potencial $V(r_1, r_2, \dots, r_N)$:

$$F_i = -\frac{dV}{dr_i} \dots\dots\dots(20)$$

Las ecuaciones 19 y 20 se resuelven simultáneamente en pequeños pasos de tiempo de forma iterativa para hacer evolucionar el sistema. Conociendo la fuerza sobre cada átomo en el sistema es posible determinar la aceleración de cada átomo. La integración de la ecuación del movimiento da lugar a una trayectoria que describe la posición, velocidad y aceleración de las partículas del sistema a lo largo del tiempo. El método es determinista, es decir, una vez que se conocen las velocidades y posiciones de cada átomo, en principio, el estado del sistema se puede predecir en cualquier momento en el pasado o en el futuro. El sistema se monitorea durante un determinado intervalo de tiempo, cuidando que la presión y la temperatura permanezcan dentro de los valores requeridos para reproducir las condiciones experimentales. Las coordenadas resultantes se almacenan en un archivo de salida. Estas coordenadas en función del tiempo, representan la trayectoria del sistema. A partir de los cálculos que se realicen sobre la trayectoria es posible determinar las propiedades macroscópicas del sistema de estudio. No obstante, es necesario comparar los datos obtenidos *in silico* con información experimental para valorar la precisión de la simulación.

3.3.1 FUNCIÓN DE POTENCIAL

Una función de potencial es un grupo de ecuaciones que definen la forma en que varía la energía potencial del sistema en función de las coordenadas del sistema. Las ecuaciones describen las interacciones atómicas mediante un conjunto de parámetros que caracterizan dentro de un contexto específico a cada elemento del sistema. Para calcular la energía potencial del sistema es indispensable definir los campos de fuerza que rigen el movimiento atómico, los cuales están determinados por las contribuciones energéticas tanto de átomos unidos covalentemente (estiramiento del enlace, deformación de ángulos y deformación fuera del plano) como de átomos no unidos covalentemente (fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas). De acuerdo a esto la variación energética del sistema va a depender de las desviaciones de estas contribuciones con respecto a sus valores de equilibrio. Considerando las

contribuciones de átomos enlazados y de átomos no enlazados, la energía potencial se puede expresar como:

$$V(R) = E_{enlace} + E_{no-enlace} \dots\dots\dots(21)$$

$$E_{enlace} = E_{estiramiento} + E_{deformación} + E_{torsión} \dots\dots\dots(22)$$

$$E_{no-enlace} = E_{van-der-Waals} + E_{electrostatica} \dots\dots\dots(23)$$

Existen varios campos de fuerza como son: AMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS/AMBER, entre otros. Éstos tienen en común cada uno de los términos de la ecuación 21; pero difieren en los términos que se le añadan o en las constantes que se empleen (los parámetros). Las dinámicas moleculares realizadas para la elaboración de esta tesis se efectuaron con el programa de GROMACS, que trabaja con los campos de fuerza y los parámetros de GROMOS, del cual a continuación se hace una breve descripción.

3.3.2 INTERACCIONES ENTRE ÁTOMOS ENLAZADOS

3.3.2.1 Deformación del enlace

El primer término de la ecuación (22) considera el estrechamiento del enlace, el cual implica átomos separados por un enlace covalente. Este está representado por la ecuación del oscilador armónico:

$$E_{estiramiento} = \sum_{enlace} \frac{K_{bf}}{2} (b - b_0)^2 \dots\dots\dots(24)$$

Esta ecuación es una representación de la energía potencial en función del desplazamiento, donde K_{bf} es la constante que determina la fuerza del enlace y $(b - b_0)^2$ es la distancia entre dos núcleos atómicos en la configuración de mínima energía. Tanto K_{bf} como $(b - b_0)^2$ son específicos para cada par de átomos enlazados.

3.3.2.2 Deformación del ángulo

El segundo término de la ecuación (22) se refiere a la deformación del ángulo θ_{ijk} con respecto al valor ideal θ_{ijk}^0 . El ángulo θ_{ijk} esta formado por tres átomos diferentes $i-j-k$ enlazados

covalentemente entre sí, y son representados por un oscilador armónico sobre el ángulo θ_{ijk} formado por dos enlaces consecutivos.

$$E_{\text{deformación}} = \sum_{\text{ángulo}} \frac{K_{ijk}^{\theta}}{2} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \dots\dots\dots(25)$$

La numeración i,j,k representan los átomos enlazados, donde j es el átomo intermedio.

3.3.2.3 Torsión

En el término de $E_{\text{torsión}}$ de la ecuación 22 se incluyen tanto el ángulo diedro como el ángulo diedro impropio.

$$E_{\text{torsión}} = \sum_{\text{diedro}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(nw - \gamma)] + \sum_{\text{impropio}} \frac{K_{\text{impropio}}}{2} (\varphi - \varphi_0)^2 \dots\dots\dots(26)$$

El primer término de la ecuación 26 representa el cambio de la energía asociada a la rotación de los ángulos diedro, los cuales se forman entre tres enlaces covalentes. Este potencial tiene un comportamiento periódico y se puede representar mediante una serie de Fourier, donde V_n determina el tamaño de la barrera rotacional, n indica la periodicidad, w es el ángulo diedro y γ hace referencia al ángulo de torsión cuando se encuentra en su mínima energía. El segundo término de la ecuación 26 corresponde al ángulo diedro impropio, representado por la función armónica, donde K_{impropio} es la constante de fuerza del ángulo impropio y Φ es el ángulo de torsión impropio. Este término gobierna la quiralidad y la planaridad de la molécula.

3.3.3 INTERACCIONES ENTRE ÁTOMOS NO ENLAZADOS

3.3.3.1 Interacciones de van der Waals

Las interacciones de van der Waals describen la repulsión o atracción entre dos átomos que no están unidos covalentemente. Con frecuencia estas fuerzas se modelan utilizando el potencial de Lennard-Jones:

$$E_{\text{van-der-Waals}} = \sum \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \dots\dots\dots(27)$$

donde R_{ij} es la distancia de Lennard-Jones de mínima energía, el parámetro ϵ_{ij} es el valor mínimo en la curva de interacción y r_{ij} es la distancia entre los dos átomos (i, j). Las fuerzas atractivas son de largo alcance (mucho menos que las fuerzas electrostáticas) y se deben a las fuerzas de dispersión de London (dipolos instantáneos) y las fuerzas repulsivas son de corto alcance y se deben a la repulsión de las nubes electrónicas.

3.3.3.2 Interacción electrostática

La interacción electrostática es una consecuencia de la distribución interna de los electrones, donde los átomos de las moléculas tienden a adquirir carga. La interacción electrostática entre un par de átomos se representa por el potencial de Coulomb:

$$E_{electrostática} = \frac{q_i q_j}{\epsilon_D r_{ij}} \dots\dots\dots(28)$$

donde ϵ_D es la constante dieléctrica del medio y r_{ij} es la distancia entre dos átomos de cargas q_i y q_j .

3.3.4 INTEGRACIÓN DE LAS ECUACIONES DEL MOVIMIENTO

Como la energía potencial es una función de las posiciones atómicas de todos los átomos del sistema, es imposible encontrar una solución analítica para la ecuación de movimiento. La función de movimiento se puede resolver numéricamente por medio de algoritmos de integración, los cuales asumen que las posiciones, velocidades y aceleraciones pueden ser aproximadas por una serie de expansión de Taylor. Hay varios algoritmos para resolver dicha aproximación, pero uno de los más empleados es el algoritmo de Verlet, el cual usa las posiciones y aceleraciones en el tiempo t y las posiciones para el tiempo $t - \Delta t$ para calcular las nuevas posiciones en el tiempo $t + \Delta t$; en este algoritmo no están explícitas las velocidades. El esquema de integración de Verlet se basa en una expansión de Taylor de tercer orden:

$$\bar{r}_i(t + \Delta t) = 2\bar{r}_i(t) - \bar{r}_i(t - \Delta t) + \Delta t^2 \frac{d^2 \bar{r}_i(t)}{dt^2} \dots\dots\dots(29)$$

La integración de las ecuaciones de movimiento produce una trayectoria que describe las posiciones, velocidades y aceleraciones de las partículas conforme ellas cambian con el tiempo. Si estos datos se conocen para cada uno de los átomos en un determinado instante, entonces el estado del sistema se puede predecir en algún tiempo, futuro o pasado.

3.3.5 MINIMIZACIÓN, CALENTAMIENTO Y EQUILIBRIO DEL SISTEMA

Las simulaciones de un sistema molecular requieren de la generación de un conjunto estadístico de configuraciones representativas del sistema a la temperatura de estudio, a partir del cual se puedan calcular las propiedades macroscópicas del sistema. Si partimos de una configuración fuera del equilibrio, las fuerzas asociadas a la energía potencial podrían ser muy altas y generar una falla en la dinámica de producción. Para evitar este inconveniente es necesario recurrir a un método de minimización de energía. La imposibilidad de encontrar el mínimo global de una estructura macromolecular debido al gran número de dimensiones y el inmenso número de configuraciones que representa la energía potencial de una macromolécula, ha llevado a utilizar como método de minimización la búsqueda del mínimo local más cercano. Esta minimización se encarga de reducir la energía potencial de una conformación, mitigando sus tensiones locales. Durante la minimización las velocidades atómicas se ajustan a cero y como consecuencia de esto los movimientos de todos los átomos se limitan, de esta forma se evitan los grandes desplazamientos de la estructura, con respecto a sus coordenadas iniciales. Una vez que se conocen las coordenadas y las velocidades iniciales del sistema, empieza el calentamiento, para lo cual, primero se asignan las velocidades a bajas temperaturas, posteriormente se hacen ligeros incrementos de la temperatura y para cada una de ellas se van asignando las nuevas velocidades, este proceso se repite hasta alcanzar la temperatura deseada. A esta técnica se le ha denominado “simulated annealing” por el sucesivo calentamiento y enfriamiento. Después del calentamiento continúa la etapa del equilibrio, que es una simulación de dinámica molecular, cuyo objetivo es asegurar que el sistema se encuentre en equilibrio a la temperatura y presión de trabajo, y libre de fluctuaciones erráticas. Durante el equilibrio varias propiedades se monitorean, como la estructura, presión, temperatura y energía del sistema.

3.3.6 INICIALIZACIÓN

La ecuación de movimiento de Newton requiere los valores iniciales, tanto de las coordenadas como de las velocidades para dar inicio a la integración. Las coordenadas iniciales usualmente se obtienen de las estructuras moleculares determinadas principalmente por cristalografía de rayos X o de RMN, y las velocidades iniciales se asignan al azar de acuerdo a la distribución de Maxwell Boltzman a una temperatura T ; normalmente estas asignaciones se hacen a baja temperatura para posteriormente incrementar la temperatura del sistema.

3.3.7 DESARROLLO DE LA DINAMICA MOLECULAR

Durante esta etapa se ejecuta la simulación del sistema en un período de tiempo dado. En el transcurso de este tiempo se registran las diferentes configuraciones en un número significativo de pasos, es decir cada vez que transcurre una fracción de tiempo Δt , se integra la ecuación de movimiento y los valores de las posiciones y de las velocidades se guardan. En esta fase ya no es necesario hacer el escalonamiento de las velocidades, debido a que el método de integración no las requiere. La simulación de dinámica molecular arroja información acerca de las propiedades conformacionales de los sistemas y la manera como la estructura cambia con el tiempo.

3.3.8 DESVENTAJAS DE LAS SIMULACIONES COMPUTACIONALES

En las dinámicas moleculares se utiliza un campo de fuerza que solamente es una función de las posiciones de los átomos. Esto significa que los movimientos electrónicos no se consideran, sino que se supone que “los electrones ajustan su dinámica de manera instantánea cuando una posición atómica cambia” (Aproximación de Born-Oppenheimer) y permanecen en el estado basal. Por este motivo, en una DM no se consideran los estados electrónicos excitados ni los procesos de transferencia de electrones, por lo tanto las reacciones químicas no se pueden simular con esta metodología.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

Todos los reactivos, así como las variedades A (L7880) y B (L8005) de la BLG utilizadas en este estudio, se compraron a Sigma. La BLG liofilizada con 99 % de pureza se disolvió en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 con NaCl 0.1 M, poco antes de realizar los

experimentos para asegurar estabilidad. La solución proteica fue diafiltrada exhaustivamente utilizando una membrana de polisulfonato (10,000 pm) en un equipo de diafiltración (Amicon). Se evaluó su pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12 %, por lo que se utilizó sin purificación posterior. La concentración de proteína fue evaluada espectrofotométricamente ($A_{280\text{nm}} 0.1\% = 0.97$), utilizando un espectrofotómetro Beckman–Coulter DU 7500.

4.2 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (CTI)

Los experimentos calorimétricos del estudio de dimerización de BLG se realizaron en un calorímetro de titulación VP–ITC (MicroCal, Northampton, MA). Debido a la naturaleza autoasociativa de la BLG, se utilizó un protocolo de dilución para realizar las determinaciones calorimétricas [51, 75-77]. Bajo este protocolo, una solución proteica predominantemente en forma de oligómero se coloca en la jeringa y una solución amortiguadora se coloca en la celda calorimétrica. La adición paso a paso de la proteína colocada en la jeringa, promoverá su dilución, incrementando la reacción de disociación, llevando al sistema a través de múltiples estados de equilibrio, donde la composición de cada uno de estos estados estará regido por una K_d (ecuación 32).

$$K_d = \frac{[P]^2}{[P_2]} = \frac{1}{K_a} \dots\dots\dots(30)$$

donde $[P]$ y $[P_2]$ corresponden a las concentraciones molares de la forma monomérica y dimerica, respectivamente. De acuerdo a un modelo de disociación simple, el calor asociado a la i -ésima inyección de volumen dV_i dentro de la celda calorimétrica de volumen fijo V_0 , es:

$$q_i = \Delta H_d [P_2]_{iny} dV_i - \Delta H_d ([P_2]_i - [P_2]_{i-1}) \left(V_0 + \frac{dV_i}{2} \right) \dots\dots\dots(31)$$

donde ΔH_d , es la entalpía de disociación del dímero. $[P_2]_i$ y $[P_2]_{iny}$ son las concentraciones de dímero en la celda de reacción y en la jeringa de inyección, respectivamente. Estos dos valores están relacionados con la concentración total de monómero $[P_T]$ a través de la constante de equilibrio.

$$[P_T] = [P] + 2[P_2] = K_d^{1/2} [P_2]^{1/2} + 2[P_2] \dots\dots\dots(32)$$

El ajuste no lineal de las ecuaciones 31 y 32 permite obtener ΔH_d y K_d de las curvas de diluciones calorimétricas. ΔG_d y ΔS_d pueden calcularse fácilmente a partir de relaciones básicas de la termodinámica:

$$\Delta G_d = -RT \ln K_d = \Delta H_d - T\Delta S_d \dots\dots\dots(33)$$

La determinación de la entalpía (ΔH_a) a presión constante a diferentes temperaturas, permite obtener el cambio en la capacidad calorífica a presión constante, ΔC_{p_a} , que es definido como:

$$\Delta C_{p_a} = \frac{\partial \Delta H_a}{\partial T} = \frac{\partial \Delta S_a}{\partial \ln T} \dots\dots\dots(34)$$

Para nuestros experimentos, generalmente se siguió un programa de 40–50 inyecciones consecutivas de 6-10 μ l, la velocidad de agitación fue de 300 rpm. El intervalo de temperaturas evaluadas fue de 15 a 35°C. Utilizamos el parámetro adimensional c ($5[PT]/K_{dis}$) como guía para establecer la concentración de proteína apropiada para los experimentos de dilución. El valor apropiado de c para el estudio de sistemas diméricos es de entre 10 y 10,000 [51]. Para todos nuestros experimentos el valor de c fue de entre 40 y 70. Los calores obtenidos en las últimas adiciones experimentales fueron considerados como equivalentes al calor de dilución de la proteína. No se observaron variaciones significativas en las mediciones calorimétricas en el intervalo de concentración proteica utilizado (0.8–1.7mM) a cada temperatura. Los resultados obtenidos a cada temperatura corresponden al valor promedio de cuando menos tres mediciones, con su respectiva incertidumbre experimental.

El estudio calorimétrico de la unión de la BLG con ácido láurico y dodecilsulfato sódico (SDS) se realizó en un calorímetro de titulación VP–ITC (MicroCal, Northampton, MA). Se utilizó un protocolo de asociación heterodimérica. La BLG se disolvió en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 con NaCl 0.1 M en un intervalo de concentración de 0.0125-0.0150 mM. La concentración de ácido láurico o SDS en la jeringa fue de 0.25-0.3 mM, concentración significativamente inferior a la respectiva concentración micelar crítica (~1 mM y ~ 4 mM para ácido láurico y SDS, respectivamente) [78]. Se utilizó un programa de 25-28 inyecciones consecutivas de 10 μ l, con un intervalo por inyección de seis minutos, con una velocidad de agitación de 300 rpm. El intervalo de temperaturas evaluadas fue de 35 a 45 °C. Para determinar los calores de dilución del ligando se realizó un segundo experimento con el mismo

programa, pero en el cual la celda de reacción se llenó únicamente con la solución amortiguadora. Los calores resultantes se restaron a los calores obtenidos en el primer experimento para obtener los calores de unión reales. Puesto que existen evidencias cristalográficas de que el ácido láurico se une a la BLG con una estequiometría de 1:1 [45], los parámetros termodinámicos de la asociación pueden determinarse a partir del ajuste de la curva de asociación a un modelo para un solo tipo de sitios independientes [79]. Se realizaron tres experimentos independientes a cada temperatura. Para todos los casos, los resultados experimentales se analizaron de manera separada y promediaron para obtener el valor con su respectiva incertidumbre experimental.

De las curvas calorimétricas de titulación se puede obtener el valor de la K_a , ΔH_a , y la estequiometría (n). El modelo que se usó para obtener estos parámetros fue el de un solo tipo de sitio de unión. Siendo θ la fracción de sitios ocupados por el ligando X , la constante de asociación K_a puede ser expresada como.

$$K_a = \frac{\theta}{(1-\theta)[X]} \dots\dots\dots(35)$$

Donde $[X]$ es la concentración de ligando libre. $[X_t]$ es la concentración total de ligando, la cual puede expresarse en términos de concentración total de proteína M_t y del numero de sitios de unión n a través de

$$X_t = [X] + n\theta M_t \dots\dots\dots(36)$$

Combinando ambas ecuaciones se obtiene

$$\theta^2 - \theta \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} + \frac{X_t}{nM_t} \right] = 0 \dots\dots\dots(37)$$

El calor desprendido hasta el punto de saturación θ es

$$Q = n\theta M_t \Delta H_a V_0 \dots\dots\dots(38)$$

Donde V_0 es el volumen de la celda de reacción. Resolviendo la ecuación cuadrática para Θ , y sustituyendo en la ecuación, obtenemos

$$Q = \frac{nM_t \Delta H_a V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] = 0 \dots\dots\dots(39)$$

Así, tenemos una ecuación que describe el calor liberado durante la asociación en términos de la K_a , ΔH_a , y la estequiometría (n), la cual puede ser ajustada a través de un método de regresión no lineal a los calores observados experimentalmente.

4.3 CÁLCULOS DE ÁREAS SUPERFICIALES ACCESIBLES AL SOLVENTE (ASA)

Se determinó el área superficial accesible al solvente (ASA) para los dímeros y monómeros de las variedades BLGA y BLGB (archivos PDB a 2.23 Å 1BSY y 1BSQ), en su estado monomérico y formando complejo con el ácido láurico (archivos PDB a 2.23 Å 1BSO (BLGA-ácido láurico) y 1B0O (BLGB-ácido láurico)) haciendo uso del programa NACCESS [80]. Para ello se utilizó un radio de prueba de 1.4 Å y cortes en las moléculas de 0.25 Å. Los cambios totales del ASA para el proceso de unión se estimaron como la diferencia entre el complejo formado y la suma de las moléculas libres:

$$\Delta ASA = ASA_{complejo} - (ASA_{proteina} + ASA_{ligando}) \dots\dots\dots(40)$$

Los valores de ΔASA_{polar} (cambios en ASA polar) se calcularon como el cambio en la accesibilidad de los átomos de nitrógeno y oxígeno en las estructuras analizadas. El ΔASA_{apolar} (cambios en ASA no polares) se calcularon como el cambio en la accesibilidad del carbono y azufre. Dado que los átomos de hidrógeno típicamente no se resuelven al difractar una muestra con rayos X, las áreas de estos átomos no se consideraron en este cálculo.

4.4 DINÁMICAS MOLECULARES (DM)

Las estructuras cristalográficas se tomaron de la base de datos PDB (archivos PDB a 2.23 Å 1BSY (dímero BLGA) y 1BSQ (dímero BLGB)), y de ambas variedades en su estado monomérico pero formando complejo con el ácido láurico (archivos PDB a 2.23 Å 1BSO (BLGA-ácido láurico) y 1B0O (BLGB-ácido láurico)). Todos los archivos PDB que se

utilizaron para realizar las DM se sometieron al servidor en línea WHATIF [81] para verificar la calidad de las estructuras (ausencia de residuos incompletos).

Las DM se realizaron con el programa GROMACS (ver. 3.1.1) [82, 83], utilizando el campo de fuerza GROMOS96 (43a2) [84, 85] para la proteína y el ligando. El agua se simuló de manera explícita mediante el modelo SPC (simple point charge) [86]. Se protonaron las histidinas mediante el programa pdb2gmx de GROMACS. Se aplicó un algoritmo de paso descendente para la minimización de energía de todos los sistemas. Se solató a la proteína en una caja dodecaédrica con moléculas de agua preequilibradas (agua spc216). El tamaño de la caja fue lo suficientemente grande para que existiera una distancia de por lo menos 1 nm entre algún átomo de la proteína y los límites de la caja. Se añadieron 12 y 14 iones de sodio para compensar la carga negativa de los dímeros de BLGA y BLGB, respectivamente, y 8 iones sodio para las especies monoméricas de ambas variedades. La temperatura, presión y el número de moléculas se mantuvieron constantes para todas las simulaciones. La caja de simulación se acopló simultáneamente a un termostato y a un barostato de Berendsen [87] con una temperatura y una presión de 300 K y 1 bar, y constantes de acoplamiento de 0.1 y 0.5 ps, para cada uno de los algoritmos, respectivamente [87]. Se realizaron las dinámicas moleculares de producción de 50 ns para todos los sistemas. Las velocidades de los átomos de la proteína se generaron siempre antes de comenzar la DM de posiciones restringidas y la DM de producción. Las velocidades iniciales se asignaron de acuerdo a una distribución de Maxwell-Boltzman con una temperatura de 300 K. Las ecuaciones de movimiento fueron integradas usando el método de leapfrog con un paso de tiempo de femtosegundos. Las longitudes de los enlaces y el ángulo H-O-H en el agua se mantuvieron constantes por medio del algoritmo SETTLE [88], mientras que el algoritmo LINCS se utilizó para restringir la longitud de los enlaces dentro de la proteína [89]. Las interacciones electrostáticas se manejaron con el método de PME (Particle Mesh Ewald). Las simulaciones, coordenadas, velocidades y energías se almacenaron cada 10 ps, para analizarse posteriormente.

4.4.1 Análisis de las desviaciones cuadráticas medias (RMSD)

Se calculó la desviación cuadrática media en función del tiempo (ecuación 41) para todas las dinámicas. Este análisis calcula el RMSD de algunos átomos de una molécula con respecto a una estructura de referencia, previo ajuste de las estructuras mediante el método de los mínimos cuadrados. Este análisis es de gran utilidad para evaluar las diferentes conformaciones que coexisten en una trayectoria con respecto a una estructura de referencia. Además, ayuda a definir la escala de tiempo en el que el sistema alcanza el equilibrio. Para todos nuestros

análisis se tomó como referencia la estructura cristalográfica y se consideraron los primeros 10 ns de la simulación como fase de equilibrio.

$$RMSD(t, t_0) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t) - r_i(t_0)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots(41)$$

Donde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ y $r_i(t)$ es la posición del átomo i en el tiempo t .

4.4.2 Análisis de las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF)

Se realizó el análisis de las fluctuaciones cuadráticas medias, en otras palabras la desviación estándar de la diferencia entre las posiciones atómicas en una conformación del sistema y las de la estructura de referencia. Estos RMSF se presentan como un promedio para cada residuo.

$$RMSF(i) = \left\langle (\Delta r_i^2)^{\frac{1}{2}} \right\rangle = \left\langle [r - \langle r \rangle]^2 \right\rangle^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots(42)$$

4.4.3 Puentes de hidrógeno (PH)

Un puente de hidrógeno (PH) es un tipo de interacción electrostática entre un hidrógeno con una carga parcial positiva y un átomo aceptor de protones. Aunque existen diferentes criterios geométricos para contabilizar PH, los parámetros utilizados en este estudio fueron una distancia máxima entre el hidrógeno y el grupo aceptor de 3.5 Å ($r \leq r_{PH} = 3.5$ Å) y un ángulo máximo de 30° ($\alpha \leq \alpha_{PH} = 30^\circ$), entre los átomos X-H--A, donde X representa un átomo al cual el hidrógeno está unido covalentemente. Este análisis puede realizarse entre átomos de una misma molécula (intramolecular) o entre átomos de moléculas distintas (intermolecular), ya sea soluto-soluto o soluto-solvente.

En este estudio se calculó el número de PH intermoleculares en la interface dimérica de ambas variedades de BLG y el número de puentes de hidrógeno entre ambas especies monoméricas de BLG y el carboxilo del ácido láurico o el sulfonato del dodecilsulfato de sodio (SDS).

4.4.4 Tiempo de residencia (T_R)

Se calculó el tiempo de residencia de las moléculas de agua que se encontraban a una distancia menor de 4 Å de los residuos que conforman la interfase del dímero de ambas variedades, para

los últimos 40 ns de la simulación molecular. Este análisis consistió inicialmente en monitorear el número de moléculas de agua que se encontraban a una distancia menor de 4 Å de los residuos que conforman la interfase del dímero de ambas variedades. Este análisis se realizó utilizando el programa *trjorder* del paquete computacional GROMACS. Posteriormente, se analizó el tiempo de residencia entre estas moléculas de agua y la proteína mediante los programas *trjconv*, *g_hbonds* y *trjorder*. Los parámetros utilizados en este análisis fueron una distancia máxima entre el hidrógeno y el grupo aceptor de 4 Å ($r \leq r_{\text{PH}} = 3.5 \text{ \AA}$), y un ángulo máximo de 30° ($\alpha \leq \alpha_{\text{PH}} = 30^\circ$). El tiempo de residencia se calculó mediante la función de supervivencia (ecuación 43).

$$P_\alpha(m) = \sum_{j=1}^{j=NW} \frac{1}{NC - m} \sum_{n=1}^{n=NC-m} P(n, n+m) \dots\dots\dots(43)$$

donde α es un átomo en particular de la proteína, NW es el número de aguas en la caja de simulación, m es un índice de configuración tal que el tiempo al que está evaluada la función P_α es $t = m\Delta t$ (donde Δt es el intervalo entre dos configuraciones consecutivas); y donde NC es el total de configuraciones. La función P toma los valores de 1 cuando la molécula de agua j (su átomo de oxígeno) reside en la esfera del átomo α de manera continua en el intervalo de configuraciones n a $n + m$ y de cero cuando esto no se obedece. P_α es una función de correlación de tiempo de residencia que indica el promedio de moléculas de agua que permanecen en la esfera de coordinación por al menos un tiempo t . Cuando $t = 0$ ($m = 0$), P_α representa el número promedio de moléculas de agua que residen en la esfera de solvatación del átomo. Como cualquier función de correlación temporal, $P(t) \alpha$ considera cada una de las configuraciones de la simulación y evalúa la probabilidad de permanencia de las moléculas de agua en la esfera de solvatación del átomo α a partir de este momento.

5. RESULTADOS

5.1 DISECCIÓN ENERGÉTICO-ESTRUCTURAL DE LA AUTOASOCIACIÓN DEL HOMODÍMERO DE BLG

En trabajos previos se ha estudiado el equilibrio monómero-dímero de la BLG básicamente mediante técnicas espectroscópicas [17-28]. En una etapa previa del presente estudio (tesis maestría) [30] se caracterizó el proceso de dimerización de la β -lactoglobulina variante A (BLGA), cuya estructura tridimensional ha sido resuelta experimentalmente a diferentes valores de pH [6-9]. La caracterización termodinámica del proceso auto-asociativo de la BLGA a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 y 35° C) y a pH neutro, se realizó mediante experimentos de dilución en un equipo de CTI. El perfil termodinámico mostró que el proceso de dimerización se encuentra entálpicamente guiado en las temperaturas estudiadas (fig.7), en tanto que la contribución entrópica fue favorable a bajas temperaturas. La estabilidad máxima del homodímero se observó a 25°C, donde la energía libre de unión está aportada totalmente por la entalpía. El ΔC_p obtenido experimentalmente fue de $-495 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Este valor resultó 2.5 veces más grande al calculado mediante modelos de áreas superficiales ($-196 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Comúnmente cuando ocurren estas discrepancias se piensa que rearrreglos estructurales pudieran ser la causa de tal diferencia. No obstante, estudios espectroscópicos (dicroísmo circular en el UV cercano y fluorescencia intrínseca) mostraron un comportamiento independiente de la concentración proteica. Además, se mostró que el proceso de homodimerización no está acoplado a cambios significativos en el estado de protonación de grupos ionizables o al intercambio de contraiones. En contraste, tanto experimentos de estrés osmótico como el análisis estructural de la interfase del dímero revelaron que un número significativo de moléculas de agua son secuestradas al formarse el dímero. De los estudios de estrés osmótico, se obtuvo un valor aproximado de $\sim 36 \pm 3$ moléculas de aguas capturadas al dimerizar la proteína. Considerando este número de aguas, y asumiendo que el ΔC_p de pasar una molécula del agua bulto a la interfase equivale aproximadamente a la diferencia de capacidad calorífica entre el agua hielo y agua líquida ($\sim -9 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), se obtuvo un ΔC_p adicional de $\sim -324 \pm 18 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Cuando esta magnitud se añade al ΔC_p calculado con modelos de ASA, se obtiene un valor de ΔC_p calculado de $-520 \text{ calorías mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, acorde con el obtenido experimentalmente.

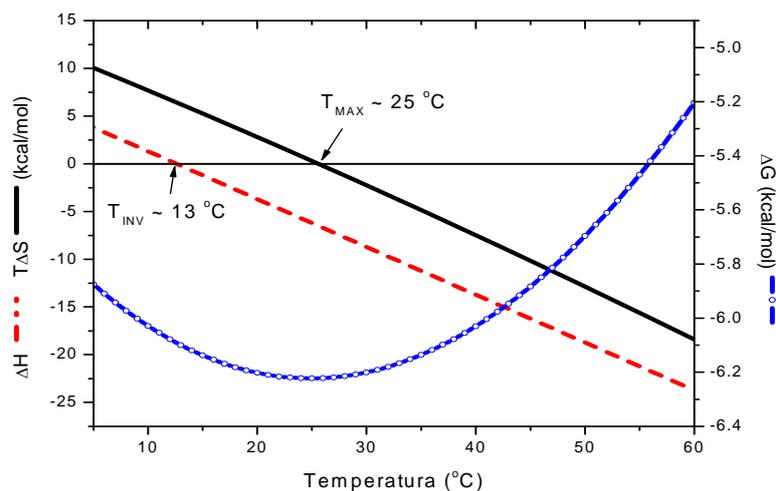


Figura 7. Perfil termodinámico de la formación del homodímero de la BLGA en función de la temperatura.

Las dos variedades más comunes de BLG (BLGA y BLGB), a pesar de poseer una estructura tridimensional similar y diferir solamente por dos mutaciones puntuales que se encuentran alejadas de la interfase de asociación dimérica, muestran propiedades biofísicas y bioquímicas diferentes, como en la estabilidad térmica [12, 13], desnaturalización mediante presión hidrostática [90] y en sus propiedades autoasociativas [19-21]. Se ha reportado mediante estudios de ultracentrifugación a pH neutro que la constante de afinidad para la dimerización de BLGB es tres veces más grande que para BLGA [21]. En este estudio realizamos el análisis de la autoasociación del homodímero de BLGB en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas en nuestro estudio previo con BLGA, con el objetivo de indagar sobre las causas moleculares de las diferencias energéticas observadas. En la Figura 8A se muestra un termograma obtenido a 25°C, del cual se puede observar que la disociación es un proceso endotérmico. Conforme la concentración de proteína se incrementa en la celda de reacción, los calores tienden a ser cada vez más pequeños, hasta que se llega a un valor constante, el cual es considerado como el equivalente al calor de dilución de la proteína [51, 75-77]. En la figura 8B se muestra la isoterma de disociación libre de los calores de dilución; la línea sólida corresponde al mejor ajuste para un modelo de disociación simple.

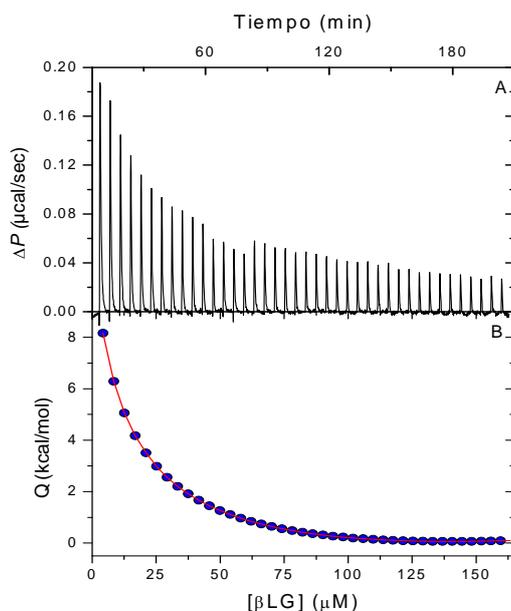


Figura 8. Perfil calorimétrico de la disociación del homodímero de BLGB a 25°C. A) Termograma de datos crudos. B) Isotherma de disociación corregida de su respectivo calor de dilución. Se realizaron 41 inyecciones consecutivas de 4 μl de proteína 1.28 mM dentro de la celda de reacción con volumen de 1.42 ml. La solución amortiguadora utilizada fue fosfatos 0.05M, 0.1M NaCl, y pH 7.

Las tablas 1 y 2 muestran los parámetros termodinámicos de la dimerización de BLGA y BLGB, respectivamente, en un intervalo de temperatura de 15-35°C. Es posible observar que la formación de ambos dímeros está guiada entálpicamente a través de todo el intervalo de temperatura estudiado. En tanto que el término entrópico mostró ser favorable a bajas temperaturas y desfavorable a altas temperatura. A partir del análisis de la dependencia del ΔH_a con respecto a la temperatura se obtuvo un ΔC_{p_a} de $-459 \pm 9 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

En la figura 9 se muestra un perfil comparativo entre los parámetros termodinámicos a 20 °C de BLGB y BLGA. Se observa que el término entálpico es más favorable para BLGB que el obtenido para BLGA, mientras que la entropía es más favorable para BLGA. El comportamiento entálpico y entrópico mostró un comportamiento similar en las demás temperaturas estudiadas. El ΔC_{p_a} de ambas variedades resultó ligeramente diferente, aunque significativamente mayor que la incertidumbre experimental. Por otra parte, la constante de asociación para BLGB fue de una magnitud mayor a la obtenida para BLGA a bajas temperatura, aunque inferior a la K_a reportada mediante estudios de ultracentrifugación analítica [21]. De cualquier forma, los datos de ITC confirman que el dímero de la variedad B es más estable que el de la A.

15	-6175 \pm 9	-2432 \pm 300	3753 \pm 310	48291 \pm 322
-----------	---------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------

20	-6204 ± 20	-3492 ± 153	2712 ± 141	42228 ± 580
25	-6214 ± 4	-5915 ± 243	299 ± 314	35922 ± 103
30	-6152 ± 33	-8566 ± 293	-2414 ± 327	27260 ± 665
35	-6044 ± 39	-11260 ± 85	-5216 ± 124	19362 ± 39

Tabla 1. Parámetros termodinámicos de la formación del homodímero de BLGA.

homodímero de BLGA.

T (°C)	ΔG_a cal mol ⁻¹	ΔH_a cal mol ⁻¹	$T\Delta S_a$ cal mol ⁻¹	K_a M ⁻¹
15	-6530 ± 53	-2975 ± 16	3555±70	83360 ± 700
20	-6534 ± 12	-5766 ± 533	770±68	69180 ± 500
25	-6405 ± 58	-6935 ± 244	-530±40	46220 ± 300
30	-6226 ± 42	-9860 ± 150	-3635±52	28820 ± 150
35	-6040 ± 45	-12300 ± 350	-6500±120	18040 ± 100

Tabla 2. Parámetros termodinámicos de la formación del homodímero BLGB.

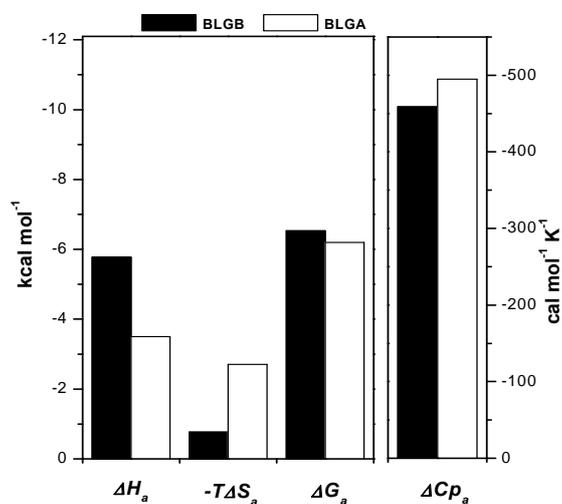


Figura 9. Análisis comparativo del comportamiento termodinámico a 20°C para la dimerización de BLGB y BLGA. Los datos fueron tomados de la tabla 1 y 2.

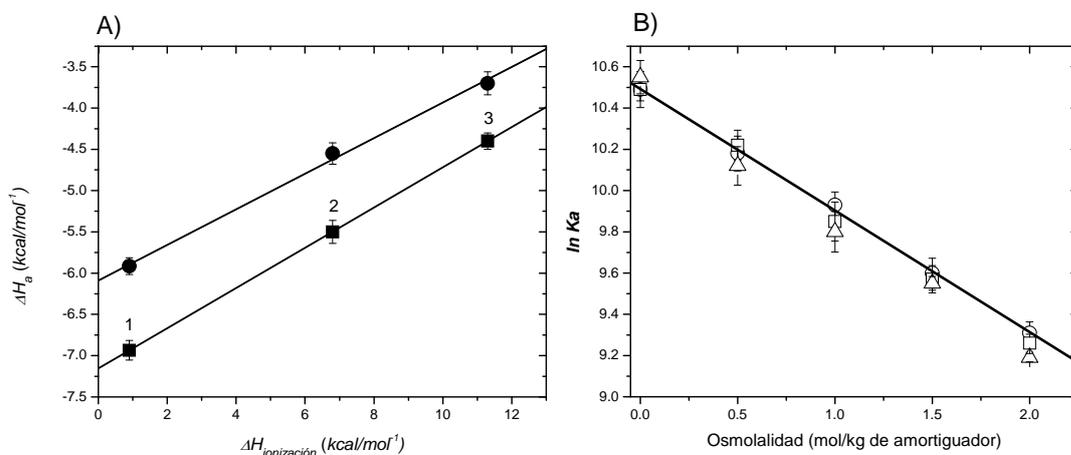
5.1.1 EFECTOS DE PROTONACIÓN

Se ha reportado que la K_a de BLG se incrementa de manera considerable conforme se acerca a su pI= 5.2, y que muestra un comportamiento independiente de la concentración de protones a

pH neutro y básico [29, 30]. Una manera de corroborar si hay acoplamiento de protones sobre la asociación proteica, es realizar experimentos calorimétricos utilizando soluciones amortiguadoras de diferente entalpía de ionización (ΔH_{ion}). La entalpía observada (ΔH_{obs}) variará en función del número de protones intercambiados, ν .

$$\Delta H_{obs} = \nu \Delta H_{ion} + \Delta H_{rea} \dots\dots\dots(44)$$

Donde la entalpía de reacción (ΔH_{rea}) es el ΔH_{obs} corregido por los efectos de protonación del amortiguador. Las mediciones se realizaron utilizando tres soluciones amortiguadoras con diferentes entalpías de ionización: i) amortiguador de fosfatos ($\Delta H_{ion}=0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$), ii) amortiguador Bis-Tris ($\Delta H_{ion}=6.8 \text{ kcal mol}^{-1}$) y iii) amortiguador Tris-HCl ($\Delta H_{ion}=11.3 \text{ kcal mol}^{-1}$). El análisis de regresión lineal de los resultados experimentales (figura 10) dio un valor de ν de 0.24 ± 0.015 protones en la formación del dimero de BLGB. Puesto que $\nu > 0$, este signo indica que ocurre liberación de protones del amortiguador y son absorbidos por la proteína al dimerizar.



Figura

10. A) ΔH_a , de las variantes BLGA (círculos) y BLGB (cuadros) en función de la entalpía de ionización del amortiguador: 1) fosfatos, 2) bis-tris y 3) Tris-HCl. B) Dependencia de la K_a de BLGA (círculos (acetamida) y cuadros (sacarosa)) y BLGB (triángulos (acetamida)) con respecto a la osmolalidad de acetamida y sacarosa.

El intercepto del gráfico en la figura 10A da la entalpía de unión corregida de los efectos de protonación del buffer ($-7.15 \pm 0.124 \text{ kcal mol}^{-1}$). Este intercambio de protones sobre la asociación implicaría que el valor de ΔH_a a 25°C obtenido en la tabla 1 es $0.215 \text{ kcal mol}^{-1}$ menos negativo. La participación de protones en el proceso de asociación de la BLGB es muy similar al observado para BLGA ($\nu = 0.21 \pm 0.04$), sugiriendo un mecanismo de asociación muy

similar entre las 2 variantes. Además, señala que la dimerización de ambas variedades muestra un comportamiento independiente de la concentración de protones al pH utilizado en este estudio.

5.1.2 EFECTOS DE HIDRATACIÓN

También realizamos estudios de estrés osmótico, utilizando un osmolito no iónico, con la finalidad de medir los efectos de hidratación acoplados a la formación de dímero de BLGB. El método de estrés osmótico consiste básicamente en el uso de cosolutos que disminuyen la actividad de agua, ocasionando una disminución de la constante de afinidad para la formación de complejos que capturan moléculas de agua para estabilizar su complejo, y aumentando la constante de afinidad para la formación de complejos que liberan moléculas de aguas tras su asociación. Por lo tanto, se puede estimar el número de moléculas de agua que participan en la estabilización del complejo a partir de la dependencia de la K_a con respecto al incremento de la concentración de osmolito [*osmol*] [91].

$$\Delta N_w = -55.6 \frac{\partial \ln K_a}{\partial [\text{osmol}]} \dots\dots\dots(45)$$

En nuestro estudio anterior se comprobó que la K_a del dímero de BLGA decrecía con el incremento de la osmolalidad, utilizando dos osmolitos químicamente diferentes. En este estudio analizamos el patrón de hidratación de BLGB utilizando sólo un osmolito de los dos utilizados con BLGA, con la finalidad de ver si existía un patrón de hidratación diferente que pudiera explicar la mayor constante de afinidad observada para BLGB.

La ecuación 45 contempla que no ocurre asociación del osmolito con la proteína. Se realizaron experimentos de unión de la acetamida a una concentración de 2M, mostrando efectos calóricos no diferenciables de los calores de dilución, demostrando que no existe asociación de la proteína con el osmolito (datos no mostrados). En la figura 10B se observa que la K_a disminuye con respecto al incremento de la concentración de osmolito de la misma manera para ambas variedades, lo cual señala que en la formación del dímero de ambas variedades se captura un número de moléculas de agua similar, ΔN_w de 36 ± 2 .

5.2 ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y DINÁMICA MOLECULAR DE LA DIMERIZACIÓN DE BLG

El análisis de las estructuras cristalográficas diméricas obtenidas a pH 7.1 para BLGA y BLGB (2.3 Å, PDB, ID: 1BSQ y 1BSY) muestra conformaciones muy similares entre ambas

variedades (Figura 11). La superposición de los dos dímeros de ambas variedades da un RMSD de 0.23 Å. Las únicas diferencias que se alcanzan a apreciar están confinadas a las asas E-F (85-90) y C-D (61-67) (Figura 11). La primera de ellas ha sido objeto de un amplio debate, debido a que en esa región se encuentra el Glu89, el cual se encuentra desprotonado y expuesto al solvente a pH neutro. El cambio en la conformación del asa E-F regula la apertura del cáliz de la BLG, permitiendo la unión de ligandos. A este fenómeno se le ha denominado “Transición de Tanford” [37]. Se ha postulado que esta diferencia que se observa entre ambos cristales probablemente se deba a las condiciones de cristalización utilizadas, ya que diferentes reportes han señalado que a pH neutro el asa E-F se encuentra en la forma abierta para ambas variedades.

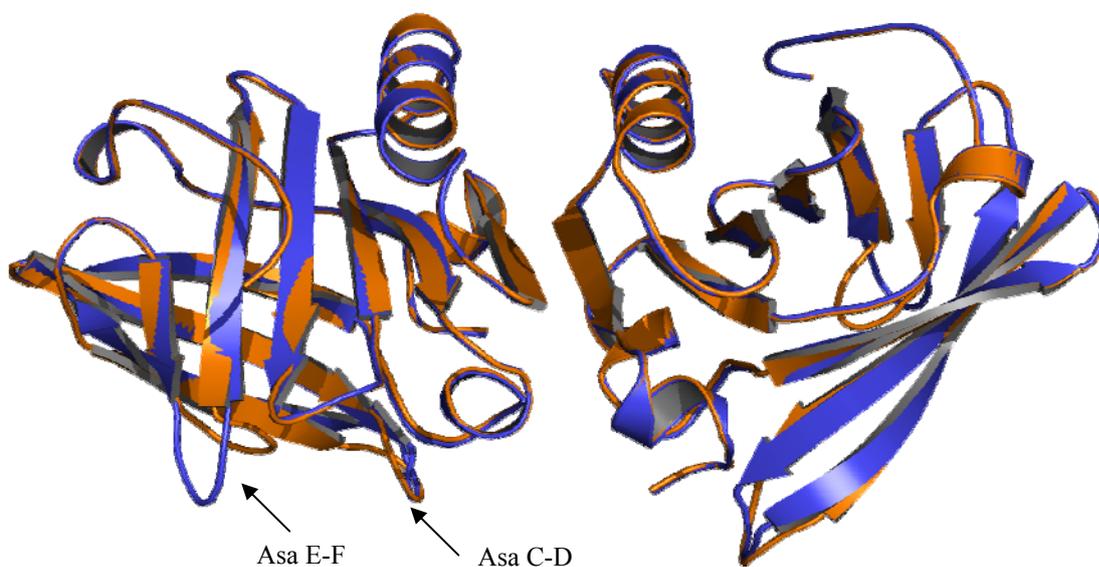


Figura 11. Estructura del homodímero de la BLGA (naranja) y BLGB (azul).

La otra diferencia en la estructura está en el asa C-D, la cual es una región que contiene una de las mutaciones (Asp64/Gly) que diferencian ambas variedades. El RMSD entre ambas variedades es de ~ 1 Å para esta asa.

Otra diferencia entre las variantes ocurre en la posición 118, donde la Val en BLGA es reemplazada por Ala en BLGB. Esta mutación, aunque no causa cambios conformacionales observables en ambas estructuras (figura 3), es importante mencionar que ocurre en la región más rígida de la proteína, como se conoce por diferentes estudios de cristalografía. Se ha señalado como la responsable de la baja estabilidad térmica de BLGB, puesto que la sustitución de Val118/Ala genera pérdida de contactos apolares y una disminución del empaquetamiento proteico. Dado que las diferencias observadas en ambas variedades ocurre lejos de la interfase dimérica, no resulta obvia la explicación de cómo las mutaciones que diferencian a ambas variedades alteran sus propiedades estructurales y fisicoquímicas. La mayor flexibilidad conformacional de BLGA con respecto a BLGB ha sido objeto de gran

controversia [15, 90]. En algunos casos, se ha observado una movilidad conformacional idéntica para ambas variedades, tanto en su forma monomérica como dimérica [16]. Una muestra de la gran movilidad conformacional de ambas variedades es que los diferentes estudios cristalográficos y por RMN han señalado la dificultad para poder resolver las asas de ambas proteínas. Con la finalidad de obtener más información acerca de la movilidad estructural entre las dos variantes e indagar si con la formación del dímero pudieran ocurrir cambios en los modos vibracionales en ambas variedades, los cuales no pueden ser observados mediante las técnicas espectroscópicas existentes, se realizaron estudios de dinámica molecular en solvente explícito de las especies monoméricas y diméricas de ambas variedades durante 50 ns.

En la Figura 12 se muestra el RMSD contra el tiempo, para los monómeros y dímeros de ambas variedades. Para todas las simulaciones analizamos el RMSD de los carbonos alfa en función del tiempo, por un periodo de 50 ns. A partir de este análisis, utilizamos los últimos 40 ns de los 50 ns totales de simulación para realizar el análisis de RMSF, puesto que fue la región donde las fluctuaciones fueron aparentemente constantes. La comparación de los valores de RMSF obtenidos a partir de las 21 estructuras resueltas mediante RMN para el monómero de la variedad A a pH de 2.7 mostró que existe una concordancia satisfactoria entre el comportamiento observado espectroscópicamente y lo obtenido computacionalmente en el presente estudio (datos no mostrados).

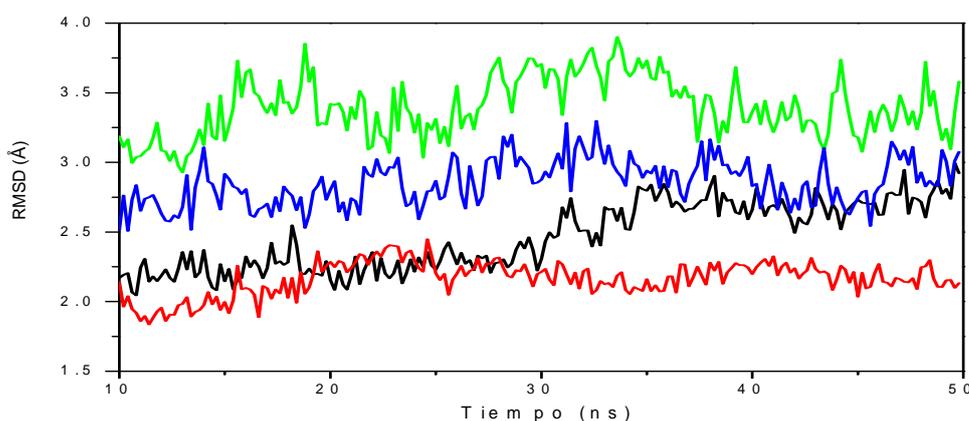


Figura 12. Desviación cuadrática media (RMSD) de todos los átomos pertenecientes al carbono alfa de dímeros y monómeros de BLG. Se tomó como referencia la estructura cristalina de cada variedad en su forma monomérica y dimérica. Monómero BLGA (línea negra), monómero BLGB (línea roja), dímero BLGB (línea azul) y dímero BLGA (línea verde). Cada punto de las curvas representa un promedio de 200 ps.

El análisis de RMSF nos permitió identificar zonas de diferente flexibilidad o rigidez estructural de una manera más fina. En la figura 13 se muestran los valores de RMSF para las especies monoméricas de BLGA y BLGB. Se puede observar que las hebras β A, B, C, y F de BLGA exhiben una movilidad conformacional de ~ 0.6 Å a lo largo de la simulación. Las hebras D, E e I exhiben una mayor movilidad (~ 0.7 Å), en tanto que las hebras G y H exhiben la menor movilidad conformacional (~ 0.5 Å). Las asas A-B, E-F y G-H exhiben la mayor movilidad conformacional de toda la proteína (≥ 2 Å). Las asas B-C, C-D y D-E exhiben una movilidad de ~ 1.5 Å. El asa F-G exhibe la menor movilidad conformacional (~ 0.7 Å), y la alfa hélice muestra una movilidad de 0.85 - 1.5 Å. En la figura 13 se observa que el monómero de BLGB muestra una movilidad conformacional muy parecida a la observada para BLGA. Las diferencias principales se observan en las asas B-C, C-D y E-F, observándose una mayor movilidad para las asas B-C y C-D y una menor movilidad del asa E-F para BLGB. En la figura 14 se muestran los resultados de RMSF obtenidos para los dímeros de BLGA y BLGB y sus respectivas formas monoméricas. El dímero de BLGA muestra un incremento de la movilidad de las hebras β y de las asas de toda su estructura con respecto a su forma monomérica. Las hebras A, B, C, E y F incrementan su movilidad con respecto a su forma monomérica ~ 0.25 Å. Las hebras G y H, que muestran la movilidad más baja en el monómero, incrementan su movilidad conformacional a ~ 0.75 Å. La hebra D incrementa su movilidad de ~ 0.7 Å en el monómero a ~ 1.2 Å en el dímero, mientras que la hebra I conserva la movilidad observada en el monómero. El asa A-B, que forma parte de la intercara dimérica, disminuye su movilidad de 2.8 Å a ~ 2 Å, en tanto que las asas B-C, C-D, D-E, E-F, F-G y G-H incrementan su movilidad en al menos 0.4 Å. La alfa hélice incrementa su movilidad de 1 - 1.4 Å a 1.6 - 2.2 Å. También el dímero de BLGB muestra un incremento de movilidad conformacional con respecto a su forma monomérica. Su movilidad es muy parecida al que experimenta el dímero de BLGA, las únicas diferencias que se aprecian entre ambos dímeros están confinadas a las asas E-F, la cual es 0.6 Å más móvil para el dímero de BLGA, mientras que las asas D-E, F-G

y G-H son más móviles para el dímero de BLGB en 0.5 Å, 0.4 Å y 0.5 Å, respectivamente.

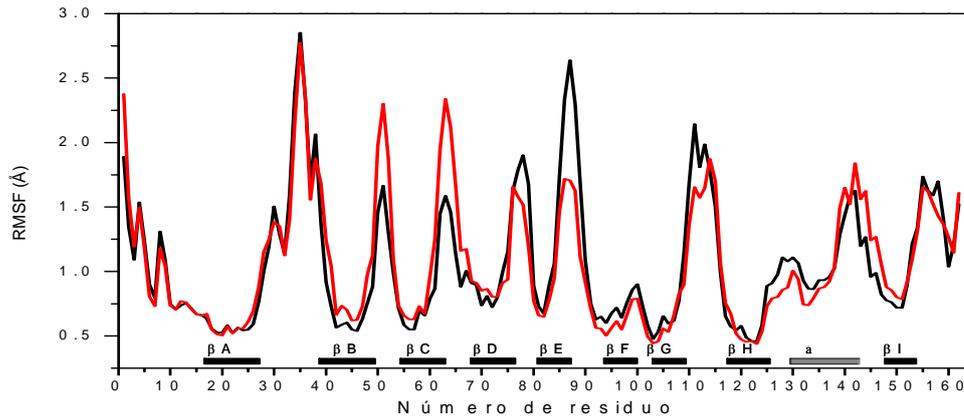


Figura 13. Fluctuación cuadrática media (RMSF) del carbono alfa de cada residuo del monómero de BLGA (línea negra) y BLGB (línea roja). En la parte inferior se indica el tipo de estructura secundaria correspondiente a la secuencia de aminoácidos de BLG.

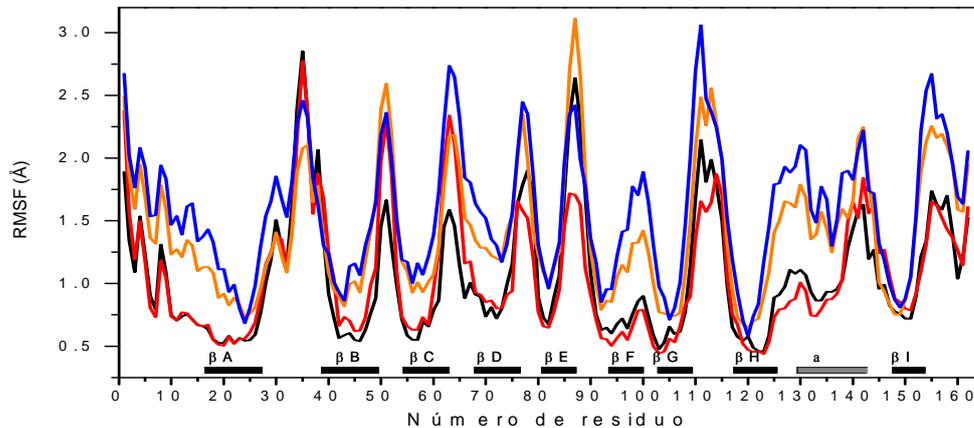


Figura 14. Fluctuación cuadráticas media (RMSF) del carbono alfa de cada residuo de los monómeros (monómero de BLGA (línea negra) y monómero de BLGB (línea roja)) y dímeros de BLG (BLGA (línea naranja) y BLGB (línea azul)).

En la figura 15 se muestra el RMSF acumulado para los monómeros y dímeros. Esta gráfica señala que la movilidad global de los monómeros libres de ambas variedades es muy parecida, dentro del error computacional. Además, se observa un incremento global de la movilidad conformacional de alrededor del 26 % de las formas dimericas con respecto a sus formas monoméricas. No obstante, la movilidad de ambos dímeros es de la misma magnitud.

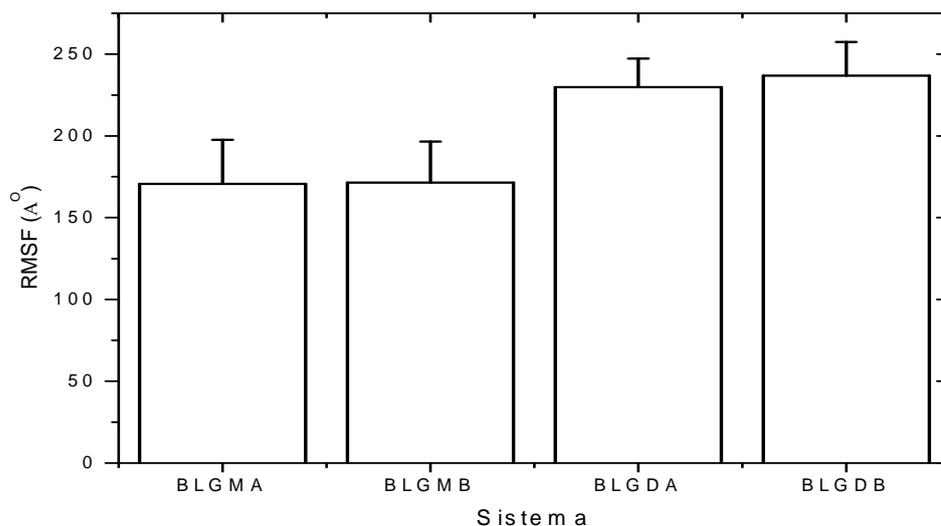


Figura 15. Fluctuaciones cuadráticas medias acumuladas del carbono alfa para todas las trayectorias, con su respectivo error computacional. Los datos se obtuvieron a partir de los valores de las figura 13 y 14.

5.2.1 ANÁLISIS DE HIDRATACIÓN

A partir de la información generada mediante los estudios de dinámica molecular, se calculó el tiempo de permanencia de las aguas que se encontraban solvatando las estructuras diméricas y monoméricas de BLG. Este análisis permitió identificar un alto número de moléculas de agua que tienen contacto con diferentes residuos del interior proteico y entre los aminoácidos que conforman la intercara del homodímero de BLG de ambas variedades. Primero se determinó el curso temporal del número de aguas a menos de 4.0 \AA de ambos monómeros (figura 16). Ambas variedades mostraron una densidad de 37 ± 6 moléculas de agua interfaciales (N_{H20}), en excelente concordancia con las determinaciones de estrés osmótico.

Posteriormente, analizamos los tiempos de residencia (t_{res}) para aquellos sitios de la proteína que mostraban altos tiempos de permanencia, utilizando una distancia $\leq 3.5 \text{ \AA}$ como criterio para la presencia de puente de hidrógeno entre la molécula de agua y algún átomo donador o aceptor de hidrógeno de la proteína. Este análisis muestra que los monómeros de ambas variedades presentan un patrón de hidratación ligeramente diferente. Para ambas variedades en su forma monomérica, se observó una interacción entre Ser21(N)-H₂O-(O)Val43, mediada por diferentes moléculas de agua a lo largo de toda la simulación, con diferentes t_{res} que van de 0.5 a 5 ns. Es importante señalar que esta interacción se observa cristalográficamente en ambas variedades [7]. Una interacción que se observa sólo para el monómero BLGA es Val118(O)-H₂O-(HE22)Gln120, la cual se estabiliza por una molécula de agua con un t_{res} de 1.3 ns. Sin

embargo, para el monómero de BLGB la situación es diferente, puesto que la interacción observada es Val41(N)-H₂O-(HE21)Gln120, mediada por una molécula de agua con un t_{res} de ~ 5 ns. Esta diferencia es importante, puesto que en la posición 118 ocurre una de las mutaciones que diferencia a ambas variedades de BLG. Por lo tanto, la diferencia entre ambas interacciones probablemente se deba a que el monómero de BLGB carece de 2 metilenos, los cuales ocasionan que Ala118 se desplace ~ 2 Å de la posición que ocupa Val118. Este incremento en la distancia entre Ala118(O)- (HE22)Gln120 ocasiona que Gln120(HE22) forme una interacción más favorable con Val41(N)- (HE21)Gln120, como se puede observar por el alto tiempo de residencia que muestra la molécula de agua que estabiliza esta interacción. La interacción Val118(O)-H₂O-(HE22)Gln120 se forma entre residuos de la misma hebra H, mientras que la interacción observada para el monómero de BLGB, Val41(N)-H₂O-(HE21)Gln120, se da entre un aminoácido de la hebra H y otro de la hebra B. Probablemente este rearrreglo estructural sea el responsable de que el monómero de BLGB muestre una estructura más rígida en esta zona de la proteína. Otras interacciones observadas para el monómero de BLGA son: i) Ser30(N)-H₂O-(O)Leu32, con diferentes aguas que se recambian a lo largo de la dinámica con t_{res} entre 0.5-3.2 ns, ii) Ala80 (N)-H₂O-(O)Val81, con sólo una molécula de agua a lo largo de toda la simulación con un t_{res} de 3.3 ns, interacción que también se observa cristalográficamente y iii) Ala80 (N)-H₂O, la cual se recambia con dos moléculas de aguas diferentes con t_{res} de 3.5 y 4.8 ns. Mientras que para el monómero de BLGB se observan: 1) Ala25(O)-H₂O, 2) Leu39(O)-H₂O y 3) Ala80(N)-H₂O con un recambio de una molécula de agua para cada aminoácido con t_{res} de 1.3, 3.2, 0.8, respectivamente. Además, el análisis de los tiempos de residencia mostró que ambas estructuras monoméricas no mostraron moléculas de agua con tiempos de residencia superiores a 0.1 ns (valor mínimo de t_{res} para que una molécula de agua sea considerada como estructural o de intercambio lento) en los diferentes aminoácidos que hacen contacto con el otro monómero al formarse el dímero.

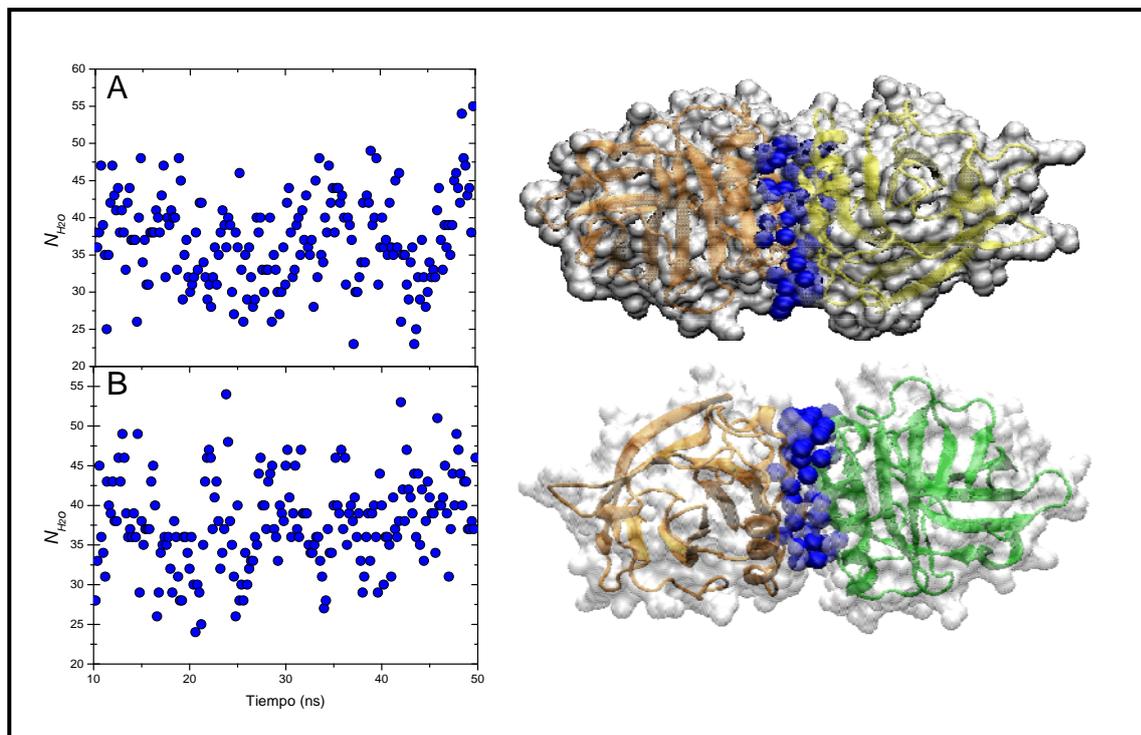


Figura 16. Análisis de la hidratación de la interface dimérica de BLG realizado mediante estudios de dinámica computacional en solvente explícito. Número de moléculas de aguas (N_{H_2O}) observadas en la interface dimérica de BLGA (A) y BLGB (B). Las moléculas de agua se representan por círculos azules.

El análisis de hidratación de las estructuras diméricas mostró un incremento de la solvatación de los aminoácidos que conforman la intercara de unión dimérica (Asp28, Asp33, Arg40, Arg148, His146, Ser150, Asn152, Gln155, Ile29, Ala34, Ile147, Leu149, Phe151), así como de otros aminoácidos cercanos a la intercara de asociación dimérica (Asp34, Leu31, Ile162, His161, Tyr42). Este análisis sobre ambos dímeros de BLG arrojó un valor de ~ 30 moléculas de agua en contacto con los residuos de la intercara y cerca de la interface con t_{res} entre 0.2-3ns. Varias de estas moléculas de agua están formando puentes de hidrógeno entre residuos de los dos protómeros, en tanto que otras se encuentran interactuando con algún residuo de un solo protómero. De las interacciones que se apreciaban en el interior de la estructura proteica del monómero de BLGA, sólo se conserva Val43(N)-H₂O-(OG)Ser21, pero con un $t_{res} < 1$ ns, mucho más corto que el observado para la forma monomérica. El dímero de BLGB conserva un contacto observado en la estructura monomérica (Gln120(HE21)-H₂O-(N)Val41), cuya molécula de agua muestra un t_{res} de ~ 5 ns. Otros contactos observados para el dímero de BLGB son: i) Glu89(OE2)-H₂O, ii) Leu104(N)-H₂O, iii) Phe105(HE1)-H₂O, y 4) Asn109 (HD21)-H₂O, con t_{res} de 0.6, 2.7, 0.2 y de 1.1-3.5, respectivamente. El número de moléculas de agua determinadas mediante el análisis de tiempos de residencia muestra un número neto de 30 moléculas de agua incorporadas al formarse el dímero para ambas variedades con t_{res} mayores

de 0.1 ns, valor ligeramente inferior al determinado mediante los estudios calorimétricos aplicando el método de estrés osmótico (36 ± 2).

5.2.2 ANÁLISIS DEL ÁREA SUPERFICIAL ACCESIBLE AL SOLVENTE (ASA)

La Tabla 3 muestra el análisis comparativo entre ΔC_p_a calculado mediante el análisis de ΔASA de BLGA y BLGB, a partir de las estructuras cristalográficas estáticas de sus respectivas formas monoméricas y diméricas, y el ΔC_p_a obtenido a partir del análisis de ΔASA de las simulaciones moleculares. Ambos valores de ΔC_p_a muestran ser de la misma magnitud para ambas variedades. No obstante, la exposición de ΔASA_{polar} y ΔASA_{apolar} se ve incrementada ligeramente al observar el comportamiento del ΔASA mediante dinámicas molecular (Tabla 3).

<i>Sistema</i>	ΔASA_{apolar}	ΔASA_{polar}	ΔC_p_a
A _{ii}	-581	-342	-225
A _i	-549	-381	-200
B _{ii}	-598	-260	-249
B _i	-557	-398	-200

Tabla 3. Análisis comparativo entre ΔC_p_a calculado mediante el análisis de ΔASA de las estructuras cristalográficas estáticas de BLGA (A) y BLGB (B) utilizando el software NACCESS (i), y el ΔC_p_a obtenido del análisis de ΔASA a partir de las simulaciones moleculares (GROMACS (ii)).

El análisis de este exceso de área aporta un valor más negativo para el ΔC_p_a que el calculado utilizando modelos área superficial sobre las estructuras cristalográficas estáticas. El valor de ΔC_p_a estimado mediante ambos métodos, y adicionándole la contribución al ΔC_p que aportan la captura de moléculas de agua sobre la formación del dímero explicaría la magnitud de ΔC_p_a observada experimentalmente. El análisis de RMSF señala un incremento de la movilidad conformacional del dímero con respecto al monómero para ambas variedades, lo cual contribuiría con un valor positivo al ΔC_p .

5.2.3 ANÁLISIS DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO EN LA INTERCARA DE ASOCIACIÓN DIMÉRICA

El análisis de las estructuras cristalográficas de los dímeros de BLGA y BLGB señala que la intercara de unión entre los monómeros de ambas variedades está conformada por las interacciones entre las hebras beta antiparalela I (His146, Ile147, Arg148, Leu149, Ser150,

Phe151, Asn152, Gln155) y el asa AB (Asp33, Arg40) [14]. Los monómeros están asociados mediante 9 puentes de hidrógeno distribuidos a lo largo de la intercara de unión (figura 4). Los estudios computacionales muestran que la interacción observada cristalográficamente entre las hebras I (His146, Ile147, Arg148, Leu149, Ser150), se mantiene a lo largo de la simulación con valor de ~ 4 puentes de hidrógeno para ambas variedades (figura 17A y 17B). Para el dímero de BLGA se observan dos puentes de hidrógeno más en la intercara entre Ile162 e His146 (figura 17A), lo cual no se observa en la estructura cristalográfica (figura 4). Esta interacción también se observa para el dímero de BLGB, pero sólo se observa una interacción de este tipo en uno de los extremos de la intercara dimérica (figura 17B). Además, el dímero de BLGB muestra una interacción que no se observa para el dímero de BLGA (Asn152-Asp28). Por otro lado, la interacción observada cristalográficamente entre el asa AB (Asp33, Arg40) (figura 4), es reemplazada en la dinámica molecular por la interacción Asp33-Gln35 para ambas variedades (figura 18A y 18B), pero se observan 2 interacciones para el dímero de BLGA y sólo una para el dímero de BLGB. Sin embargo, la geometría de los puentes de hidrógeno que estabilizan el asa A-B en el dímero BLGB parece mejor optimizada y se conservan por más tiempo a lo largo de la simulación, a diferencia de los observados para el dímero de BLGA. La cuantificación del número total de puentes de hidrógeno de la intercara de los monómeros de ambas variedades arrojó un valor de 7 ± 2 y 9 ± 2 puentes de hidrógeno para BLGA y BLGB, respectivamente, indicando que el dímero de BLGB posee una interface más estabilizada, lo cual podría explicar su mayor K_d observada experimentalmente a bajas temperaturas (tabla 1). Sin embargo, no es claro como las mutaciones que diferencian ambas variedades provocan estos cambios en la intercara dimérica.

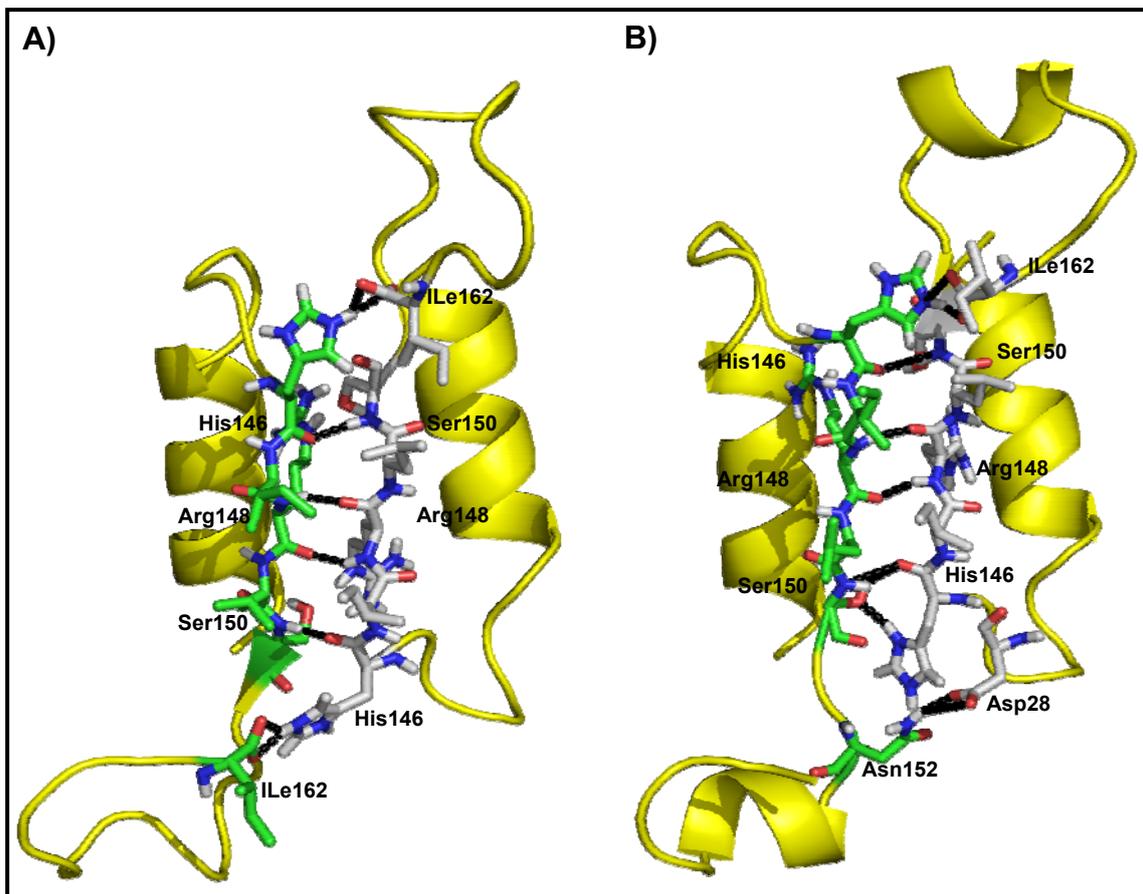


Figura 17. Hebras beta I para BLGA(A) y BLGB (B).

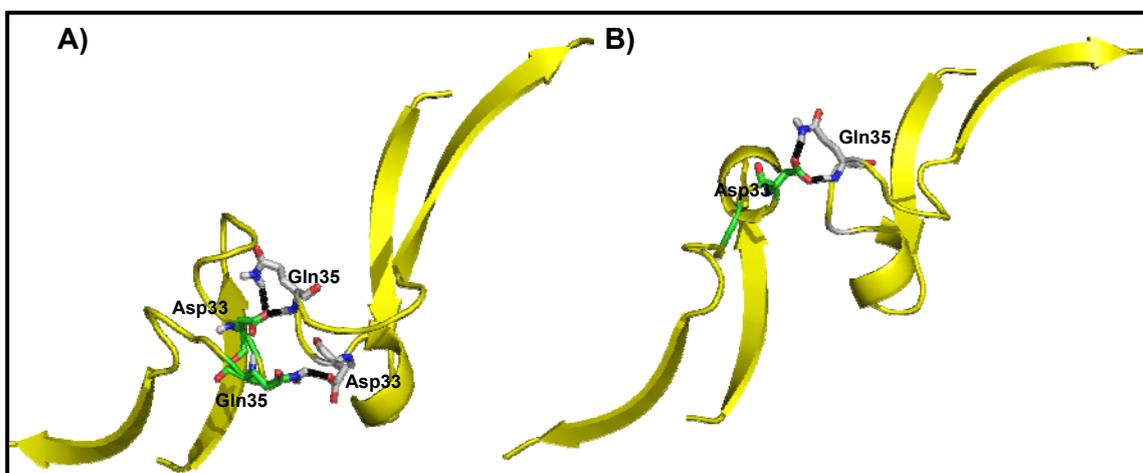


Figura 18. Hebras beta I para BLGA(A) y BLGB (B).

5.3 DISECCIÓN ENERGÉTICO-ESTRUCTURAL DE LA INTERACCIÓN DE LA BLG CON EL ÁCIDO LAÚRICO

Varios estudios han mostrado que la BLG posee la capacidad de unir diferentes ligandos hidrofóbicos con K_a del orden de 10^3 - 10^8 M^{-1} [92]. No obstante, sólo se tiene evidencia cristalográfica de la BLG formando complejo en su cáliz con el ácido láurico [45], ácido palmítico [46], retinol [48] y vitamina D3 [49]. Aunque múltiples estudios espectroscópicos han generado información sobre la K_a y el ΔG_a de los ligandos anteriormente mencionados, estos parámetros termodinámicos sólo dan una información generalizada de la asociación y no precisan información sobre el tipo de energética que guía la asociación de estos ligandos. La calorimetría de titulación isotérmica, sin embargo, puede generar información más detallada sobre la energética de la asociación proteína-lípido. El número de estudios de la interacción proteína-lípido son muy escasos, debido a la pobre solubilidad de los ácidos grasos. Uno de los ligandos que más ha despertado interés en cuanto a su asociación con la BLG ha sido el ácido palmítico. Puesto que es uno de los ácidos grasos principales que se encuentran en la leche de rumiantes, y se ha pensado que este es el ligando principal que une y transporta la BLG. Sin embargo, la solubilidad de este ligando en agua es muy escasa menor a 1 μM [78], llegando a solubilizar sólo en una mezcla de etanol-agua. Por lo tanto, en este estudio elegimos al ácido láurico, del cual se ha reportado una solubilidad mayor a 1 mM a pH 7.4, 37°C y en amortiguador de fosfatos [78]. Además, estudios cristalográficos demuestran que la BLG lo une con una estequiometría de 1 en su cáliz [45], y se conoce mediante estudios de diálisis al equilibrio y a pH neutro que BLGA posee una K_a de 0.5×10^5 M^{-1} para el ácido láurico [92], y mediante estudios de fluorescencia intrínseca, que BLGB posee una K_a de 1.43×10^6 M^{-1} [92]. En este estudio realizamos estudios calorimétricos de la unión de ambas variedades de la BLG en su forma predominantemente monomérica hacia el ácido láurico, en un intervalo de temperaturas de 37-45°C a pH de 7.0, y en amortiguador de fosfatos. En este intervalo de temperaturas, el ácido láurico es soluble en el amortiguador de fosfatos a una concentración ~ 1 mM [78]. Además, la BLG es altamente estable, puesto que estudios de desplegamiento mediante calor han señalado que la especie monomérica de BLG posee una T_m de $\sim 70^\circ C$. El objetivo principal de este estudio fue indagar hasta qué punto las mutaciones en ambas variedades alteraban la K_a hacia un ligando en común. En la Figura 19 se pueden observar las isotermas de asociación de la BLGA y BLGB con el ácido láurico a 37°C.

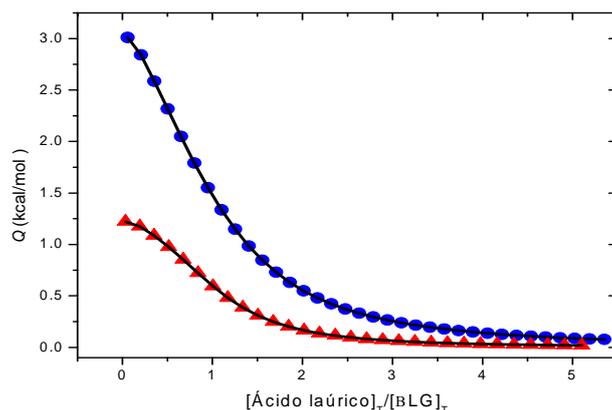


Figura 19. Isothermas de la asociaci3n de la BLGA (c3rculos) y BLGB (tri3ngulos) con 3cido la3rico a 37°C.

En la Tabla 4 se muestran los par3metros termodin3micos de uni3n y estequiometr3a (n) del 3cido la3rico a ambas variedades de BLG a diferentes temperaturas. La K_a result3 casi del doble para BLGB con respecto BLGA. Aunque estos valores son algo diferentes a los obtenidos espectrosc3picamente, es importante se3alar que guardan la misma relaci3n en el valor absoluto entre las dos variedades. Adem3s, la tabla 4 se3ala que la asociaci3n para ambas es entr3picamente favorable y ent3lpicamente desfavorable. Siendo ent3lpicamente m3s desfavorable y entr3picamente m3s favorable para BLGA que para BLGB.

T (°C)	n	$K_a \text{ M}^{-1}$	$\Delta G_a \text{ cal mol}^{-1}$	$\Delta H_a \text{ cal mol}^{-1}$	$T\Delta S_a \text{ cal mol}^{-1}$
37§	0.99 ± 0.01	370000 ± 1220	-7843 ± 160	$+1555 \pm 40$	9338 ± 300
37*	0.94 ± 0.046	187836 ± 800	-7456 ± 200	$+4578 \pm 58$	12034 ± 180
40§	0.95 ± 0.017	412500 ± 1000	-8040 ± 95	$+2260 \pm 53$	10300 ± 250
40*	0.97 ± 0.028	247547 ± 1300	-7700 ± 65	$+4800 \pm 82$	12500 ± 220
45§	1.15 ± 0.018	470000 ± 1800	-8228 ± 188	$+2525 \pm 100$	10753 ± 400
45*	1.1 ± 0.027	402000 ± 1200	-8148 ± 300	$+5023 \pm 249$	13171 ± 600

Tabla 4. Par3metros termodin3micos de la uni3n de la BLGA (*) y BLGB (§) con el 3cido la3rico.

La dependencia del t3rmino ent3lptico o entr3pico con respecto a la temperatura nos permiti3 obtener el $\Delta C p_a$ de ambas variedades con el 3cido la3rico. Mostrando un $\Delta C p_a$ de $113 \pm 9 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para BLGB y de $45 \pm 8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para BLGA.

A la fecha, existen pocos reportes relacionados a la uni3n prote3na-l3pido realizados mediante CTI, de los cuales la gran mayor3a muestran un perfil termodin3mico el cual se le ha denominado como el “efecto hidrof3bico cl3sico”, caracterizado por estar guiado por una

entalpía desfavorable, una entropía favorable y un ΔC_p_a negativo. Diferentes estudios energético-estructurales han generado la información suficiente para la interpretación molecular de este comportamiento, el cual se debe principalmente a la desolvatación (efecto hidrofóbico) de las especies que forman un complejo determinado. En conjunto con la formación de interacciones favorables entre el ligando y la proteína, en algunos casos con la participación de moléculas de agua estabilizando la interacción, además de una disminución de los modos vibracionales de una o ambas moléculas en el complejo. No obstante, el comportamiento observado en este estudio no es compatible con lo esperado para un efecto hidrofóbico clásico, ya que el ΔC_p_a resultó positivo, lo cual podríamos describirlo como un “efecto hidrofóbico no clásico” en este parámetro.

Adicionalmente, realizamos experimentos de ITC para la asociación del dodecilsulfato sódico (SDS) con la BLGB a diferentes temperaturas y para BLGA a 30°C. Esto con la finalidad de descartar que la baja solubilidad del ácido láurico pudiera estar ocasionando efectos acoplados en las mediciones calorimétricas. El SDS posee una solubilidad de $\sim 4\text{mM}$, permitiéndonos descartar efectos de insolubilidad y, además posee una estructura hidrocarbonada idéntica a la del ácido láurico, por lo cual observaremos un proceso de asociación semejante. En la Figura 20 se observa la isoterma de asociación de la BLGB y BLGA con el SDS a 30°C. En la Tabla 5 se muestran los parámetros termodinámicos de la asociación de la BLGB con el SDS y para BLGA sólo a 30°C. Para la asociación de BLGB con el SDS se puede observar un comportamiento guiado entálpicamente y entrópicamente, a diferencia del ácido láurico, donde la entalpía es desfavorable. La dependencia de la entalpía con respecto a la temperatura arroja un ΔC_p_b de $117 \pm 7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, el cual es muy parecido al obtenido con el ácido láurico. Esta coincidencia parece indicar que se ocultan cantidades similares de superficie en ambos complejos. Por otra parte, la entropía continua siendo favorable, aunque de menor magnitud y el término entálpico se vuelve favorable. Esto podría explicarse debido a que el grupo sulfonato del SDS puede formar más interacciones con otros aminoácidos que forman parte de la entrada del cáliz, lo cual ocasiona una menor movilidad del SDS y del propio cáliz de BLG.

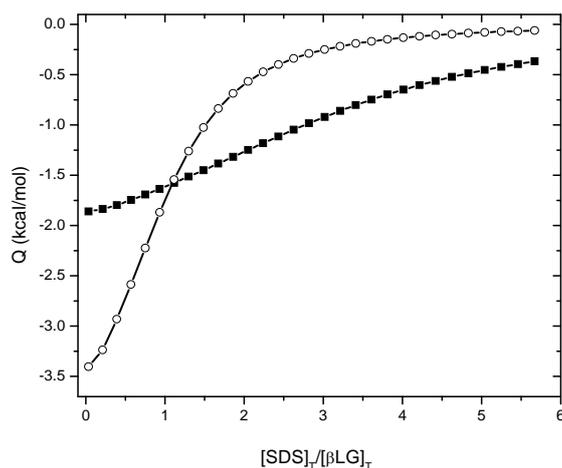


Figura 20. Isothermas de la asociaci3n de BLGA y BLGB con SDS, cuadros y c3rculos, respectivamente a 30°C.

T (°C)	<i>N</i>	<i>K_a</i> M ⁻¹	ΔG_a cal mol ⁻¹	ΔH_a cal mol ⁻¹	$T\Delta S_a$ cal mol ⁻¹
20	0.97 ± 0.03	1460000 ± 3220	-8249 ± 60	-5289 ± 54	2960 ± 65
25	0.98 ± 0.012	988000±7000	-8169±44	-4800±90.8	3339±70
30	0.99 ± 0.01	579000±5800	-8002 ± 88	-4204 ± 91.8	3798 ± 93
30*	0.9 ± 0.05	107000±2000	-6943 ± 110	-2487 ± 217	4456 ± 88
35	0.98 ± 0.01	295000± 5000	-7699 ± 5073	-3446±121	4258±58

Tabla 5. Parámetros termodinámicos de la uni3n de BLGB con SDS a diferentes temperaturas y de BLGA con SDS sólo a 30 (*).

5.3.1 ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y DE DINÁMICA MOLECULAR DE LA ASOCIACIÓN DE BLG CON EL ÁCIDO LAÚRICO

El análisis de las estructuras cristalográficas de los monómeros de BLGA y BLGB formando complejos con el ácido láurico (PDB 1BSO y 1B0O) indican que la cadena alifática queda inmersa dentro del cáliz y el carboxilo del ácido láurico se encuentra expuesto al solvente formando interacciones con Lys60 y Lys69. Además, estas lisinas son estabilizadas por el Glu62 que se encuentra en el asa C-D (figura 21A y 21B). Sin embargo, la geometría de los puentes de hidrógeno que estabilizan esta interacci3n parece más optimizada para el complejo BLGB-ácido láurico (figura 21B). Esta diferencia en la red de puentes de hidrógeno parece ser resultado de la mutaci3n Asp64/Gly que se localiza en el asa C-D. Esta mutaci3n se encuentra rodeada por Asn63 y Glu65, generando una repulsi3n electrostática al residuo 64, para el caso del complejo BLGA-ácido láurico. Esto ocasiona una conformaci3n diferente del Glu62, lo

cual se ve reflejado en la diferencia en el valor de RMSD entre ambas variedades ($\sim 1\text{\AA}$) y en los valores de sus ángulos diedros (figura 22).

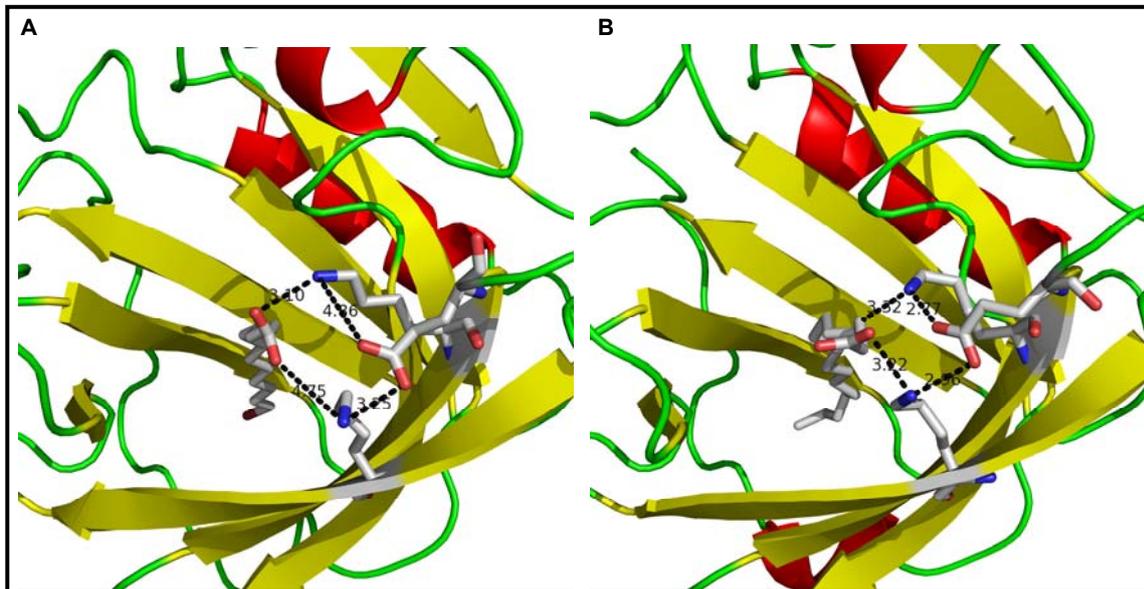


Figura 21. Interacción entre el carboxilo del ácido láurico y residuos de ambas variedades de BLG. A) Interacción entre Lys60-Glu62-Lys69 y el carboxilo del ácido láurico (tomado del cristal (PDB1BSO). para BLGA. B) Interacción entre Lys60-Glu62-Lys69 y el carboxilo del ácido láurico para BLGB (tomado del cristal (PDB1BSO).

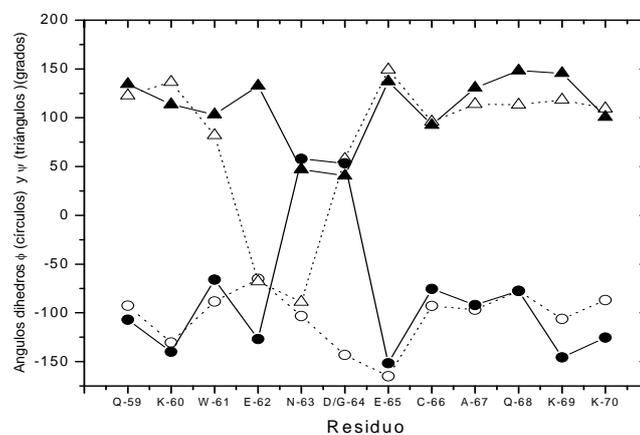


Figura 22. Ángulos diedros para el asa CD de ambas variedades de BLG. Los ángulos diedros Φ se representan con círculos negros (BLGB-ácido láurico) y blancos (BLGA-ácido láurico). Los ángulos diedros Ψ se representan con triángulos negros (BLGB-ácido láurico) y blancos (BLGA-ácido láurico).

Aunque el análisis de las estructuras estáticas libres y formando el complejo nos aportan información muy valiosa acerca del tipo de interacciones y cambios conformacionales que

experimenta el complejo, también es importante realizar un análisis del comportamiento del complejo en solvente acuoso, por lo que efectuamos estudios de dinámica molecular para ambas variedades en su forma apo y holo con la finalidad de observar el comportamiento de las interacción entre el carboxilo del ácido láurico y la proteína, además de las diferencias en movilidad conformacional en la forma apo y holo.

El estudio computacional sobre el análisis del comportamiento de las interacciones entre el carboxilo del ácido láurico y BLG indica que las interacciones que se observan cristalográficamente en ambas variedades se conservan en gran parte de la simulación. No obstante, un análisis del número de puentes de hidrógeno entre el carboxilo y las cadenas laterales de Lys60 y Lys69 señala que el complejo BLGB-ácido láurico es estabilizado simultáneamente por Lys60 y Lys69 con mayor frecuencia que de manera aislada. Mientras que para el monómero de BLGA-ácido láurico se observa que el carboxilo es estabilizado con mayor frecuencia por Lys60 o Lys69, que de manera simultánea (figura 23). Esta diferencia probablemente se deba a una mejor estabilización de Lys60-Glu62-Lys69 en el complejo BLGB-ácido láurico.

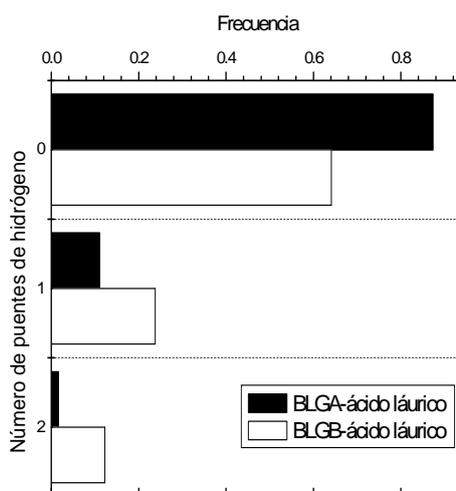


Figura 23. Fracción de tiempo durante la simulación molecular en la cual el carboxilo del ácido láurico mostró interacción o no con los residuos Lys60 y Lys69 de BLGA (negro) y BLGB (blanco). Ninguna interacción (0), una interacción, ya sea con Lys60 o Lys69 (1), y con Lys60 y Lys69 simultáneamente (2).

El análisis de RMSF para los carbonos alfa de los complejos BLGA y BLGB con el ácido láurico señala que hay una disminución de la movilidad conformacional de todos los loops que conforman al monómero de BLGA formando complejo con el ácido láurico (BLGA-LA) con respecto a su forma libre (BLGA) (figura 24). De igual manera, BLGB formando complejo

con el ácido láurico (BLGB-LA) experimenta una notable disminución en la movilidad de sus asas A-B y B-C (figura 25), además de una disminución de movilidad en sus hebras β A, B, C, D y E.

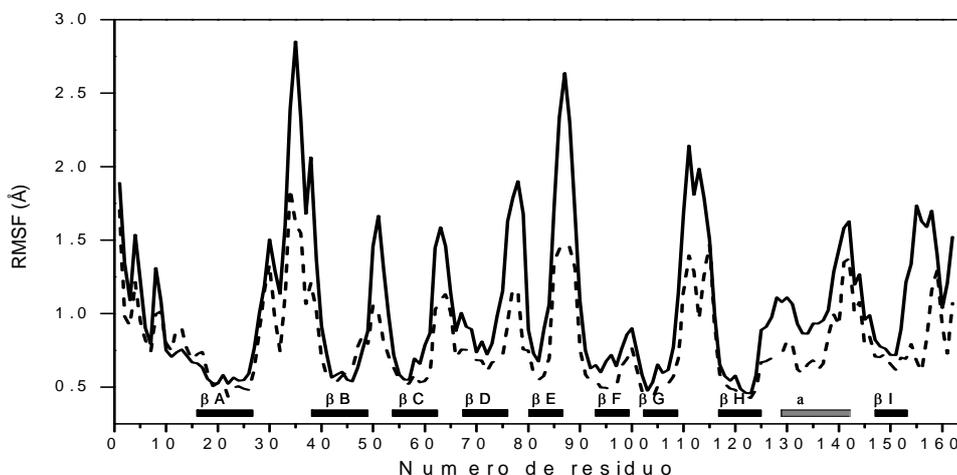


Figura 24. Fluctuación cuadrática media (RMSF) del carbono alfa de cada residuo del monómero de BLGA (línea sólida) y BLGA-LA (línea de rayas).

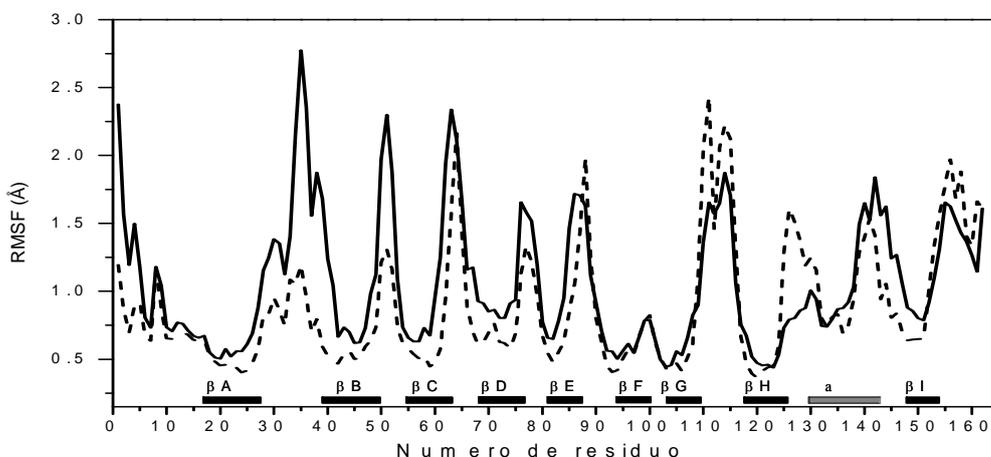


Fig. 25.

Fluctuación cuadrática media (RMSF) del carbono alfa de cada residuo del monómero de BLGB (línea sólida) y BLGB-LA (línea de rayas).

En la figura 26 se muestra el RMSF acumulado para ambas variedades en su forma libre y formando complejo con el ácido láurico. Como se puede apreciar, la BLGA-LA experimenta una disminución de su movilidad conformacional de $\sim 24\%$ con respecto al monómero de BLGA. Mientras que BLGB-LA experimenta una disminución de su movilidad conformacional de $\sim 19\%$ con respecto al monómero de BLGB.

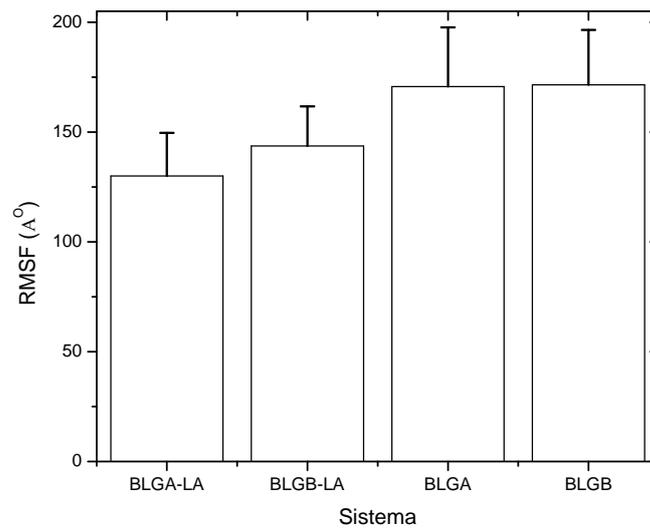


Figura 26. Fluctuaciones cuadráticas medias del carbono alfa acumuladas para todas las trayectorias, obtenidos a partir de los valores de las figuras 24 y 25.

6. DISCUSIÓN

En este estudio realizamos una caracterización termodinámica, un análisis estructural y simulaciones computacionales de dinámica molecular e hidratación del comportamiento asociativo del homodímero de BLGB. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos previamente para el homodímero de BLGA. La caracterización termodinámica mostró que, al igual que lo observado para BLGA, la dimerización de BLGB es un proceso entálpicamente dirigido en el intervalo de temperaturas estudiadas, acompañado de una entropía favorable a bajas temperaturas y desfavorable a altas temperaturas, pasando por la temperatura de máxima estabilidad, a $\sim 25^\circ\text{C}$ para BLGB. A 20°C , la K_a de BLGB resultó 50 % mayor que para BLGA. Este valor superior de K_a de BLGB con respecto a BLGA se debe principalmente a un mayor aporte entálpico favorable al ΔG_a y un menor aporte entrópico favorable. Esta diferencia de estabilidad entre las dos variedades disminuye con el aumento de temperatura, observándose mayor estabilidad para BLGA a 35°C . El comportamiento entrópicamente más favorable y entálpicamente menos favorable para la dimerización de BLGA parece sugerir que tras la autoasociación la libertad conformacional de la variedad A es ligeramente mayor a la de la variedad B.

El análisis de la dependencia de la entalpía con respecto a la temperatura mostró un valor de ΔC_{p_b} de -459 kcal/mol para BLGB, valor muy parecido al reportado para BLGA, y concordando con el análisis de la dependencia entálpica con respecto a la temperatura de los datos reportados a pH ácido para BLGB [23].

Realizar un análisis energético estructural precisa de poseer información estructural a nivel atómico del sistema de estudio. BLG ha mostrado ser un muy buen sistema para el análisis de la dimerización, debido a que es un homodímero que no experimenta cambios conformacionales significativos tras su asociación, experimenta un equilibrio monómero-dímero rápido y es altamente soluble. Posee una intercara con un alto contenido de superficies polares, situando a la BLG en el punto más alto entre homodímeros polares, heterodímeros y proteínas globulares [34]. Además, la topología de su intercara de unión muestra una escasa complementariedad [36], la cual incrementa su grado de complementariedad al considerar las aguas interfaciales que se observan en la estructura dimérica resuelta a 1.8 \AA [8]. El análisis de las estructuras cristalográficas de los dímeros de BLGA y BLGB muestra una alta densidad de moléculas de agua mediando interacciones entre aminoácidos polares en su intercara. Estas características indican que la BLG es un buen sistema para estudiar efectos de hidratación residual ligados a la asociación proteína-proteína. Numerosos estudios han establecido que la

mayoría de las asociaciones biológicas van acompañadas de un $\Delta C p_a$ negativo como resultado principalmente de la deshidratación de las áreas superficiales apolares interactuantes en el complejo. En efecto, para muchos complejos proteicos se ha mostrado una clara correlación entre el $\Delta C p_a$ con la cantidad de área superficial deshidratada [93, 94]. Por consiguiente, el $\Delta C p_a$, ΔH_a y ΔS_a , pueden estimarse a partir de modelos semiempíricos, considerando las estructuras libres y formando el complejo. No obstante, se han reportado numerosos trabajos para los cuales esta condición no se cumple, debido a numerosos factores como lo son: cambios conformacionales significativos, efectos de protonación. Recientemente se ha reportado que la incorporación de moléculas de agua en las asociaciones biológicas ejerce un efecto importante en la magnitud del $\Delta C p_a$ [95-102]. En nuestro estudio anterior sobre la autoasociación del homodímero de BLGA observamos que el valor experimental de $\Delta C p_a$ fue de más del doble que el obtenido a partir de modelos de área superficial. Diferentes reportes, incluyendo el nuestro, muestran que no existen rearrreglos conformacionales significativos de los monómeros tras su asociación. En cambio, mediante métodos experimentales y simulaciones computacionales se demostró que un número considerable de aguas era capturado con la formación del dímero. La consideración conjunta de los efectos de esta hidratación residual y de las magnitudes esperadas para la deshidratación de la interfase permitió dar cuenta del valor del $\Delta C p_b$ experimental. En este estudio encontramos un comportamiento autoasociativo muy parecido para el homodímero de BLGB, además los análisis de incorporación de moléculas de agua mediante el método de estrés osmótico sobre la dimerización muestran un recambio de 37 moléculas de agua para ambas proteínas. El análisis de las aguas que solvatan la interfase proteica de ambas variedades muestra un promedio de 37 moléculas de agua a lo largo de la simulación molecular de 50 ns. Aunque hasta la fecha resulta difícil atribuir un peso energético específico a las aguas que llegan a ser capturadas en una asociación biológica [95-102], es conocido que el valor de estas aguas contribuye con $\Delta C p$ negativo. De acuerdo a varios reportes el $\Delta C p$ por molécula de agua oscila de -6 a -148 cal mol⁻¹ K⁻¹, debido a que ocurre una disminución de los modos vibracionales, rotacionales y translacionales de la molécula de agua con respecto al agua bulto. Este “congelamiento” de aguas conlleva una contribución entrópica desfavorable al ΔG_a de la interacción [103]. Por lo tanto, para el tipo de aguas que median interacciones entre proteínas como las que se describen en este trabajo, el costo entrópico desfavorable de inmovilizar una molécula de agua es compensado por la ganancia entálpica de la formación de interacciones más energéticas. En este estudio, atribuimos un valor de -8.2 cal mol⁻¹ K⁻¹ para la rigidificación de cada molécula de agua, derivado del análisis de nuestro estudio anterior [30]. Si agregamos la contribución

energética de las 37 moléculas de agua que son secuestradas tras la formación del homodímero, obtenemos un valor de $-465 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, el cual concuerda de manera excelente con nuestro valor experimental de $-459 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Existe otro factor que podría estar contribuyendo al valor total de ΔC_{p_a} observado experimentalmente, como lo es restricción de los movimientos vibracionales suaves de las proteínas que forman un complejo. Diferentes grupos de investigación han reportado una alta flexibilidad para las asas AB, CD, EF y GH que conforman la estructura de la BLG, ya que la densidad electrónica para estas asas es muy baja o ausente en las estructuras cristalográficas y en las estructuras resueltas mediante RMN muestran múltiples conformaciones. Esta excepcional movilidad de las asas de la BLG se ha relacionado con el costo energético de mantener desolvatada el área superficial accesible al solvente del cáliz. Anteriormente, se mencionó que el sitio de unión de la BLG (cáliz) se encuentra altamente deshidratado, lo cual debe de abonar en contra de la estabilidad global de la proteína. Esto es compensado con la entropía favorable asociado con el incremento de la flexibilidad de las asas, donde la alta movilidad de estas asas contribuye a mantener la estabilidad de la estructura nativa [104]. También se ha reportado que probablemente estas asas altamente flexibles que se encuentran arriba del bolsillo de unión pudieran desempeñar un papel importante en su asociación con ligandos, como se ha observado con la proteína unidora de retinol (PUR), una proteína estructuralmente relacionada y de función conocida [105].

Mediante métodos espectroscópicos se ha determinado una mayor movilidad conformacional para la forma monomérica y dimérica de BLGA que para BLGB [15], en tanto que otros autores indican que no existen diferencias entre ambas variedades [16]. En nuestro caso analizamos mediante estudios de dinámica molecular el comportamiento de ambas variedades en su forma monomérica y dimérica. Los patrones de movilidad basados en RMSF reprodujeron de manera satisfactoria la movilidad observada para el monómero mediante RMN a pH ácido, observándose que las asas muestran fluctuaciones mayores que las de las hebras β . De acuerdo con los resultados de RMSF, no existe diferencia significativa en la movilidad de ambas variedades. No obstante, para ambas variedades se encontró que con la dimerización, los monómeros experimentan un incremento significativo de la movilidad estructural, aumento que impacta tanto a las asas como a las hebras β . Existen diferentes reportes experimentales que muestran que la unión de pequeños ligandos, péptidos o proteínas rigidifican de manera global la estructura de algunas proteínas [106-110], mientras que otras incrementan su flexibilidad tras asociarse [111-121]. Además, se ha observado que los cambios en la dinámica proteica frecuentemente involucran regiones alejadas de la superficie interactuantes [109, 112, 113, 115, 117, 119, 120], lo cual también se observa en este estudio. Se ha reportado que estos

cambios estructurales a larga distancia de la interfase probablemente transfieran información a lugares distantes de la proteína (alostería) [122] y tengan un papel importante en regular la K_a [123]. Estudios computacionales de tres complejos diferentes mostraron una disminución significativa de la movilidad conformacional en la formación del complejo [124-126]. Contrario a esto, se ha observado un aumento de la movilidad conformacional en la dimerización de la insulina [127]. Recientemente, en otro estudio computacional se observó tanto ganancia como pérdida de movilidad conformacional de un total de 17 complejos proteína-proteína [128], indicando que el incremento o disminución de la movilidad conformacional quizás tenga una influencia considerable en la estabilidad de los complejos proteicos [129]. El incremento en la movilidad conformacional de las especies diméricas con respecto a las formas monoméricas observado en este estudio contribuiría con un ΔC_p positivo, esta magnitud se ve contrarestanda por la alta hidratación de la interface proteica con moléculas de agua con tiempos de residencia altos.

La información generada mediante el análisis estructural, estudios de dinámica computacional en conjunto con nuestros datos experimentales nos permitió hacer una aproximación sobre el comportamiento termodinámico observado en este estudio. A lo largo de las simulaciones moleculares se observó que el carboxilo del ácido láurico forma puentes salinos con las cadenas laterales de Lys60 y Lys69 para ambas variedades (figura 21). Sin embargo, la geometría de esta interacción parece mejor optimizada para BLGB-ácido láurico (figura 21B), lo cual explicaría la K_a mayor observada para este sistema. Además, esta interacción posee un fuerte carácter endotérmico, debido a que la deshidratación de grupos cargados es entálpicamente desfavorable y entropicamente favorable [130], lo cual explicaría el comportamiento observado experimentalmente (tabla 4).

El cáliz de la BLG posee un volumen de $\sim 315 \text{ \AA}^3$, mientras que el ácido láurico posee un volumen de $\sim 180 \text{ \AA}^3$. Esta baja complementariedad ocasiona que las interacciones de van der Waals que estabilizan el complejo no sean lo suficiente energéticos para contrarrestar el término entálpico desfavorable ocasionado por la formación del puente salino y la deshidratación de las especies interactuantes. El término entrópico y el ΔC_p positivo que caracteriza la asociación de ambas variedades podría estar alimentado principalmente por la desolvatación favorable que experimenta el ácido láurico y a la pérdida de varias moléculas de agua estructurales en sitios distantes al cáliz, las cuales son observadas en sus respectivas formas libres. La diferencia observada en el ΔC_p entre ambas variedades probablemente se explique por una mayor o menor pérdida de moléculas de agua al formarse el complejo.

El comportamiento termodinámico de la interacción de la BLG con el SDS señaló un mecanismo de asociación parecido al del BLGB con el ácido láurico, ya que aunque este proceso presenta una entalpía favorable, ésta tiende a ser menos favorable con respecto al incremento en la temperatura y por lo tanto contribuye con ΔC_p positivo, de casi la misma magnitud que el obtenido con BLGB versus ácido láurico. Por otra parte, como explicación a los cambios favorables observados en la entropía y entalpía podrían explicarse mediante estudios de dinámica computacional, donde se observa que el grupo sulfato del SDS tiende a formar mejores interacciones con varios aminoácidos que forman parte de la entrada del cáliz de BLGB.

7. CONCLUSIÓN

El comportamiento autoasociativo mostró ser entálpicamente más favorable para BLGB y menos favorable entrópicamente que para BLGA. En tanto que el ΔC_p_a mostró que el patrón de deshidratación de ambas variedades es similar. El análisis calorimétrico de hidratación mediante el método de estrés osmótico mostró que ambas variedades incorporan aguas tras su dimerización, dando un valor de 36 ± 7 . Mientras que el análisis de tiempos de residencia realizado a partir de la información generada mediante los estudios computacionales de ambos dímeros mostró la participación de un valor de ~ 30 moléculas de agua en la interfase y de sitios cercanos a la intercara de dimerización con tiempos de residencia (0.2-3 ns). Cabe mencionar que el análisis de tiempos de residencia subestima la formación de redes acuosas entre los residuos de la interfase, los cuales probablemente se observen experimentalmente. Nuestros estudios de dinámica molecular indican una movilidad conformacional muy parecida para los monómeros de las variantes A y B. Mostrando que las únicas diferencias entre ambas variedades están confinadas al asa G-H y la alfa hélice, siendo el asa G-H más móvil para el monómero de BLGA y la alfa hélice más móvil para el monómero de BLGB. En tanto que las formas diméricas de ambas variedades muestran una movilidad conformacional mayor a la observada para sus respectivas formas monoméricas, pero de la misma magnitud entre ambos dímeros, lo cual concuerda con lo reportado mediante estudios de espectroscopía de infrarrojo [16]. Ciertamente, este resultado parece ser contraintuitivo, puesto que se esperaría una disminución de la flexibilidad conformacional en el complejo que con respecto a las formas libres. No obstante, existen diferentes reportes experimentales que demuestran que la unión de pequeños ligandos, péptidos o proteínas rigidifican de manera global la estructura de algunas proteínas, mientras que otras incrementan su flexibilidad tras asociarse [113]. Además, se ha observado que los cambios en la dinámica proteica frecuentemente están confinados a regiones alejadas de la superficie interactuante, lo cual también se observa en este estudio.

El mayor número de puentes de hidrógeno observados en la intercara del dímero de BLGB podría explicar la K_a más grande observada experimentalmente. No obstante, las causas que generan esta diferencia en el número de puentes de hidrógeno en la interface de ambas variedades no es posible relacionarla con las mutaciones, lo cual sugiere que las mutaciones probablemente ocasionan cambios globales en la estructura que generan una arquitectura ligeramente diferente en la interface dimérica de ambas variedades.

Por otra parte, el perfil termodinámico de la asociación de BLGA y BLGB con el ácido láurico o SDS señala un tipo de asociación proteína-lípido perteneciente al tipo efecto hidrofóbico no

clásico, dado que es acompañado de un $\Delta C p_a$ positivo para ambas variedades. Este comportamiento probablemente se explique por la pérdida de varias moléculas de agua estructurales en sitios distantes al cáliz en el complejo BLG-ácido láurico, ocasionando la disminución de la movilidad observada para ambas variedades. La K_a de ambas variedades en su forma monomérica para el ácido láurico se encuentra en el rango de las reportadas mediante técnicas espectroscópicas. No obstante, se observa una K_a más grande para BLGB. Algo característico para BLGB en todo este estudio, ya que tanto en su auto-asociación homodimérica, así como es su asociación con el ácido láurico muestra parámetros termodinámicos más favorables y constantes de asociación más grandes. Indicando que las dos mutaciones que diferencian a ambas variantes causan cambios sutiles en la conformación de los residuos involucrados en la unión de ligando y la interface de asociación dimérica, confiriendo una mayor K_a para BLGB, puesto que tanto la interface de asociación homodimérica como el cáliz de asociación al ligando posee la misma topología y no se observan diferencias entre ambas variedades.

8. PERSPECTIVAS

- A. Realizar experimentos de CTI utilizando el método de estrés osmótico para la asociación de ambas variedades de la BLG con el SDS y ácido láurico. Para cuantificar

el número de moléculas de agua que son liberadas al formarse el complejo, y que pudieran explicar el ΔC_p positivo observado experimentalmente.

- B. Analizar los tiempos de residencia de las moléculas de agua de las especies monoméricas de ambas variedades tanto en su forma libre y asociada con ácido láurico mediante modelado computacional. Con el interés de relacionar los resultados experimentales con los obtenidos *in silico*.
- C. Realizar experimentos de CTI de la asociación de ambas variedades de BLG con ligandos análogos al SDS con estructura hidrocarbonada inferior y superior. Con el objetivo de cuantificar la contribución energética por átomo de carbono a la asociación.

9. REFERENCIAS

1. Newcomer, M., et al., & Peterson, P.A. (1984). The three-dimensional structure of retinol-binding protein. *EMBO J.* 3: 1451–1454.
2. Papiz, M.Z., et al., & Kraulis, P.J. (1986). The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol binding protein. *Nature.* 324:383–385.

3. Pervaiz, S. & Brew, K. (1987). Homology and structure function correlations between alpha-1-acid glycoprotein and serum retinolbinding protein and its relatives. *FASEB J.* 1:209–214.
4. Sawyer, L. (1987). One fold among many. *Nature.* 327: 659-712.
5. Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. (1994). Lipid binding proteins: A family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem.* 45:89–151.
6. Qin BY, Bewley MC, Creamer LK, Baker HM, Baker EN, Jameson GB. (1998). Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry* 37:14014–14025.
7. Qin BY, Bewley MC, Creamer LK, Baker EN, Jameson GB. (1999). Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Protein Sci.* 8:75–83.
8. Brownlow S, Cabral JHM, Cooper R, Flower DR, Yewdall SJ, Polikarpov I, North ACT, Sawyer L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution—Still an enigmatic lipocalin. *Structure.* 5:481–495.
9. Bewley MC, Qin BY, Jameson GB, Sawyer L, Baker EN. (1997). Bovine β -lactoglobulin and its variants: A three-dimensional perspective. In: *Milk protein polymorphism, Special Issue 9702.* Brussels: International Dairy Federation Bulletin. pp 100–109.
10. Sawyer, W.H., Norton, R.S., Nichol, L.W. & McKenzie, H.A. (1971). Thermodenaturation of bovine β -lactoglobulin: kinetics and the introduction of b-structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 243: 19–30.
11. Hillier, R.M. & Lyster, R.L.J. (1979). Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey. *J. Dairy Res.* 46: 95–102.
12. Imafadon, G.I., Ng-Kwai-Hang, K.F., Harwalkar, V.R. & Ma, C.-Y. (1991). Differential scanning calorimetric study of different genetic variants of b-lactoglobulin. *J. Dairy Res.* 74: 2416–2422.
13. McSwiney, M., Singh, H., Campanella, O. & Creamer, L.K. (1994). Thermal gelation and denaturation of bovine β -lactoglobulins A and B. *J. Dairy Res.* 61: 221–232.
14. Gough P, Jenness R. (1962). Heat denaturation of β -lactoglobulins A and B. *J Dairy Sci.* 45:1033–1039.
15. Dong, A., Matsuura, J., Allison, S.D., Chrisman, E., Manning, M.C. & Carpenter, J.F. (1996). Infrared and circular dichroism spectroscopic characterization of structural differences between β -lactoglobulin A and B. *Biochemistry.* 35: 1450±1457.
16. Panick, G., Malessa, R. & Winter, R. (1999). Differences between the pressure- and temperature-induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin A, B and AB monitored by FTIR spectroscopy and small-angle X-ray scattering. *Biochemistry.* 38: 6512±6519.

17. Pedersen KO. (1936). Ultracentrifugal and electrophoretic studies on the milk proteins: the β -lactoglobulin of Palmer. *Biochem J.* 30:961–970.
18. Georges C, Guinand S, Tonnelat J. (1962). Etude thermodynamique de la dissociation réversible de la β -lactoglobuline B pour des pH supérieurs à 5.5. *Biochem Biophys Acta.* 59:737–739.
19. McKenzie HA, Sawyer WH. (1967). Effect of pH on β -lactoglobulins. *Nature.* 214:1101–1104.
20. Townend R, Winterbottom RJ, Timasheff SN. (1960). Molecular interactions in β -lactoglobulin. II. Ultracentrifugal and electrophoretic studies of the association of β -lactoglobulin below its isoelectric point. *J Am Chem Soc.* 82: 3161–3168.
21. Zimmerman JK, Barlow GH, Klotz IM. (1970). Dissociation of β -lactoglobulin near neutral pH. *Arch Biophys Biochem.* 138: 101–109.
22. Kelly MJ, Reithel FJ. (1971). A thermodynamic analysis of the monomer-dimer association of β -lactoglobulin A at the isoelectric point. *Biochemistry.* 10: 2639–2644.
23. Joss LA, Ralston GB. (1996). β -lactoglobulin B: a proposed standard for the study of reversible self-association reactions in the analytical ultracentrifuge? *Anal Biochem.* 236:20–26.
24. Aymard P, Durante D, Nicolai T. (1996). The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *Int J Biol Macromol.* 19:213–221.
25. Verheul M, Pedersen JS, Roefs SPFM, de Kruif KG. (1999). Association behavior of native β -lactoglobulin. *Biopolymers.* 49:11–20.
26. Timasheff SN, Townend R. (1961). Molecular interactions in β -lactoglobulin. VI. The dissociation genetic species of β -lactoglobulin at acid pH's. *J Am Chem Soc.* 83:470–473.
27. Townend R, Timasheff SN. (1960). Molecular interactions in β -lactoglobulin. III. Light scattering investigation of the stoichiometry of the association between pH 3.7 and 5.2. *J Am Chem Soc.* 82:3168–3174.
28. Sakurai K, Goto Y. (2002). Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin by amino acid substitution. *J Biol Chem.* 277:25735–25740.
29. Sakurai K, Oobatake M, Goto Y. (2001). Salt-dependent monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH 3. *Protein Sci.* 10:2325–2335.
30. Bello M, Pérez-Hernández G, Fernández-Velasco D. A, Arreguín-Espinosa R, García-Hernández E. (2008). Energetics of bovine β -lactoglobulin homodimerization: effects of water sequestering on heat capacity change. *Proteins.* 70(4):1475-87.

31. Uhrínová, S., Smith, M.H., Jameson, G.B., Uhrín, D., Sawyer, L., and Barlow, P.N. (2000). Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the β -lactoglobulin dimer. *Biochemistry* 39: 3565–3574.
32. Kuwata, K., Hoshino, M., Forge, V., Era, S., Batt, C.A., and Goto, Y. (1999). Solution structure and dynamics of bovine β -lactoglobulin A. *Protein Sci.* 8: 2541–2545.
33. Tsai CJ, Lin SL, Wolfson HJ, Nussinov R. (1997). Study of protein–protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect. *Protein Sci.* 6:53–64.
34. García-Hernández E, Zubillaga RA, Rodríguez-Romero A, Hernández-Arana A. (2000). Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology.* 10:993–1000.
35. Bahadur RP, Chakrabarti P, Rodier F, Janin J. (2003). Dissecting subunit interfaces in homodimeric proteins. *Proteins.* 53:708–719.
36. Nooren IM, Thornton JM. (2003). Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *J Mol Biol.* 325:991–1018.
37. Tanford C, Bunville LG, Nozaki Y. (1959). The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5. *J Am Chem Soc.* 81: 4032–4036.
38. Qin BY, Bewley MC, Creamer LK, Baker HM, Baker EN, Jameson GB. (1998). Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry.* 37:14014-14023.
39. Taulier N, Chalikian TV. (2001). Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *J Mol Biol.* 314:873–889.
40. Sivaprasadarao, A. & Findlay, J.B.C. (1988). The interaction of retinol binding protein with its plasma-membrane receptor. *Biochem J.* 255:561–569.
41. Flower, D.R. (1996). The lipocalin family: structure and function. *Biochem. J.* 318:1–14.
42. Perez, M.D., Diaz de Villegas, M.C., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J.M. & Calvo, M. (1989). Interaction of fatty acids with β -lactoglobulin and albumin from ruminant milk. *Biochem. J.* 106:1094–1097.
43. Spector, A.A. & Fletcher, J.E. (1970). Binding of long chain fatty acids to β -lactoglobulin. *Lipids* 5:403–411.
44. Farrell, H.M., Behe, M.J. & Enyeart, J.A. (1987). Binding of p-nitrophenol phosphate and other aromatic-compounds to β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 70:252–258.
45. Qin BY, Creamer LK, Baker EN, Jameson GB. (1998). 12-Bromododecanoic acid binds inside the calyx of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett.* 438:272– 278.
46. Wu S-Y, Pérez MD, Puyol P, Sawyer L. (1999). β -Lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *J Biol Chem.* 274:170-174

47. G. Kontopidis, C. Holt, L. Sawyer. (2004). Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function, *J. Dairy Sci.* 87: 785–796.
48. G. Kontopidis, C. Holt, L. Sawyer. (2002). The ligand-binding site of bovine β -lactoglobulin: evidence for a function? *J. Mol. Biol.* 318: 1043–1055.
49. M.C. Yang, H.H. Guan, M.Y. Liu, Y.H. Lin, J.M. Yang, W.L. Chen, C.J. Chen, S.J. Mao. (2008). Crystal structure of a secondary vitamin D₃ binding site of milk β -lactoglobulin. *Proteins* 71: 1197–1210.
50. Qvist J, Davidovic M, Hamelberg D, Halle B. (2008). A dry ligand-binding cavity in a solvated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(17):6296-301.
51. Velazquez-Campoy A, Leavitt SA, Freire E. (2004). Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol.* 261:35–54.
52. Prabhu NV, Sharp KA. (2005). Heat capacity in proteins. *Annu Rev Phys Chem.* 56:521–548.
53. Cabani, S., Gianni, P., Mollica, V., & Lepori, L. (1981) *J. Solution Chem.* 10:563-595.
54. Hermann, R. B. (1972). Theory of hydrophobic bonding. II. Correlation of hydrocarbon solubility in water with solvent cavity surface area. *J. Phys. Chem.* 76, 2754-2759.
55. Murphy KP, Freire E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv Protein Chem.* 43:313–361.
56. Lee B, Richards FM. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol;* 55:379-400.
57. Murphy KP, Xie D, Garcia KC, Amzel LM, Freire E. (1993). Structural energetics of peptide recognition: angiotensin II/antibody binding. *Protein.* 15:113-120.
58. Gomez J, Freire E. (1995). Thermodynamic mapping of the inhibitor site of aspartic of protease endothiapepsin. *J Mol. Biol.* 252:337-350.
59. Murphy KP, Bhakuni V, Xie D, Freire E. (1992). Molecular basis of cooperativity in protein folding. III. Structural identification of cooperative folding units and folding intermediates. *J Mol Biol.* 227:293-306.
60. Xie D, Freire E. (1994). Molecular basis of cooperativity in protein folding. V. Thermodynamic and structural conditions for the stabilization of compact denatured states. *Proteins.* 19:291-301.
61. Luque I, Freire E. (2002). Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands. *Proteins.* 49:181-190.
62. Murphy KP, Freire E, Paterson Y. (1995). Configurational effects in antibody-antigen interactions studied by microcalorimetry. *Proteins.* 21:83-90.

63. Murphy KP, Xie D, Thompson KS, Amzel LM, Freire E. (1994). Entropy in biological binding processes: estimation of translational entropy loss. *Proteins*. 18:63-67
64. Murphy KP, Privalov PL, Gill SJ. (1990). Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds. *Science*. 247:559-561.
65. Baldwin RL. (1986). Temperature dependence of the hydrophobic interactions in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:8069-8072.
66. Finkelstein AV, Janin J. (1989). The price of lost freedom: entropy of biomolecular complex formation. *Protein Eng*. 3:1-3.
67. Tamura A, Privalov PL. (1997). The entropy cost of protein association. *J Mol Biol*. 273:1048-1060.
68. Amzel LM. (1997). Loss of translational entropy in binding, folding, and catalysis. *Proteins*. 28:144-149.
69. Murphy KP, Freire E. (1995). Thermodynamic strategies for rational proteins and drugs design. *Pharm Biothechnol*. 7: 219-241.
70. Creamer TP, Rose GD. (1992). Side-chain entropy opposes alpha-helix formation but rationalizes experimentally determined helix-forming propensities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 5937-5941.
71. Creamer TP, Rose GD. (1994). Alpha-helix-forming propensities in peptides and proteins. *Proteins*. 19: 85-97.
72. D'Aquino JA, Gomez J, Hilser VJ, Lee KH, Amzel LM, Freire E (1996). The magnitude of the backbone conformational entropy change in protein folding. *Proteins*. 25:143-156.
73. Lee KH, Xie D, Freire E, Amzel LM. (1994). Estimation of changes in side-chain configurational entropy in binding and folding: general methods and application to helix formation. *Proteins*. 20:68-84.
74. Baker BM, Murphy KP. (1998). Prediction of binding energetics from structure using empirical parameterization. *Method Enzymol*. 295:294-315.
75. Burrows SD, Doyle ML, Murphy KP, Franklin SG, White JR, Brooks I, McNulty DE, Scott MO, Knutson JR, Porter D, Young PR, Hensley P. (1994). Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveals it is a monomer at physiological concentrations. *Biochemistry*. 33:12741-12745.
76. Lovatt M, Cooper A, Camilleri P. (1996). Energetics of cyclodextrin induced dissociation of insulin. *Eur Biophys J*. 24:354-357.

77. Luke K, Apiyo D, Wittung-Stafshede P. (2005). Dissecting homo-heptamer thermodynamics by isothermal titration calorimetry: entropy-driven assembly of co-chaperonin protein 10. *Biophys J.* 89:3332–3336.
78. Vorum H; Brodersen R; Kragh-Hansen U; Pedersen A O Solubility of long-chain fatty acids in phosphate buffer at pH 7.4. *Biochimica et Biophysica Acta* ; 1126(2):135-142.
79. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. E , and Lin, L. (1992). Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. *Anal. Biochem.* 179:131-137.
80. Hubbard SJ, Thornton JM. NACCESS Computer Program, London UK: Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College; 1993.
81. Vriend G. (1990). WHAT IF: a molecular modelling and drug design program. *J Mol Graph.* 8:52–56.
82. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. (1995). GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp Phys Commun.* 91:43–56.
83. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 16:1701-18.
84. Xavier Daura, Alan E. Mark, Wilfred F. van Gunsteren. (1998). Parametrization of aliphatic CH_n united atoms of GROMOS96 force field. *J Comput Chem.* 19(5): 535-547
85. Lukas D. Schuler, Xavier Daura, Wilfred F. van Gunsteren. (2001). An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *J Comput Chem.* 22(11): 1205-1218.
86. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, Hermans J. (1981). Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Pullman B, editor. *Intermolecular forces.* The Netherlands: Reidel. pp 331–342.
87. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, Di Nola A, Haak JR. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys.* 81:3684–3690.
88. Miyamoto S, Kollman PA. (1992). SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comp Chem.* 13:952–962.
89. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije. (1997). JGEM. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem.* 18:1463–1472.
90. Botelho MM, Valente-Mesquita VL, Oliveira KM, Polikarpov I, Ferreira ST. (2000). Pressure denaturation of β -lactoglobulin. Different stabilities of isoforms A and B, and an investigation of the Tanford transition. *Eur J Biochem.* 267(8):2235-2241.

91. Parsegian VA, Rand RP, Rau DC. (1995). Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods Enzymol.* 259:43–94.
92. Sawyer, L. (2003). β -Lactoglobulin. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry, Proteins: Vol. 1.* (3rd ed.).
93. Baker, B. M., and Murphy, K. P. (1998). Prediction of binding energetics from structure using empirical parameterization. *Methods Enzymol.* 295:294-315.
94. Luque, I., and Freire, E. (1998). A system for the structure-based predictions of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods Enzymol.* 295:100-127.
95. Ladbury JE, Wright JG, Sturtevant JM, Sigler PB. (1994). A thermodynamic study of the trp repressor–operator interaction. *J Mol Biol.* 238:669–681.
96. Guinto ER, Di Cera E. (1996). Large heat capacity change in a protein monovalent cation interaction. *Biochemistry.* 35:8800–8804.
97. Morton CJ, Ladbury JE. (1996). Water-mediated protein–DNA interactions: the relationship of thermodynamics to structural detail. *Protein Sci.* 5:2115–2118.
98. Holdgate GA, Tunnicliffe A, Ward WHJ, Weston SA, Rosenbrock G, Barth PT, Taylor IWF, Pauptit RA, Timms D. (1997). The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry.* 36:9663–9673.
99. Clarke C, Woods RJ, Gluska J, Cooper A, Nutley MA, Boons GJ. (2001). Involvement of water in carbohydrate–protein binding. *J Am Chem Soc.* 123:12238–12247.
100. Bergqvist S, Williams MA, O’Brien R, Ladbury JE. (2004). Heat capacity effects of water molecules and ions at a protein-DNA interface. *J Mol Biol.* 336:829–842.
101. Geroult S, Virdee S, Waksman G. (2006). The role of water in computational and experimental derivation of binding thermodynamics in SH2 domains. *Chem Biol Drug Des.* 67:38–45.
102. Rau D. (2006). Sequestered water and binding energy are coupled in complexes of λ Cro Repressor with non-consensus binding sequences. *J Mol Biol.* 361:352–361.
103. Sturtevant JM. (1977). Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(6):2236-40.
104. Geoffrey B. Jameson, Julian J. Adams, Lawrence K. Creamer. (2002). Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal.* 12:319–329.
105. Noy, N. (2000). Retinoid-binding proteins: Mediators of retinoid action. *Bioch. J.* 348:481–495.

106. Olejniczak, E.T., Zhou, M.M., and Fesik, S.W. (1997). Changes in the NMR-derived motional parameters of the insulin receptor substrate 1 phosphotyrosine binding domain upon binding to an interleukin 4 receptor phosphopeptide. *Biochemistry*. 36: 4118–4124.
107. Lee, A., Kinnear, S., and Wand, A. (2000). Redistribution and loss of side chain entropy upon formation of a calmodulin-peptide complex. *Nat. Struct. Biol.* 7:72–77.
108. Mercier, P., Spyropoulos, L., and Sykes, B. (2001). Structure, dynamics, and thermodynamics of the structural domain of troponin C in complex with the regulatory peptide 1–40 of troponin I. *Biochemistry* 40:10063–10077.
109. Wang, C., Pawley, N., and Nicholson, L. (2001). The role of backbone motions in ligand binding to the c-Src SH3 domain. *J. Mol. Biol.* 313:873–887.
110. Kern, D., and Zuiderweg, E.R. (2003). The role of dynamics in allosteric regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:748–757.
111. Stivers, J.T., Abeygunawardana, C., Mildvan, A.S., and Whitman, C.P. (1996). ¹⁵N NMR relaxation studies of free and inhibitor-bound 4-oxalocrotonate tautomerase: backbone dynamics and entropy changes of an enzyme upon inhibitor binding. *Biochemistry*. 35:16036–16047.
112. Yu, L., Zhu, C.X., Tse-Dinh, Y.C., and Fesik, S.W. (1996). Backbone dynamics of the C-terminal domain of Escherichia coli topoisomerase I in the absence and presence of single-stranded DNA. *Biochemistry*. 35:9661–9666
113. Zidek, L., Novotny, M.V., and Stone, M.J. (1999). Increased protein backbone conformational entropy upon hydrophobic ligand binding. *Nat. Struct. Biol.* 6:1118–1121.
114. Vergani, B., Kintrup, M., Hillen, W., Lami, H., Piemont, E., Bombarda, E., Alberti, P., Doglia, S.M., and Chabbert, M. (2000). Backbone dynamics of Tet repressor alpha8-intersectional-alpha9 loop. *Biochemistry*. 39:2759–2768.
115. Yun, S., Jang, D.S., Kim, D.H., Choi, K.Y., and Lee, H.C. (2001). ¹⁵N NMR relaxation studies of backbone dynamics in free and steroid-bound Delta 5–3-ketosteroid isomerase from Pseudomonas testosteroni. *Biochemistry*. 40:3967–3973.
116. Zhu, L., Hu, J., Lin, D., Whitson, R., Itakura, K., and Chen, Y. (2001). Dynamics of the Mrf-2 DNA-binding domain free and in complex with DNA. *Biochemistry* 40:9142–9150.
117. Loh, A.P., Pawley, N., Nicholson, L.K., and Oswald, R.E. (2001). An increase in side chain entropy facilitates effector binding: nmr characterization of the side chain methyl group dynamics in cdc42hs. *Biochemistry* 40:4590–4600.

118. Finerty, P.J., Jr., Muhandiram, R., and Forman-Kay, J.D. (2002). Side-chain dynamics of the SAP SH2 domain correlate with a binding hot spot and a region with conformational plasticity. *J. Mol. Biol.* 322:605–620.
119. Arumugam, S., Gao, G., Patton, B.L., Semchenko, V., Brew, K., and Van Doren, S.R. (2003). Increased backbone mobility in β -barrel enhances entropy gain driving binding of n-timp-1 to mmp-3. *J. Mol. Biol.* 327:719–734.
120. Fayos, R., Melacini, G., Newlon, M., Burns, L., Scott, J., and Jennings, P. (2003). Induction of flexibility through protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 278:18581–18587.
121. Balog, E., Becker, T., Oettl, M., Lechner, R., Daniel, R., Finney, J., and Smith, J. (2004). Direct determination of vibrational density of states change on ligand binding to a protein. *Phys. Rev. Lett.* 93:28-103.
122. Buck, E., and Iyengar, R. (2003). Organization and functions of interacting domains for signaling by protein-protein interactions. *Science.* 23:3-14.
123. Steinberg, I.Z., and Scheraga, H.A. (1963). Entropy changes accompanying association reactions of proteins. *J. Biol. Chem.* 238:172–181.
124. Viñals, J., Kolinski, A., and Skolnick, J. (2002). Numerical study of the entropy loss of dimerization and the folding thermodynamics of the GCN4 leucine zipper. *Biophys. J.* 83:2801–2811.
125. Gohlke, H., Kiel, C., and Case, D. (2003). Insights into protein-protein binding by binding free energy calculation and free energy decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS complexes. *J. Mol. Biol.* 330:891–913.
126. Hsu, S., Peter, C., van Gunsteren, W., and Bonvin, A. (2004). Entropy calculation of HIV-1 Env gp120, its receptor CD4 and their complex: an analysis of configurational entropy changes upon complexation. *Biophys. J.* 88:15–24.
127. Tidor, B., and Karplus, M. (1994). The contribution of vibrational entropy to molecular association. The dimerization of insulin. *J. Mol. Biol.* 238:405–414.
128. R. Grünberg, M. Nilges, J. Leckner. Flexibility and Conformational Entropy in Protein-Protein Binding. *Structure*, Volume 14, Issue 4, p.p. 683-693
129. Impey, R.W., Madden, P.A., and McDonald, I.R. (1983). Hydration and mobility of ions in solution. *J. Phys. Chem.* 87:5071–5083.
130. Koji Kano, Yoshiyuki Ishida, Kohei Kitagawa, Mayuko Yasuda, and Maki Watanabe. (2007). Heat-Capacity Changes in Host–Guest Complexation by Coulomb Interactions in Aqueous Solution. *Chem. Asian J.* 2:1305 – 1313.

Energetics of protein homodimerization: Effects of water sequestering on the formation of β -lactoglobulin dimer

Martiniano Bello,¹ Gerardo Pérez-Hernández,² D. Alejandro Fernández-Velasco,³ Roberto Arreguín-Espinosa,¹ and Enrique García-Hernández^{1*}

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, México

²Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, México 04510, México

³Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa, Pedro Antonio de los Santos 84, San Miguel Chapultepec, Miguel Hidalgo, México 11850, México

ABSTRACT

Transient protein–protein interactions are functionally relevant as a control mechanism in a variety of biological processes. Analysis of the 3D structure of protein–protein complexes indicates that water molecules trapped at the interface are very common; however, their role in the stability and specificity of protein homodimer interactions has been not addressed yet. To provide new insights into the energetic bases that govern the formation of highly hydrated interfaces, the dissociation process of bovine β lg variant A at a neutral pH was characterized here thermodynamically by conducting dilution experiments with an isothermal titration calorimeter. Association was enthalpically driven throughout the temperature range spanned. ΔH and ΔC_p were significantly more negative than estimates based on surface area changes, suggesting the occurrence of effects additional to the dehydration of the contact surfaces between subunits. Near-UV CD spectra proved to be independent of protein concentration, indicating a rigid body-like association. Furthermore, the process proved not to be coupled to significant changes in the protonation state of ionizable groups or counterion exchange. In contrast, both osmotic stress experiments and a computational analysis of the dimer's 3D structure indicated that a large number of water molecules are incorporated into the interface upon association. Numerical estimates considering the contributions of interface area desolvation and water immobilization accounted satisfactorily for the experimental ΔC_p . Thus, our study highlights the importance of explicitly considering the effects of water sequestering to perform a proper quantitative analysis of the formation of homodimers with highly hydrated interfaces.

Proteins 2008; 70:1475–1487.
© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: protein–protein interaction; calorimetry; structural-energetics; ITC; residual hydration.

INTRODUCTION

Bovine β -lactoglobulin (β lg) is one of the most prominent members of the lipocalin family, a large group of proteins mainly involved in the transport of small hydrophobic molecules.¹ Its fold, characterized by eight antiparallel β -strands (labeled A–H) arranged in two β -sheets, lacks the typical compact core of globular proteins (Fig. 1). Instead, the β -sheets form a cavity, usually referred to as “calyx”, which constitutes the main binding site for hydrophobic ligands.^{2,3} Several genetic variants of β lg have been identified in cow's milk, variants A and B being the most prevalent.^{4,5} These variants differ at only two positions in the polypeptide chain: 64 (Asp_A → Gly_B) and 118 (Val_A → Ala_B). The former position, located near the flexible CD loop, is highly exposed to the solvent, while the second one, at the β -strand H, is immersed in the hydrophobic cavity of the protein. Although the crystal structures of the variants show that these mutations do not cause any significant conformational difference,^{6,7} distinct properties in stability and dynamic behavior have been documented.^{7–11} As early as 1936, Pedersen¹² provided evidence about the tendency of β lg to self-associate. Since then, its aggregation behavior has been studied extensively.^{13–24} Above pH 3.5, β lg behaves as a weak homodimer whose strength of interaction depends on pH in a complex way.¹⁵ Below pH 3.5, dimers dissociate into monomers due to electrostatic repulsion, although formation of dimers can be induced by increasing the ionic strength of the solution.²³ For variant A, it has been observed that a fraction of monomers form octamers between pH 3.5 and 5.5, at temperatures of around 4°C.²⁴ In contrast, the dimer is the largest quaternary structure observed for variant B.

Grant sponsor: CONACyT; Grant numbers: 47097, 41328; Grant sponsors: DGAPA, PAPIIT; Grant number: IN217106-3.

*Correspondence to: Enrique García-Hernández, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, México.

E-mail: egarciah@servidor.unam.mx

Received 10 November 2006; Revised 27 April 2007; Accepted 22 May 2007

Published online 1 October 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/prot.21639

**Figure 1**

Left. Schematic representation of the 3D structure of β lg dimer. The labeling of the β -strands is shown. Residues with at least 5 \AA^2 of surface area buried at the interface are shown as sticks. Right. Perpendicular view of the contact zone of one subunit. Polar (Asp²⁸, Asp³³, Arg⁴⁰, Arg¹⁴⁸, His¹⁴⁶, Ser¹⁵⁰, Asn¹⁵², Gln¹⁵⁵) and apolar (Ile²⁹, Ala³⁴, Ile¹⁴⁷, Leu¹⁴⁹, Phe¹⁵¹) residues represented as black and white VDW spheres, respectively.

The β lg dimer interface is composed of residues in the A-B loop and the β -strand I (Fig. 1). Each protomer contributes four charged (Asp²⁸, Asp³³, Arg⁴⁰, Arg¹⁴⁸), four polar (His¹⁴⁶, Ser¹⁵⁰, Asn¹⁵², Gln¹⁵⁵) and five apolar (Ile²⁹, Ala³⁴, Ile¹⁴⁷, Leu¹⁴⁹, Phe¹⁵¹) residues.²⁵ This residue composition yields the β lg interface salient features as compared to other protein homodimer interfaces. First, the β lg interface constitutes a highly polar environment. Indeed, the fractional content of polar surfaces of the β lg interface turns out to be significantly larger than the average content seen in different sets of homodimeric or heterodimeric interfaces^{26–29}; the fraction of polar area is even larger than the average content for the exterior surface of globular proteins.^{27,30} Second, the interface size of β lg is small, being at the bottom limit observed for protein homodimers.³¹ Additionally, the hydration properties of the β lg interface also appear to be non-standard. Statistical surveys of residual hydration at protein–protein interfaces revealed a correlation between the amount of buried polar surface and the number of water molecules that the interface is prone to incorporate.³² The β lg interface shows density of water molecules per unit of polar area similar to the average density seen at homodimeric interfaces (see Results). Nevertheless, due to the high abundance of polar surfaces, the density of water molecules per unit of total interface area for β lg becomes significantly larger than the average density for protein homodimers.³²

With such interfacial properties, β lg appears to be an attractive study system for further expanding our understanding of the molecular and energetic bases that govern the formation of protein homodimers. With this aim, the process of dissociation of β lg dimer variant A at neutral pH was characterized here by conducting dilution experiments using an isothermal titration calorimeter. The only

calorimetric measurement on β lg dimerization preceding this study is that performed by Sakurai *et al.*,²¹ who induced the formation of the dimer at pH 3.0 by titrating the monomer with saline solution. However, the intrinsic complexity of this kind of measurement precluded a precise determination of the thermodynamic functions. In contrast, the dilution protocol used in the present study yielded data that allowed the homodimer energetics to be determined robustly.³³ In this regard, it is noteworthy to mention that although ITC surpasses other techniques in precision, since it allows ΔH to be measured directly and ΔC_p to be determined just as a first derivative parameter, the number of protein homodimers studied with this technique is still scarce.^{33–37} The thermodynamic profile obtained here for β lg revealed that the process is enthalpically driven throughout the temperature range spanned, with the maximum stability occurring around 25°C. The changes in heat capacity (ΔC_{pA}) and enthalpy (ΔH_A) accompanying dimer formation resulted to be significantly larger than estimates derived with empirical models based on surface area changes. After assessing different factors that could be responsible for such a discrepancy, our results indicated that water molecules that become immobilized at the interface upon dimer formation have a major role in determining the large negative magnitudes of ΔC_{pA} and ΔH_A .

METHODS

All chemicals, including bovine β lg variant A (L7880) were from Sigma Chemical Co. Experiments were performed at pH 7.0 in a 0.05M buffer phosphate solution added with 0.1M NaCl, unless otherwise stated. β lg was dissolved into the buffer solution, and extensively dialy-

trated in an Amicon stirred cell through polyethersulfone ultrafiltration discs. Protein concentration ($M_W = 18.24$ kDa) was determined spectrophotometrically ($A_{0.1\%}^{280\text{nm}} = 0.97$) after thoroughly degassing the solution.

Isothermal titration calorimetry

Because of the self-associative nature of βlg , a dilution protocol was the method of choice to perform calorimetric measurements.^{33,37} Under this protocol, stepwise additions of small aliquots of a solution of high protein concentration are applied into the calorimetric reaction cell loaded with buffer solution. Dilution of the stock protein solution perturbs the equilibrium, triggering the dissociation of the homodimer in the cell to an extent that is determined by the equilibrium constant

$$K_{\text{disc}} = \frac{[P]^2}{[P_2]}$$

where $[P]$ and $[P_2]$ are the molar concentrations of the free monomer and dimer, respectively. According to a simple dimer dissociation model, the heat measured upon addition of the i^{th} injection of volume dV_i into the cell calorimeter of fixed-volume V_0 would be

$$q_i = \Delta H_{\text{disc}}[P_2]_{\text{sy}} dV_i - \Delta H_{\text{disc}}([P_2]_i - [P_2]_{i-1}) \left(V_0 + \frac{dV_i}{2} \right) \quad (1)$$

where ΔH_{disc} is the dissociation enthalpy of the dimer. The dimer concentration in the reaction cell $[P_2]_i$ and the syringe $[P_2]_{\text{sy}}$ are in turn related to the corresponding equivalent monomer concentrations $[P_T]$ through the dissociation constant:

$$[P_T] = [P] + 2[P_2] = K_{\text{disc}}^{1/2}[P_2]^{1/2} + 2[P_2] \quad (2)$$

ΔH_{disc} and K_{disc} were determined from dilution calorimetric data through non-linear regression fitting of Eqs. (1) and (2). ΔG_{disc} and ΔS_{disc} were calculated from these parameters with standard thermodynamic relations:

$$\Delta G_{\text{disc}} = -RT \ln K_{\text{disc}} = \Delta H_{\text{disc}} - T\Delta S_{\text{disc}} \quad (3)$$

By conducting experiments at different temperatures, the heat capacity change was estimated according to:

$$\Delta C_{p,\text{disc}} = \frac{d\Delta H_{\text{disc}}}{dT} = T \frac{d\Delta S_{\text{disc}}}{dT} \quad (4)$$

ITC measurements were performed using a VP-ITC instrument (MicroCal, Inc). During experiments, the stirrer-syringe was kept rotating at ~ 300 rpm. Typically, 40–50 aliquots of protein solution were injected. Similarly to conventional titration experiments, the c parameter ($= [P_T]/K_{\text{disc}}$) was used as a guide to set appropriate protein

concentrations for performing dilution ITC measurements. In the case of dimer dissociation, the recommended window is $10 \leq c \leq 10,000$.³⁷ In all our experiments, c was between 40 and 70. Results are reported in terms of dimer association, that is, K_A , ΔG_A , ΔH_A , ΔS_A , and ΔC_{pA} . No dependence of the ITC measurements on protein concentration was observed in the 0.8–1.7 mM range.

Circular dichroism

Near-UV CD spectra were recorded at $(25 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ on a JASCO J-720 spectropolarimeter calibrated with (+)-10-camphorsulfonic acid. Three scanning acquisitions were accumulated and averaged to yield the final spectrum. CD spectra were corrected for the buffer baseline. The mean residue ellipticity, $[\theta]$, was calculated as $100\theta_{\text{obs}}(lC)^{-1}$, where θ_{obs} is the observed ellipticity in degrees, C is the concentration in residue moles per liter and l is the length of the cell light-path in centimeters. Protein solutions were prepared by diluting a stock solution into buffer as required. Solutions with different $[P_T]$ were assessed using rectangular quartz cells with appropriate path-lengths in order to keep the optical density per cm of path-length (at 280 nm) smaller than 1.

Changes in accessible surface area

Structure-based determinations of water-accessible surface areas (A) were performed with the NACCESS program,³⁸ using a probe radius of 1.4 Å, and a slice width of 0.25 Å. Changes in A upon dimer formation (ΔA) were estimated from the difference between the dimer and the sum of free subunits. Polar (ΔA_p) and apolar (ΔA_{ap}) area changes were calculated from changes in accessibility of nitrogen plus oxygen atoms and sulfur plus carbon atoms, respectively.

Molecular dynamics simulations

The quality of the βlg dimer X-ray structure (1beb.pdb;²⁵) was checked and fixed with the WHAT IF web interface.³⁹ MD simulation of the dimer was performed in explicit solvent using a periodic truncated octahedral box solvated with 11672 SPC water molecules.⁴⁰ Sixteen sodium ions were added to compensate for the net negative charge of the protein. The distance between any atom of the protein and the box wall was at least 1.0 nm. A similar MD simulation for the isolated chain A taken from the dimer structure was performed, including eight sodium ions and 6308 water molecules.

Simulations were conducted by using the GROMACS simulation suite and the OPLS all-atom force field.⁴¹ Systems were equilibrated in a stepwise fashion. First, the solvent was relaxed using steepest descent energy minimization, keeping the protein atoms fixed, followed by 100 ps of MD equilibration at 250 K. Unrestrained MD of successive 100 ps equilibration periods of the whole

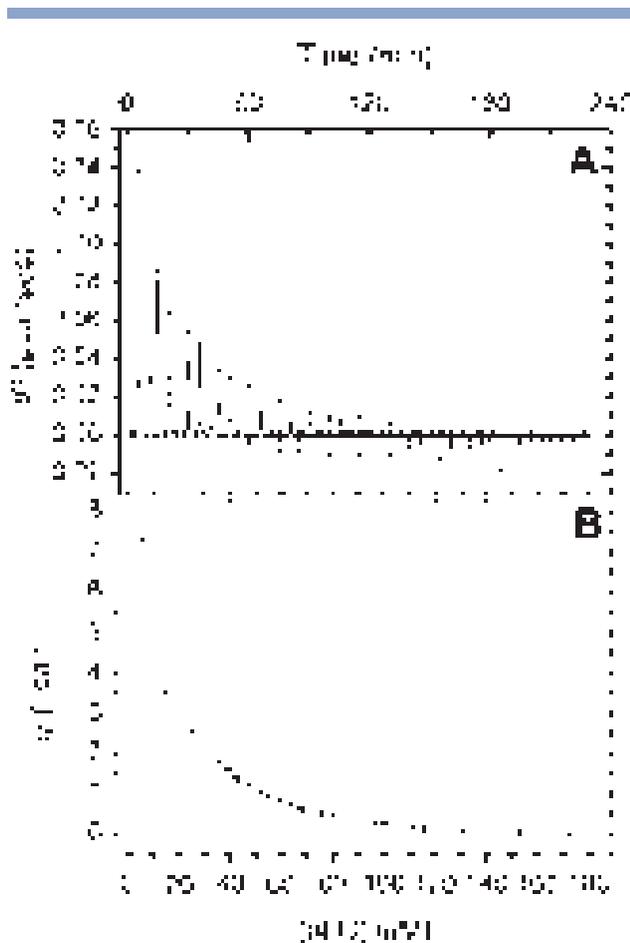


Figure 2

Heat effects of β Ig dimer dissociation measured by ITC. Consecutive 4- μ L aliquots of 1.28 mM protein solution were diluted into 1.42 mL of 0.05M phosphate buffer (pH 7.0) added with 0.1M NaCl, at 25°C. A total of 45 injections were applied. **A:** Raw calorimetric trace. **B:** Dissociation isotherm corrected for dilution heats. The solid line corresponds to the best fitting of a dimer dissociation model [Eqs. (1), (2)] to the experimental data.

system were then performed at 250 and 300 K, with velocity reassignments every 5 fs. Finally, MD runs were carried out in the isothermal-isobaric ensemble for 5 ns. Temperature was maintained at 300 K with temperature coupling to an external heat bath with a relaxation time of 0.1 ps, and pressure was kept constant by weak isotropic coupling to a pressure bath, with a relaxation time of 0.1 ps.⁴² Electrostatic interactions were handled using the particle mesh Ewald method. LINCS and SETTLE algorithms were applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2 fs.^{43,44}

RESULTS

ITC characterization

The energetics of homodimerization of bovine β Ig variant A at neutral pH was characterized here by conduct-

ing dilution experiments using a high-precision ITC instrument. As an example, Figure 2(A) shows a thermogram obtained at 25°C, which shows that dissociation occurred with heat absorption. As the protein concentration in the reaction cell was progressively increased, smaller heats were recorded with each new injection, tending asymptotically to a negative value that approximates the dilution heat of the protein.³³ Figure 2(B) shows the dissociation isotherm after subtracting dilution heats. The solid line corresponds to the best fitting of a model of dimer dissociation [Eqs. (1), (2)] to the experimental data. Likewise, experiments were performed for temperatures in the 15–35°C range. Table I summarizes the calorimetric results expressed in terms of dimer formation. Values at each temperature correspond to the mean of three independent experiments.

Figure 3 shows the profiles of the binding parameters as a function of temperature. The formation of β Ig dimer was enthalpically driven throughout the temperature range spanned. The sign of ΔS_A was observed to change around room temperature, which corresponds to the temperature of maximum stability of the dimer. Analysis of the thermal dependence of ΔH_A data yielded $-495 \pm 9 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ for ΔC_{pA} ; a similar value ($-504 \pm 11 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) was obtained when the thermal dependence of ΔS_A was used instead. Using these magnitudes, the temperatures at which ΔH_A and ΔS_A become zero (T_H and T_S , respectively) were calculated to be 12 and 25°C, respectively.

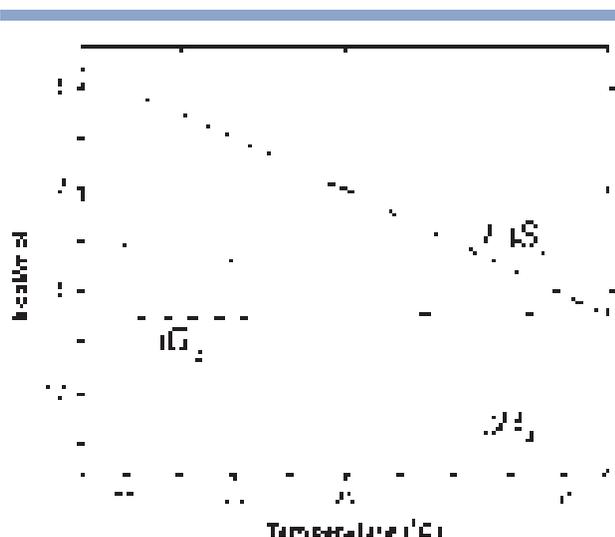
The self-association of bovine β Ig has been studied extensively in the past, mainly by the sedimentation equilibrium technique. Table II gathers data derived from other groups for β Ig variant A at several pH values. As can be seen, K_A values obtained here from calorimetric measurements compare favorably with values determined via sedimentation data under similar conditions. In contrast, significant differences are seen in the magnitudes of ΔH_A and ΔS_A . These discrepancies may be traced in part to the strong entropy–enthalpy compensation observed in Figure 3, which makes ΔH_A difficult to determine with precision through a van't Hoff analysis. Furthermore, most ΔH_A values in Table II were derived assuming ΔC_{pA} to be zero. Regarding this last parameter,

Table I

Homodimerization Energetics of β Ig Variant A at Neutral pH as Determined by ITC^a

Temperature °C	ΔG_A cal mol ⁻¹	ΔH_A cal mol ⁻¹	$T\Delta S_A$ cal mol ⁻¹	K_A M ⁻¹
15	-6175 ± 9	-2432 ± 300	3753 ± 310	48291 ± 322
20	-6204 ± 20	-3492 ± 153	2712 ± 141	42228 ± 580
25	-6214 ± 4	-5915 ± 243	299 ± 314	35922 ± 103
30	-6152 ± 33	-8566 ± 293	-2414 ± 327	27260 ± 665
35	-6044 ± 39	-11260 ± 85	-5216 ± 124	19362 ± 535

^aValues are the mean of three experiments at each temperature.

**Figure 3**

Thermodynamic profile of β Ig dimerization at neutral pH as a function of temperature. The data represent the average of three independent measurements.

Sakurai *et al.*²¹ reported two different values at pH 3.0: -179 and -461 cal mol⁻¹ K⁻¹ in NaClO₄ and NaCl, respectively. Significant differences for ΔH_A with the two salts were also obtained in that study. From data by Joss and Ralston¹⁸ for β Ig variant B (pH 2.6, ionic strength 0.16) a ΔC_{pA} value of -704 cal mol⁻¹ K⁻¹ is obtained. All these ΔC_{pA} values, though scattered, are comparable to the value determined calorimetrically in the present study.

Protonation changes

According to data in Table II, K_A increases as pH gets closer to the isoelectric point of β Ig (pI = 5.2), while it seems to be rather independent of proton concentration at neutral and slightly basic solutions, implying that dimerization is not significantly coupled to proton exchange with solvent at those conditions. A way to prove whether proton exchange takes place is to carry out calorimetric measurements using buffers of different ionization enthalpy, ΔH_{ion} .⁴⁶ Thus, the measured enthalpy, ΔH_{obs} , will vary as a function of the number of protons exchanged, ν :

$$\Delta H_{obs} = \nu \Delta H_{ion} + \Delta H_b \quad (5)$$

where ΔH_b is the binding enthalpy with no solvent protonation effects. Figure 4(A) shows ΔH_{obs} as a function of ΔH_{ion} . Measurements were carried out at 25°C using buffers of quite different ΔH_{ion} (phosphate, $\Delta H_{ion} = 0.9$ kcal mol⁻¹; bis-tris, $\Delta H_{ion} = 6.8$ kcal mol⁻¹; tris, $\Delta H_{ion} = 11.3$ kcal mol⁻¹). Linear regression analysis of data in Figure 4(A) yielded a net uptake of 0.21 ± 0.04 protons

upon dimer formation. This proton exchange implies that ΔH_A values in Table I, which were measured in phosphate buffer, are around 0.15 kcal mol⁻¹ less negative than ΔH_b .

Hydration changes

Osmotic stress studies using nonionic osmolytes were conducted to measure hydration effects coupled to dimer formation.⁴⁷ Cosolutes exert opposite effects on the equilibrium constant for reactions that expel or incorporate water molecules. In the case of reactions that bury water molecules in microenvironments that are inaccessible to the osmolyte due to steric hindrance, the latter competes indirectly for these molecules due to its dropping effect on bulk water activity, thus decreasing the magnitude of the equilibrium constant. On the contrary, osmotic stress favors reactions that eject water molecules. Accordingly, the number of water molecules that are not accessible to the osmolyte (ΔN_W) can be estimated from the dependence of the equilibrium constant on the osmolality of the solution, [osmol]⁴⁷:

$$\Delta N_W = -55.6 \frac{\partial \ln K}{\partial [\text{osmol}]} \quad (6)$$

Equation (6) assumes that no direct interaction between the cosolute and the protein takes place. Calorimetric titrations of predominantly dimeric β Ig (>1 mM) with sucrose or acetamide (2M), two osmolytes with quite different chemical properties, yielded caloric effects not differentiable from dilution heats (data not shown), indicating no interaction with the protein. Therefore, they were selected as stressing agents. As shown in Figure 4(B), K_A became progressively smaller as the concentration of osmotic agents was increased. This observation is consistent with the net uptake of water molecules upon dimer formation. Regression analysis of sucrose and acetamide data in Figure 4(B) yielded ΔN_W of 36 ± 2 and 33 ± 2 ,

Table II

Summary of Literature Values for β Ig Variant A Homodimer Energetics, Obtained by Sedimentation Equilibrium at 20°C^a

pH	[NaCl]	ΔG_A kcal mol ⁻¹	ΔH_A kcal mol ⁻¹	$T\Delta S_A$ kcal mol ⁻¹	K_A M ⁻¹ × 10 ⁻³	Reference
8.2	0.13	-6.29	ND	ND	49	16
7.5	0.10	-5.63	ND	ND	16	14
7.0	0.10	-6.20	-3.49	2.71	42	This work
7.0	0.10	-6.27	-15.52	-9.25	47	17
6.9	0.13	-6.29	ND	ND	49	16
6.5	0.10	-6.35	ND	ND	54	45
6.5	0.02	-7.11	ND	ND	203	22
5.2	0.10	-8.08	-6.91	1.17	1058	17
3.0	0.05/0.5	-5.1/7.1	-12	-6.9/-4.9	7	21
2.7	0.1	-5.4	-12.4	-7.0	11	23

^aND: no determined.

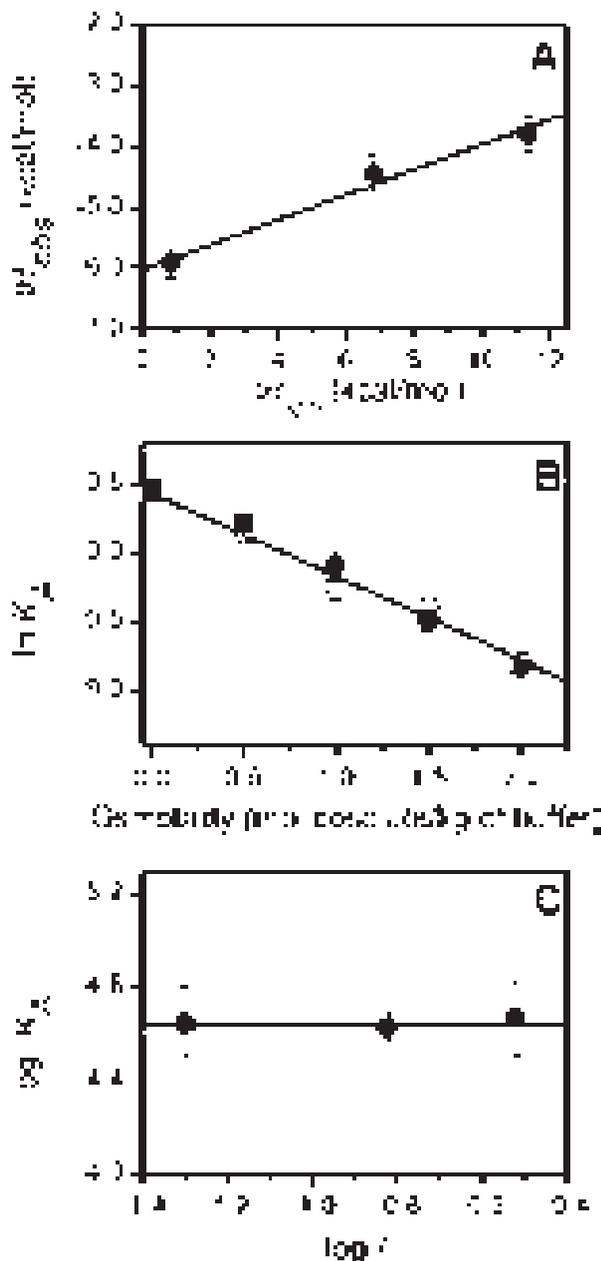


Figure 4

Proton (A), water (B), and counterion (C) linkage for the formation of the β lg homodimer measured calorimetrically at 25 °C. Sucrose (solid circles) and acetamide (open circles) were used as stress agents while NaCl was used to vary the ionic force of the solution. The data represent the average of three independent measurements.

respectively. The linearity observed in Figure 4(B) and the agreement in the number of exchanged water molecules for both osmolytes confirmed that changes measured in K_A were nonspecific. A global fit of sucrose and acetamide data yielded the acquisition of 36 ± 3 water molecules upon dimerization.

Counterion exchange

According to polyelectrolyte theory,^{48,49} the number of counterions exchanged upon binding, ΔN_{Cl} , can be determined from the ionic strength dependence of the equilibrium constant:

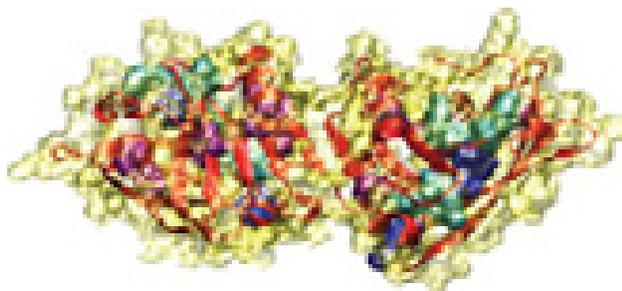
$$\Delta N_{Cl} = \frac{\partial \log K}{\partial \log I} \quad (7)$$

where I stands for the solution's ionic strength. In contrast with osmotic stress experiments, relatively low salt concentrations must be used in order to minimize effects on water activity. As shown in Figure 4(C), calorimetrically measured K_A was found to be fairly constant upon variation of NaCl concentration in the range of 0.05–0.30 M. The behavior observed in this Figure is consistent with the exchange of $\sim 0.06 \pm 0.28$ counterions. This is in agreement with previous observations indicating that β lg monomer/dimer equilibrium is marginally sensitive to ionic strength variations at neutral pH,^{17,20} showing a negligible virial coefficient at protein concentrations in the sub-millimolar range.^{16,19} In contrast, dimerization in acidic media is strongly dependent on the amount of electrolytes added.^{15,18–21} At pH 3, for instance, it has been found that high concentrations of salt are required to induce dimerization, with the net uptake of two anions.²¹

Spectroscopic characterization

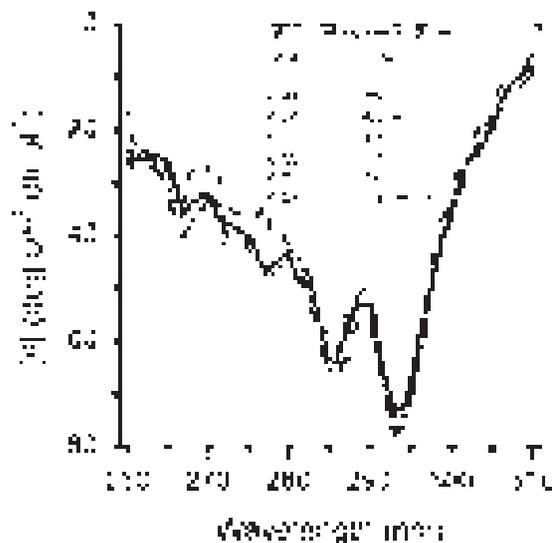
Inspection of the 3D structure of β lg dimer (Fig. 5) reveals that only Phe¹⁵¹ of each monomer is partially buried at the interface, while the other aromatic residues are not directly involved in the contact between proto-mers. Furthermore, the dispositions of these residues in the rest of the structure make them very sensitive reporters for local and global structural rearrangements in the protein. Indeed, they have proved useful in the identification and characterization of numerous conformational changes that β lg undergoes upon influence from a number of factors, including temperature, pH, pressure, salt and caotropic agents.^{50–61} Consequently, the spectroscopic properties of these residues can be assessed conveniently in order to investigate whether conformational changes beyond the dimer interface occur upon dimer formation.

CD spectroscopy was the technique of choice, as it is less sensitive than other techniques such as fluorimetry to side effects that arise from variations in the optical density of the solution, allowing the sampling of a wider range of protein concentration. Near-UV CD spectra using different protein concentrations are shown in Figure 6. The spectra showed the fine structure previously described for native β lg, which arises from aromatic residues placed in a variety of asymmetric environments characteristic of the tertiary structure of the protein. As

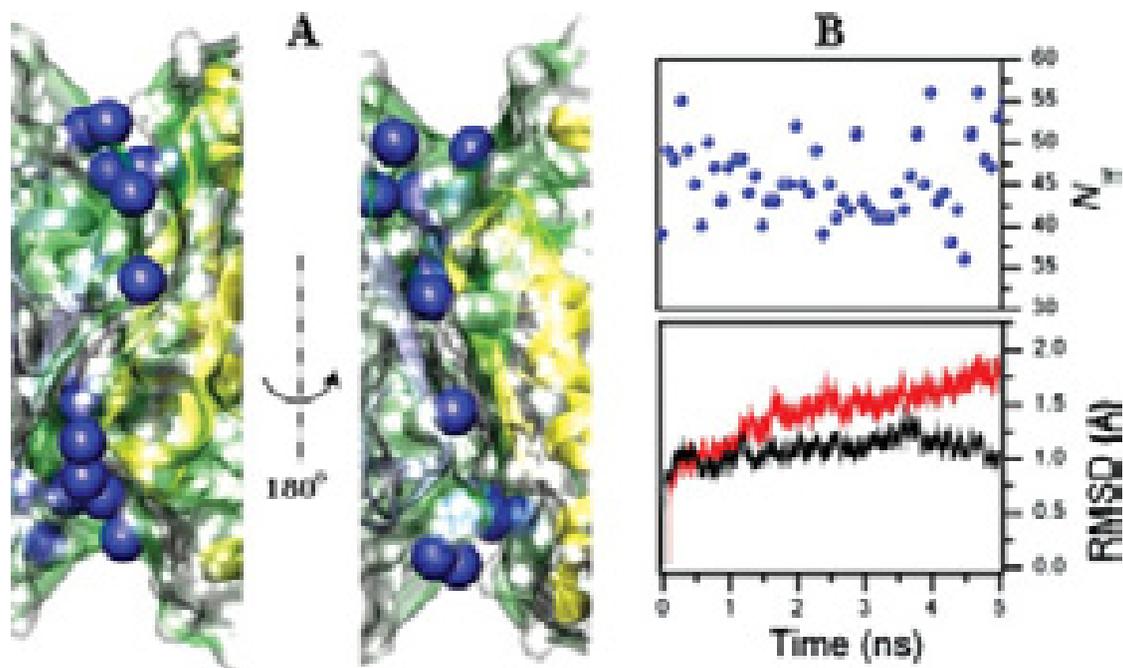
**Figure 5**

Schematic representation of the crystal structure of the dimer of β lg (1beb), highlighting the location of tryptophan (blue), tyrosine (cyan), and phenylalanine (magenta) residues.

can be seen, CD signals were found to be, within experimental uncertainty, independent of protein concentration. The fraction of monomers forming dimers in the protein concentration range spanned (0.01–0.41 mM) varied from ~ 0.14 to ~ 0.70 , that is, more than half of the molar change was sampled. Therefore, CD results indicated that the monomer-to-dimer equilibrium at neutral pH is not accompanied by significant changes in tertiary structure. This picture is in agreement with a

**Figure 6**

CD spectra of β lg as function of protein concentration in 0.05M phosphate buffer, 0.1M NaCl, pH 7.0, 25°C. Ellipticity was normalized by protein concentration. $[P_T]$ stands for the total monomer concentration. The corresponding percentage of monomers forming dimers at each $[P_T]$ calculated according to data in Table 1 is indicated.

**Figure 7**

Hydration of the β lg dimer interface. **A:** 17 interface water molecules were identified within 4.5 Å from both subunits in the crystal structure of the dimer (blue spheres). **B:** Molecular dynamics simulation results. The number of interface water molecules (circles) and the RMSD as a function of time for the free (red line) and bound (black line) monomer are plotted.

number of previous studies, including the observation that the NMR structure of the free monomer at acid pH is very similar to that observed in the crystal structure of the dimer at neutral pH.^{62–64} Furthermore, early evidence by Zimmerman *et al.*¹⁶ showed that the dimerization behavior of β lg is not altered by the presence of hydrophobic ligands. More recently, D'Alfonso *et al.*⁶⁵ reported that dimers and monomers bind ANS with similar strength.

Structural analysis and molecular dynamics simulations

To look for a structural correlation for the osmotic stress results, the crystal structure of β lg dimer obtained at pH 6.5 (1.8 Å, PDB ID: 1beb) was analyzed for interface hydration. Interface water molecules were defined as those molecules lying within 4.5 Å from both protein subunits. This cutoff is the same value used in a recent statistical study on hydration of protein–protein interfaces.³² Seventeen of the ~200 solvent molecules solved in the crystal structure satisfied the distance criterion [Fig. 7(A)]. Considering the 1039 Å² of total surface area buried at the β lg interface (see below), the surface density of water molecules amounts to 16 molecules per 1000 Å². This density is significantly larger than the mean density of 10 water molecules per 1000 Å² of total interface area seen in crystal structures of protein homodimers.³² Nevertheless, this difference vanishes when the density is referred to the interface polar area, which amounts to 34 molecules per 1000 Å² for the β lg interface (495 Å² of polar area), while the mean value for homodimer interfa-

ces is 32 molecules per 1000 Å².³² Thus, the density of water molecules in relation to the total surface area is large in the case of β lg simply due to its large fractional content of polar areas (0.48). As pointed out above, this high abundance of polar surfaces locates β lg in the top range of most polar homodimer interfaces characterized so far.²⁸ Its polar content is not only significantly larger than the average content for homodimer interfaces (0.35), but also larger than that observed for heterodimeric interfaces (0.43) and the surface of globular proteins (0.44).^{27,29,66}

An inspection of the β lg structure revealed that interfacial water molecules are indeed embedded in a highly polar environment, being engaged in a complex network of polar-to-polar contacts (Table III). The pattern of hydration of the β lg interface can be described as a patch of protein surface that is significantly hydrated and surrounded by immobilized solvent molecules.³² On average, around 3.6 protein polar neighbors per water molecule are seen within 4 Å. Three of these water molecules (residue numbers 403, 406, and 521, according to the 1beb pdb file) have only two neighbors each. Fifteen out of 17 are within 3.5 Å from at least 1 polar protein atom, which is similar to the statistical frequency observed at protein–protein interfaces.³² In this regard, it is worthy to mention that in the analysis performed by Nooren and Thornton,²⁸ the β lg interface was reported as having poorly complementary surfaces. These authors quantified the shape complementarity of the interface through the gap index, which is calculated as the ratio of the void volume to the total area at the interface. The gap index of the β lg interface with no water molecules is

Table III

Neighbor Polar Atoms of Crystallographic Water Molecules Observed at the Homodimer Interface of β lg (≤ 4 Å)

HOH ^a	Residue(atom) in subunit A, distance (Å)	Residue(atom) in subunit B, distance (Å)	HOH, distance (Å)
403	M ¹⁴⁵ (O), 3.76	S ¹⁵⁰ (OG), 3.81	
404	S ²⁷ (O), 3.89; D ²⁸ (OD1), 2.79; I ²⁹ (N), 2.83	N ¹⁵² (OE1), 3.94; Q ¹⁵⁵ (OE1), 3.89; Q ¹⁵⁵ (NE2), 3.94	HOH ⁴²⁴ (O), 3.78; HOH ⁵⁹⁶ (O), 2.68
406	Q ³⁵ (N), 3.14	D ³³ (OD2), 3.31	
414	H ¹⁴⁶ (NE2), 3.47	S ¹⁵⁰ (O), 3.74; F ¹⁵¹ (O), 2.86	HOH ⁴⁵⁸ (O), 3.60
424	S ²⁷ (O), 2.99; D ²⁸ (OD1), 3.93; H ¹⁴⁶ (ND1), 3.38	N ¹⁵² (OD1), 3.90	HOH ⁴⁰⁴ (O), 3.78
428	Q ¹⁵⁵ (OE1), 3.73; Q ¹⁵⁵ (NE2), 3.93	D ²⁸ (OD1), 3.31; I ²⁹ (N), 2.98	HOH ⁴⁷⁷ (O), 3.23; HOH ⁵⁶⁹ (O), 2.76
431	R ¹⁴⁸ (NH1), 3.02; R ¹⁴⁸ (O), 3.64	M ¹⁴⁵ (O), 3.68; H ¹⁴⁶ (O), 3.75; I ¹⁴⁷ (N), 3.55; R ¹⁴⁸ (N), 3.96; R ¹⁴⁸ (NH1), 3.39	
458	H ¹⁴⁶ (NE2), 3.61	N ¹⁵² (ND2), 3.49	HOH ⁴¹⁴ (O), 3.60
477		S ²⁷ (O), 3.62; D ²⁸ (O), 3.23	HOH ⁴²⁸ (O), 3.23; HOH ⁵³¹ (O), 3.65
498	D ³³ (OD2), 2.63	R ⁴⁰ (NH2), 3.81	HOH ⁵²⁰ (O), 2.71
508	H ¹⁴⁶ (O), 2.41; I ¹⁴⁷ (N), 3.72	S ¹⁵⁰ (N), 3.87; R ¹⁴⁸ (O), 3.97	
520	S ³⁰ (N), 3.62	Q ¹⁵⁵ (OE1), 3.64	HOH ⁵⁹⁸ (O), 2.71
521	Q ¹⁵⁵ (OE1), 3.05	S ³⁰ (N), 3.70	
531	N ¹⁵² (ND2), 3.97	D ²⁸ (OD1), 3.43; D ²⁸ (OD2), 2.91	HOH ⁴²⁸ (O), 3.96; HOH ⁴⁷⁷ (O), 3.65
536	S ¹⁵⁰ (OG), 3.78; F ¹⁵¹ (N), 3.95; F ¹⁵¹ (O), 2.77	H ¹⁴⁶ (NE2), 3.49	
569	S ¹⁵⁰ (O), 2.95; N ¹⁵² (ND2), 3.95; N ¹⁵² (N), 3.21; Q ¹⁵⁵ (NE2), 2.68	H ¹⁴⁶ (NE2), 3.88	HOH ⁴²⁸ (O), 2.76
596	H ¹⁴⁶ (ND1), 3.64; H ¹⁴⁶ (NE2), 3.84	S ¹⁵⁰ (O), 2.76; N ¹⁵² (ND2), 3.58; N ¹⁵² (N), 3.69; N ¹⁵² (OD1), 3.46; Q ¹⁵⁵ (NE2), 2.62	HOH ⁴⁰⁴ (O), 2.68

^aResidue number according to pdb file 1BEB.

5.3, while the average magnitude for homodimer interfaces is 2.8.²⁸ We recalculated the void volume for the β lg interface with the SURFNET software⁶⁷ taking into account the 17 interface water molecules, obtaining a gap index of 3.0.

The number of interface water molecules seen in the crystal structure of β lg dimer is about half of that determined via osmotic perturbation. Several factors could be responsible for this difference, including the fact that interface water molecules tend to be underreported in the crystal structure of proteins.³² To check whether the β lg interface is able to accommodate additional water molecules, the dimer structure was subjected to a molecular dynamics simulation in explicit solvent. After equilibration of the solvent box, 38 water molecules were seen lying within 4.5 Å from both protein subunits. Sixteen of these interface water molecules showed positions equivalent to those observed in the crystal structure. A 5-ns molecular dynamics simulation was performed to investigate the consistency of this extended number of water molecules. As shown in Figure 7(B), the number of interface water molecules kept fairly constant during the simulation. The average number for the whole simulation was 47 ± 5 , which is somewhat larger than the number determined via osmotic stress measurements.

Figure 7(B) also shows the time course of the RMSD observed during simulations for free and bound monomers. Regardless of the association state, no significant deviations in relation to the crystal structure were observed. Similar results were obtained for the radius of gyration (data not shown). These results are in agreement with CD measurements indicating that β lg dimerization resembles a rigid-body like association.

DISCUSSION

The fact that β lg possess a small interface with a high density of residual water molecules may imply that water incorporation has a significant effect on the formation energetics of this dimer. Recently, increasing evidence has been gathered indicating that the burying of water molecules at the binding interface can exert a significant effect on the magnitude of ΔC_p .^{68–75} To investigate this possibility, the β lg dimer was analyzed using surface area models. The most commonly used partition in these empirical models for ΔC_p includes the contributions of polar and apolar groups (ΔC_{pp} and ΔC_{pap} , respectively), which are assumed to be proportional to the changes in solvent-accessibility of surface areas (ΔA).

$$\Delta C_p = \Delta C_{pp} + \Delta C_{pap} = \Delta C_{pp}\Delta A_p + \Delta C_{pap}\Delta A_{ap} \quad (8)$$

Table IV lists four sets of parameters that have been published in the literature for specific contributions in Eq. (8). These parameterizations were derived using either model compounds^{76,77} or protein folding data.^{78,79}

Table IV
Heat Capacity Parameterizations Based on Changes in Polar and Apolar Surface Areas^a

	ΔC_{pp}	ΔC_{pap}
Murphy and Freire (76)	-0.26	0.45
Spolar et al. (77)	-0.14	0.32
Myers et al. (78)	-0.09	0.28
Makhatadze and Privalov (79)	-0.21	0.51

^aUnits in cal (mol Å² K)⁻¹.

Surface area changes were calculated on the high-resolution crystallographic structure of β lg dimer (1beb). No water molecules were included in the calculations, while free protomers were modeled by simply eliminating the other subunit in the dimer structure, that is, assuming a rigid-body like association. The amounts of polar and apolar surfaces buried at the interface ($\Delta A_p = -495$ and $\Delta A_{ap} = -545$ Å², respectively) were similar to each other. Using these area changes, the magnitudes of ΔC_{pA} estimated with the parameterizations in Table IV were considerably smaller (-105 to -174 cal mol⁻¹ K⁻¹) than the experimental magnitude (-495 ± 9 cal mol⁻¹ K⁻¹). Significant discrepancies between experimental and calculated heat capacity changes can take place due to a number of factors, including (1) major conformational changes, (2) change in the protonation state of ionizable groups, (3) counterion exchange, and (4) uptake or release of structural waters.^{46,80} According to results obtained in this study and in previous reports, factors 1-to-3 seem to be ruled out in the case of β lg dimerization at neutral pH. In contrast, both osmotic stress measurements and analysis of the crystal structure of the dimer revealed that a large number of water molecules are sequestered upon binding.

On going from bulk solvent to an ordered environment, a water molecule is expected to contribute to the observed ΔC_p with a negative magnitude due to a reduction in its thermally accessible vibrational, librational and rotational modes.⁸¹ However, the evaluation of the specific contribution of buried waters to the energetics in protein association is not straightforward and still difficult to accomplish with reasonable accuracy. Experimental approaches have yielded a wide range of values for this contribution. Morton and Ladbury⁷⁰ noted a breakdown between observed and calculated ΔC_p for the formation of protein-DNA complexes. By assuming that the differences between ΔA -calculated and experimental magnitudes were entirely due to water sequestering, the authors estimated values between -6 and -12 cal mol⁻¹ K⁻¹ per water molecule. Using similar considerations, Holdgate *et al.*⁷¹ estimated -48 ± 31 cal mol⁻¹ K⁻¹ in studying the binding of novobiocin to the B subunit of DNA gyrase. In analyzing data on the dissolution of dipeptide

crystals, Haberman and Murphy⁸² estimated -60 ± 8 cal mol⁻¹ K⁻¹ per water molecule. More recently, Clarke *et al.*⁷² found a more suitable system in the comparison of two Concanavalin A complexes. These two complexes were all identical except by the substitution of the hydroxyl attached at C-2 on the central mannose in the wild trimannoside by a hydroxyethyl moiety. This modification was engineered to force the displacement of a single water molecule seen in the 3D structure of the wild complex well-buried at the protein-carbohydrate interface. According to this study, the incorporation of the structural water molecule elicits a heat capacity change of -17 cal mol⁻¹ K⁻¹. Nevertheless, the actual heat capacity contribution of the structural water should be somewhat less negative than the difference between the two Concanavalin A adducts, due to the contribution arising mainly from the burying of the two additional carbon atoms in the engineered carbohydrate. Analyzing these same complexes computationally through the inhomogeneous fluid solvation theory, Li and Lazaridis⁸³ obtained -10 cal mol⁻¹ K⁻¹. Using this approach, similar results were obtained by the same authors for a bound water molecule forming part of the interface between HIV-1 protease and cyclic urea inhibitors.⁸⁴

Crystalline or liquid organic phases have been thought to mimic the highly packed environment characteristic of globular proteins and their interfaces when forming complexes.⁸⁵ Accordingly, the transfer of pertinent model compounds from these condensed phases to an aqueous environment has been used largely to infer the energetics of chemical groups in folding and binding processes.⁸⁶ Following this philosophy of group transferability, the heat capacity decrease for burying a bulk water molecule into a solid-like protein-protein interface may be readily estimated from the difference in isobaric heat capacities of liquid water and ice.^{70,87} The heat capacity of liquid water is 18.0 cal mol⁻¹ K⁻¹ at 25°C. Considering its thermal dependence,⁸⁸ the heat capacity of ice at 25°C would be 9.8 cal mol⁻¹ K⁻¹. The difference amounts to -8.2 cal mol⁻¹ K⁻¹. According to osmotic stress measurements, 36 ± 3 water molecules are incorporated upon formation of β lg dimer. Therefore, the extra effect on ΔC_{pA} from water sequestering would be -295 ± 25 cal mol⁻¹ K⁻¹. When this magnitude is added to the changes calculated with surface area models, the resulting estimations (-400 to -469 cal mol⁻¹ K⁻¹) are in good agreement with the experimental magnitude (-495 ± 9 cal mol⁻¹ K⁻¹).

The sequestering of a water molecule into a highly structured environment is thought to be accompanied by a favorable enthalpy that offsets the entropy cost due to the restriction of the degrees of freedom of the molecule.⁸⁹ The entropic and enthalpic effects of this process are very complex and highly dependent on the fine stereochemical details of the interaction.^{83,84} As a consequence, these contributions are extremely difficult to

assess accurately. According to Xie and Freire,⁹⁰ the change in enthalpy at 60°C is given by

$$\Delta H(60) = 31.4\Delta A_p - 8.44\Delta A_{ap}, \quad (9)$$

where proportionality coefficients were obtained from the analysis of protein unfolding data. This parameterization has been useful in analyzing the folding of a number of proteins, as well as the formation of protein complexes after correction for coupled-equilibria effects.⁴⁶ Equation (9), with surface area changes for the β lg dimer, yields $\Delta H(60) = -10.9$ kcal mol⁻¹. Using the experimental ΔC_{pA} , the calculated ΔH_A at 25°C is $+6.4$ kcal mol⁻¹, which differs drastically from the experimental value (-5.9 kcal mol⁻¹). This discrepancy is consistent with a stabilizing enthalpic effect due to the incorporation of water molecules into the β lg interface.

The above results suggest a major energetic role of water sequestering in the formation of the β lg homodimer. Nevertheless, it should be noted that the value of -8.2 cal mol⁻¹ K⁻¹ calculated from the difference between the heat capacity of ice and liquid water represents an upper limit for the sequestering of a water molecule, as it implies a reduction of soft modes as large as that in a lattice environment.⁸⁷ Since it is reasonable to expect that a fraction of the water molecules detected via osmotic perturbation measurements are weakly bound,⁹¹ the effect of water incorporation on ΔC_{pA} should be somewhat smaller than the above calculation. In fact, the temperature factors of water molecules seen at the homodimer interface can differ considerably from each other. The *B*-factor range for these molecules is 22–74 Å², although only one of them has a value larger than 56 Å². Furthermore, assuming that the difference between the experimental enthalpy and that calculated with Eq. (9) is due to water sequestering effects alone, the average enthalpy change per sequestered water molecule would be -0.34 kcal mol⁻¹. This magnitude is significantly smaller than the molar heat of ice formation from liquid water (-1.44 kcal mol). Thus, it seems that some additional effects might be taken place in the formation of the β lg homodimer. A likely scenario may consist in the occurrence of significant changes in protomer dynamics upon dimer formation. Heat capacity is related to variations in enthalpy fluctuations:

$$C_p = \frac{\langle \delta H^2 \rangle}{kT^2} \quad (10)$$

where the numerator stands for the mean squared fluctuation in enthalpy and *k* is the Boltzmann constant. Therefore, reduction of the soft vibrational modes upon binding would decrease the heat capacity of the system. The effect of decreasing fluctuations has been postulated as a significant source of the unexpectedly large negative ΔC_p observed for the formation of protein-DNA or pro-

tein–protein adducts involving folding or stiffening of at least one of the molecular partners.^{92–95} In the case of β lg, it has been stated that it exhibits a large flexibility at neutral pH. Partial cancellation of this flexibility upon dimer formation could yield additional decrease of ΔC_{pA} . However, no systematic study has been carried out on the effect of dimerization on the internal mobility of β lg. Interestingly, evidence has been provided on the greater structural mobility of variant A in relation to that of variant B as inferred from infrared spectroscopy with hydrogen–deuterium exchange and gelification properties.^{9,96} Therefore, a comparative study on the dimerization properties of β lg variants could shed some light on the role that the change in protomer dynamics has on ΔC_{pD} . This study is currently being undertaken in our lab.

ACKNOWLEDGMENTS

M.B. received fellowships from CONACyT and DGAPA. Computer support and cpu time for the simulations were facilitated by DGSCA.

REFERENCES

- Sawyer L, Kontopidis G. The core lipocalin, β -lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:136–148.
- Qin BY, Bewley MC, Creamer LK, Baker HM, Baker EN, Jameson GB. Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry* 1998;37:14014–14023.
- Wu SY, Perez MD, Puyol P, Sawyer L. β -lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *J Biol Chem* 1999;274:170–174.
- Aschaffenburg R, Drewry J. Occurrence of different β -lactoglobulins in cow's milk. *Nature* 1955;176:218–219.
- Godovac-Zimmermann J, Krause I, Baranyi M, Fischer-Fruhholz S, Juszcak J, Erhardt G, Buchberger J, Klostermeyer H. Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine beta-lactoglobulins I and J. *J Protein Chem* 1996;15:743–750.
- Oliveira KMG, Valente-Mesquita VL, Botelho MM, Sawyer L, Ferreira ST, Polikarpov I. Crystal structures of bovine β -lactoglobulin in the orthorhombic space group C22₁. Structural differences between genetic variants A and B and features of the Tanford transition. *Eur J Biochem* 2001;268:477–483.
- Qin BY, Bewley MC, Creamer LK, Baker EN, Jameson GB. Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Protein Sci* 1999;8:75–83.
- Timasheff SN, Mescanti L, Basch JJ, Townend R. Conformational transitions of bovine β -lactoglobulins A, B, and C. *J Biol Chem* 1966;241:2496–2501.
- Dong A, Matsuura J, Allison SD, Chrisman E, Manning MC, Carpenter JF. Infrared and circular dichroism spectroscopic characterization of structural differences between β -lactoglobulin A and B. *Biochemistry* 1996;35:1450–1457.
- Manderson GA, Hardman MJ, Creamer LK. Effect of heat treatment on the conformation and aggregation of β -lactoglobulin A, B, and C. *J Agr Food Chem* 1998;46:5052–5061.
- Botelho MM, Valente-Mesquita VL, Oliveira KM, Polikarpov I, Ferreira ST. Pressure denaturation of β -lactoglobulin: different stabilities of isoforms A and B, and an investigation of the Tanford transition. *Eur J Biochem* 2000;15:2235–2241.
- Pedersen KO. Ultracentrifugal and electrophoretic studies on the milk proteins: the lactoglobulin of Palmer. *Biochem J* 1936;30:961–970.
- Georges C, Guinand S, Tonnelat J. Etude thermodynamique de la dissociation réversible de la β -lactoglobuline B pour des pH suérieurs à 5.5. *Biochem Biophys Acta* 1962;59:737–739.
- McKenzie HA, Sawyer WH. Effect of pH on β -lactoglobulins. *Nature* 1967;214:1101–1104.
- Townend R, Winterbottom RJ, Timasheff SN. Molecular interactions in β -lactoglobulin. II. Ultracentrifugal and electrophoretic studies of the association of β -lactoglobulin below its isoelectric point. *J Am Chem Soc* 1960;82:3161–3168.
- Zimmerman JK, Barlow GH, Klotz IM. Dissociation of β -lactoglobulin near neutral pH. *Arch Biophys Biochem* 1970;138:101–109.
- Kelly MJ, Reithel FJ. A thermodynamic analysis of the monomer-dimer association of β -lactoglobulin A at the isoelectric point. *Biochemistry* 1971;10:2639–2644.
- Joss LA, Ralston GB. β -lactoglobulin B: a proposed standard for the study of reversible self-association reactions in the analytical ultracentrifuge? *Anal Biochem* 1996;236:20–26.
- Aymard P, Durante D, Nicolai T. The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *Int J Biol Macromol* 1996;19:213–221.
- Verheul M, Pedersen JS, Roefs SPFM, de Kruijff KG. Association behavior of native β -lactoglobulin. *Biopolymers* 1999;49:11–20.
- Sakurai K, Oobatake M, Goto Y. Salt-dependent monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH 3. *Protein Sci* 2001;10:2325–2335.
- Sakurai K, Goto Y. Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin by amino acid substitution. *J Biol Chem* 2002;277:25735–25740.
- Timasheff SN, Townend R. Molecular interactions in β -lactoglobulin. VI. The dissociation genetic species of β -lactoglobulin at acid pH's. *J Am Chem Soc* 1961;83:470–473.
- Townend R, Timasheff SN. Molecular interactions in β -lactoglobulin. III. Light scattering investigation of the stoichiometry of the association between pH 3.7 and 5.2. *J Am Chem Soc* 1960;82:3168–3174.
- Brownlow S, Cabral JHM, Cooper R, Flower DR, Yewdall SJ, Polikarpov I, North ACT, Sawyer L. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution—still an enigmatic lipocalin. *Structure* 1997;5:481–495.
- Tsai CJ, Lin SL, Wolfson HJ, Nussinov R. Study of protein–protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect. *Protein Sci* 1997;6:53–64.
- García-Hernández E, Zubillaga RA, Rodríguez-Romero A, Hernández-Arana A. Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology* 2000;10:993–1000.
- Nooren IM, Thornton JM. Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *J Mol Biol* 2003;325:991–1018.
- Bahadur RP, Chakrabarti P, Rodier F, Janin J. Dissecting subunit interfaces in homodimeric proteins. *Proteins* 2003;53:708–719.
- Chothia C. The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *J Mol Biol* 1976;105:1–12.
- Stites WE. Protein-protein interactions: interface structure, binding thermodynamics and mutational analysis. *Chem Rev* 1997;97:1233–1250.
- Rodier F, Bahadur RP, Chakrabarti P, Janin J. Hydration of protein-protein interfaces. *Proteins* 2005;60:36–45.
- Burrows SD, Doyle ML, Murphy KP, Franklin SG, White JR, Brooks I, McNulty DE, Scott MO, Knutson JR, Porter D, Young PR, Hensley P. Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveals it is a monomer at physiological concentrations. *Biochemistry* 1994;33:12741–12745.
- Lovatt M, Cooper A, Camilleri P. Energetics of cyclodextrin-induced dissociation of insulin. *Eur Biophys J* 1996;24:354–357.
- Chen S, Chen L, Tan J, Chen J, Du L, Sun T, Shen J, Chen K, Jiang H, Shen X. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like proteinase N terminus is indispensable for proteolytic activity but

- not for enzyme dimerization. Biochemical and thermodynamic investigation in conjugation with molecular dynamics simulations. *J Biol Chem* 2005;280:164–173.
36. Luke K, Apiyo D, Wittung-Stafshede P. Dissecting homo-heptamer thermodynamics by isothermal titration calorimetry: entropy-driven assembly of co-chaperonin protein 10. *Biophys J* 2005;89:3332–3336.
 37. Velazquez-Campoy A, Leavitt SA, Freire E. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol* 2004;261:35–54.
 38. Hubbard SJ, Thornton JM. NACCESS Computer Program, London UK: Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College; 1993.
 39. Vriend G. WHAT IF: a molecular modelling and drug design program. *J Mol Graph* 1990;8:52–56.
 40. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, Hermans J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Pullman B, editor. *Intermolecular forces*. The Netherlands: Reidel; 1981. pp 331–342.
 41. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp Phys Commun* 1995;91:43–56.
 42. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, Di Nola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984;81:3684–3690.
 43. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem* 1997;18:1463–1472.
 44. Miyamoto S, Kollman PA. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comp Chem* 1992;13:952–962.
 45. Sakai K, Sakurai K, Sakai M, Hoshino M, Goto Y. Conformation and stability of thiol-modified bovine β -lactoglobulin. *Protein Sci* 2000;9:1719–1729.
 46. Baker BM, Murphy KP. Prediction of binding energetics from structure using empirical parameterization. *Methods Enzymol* 1998;295:294–315.
 47. Parsegian VA, Rand RP, Rau DC. Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods Enzymol* 1995;259:43–94.
 48. Record MT, Zhang W, Jr, Anderson CF. Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, Hofmeister effects, and osmotic effects of salts. *Adv Protein Chem* 1998;51:281–353.
 49. Dragan AI, Li Z, Makeyeva EN, Milgotina EI, Liu Y, Crane-Robinson C, Privalov PL. Forces driving the binding of homeodomains to DNA. *Biochemistry* 2006;45:141–151.
 50. Wahl P, Timasheff SN. Polarized fluorescence decay curves for β -lactoglobulin A in various states of association. *Biochemistry* 1969;8:2945–2949.
 51. Mills OE. Effect of temperature on tryptophan fluorescence of β -lactoglobulin B. *Biochim Biophys Acta* 1976;434:324–332.
 52. Dufour E, Bertrand-Harb C, Haertlé T. Reversible effects of medium dielectric constant on structural transformation of β -lactoglobulin and its retinol binding. *Biopolymers* 1993;33:589–598.
 53. Dufour E, Hui Bon Hoa G, Haertlé T. High-pressure effects on β -lactoglobulin with ligands studied by fluorescence. *Biochem Biophys Acta* 1994;1206:166–172.
 54. Creamer LK. Effect of sodium dodecyl sulfate and palmitic acid on the equilibrium unfolding of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry* 1995;34:7170–7176.
 55. Kuwajima K, Yamaya H, Sugai S. The burst-phase intermediate in the refolding of β -lactoglobulin studied by stopped-flow circular dichroism and absorption spectroscopy. *J Mol Biol* 1996;264:806–822.
 56. Molinari H, Ragona L, Varani L, Musco G, Consonni R, Zetta L, Monaco HL. Partially folded structure of monomeric bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett* 1996;381:237–243.
 57. Hamada D, Goto Y. The equilibrium intermediate of β -lactoglobulin with non-native α -helical structure. *J Mol Biol* 1997;269:479–487.
 58. García-Hernández E, Hernández-Arana A, Zubillaga RA, Rojo-Domínguez A. Thermodynamic and spectroscopic evidence for a complex denaturation mechanism of bovine β -lactoglobulin A. *Biochem Mol Biol Int* 1998;45:761–768.
 59. Renard D, Lefebvre J, Griffin MCA, Griffin WG. Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *Int J Biol Macromol* 1998;22:41–49.
 60. Ikeuchi Y, Nakagawa K, Endo T, Suzuki A, Hayashi T, Ito T. Pressure-induced denaturation of monomer β -lactoglobulin is partially irreversible: comparison of monomer form (highly acidic pH) with dimer from (neutral pH). *J Agric Food Chem* 2001;49:4052–4059.
 61. Taulier N, Chalikian TV. Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *J Mol Biol* 2001;314:873–889.
 62. Fogolari F, Ragona L, Zetta L, Romagnoli S, De Kruijff K G, Molinari H. Monomeric bovine β -lactoglobulin adopts a β -barrel fold at pH 2. *FEBS Lett* 1998;436:149–154.
 63. Kuwata K, Hoshino M, Forge V, Era S, Batt CA, Goto Y. Solution structure and dynamics of bovine β -lactoglobulin A. *Protein Sci* 1999;8:2541–2545.
 64. Uhrinova S, Smith MH, Jameson GB, Uhrin D, Sawyer L, Barlow PN. Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the β -lactoglobulin dimer. *Biochemistry* 2000;39:3565–3574.
 65. D'Alfonso L, Collini M, Baldini G. Evidence of heterogeneous 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate binding to β -lactoglobulin from fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1999;1432:194–202.
 66. Lo Conte L, Chothia C, Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 1999;285:2177–2198.
 67. Laskowski RA. SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities and intermolecular interactions. *J Mol Graph* 1995;13:323–330.
 68. Ladbury JE, Wright JG, Sturtevant JM, Sigler PB. A thermodynamic study of the trp repressor-operator interaction. *J Mol Biol* 1994;238:669–681.
 69. Guinto ER, Di Cera E. Large heat capacity change in a protein-monovalent cation interaction. *Biochemistry* 1996;35:8800–8804.
 70. Morton CJ, Ladbury JE. Water-mediated protein-DNA interactions: the relationship of thermodynamics to structural detail. *Protein Sci* 1996;5:2115–2118.
 71. Holdgate GA, Tunnicliffe A, Ward WHJ, Weston SA, Rosenbrock G, Barth PT, Taylor IWF, Pauptit RA, Timms D. The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry* 1997;36:9663–9673.
 72. Clarke C, Woods RJ, Gluska J, Cooper A, Nutley MA, Boons GJ. Involvement of water in carbohydrate-protein binding. *J Am Chem Soc* 2001;123:12238–12247.
 73. Bergqvist S, Williams MA, O'Brien R, Ladbury JE. Heat capacity effects of water molecules and ions at a protein-DNA interface. *J Mol Biol* 2004;336:829–842.
 74. Geroult S, Virdee S, Waksman G. The role of water in computational and experimental derivation of binding thermodynamics in SH2 domains. *Chem Biol Drug Des* 2006;67:38–45.
 75. Rau D. Sequestered water and binding energy are coupled in complexes of λ Cro Repressor with non-consensus binding sequences. *J Mol Biol* 2006;361:352–361.
 76. Murphy KP, Freire E. Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv Protein Chem* 1992;43:313–361.
 77. Spolar RS, Livingstone JR, Record MT, Jr. Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surface from water. *Biochemistry* 1992;31:3947–3955.

78. Myers JK, Pace CN, Scholtz JM. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* 1995;4:2138–2148.
79. Makhatadze GI, Privalov PL. Energetics of protein structure. *Adv Protein Chem* 1995;47:307–425.
80. Ladbury JE, Williams MA. The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 2004;14:562–569.
81. Cooper A. Heat capacity effects in protein folding and ligand binding: a re-evaluation of the role of water in biomolecular thermodynamics. *Biophys Chem* 2005;115:89–97.
82. Habermann SM, Murphy KP. Energetics of hydrogen bonding in proteins: a model compound study. *Protein Sci* 1996;5:1229–1239.
83. Li Z, Lazaridis T. The effect of water displacement on binding thermodynamics: Concanavalin A. *J Phys Chem B* 2005;109:662–670.
84. Li Z, Lazaridis T. Thermodynamic contribution of the ordered water molecule in HIV-1 protease. *J Am Chem Soc* 2003;125:6636–6637.
85. Lazaridis T, Archontis G, Karplus M. Enthalpic contribution to protein stability: insights from atom-based calculations and statistical mechanics. *Adv Protein Chem* 1995;47:231–306.
86. Prabhu NV, Sharp KA. Heat capacity in proteins. *Annu Rev Phys Chem* 2005;56:521–548.
87. Dunitz JD. The cost of bound water in crystals and biomolecules. *Science* 1994;264:670.
88. Giauque WF, Stout JW. The entropy of water and the third law of thermodynamics. The heat capacity of ice from 15 to 273 K. *J Am Chem Soc* 1936;58:1144–1150.
89. Ladbury J.E. Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem Biol* 1996;3:973–980.
90. Xie D, Freire E. Molecular basis of cooperativity in protein folding. V. Thermodynamic and structural conditions for the stabilization of compact denatured states. *Proteins* 1994;19:291–301.
91. Kiser JR, Monk RW, Smalls RL, Petty JT. Hydration changes in the association of Hoechst 33258 with DNA. *Biochemistry* 2005;44:14988–14997.
92. Cooper A. Thermodynamic fluctuations in protein molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2740–2741.
93. Cooper A. Protein fluctuations and the thermodynamic uncertainty principle. *Prog Biophys Mol Biol* 1984;44:181–214.
94. Cui T, Wei S, Brew K, Leng F. Energetics of binding the mammalian high mobility group protein HMGA2 to poly(dA-dT)₂ and poly(dA)-poly(dT). *J Mol Biol* 2005;325:629–645.
95. Keeble AH, Kirkpatrick N, Shimizu S, Kleantous C. Calorimetric dissection of colicin DNase-immunity protein complex specificity. *Biochemistry* 2006;45:3243–3254.
96. Huang XL, Catignani GL, Foegeding EA, Swaisgood HE. Comparison of the gelation properties of β -lactoglobulin genetic variants A and B. *J Agric Food Chem* 1994;42:1064–1067.