# La Física de la desnaturalización de proteínas en frío (o como cocinar un huevo a temperatura ambiente)

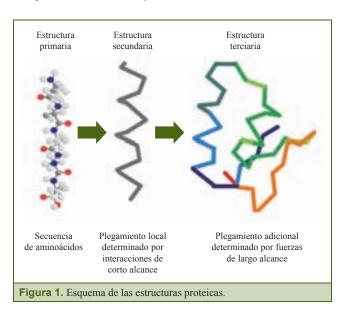
### J. Raúl Grigera

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

### 1. Introducción

En 1914 Bridgman [1] describió una experiencia en la cual un huevo sometido a 12 kbar (1 bar = 0,1 MPa) a temperatura ambiente, luego de la descompresión mostraba un aspecto similar a la cocción. La clara del huevo –cuya composición es esencialmente albúmina— se había tornado blanca y con una consistencia de gelatina espesa, se había desnaturalizado en forma similar a un tratamiento térmico

La albúmina es una de las muchas proteínas que se conocen pero ¿qué son las proteínas desde el punto de vista de su composición, estructura y función?



Brevemente, las proteínas están formadas por una o más cadenas, de variadas longitudes, de aminoácidos que pueden contener asimismo algunos grupos denominados *proestéticos*. Existen 20 aminoácidos en la naturaleza y, dado que podemos contar con muy diferente número de componentes en una proteína, vemos que puede existir una infinita variedad de ellas. Se considera que una proteína debe tener al menos 20 unidades de aminoácidos, si posee menos se los denomina *polipéptidos*.

La cadena de aminoácidos (o cadena peptídica) fluctúa alrededor de una conformación determinada. Esta conformación posee diferentes grados de orden a saber: la estructura primaria determinada por la disposición de los aminoácidos en forma consecutiva; estructura secundaria, dada por el plegamiento de esas estructuras en el espacio, pudiendo ser de hélice  $\alpha$ , hoja  $\beta$  plegada y otras; la estructura terciaria, dada, a su vez, por plegamientos de la estructura anterior sobre sí misma; la estructura cuaternaria, generada cuando las moléculas plegadas en todas las tres estructuras mencionadas se juntan entre sí. Se muestran ejemplos en la Fig. 1.

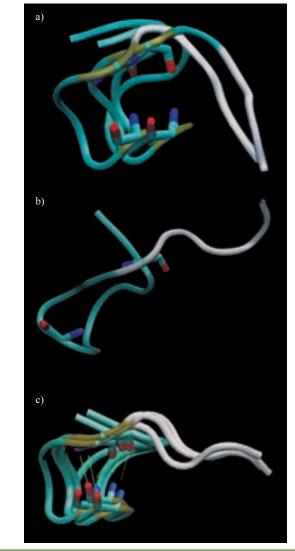
Dado que la estructura proteica está determinada por la *secuencia* de los aminoácidos involucrado por lo que se podría, en principio, predecir la misma a partir del conocimiento de la secuencia. El problema a pesar de los avances logrados está aún sin resolver.

# 2. El estado nativo y la desnaturalización

La estructura de las proteínas, que mencionamos anteriormente está definida para estrictas condiciones del entorno: una solución acuosa con una composición iónica dentro de estrechos márgenes de concentración, pH, temperatura y presión. Sin embargo, no estamos diciendo que sea una conformación única sino que las diferentes conformaciones fluctúan alrededor de una mayoritaria. A la conformación a la cual la proteína tiene la función que corresponde al organismo del que forma parte la denominamos conformación *nativa*. Si la conformación es tal que ha perdido su función la denominamos *desnaturalizada*<sup>1</sup>. Al proceso de trasformación de nativa a desnaturalizada lo llamamos *desnaturalización*.

Tal como mencionamos, el estado nativo corresponde a una distribución alrededor de la estructura predominante, de acuerdo a las condiciones del entorno. Esto es de esperar, sin embargo no solamente podemos encontrar una distribución estadística debido a fluctuaciones térmicas locales, sino también algunas estructuras defini-

Esta definición funcional no es la adoptada universalmente pero nos parece que es la más apropiada.



**Figura 2.** Tres confórmeros del la fracción de INGAP (*Islet Neo Genesis Associated Protein*) que ocupan el 48% del tiempo total de simulación (20 ns), el resto del tiempo no se observan conformaciones estables. La ocupación durante la simulación de los confórmeros son: a) 14.5%; b) 10,0%; c) 23,5% (de referencia [3]). Las líneas delgadas que conectan diferentes cadenas son puentes de hidrógeno.

das (confórmeros). La Fig. 2 muestra un ejemplo de un polipéptido con tres conformaciones de distinto tiempo de vida<sup>2</sup>.

A la luz de los resultados actuales resulta claro que el tratamiento cinético de la desnaturalización no puede ser tratado como una transición entre dos estados, salvo en casos excepcionales.

# 3. Algo de Termodinámica

La temperatura y la presión son dos variables termodinámicas de importancia para mantener el estado nativo de las proteínas. El sentido de la reacción está determinado por el cambio en la energía de Gibbs ( $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ ), la que se relaciona con la constante de reacción por:

$$lnK = -\Delta G/RT \tag{1}$$

Para un proceso reversible encontramos

$$\left(\frac{\partial(\ln K)}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta S}{RT} \tag{2}$$

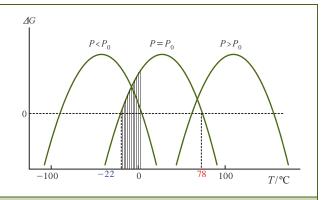
para la temperatura y

$$\left(\frac{\partial (\ln K)}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V}{RT} \tag{3}$$

para la presión.

De las ecuaciones 2 y 3 surge que un aumento de la temperatura facilita la reacción de desnaturalización, en tanto que lo mismo ocurre cuando la presión produce una disminución del volumen.

El estado nativo se mantiene, tal como hemos mencionado, en un rango muy estrecho de las variables presentes. La Fig. 3 muestra la energía de Gibbs de desnaturalización en función de la temperatura a presión atmosférica  $(p_0)$ , y a valores mayores y menores, la zona comprendida por la curva y la línea correspondiente a  $\Delta G = 0$  es la región donde la proteína se mantiene en estado nativo. Podemos ver que a presión atmosférica la proteína se mantiene en estado



**Figura 3.** Energía de Gibbs de desnaturalización proteica en función de la temperatura a diferentes presiones. En la curva correspondiente a presión atmosférica ( $P_0$ ) la zona rayada corresponde a la región de congelamiento del agua. El acceso experimental a esta región está en principio vedado. Se pueden realizar ciertos experimentos en estado sobreenfriado del agua.

Según de Gennes [2] el número de unidades que requiere una polipeptido para formar un receptor específico es de 13 aminoácidos.

nativo entre (aproximadamente) los  $-22^{\circ}$ C y  $78^{\circ}$ C<sup>3</sup>. En la curva correspondiente a  $p_0$  se marca la región para la cual si bien nos encontramos en el estado nativo no es fácilmente accesible a los experimentos debido a que nos encontramos por debajo del punto de congelación del agua.

Vemos que para una dada presión existen dos valores de temperatura de desnaturalización.

Tanto el aumento como el descenso de la temperatura puede desnaturalizar la proteína y los valores límites por debajo y por encima de aquella en que permanece nativa dependen del valor de la presión. El proceso de desnaturalización que se produce por descenso de la temperatura es la que se denomina desnaturalización fría, en oposición a la que se produce por aumento de la temperatura, que es la que se designa regularmente como desnaturalización térmica. Si consideramos un poco más en detalle podemos escribir las expresiones termodinámicas a partir de la ecuación de Clausius Clapeyron,

$$d\Delta G = \Delta V dp - \Delta S dT \tag{4}$$

Integrando entre  $T-T_0$  y  $p-p_0$ , obtenemos en segundo orden:

$$\Delta G = \frac{\Delta \beta}{2} (p - p_0)^2 + \Delta \alpha (p - p_0) (T - T_0) - (5)$$

$$- \Delta \frac{C_v}{2T_0} (T - T_0)^2 + \Delta V_0 (p - p_0) - (5)$$

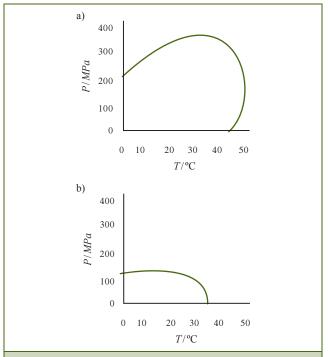
$$- \Delta S (T - T_0) + \Delta G_0$$

donde  $\beta$  es el factor de compresibilidad  $\beta = (\partial V/\partial p)_T$  y  $\alpha$  el factor de expansividad  $\alpha = (\partial V/\partial T)_p = -(\partial S/\partial p)_T$ . La ecuación 5 define la superficie de la energía de Gibbs en función de P y T. La sección por el plano  $\Delta G = 0$  de la misma es una elipse que encierra los límites de la región dentro de la cual la proteína conserva su estado nativo.

Aún cuando este resultado es razonable debemos tener en cuenta que la aproximación a segundo orden implica la suposición que  $\Delta C_v$ :  $\Delta \beta$  y  $\Delta \alpha$  son constantes, lo que en términos generales no es cierto. La elipse que se obtiene cuando se toman aproximaciones mayores se deforma hacia diferentes ejes [4].

Dado que las elipses no se encuentran, en general, totalmente en regiones accesibles, los resultados experimentales sólo pueden obtenerse parcialmente y las curvas aproximadas dan globalmente cuenta de los mismos.

La Fig. 4 muestra el caso de la quimotripsina y la ribonucleasa.



**Figura 4.** Curvas aproximadas de la energía de Gibbs para a) quimotripsina y b) ribonucleasa, basadas en datos Hawley [5].

# 4. El medio y sus propiedades

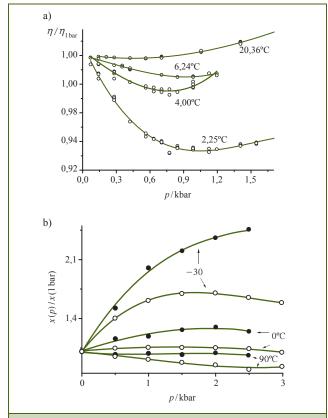
El tratamiento que consideramos en la sección anterior presupone un medio homogéneo en la cual sus propiedades sufren cambios graduales con la temperatura y presión. El principal componente de los medios biológicos el agua está lejos de tener un comportamiento uniforme. Ciertas propiedades no se comportan como en otros líquidos y la peculiaridad en el comportamiento de dichas propiedades son mal llamadas "anomalías" del agua, particularmente el efecto de con la presión muestra claramente la distinción entre el agua y los llamados líquidos "regulares" [6]. La Fig. 5 muestra dos ejemplos (viscosidad y coeficiente de difusión) donde vemos que en un dado rengo de presiones las propiedades varían en su comportamiento tornando al comportamiento de los líquidos simples.

Es lícito preguntarnos el por qué de este comportamiento. La respuesta se basa en la estructura del agua<sup>4</sup>.

La molécula de agua no es la única que puede formar puentes de hidrógeno pero, dado que el oxígeno puede actuar como dador y aceptor de ellos, el número de enlaces por

Nótese que se trata de una curva general. Existen proteínas para las cuales el rango se desplaza hacia las altas temperaturas (termófilas) y hacia las bajas temperaturas (criófilas).

 $<sup>^4</sup>$  Definimos estructura en un fluido [7] cuando es posible definir un número finto de unidades estructurales  $S_k$  con un tiempo de vida  $\boldsymbol{\tau}_s$  al menos un orden de magnitud mayor que el período de vibración de los enlaces que definen dichas estructuras. Para el agua el tiempo de vida media de  $S_k$  es del orden de  $10^{-11}-10^{-12}$ , en tanto que el período de vibración de los enlaces H-O es aproximadamente  $2\times 10^{-13}$ .



**Figura 5.** a) Viscosidad relativa  $(\eta/\eta \ 1)$  bar) a diferentes temperaturas. La variación con la presión sufre un cambio de tendencia por sobre una cierta presión según la temperatura b) Coeficientes de difusión rotacional  $(1/\tau_2)$ , círculos llenos y traslacional (D), círculos vacíos. Se observa que el coeficiente de difusión rotacional aumenta más rápidamente que el traslacional con al presión.

cada molécula de agua puede llegar a cuatro. Esto ocurre en el estado sólido en condiciones regulares de presión y temperatura el Hielo  $I_h$ , formando una estructura hexagonal abierta (terahédrica).

Al fundirse la estructura (abierta) del hielo comienza a desarmarse aumentando su densidad con el aumento de temperatura hasta llegar a su máximo valor a los 4°C. Es este proceso las estructuras teraédricas se desarman progresivamente. la coexistencia de las estructuras teraédricas de baja densidad con el "mar" de moléculas de agua con tres, dos uno o ningún puente de hidrógeno, de más alta densidad es la fuente del comportamiento particular del agua. Un modelo de dos estados como una mezcla de estructuras de baja y alta densidad describiría esta situación fue sugerida difusamente en el pasado. En 1948 Hall [8] propone el modelo de dos estados para justificar el origen de la absorción ultrasónica anómala del agua. Este modelo no fue considerado favorablemente hasta la aparición de la simulación computacional, lamentablemente sin reconocimiento de los trabajos originales.

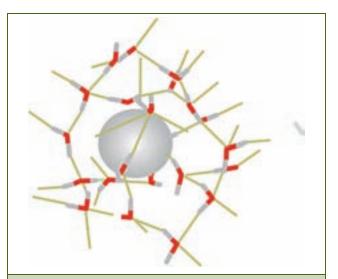
Esta mezcla entre estructuras de baja y alta densidad tiene composición variable con la temperatura y presión, decreciendo la componente de baja densidad con el aumento de cualquiera de estas variables. La transición es gradual y debe existir un punto de cruce (*crossover*) donde encontraremos la composición igualitaria.

### 5. La Interacción Hidrofóbica

La sustancias no polares se las denomina también *hidrofó-bicas* –repelen el agua– y su solubilidad es muy baja. La entropía de solubilización de una sustancia no polar en agua es negativa, lo que se puede deducir fácilmente ya que la misma decrece con la temperatura, lo opuesto de las sustancias hidrofilicas. Dado que la entropía de mezcla es positiva debe haber presente otra componente negativa que supera la de mezcla.

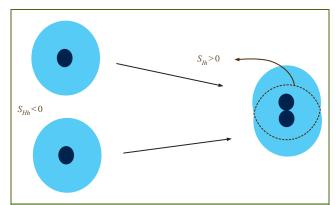
En 1959 Kauzmann [9] propuso como explicación del fenómeno que existía una hidratación hidrofóbica en la cual las moléculas de agua circundantes se ordenaban optimizando el número de puentes de hidrógeno y, por lo tanto, disminuían su movilidad. La hipótesis permitió dar una explicación aceptable de la interacción hidrofóbica y tuvo una rápida y general aceptación. La verificación experimental llegó mucho después [10-12]. La Fig. 6 muestra un esquema simplificado de la hidratación de una molécula no polar.

La hidratación hidrofóbica restringe el movimiento del agua por la interacción mutua de las moléculas de agua involucradas y no por interacción directa con el soluto, por el contrario, la repelencia hace que el agua se estructure



**Figura 6.** Hidratación hidrofóbica. Las moléculas de agua se reordenan evitando posibles puentes de hidrógeno en dirección al soluto, lo que favorece la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua circundante disminuyendo su movilidad y la entropía total.

30



**Figura 7.** Esquema del proceso de interacción hidrofóbica. Izquierda) La introducción de partículas no-polares en agua produce una esfera de hidratación de menor movilidad que el seno del líquido, lo que produce un descenso de la entropía del sistema. Derecha) La interacción entre ambas partículas liberan al medio un cierto número de moléculas de agua con el consecuente aumento de la entropía.

en una forma de baja densidad con una muy débil interacción con el soluto. Al entrar en contacto dos partículas hidrofóbicas, en el área de contacto las moléculas que se encontraban formando la esfera de hidratación pasan al seno del líquido aumentando su movilidad y, consecuentemente, aumentando la entropía del sistema. Tal como señalamos la hidracción hidrofóbica produce un descenso de entropía, y de allí la baja solubilidad, en tanto que la interacción hidrofóbica produce un aumento de la misma favoreciendo el "enlace". El proceso —que se ilustra en la Fig. 7—, lo podemos analizar más rigurosamente a partir de la energía de Gibbs como:

### a) Hidratación hidrofóbica

$$\Delta G_{h-h} = \Delta H_{hid} - T \Delta S_{h-h}$$

$$\cot \Delta S_{h-h} < 0$$
(6)

### b) Interación hidrofóbica

$$\Delta G_{int-h} = \Delta H_{int-h} - T \Delta S_{int-h}$$

$$\cot \Delta S_{int-h} > 0$$
(7)

Como podemos ver, en el signo de la entropía de interacción hidrofóbica, el aumento de la temperatura produce un incremento del efecto. Esto da a la interacción hidrofóbica un carácter único entre los diferentes tipo de interacción.

La asociación de superficies polares no se produce solamente en el caso de moléculas pequeñas sino también entre superficies de gran área. El efecto de disminución de la movilidad de las moléculas de agua que se observa en superficies hidrofóbicas relativamente grandes se extiende a varios nanómetros de distancia de la superficie [25].

El plegamiento de las proteínas tiene como su principal componente a la interacción hidrofóbica. Los enlaces de hidrógeno son muy importantes en este proceso pero no son el factor principal, si bien la energía de un enlace de hidrógeno es del orden de 5 kcal.mol<sup>-1</sup> y la un contacto hidrofóbico es de alrededor de 1,5 kcal.mol<sup>-1</sup>, en una proteína el número de contactos hidrofóbicos excede largamente a de enlaces de hidrógeno.

### 5.1. La influencia de la Presión

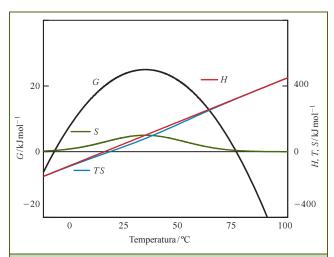
El análisis microscópico del efecto de la presión sobre la estructura del agua nos indican que la presión altera el reticulado de puentes de hidrógeno por encima de aproximadamente 1 ó 2 kbar. Consideraremos dos resultados experimentales que son contundentes; uno es el trabajo de Prielmeier y col. [14] y otro es el de Cai y col. [15]. Preimeier y col. realizaron medidas del coeficiente de autodifusión de agua a diferentes presiones mediante resonancia magnética nuclear pulsada (*spin-echo*) de 0,1 a 150 MPa. Los datos, con el complemento de resultados de viscosidad y relajación dieléctrica permiten separar la difusión rotacional de la traslacional. Se encuentra que la difusión rotacional aumenta con la presión mucho más que la difusión traslacional la que, por sobre aproximadamente 150 MPa, decrece.

Este resultado puede interpretarse si consideramos que la estructura tetraédrica es perturbada por la presión, favoreciendo una estructura más compacta que dificulta la traslación pero, al liberar las moléculas de al menos algunos puentes de hidrógeno, facilita la rotación.

El otro experimento que mencionamos (debido a Cai y col.) muestra el estudio del agua a diferentes presiones mediante dispersión elástica de rayos X revelando una pérdida parcial de la correlacción de puentes de hidrógeno, lo que implica una disminución de la componente de estructura teraédrica. Este efecto se encuentra por encima de 1,5-2,0 kbar.

Estos, y otros experimentos, muestran que con el aumento de la presión produce una disminución de la estructura teraédrica, lo que trae como consecuencia el debilitamiento de la interacción hidrofóbica. Dado que la interacción hidrofóbica es el factor dominante en la estructura proteica, esta interpretación nos permite explicar la desnaturalización con la presión. La Fig. 3 muestra este comportamiento, pero también nos muestra que la presión desplaza la curva de estabilidad hacia la derecha, con lo que la presión resulta un factor de protección contra la desnaturalización térmica, al menos en cierto rango, como también puede verse en la misma figura.

El comportamiento peculiar de la interacción hidrofóbica con la temperatura explica la desnaturalización por el descenso de la temperatura así como el desplazamiento de la



**Figura 8.** Entropía y entalpía de desnaturalizacion (basada parcialmente en datos de Privalov [16]).

curva de estabilidad con la presión. El balance entre entropía y entalpía de las proteínas se puede ver en la Fig. 8<sup>5</sup>. Podemos ver que la desviación de la linealidad de la contribución entrópica ( $T\Delta S$ ) es la que produce la forma tipo parábola en la curva de la energía de Gibbs de desnaturalización. La información experimental proviene del estudio calorimétrico de donde, a partir de la capacidad calorífica, se obtiene la entalpía y entropía del proceso. Esta figura es ilustrativa pero debe tenerse en cuenta que el factor  $T\Delta S$  se ha calculado suponiendo que el incremento de la capacidad calorífica no depende de la temperatura, lo que es cierto en un importante grupo de proteínas pero no en todas. El perfil de la entropía que se muestra en la figura no corresponde a mediciones sino que se trata de una representación de como aproximadamente se comporta la entropía que se genera por los contactos hidrofóbicos.

El comportamiento de la entropía puede visualizarse teniendo en cuenta las transformaciones del agua con la temperatura. A temperaturas muy bajas la componente tetraédrica del agua es considerable, los contactos entre superficies hidrofóbicas liberan las moléculas del contacto las que, dada la estructura predominante del agua, pasa a formar parte de una estructura también tetraédrica sin cambio apreciable en la entropía. A temperaturas en que la tetraedicidad del agua es menor se produce la ganancia entrópica, al que disminuye cuando la agitación térmica es muy importante. Este comportamiento brinda una simple explicación de la desnaturalización en frío.

En forma similar podemos entender el desplazamiento de la curva hacia temperaturas mayores con aumento de la presión. La aplicación de la presión produce, como mencionamos anteriormente, una disminución de la componente tetraédrica en el agua, la relación entre la estructura del agua de hidratación y el medio circundante es la que contribuye a la ganancia en entropía. A presiones moderadamente altas la diferencia entre dichas estructuras puede ser apreciable y, al mismo tiempo, el aumento de la temperatura contribuye al factor  $T\Delta S$ . A mayores presiones se inhibe la formación de estructuras en las cercanías de las superficies.

## 6. Experimentos y Simulación

Los resultados preliminares de Bridgman<sup>6</sup> han sido probablemente los disparadores del estudio detallado del proceso. Más recientemente la actividad de Gregorio Weber y sus discípulos (ver por ejemplo la referencia [18]) realizaron una contribución importante en el campo de la desnaturalización de proteínas, tanto en cuanto a la Termodinámica como experimentalmente –particularmente en el uso de espectroscopía en el infrarrojo y de fluorescencia.

Información molecular detallada puede obtenerse mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [19,20] a través del estudio del corrimiento químico relativo por efecto de la presión. En condiciones favorables es posible obtenerse, por comparación con la estructura no perturbada, la estructura tridimensional de la proteína bajo presión asimismo la información sobre movilidad y detalles en ciertas regiones resultan de gran utilidad.

La simulación de dinámica molecular (DM) resultaba inadecuada hasta hace relativamente corto tiempo [21] debido a que la capacidad computacional no permitía alcanzar los intervalos necesarios por observar el proceso. Resultado más recientes permiten comparar las estructuras simuladas con las experimentales, mostrando un buen acuerdo y permitiendo obtener detalles de la alteraciones estructurales [22]. Moléculas lábiles a la presión, como la mioglobina, llegan a un desplegamiento completo en un tiempo relativamente corto (del orden de segundos) lo que no permite obtener estructuras estables, La simulación da cuenta de los estadíos intermedios en escala de tiempos de los cientos de nano segundos [23,24] permitiendo obtener una buena descripción del proceso. Ha sido posible también obtener algunas estimaciones a tiempos mucho mayores mediante un apropiado procesamiento de los datos [25].

Estos resultados muestran en todos los casos un aumento del área hidrofóbica expuesta al solvente con la presión, lo que es una indicación firme de la disminución del efecto hidrofóbico con la aplicación de la presión.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> El perfil de la entropía es solamente un esquema que muestra su comportamiento y no pretende ser una descripción exacta del proceso.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> La incursión de Bridgman en el campo de las proteínas fue pasajera y meramente cualitativa. Contrasta la longitud del trabajo mencionado sobre la albúmina (una página) con el que describe extensamente la acción de la presión sobre 11 diferentes materiales (75 páginas) [17].

### 7. Conclusiones

La descripción del proceso de desnaturalización de proteínas en frío que hemos dado no pretende ser exhaustiva, sin embargo hemos expuesto los fundamentos básicos que nos llevan a dar una explicación plausible del fenómeno. Falta aún lograr una descripción detallada de la Termodinámica del proceso como adentrar en otros factores que contribuyen a la desnaturalización y son afectados también con la temperatura y presión.

La información experimental disponible puede ser explicada, al menos cualitativamente, por la acción de la presión y temperatura en la interacción hidrofóbica, la que representa la mayor contribución al plegamiento de las proteínas.

# 8. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina, la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) de Argentina. Agradezco al Dr. Oscaldo Chara por sus útiles comentarios sobre le manuscrito. El autor es Investigador del CONICET y Profesor Emérito de la UNLP.

### Referencias

- [1] Bridgman P.W. *The coagulation of albumen by pressure*. J. Biol. Chem. **19**, 511 (1914).
- [2] De Gennes P.G. Introduction to Polymer Dynamics. Cambridge University Press, Cambridge 1990.
- [3] MAC CARTHY A.N., MOGILNER I.G., GRIGERA J.R. ET AL. Islet neogenesis associated protein (INGAP): Structural and dynamical properties on its active pentapectide. J. Molec. Graph. and Mod. 27 701, (2009).
- [4] SMELLER L., HEREMANS K. Some thermodynamics and kinetic consequences of the phase diagrams of protein denaturation. en: Heremans K. (ed.) High Pressure Reserarch in Bioscience ans Biotechnology. Leuven University Press, Louvain 1997, pp. 55-58.
- [5] HAWLEY S.A. (1971) Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. Biochemistry 10, 2436.
- [6] WOOLF L.A. Tracer diffusion of tritiated water (THO) in ordinary water (H2O) under pressure. J. Chem. Soc. Farad. Trans. I. 71, 784 (1975).
- [7] BERENDSEN H.J.C. Water Structure en: Theoretical and Experimental Biophysics, Editor: Cole A. Marcel Dekker, New York 1967.

- [8] HALL L. The Origin of Ultrasonic Absorption of Water Phys. Rev. 73, 775 (1948).
- [9] KAUZMANN W. (1959) Some Factors in the Interpretation of the Protein Denaturation. Adv. Protein Chem. Adv. Protein Chem. 57, 1 (1959).
- [10] GOLDAMMER V., HERTZ H.G. Molecular Motion and Structure of Aqueous Mixtures with Nonelectrolytes as Studied by Nuclear Magnetic Relaxation Methods. J. Phys. Chem. 74 3734 (1970).
- [11] HALLENGA K.; GRIGERA J.R., BERENDSEN H.J.C. Influence of Hydrophobic Solutes on the Dynamic Behavior of Water. J. Phys. Chem 84 2381 (1980).
- [12] REZUS Y.L.A., BAKKER H.J. Observation of Immobilized Water Molecules around Hydrophobic Groups. Phys. Rev. Lett. 99, 148301 (2007).
- [13] CHARA O., McCARTHY A.N., FERRARA C.G., CAFFARENA E.R., GRIGERA J.R. Water behavior in the neighborhood of hydrophilic and hydrophobic membranes: Lessons from molecular dynamics simulation. Physica A 388, 2552 (2009).
- [14] Prielmeier F.X., Lang E.W., Speedy R.J., Lüdemann H.D. *Diffusion in supercooled water to 300 MPa*. Phys. Rev. Letters **59**: 1128 (1987).
- [15] CAI, Y.Q. ET AL. Ordering of Hydrogen Bonds in High-Pressure Low-Temperature H2O. Phys. Rev Letters 94, 025502 (2005).
- [16] Privalov P.L. Thermodynamics problem in structural molecular biology Pure Appl-Chem. 79, 1445 (2007).
- [17] Bridgman P.W. Change of Phase under Pressure. I. The Phase Diagram of Eleven Substances with Especial Reference to the Melting Curve. Phys. Rev. 3, 126 (1914).
- [18] MARKLEY J.J., NORTHROP D.B & ROYER C.A. (COMPILADORES) High-Pressure Effect in Molecular Biophysics and Enzymology Oxford University Press, New York-Oxford 1996.
- [19] LI H. & AKASAKA K. Conformational fluctuations of proteins revealed by variable pressure NMR. Biochimica et Biophysica Acta. 1764, 331 (2006).
- [20] KITAHARA R., YOKOYAMA S. & AKASAKA K. NMR snapshots of a fluctuating protein structure. Ubiquitin at 30kbar<sup>-3</sup>bar J. Mol. Biol. **347**, 277 (2005).
- [21] HÜNENBERGER P.H., MARK A.E. & VAN GUNSTEREN W.F. Computational Approaches to Study Protein Unfolding: Hen Egg White Lysozyme as a Case Study Proteins: Structure, Function, and Genetics 21, 196 (1995).
- [22] McCarthy A.M. & Grigera J.R. Effect of pressure on the conformation of proteins. A molecular dynamics simulation of lysozyme J. Mol. Graph. Mod. 24, 254 (2006).
- [23] McCarthy A.N. & Grigera J.R. *Pressure denaturation of apomyo-globin: a molecular dynamics simulation study*. Biochim. Biophys. Acta. **1764**, 506 (2006).
- [24] GRIGERA J.R & MCCARTHY A.N. The behavior of the hydrophobic effect under pressure and protein denaturation. Biophys J. 98, 1626 (2010).
- [25] CHARA O., GRIGERA J.R., & McCARTHY A.N. Studying the Unfolding Kinetics of Proteins under Pressure Using Long Molecular Dynamic Simulation Runs, J. Biol. Phys. 33, 515 (2007).