

Estudio preliminar del mecanismo de apagamiento de la fluorescencia de la lisozima por tetrakis-*para*-carboxifenil porfirina

Vicente Escobar Jonathan Osiris, García Sánchez Miguel Ángel, Tello Solís Salvador Ramón*

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Química. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Iztapalapa, Ciudad de México. C.P. 09340. México.

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

Recibido:
20/abril/2018

Aceptado:
30/julio/2018

Palabras clave:
Porfirina, lisozima,
fluorescencia

Keywords:
Porphyrin, lysozyme,
fluorescence

RESUMEN

Las interacciones moleculares son procesos centrales que regulan la vasta mayoría de reacciones catabólicas y metabólicas en los organismos vivos. Así mismo, el estudio de las interacciones intermoleculares proteína-ligando forman parte sustancial en las primeras etapas del desarrollo de nuevos agentes farmacéuticos. En esta investigación se sintetizó la tetrakis-*para*-carboxifenil porfirina, $H_2T(p-COOH)PP$, y se estudió su interacción con lisozima por métodos espectroscópicos: UV-visible y fluorescencia. Se encontró que la especie $H_2T(p-COOH)PP$ no tiende a formar agregados, ni a protonarse en medio acuoso. Se observó el apagamiento intrínseco de la fluorescencia de la lisozima en presencia de $H_2T(p-COOH)PP$, el análisis a diferentes temperaturas usando el método de Stern-Volmer, reveló que el apagamiento es principalmente de carácter dinámico, por lo que se estableció que no existe un contacto importante para que se genere una interacción no covalente estable entre lisozima y $H_2T(p-COOH)PP$.

ABSTRACT

Molecular interactions are central processes and mediate the majority of catabolic and metabolic reactions in living organisms. Therefore, the study of intermolecular interactions protein-ligand is an essential part for the early stages of the development of new pharmaceutical compounds. In this work, tetrakis-*para*-carboxyphenil porphyrin was synthesized and its interaction with lysozyme by spectroscopic methods, UV-vis and fluorescence, was studied. Aggregation or protonation of $H_2T(p-COOH)PP$ did not tend to occur in aqueous medium. Intrinsic adhesion of fluorescence of lysozyme was observed in the presence of $H_2T(p-COOH)$ and the analysis at different temperatures using the Stern-Volmer method, revealed that $H_2T(p-COOH)PP$ causes fluorescence quenching of lysozyme through a dynamic quenching process. Consequently, it was determined that it does not form a stable non-covalent interaction with lysozyme.

Introducción

La descripción cuantitativa de procesos biológicos es una de las principales áreas de investigación en las ciencias de la vida; tanto en fisiología, bioquímica y biología celular o molecular. Entre ellos el reconocimiento molecular, por ejemplo, entre proteínas y ligandos a través de asociaciones no covalentes tienen un papel fundamental en todos los procesos biológicos. Un rubro de aplicación donde adquiere gran relevancia es en la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos farmacéuticos y en sus etapas posteriores orientados a estudios farmacocinéticos como la absorción y distribución endógena del fármaco. Este último proceso es mediado por proteínas plasmáticas, lo que significa que estas especies condicionan la población de moléculas de fármaco libre que lleguen a las células diana. La mayoría de los fármacos son transportados al sitio objetivo (blanco), ya sea por albúmina de suero humano o lipoproteínas de baja densidad (Sugio et al., 1999).

En los últimos años se ha visto el advenimiento en el uso de transportadores específicos basados en estructuras proteicas (Watanabe y Ohtsuki, 2016; Pereira et al., 2014). Las proteínas de baja masa molecular, como la lisozima son excelentes candidatos ya que pueden ser reabsorbidas y catabolizadas por las células tubulares del riñón (Novaković et al., 2012). Por lo tanto, estas proteínas pueden servir como acarreadores de fármacos en afecciones hepáticas. En ese sentido la combinación de las propiedades transportadoras de estas proteínas y las propiedades fotofísicas de los fotosensibilizadores como las tetrafenilporfirinas pueden extrapolarse a afecciones de tipo tumoral en dicho órgano.

El análisis del apagamiento de fluorescencia es una metodología muy conveniente para estudios de reconocimiento molecular (Schibilla et al., 2016), esta técnica es una estrategia de uso muy frecuente ya que provee información precisa y sensitiva sobre las interacciones biomoleculares, principalmente no covalentes, que se pueden dar entre una proteína y un ligando, así como, también interacciones de un ligando con otras biomacromoléculas, como ADN o membranas plasmáticas (Husain et al., 2017).

En este trabajo se sintetizó la *tetrakis-para-carboxifenil* porfirina, $H_2T(p-COOH)PP$, y se estudió su interacción con lisozima por espectroscopía: UV-visible y fluorescencia. Se realizaron titulaciones fluorométricas de una concentración constante de lisozima con un aumento gradual de la concentración de ligante, es decir, de $H_2T(p-COOH)PP$ y se observó el apagamiento de emisión de la fluorescencia de la lisozima. El análisis de los datos experimentales se realizó usando el modelo de Stern-Volmer (Banerjee et al., 2008).

Metodología

Síntesis y Caracterización espectroscópica de tetrakis-para-carboxifenil porfirina

La síntesis de *tetrakis-para-carboxifenil* porfirina se llevó a cabo por el método utilizado por García Sánchez, 1993 y el método de Adler (Adler et al., 1967). La síntesis consistió en la condensación a reflujo de pirrol (0.041 moles) y 4-carboxibenzaldehído (0.041 moles) en 50 mL de ácido propiónico, a la mezcla de reacción se agregó 1 equivalente de propionato de sodio y se mantuvo a reflujo a 120 °C durante 4 horas. La purificación se realizó por cromatografía en columna de sílica gel.

La caracterización de la especie $H_2T(p-COOH)PP$ se llevó a cabo por espectroscopía UV-vis, fluorescencia e infrarrojo con transformada de Fourier, FTIR. El rendimiento de la reacción fue menor al 36 %. Debido a la baja solubilidad en agua de esta especie, se optó por disolverla en una mezcla de etanol y disolución amortiguadora de fosfatos a pH 7, en una proporción 20:80 V/V, para la obtención de los espectros de absorción y fluorescencia.

Lisozima

La lisozima de huevo de gallina (99 %), se obtuvo del proveedor Sigma-Aldrich y se usó sin ninguna purificación previa antes de cada estudio. Todas las disoluciones de lisozima se prepararon en amortiguador (previamente filtrado) de fosfatos (fosfato monobásico de potasio y fosfato dibásico de potasio) 5 mM pH 7. La concentración de lisozima usada en los estudios de interacción por métodos espectroscópicos fue de 4.77×10^{-6} M.

Estudios de interacción del sistema lisozima- $H_2T(p-COOH)PP$

Análisis por espectroscopía UV-vis

Para los estudios de interacción del sistema lisozima- $H_2T(p-COOH)PP$, se determinó en primera instancia la concentración de porfirina libre, extrapolando los datos de absorción obtenidos a 419 nm a una curva estándar previamente realizada, así como, empleando el coeficiente de extinción molar ya reportado de 125000 (Sigma-Aldrich). Los estudios se realizaron por duplicado a pH 7 y a 25 °C. Debido a la baja solubilidad de $H_2T(p-COOH)PP$ en agua, ésta se disolvió en una mezcla etanol-fosfatos 20:80 V/V. El intervalo de concentraciones de $H_2T(p-COOH)PP$, empleado durante las titulaciones fue de 1.34×10^{-5} a 2.5×10^{-4} M.

Análisis por espectroscopía de fluorescencia

El análisis de la interacción lisozima- $H_2T(p-COOH)PP$ por fluorescencia, se llevó a cabo titulando una solución de concentración fija de lisozima 4.77×10^{-6} M con cantidades crecientes de la porfirina en el intervalo de concentraciones de 1.3×10^{-5} a 3×10^{-4} M. Los estudios de fluorescencia se realizaron por duplicado a tres diferentes temperaturas 25, 35 y 44 °C y a pH 7. El monitoreo de la interacción se realizó excitando el sistema a una longitud de onda de 280 nm y registrando los datos en un intervalo de 290 a 650 nm. El volumen final de la titulación en la celda contenía una cantidad máxima del 2% en etanol V/V.

Para el análisis de los datos del apagamiento de fluorescencia se empleó el modelo de Stern-Volmer (Lakowicz, 2006):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [L] \quad (1)$$

Donde F_0 es la emisión de fluorescencia de lisozima libre, F es la emisión de fluorescencia en presencia de ligando (porfirina) en cada punto de la titulación, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer y $[L]$ es la concentración de la porfirina libre.

Resultados y discusión

Caracterización espectroscópica de tetrakis-para-carboxifenil porfirina, $H_2T(p-COOH)PP$

En la figura 1, se muestra la estructura química de $H_2T(p-COOH)PP$. El espectro UV-vis obtenido (Figura 2), es característico de una porfirina base libre, esto es, presenta una banda de Soret a los 416 nm y las diferentes bandas Q en el intervalo de los 513 a 652 nm. Indicando que no se presenta un efecto de agregación o dimerización (Yin, 2016; Zakavi *et al.*, 2013).

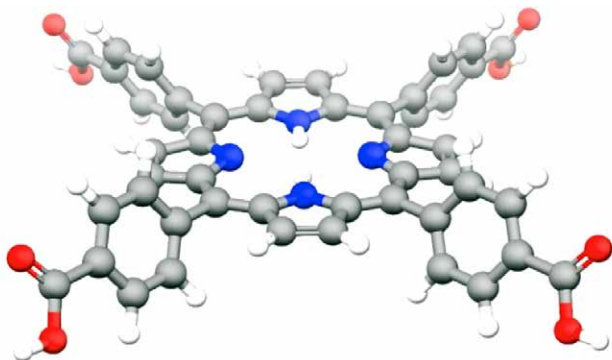


Figura 1. Estructura tridimensional de $H_2T(p-COOH)PP$.

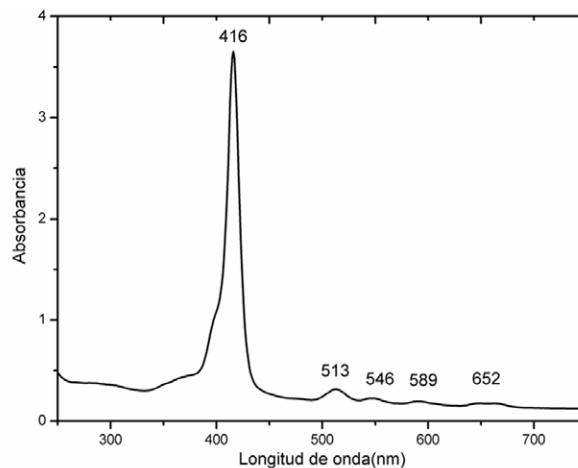


Figura 2. Espectro UV-vis de la especie $H_2T(p-COOH)PP$ en mezcla etanol-fosfatos 20:80 V/V pH 7 a 25 °C.

En el espectro FTIR de la figura 3, se señalan las principales bandas de vibración de los grupos funcionales asociados a la especie $H_2T(p-COOH)PP$. La banda ancha de los grupos -OH del ácido carboxílico se observa entre 3300 y 2450 cm^{-1} , así como, las señales de los enlaces C=O, C=C y C-O características de ácidos carboxílicos, se observan a los 1675 y 1281 cm^{-1} , respectivamente. Las vibraciones de estiramiento de enlaces N-H se observan a los 3326 y 1606 cm^{-1} y las deformaciones del anillo a menos de 1,000 cm^{-1} .

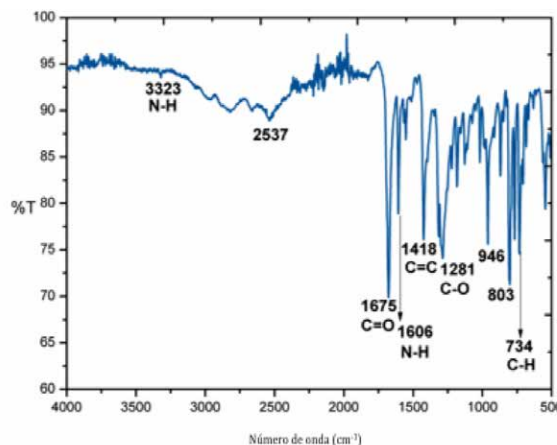


Figura 3. Espectro FTIR de $H_2T(p-COOH)PP$.

La especie $H_2T(p-COOH)PP$, también se caracterizó por espectroscopía de fluorescencia considerando previo a los estudios de interacción con lisozima dos diferentes longitudes de onda de excitación: 280 y 419 nm. En los espectros de la figura 4 se observa una fuerte emisión de fluorescencia a los 640 nm para ambas longitudes de

onda de excitación y la aparición de un pico de mucha menor intensidad cercano a los 550 nm cuando se excita la porfirina a 280 nm.

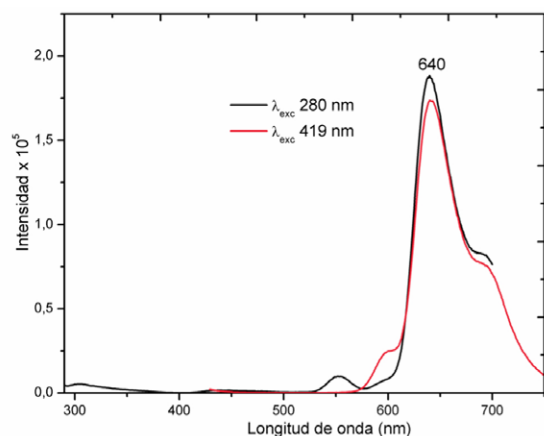


Figura 4. Espectro de emisión de fluorescencia de la especie $H_2T(p-COOH)PP$ en mezcla etanol-fosfatos (5 mM) 20:80 V/V, pH 7 y a 25 °C.

Estudios de interacción del sistema lisozima- $H_2T(p-COOH)PP$

Análisis por espectroscopía UV-vis

Un cambio en el ambiente circundante a los residuos aromáticos de la lisozima modifica su espectro de absorción en el UV-vis, por lo que de esta manera podría asumirse que el incremento observado en la absorción a 280 nm (figura 5), se debe a la interacción o formación de un complejo lisozima- $H_2T(p-COOH)PP$.

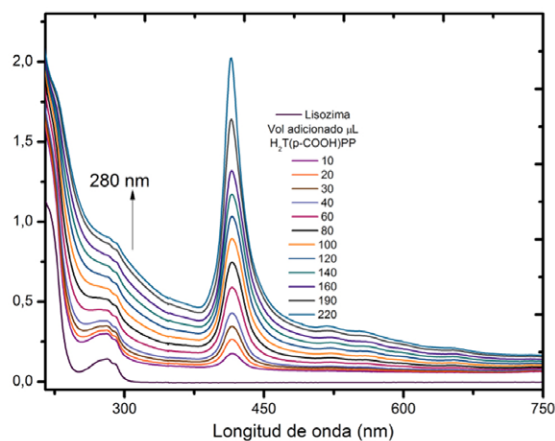


Figura 5. Titulación espectrofotométrica seguida por UV-visible, de lisozima ($4.77 \times 10^{-6} M$) en disolución de fosfatos (5 mM) pH 7 con $H_2T(p-COOH)PP$ (intervalo 1.34×10^{-5} a $2.5 \times 10^{-4} M$). El volumen final de la titulación en la celda contenía una cantidad máxima del 2% en etanol V/V.

Pero además que la interacción se establece en la proximidad de un residuo de triptófano (Trp) de la lisozima: ya sea Trp 108 o Trp 62, puesto que solo estos dos residuos son responsables de la absorción y emisión de fluorescencia de la lisozima (Nishimoto *et al.*, 1999).

Sin embargo, los datos de UV-vis, no son suficientes para asegurar la existencia una interacción entre lisozima y $H_2T(p-COOH)PP$.

Análisis por espectroscopía de fluorescencia

La excitación de la lisozima en disolución con luz de longitud de onda de 295 nm, permite observar solo la emisión de los residuos de triptófano, mientras que, si se excita a una longitud de onda de 280 nm, se observa la emisión de fluorescencia de triptófano y de tirosina presentes en la proteína (Sanei *et al.*, 2011) UV/vis absorption, resonance light scattering, synchronous fluorescence and circular dichroism (CD). La lisozima presenta en su estructura seis residuos de triptófano, sin embargo, solo dos de ellos están expuestos en la superficie Trp 62 y Trp 108 (Nishimoto *et al.*, 1999) los cuales son los responsables de la emisión de fluorescencia de la lisozima (Figura 6).

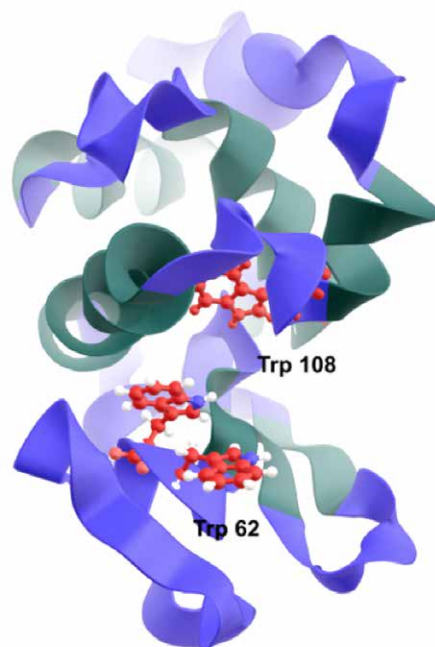


Figura 6. Estructura terciaria de la lisozima, se resaltan los residuos de Trp 62 y Trp 108 (Imoto *et al.*, 1971).

Mediante los estudios de fluorescencia se observó un apagamiento intrínseco de la lisozima a los 326 nm, al titular con cantidades crecientes de $H_2T(p-COOH)PP$

(Figura 7), sin embargo, no se presentó un cambio o un desplazamiento de la banda de emisión. La constante de Stern-Volmer (Ecuación 1), calculada a diferentes temperaturas, proporciona información importante sobre el mecanismo de apagamiento; el cual puede ser estático, es decir, hay la formación de un complejo proteína-ligando no fluorescente, o dinámico, es decir, se presentan choques intermoleculares para un sistema dado (Lakowicz, 2006).

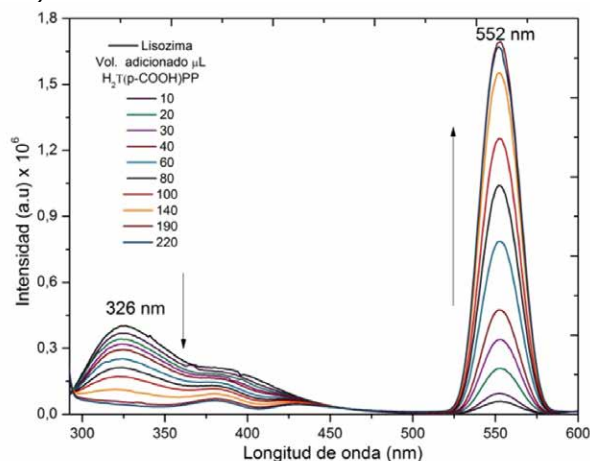


Figura 7. Titulación espectrofluorométrica del sistema lisozima- $H_2T(p-COOH)PP$ en disolución de fosfatos (5 mM) pH 7 (el volumen final de la titulación contenía una cantidad máxima del 2% V/V en etanol).

Una manera de diferenciar los procesos de apagamiento de carácter estático de los procesos dinámicos, es realizar los estudios a diferentes temperaturas. La dependencia del apagamiento dinámico a altas temperaturas, resulta en una difusión más rápida, por tanto, la constante de Stern-Volmer aumenta con la temperatura. En contraste, con el apagamiento estático, las altas temperaturas afectan la estabilidad del complejo (no fluorescente) formado y la K_{SV} disminuye.

Es bien conocido que ciertas reacciones de apagamiento de fluorescencia generan gráficos de Stern-Volmer que se desvían de la linealidad con curvaturas ya sea positivas o negativas (Castanho y Prieto, 1998; Htun, 2004; Keizer, 1983) micelles and colloidal systems.

El análisis de los datos de la titulación del sistema lisozima- $H_2T(p-COOH)PP$, mostró que existe una desviación con curvatura positiva del gráfico de Stern-Volmer (Figura 8). Este tipo de eventos no pueden ser atribuidos a un apagamiento estático convencional, es decir, aquel asociable a la formación de un complejo no fluorescente, sin embargo, puede atribuirse a la existencia de una esfera de apagamiento efectiva. Esto quiere decir que el

ligando, $H_2T(p-COOH)PP$, está confinado en una zona con baja libertad de difusión (Guha *et al.*, 1999).

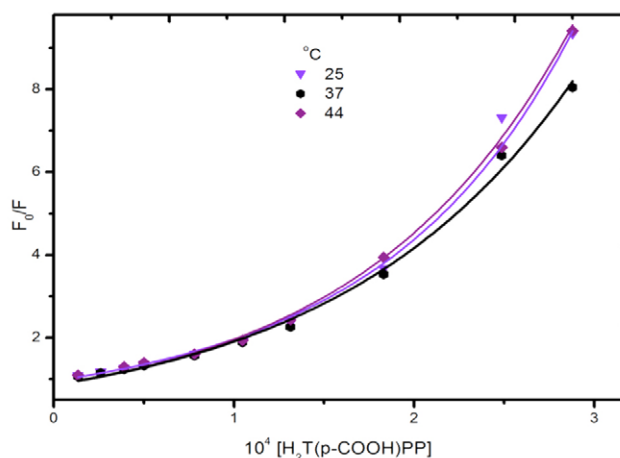


Figura 8. Gráfico de Stern-Volmer, desviación positiva, para el sistema lisozima- $H_2T(p-COOH)PP$.

Esta condición sugiere que existe una fracción "W" de moléculas de lisozima en estado excitado que son apagadas durante la titulación. En los casos en los que existe un apagamiento muy efectivo, la velocidad de apagamiento es muy rápida y, por lo tanto, no parecen estar involucrados procesos de difusión, en vez de esto ocurren interacciones de largo alcance. Se ha propuesto que en la desviación positiva de la linealidad del gráfico de Stern-Volmer (Ecuación 1), están involucrados simultáneamente procesos de apagamiento estático y dinámico en el radio de la esfera de acción finito. En este sentido puede ser importante la contribución asociada a efectos no "estacionarios". El proceso "apagamiento estático" instantáneo puede ser debido a la formación de un complejo en estado basal. Así, la fracción "W", decrece respecto de la unidad, en contraste con el gráfico convencional de Stern-Volmer, en la que $W = 1$ (Keizer, 1983; Roy y Mukherjee, 1987).

En el gráfico de Stern-Volmer de la figura 8, se presenta una curvatura positiva en todas las temperaturas consideradas, además se observa que un proceso de apagamiento no resulta dependiente por el incremento de la temperatura entre 25 y 44 °C. Esto indica que la asociación entre la porfirina con sustituyentes carboxilo y la lisozima es poco probable, y que el tipo de apagamiento observado debe ser de tipo dinámico.

El apagamiento de fluorescencia de la lisozima observado durante la titulación con la porfirina, podría deberse al acercamiento de esta especie con aquellos residuos de triptófano expuestos en la superficie de la enzima (Figura 9) (Brunette y Farrens, 2014). Asumiendo

que el acercamiento de $H_2T(p-COOH)PP$, ocurre preferentemente en las proximidades de los residuos de Trp 62 o Trp 108 de la lisozima, esta distancia debe ser menor por lo menos menor a 15 Å de distancia de este par de residuos, pero no lo suficientemente próximo como para producir un efecto de apagamiento estático.

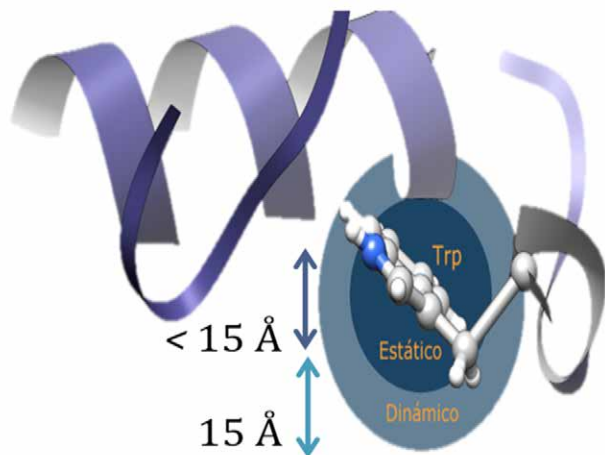


Figura 9. Esfera de apagamiento del triptófano. Las distancias para que se observe un efecto de apagamiento estático son < a 15 Å, mientras que en distancias mayores o iguales a 15 Å se tendrá apagamiento dinámico.

A pH 7, la lisozima presenta 18 residuos cargados positivamente (entre argininas y lisinas) y solo 9 residuos cargados negativamente que en su mayoría corresponden a residuos de aspártico. En el sitio activo se encuentra el Asp 52 y la Glu 35 cargados negativamente, en la misma cavidad como se mencionó anteriormente se encuentran los residuos de Trp 62 y 63. Si la interacción ocurre en la proximidad de estos residuos, probablemente haya un efecto de repulsión electrostática entre los grupos carboxilo tanto de $H_2T(p-COOH)PP$, como de los residuos de Asp y Glu de la lisozima. Por otra parte, la rigidez del anillo de la porfirina disminuye los grados de libertad que pueden adoptar los grupos carboxilo en la periferia. Aunado a la posible repulsión, también es probable la presencia de un efecto estérico que limite las posibilidades de interactuar con algunos de los dos residuos de Trp. De esta manera, solo podría ser efectivo el apagamiento dinámico visto experimentalmente.

Conclusiones

Se sintetizó satisfactoriamente la especie $H_2T(p-COOH)PP$, cuyas soluciones acuosas no propiciaron agregación como sucedería con otras especies similares. Sin embargo, no se observa una interacción importante en el sistema

lisozima- $H_2T(p-COOH)PP$, puesto que el apagamiento de fluorescencia de la lisozima es principalmente de índole dinámico, siendo muy probable que solo una pequeña fracción de $H_2T(p-COOH)PP$ logre formar un complejo estable con la lisozima.

Agradecimientos

JOVE: agradece la beca otorgada por el conacyt con No. 375880.

Referencias

- Adler A. D., Longo F. R., Finarelli J. D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L. (1967). A Simplified Synthesis for Meso-Tetraphenylporphine. *J. Org. Chem.*, 32: 476-476.
- Banerjee S., Choudhury A.S., Dasgupta S., Samita B. (2008). Photoinduced Electron Transfer Between Hen Egg White Lysozyme and Anticancer Drug Menadione. *J. Lumin.*, 128: 437-444.
- Brunette A. M. J., Farrens D. L. (2014). Distance Mapping in Proteins Using Fluorescence Spectroscopy: Tyrosine, like Tryptophan, Quenches Bimane Fluorescence in a Distance-Dependent Manner. *Biochemistry*, 53: 6290-6301.
- Castanho M. A., Prieto M. J. E. (1998). Fluorescence Quenching Data Interpretation in Biological Systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1373: 1-16.
- García Sánchez M.A. (1993). Síntesis y caracterización de complejos macrocíclicos mixtos lantanoides. Tesis de Maestr. *Lett.,s4-1812.. S., Schneider R. J., Fernandes R., Tomía*, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Guha D., Mitra S., Das R., Mukherjee S. (1999). Luminol Fluorescence Quenching by Triethyl Amine and Non-Linear Stern- Volmer Plot: Solvent Effect. *IJC-A*, 38: 760-767.
- Htun T. (2004). A Negative Deviation from Stern – Volmer Equation in Fluorescence Quenching. *J. Fluoresc.*, 14: 217-222.
- Husain M. A., Ishqi H. M., Sarwar T., Su R., Tabish M. (2017). Interaction of Indomethacin with Calf Thymus DNA: A Multi-Spectroscopic, Thermodynamic and Molecular Modelling Approach. *Med. Chem. Comm.*, 8: 1283-1296.

- Imoto T, Forstert L. S., Rupley J. A., Tanaka F. (1971). Fluorescence of Lysozyme: Emissions from Tryptophan Residues 62 and 108 and Energy Migration. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69: 1151-1155.
- Keizer J. (1983). Nonlinear Fluorescence Quenching and the Origin. *J. Am. Chem. Soc.*, 3443: 1494-1498.
- Lakowicz J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd Edition Springer, New York, USA.
- Nishimoto E, Yamashita S., Yamasaki N., Imoto T. (1999). Resolution and Characterization of Tryptophyl Fluorescence of Hen Egg-White Lysozyme by Quenching- and Time-Resolved Spectroscopy. *Biosc. Biotechn. Biochem.*, 63: 329-336.
- Novaković I, Anđelković U, Zlatović ., Gašić M., Sladić D. (2012). Bioconjugate of Lysozyme and the Antibacterial Marine Sesquiterpene Quinone Avarone and Its Derivatives. *Bioconjugate Chem.*, 23: 57-65.
- Pereira P. M. R., Carvalhop J. J., Silva S., Cavaleiro J. A. S., Schneider R. J., Fernandes R., Tomé J. P. C. (2014). Porphyrin Conjugated with Serum Albumins and Monoclonal Antibodies Boosts Efficiency in Targeted Destruction of Human Bladder Cancer Cells. *Org. Biol. Chem.*, 12: 1804-1812.
- Roy R., Mukherjee S. (1987). Fluorescence Quenching of Carbazole and Indole by Ethylenetrithiocarbonate. *Chem. Phys. Lett.*, 140: 210-214.
- Sanei H., Asoodeh A., Hamedakbari-Tusi Sh., Chamani J. (2011). Multi-Spectroscopic Investigations of Aspirin and Colchicine Interactions with Human Hemoglobin: Binary and Ternary Systems. *J. Solution Chem.*, 40: 1905-1931.
- Schibilla F, Stegemann L., Strassert C. A., Rizzo F, Ravoo B. J. (2016). Fluorescence Quenching in β -Cyclodextrin Vesicles: Membrane Confinement and Host-guest Interactions. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 15: 235-243.
- Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. (1999). Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å Resolution. *Protein Eng.*, 12: 439-446.
- Watanabe K., Ohtsuki T. (2016). Photocontrolled Intracellular RNA Delivery Using Nanoparticles or Carrier-Photosensitizer Conjugates. *Pro. Mol. Bio. Trans. Sci.*, 139: 1877-1173.
- Yin Yao-B. (2016). DFT Study on Deprotonation and Protonation of Porphyrins: How Many Protons Can the Porphyrin Core Take Up? *Computational and Theoretical Chemistry*, 1080: 38-46.
- Zakavi S, Rahiminezhad H., MojarradA. G., Yazdeli T. M., Alizadeh R. (2013). Effects of Core and / or Peripheral Protonation of meso-Tetra(2-, 3-, and 4-pyridyl) Porphyrin and meso-Tetra(3-methylpyridyl)Porphyrin on Their UV-vis Spectra. *J. Spectrosc.*, 2013: 1-7.