

Efectos de la urea sobre agregados hidrofóbicos

Effect of urea over hydrophobic aggregates

C. Gastón Ferrara ^a *

^aUniversidad Nacional Arturo Jauretche - UNAJ, Argentina

^bInstituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos-IFLYSIB (CONICET-UNLP), 59 N° 789, CP 1900, Argentina

Recibido: 11/4/2014; revisado: 23/6/2014; aceptado: 27/6/2014

C. Gastón Ferrara: Efectos de la urea sobre agregados hidrofóbicos. *Jou.Cie.Ing.* **6** (1): 21-25, 2014. ISSN 2145-2628.

Resumen

A fines de contribuir al entendimiento del mecanismo por el cual se desnaturaliza una proteína en el presente trabajo analizamos mediante simulaciones computacionales la formación de agregados en una mezcla binaria de partículas no polares en agua y los cambios que se producen en los agregados y en la estructura del agua del sistema cuando le agregamos urea a la mezcla binaria. Los resultados nos muestran que la presencia de la urea produce una disminución en el tamaño promedio de los agregados de partículas no polares, lo cual dada la simpleza del sistema inicial solo puede interpretarse en términos de una disminución de la interacción hidrofóbica. De manera complementaria analizamos la función de distribución radial para el agua en cada uno de los sistemas observándose resultados compatibles con la idea de que la presencia de la urea contribuye a fortalecer la estructura del agua. Todos los sistemas fueron simulados utilizando Dinámica Molecular como técnica central, ajustando los baños de temperatura y presión a 300 K y 1 bar respectivamente.

Palabras Clave: Urea, partículas no polares, hidrofobicidad, agua.

Abstract

The mechanism by which the urea acts as a protein denaturant agent does not appear to be clearly elucidated. In order to contribute to the understanding of this mechanism, in this paper we analyzed by computer simulations of aggregate formation in binary mixtures of nonpolar particles in water and the changes that occur in the aggregates and the structure of water in the system when we added urea to the binary mixture. The results show that the presence of urea causes a decrease in the average size of the aggregates of nonpolar particles, which given the simplicity of the initial system can only be interpreted in terms of a decrease of the hydrophobic interaction. Complementarily, it is analyzed the radial distribution function for the water in each system, showing results consistent with the idea that the presence of urea strengthen the structure of water. All systems were simulated using Molecular Dynamics as a main technique, with coupling the bath temperature and pressure at 300 K and 1 bar respectively.

Keywords: Urea, non polar particles, hydrophobic, water.

* gferrara72@gmail.com

1. Introducción

El proceso por el cual se produce la desnaturalización de las proteínas no se halla completamente dilucidado. Por lo tanto, a fines de comprender mejor este mecanismo en los últimos años se ha estudiado de manera exhaustiva el rol que cumple la urea como agente desnaturalizante [1]. Se proponen dos tipos de mecanismos de desnaturalización, que son los que cuentan con la mayor cantidad de evidencia en su apoyo: el llamado mecanismo directo y el mecanismo indirecto. Ambos han sido discutidos ampliamente en la literatura [2–5]. El mecanismo directo sugiere que la urea desnaturaliza las proteínas a través de interacciones directas con varios segmentos de la cadena principal de la proteínas, promoviendo la transferencia de estos segmentos al disolvente acuoso. Por otra parte el mecanismo indirecto sugiere que la urea interrumpe la red de puentes de hidrógeno del agua y por lo tanto altera el disolvente acuoso de las proteínas, reduciendo el efecto hidrofóbico y logrando de esta manera exponer el núcleo hidrofóbico de la proteína a las moléculas de agua [6, 7]. La importancia del problema ha hecho que se produzcan un número considerable de análisis basados en metodologías teóricas o modelados computacionales de sistemas en donde se estudian los efectos de la urea sobre una solución acuosa con un soluto no polar. La presencia de la urea parece afectar [8] la formación de pares de solutos hidrofóbicos [9] y en determinadas concentraciones parece mejorar la formación de pares hidrofóbicos [10] aunque este tipo de análisis presenta la desventaja de que la información experimental para contrastar los resultados es escasa [11].

En el presente trabajo se analizó la influencia de la urea sobre la solubilidad de partículas simples no polares en agua, estudiando de esta manera a través de este sencillo modelo el comportamiento de la interacción hidrofóbica y los cambios producidos en esta por la presencia de urea.

2. Materiales y métodos

La totalidad de las simulaciones fueron realizadas utilizando la técnica de Dinámica Molecular (DM), en particular usamos para ello un software libre como es el paquete de GROMACS 4.5.5 [12], resolviendo en este caso las ecuaciones de movimiento con el algoritmo de leap-frog. Las restricciones topológicas de las moléculas de agua se resolvieron utilizando el algoritmo SETTLE [13] y las interacciones de largo alcance se calcularon utilizando Particle Mesh Ewald (PME) [12, 14].

Para todas las simulaciones se usó el campo de fuerzas ffgmx2 [12].

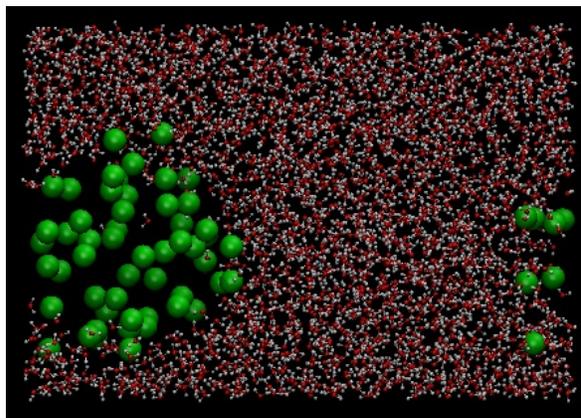


Fig.1a. Sistema BCV.

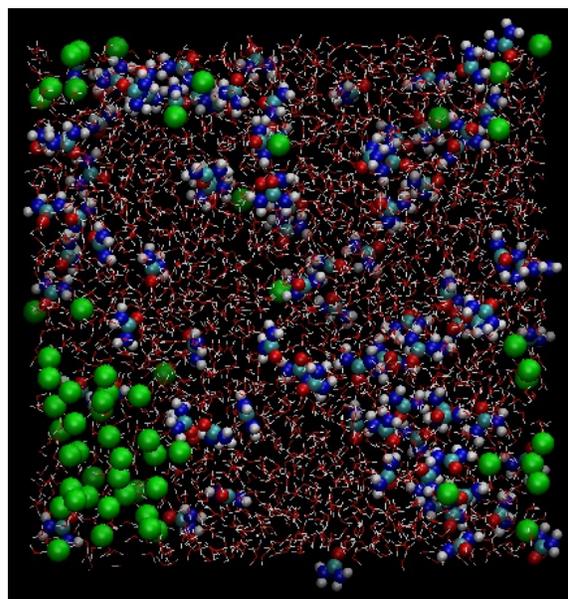


Fig.1b. Sistema BCVU.

El radio de corte para las interacciones de largo alcance utilizado fue de 0,9 nm. Todas las simulaciones se llevaron a cabo bajo condiciones de contorno periódicas y utilizando una semilla diferente para cada sistema al asignar las velocidades iniciales. Los sistemas fueron débilmente acoplados a un baño de temperatura y presión, eligiendo para realizar el acoplamiento térmico e hidrostático el algoritmo de Berendsen [15], trabajando de esta manera dentro de un ensamble NPT.

En una primer etapa se procedió a equilibrar cada sistema en las condiciones de acoplamiento de los baños

durante 3000 ps. Para todos los sistemas analizados la presión del baño se mantuvo a 1 bar, cambiando la temperatura del baño de acoplamiento térmico. El paso de integración utilizado fue 2 fs.

Como solvente explícito para todos los sistemas se utilizó el modelo de agua de tres puntos SPC/E [16] conformando una mezcla con partículas de Lennard-Jones (LJ). Estas partículas de carácter hidrofóbico, fueron definidas de manera tal que su radio fue de 0.42 nm y un mínimo de energía de 0.65017 kJ / mol. En el caso de la urea usamos el modelo HHL propuesto por Hager, Huler y Lifson [17]. Los tres sistemas utilizados para el análisis fueron:

Número de partículas	
Sistema	/Agua / LJ / Urea
BULK	/2744 / 0 / 0
BCV	/2665 / 60 / 0
BCVU	/2748 / 60/ 100

Tabla 1. Características de los sistemas simulados.

Para poder tener una mejor idea de los sistemas simulados presentamos en las figuras siguientes una imagen de los mismos.

Inicialmente los tres sistemas consistían en una caja cúbica de simulación, cuyos volúmenes fueron de $79,2 \text{ nm}^3$ para BULK, $88,53 \text{ nm}^3$ para BCV y $88,28 \text{ nm}^3$ para BCVU. Finalmente se continuaron las simulaciones a cada temperatura y presión durante 2000 ps más, usando los datos obtenidos en este periodo para el análisis.

2.1. Observables

En el presente trabajo se determinó el tamaño de los agregados de partículas hidrofóbicas a partir de un criterio de conectividad directa instantáneo, definiendo la conectividad directa [18] por parámetros de carácter puramente geométricos, llamado criterio de Stillinger [19] el cual se basa solamente en la distancia entre las dos partículas involucradas. Este criterio considera que dos partículas están directamente conectadas si su separación es menor que una cierta distancia crítica, la cual se elige de acuerdo a la problemática planteada. En nuestro caso elegimos como criterio de conectividad, es decir que dos partículas se hallan conectadas si la distancia entre sus centros es menor o igual que una vez y media su diámetro ($1,5 \sigma$). La clasificación e identificación

de las partículas que componen los agregados una vez definido el criterio de conectividad se realizó utilizando el algoritmo de Stoodard [20]. Para definir el tamaño (en cantidad de partículas) de un clúster finito podemos primero definir la probabilidad de encontrar un clúster compuesto de s partículas de la siguiente manera:

$$w_s = \frac{n(s)s}{N}$$

donde $n(s)$ es el número de agregados consistentes de s partículas (frecuencia) y N el número total de partículas. El cociente $\frac{n(s)}{N}$ en este caso lo podemos pensar como una frecuencia relativa. Así definida la probabilidad w_s cumple la condición de normalización, es decir:

$$\sum_{s=1}^N w_s = 1$$

De esta manera, el tamaño promedio del clúster [21] lo podemos definir como:

$$S = \sum_{s=1}^N s^2 n(s) / \sum_{s=1}^N s n(s)$$

La determinación y medida de los tamaños promedio de los agregados, a partir de la implementación de todos los criterios descriptos previamente se hizo a partir de programas de propia autoría.

3. Resultados y discusión

En una primer etapa del trabajo comenzamos analizando la dependencia de la solubilidad de las partículas no polares (sistema BCV) en agua a diferentes temperaturas, manteniendo en todos los casos la presión a 1 bar. Se observa en la figura 2 que a bajas temperaturas y en estas condiciones de presión el sistema no logra conformar grandes agregados, pero a partir de los 300 K aumenta sustancialmente el tamaño de los agregados, observándose que el sistema alcanza el límite de solubilidad y después de ese punto el tamaño medio de los agregados involucra alrededor del 80 % del número total de partículas de soluto.

Esta agregación se desintegra a temperaturas más altas para las cuales se recupera la solubilidad de la mezcla, levemente por encima de los 450 K. Esto es consistente con la idea del aumento de movimiento térmico y la disminución de la contribución entrópica a la asociación producida por la pérdida de estructuración del agua. El origen de este peculiar comportamiento clara-

mente esta asociado a una fuerte presencia de la interacción hidrofóbica, mostrando que se produce un aumento en su magnitud al aumentar la temperatura [22] en un cierto rango de temperaturas, comportamiento que se contrapone en su dependencia a lo que ocurre con los otros tipos de interacciones. Esta característica se reproduce correctamente para la presente simulación coincidiendo cuantitativamente con los resultados experimentales [23].

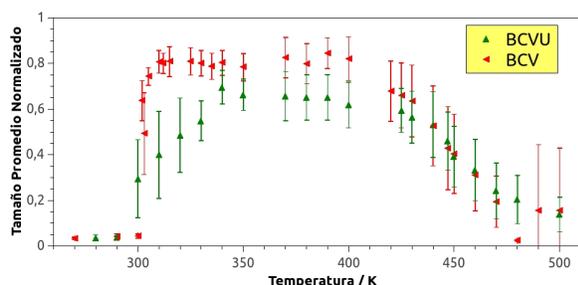


Fig. 2. Tamaño promedio de los agregados en función de la temperatura.

El análisis del segundo sistema (BCVU) nos muestra que la presencia de urea modifica el tamaño de los agregados no polares, conformándose agregados que involucran menos del 70 % del número total de partículas no polares. La presencia de urea, aunque sea a bajas concentraciones como es en este caso, parece producir un debilitamiento en la interacción hidrofóbica. Esto podría explicarse pensando en que se producen puentes de hidrógeno entre el agua y la urea, los cuales son significativamente más débiles que los producidos en las moléculas de agua, pero logran producir o impulsar una situación de agregación de la urea debido a la interacción hidrofóbica.

Si observamos la figura 3, en donde analizamos la función de distribución radial para el agua en los tres sistemas y a una temperatura de 300 K, se nota un pequeño aumento en el pico correspondiente a primeros vecinos. Si comparamos el sistema BCVU con el sistema BCV, claramente para ambos sistemas estos picos son mayores que el correspondiente al del agua bulk. Este comportamiento parece ser consistente con la idea de que la presencia de urea en determinadas concentraciones logra ordenar el agua del entorno a partir de la formación de puentes de hidrógeno, aunque sean de un carácter más débil.

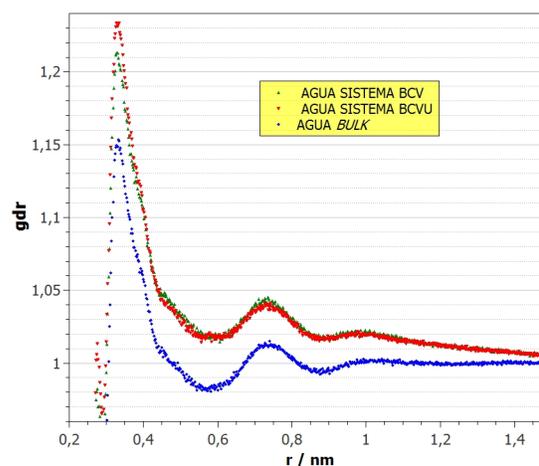


Fig. 3. Función de distribución radial para el agua en los tres sistemas.

4. Conclusiones

Podemos concluir que las simulaciones por dinámica molecular describen adecuadamente el comportamiento experimental de las soluciones acuosas de partículas hidrofóbicas y los cambios que se producen cuando le agregamos urea en determinadas concentraciones [24]. Los sistemas elegidos son de gran sencillez en el aspecto computacional y de modelización lo cual nos permite lograr una mejor interpretación de los fenómenos ocurridos y nos evita de esta manera los problemas que implicaría trabajar con simulaciones de sistemas más complejos, tales como son las proteínas, en donde hay otros tipos de interacciones y restricciones. Estos modelos sencillos nos sirven para aclarar cuáles son las interacciones responsables de los resultados observados.

Se observó que como consecuencia de la presencia de urea en la mezcla binaria, se produce una disminución en la solubilidad de las partículas no polares, formándose agregados de menor tamaño, lo cual es un claro indicador de que la presencia de la urea produce una disminución de la interacción hidrofóbica. El análisis realizado a partir de la función de distribución radial del agua en todos los sistemas parece indicar que la presencia de la urea fortalece débilmente la estructura del agua, al menos para primeros vecinos, a costa de un debilitamiento de la interacción hidrofóbica. Sería interesante en trabajos futuros poder comparar el comportamiento de la formación de agregados para un amplio rango de concentraciones de urea y analizar como cambia el área expuesta al solvente en los agregados no polares conformados.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Ariel Meyra y al Dr. Raul Grigera por sus constantes aportes y comentarios en nuestras discusiones científicas

Referencias

- [1] M. Chaplin. Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nature Reviews*, 7:861, 2006.
- [2] D.R. Canchi, D. Paschek, and A.E. Garcia. Equilibrium study of protein denaturation by urea. *J. Am. Chem. Soc.*, 132:2338, 2009.
- [3] Maeng-Eun Lee and Nico FA van der Vegt. Does urea denature hydrophobic interactions? *Journal of the American Chemical Society*, 128:4948–4949, 2006.
- [4] Ronen Zangi, Ruhong Zhou, and BJ Berne. Urea’s action on hydrophobic interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 131:1535–1541, 2009.
- [5] Peng Xiu, Zaixing Yang, Bo Zhou, Payel Das, Haiping Fang, and Ruhong Zhou. Urea-induced drying of hydrophobic nanotubes: comparison of different urea models. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115:2988–2994, 2011.
- [6] Tanner A Shpiruk and Mazdak Khajehpour. The effect of urea on aqueous hydrophobic contact-pair interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15:213–222, 2013.
- [7] Martin C Stumpe and Helmut Grubmüller. Aqueous urea solutions: structure, energetics, and urea aggregation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111:6220–6228, 2007.
- [8] Seishi Shimizu. The effect of urea on hydrophobic hydration: preferential interaction and the enthalpy of transfer. *Chemical Physics Letters*, 517:76–79, 2011.
- [9] Seishi Shimizu and Hue Sun Chan. Origins of Protein Denatured State Compactness and Hydrophobic Clustering in Aqueous Urea: Inferences from Nonpolar Potentials of Mean Force. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 49:560–566, 2002.
- [10] Mitsunori Ikeguchi, Shugo Nakamura, and Kentaro Shimizu. Molecular dynamics study on hydrophobic effects in aqueous urea solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 123:677–682, 2001.
- [11] Ileana M Pazos and Feng Gai. Solute’s perspective on how trimethylamine oxide, urea, and guanidine hydrochloride affect water’s hydrogen bonding ability. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116:12473–12478, 2012.
- [12] David Van Der Spoel, Erik Lindahl, Berk Hess, Gerrit Groenhof, Alan E Mark, and Herman JC Berendsen. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, 26:1701–1718, 2005.
- [13] Shuichi Miyamoto and Peter A. Kollman. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of computational chemistry*, 13:952–962, 1992.
- [14] Darrin M York, Tom A Darden, and Lee G Pedersen. The effect of long-range electrostatic interactions in simulations of macromolecular crystals: A comparison of the Ewald and truncated list methods. *The Journal of chemical physics*, 99:8345–8348, 1993.
- [15] Herman JC Berendsen, J Pl M Postma, Wilfred F van Gunsteren, ARHJ DiNola, and JR Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of chemical physics*, 81:3684–3690, 1984.
- [16] HJC Berendsen, JR Grigera, and TP Straatsma. The missing term in effective pair potentials. *Journal of Physical Chemistry*, 91:6269–6271, 1987.
- [17] AT Hagler, E Huler, and S Lifson. Energy functions for peptides and proteins. I. Derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystals. *Journal of the American Chemical Society*, 96:5319–5327, 1974.
- [18] Terrell L Hill. Molecular clusters in imperfect gases. *The Journal of Chemical Physics*, 23:617–622, 1955.
- [19] Frank H Stillinger Jr. Rigorous Basis of the Frenkel-Band Theory of Association Equilibrium. *The Journal of Chemical Physics*, 38:1486–1494, 1963.
- [20] Spotswood D Stoddard. Identifying clusters in computer experiments on systems of particles. *Journal of Computational Physics*, 27:291–293, 1978.
- [21] Dietrich Stauffer and Amnon Aharony. *Introduction to percolation theory*. CRC press, 1994.
- [22] Gastón Ferrara, Andrés N McCarthy, and J Raúl Grigera. Clustering of Lennard-Jones particles in water: temperature and pressure effects. *The Journal of chemical physics*, 127:104502, 2007.
- [23] Aleksandër Dhima, Jean-Charles de Hemptinne, and Gérard Moracchini. Solubility of light hydrocarbons and their mixtures in pure water under high pressure. *Fluid Phase Equilibria*, 145:129–150, 1998.
- [24] C Gastón Ferrara, Osvaldo Chara, and J Raúl Grigera. Aggregation of non-polar solutes in water at different pressures and temperatures: The role of hydrophobic interaction. *The Journal of chemical physics*, 137:135104, 2012.