



Determinación de las interacciones no-covalentes del complejo base libre de tetrasulfoftalocianina-Lisozima

Vicente Escobar Jonathan Osiris, García Sánchez Miguel Ángel, Serratos Álvarez Iris Natzielly, Tello Solís Salvador Ramón*

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química. Avenida San Rafael Atlixco No. 186. Colonia Vicentina, C.P. 09340. Ciudad de México. México

*Autor para correspondencia: srts@xanum.uam.mx

Recibido:

19/mayo/2016

Aceptado:

3/agosto/2016

Palabras clave

Lisozima,
tetrasulfoftalocianina,
interacción no covalente

Keywords

Lysozyme,
tetrasulphophthalocyanine,
non-covalent interaction

RESUMEN

El estudio de las interacciones no-covalentes de proteínas con macromoléculas es de gran importancia, para el conocimiento y análisis, por ejemplo, de cómo las enzimas se unen a un sustrato. En este trabajo, se determinó fluorométricamente el tipo de interacciones no-covalentes presentes en el complejo de la base libre de tetrasulfoftalocianina con Lisozima. La base libre de tetrasulfoftalocianina se sintetizó y caracterizó por UV-vis, observándose la formación de un monómero. Se propone una estequiometría de asociación de la base libre de tetrasulfoftalocianina-Lisozima 1:1. A partir de este modelo se calculó la constante de unión y el cambio en la energía libre de Gibbs de unión (ΔG_u) a 25, 35 y 42.5 °C, además, se determinaron los parámetros termodinámicos ΔH_u y ΔS_u a partir de estos resultados, se establece que las principales interacciones no-covalentes en la asociación, son debidas a puentes de Hidrógeno.

ABSTRACT

The study of non-covalent interactions between proteins and macromolecules is of major importance for the understanding and analysis, for example, as enzymes are bind to a substrate. In this work, we determined the thermodynamic parameters of the binding process (K_u , ΔG_u , ΔH_u , and ΔS_u) of the interactions present in the complex free-base tetrasulphophthalocyanine-Lysozyme, using fluorimetric titrations at different temperatures (25, 35 and 42.5 °C). The values of ΔH_u and ΔS_u obtained implies that non-covalent interactions present in the complex tetrasulphophthalocyanine-Lysozyme are mainly electrostatic contacts and Hydrogen bonds.

Introducción

El estudio de las interacciones no-covalentes de proteínas con macromoléculas es de gran importancia, para el conocimiento y análisis, por ejemplo, de cómo las enzimas se unen a un sustrato o a un inhibidor o como proteínas transportadoras, tales como, la hemoglobina o las proteínas de almacenamiento como la mioglobina, se unen al Oxígeno (Olsson et al., 2008). Así mismo, muchas proteínas que actúan como reguladores lo hacen uniéndose a iones hidronio (H_3O^+). De hecho, la mayoría de las funciones biológicas involucran la interacción de pequeñas moléculas, que fungen como metabolitos, reguladores y sitios de señalamiento para llevar a cabo una diversidad de procesos celulares. Uno de los aspectos clave de tales interacciones es la relación entre estructura molecular y la termodinámica de la unión (Homans, 2007).

La termodinámica química nos permite predecir la dirección espontánea de una reacción química, y determinar las fuerzas involucradas que gobiernan dicha interacción. Generalmente, las moléculas pequeñas se unen a macromoléculas a través de cuatro modos de unión: enlaces puente de Hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Murphy, 1999).

La afinidad entre especies es cuantificada a través de la constante de unión K_u (Freire, 2008), la cual refleja los efectos de las interacciones no-covalentes entre proteína-ligando y puede describirse mediante la siguiente ecuación: $P + L \rightleftharpoons PL$

$$K_u = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad [1]$$

Donde $[P]$ es la concentración molar de proteína en el equilibrio, $[L]$ es la concentración molar de ligando en el equilibrio, $[PL]$ es la concentración molar del complejo en el equilibrio y K_u la constante de unión a la temperatura T . La afinidad también puede ser cuantificada a través de la energía libre de unión, ΔG_u , la cual está relacionada con la constante de unión a través de la relación:

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u = \Delta H_u - T\Delta S_u \quad [2]$$

Donde ΔG_u es la energía libre de Gibbs de unión, R la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, ΔH_u es el cambio de entalpía de unión y ΔS_u es el cambio de entropía de unión. Una energía libre de unión negativa indica una interacción favorable entre el ligando y la proteína, sin embargo, depende de dos condiciones ambientales tales como la temperatura y el pH. ΔG_u es la suma de dos términos diferentes, uno entálpico, ΔH_u y uno entrópico, ΔS_u , los cuales dan

información sobre la naturaleza de las interacciones involucradas, y por lo tanto, para lograr una alta afinidad es necesario que ambos términos contribuyan de manera favorable a la energética de unión (Freire, 2008; Horn et al., 2002). La entalpía está relacionada a la naturaleza de las interacciones no covalentes; como Interacciones de van der Waals, interacciones de origen electrostático y puentes de Hidrógeno, la entropía de unión es dependiente en primera instancia del efecto hidrofóbico e inherente a interacciones segregativas, por ejemplo, cambios en la configuración y la solvatación de grupos hidrofílicos/lipofílicos hacia la formación de complejos (Olsson et al., 2008). Estas interacciones contribuyen de manera diferente al ΔH_u y ΔS_u es decir, poseen diferentes "firmas termodinámicas" (Freire, 2008; Horn, 2002).

Ross y Subramanian (1981), han resumido la natura 2.- $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, corresponde a contactos de van der Waals, formación de puentes de Hidrógeno

3.- $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$, corresponde a interacciones iónicas/electrostáticas.

Para confirmar cual es la naturaleza de las interacciones o fuerzas que actúan, se determinan los valores del cambio de entalpía ΔH_u y el cambio de entropía ΔS_u de reacción. El ΔH_u puede ser calculado de dos maneras; directamente usando calorimetría de titulación isotérmica o indirectamente midiendo la dependencia de la temperatura sobre la constante de unión (Samari et al., 2012) trabajando dentro de un intervalo de temperaturas en el que no se degraden las proteínas, mediante la ecuación de van't Hoff:

$$\ln K_u = -\frac{\Delta H_u}{RT} + \frac{\Delta S_u}{R} \quad [3]$$

En donde K_u es la constante de unión a la temperatura T , y R es la constante universal de los gases. Los valores de ΔH_u y ΔS_u se calculan a partir de la pendiente y la ordenada al origen de la representación gráfica del $\ln K_u$ frente a $1/T$, respectivamente, con lo que podemos obtener el ΔG_u , por medio de la ecuación [2].

Por otro lado, las ftalocianinas (Pcs) son ligantes aromáticos tetradentados de estructura plana con 18 electrones π deslocalizados, en el que existen tres tipos de átomos de Nitrógeno; los Nitrógenos pirrólicos (N_1), los Nitrógenos aza centrales (N_2) y los Nitrógenos aza puente (N_3), siendo los Nitrógenos centrales y los externos, energéticamente muy diferentes en la base libre de ftalocianinas, pero muy similares en las metalofalocianina (García-Sánchez et al., 2003). Recientemente, se han propuesto como bloques de construcción molecular para su arreglo en materiales moleculares y aparatos nanotecnológicos (García et al., 2003). La estructura de las ftalocianinas es similar a las

de las porfirinas y compuestos naturales de la misma familia, pero su mayor absorción en la zona del espectro visible ocurre alrededor de los 680 nm, que es casi el doble de la longitud de onda a la que las porfirinas presentan su absorción principal en dicha región. Esta característica permite proponer a la Pcs como modelos en sustitución de la porfirinas en la terapia fotodinámica (García et al., 2003).

La Lisozima de huevo de gallina es una enzima compuesta de una sola cadena de 129 residuos de aminoácidos, entrecruzada por cuatro puentes disulfuro (van der Berg et al., 1999) y formando dos dominios o lóbulos: el dominio α con los residuos (1-40 y 90-129) y el dominio β (41-89), unidos por una larga α -hélice donde se encuentra el sitio activo (en este sitio se encuentran dos aminoácidos que son necesarios para que ocurra la catálisis que son (Glu 35 y Asp 52) (Matthyssens et al., 1974; Davies et al., 1969).

La Lisozima al ser una enzima pequeña y estable se ha usado como modelo de investigación, sobre la estructura y función de las proteínas. La Lisozima tiene muchas funciones fisiológicas, por ejemplo, la de transporte de moléculas, cuya efectividad depende de la unión enzimática (Li y Li, 2011). Entre los diversos estudios se encuentran un gran número de reportes que describen la unión de la Lisozima a lípidos (Gorbenko et al., 2007), también se han reportado estudios sobre la acción antiviral contra ciertos virus, como un potencial antibiótico, en estudios de actividad antiinflamatoria y como antihistamínico, en activación directa de células inmunes y acción antitumoral. Sin embargo, hoy en día es muy poca la información que hay sobre la interacción de la Lisozima con ftalocianinas o porfirinas.

En este trabajo se estudió la interacción y formación de un complejo entre Lisozima y una base libre de tetrasulftalocianina, a través de la caracterización energética de dicha unión a diferentes temperaturas. Por espectroscopia de emisión de fluorescencia, se determinó la constante de equilibrio de unión del complejo, K_u , y se obtuvieron los parámetros termodinámicos de la asociación o unión: ΔG_u , ΔH_u y ΔS_u . Se estableció que la interacción base libre de tatrafeniltalocianina-Lisozima cumple con una estequiometría 1:1 y que las interacciones no-covalentes principales en la asociación son puentes de Hidrógeno.

Metodología

Base libre de tetrasulftalocianina, H₂TSPc

La síntesis, purificación y caracterización de H₂TSPc, se llevó a cabo por el método reportado por García (1993).

La H₂TSPc fue disuelta en un amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.

Lisozima

La Lisozima de huevo de gallina se obtuvo de Sigma-Aldrich Sigma (E.C.3.2.1.17) y se disolvió en amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7. Se utilizó agua desionizada.

UV-visible

Los espectros UV-vis de la Lisozima o de la H₂TSPc se obtuvieron en un espectrofotómetro HP modelo 8453, equipado con un sistema de temperatura tipo Peltier. La celda empleada fue de 1 cm de recorrido óptico.

La concentración de Lisozima se determinó espectrofotométricamente usando $E^{(280\text{nm}, 1\%)} 26.4$ (Tello, 2008).

Fluorescencia

Los experimentos de titulación fluorométrica se realizaron en un espectrofluorómetro K2 de ISS (Champaign, IL, USA), equipado con un sistema Peltier para el control de la temperatura. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 280 nm y se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia correspondiente en el intervalo de 290 a 650 nm. La determinación de la constante de asociación o unión se llevó a cabo titulando 3 mL de una disolución de Lisozima de concentración 5.983×10^{-6} M, con volúmenes de 5 a 175 μL de una disolución madre 1.7747×10^{-4} M de H₂TSPc. El proceso se estudió a 25, 35 y 42.5 °C.

Resultados y discusión

Base libre de tetrasulftalocianina

En la figura 1, se presenta el espectro UV-visible de la H₂TSPc, en regulador de fosfatos 5 mM, pH 7 a 25 °C. Se observa la banda de Soret a 345 nm y una banda Q a 697 nm, características espectrales de un ciclo tetrapirrólico presente en forma monomérica (García, 1993).

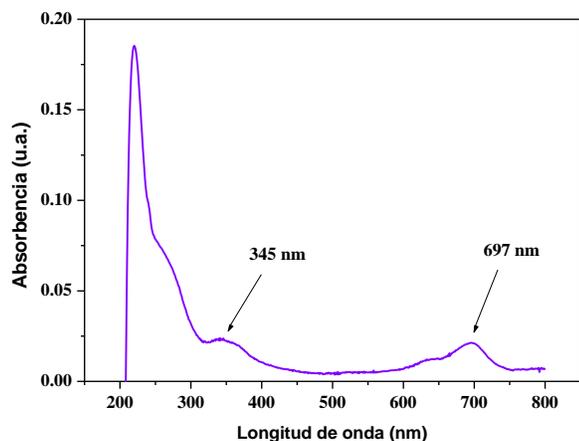


Figura 1. Espectro UV-vis de la H₂TSPc, en regulador de fosfatos 5 mM pH 7 a 25 °C.

Estudio de la asociación no-covalente de H₂TSPc-Lisozima por apagamiento de fluorescencia

La técnica de apagamiento de fluorescencia, se utilizó para investigar el mecanismo de asociación no-covalente de la H₂TSPc a la Lisozima, determinando el modo de unión a través de la constante de asociación o unión, K_u , y los parámetros termodinámicos ΔG_u , ΔH_u , ΔS_u . Los cambios de emisión del triptófano son comunes en respuesta a transiciones conformacionales, la unión al sustrato o cuando ocurre la desnaturalización de la proteína. La longitud de onda de excitación de 280 nm, permite observar la emisión de los residuos de triptófano, así como, de la tirosina presente en las proteínas (Sanei et al., 2011). Dado que para esta proteína la interferencia de la emisión de fluorescencia por parte de la tirosina y/o la transferencia de energía de la tirosina al triptófano es mínima (Nishimoto y Yamasita, 1999), el seguimiento del apagamiento debido a la interacción Lisozima-macrocielo tetrapirrólico, se llevó a cabo a una longitud de onda de excitación de 280 nm. En tales espectros se observó que la Lisozima libre presentó un máximo de emisión a los 327 nm, que se debe principalmente a la emisión de los residuos de triptófano 62 y 108, además se observó otro máximo a 550 nm.

En la figura 2, se presentan los espectros de fluorescencia, con $\lambda_{exc} = 280$ nm y 25 °C, para la titulación de la disolución de Lisozima con volúmenes crecientes de la disolución de H₂TSPc. Las principales características espectrales son un máximo a 327 nm y otro a 553 nm, con un punto isobéptico a 435 nm. Por el seguimiento de la intensidad de fluorescencia de la banda a los 327 nm, se comprobó que existe una disminución o apagamiento intrínseco de la fluorescencia de la Lisozima, al titularla

con cantidades crecientes de H₂TSPc, lo cual se debe a la interacción entre la proteína y la base libre de la ftalocianina. Además, se realizaron experimentos 35 y 42.5 °C, observándose un comportamiento equivalente al de 25 °C.

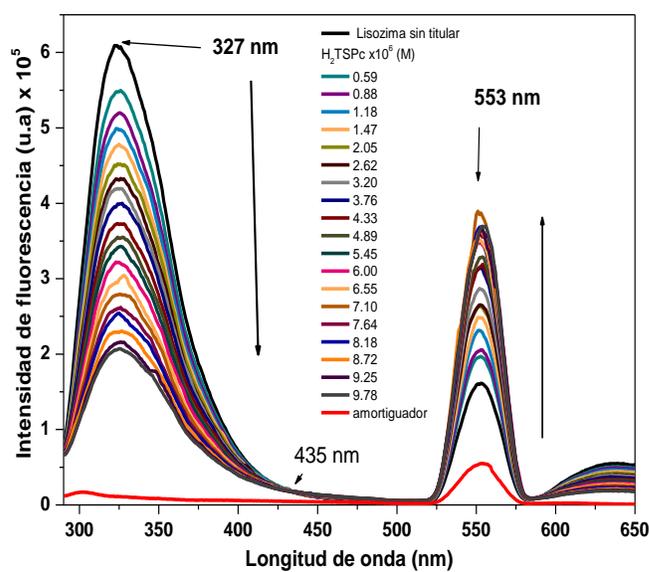


Figura 2. Titulación fluorométrica para el sistema H₂TSPc-Lisozima a 25°C. $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Constante de asociación, K_u , H₂TSPc-Lisozima. Modelo de ajuste para un sitio de unión independiente

Los datos obtenidos por apagamiento de fluorescencia a cada temperatura, fueron analizados con un modelo para un sitio de unión independiente reportado por Neria et al. (2003), en el cual se utiliza la siguiente ecuación, para obtener la constante de asociación:

$$y = \left(\frac{a}{2c}\right) [c + x + b] - \sqrt{(c + x + b)^2 - 4cx} \quad [4]$$

Dónde: $y = 1 - (F_0 / F)$, F_0 es la intensidad de fluorescencia de la Lisozima en ausencia de ligando y F la intensidad de fluorescencia de la enzima en presencia del ligando, H₂TSPc, a una concentración dada; a es el valor asintótico al cual tiende y a altos valores de x , también llamada fracción de saturación; b es la constante de disociación del sistema base libre de tetrasulfoftalocianina-Lisozima ($b = 1 / K_u$); c es la concentración total de Lisozima o concentración total de los sitios de unión; y x es la concentración total de H₂TSPc. El análisis de los datos

experimentales, mediante una regresión no lineal, se realizó utilizando la ecuación [4], para el ajuste correspondiente se empleó el programa *Origin 8.0* (MicroCal Inc. Northampton, MA, USA), lo que permitió determinar el valor de b y a simultáneamente (Neria et al., 2003). En la figura 3, se presenta el comportamiento observado a cada temperatura.

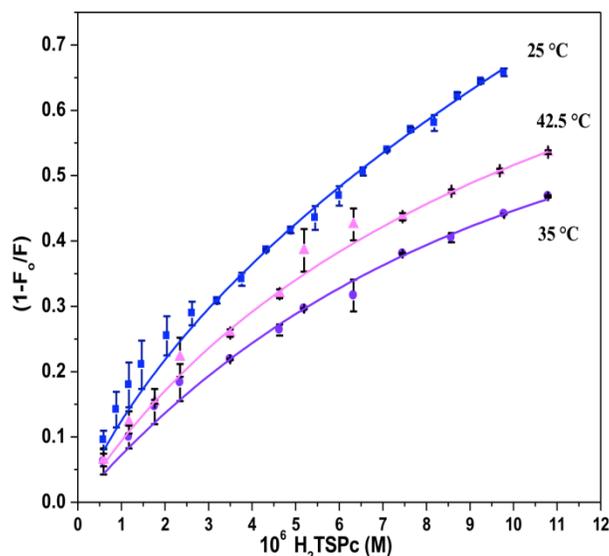
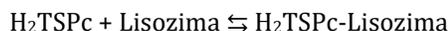


Figura 3. Curvas de titulación fluorométrica para el sistema H₂TSPc-Lisozima, a diferentes temperaturas. Longitud de onda de excitación 280 nm y de emisión 327 nm.

Se encontró que los datos experimentales se ajustaron consistentemente al comportamiento descrito por la ecuación (4), con valores de R^2 mayores a 0.9920 (Tabla 1), lo que permite establecer que el proceso de asociación sigue el modelo:



En la figura 4, se presenta el diagrama de van't Hoff (ecuación [3]), para el proceso de asociación H₂TSPc-Lisozima. A partir de la pendiente se obtiene el valor de ΔH_u y de la ordenada al origen el valor de ΔS_u . En la tabla 1, se presentan la constante de unión y los parámetros termodinámicos de unión para la formación del complejo H₂TSPc-Lisozima.

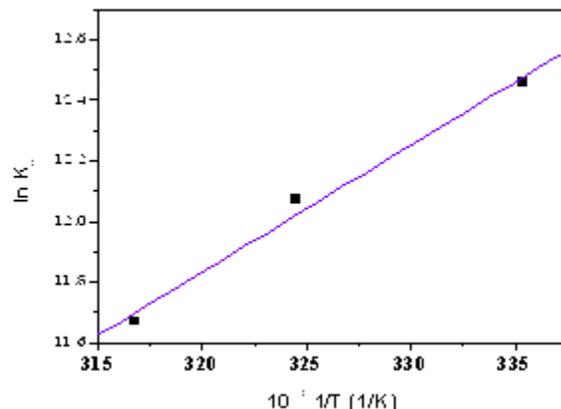


Figura 4. Diagrama de van't Hoff para la asociación H₂TSPc-Lisozima.

Tabla 1. Constante de unión y parámetros termodinámicos de unión, para la formación del complejo H₂TSPc-Lisozima.

T (°C)	$K_u \cdot 10^{-5}$ (mol L ⁻¹)	* ΔG_u (kJ/mol)	R^2	ΔH_u (kJ/mol)	ΔS_u (J/molK)
25	2.57	-30.9	0.9987	-34.8	-12.9
35	1.75	-30.9	0.9927		
42.5	1.17	-30.6	0.9997		

$$*\Delta G_u = -RT \ln K_u$$

En trabajos previos (Escobar et al., 2015; Escobar, 2016), estudiamos *in silico* el acoplamiento molecular de la base libre de tetrasulfoftalocianona con la Lisozima, utilizando el programa *Auto Dock Vina*. Los estudios se realizaron con la estructura cristalográfica de la Lisozima (*ID PDB 2LYZ*) y la estructura monomérica de la H₂TSPc, las cuales se construyeron a partir de una plantilla optimizada en *GaussView 5.0*. A los veinte mejores conformeros se les realizaron cálculos electrostáticos a través de la contribución electrostática/polar y electrostática/no-polar, para establecer el sitio de unión energéticamente más favorable a través de la energía libre de Gibbs de unión computacional, ΔG_{uc} . Los resultados (datos no mostrados) *in silico* obtenidos mostraron una estequiometría de unión 1:1 y que las interacciones de tipo electrostático que gobiernan la interacción entre la H₂TSPc y Lisozima son similares a los obtenidos por el estudio de titulación fluorométrica reportado en este trabajo. Con estos cálculos se demostró que el sitio de unión está favorecido y que se establece por medio de puentes de Hidrógeno, con los residuos Trp 62, 63, Asn 49 de la Lisozima y además, que existe una

interacción carga-carga con Arg 61, con los átomos de oxígeno del grupo sulfo de la sulfoftalocianina (Figura 5).

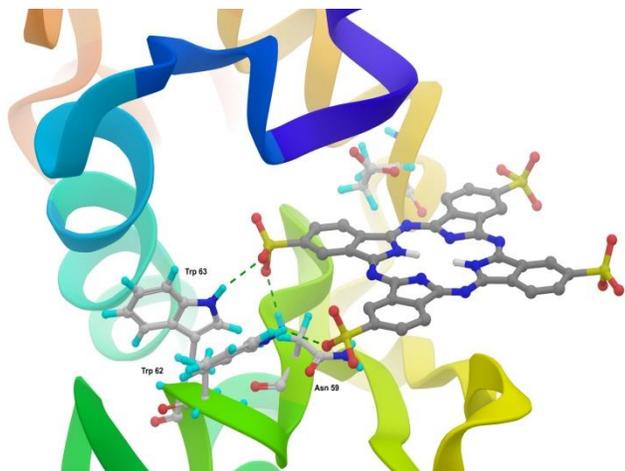


Figura 5. Formación del complejo H₂TSPc-Lisozima. $\Delta G_{uc} = -314.45$ kJ/mol (Escobar, 2016).

Conclusiones

Los estudios fluorométricos de la asociación H₂TSPc-Lisozima, demuestran que se cumple con un modelo de interacción 1:1. Además, los valores de los parámetros termodinámicos para la unión de H₂TSPc y Lisozima obtenidos: $\Delta G_u < 0$, indica que la asociación es favorable y que $\Delta H < 0$ y $\Delta S < 0$, implican que las interacciones no-covalentes involucradas en el complejo H₂TSPc-Lisozima, se deben principalmente a contactos electrostáticos de van der Waals, y puentes de Hidrógeno.

Agradecimientos

J. Osiris Vicente E. al CONACyT, por la beca para estudios de Maestría en Química, número de registro 130442. S.R. Tello Solís al Cuerpo Académico de Biofísicoquímica.

Referencias

Davies R. C., Neuberger A., Wilson G. M. (1969). The Dependence of Lysozyme activity on pH and ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta*, 178: 294-503.

Escobar V. J.O., García S.M. A., Serratos A. I. N., Millán P. C., Tello S.S.R. (2015). Estudio computacional del acoplamiento molecular Lisozima-tetrasulfoftalocianinas. Memorias 4^{to} Coloquio de Diseño y Textura de Nanoestructuras. 159-161.

Escobar V.J.O. (2016). Estudio de la Interacción Lisozima-sulfoftalocianinas. Tesis de Maestría en Química.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Freire E. (2008). Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? *Drug Discov. Today*, 13: 869-874.

García S.M.A (1993). Síntesis y Caracterización de Complejos Macro-cíclicos Mixtos Lantanoideos. Tesis de Maestría en Química. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

García S.M.A., Rojas G.F., Menchaca C.E.C., Tello S.S.R., Quiroz S.R. I. Y., Díaz A.L.A., Sala B.E., Campero A. (2013). Crossed and linked histories of tetrapyrrolic macrocycles and their use for engineering pores within sol-gel matrices. *Molecules*, 18: 588-653.

Orbenko G. P., Valeriya M. Ioffe M. V., Kinnunen P. K. J. (2007). Binding of Lysozyme to phospholipid bilayers: evidence for protein aggregation upon membrane association. *Biophys. J.*, 93: 140-153.

Homans S. W. (2007). Dynamics and thermodynamics of ligand-protein interactions. *Top. Curr. Chem.* 272: 51-82.

Horn J. R., Brandts J. F., Murphy K. P. (2002). van't Hoff and calorimetric enthalpies II: effects of linked equilibria. *Biochemistry*, 41: 7501-7507.

Li S., Li D. (2011). Investigation on the pH-dependent binding of benzocaine and Lysozyme by fluorescence and absorbance. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 82: 396-405.

Matthysens G. E., Giebens O., and Kanarek L. (1974). Structure and antigenicity of hen egg-white Lysozyme fragments study of region 57-107. *Eur. J. Biochem.*, 43: 353-362.

Murphy K. P. (1999). Predicting binding energetics from structure: looking beyond DG8. John Wiley Sons, Inc., p. 333-339.

Nishimoto E., Yamasita S. (1999). Resolution and characterization of tryptophyl of fluorescence of hen egg-white with Lysozyme by quenching and time resolved spectroscopy. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2: 329-336.

Neria R.M., Padilla Z.J., García H.E., Tello S.S.R., Zubillaga R.A. (2003). Binding energetics of the inhibitor cystatin to the cysteine proteinase actinidin. *PPL*, 10: 139-145.

Olsson T., Williams M.A., Pitt W. R. (2008). The thermodynamics of protein-ligand interaction and



solvation: insights for ligand design. *J. Mol. Biol.* 384: 1002-1017.

Ross P. D., Subramanian S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20: 3096-3102.

Samari F., Hemmateenejad B., Shamsipur M., Rashidi M., Samouei H. (2012). Affinity of two novel five-coordinated anticancer Pt(II) complexes to human and bovine serum albumins: a spectroscopic approach., *Inorg. Chem*, 51: 3454-3464.

Sanei H., Asoodeh A., Hamedakbari-Tusi S., Chamani J. (2011). Multi-spectroscopic investigations of aspirin and colchicine interactions with human hemoglobin: binary and ternary systems. *J. Solution Chemistry*, 40: 1905-1931.

Tello S.S.R. (2008). Thermal unfolding of lysozyme studied by uv difference spectroscopy. *The Chemical Educator*, 13: 16-18.

van der Berg B., Chong E. W., Robinson C. V., Mateo P. L., Christopher Dobson C. (1999). Oxidative refolding of hen Lysozyme and Its catalysis by protein disulfide isomerase. *J. Europ. Mol. Biol. Organ.*, 18: 4794-4803.