

CICLO 3: Aplicaciones de la espectrofluorimetría

- OBJETIVOS GENERALES:**
- 1) Estudio de la fluorescencia intrínseca de proteínas, y del uso de desactivadores (quenchers) en estudios estructurales.
 - 2) Estudio de fluoróforos extrínsecos, efecto de la polaridad del disolvente, y su aplicación en la determinación de los parámetros de unión de ligandos a macromoléculas.

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE: Acercamiento a las técnicas de espectroscopía de fluorescencia y sus aplicaciones en problemas bioquímicos.

DÍA 1

- Objetivos específico:**
- 1) Realizar los espectros de excitación y de emisión del triptofano en solución y de los residuos de triptofano de las proteínas seroalbúmina bovina (BSA) y ovalbúmina (OVA).
 - 2) Estudiar la accesibilidad de los residuos triptofanilo mediante ensayos de desactivación (quenching) de la fluorescencia por yoduro.

Materiales

- Buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4
- Triptofano 0.05 mM
- BSA 50 μ M
- OVA 50 μ M
- Yoduro de potasio (KI) 1M
- Ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
- KCl 2 M

Procedimiento

- 1) Preparar una serie de tubos (al menos 6, por duplicado, con volumen igual o mayor a 3 mL) a una concentración final de 2 μ M de triptofano o proteína, en presencia de concentraciones variables de yoduro (de 0 a 50 mM). Para el caso de la BSA, preparar las soluciones tanto en buffer como en KCl 1 M.
- 2) Utilizar los tubos preparados en ausencia de yoduro para obtener los espectros de emisión y excitación de los mismos. Compararlos.

⇒ ¿Qué pasos deben seguirse para realizar dichos espectros?

⇒ ¿En qué unidades medimos la fluorescencia?

3) Fijando la λ_{exc} y λ_{em} en los máximos encontrados, medir la fluorescencia de la solución de Trp previamente burbujeada con N_2 durante 5 min.

⇒ ¿A qué se debe el cambio en la fluorescencia observado?

4) Fijando la λ_{exc} y λ_{em} en los máximos encontrados, medir la fluorescencia de la serie de tubos preparados anteriormente. Con los datos obtenidos realizar un gráfico de Stern-Volmer y determinar la constante de Stern-Volmer del yoduro tanto para el triptofano en solución como para los residuos triptofanilos de la BSA y de la OVA.

⇒ ¿Podemos determinar k_q , la constante bimolecular de quenching (constante de velocidad para la reacción entre el quencher y el estado excitado del fluoróforo) con los datos obtenidos? ¿Espera obtener el mismo quenching por yoduro del triptofano en solución que el triptofano en la albúmina? ¿Por qué?

Actualmente se encuentran disponibles aproximadamente 20.000 estructuras de proteínas en los bancos de datos, que consisten principalmente de estructuras resueltas por cristalografía de rayos X y por RMN. Existen varias bases de datos de estructuras proteicas:

The Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>

PubMed/Structure: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=structure>

También existen varios visualizadores, el más usado en nuestro laboratorio es el SwissPDBviewer (<http://www.expasy.ch/spdbv/text/download.htm>), pero también pueden usarse el Hyperchem o el Cn3D, disponible en Pubmed.

La ovalbúmina ha sido cristalizada y se ha determinado su estructura, mientras que la BSA aún no ha sido cristalizada. Sin embargo, la estructura de la seroalbúmina humana sí ha sido resuelta, y es esencialmente igual a la de BSA. Una de las principales diferencias radica en que la BSA cuenta con dos residuos triptofanilos (W134 y W214), mientras que la HSA sólo cuenta con uno (W214).

DÍA 2

Objetivo específico 1: Estudiar el efecto de la polaridad del solvente en la emisión de fluorescencia.

Materiales

- ANS (ácido 8-anilinoftalensulfónico) 1mM
- EtOH rectificado 95%
- H₂O destilada

Procedimiento

1) Preparar una serie de tubos que contengan 20 μ M ANS y diferentes concentraciones de etanol (concentración aproximada indicada más abajo). El volumen final no podrá ser menor que 3.0 mL. Consideren que el etanol rectificado es 100 %.

- a) H₂O
- b) EtOH 50 % (v:v) en H₂O
- c) EtOH 75 % (v:v) en H₂O
- d) EtOH 90 % (v:v) en H₂O
- e) EtOH

2) Realizar el espectro de emisión en cada caso. Graficar los picos de emisión en función de la concentración de etanol.

⇒ ¿Cómo elegiría λ_{exc} ?

⇒ ¿Qué parámetros de fluorescencia se ven afectados?

⇒ ¿Qué es el corrimiento de Stokes? ¿Por qué la polaridad del disolvente afecta al mismo?

Objetivo específico 2: Estudiar la unión de ANS a la albúmina plasmática.

Materiales

- Buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4
- BSA deslipidada 50 μ M
- ANS 1mM
- ANS 0.1 mM

Procedimiento

- 1) Preparar al menos 12 tubos, por duplicado, que contengan 2 μ M BSA y diferentes concentraciones de ANS, en un rango de concentraciones aproximado de 0 - 25 μ M ANS. Los 4-5 primeras concentraciones de ANS deberán ser menor o igual que la concentración de BSA.
- 2) Medir fluorescencia a cada uno de los tubos. Graficar intensidad de fluorescencia vs [ANS]. Con los 4-5 primeros puntos de la curva calcular el factor de proporcionalidad entre intensidad de fluorescencia y la concentración del fluoróforo ANS (B).

⇒ ¿A qué longitud de onda de excitación y de emisión trabajaremos?

⇒ ¿Cómo se relaciona la intensidad de fluorescencia con la concentración? ¿en qué condiciones esto se cumple?

⇒ ¿A partir de estos resultados ¿qué parámetros del equilibrio de unión puede obtener?

⇒ ¿Qué conclusiones puede sacar de los resultados observados?

DÍA 3

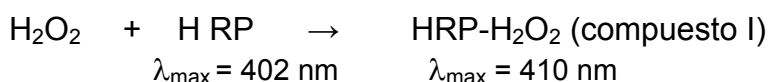
Resolución de ejercicios, discusión de los resultados obtenidos y parcial.

ANÁLISIS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

A continuación presentamos una serie de resultados experimentales y preguntas para el análisis y discusión.

Problema 1. Determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

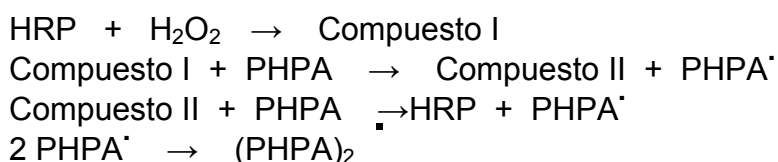
El método para la determinación de H₂O₂ se basa en la reacción de éste con una peroxidasa (en general se utiliza la peroxidasa de rábano, HRP) para formar el complejo enzima-sustrato, éste existe en dos estados llamados compuesto I y II. Según la siguiente reacción:



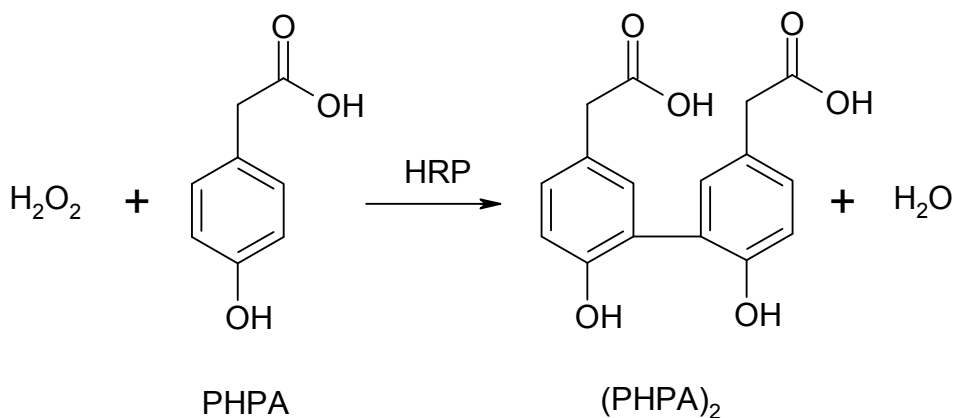
En presencia de H₂O₂, la A₄₀₂ disminuye (desaparece HRP libre) y simultáneamente aumenta la A₄₁₇ (aparición del complejo HRP-H₂O₂).

El método espectrofotométrico para la determinación de H₂O₂ mide la diferencia de las absorbancias a 417nm y 402nm .(A₄₁₇₋₄₀₂), luego del agregado de HRP.

Otra manera de cuantificar H₂O₂ es por fluorescencia. En presencia de un sustrato oxidable, la peroxidasa puede oxidarlo a expensas de H₂O₂. El compuesto I y II formados (HRP-H₂O₂) pueden oxidar compuestos fenólicos sustituidos para dar sustratos oxidados fluorescentes. Un derivado fenólico muy utilizado es el ácido p-hidroxifenilacético (PHPA), que se oxida a 2,2'-dihidroxi-bifenil-5,5'-diacetato ([PHPA]₂), fluorescente.



En resumen, la estequiometría de la reacción es la siguiente:



El método fluorimétrico para medir H_2O_2 se basa en la medida de la fluorescencia del $(\text{PHPA})_2$ formado luego de agregar H_2O_2 y PHPA.

A continuación se le suministran los datos obtenidos en la elaboración de una curva de calibración para la determinación de H_2O_2 por el método espectrofotométrico y por el método fluorimétrico.

Curva de Calibración. Método Espectrofotométrico

Buffer (mL)	HRP (3 mg/mL) (mL)	H_2O_2 (20 mM) (mL)	A_{402}	A_{417}
2,98	0,020	0	0,090/0,105	0,060/0,060
2,96	0,020	0,015	0,300/0,287	0,322/0,300
2,95	0,020	0,030	0,295/0,290	0,345/0,344
2,92	0,020	0,060	0,290/0,288	0,444/0,428
2,89	0,020	0,090	0,282/0,278	0,481/0,488
2,92	0,020	0,060	0,288/0,28	0,410/0,416

El último valor corresponde a una solución problema que contiene H_2O_2 ; la cual se diluyó 1/10 para luego tomar una alícuota de 0,06 mL para el ensayo.

Curva de Calibración. Método Fluorimétrico

Buffer (mL)	PHPA (50 mM) (mL)	HRP (10 mg/mL) (mL)	H ₂ O ₂ (200 μM) (mL)	U.R.F.
3,58	0,4	0,02	0	9,5/8,6
3,57	0,4	0,02	0,01	18,2/15,5
3,56	0,4	0,02	0,02	22,8/23,1
3,54	0,4	0,02	0,04	35,8/35,9
3,50	0,4	0,02	0,08	58,8/57,0
3,48	0,4	0,02	0,12	79,3/83,0
3,40	0,4	0,02	0,16	97,7/96,8
3,38	0,4	0,02	0,20	99,7/100,8
3,38	0,4	0,02	0,20	42,0/46,2

Se midió fluorescencia con $\lambda_{exc} = 323 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 400 \text{ nm}$ y ancho de rendija en ambos de 5 nm. El último valor corresponde a la solución problema la cual se diluyó 1/3000 y se tomó una alícuota de 0.2 mL para el ensayo.

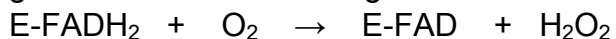
⇒ *Compare la sensibilidad de ambos métodos*

⇒ *Utilizando las curvas de calibración correspondientes determine la concentración de las sustancias problema*

⇒ *¿Qué método utilizaría para detectar liberación de H₂O₂ en células endoteliales (en el orden de nmol H₂O₂ / mL)?*

Problema 2. Medición de la producción de H₂O₂, por un sistema enzimático utilizando el método fluorimétrico.

La enzima glucosa oxidasa (GO) es una flavoproteína que cataliza la oxidación aeróbica de la glucosa produciendo peróxido de hidrógeno.



La producción de H₂O₂ por la enzima GO fue determinada usando el método fluorimétrico anteriormente descrito.

Se preparó una mezcla de glucosa, (GO), PHPA y HRP según el siguiente protocolo y se registró intensidad de fluorescencia en función del tiempo, para dos diferentes concentraciones de la enzima.

	A	B
Buffer fosfato 0.1M, pH 7.4.....	3,46 mL	3,50 mL
PHPA 50 mM	0,40 mL	0,40 mL
HRP 10 mg/mL	0,02 mL	0,02 mL
glucosa 1 M	0,06 mL.....	0,06 mL
GO 0.2 U/mL	0,06 mL	0,02 mL

tiempo (min)	U.R.F.	
	A	B
0	17,0/19,0	18,0/19,2
5	25,2/27,0	20,7/22,0
10	39,5/39,0	27,5/28,6
15	52,9/55,0	35,5/36,5
20	62,3/66,2	41,9/40,3
25	69,0/75,0	48,8/49,3
30	72,4/76,4	54,2/55,0
40	75,0/76,7	60,2/60,9

⇒ Calcule la velocidad de producción de H_2O_2 en cada caso. (Grafique $[H_2O_2]$ vs tiempo).
 ¿cómo hubiera esperado usted que fueran las velocidades de reacción para cada caso? Si los resultados obtenidos difieren de los que usted esperaba, ¿a qué se lo atribuiría?

Problema 3. Efecto del pH sobre la fluorescencia del dímero PHPA

Se preparó una solución 5 mM de PHPA con 0.5 mg/mL de HRP. La dimerización del PHPA se inició con la adición de H_2O_2 10 μ M, incubando 10 minutos a 37°C. Una alícuota del dímero así preparado se diluye en buffer fosfato o pirofosfato a los pH indicados y se mide la intensidad de fluorescencia.

- ⇒ Grafique intensidad de fluorescencia en función del pH
- ⇒ ¿Qué conclusiones puede sacar al respecto? ¿Por qué se observa este efecto?
- ⇒ ¿Para qué podría utilizar esta propiedad?

PH	U.R.F. x 10 ³
5,0	1,0
6,0	1,3
6,5	1,8
6,8	3,0
7,0	4,1
7,5	8,0
7,8	13,0
8,0	16,0
8,5	24,0
9,0	32,0
9,5	35,0

Problema 4. Uso de desactivadores ("Quenchers")

En experimentos de fluorescencia no hay que olvidar la posibilidad de que ocurran fenómenos de apagamiento o desactivación ("quenching") del fluoróforo. En muchos casos, esta desactivación es utilizada para investigar el sistema en estudio.

A continuación se suministran los datos de desactivación por nitrito (NO_2^-) de la fluorescencia de dos sondas fluorescentes derivadas del pireno:

(1-pirenil) metiltrimetilamonio (PMTMA) y 11-(1-pirenil)undeciltrimetilamonio (PUTMA), $\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$, en solución (acuosa y etanólica) y luego de incorporadas dichas sondas fluorescentes a liposomas (el PUTMA se incorpora en el centro de la bicapa lipídica mientras que el PMTMA lo hace en la superficie).

PMTMA/buffer

	U.R.F			[NO ₂ ⁻] (mM)
aire	100	98	101	0
+ Ar	129	123	124	0
↓	57	63	63	1
	40	40	41	2
	29	30	30	3
	23	24	25	4
↓	19	19	20	5

PMTMA/liposomas

	U.R.F.			[NO ₂ ⁻] (mM)
aire	92	91	95	0
+ Ar	105	100	106	0
↓	86	83	85	1
	70	69	69	2
	58	62	61	4
	51	56	48	6
	43	40	40	8

PUTMA/etanol

	U.R.F.			[NO ₂ ⁻] (mM)
aire	10	9	10	0
+ Ar	99	105	104	0
↓	37	38	37	1
	25	24	23	2
	19	19	20	3
	16	16	15	4
	14	13	13	5

PUTMA/liposomas

	U.R.F			[NO ₂ ⁻] (mM)
aire	104	103	102	0
+ Ar	165	161	162	0
↓	154	143	151	1
	147	163	142	2
	130	123	127	4
	118	114	117	6
	114	103	106	8

⇒ Con estos datos experimentales, realice un gráfico de Stern-Volmer para cada caso.

⇒ ¿Podría calcular k_{NO_2} . (constante de velocidad para la reacción entre el desactivador, nitrito, y el estado excitado del fluoróforo) para cada sonda fluorescente?

⇒ ¿Qué puede concluir de los resultados?