

CAPÍTULO III:

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de distintas formas de apo A-I

1.1. Purificación de apoA-I de plasma

La apoA-I se obtuvo a partir de suero Humano (del Banco de Sangre del Instituto de Hemoterapia de la Provincia de Buenos Aires, La Plata), alternando técnicas de ultra centrifugación y cromatografía de exclusión molecular (Tricerri et al., 1998)

- 1.- Se descongela el plasma humano y se lleva a una densidad de 1,21 gr/ml considerando el aumento de volumen por el agregado de BrNa. Se necesitan 0,282 g/ml de BrNa y 0.262g/ml de BrK para llevar a la densidad deseada.
- 2.- Se Ultra centrifuga a 55.000 rpm en rotor de ángulo fijo 70 Ti (Beckman) durante 44 hs a 10°C.
- 3.- Luego de la ultra centrifugación se separa las lipoproteínas flotantes en esas condiciones. Es la capa superior de color naranja intenso (ver esquema adjunto).

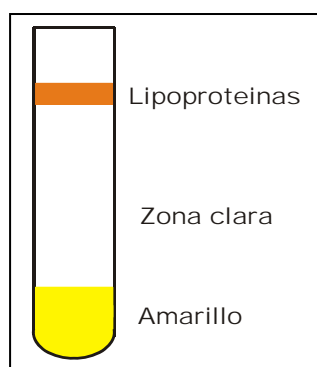


Fig.III-1 Esquema de ultracentrifugación de las lipoproteínas

4.- Luego se separan las HDL en columna abierta de Sephacryl S300 (de un metro de largo), eluyendo con Buffer Tris 10mM; ClNa 0,15M; Azida 0,01%; pH=8. Eluyen las VLDL, LDL y HDL en ese orden.

5.- Se dializan las HDL en membrana de diálisis de corte 12.000 contra EDTA 5mM, cambiando el buffer 5 veces durante 2 días.

6.- Se deslipidiza la muestra con guanidina HCl 6M. En base a ese calculo agregar la cantidad deseada sobre la muestra, colocar en frasco color caramelo, agitando a 37°C durante 3 hs, luego colocar en hielo durante 10 minutos.

- 7.- Se dializa contra EDTA 5mM pH=7,4; cambiando el buffer 5 veces durante 2 días.
- 8.- Se lleva a densidad de 1,21g/ml agregando a la muestra BrNa.
- 9.- Luego de llevar a densidad deseada se ultra centrifuga a 50.000 rpm en el mismo rotor durante 24 hs a 10°C.
- 10.- La capa superior flotante se separa, ya que contiene las HDL ricas en apoA-II. El resto del contenido del tubo, se colecta y dializa contra CO_3NH_4 5mM, cambiando el buffer 5 veces, durante 2 días (ver esquema).

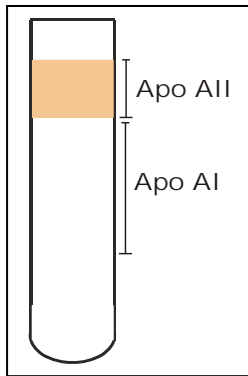


Fig.III-2 Esquema de ultracentrifugación en la separación de apoA-II de apoA-I

11.- Se liofiliza las muestras luego de dializar, y si se desea se puede interrumpir la purificación guardando las muestras a -80°C .

12.- Para purificar la apoA-I se disuelve el liofilizado en el buffer de elusión (Tris 10 mM, 1% β -Mercapto Etanol (BME), guanidina HCl 3M, pH 8.0), a una concentración de proteína ~ de 50 mg/ml y se filtra por gel en columna Superdex 200 10/30 HR (Pharmacia). Se puede usar bomba (Pump-P500 presión 1.5 MPA) acoplada al detector UV y registrador.

(El BME mejora la separación de la apoA-II contaminante llevándola a su forma monomérica ya que reduce el puente disulfuro).

Se siembran 500 μl a un flujo de 0,5 ml/min

13.- Se colectan las fracciones conteniendo apoA-I y se dializan contra buffer EDTA 0,01 % pH = 7,5 durante 2 días cambiando 5 veces el volumen.

14.- Luego se liofiliza, se pesa el liofilizado y se separa una parte para confirmar su pureza por gel de poliacrilamida (ver más adelante) al 12% con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). El resto se rotula y guarda a -80°C .

1.2. Obtención de péptido central de apoA-I

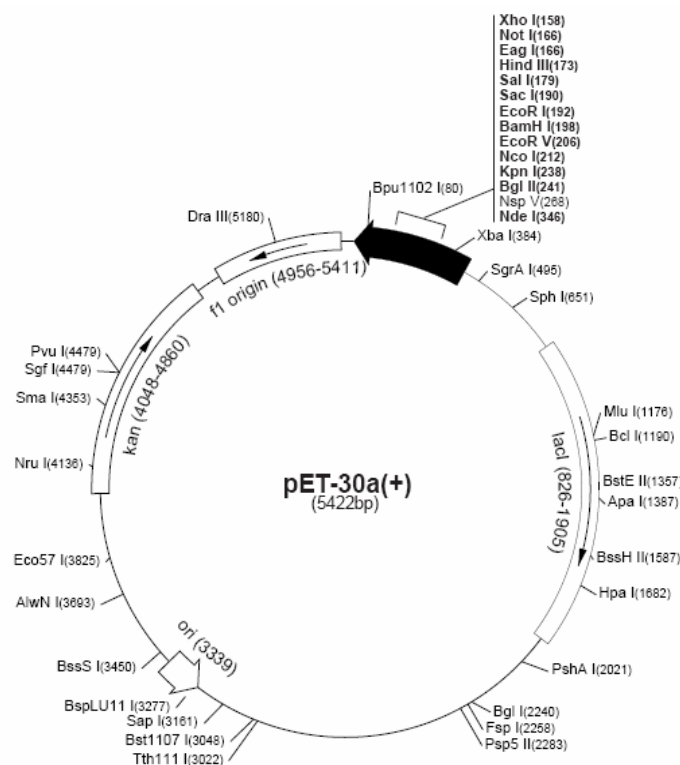
Este péptido fue sintetizado por el Servicio del Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oklahoma State University, OK, USA, purificado (a $> 95\%$) por RP-HPLC, y controlado por espectrometría de masa de electrospray.

1.3. Obtención de apoA-I con secuencia nativa (Wild type) ó mutada mediante expresión a partir de cultivos bacterianos.

i) Técnicas de biología molecular

Obtención y amplificación de vectores para clonación: plásmidos.

Los plásmidos son secuencias de DNA de doble cadena, de origen bacteriano, que permiten la incorporación y manipulación de un gen específico, ya sea de origen procariontico o, como en nuestro caso, el cDNA de origen eucariótico a bacterias para la expresión de la proteína de elección; en este trabajo se utilizaron los plásmidos pET30, de Novagen, cuya secuencia permite la selección de bacterias subclonadas gracias a que le confiere resistencia al antibiótico Kanamicina. En el lugar de inserción del gen (polilinker) el plásmido incorpora a la secuencia del gen una cola de polihistidina directamente al inicio de la secuencia N-terminal de la proteína para su posterior purificación, esta cola de polihistidina es eliminada de la secuencia de aminoácido como se explicará mas adelante (ver Fig.III-3)



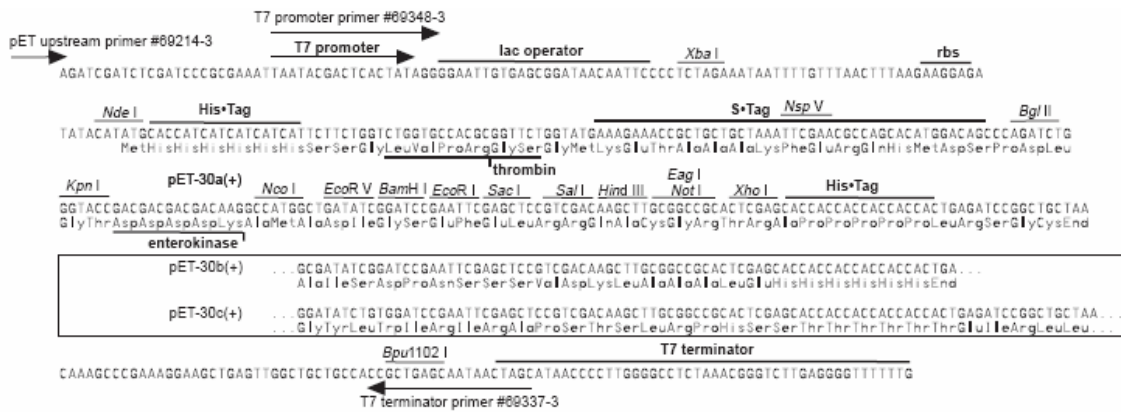


Fig III-3: esquema general del plásmido PET 30 y detalle de la secuencia de nucleótidos en el polilinker

En la figura III-3 se muestra el esquema general del plásmido en donde se observa la región del polilinker, el sitio de replicación y el gen que codifica la resistencia a kanamicina. En la parte inferior se detalla la secuencia de nucleótidos y los sitios de restricción en la región donde se inserta el gen de interés. La adición de IPTG (Isopropil Tiogaláctosido) induce al operón lac, lo que promueve la expresión del gen de la proteína insertada, junto con diferentes secuencias aminoacídicas de interés, las que facilitan su posterior purificación.

La obtención de plásmidos a partir de bacterias se realiza a pequeña escala (miniprep) en donde se obtienen microgramos de ADN plasmídico; se utilizan para tal fin dos protocolos diferentes cuyo fundamento es la lisis alcalina con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) para producir la liberación del plásmido de las bacterias, dejando aparte el ADN cromosómico junto con restos de pared celular. Una vez que estos restos son separados, se purifica el ADN plasmídico a partir de la solución remanente. Se utilizaron dos técnicas, una de bajo costo y casera (Sembrook and Russell, 2001), utilizada para verificar ausencia de contaminación o para obtener plásmidos para posteriores transformaciones, y la otra mediante un kit comercial de Qiagen, utilizado para obtener plásmido con una pureza considerable, adecuado para su secuenciación o posteriores manipulación en biología molecular.

ii) Tratamiento de bacterias para conferirles competencia

En este trabajo se utilizaron huéspedes bacterianos de expansión de plásmido (JM109) y de expresión de proteínas (BL21 DE3) de Novagen, derivados de líneas de *E. coli*; para cualquiera de los dos casos se requiere la incorporación del plásmido en las bacterias mediante el proceso de “transformación”, para lo cual previamente debe manipularse las mismas para ser aptas para tal paso, o sea hacerlas “competentes”.

La competencia de las bacterias se logra con un crecimiento a baja temperatura (24 °C) hasta una DO de 0.6 a 630 nm, y posteriores lavados con soluciones de $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$, el primer paso de este proceso altera la composición lipídica de la membrana, haciéndola mas “permeable” al plásmido, se postula que $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$ compleja la membrana facilitando el pegado del plásmido y posterior introducción del mismo a la bacteria (Lederberg and Cohen, 1974) una vez obtenidas se las guarda en solución con glicerol esteril al 20% a -80 °C. Este protocolo es muy sencillo y económico, pero la eficiencia de transformación es baja y pierden la competencia muy rápidamente. Otra técnica para obtener bacterias competentes es usando soluciones con RbCl , (Sembrook and Russell, 2001) obteniéndose bacterias altamente competentes, pero que pierden la competencia rápidamente y el costo de las sales de rubidio es bastante elevado.

iii) Transformación

El método por el cual se introduce plásmido dentro de bacterias se denomina transformación, y puede ser realizado por electroporación o shock térmico. El utilizado en este trabajo fue transformación por shock térmico. La técnica consiste en poner en contacto 0.2 ml de bacterias competentes con una solución del plásmido que no supere los 20 μl , por el término de 30 minutos a 4 °C, y luego se transfiere el tubo a un baño a 42 °C durante 90 segundos. Inmediatamente se pone el tubo en hielo y se le agrega 0.8 ml de medio SOC. Se incuba a 37 °C durante una hora, y por último se centrifuga para obtener un precipitado de bacterias, las cuales se toman con una punta de pipeta y se distribuyen en una placa de agar al 1.5 % con medio Luria- Bertani (agar -LB), mas el antibiótico adecuado (en nuestro caso Kanamicina 30 $\mu\text{g/ml}$). Se deja la placa a temperatura ambiente por una hora, para luego incubarla por 24 horas a 37 °C para que desarrollen las bacterias transformadas, que van a ser aquellas que poseen resistencia al antibiótico por tener el plásmido. Luego se toman una a una las colonias y se las crece en medio LB líquido con

antibiótico; la mitad de medio se separa para comprobación del proceso (purificación del plásmido y análisis de secuencia ó expresión), y el resto se guarda en glicerol 20% a -80°C para su conservación.

Medio de cultivo Luria –Bertani (LB): 10 gr de triptona bacteriológica
5 gr de Extracto de levadura
10 gr de NaCl

Se lleva a pH de 7.4 y a volumen de un litro, para luego esterilizar por 15 minutos a 120°C.

Medio SOC: 20 gr de triptona bacteriológica
5 gr de Extracto de levadura
5 gr de Na Cl
Glucosa 20 mM.

Se lleva a volumen de un litro y se esteriliza por filtración

iv) Construcción de los mutantes de apoA-I

La amplificación de cadenas de ácidos nucleicos ha sido posible gracias al acceso de oligonucleotidos de origen sintético y a la obtención de polimerasas, este hecho ha logrado la clonación, y modificación de genes *in vitro* y en forma rápida, gracias a la denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la que permite obtener, de una región determinada del genoma, millones de copias, siempre que una parte de su secuencia sea conocida. La técnica consiste básicamente en diseñar en una primera etapa dos oligonucleotidos iniciadores o “primers” a partir de la secuencia conocida, cada uno complementario a una de las hebras de la doble hélice y en extremos opuestos. El éxito de la técnica se logra gracias al uso de una DNA polimerasa aislada de una bacteria termófila que es estable a muy altas temperaturas, de forma tal que no se desnaturaliza al aumentar la temperatura en sucesivos ciclos. Cuando se calienta la doble hebra y posteriormente se enfría en presencia de exceso de los “primers”, se logra que estos oligonucleótidos se hibridicen o “peguen” con las secuencias complementarias de DNA genómico, y luego que, en presencia de los cuatro desoxinucleótidos y de la DNA polimerasa, se elonge la secuencia flanqueada por los primers. Cuando se repite el procedimiento los fragmentos recién sintetizados sirven de moldes, y en pocos ciclos el producto que predomina es una secuencia única de DNA cuya longitud corresponde a la distancia de nucleótidos que hay

entre los primers (ver Fig. III-4), cada ciclo toma por lo general unos 5 minutos, por lo que el procedimiento completo lleva unas pocas horas. El esquema general de la técnica se muestra en la Fig. III-4 (Sembrook and Russell, 2001).

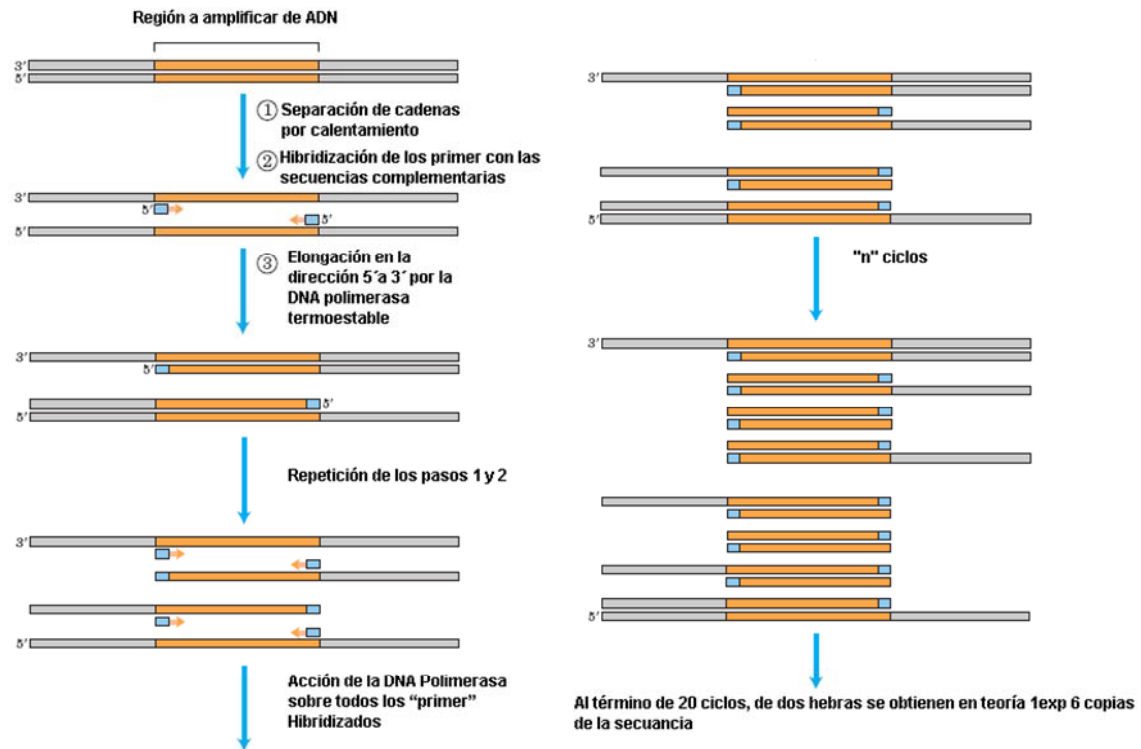


Fig.III-4 . Esquema de amplificación de una secuencia de ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Con una modificación de esta técnica se logra introducir un mutación, ya sea eliminando, agregando o cambiando los codones que codifican para aminoácidos, además de la amplificación de una región o secuencia de ADN genómico.

En este trabajo, incorporamos mutaciones puntuales en sobre la secuencia de apoA-I inserta en vector plasmídico, utilizando en la reacción de PCR oligonucleótidos o primers complementarios que poseen el cambio requerido (ver Fig. III-5).

Uno de los objetivos propuestos fue la construcción de una serie de mutantes de apoA-I conteniendo un único residuo de Triptofano en diferentes posiciones de su región central, a fin de estudiar la conformación de esta región y su mecanismo de inserción en membranas.

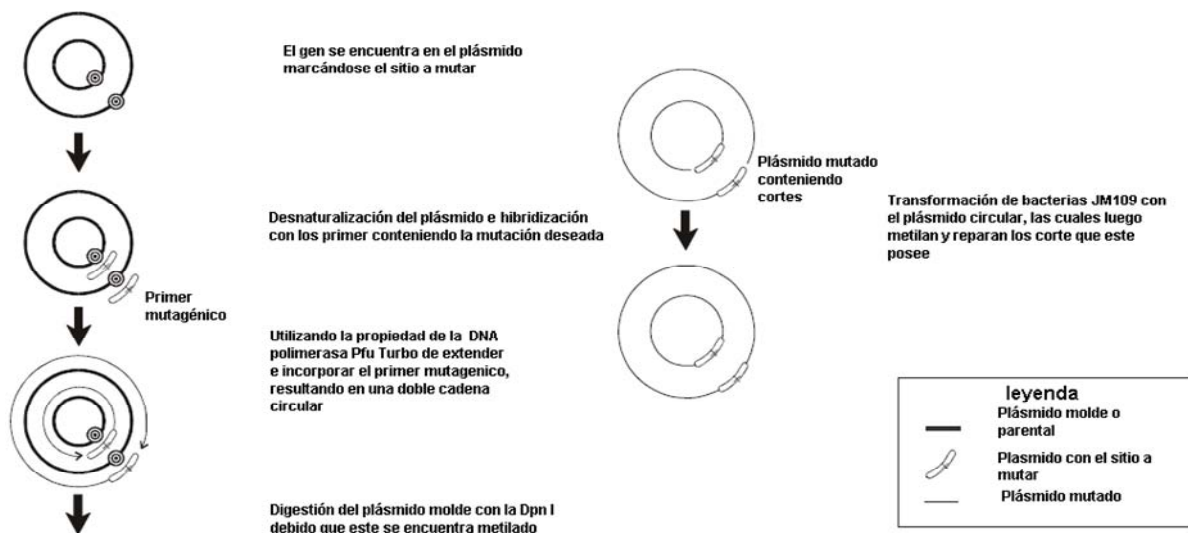


Figura. III-5: esquema de PCR modificada en donde se logra la mutación de un gen en un sitio específico

Se realizó la construcción de estos mutantes por mutagénesis sitio dirigida usando el kit comercial “Quick-Change” de Stratagen. En este método se utiliza una ADN polimerasa (PfuTurbo) de muy baja tasa de error, lo que permite realizar la reacción de PCR sobre el plásmido completo. El plásmido pET 30 conteniendo el inserto del cDNA de un mutante libre de residuos Trp (W@Ø) fue utilizado como plantilla para lograr las mutantes finales con una única ronda de mutagénesis. Esta construcción molde fue donada por el Dr WS Davidson de la Universidad de Cincinnati, OH, USA. Seis juegos de oligonucleótidos iniciadores complementarios (cumpliendo los requerimientos de temperatura de fusión recomendados por los fabricantes del kit) fueron diseñados para introducir un codon para triptofano individualmente en cada una de las seis posiciones ocupadas por un residuo hidrofóbico en la región central de apoA-I (W@90, W@93, W@97, W@101, W@104 y W@108), y fueron sintetizados en el Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oklahoma State University, Stillwater, OK, USA. Estos mutantes, al igual que la Wild Type, poseen una secuencia de pre-pro apoA-I junto con una secuencia de poli Histidina en la región N- Terminal; esta secuencia pre-pro (5 amino ácidos) existe en la construcción, ya que mejora notablemente los niveles de expresión en bacterias sin alterar la funciones de la proteína (McGuire et al., 1996) Para eliminar esta secuencia junto con la de poli Histidina se le ha insertado un sitio de

reconocimiento de corte para la enzima IgaS, cuya especificidad de corte es mucho mejor que la de la enteroquinasa, presente en la forma Wild Type.

Una vez realizadas las rondas de PCR, en presencia de las secuencias iniciadoras complementarias mencionadas, se digiere el producto con enzima de restricción DpnI que elimina el plásmido molde ó “template” y el producto de la digestión se transforma en bacterias competentes JM109, con el objetivo de expandir el plásmido para posterior extracción por lisis alcalina y así verificar por secuenciación la introducción de la mutación deseada. Las muestras se envían a secuenciar mediante métodos estándares y se analizan con ayuda de programas clásicos (Gene-runner). Una vez verificada la secuencia, se transforma células (BL21 (DE3)) con el plásmido conteniendo el inserto deseado para llevar a cabo la expresión de la proteína.

v) Expresión y purificación

Una vez que los plásmidos fueron introducidos en las bacterias BL21 y verificado que las bacterias crecidas en las placas no eran contaminaciones se buscaron las condiciones de expresión y purificación. Las de mejor resultado consistieron en hacer un plaqueo en medio LB/agar con antibiótico (kanamicina), luego crecer una colonia en 5 ml de medio líquido toda la noche (ON), para después inocular 1 ml de estas bacterias en un erlenmeyer con 500 ml de medio líquido. El crecimiento se continúa hasta una densidad óptica (DO) de 0.6 a 650 nm para inducir a continuación la expresión con 0.4 μ M IPTG. Se deja induciendo por el término de dos horas, se centrifuga y colecta todas las bacterias, y al pellet de bacterias se las lisa incubando durante 4 hs con solución de guanidina HCl 3 M, ya que una gran cantidad de proteína expresada se deposita en los cuerpos de inclusión. Se centrifuga para eliminar membranas y restos celulares, y se dializa contra 1000 volúmenes de buffer Fosfato de Potasio 50mM, NaCl 500mM, pH 7.4 con tres cambios del buffer. Al término de la diálisis se vuelve a centrifugar para eliminar todas las proteínas insolubles en medio acuoso. El sobrenadante, si bien está muy enriquecido en la proteína recombinante, tiene una proporción considerable de contaminantes, que se eliminan por elusión a través de columnas de afinidad de metales inmovilizados (IMAC). Las proteínas mutantes quedan adsorbidas a la matriz de la columna por afinidad con la cola de poli Histidina, y, posteriormente se eluyen por competencia con buffer con Imidazol.

vi) Eliminación de la secuencia de fusión mediante corte con enzima proteolítica

El vector pET30, como se mencionó, presenta directamente adyacente al sitio de clonado de la proteína de interés, una secuencia que codifica para un péptido con un dominio polihistidina para facilitar la purificación. El clon de la apoA-I inserto corresponde a la pre-pro apoA-I ya que de esta forma se puede obtener gran cantidad de proteína. Si bien se ha demostrado que el pre-pro péptido adicional no cambia las propiedades de apoA-I, posee un residuo de Trp que interfiere con las mediciones a realizar. Ya que las proteasas (como enteroquinasa) ampliamente usadas con el propósito de clivar proteínas de fusión producen proteólisis inespecífica de apoA-I, el inserto contiene un sitio de reconocimiento para la enzima proteolítica IGASA, diseñado de manera tal de eliminar simultáneamente el pro-péptido. La reacción de proteólisis con esta enzima es bastante específica, pero muy dependiente de las condiciones usadas, siendo las de mejor resultado una incubación por 24 horas a 32 °C en buffer tris 20mM, EDTA 5 mM, pH 7,8; la reacción se termina con un agente inhibidor de proteasas, el PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride).

2. Técnicas electroforéticas

Cuando una molécula cargada es sometida a un campo eléctrico, ésta migrará a una velocidad que dependerá del tamaño, carga neta, forma y viscosidad del medio en el cual se mueve (Laemmli, 1970). Por lo tanto establecidas las condiciones de pH y fuerza iónica, cada molécula migrará a una única posición dentro del campo eléctrico. En la separación de moléculas de ácidos nucleicos el soporte utilizado es un gel de agarosa, mientras que para la separación de proteínas el soporte utilizado es una matriz polimerizada de acrilamida y N,N'-metil-bis-(acrilamida) (PAGE) en buffer glicina usando como iniciador tetrametilnamida (TEMED) y como catalizador persulfato de amonio. Este tipo de geles es mecánicamente fuerte, termoestable y químicamente inerte. El efecto tamiz aumenta la resolución y puede graduarse fácilmente el tamaño del poro, modificando las cantidades de agente soporte.

2.1. Geles de agarosa:

La electroforesis de geles de agarosa se utilizó en la separación de fragmento de DNA en base a su peso molecular y a su grado de empaquetamiento; los fragmentos más pequeños migran más rápido que los de mayor tamaño, y la distancia recorrida en el gel es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular. De esta manera el tamaño puede ser determinado por calibración del gel con estándares de peso molecular conocido y comparando las distancias que migran los fragmentos desconocidos.

Preparación del gel: se realizaron geles horizontales, con solución de agarosa al 0.8% en buffer TBE. Dado que la agarosa se disuelve en caliente, se prepara primero la suspensión de la misma y se la calienta en horno de microondas agitando cada 15 seg hasta que no se observan más “grumos” de agarosa. Una vez logrado una solución homogénea se la deja enfriar hasta unos 60 °C y se la vuelca en la cama horizontal del gel, colocando el peine para formar los pocillos de siembra y dejando enfriar hasta que gelifique. Una vez logrado esto último se coloca el gel en la cuba electroforética y se la cubre con buffer TBE.

Siembra de muestras: se siembran 5 ul de las mismas (lo ideal es que tenga unos 20 ng de ADN por banda para evitar distorsiones) con 1 ul de “loading buffer” y se corre a 100 vol hasta que el frente haya recorrido aproximadamente el 80% del tamaño del gel. Para observar la presencia de ácidos nucleicos se incuba el gel por 30 minutos en solución de

bromuro de Etidio al 10% en TBE, para luego observar las bandas por medio de luz UV de un trans iluminador.

Las soluciones utilizadas fueron:

- Solución de TBE (Tris 50 mM- Boro 50 mM- EDTA 1mM) pH 8
- Loading Buffer (6X: NaOH 300mM, 6 mM EDTA, 18 % p/v ficoll, 0.15 % p/v verde de Bromo cresol, y 0.25 % p/v Xileno Cianol)

2.2. Geles de Poliacrilamida:

Los geles PAGE fueron utilizados para la determinación de pureza y pesos moleculares de proteínas y/o complejos lipoproteicos; para esto se utilizaron básicamente dos tipos de procedimientos: uno en condiciones nativas y con gradiente de poliacrilamida, en donde cada proteína migra dependiendo de la relación carga/masa hasta que el tamaño del poro impide su migración; la otra variante es en condiciones desnaturizantes con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (SDS-PAGE), en donde la matriz tiene una composición constante, pero todo el sistema posee un detergente como agente desnaturizante; éste desestabiliza toda interacción no covalente de la proteínas combinándose en una relación estequiométrica (por cada 2 aminoácido 1 de SDS), independizando la carga neta que tendría la proteína a ese pH, y por lo tanto siendo la migración dependiente solamente del tamaño de la molécula.

Los protocolos de estos sistemas son:

- Sistema de gel nativo para proteínas (PAGE):

El método utilizado es el de Laemmli (Laemmli, 1970). Consiste en un sistema vertical discontinuo que posee dos geles contiguos, pero distintos: el gel separador por debajo y el gel de siembra por encima, ambos distintos en fuerza iónica, pH y tamaño de poro. Esta discontinuidad sirve para concentrar grandes volúmenes de muestra en el gel de siembra, resultando en una mejor resolución final. El gel de siembra se preparó con una concentración final de 4% p/v de acrilamida, la cual se polimeriza resultando el tamaño de poro no limitante. El gel separador implica un gradiente lineal de concentración que va de 4% a 25% p/v en acrilamida. Las proteínas se detectaron coloreando con solución de Coomassie, ó tinción de plata en caso de que la cantidad de proteína sea inferior a la detectada con la primer técnica.

- Sistema de gel desnaturizante (SDS-PAGE):

Posee como el anterior dos geles contiguos, uno separador y otro resolutivo diferenciándose en las condiciones de pH, fuerza iónica y tamaño de poro, el primero posee las mismas condiciones que el nativo, excepto que posee el agente desnaturizante SDS a una concentración de 0.1% p/v. El gel resolutivo consiste en un gel continuo de concentración constante, lo cual indica que el tamaño del poro es igual a lo largo del gel, este tamaño se logra variando la concentración final de acrilamida, y como el gel de siembra, posee SDS en una concentración de 0.1%. La muestra es tratada con buffer muestra que posee SDS (0.1%) y se la hierva por el término de 3 minutos, para luego correr el gel a 140 voltios. Hay que tener en cuenta que en este tipo de “corridas” la proteína no llega hasta el poro límite. La tinción es similar que en caso anterior.

Este tipo de sistemas es útil para resolver muestras de proteínas desde 15 kD y como hemos trabajado con péptidos de tamaño menor, utilizamos un sistema que resuelve mejor mezclas de péptidos pequeños denominados geles de Tricina (Schägger and Jagow, 1987) que, aparte del gel de siembra, posee dos geles contiguos de concentraciones diferentes, denominándose el primero espaciador (spacer) y el siguiente resolutivo (resolving), todos preparados en las mismas condiciones de pH y fuerza iónica; en este caso el buffer catódico posee tricina pero no el anódico.

Las soluciones utilizadas son:

Geles PAGE y SDS- PAGE

- _Acrilamida (40% p/v)/Bis Acrilamida (0.8%)
- _Buffer de gel siembra: Tris-HCl 0.125M pH 6.8
- _Buffer de gel separador: Tris-HCl 0.375M pH 8.8
- _Iniciador: Persulfato de amonio (10mg /100µl)
- _Catalizador: TEMED
- _Buffer de desarrollo: Tris-Glicina 0.025 M- Tris 0.192 M Glicina. PH 8.3.
- _Colorante: Coomassie Blue g-250, 0.1 %, en ácido acético 10%, metanol 40%
- _Buffer muestra: Tris 0.062M, glicerol 10%, azul de bromo fenol (0.05 mg/ml), pH 6.8

Los SDS-PAGE poseen todas las soluciones SDS de concentración 0.1%

Geles Tricina (con SDS):

- _ Acrilamida (40%p/v)/Bis Acrilamida (1.5%)
- _Buffer de gel: Tris 0.3M, pH 8.45, SDS 0.3%
- _Buffer Anódico: Tris 0.2M, pH 8.9, SDS 0.3%

- _Buffer Catódico: Tris 0.1M, Tricina 0.1M pH 8.25, SDS 0.3%
- _Iniciador: Persulfato de amonio (10mg /100µl)
- _Catalizador: TEMED
- _Buffer de desarrollo: Tris-Glicina 0.025 M- Tris 0.192 M Glicina. pH 8.3.
- _Colorante: Coomassie Blue g-250, 0.1 %, en ácido acético 10%, metanol 40%
- _Buffer muestra: tris0.062M, glicerol 10%, azul de bromo fenol (0.05 mg/ml), pH 6.8

3. Determinación de concentración de proteína

La determinación de concentración de proteínas fue realizada en todos los casos midiendo la absorbancia a 280 nm, después de determinar el espectro de absorción de cada proteína desde 200 a 400 nm Este método fue elegido ya que al conocerse la secuencia de la apoA-I y de sus mutantes, se puede calcular su coeficiente de extinción dado por diversos programas accesibles por internet (www.expasy.org). Este tipo de programas calcula el coeficiente partir de la contribución individual de los aminoácidos (Trp, Tyr, Phe y Cys) de la secuencia suponiendo que se comportarán igual que en la proteína entera; se estima que el error cometido es menor al 5 % (Gill and von Hippel, 1989). Otras de las ventajas de este método es que no se pierde muestra y del espectro se puede observar la calidad de la misma. Este método se ha comparado con los convencionales Lowry y/o Bradford, no observándose diferencia significativa, más allá de las limitaciones de estos últimos.

4. Técnicas Espectroscópicas

4.1. Resonancia Electrónica Paramagnética (EPR)

La mayor cantidad de moléculas o átomos poseen todos sus electrones apareados a los que se denominan diamagnéticos, sin embargo en los sistemas biológicos existen dos clases de moléculas que poseen electrones desapareados, denominados paramagnéticas: radicales libres, y metales de transición. La característica básica de la Resonancia Electrónica Paramagnética es su capacidad de detectar electrones desapareados, siendo la propiedad esencial detectada el momento magnético asociado con el spin del electrón.

Si se coloca una sustancia en un campo magnético de intensidad H , el campo inducido B dentro de la misma, está dado por

$$B = H + 4 \pi M = \mu H \quad (1)$$

siendo M la magnetización, o momento dipolar magnético por u. de volumen, y μ la permeabilidad. Para materiales no ferromagnéticos, se cumple que $M = \chi H$, donde χ es la susceptibilidad por u. de volumen.

Si se divide la ecuación anterior por H , entonces tenemos $\mu = 1 + 4 \pi \chi$, Si la susceptibilidad χ no depende del campo aplicado y además es positiva, la sustancia es paramagnética y concentra las líneas de fuerza dentro de la sustancia, si es negativa, la sustancia es diamagnética y dispersa las líneas de fuerza.

Para cada electrón desapareado, el espín es $S = 1/2$ y su energía sin campo eléctrico es E_0 , cuando se aplica un campo los espines de los electrones se acomodan paralelos o antiparalelos al campo aplicado, siendo su energía

$$E = E_0 + m_s \cdot g \cdot \mu_B \cdot B \quad (2)$$

(interacción Zeeman) en donde m_s es la proyección del espín del electrón en la dirección del campo y toma los valores $+1/2$ y $-1/2$, g (factor espectroscópico) y μ_B (magnetón de Bohr que convierte las unidades de momento angular en momento magnético) son constantes, y B es el campo que “ve” el electrón (McMillan, 1975).

La representación esquemática de los niveles energéticos que pueda adquirir cada electrón en función del campo H se muestra en la figura III-6 a continuación.

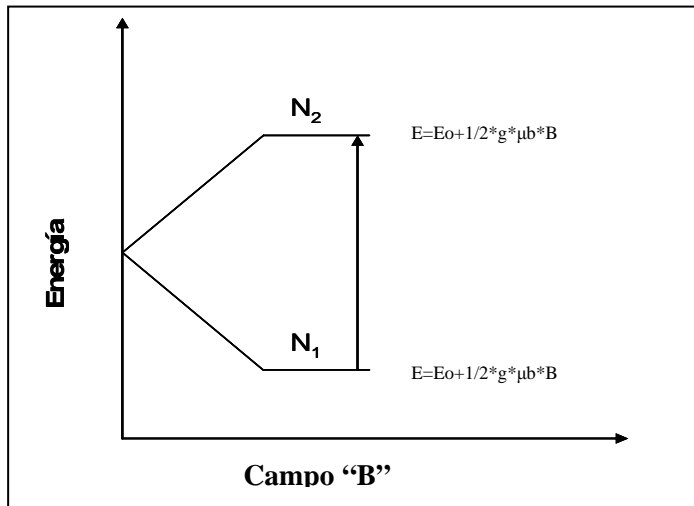


Fig.III-6. División de niveles de energía en un campo magnético

La diferencia de energía que existe entre los dos niveles está dada por

$$\Delta E = g \cdot \mu_b \cdot B \quad (4)$$

Si conjuntamente con el campo magnético externo se aplica una radiación electromagnética, esta será absorbida y se inducirá la transición del nivel inferior al superior, y se producirá la condición de resonancia cuando el cuanto radiación de valor $h \cdot \nu$ (donde h y ν son la cte de Plank y la frecuencia de la radiación) sea igual a:

$$h \cdot \nu = g \cdot \mu_b \cdot H \quad (5) \quad (\text{en las ecuaciones puede aparecer indistintamente } H \text{ o } B, \text{ ya que estrictamente es } B \text{ es el valor de campo que "ve" el electrón}).$$

Así los espectros de EPR pueden ser determinados igualmente manteniendo la intensidad del campo magnético aplicado H y variando la frecuencia de radiación ν ; o la inversa, manteniendo fija la frecuencia de radiación ν y variando el campo B . Ya que los generadores de microondas (válvulas o diodos Gunn) solo pueden "barrer" un estrecho margen de frecuencias (8-10 GHz), normalmente se utiliza la opción de "Barrer" el campo magnético. De esta última manera es como funciona la mayoría de espectrómetros de EPR. De acuerdo con la última ecuación (5) la condición de resonancia se podrá cumplir con cualquier radiación electromagnética, simplemente aplicando la adecuada intensidad del campo. Sin embargo la intensidad de absorción depende de la diferencia de población entre los niveles, por lo que la distribución de población está dada por la diferencia de energía entre los niveles a una determinada temperatura:

$$N_2/N_1 = e^{-h \cdot \nu / kT} \quad (6).$$

Así para aumentar la sensibilidad del método se trabaja a alta intensidad de campo (como ser a 0.3- 1.2 T) y de ser posible, a baja temperatura. En general los

espectrómetros trabajan en la región de microondas (como ser entre $9 \cdot 10^9$ - $3.6 \cdot 10^{10}$ HZ, correspondiente a longitudes de onda que van desde 3.0 a 0.75 cm). La señal detectada en los espectros de EPR se analiza como la derivada del espectro de absorción.

La señal detectada en los espectros de EPR se analiza como la derivada del espectro de absorción. Muchos tipos de interacciones pueden ocurrir en un sistema paramagnético, dependiendo de la naturaleza del sistema y del medio en que se encuentra. Las interacciones pueden ser intra- ó intermoleculares, estas últimas pueden ser evitadas usando muestras en que la sustancia paramagnética está lo suficientemente diluida en una sustancia diamagnética. Para un único electrón desapareado, una interacción de Zeeman pura producirá únicamente dos niveles de energía, y el espectro de EPR consistirá en una sola línea de absorción. Además de la interacción de Zeeman, puede ocurrir interacción entre el electrón y el momento magnético del núcleo (acoplamiento hiperfino), y en caso de moléculas con más de un electrón desapareado, pueden ocurrir interacciones entre sus spines. En ambos casos se puede producir una separación en varias líneas de absorción (splitting). Solamente se va a discutir la interacción entre los electrones desapareados con su núcleo, ya que los marcadores de spines utilizados, poseen solamente un electrón desapareado.

La interacción hiperfina surge de la interacción entre el electrón desapareado con el momento magnético del núcleo del algún átomo con el cual su orbita está asociada cuando este electrón siente un campo magnético adicional debido a las $2I+1$ orientaciones posibles que puede asumir el momento magnético del núcleo. Para un electrón desapareado interactuando con un núcleo de spin I , se producirá la separación de cada nivel Zeeman en $2I+1$ diferentes subniveles.

Si por ejemplo el espín del electrón es $1/2$ y el del núcleo es $1/2$, el electrón va a experimentar un efecto conjunto con el campo aplicado y con el inducido por el núcleo, y la energía de los electrones sería:

$$E = E_0 + m_s \cdot g \cdot \mu_B \cdot B + m_s \cdot m_I \cdot A \quad (7)$$

en donde m_s es la componente z del electrón, y m_I la componente z del del núcleo. Por ejemplo, para un electrón que interactúa con un núcleo de $I = 1/2$, el espectro en este caso será de dos líneas de igual intensidad, y la separación entre las líneas será proporcional a la interacción núcleo-electrón que se denomina constante de acoplamiento hiperfino (“ A ” en la ecuación 7) y no depende del campo aplicado siempre que éste sea lo suficientemente

fuerte para cuantificar por separado los momentos magnéticos del electrón (S) y del núcleo (I); esto no se cumple cuando los spines nucleares y electrónicos se acoplan para dar un solo número cuántico “F”

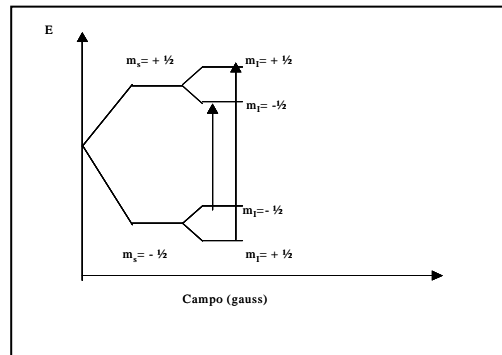


Fig.III-7: esquema en como se dividen los niveles Zeeman por interacción del electrón desapareado con el momento magnético nuclear $I=1/2$

Los átomos que constituyen los sistemas biológicos con spines nucleares no nulos son el H ($I=1/2$), N($I=1$), F ($I=1/2$), el C y el O en sus isótopos abundante no poseen, pero si lo poseen los isótopos ^{13}C ($I=1/2$) y ^{17}O ($I=5/2$)

Las transiciones posibles son $\Delta m_s=1$ $\Delta m_I=0$

La medición del espectro nos permite obtener información sobre el medio ambiente que rodea al electrón desapareado. Existen dos tipos de interacciones que pueden contribuir a la forma del espectro: Interacciones “spin-Lattice”, y las interacciones “spin-spin”. Las primeras representan las interacciones que tienen lugar entre el electrón y el medio ambiente que lo rodea, ya sea de la red cristalina o del resto de la molécula en que se encuentra. Estas interacciones hacen que la energía captada por el electrón se relaje en el medio ó sistema molecular y por lo tanto el proceso es continuo. Este proceso acorta los tiempos de vida de los niveles excitados produciendo (por el principio de incertidumbre) un ensanchamiento de líneas espectrales. El tiempo de correlación longitudinal ó de spin-lattice (T_1) es el tiempo que lleva a perder el electrón $1/e$ de la energía absorbida y está relacionado con la inversa del ancho de banda. Cuando existe baja intensidad de radiación (para evitar saturación del sistema), El otro mecanismo, la interacción spin-spin, que modula la energía sin causar transiciones, mantiene la energía de Zeeman constante en contraste con la interacción spin-lattice y está caracterizado por el tiempo de correlación transversal (T_2), produciendo una curva de absorción Lorentziana, cuyo ancho es directamente proporcional con la distancia de pico apico de la curva derivada. Los dos

mecanismos producen una de curva de absorción Lorentziana, que esta relacionada directamente proporcional con la distancia de pico a pico de la curva derivada.

Las interacciones spin-spin están relacionadas con todos los mecanismos por los cuales los electrones pueden intercambiar energía entre ellos, una aplicación de la medida de esta interacción es poder medir la difusión transversal y no serán discutidos en este trabajo.

Efecto de movilidad en los espectros de EPR

Los espectros de EPR para un mismo marcador son distintos si éste se encuentra en una estructura cristalina o si se encuentra en solución. La separación hiperfina consiste básicamente en dos tipos de interacciones. La primera puede asemejarse a la clásica interacción dipolo-dipolo entre los momentos magnéticos del spin electrónico y el nuclear. Esta interacción tiene una variación angular dada por $3\cos^2\theta-1$, que tomará los valores de 2 a -1 cuando θ tome valores entre 0 y $\Pi/2$. El segundo tipo de interacción es la de contacto o de Fermi (Berliner, 2002), (Ingram, 1969) este contacto es independiente del ángulo entre el campo magnético aplicado y la particular orientación del marcador. La interacción dipolar magnética entre los electrones desapareados causa un corrimiento del campo que siente cada electrón, causando una dispersión de los campos de resonancia.. Si se tiene una estructura cristalina con las moléculas paramagnéticas perfectamente orientadas, tanto el valor de g (factor descrito anteriormente) como las interacciones hiperfinas dependerán de la orientación relativa del campo aplicado y la del eje del campo eléctrico interno de la estructura cristalina o de cualquier determinante de estructura. Entonces, si se rota el cristal en el campo magnético se obtendrán distintas intensidades de campo de resonancia como así también distintas separaciones hiperfinas. Si por lo contrario las moléculas están orientadas al azar en un sólido o en un medio de muy alta viscosidad, el espectro será la suma de los espectros individuales para cada orientación y habrá así un gran ensanchamiento de la línea de absorción.

En el caso de soluciones en estado líquido, las moléculas están orientadas al azar tanto respecto al campo como a las otras moléculas. Todas las moléculas se están moviendo rápidamente, de manera tal que las moléculas cercanas a un electrón desapareado cambian rápidamente de posición en un tiempo mucho más corto que el requerido en la transición del spin electrónico. Esto hace que la contribución del entorno al campo magnético del electrón desapareado sea un promedio de todas las interacciones

producidas por todas las moléculas en el transcurso de la transición. Un promedio de $3\cos^2\theta-1$ sobre todos los ángulos será igual a cero. Por lo tanto si la movilidad de las moléculas paramagnéticas es suficientemente rápido, todos los electrones desapareados sufrirán un mismo campo dipolar producido por su entorno, el cual ha sido promedio a cero por tales movimientos.

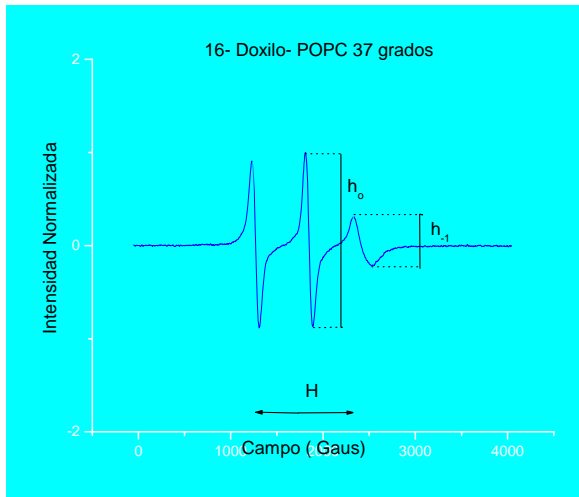
De esta manera el ancho de líneas de absorción puede ser ampliamente reducido por efecto del movimiento, y es por esto que los espectros en soluciones líquidas pueden ser de muy alta resolución, comparada con el mismo marcador en sólidos no orientados, en donde se obtiene líneas muy anchas. Con estados intermedios de movilidad, de manera que las orientaciones ocurren en tiempo comparable con la transición de spin, se logran espectros intermedios, es por esto que los espectros de EPR de sustancias paramagnéticas son sensibles a la movilidad y al grado de orientación de las moléculas. Teniendo en cuenta las anisotropías, la energía de los distintos niveles en ausencia de interacción spin-spin estará dada por el Hamiltoniano

$$H = \mu_b \cdot B \cdot G \cdot S + S \cdot A \cdot I \quad (8)$$

donde S e I son los operadores de los spines electrónico y nuclear, y G y A son los tensores g e hiperfino respectivamente.

El primer término representa las interacciones de Zeeman y el segundo se debe a la interacción hiperfina. Si se define un sistema de coordenadas, los componentes de los tensores G y A en las tres direcciones pueden calcularse introduciendo la sustancia paramagnética, y determinando el espectro de EPR en las tres direcciones respecto del campo magnético. Conociendo estos componentes principales, se puede calcular los valores esperados de g y de la separación hiperfina para cualquier orientación (Berliner, 1976). Esta anisotropía en los valores de G y de A son las bases para el cálculo del parámetro de orden S en membranas (Seelig, 1970).

Cuando una molécula paramagnética sufre movimiento isotrópico rápido en comparación con el tiempo asociado a una transición de spin, pueden desarrollarse ecuaciones para medir el tiempo de correlación τ para la rotación de la molécula (Morse II, 1986) directamente de la derivada del espectro, dado por la siguiente formula.



$$\tau_c = K * \Delta H * [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1]$$

Fig.III- 8: espectro de EPR de Doxilo en donde se muestra los parámetros medidos, ΔH es el ancho de pico central, mientras que h_0 y h_{-1} son las amplitudes de los picos de las líneas central y de campo alto

El tiempo de correlación rotacional puede ser utilizado para calcular la micro viscosidad aparente del medio de acuerdo a la ecuación de Stokes-Einstein, rigurosamente válido para cuando el marcador es mucho mayor que el solvente.

Pequeñas moléculas en medio isotrópico pueden sufrir movimientos anisotrópicos, (Goldman et al., 1972), (Hwang et al., 1975) caracterizándose así por lo menos dos tiempos de correlación, uno que caracteriza la rotación a través del eje principal de la molécula y otro que caracteriza el movimiento de dicho eje (Goldman et al., 1972), pero en sistema de membranas el calculo del tiempo de correlación es inexacto debido al ordenamiento de la molecular.

Marcadores de spin

Los marcadores de spin que usamos son radicales libres estables derivados del nitrógeno denominados nitroxilo, como ser Tempo y Doxil, (ver figura III-9 a y b respectivamente). Estos son estables gracias al efecto protector que le confiere el estar unido a un carbono terciario. El primero es anfifílico, mientras que al segundo se lo suele unir a un ácido graso para hacerlo liposoluble, la estabilidad es tal que no son casi reactivos, además de ser estables en un amplio rango de pH como así hasta 80°C. El espectro de estos marcadores comprende tres líneas dadas por la interacción del electrón $2p\pi$ de la unión N-O y el núcleo del ^{14}N ($I=1$)

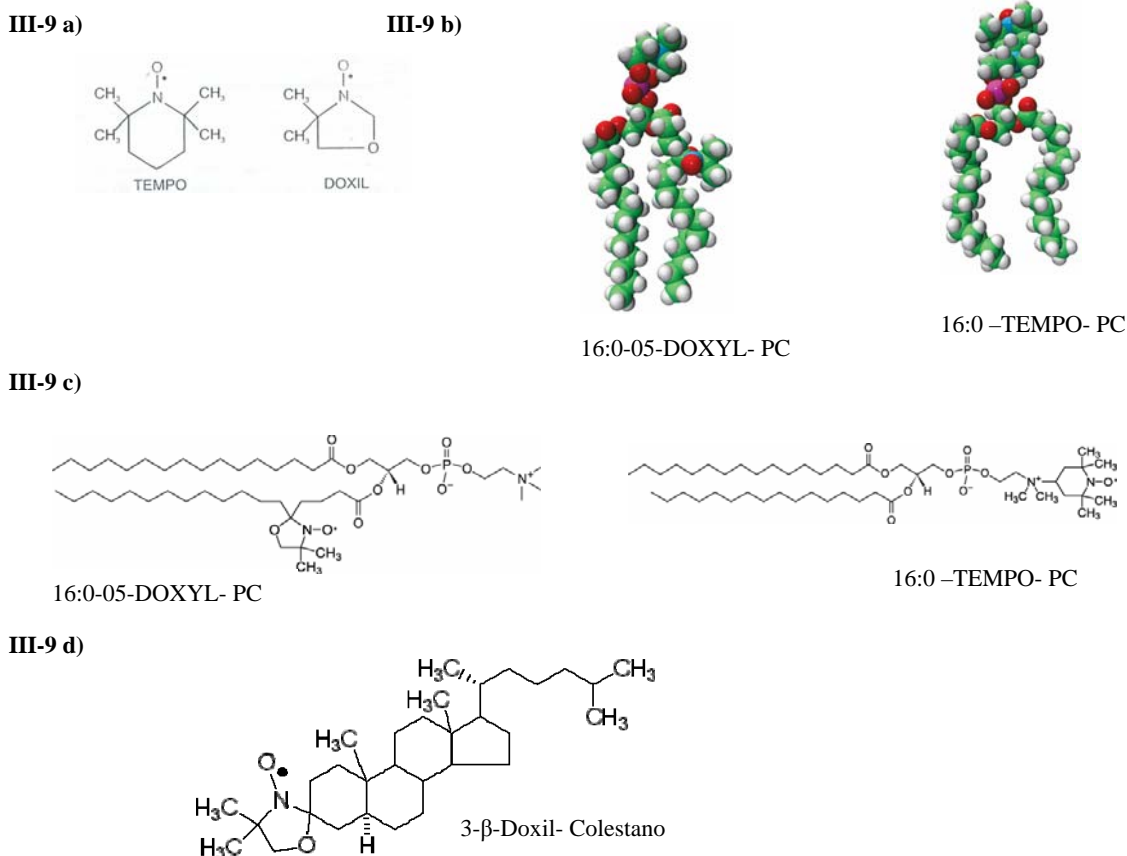


Fig III-9: se muestra en la fig. 9 a la estructura en línea de los marcadores de spin utilizados, mientras que en la 9 b y en la 9c se muestran algunos derivados utilizados en sistemas lipídicos. 9 d) 3-β-Doxil-Colestano

Estos marcadores se encuentran unidos químicamente a distintas moléculas, el tiempo se encuentra unido en fosfolípidos en la cabeza polar, mientras que el grupo Doxilo se encuentra sustituyendo al carbono *n* de un ácido esteárico libre o unido a un fosfolípido. Según el carbono que se encuentra sustituido se denomina *n*-doxil-ácido-esteárico, o su denominación en fosfolípido como ser 1-palmitoil- 2- *n*-doxil esterolil -*sn*-glycero-3-fosfatidilcolina, los cuales denominaremos *n*-Doxil-PC. En la figura III-9 se grafica dos derivados de gran utilidad. En consecuencia al aumentar el *n* el marcador se encontrará más sumergido en la región hidrofóbica; y si bien el anillo doxil tiene un considerable tamaño respecto a otras moléculas estudiadas, la baja proporción utilizada (menos del 0.3 % molar), permite suponer que no altera la estructura de los agregado que forma. Otro marcador de spin de gran utilidad es el 3-β-Doxil- Colestano, análogo de colesterol (fig. III-9d)

Parámetro de orden

Cuando los marcadores de los que hablamos son incorporados en sistemas lipídicos se ubican preferentemente con el eje molecular mayor paralelo a las cadenas alquílicas o acílicas de los otros lípidos y perpendicular a la superficie. El parámetro de orden es definido como una medida de distribución de las orientaciones moleculares respecto al eje de referencia, el cual es la perpendicular a la superficie determinado por la siguiente fórmula:

$S = (3 \langle \cos^2 \alpha \rangle - 1) / 2$, siendo α el ángulo entre la perpendicular a la superficie y la dirección del eje Z a lo largo del orbital $2p\pi$ de la unión N-O.

El parámetro de orden no involucra la velocidad de movimiento de los marcadores paramagnéticos, y asume que estos son suficientemente rápidos en el tiempo de transición spin-spin.

En el dibujo se muestran los posibles movimientos que puede tener un marcador de spin inserto en una membrana, el ángulo α es el forma con el eje z.

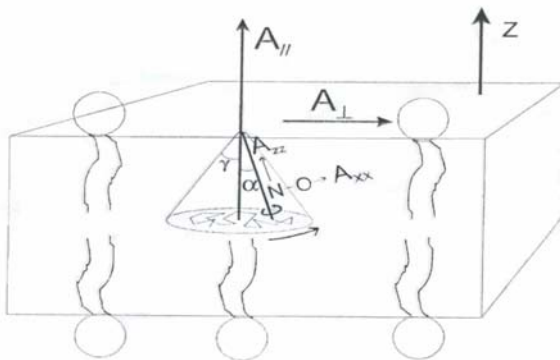


Fig.III-10: Movimiento de un grupo nitroxilo unido a una cadena carbonada de un ácido graso insertado en una membrana lipídica el ángulo α es el que forma el eje z del sistema de ejes del tensor hiperfino A del grupo nitroxilo con el eje normal Z de la bicapa. El cono 2γ es el espacio en el cual se tambalea el grupo nitroxilo debido a las isomerizaciones trans-gauche

El acoplamiento hiperfino medido resultante de la promediación de A_{zz} con A_{xx} y A_{yy} se denomina $A_{//}$, mientras que la promediación de A_{xx} y A_{yy} con A_{zz} se denomina A_{\perp} .

El parámetro de orden S en bicapas orientadas y cuando el eje z es paralelo al eje molecular como ocurre con nuestros marcadores, puede ser calculado por:

$$S = \frac{\text{Anisotropía observada}}{\text{Máxima anisotropía}} = \frac{(A_{//} - A_{\perp})}{(A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2)} \quad (10)$$

La máxima anisotropía se calcula con los valores principales del tensor para un monocristal, y si estos no se conocen se puede usar los valores de un sistema congelado,

multiplicando por un factor de corrección de polaridad. Los valores de anisotropía observada se calculan directamente del espectro.

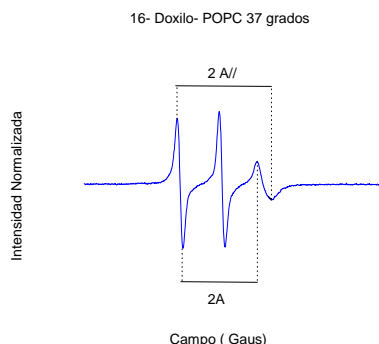


Fig. III-11 se muestra en la figura la derivada de un espectro de absorción de EPR, indicando cuales son los parámetros obtenidos del mismo para estimar el parámetro de orden

Cuando el sistema está ordenado el $A_{//}$ toma el valor de A_{zz} y $A_{\perp} = (A_{xx} + A_{yy})/2$ y en consecuencia $S=1$, cuando el sistema se empieza a desordenar $A_{//}$ disminuye por contribución de A_{\perp} , y A_{\perp} aumenta por contribución de $A_{//}$, y en consecuencia si está realizando movimientos isotrópicos rápidos, $A_{//}$ es aproximadamente igual a A_{\perp} y $S=0$

En nuestro caso hemos comparado el parámetro de orden de un mismo marcador en dos condiciones distintas, como se explicara mas adelante.

Método experimental utilizado

La técnica de EPR se utilizó con dos propósitos; el primero observar si la interacción con membranas artificiales de apoA-I y del péptido A 77-120 producen modificaciones en la movilidad u orden de sus lípidos constituyentes, para tal fin se utilizaron vesículas unilamelares (LUV), con y sin colesterol y a diferentes temperaturas, con diferentes marcadores de spin como se detallará mas adelante. El segundo de los propósitos fue observar el efecto de la apoA-I (cuando forma complejos discoidales con lípidos), sobre la movilidad u orden de los fosfolípidos de los complejos en los que se halla reconstituida (ver mas adelante). Los protocolos experimentales fueron los siguientes:

a) Vesículas lipídicas unilamelares grandes (LUVs): Se utilizaron vesículas de (POPC) y de POPC/colesterol (POPC/Col) en relación molar 4/1, conteniendo las

distintas sondas de spin a una concentración 0,30% molar. Para esto se prepararon films a partir de soluciones stock de los lípidos, el solvente se evaporó con N₂, dejándolas a baja presión por dos horas para eliminar los restos de solvente; luego los lípidos fueron resuspendidos por agitación en buffer fosfato 10 mM, pH=7.6, sonicados por diez minutos y por último extruidos a través de filtros de poli carbonatos de 100 nm promedio, durante ~ diez ciclos. La concentración final de las vesículas fue de 10mM. (nota: el método de preparación de vesículas unilamelares será siempre el mismo, mas allá que se usen o no marcadores de spin). Los marcadores utilizados fueron Tempo-PC, y *n-Doxil-PC* (*n*=5, 9, 10, 12, 14 o 16), y un análogo de colesterol 3-β-Doxil-Colestano

Condiciones de incubación con apoA-I: las muestras fueron preparadas agregando vesículas hasta una concentración final de 6 mM, y proteína o péptido hasta una relación molar lípido/proteína de 15/1, a esta relación la mayor parte de la proteína está unida a membrana (Toledo et al., 2000), se incubó durante un hora, a las temperaturas de 37, 25, y 5 grados centígrados, y luego se registró el espectro mediante EPR.

b) Vesículas lipídicas discoidales conteniendo apoA-I: en este caso se estudió mediante EPR la cinética de lipidación de apoA-I. En primer lugar se obtuvieron liposomas multilamelares (MLV) de 1,2-dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), con las distintas sondas de spin a una concentración 0,30% molar. Para esto se prepararon films a partir de soluciones stock de los lípidos, luego de evaporarlas con N₂ fueron dejadas a baja presión por dos horas para eliminar los restos de solvente, y por último fueron resuspendidas por agitación en buffer fosfato 10 mM, pH=7,6.

Condiciones de incubación: las muestras fueron preparadas agregando apoA-I a vesículas a una concentración final de DMPC de 6 mM, hasta alcanzar una relación molar lípido/proteína de 40/1 a 37 °C ya que a esta temperatura la formación de discos es muy lenta. Luego la mezcla fue llevada rápidamente a 24 °C en el espectrómetro (en condiciones de Tt de la DMPC donde la reacción es rápida (Swaney and Chang, 1980), y se siguió la cinética, midiendo espectros a distintos tiempos. Por último se miden los espectros de EPR a distinta temperatura (por encima y debajo de la Tt).

Espectroscopia de EPR: Las medidas de EPR fueron realizadas en un espectrómetro Bruker EMX. La amplitud de modulación de 1G y el poder de microonda es de 10mW. El control de temperatura es dentro 0.2°C en forma variable fue realizado con Bruker

BVT-2000, y monitoreada con Fluke 51 K:J. El campo magnético es medido con Gaussímetro Bruker ER 035 NMR, y los datos son convertidos a escala con software WINEPR (bruker).

4.2. Fluorescencia (Lakowicz, 1999)

La luminiscencia es la emisión de fotones desde estados electrónicamente excitados. Esta se divide en dos tipos, dependiendo de la naturaleza del estado basal y del estado excitado. En un estado singlete (o singlete) el electrón en el orbital de energía superior tiene la orientación opuesta al del segundo electrón del estado energético inferior, por lo que se dice que estos dos electrones están apareados. Si el electrón en el estado excitado tiene la orientación igual al del estado energético inferior, se dice que estos dos están despareados, y el sistema será un triplete. El retorno al estado basal de un estado singlete, no requiere que el electrón cambie de orientación, sin embargo si el retorno es desde un estado triplete requerirá que el electrón cambie de orientación. La fluorescencia es la emisión que resulta del regreso un electrón apareado a su nivel basal. Estas transiciones están cuánticamente “permitidas”, y la velocidad de emisión son del orden de 10^8 sec^{-1} , por lo que la vida media del estado excitado es del orden de 10^{-8} seg. (10nseg). La Fosforescencia es la emisión resultante del retorno de estados excitados de distinta multiplicidad, generalmente de estados excitados tripletes que retornan a estados basales singletes, dicha transición no está “cuánticamente” permitida y la emisión es muy lenta, por lo que se traduce en vidas medias de los estados excitados en el orden de mseg.

Las sustancias que poseen capacidad fluorescente, poseen por lo general electrones deslocalizados, típicamente en dobles enlaces conjugados.

Lo antes dicho está esquematizado en los diagramas de A. Jablonski.

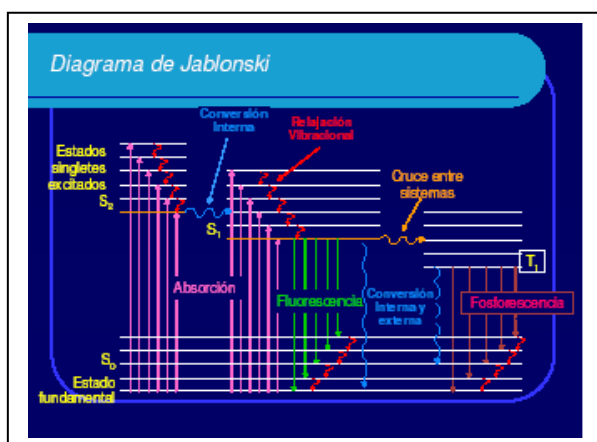


Fig.III-12 Los estados basales están representados por S_0 , mientras que los primeros estados electrónicos superiores son S_1 y S_2 ; en los fluoróforos pueden existir diferentes estados vibracionales determinados por 1,2,3,etc. La absorción está representada en forma vertical ascendente, ya que ilustra a la absorción como un proceso instantáneo, dicho proceso ocurre en el orden de 10^{-15} seg. Que es un tiempo muy corto para que se produzca un desplazamiento nuclear significativo.

La distribución de Boltzman describe la relación de moléculas existente entre los estados vibracionales 0 y 1

$$R = e^{-\Delta E/kT}$$

En donde ΔE es la diferencia de energía entre los dos niveles, y el producto kT es la energía térmica del sistema, entonces a temperatura ambiente o por lo general, la de trabajo, el valor de $R=0.01$, por lo que la absorción ocurre desde el nivel inferior.

Luego de la absorción de luz, pueden ocurrir varios procesos. Entre ellos puede ocurrir que un fluoróforo es excitado a niveles vibracionales superiores a S_1 o también a S_2 . Salvo por excepciones, las moléculas suelen relajarse rápidamente a los niveles vibracionales inferiores de S_1 . Este proceso se llama inter conversión interna que ocurre en 10^{-12} seg. Este tiempo relativamente corto en relación a la vida media de la fluorescencia, hace que la conversión interna ocurra casi completamente previa a la emisión. Así la emisión de fluorescencia ocurre desde estados excitados térmicamente equilibrados. La desexcitación ocurre asimismo a niveles vibracionales superiores de S_0 , ocurriendo la conversión interna a posteriori.

Los espectros de fluorescencia son presentados como espectros de emisión, en los cuales se determina el cambio de intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda, esta emisión dependerá de la estructura química del fluoróforo y del solvente en que se encuentre disuelto, como también del entorno en que se encuentre. A fin de estudiar estructura proteica puede utilizarse fluoróforos sintéticos (fluoresceína, etc), ó utilizar la capacidad de fluorescencia intrínseca de algunos aminoácidos, como ser Tirosina (Tyr), Triptofano (Trp) o Fenilalanina (Phe) dada por los grupos aromáticos que estos aminoácidos poseen

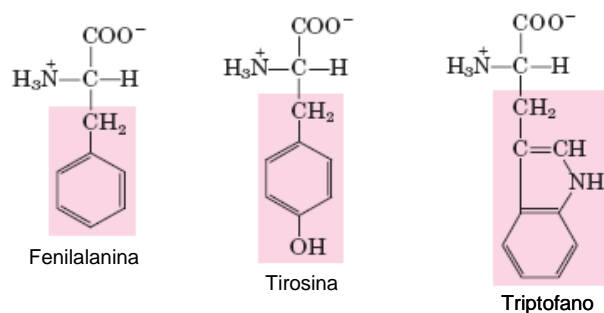
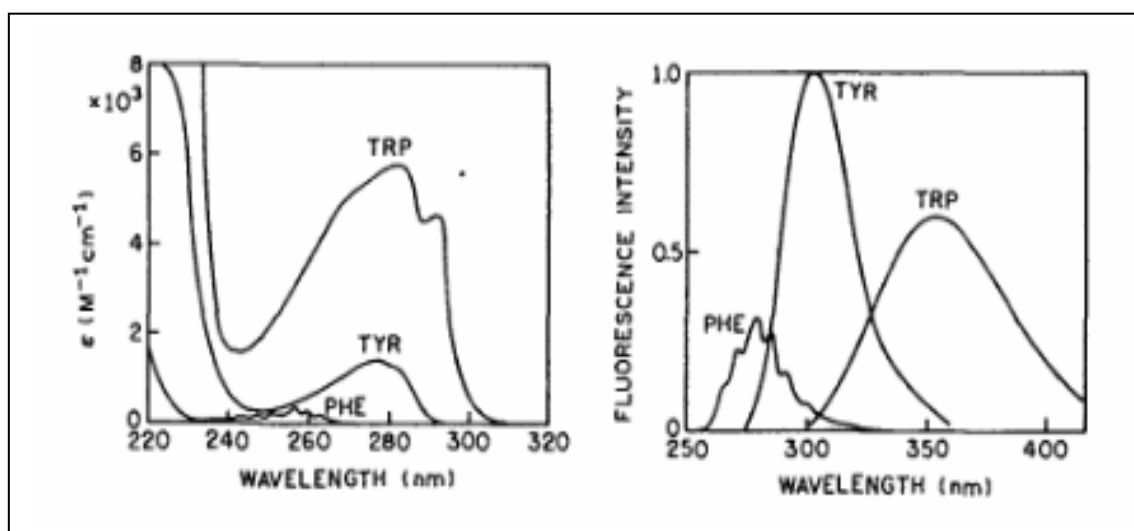


Fig.III-13: Se muestran los grupos aromáticos de los aminoácidos fluorescentes

El grupo indol del Trp es el que hace que las proteínas absorban y emitan luz en la región del Ultra violeta del espectro. La Tyr tiene una intensidad de emisión similar a la del Trp, pero su máximo de emisión esta dada en longitudes de onda menores que la de éste y puede ser quencheada (apagada) su fluorescencia por interacciones con péptidos o por transferencia de energía (ver mas adelante) con el Trp, además la misma aumenta en proteína desnaturalizadas, debido a cambios en el pKa del fenol que favorecerían el estado excitado. La fluorescencia de la fenilalanina adquiere importancia cuando en proteínas no existe residuos de Trp o de Tyr, cosa que raramente ocurre. La emisión del Trp es altamente sensible al ambiente que lo rodea, sufriendo un corrimiento hacia longitudes de onda mayores (hacia el rojo del espectro) cuando el medio al que se expone este residuo es acuoso. La fluorescencia del Trp puede ser quencheada por diferentes grupos, como ser Γ^- , acrilamida, grupos disulfuro o radicales libres como los nitroxilos utilizados en EPR. En la Figura III-14 se resumen las propiedades espectrales mencionadas para estos aminoácidos.



aminoácido	$\lambda_{\text{exit.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emis.}}$ (nm)	Eficiencia cuántica	vida media (ns)
Fenilalanina	260	282	0.02	6.8
Tirosina	275	304	0.14	3.6
Triptofano	295	353	0.13	3.1

Fig.III-14: arriba se observan espectros de absorción y de emisión de los mismos en un medio acuoso abajo se sintetiza en la tabla las características espectrales de los aminoácidos mencionados en solución acuosa a pH 7

En este trabajo se estudió la información espectral del Trp mediante la intensidad de fluorescencia, o el corrimiento del máximo de emisión. La primera

depende de la concentración de fluoróforo, de la interacción del mismo con su entorno, de la transferencia de energía con la misma especie o con otra, etc y por lo tanto del rendimiento cuántico.

El segundo proceso es llamado corrimiento de Stokes. Excepto para átomos en fase vapor, una observación que siempre ocurre en fluorescencia es la emisión a longitudes de onda mayores que la de excitación, o sea que la emisión es con pérdida de energía. Este proceso puede tener varias causas; una causa común es el rápido descenso a los niveles vibracionales más bajos de S1, es más, los fluoróforos muchas veces caen a niveles vibracionales de S0 (ver fig. III-12), resultando en pérdidas adicionales de energía; los fluoróforos pueden presentar además, corrimientos adicionales debido a la relajación de los estados excitados ocasionados por solventes polares, ó sufrir reacciones químicas durante el estado excitado.

Anisotropía de fluorescencia

Los fluoróforos por lo general absorben fotones cuyos vectores eléctricos se encuentran alineados paralelos al momento de transición del fluoróforo. En una solución isotrópica, los fluoróforos son moléculas orientadas al azar. Si se irradia moléculas con luz polarizada, se seleccionarán selectivamente aquellas cuyos dipolos de absorción se encuentren paralelos al vector eléctrico de excitación. Esta “selección selectiva” o foto selección de moléculas parcialmente orientadas, resulta en la emisión de luz parcialmente polarizada. Los momentos de transición para la absorción y la emisión tiene orientaciones fijas para cada fluoróforo, y el ángulo relativo entre estos momentos determina la máxima anisotropía medida.

La anisotropía de fluorescencia esta definida por

$$r=(I_v-I_H)/(I_v+2I_H)$$

en donde I_v e I_H son las intensidades de fluorescencia de las emisiones de luz polarizadas vertical y horizontalmente, respectivamente. Debido a la foto selección de los fluoróforos, la anisotropía puede tomar valores entre -0.2 y 0.4 . La disminución de anisotropía está dada generalmente por movilidad o difusión rotacional del fluoróforo, que ocurren durante la vida media del estado excitado y desplazan el dipolo de emisión

de la molécula. Otro proceso de disminución de anisotropía ó despolarización es la transferencia de energía.

Transferencia de energía

Es el proceso por el cual la energía de una molécula excitada o donador, es cedida a otra que actúa como aceptor, esta transferencia ocurre sin emisión de fotones y es el resultado, primariamente de la interacción dipolo-dipolo entre el donador y el aceptor. El grado de transferencia de energía depende del solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el de absorción del aceptor, la orientación relativa entre los dipolos de transición de ambos, y de la distancia entre ambas moléculas. Esta dependencia de la distancia es lo que hace a esta medida sumamente útil, ya que permite determinar la distancia entre las moléculas que actúa como donador y la actúa como aceptor.

La velocidad de transferencia de energía desde un donador a un aceptor (K_t), está dada por:

$$K_t = 1/\tau (R_0/r)^6$$

en donde τ es el tiempo de vida medio del donador en ausencia del aceptor, “ r ” es la distancia entre ambas moléculas y R_0 es una distancia característica, llamada de Förster, que es la distancia en donde la eficiencia de transferencia de energía es del 50%. Esta dependencia es útil para distancias que van desde 20 a 50 Å, las que son típicas ó comparables a distancias intramoleculares en proteínas y al espesor de las membranas biológicas.

La transferencia de energía puede ocurrir entre moléculas químicamente diferentes, llamándose Hetero transferencia, o entre moléculas iguales, denominándose Homo transferencia. Este tipo de transferencia ocurre en fluoróforos cuyos espectros de absorción y emisión están en cierto grado solapados. En este trabajo se ha usado la medida de homo transferencia para determinar la cercanía de fluoróforos.

Usualmente la determinación de transferencia de energía es por medio de la observación en cambios de intensidad o en la vida media de las moléculas aceptor o donador, estas observaciones se aplican cuando las moléculas son diferentes, o sea para heterotransferencia de energía. Cuando se determina homotransferencia, como ser el caso del Triptofano en las proteínas, se dificulta la observación de este efecto y se

determina en cambio eficiencia de transferencia basada en anisotropía. Fluoróforos que exhiben pequeños corrimientos de Stokes (cierto grado de solapamiento entre espectros de excitación y emisión), pueden sufrir homotransferencia, la que puede ser detectada por la depolarización resultante de la emisión.(Weber, 1960) (Hamman et al., 1996). La eficiencia de la transferencia de energía en ese caso puede ser determinada mediante la determinación de anisotropía en presencia y en ausencia de transferencia, según la expresión

$$E=2(r_0 - \langle r \rangle) / r_0 \quad (\text{Hamman et al., 1996})$$

donde r_0 y $\langle r \rangle$ son las anisotropías en ausencia y presencia de homotransferencia, respectivamente. Como fue descrito por Weber (Weber, 1960), la homotransferencia desaparece cuando se excita en el extremo rojo de espectro.

Para estimar la distancia en que se encuentran los residuos de Trp de diferentes moléculas de proteína se utilizó la homotransferencia de energía de las mutantes puntuales de apoA-I en solución y cuando se encuentran formando complejos lipoproteicos discoidales, estos últimos obtenidos por micelización directa o por diálisis con colato de sodio.

Quenching o apagado de fluorescencia

La intensidad de fluorescencia puede decaer por varios procesos, dichos procesos se denominan quenching o apagamiento de la fluorescencia, y ocurre cuando el fluoróforo excitado vuelve al estado basal sin emitir fotones debido al contacto con la molécula “quencheadora” ó apagadora.

Existen dos procesos por el cual el quenching puede ocurrir, uno en donde la molécula en su estado excitado le transfiere energía al quencher cuando colisiona, denominándose el proceso “quenching dinámico ó colisional”, o cuando el fluoróforo en su estado fundamental forma un complejo con el quencher, el cual se relaja por procesos que no emiten fotones (ver Figura III-15)



Fig.III-15: esquematización de diferentes procesos por lo cual la fluorescencia puede ser apagada

Existen muchos tipos de moléculas apagadoras o amortiguadoras, pero es importante que no todas actúan sobre todos los fluoróforos. El decaimiento de la intensidad de fluorescencia está descrita por la ecuación de Stern-Volmer:

$F_0/F=1+K[Q]$, en donde F_0 es la intensidad del fluoróforo en ausencia del quencher, F es la intensidad en presencia del mismo y K la constante de Quenching.

En este trabajo se usaron como agente apagador las mismas moléculas de Doxilos a distintas alturas como las utilizadas en los estudios de EPR para poder determinar el modo de inserción de la apoA-I en vesículas unilamelares. Para esto se utilizaron las mutantes simples de Triptofano en las posiciones 93, 104 y 108, las cuales se titularon con vesículas unilamelares hechas como se mencionó más arriba, pero con una cantidad de apagador de un 20% en moles, modificándose la ecuación anterior a una similar de binding.

El tratamiento matemático del apagamiento o quenching, y la accesibilidad al mismo es explicado y desarrollado en los resultados.