

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE PROTEÍNAS EN  
CONDICIONES DE AGLOMERACIÓN  
MACROMOLECULAR: DESARROLLO DE MÉTODOS  
AVANZADOS DE ESPECTROSCOPÍA LÁSER DE  
FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL DE  
PICOSEGUNDOS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR Silvia Zorrilla López**

Bajo la dirección de la Doctora:  
M<sup>a</sup> del Pilar Lillo Villalobos

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-1850-7**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE PROTEÍNAS EN  
CONDICIONES DE AGLOMERACIÓN  
MACROMOLECULAR: DESARROLLO DE MÉTODOS  
AVANZADOS DE ESPECTROSCOPIA LÁSER DE  
FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL DE  
PICOSEGUNDOS**

**TESIS DOCTORAL**

**INSTITUTO DE QUÍMICA-FÍSICA "ROCASOLANO"  
C.S.I.C.**

**SILVIA ZORRILLA LÓPEZ**  
**MADRID, 2002**

**DIRIGIDA POR DRA. M. PILAR LILLO VILLALOBOS**

"No existen conocimientos más elevados o más bajos,  
sino un conocimiento único que emana de la experimentación."

Leonardo da Vinci

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido a la realización de este trabajo, en especial :

A la Dra. Pilar Lillo, directora de esta tesis, por la atención con la que ha dirigido y corregido este trabajo. Por sus ánimos en los peores momentos y por haberme enseñado a trabajar con rigor científico.

Al Dr. Ulises Acuña, por haber puesto a mi disposición todos los medios de su laboratorio para la realización de este trabajo. Por sus interesantes observaciones, por las discusiones científicas que hemos tenido a lo largo de este tiempo y por su amabilidad al haber revisado el manuscrito de la tesis.

Al Dr. Germán Rivas, por haber sugerido la idea central de este trabajo. Por su ayuda con los experimentos de ultracentrifugación y por su atenta revisión del manuscrito de esta tesis.

Al Dr. Abderrazak Douhal, por haberme facilitado el acceso a su equipo de fluorescencia con resolución temporal, que ha permitido la realización de una parte de los experimentos de este trabajo.

To Dr. Ton Visser, for having accepted me in his lab to do the FCS experiments of this work and for helpful comments on this work. And also to the people at his lab, Mark Hink, Ruchira and Dr. J W Borst for all the help they gave me during my short stay in The Netherlands.

To Dr. Allen Minton, for his help with the data analysis of some ultracentrifugation experiments of this work and for helpful discussions.

A la Dra. María Gasset, por haberme permitido el acceso al material de su laboratorio, en especial a su fluorímetro. Por sus consejos científicos, ánimos y ayuda en el día a día.

A Dra. Mercedes Jiménez y al Dr. Carlos Alfonso, por su gran ayuda con los experimentos de centrifugación. Por su amabilidad, sus ánimos y su buen humor. A José, por su ayuda con los pósters, por su simpatía y por sus ánimos.

A la Dra. Asunción Bosch, por su labor como tutora de esta tesis. Por sus ánimos y consejos, por haber supervisado el manuscrito de la tesis y por su ayuda con la parte administrativa.

A todo el personal del Instituto Rocasolano, taller mecánico, almacén, conserjes, secretaría, por su amabilidad.

A la Comunidad de Madrid, por la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador, sin la cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo. Por la ayuda económica recibida en el proyecto CAM 07B/0042/1999. Al Ministerio de Ciencia y Tecnología, por la concesión del proyecto DGICYT BQU 2000-1500. Al Dr Emilio Díez y a Smithkline Beecham Pharmaceuticals por participar como Ente Promotor-Observador de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Olga, Reinerio, Gema, Isabel, José y Nikolay, por los buenos ratos que hemos pasado juntos y por haber hecho más agradable el tiempo durante el que hemos trabajado juntos con su simpatía y buen humor. A Rosa y Juan por haberme apoyado durante todo este tiempo.

A M. Carmen, Ruth, Cristina y Mónica, por ser mis amigas y por haberme ayudado y animado siempre que lo he necesitado.

A mis padres, en especial a Carmen, por su cariño, su espíritu positivo, su manera de entender la vida y en definitiva por ser mi madre. A Iván y Leyre por haberme animado y apoyado en todas las etapas de mi vida. A mis abuelos, por ser los mejores abuelos. A Olga y a Javier por el cariño y apoyo que me han mostrado desde el primer momento.

Y muy especialmente a Pablo, por estar a mi lado, por haberme animado y cuidado. Por su ayuda con el manuscrito de la tesis y por lo que cada día aprendo de él.

# *Índice*

---

Índice	III
Abreviaturas	IX
Resumen	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN. Aglomeración macromolecular. Consecuencias bioquímicas, biofísicas y fisiológicas</b>	1
1.1. Interacciones no específicas. Fenómeno de exclusión de volumen	4
1.2. Consecuencias termodinámicas de la aglomeración macromolecular	7
1.3. Efecto de la aglomeración macromolecular sobre la velocidad de las reacciones	8
1.4. Aglomeración macromolecular y función biológica	9
1.5. Aproximaciones experimentales al estudio del efecto de la aglomeración macromolecular sobre las reacciones entre macromoléculas	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	13
<b>3. FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	17
3.1. Espectroscopia de fluorescencia	19
3.1.1. Tiempos de vida media de fluorescencia	20
3.1.2. Anisotropía de fluorescencia	21
3.1.2.1. Emisión de fluorescencia polarizada. Concepto de fotoselección	21
3.1.2.2. Despolarización de fluorescencia inducida por la rotación browniana	22
3.1.2.3. Despolarización de fluorescencia en estado estacionario. Ecuación de Perrin-Weber	23
3.1.2.4. Multiplicación de factores de despolarización. Regla de Soleillet	26
3.1.2.5. Despolarización de fluorescencia resuelta en el tiempo. Rotación global y dinámica local	27
3.2. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)	33
3.2.1. Fundamento de la técnica	33
3.2.2. Función de autocorrelación. Coeficiente de difusión translacional	35
3.3. Ultracentrifugación analítica. Equilibrio de sedimentación	40
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	45
4.1. Proteínas, sondas fluorescentes y otros reactivos	47
4.2. Preparación de apomioglobina	49

---

<i>4.3. Marcado de proteínas con fluoróforos extrínsecos</i>	49
4.3.1. Determinación del grado de marcado	51
4.3.2. Utilización de las proteínas marcadas con fluoróforos extrínsecos como trazadores	52
<i>4.4. Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible</i>	53
<i>4.5. Espectroscopía de fluorescencia</i>	55
4.5.1. Espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario	55
4.5.1.1. Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario	60
4.5.2. Espectrometría de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos	64
4.5.2.1. Medida experimental de los tiempos de vida media de fluorescencia y de la anisotropía de fluorescencia con resolución temporal	67
4.5.2.2. Análisis numérico de los decaimientos de fluorescencia. Técnicas de reconvolución iterativa	68
4.5.3. Medidas de fluorescencia realizadas en un lector de placas	71
4.5.4. Determinación de la constante de homodimerización aparente de apoMb en presencia de distintas concentraciones de RNasa A por anisotropía de fluorescencia	72
<i>4.6. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)</i>	73
4.6.1. Procedimiento experimental	73
4.6.2. Análisis numérico de las funciones de autocorrelación	75
<i>4.7. Medida de las viscosidades macroscópicas</i>	77
<i>4.8. Ultracentrifugación analítica. Equilibrio de sedimentación</i>	78
4.8.1. Procedimiento experimental	78
4.8.2. Análisis de los gradientes de equilibrio de sedimentación	82
<b>5. RESULTADOS</b>	83
<i>5.1 Preparación de apomioglobina</i>	85
<i>5.2. Características de los Marcajes de apomioglobina y ribonucleasa A con fluoróforos extrínsecos</i>	86
<i>5.3. Estudio del efecto de la alta concentración de proteínas en solución (medios aglomerados) sobre las reacciones de asociación: apomioglobina en presencia de ribonucleasa A y de albúmina sérica humana</i>	89
5.3.1. Comportamiento hidrodinámico de la apomioglobina en soluciones tampón	89



---

5.3.1.1. Caracterización hidrodinámica de la apomioglobina marcada con ANS	90
5.3.1.2. Caracterización hidrodinámica de la apomioglobina marcada con fluoresceína	91
a. Experimentos de fluorescencia	91
b. Experimentos de ultracentrifugación analítica	100
5.3.1.3. Estudio comparativo de las conformaciones globales de apoMb-FI y apoMb-ANS	100
5.3.2. Estudio del estado de asociación de la apomioglobina en presencia de altas concentraciones de ribonucleasa A	104
5.3.2.1. Experimentos de fluorescencia con apomioglobina marcada con ANS	104
5.3.2.2. Experimentos de fluorescencia con apomioglobina marcada con fluoresceína	112
5.3.2.3. Experimentos de fluorescencia en estado estacionario a concentración fija de ribonucleasa A y con concentraciones variables de apomioglobina	115
5.3.2.4. Experimentos de equilibrio de sedimentación de ribonucleasa A altamente concentrada	117
5.3.3. Estudio del estado de asociación de la apomioglobina en presencia de altas concentraciones de HSA	122
<i>5.4. Efecto de la alta concentración de proteínas en solución (medios aglomerados) sobre la difusión rotacional y translacional de proteínas: apomioglobina en presencia de altas concentraciones de ribonucleasa A o de albúmina sérica humana</i>	131
5.4.1. Viscosidad macroscópica de soluciones de ribonucleasa A y de albúmina sérica humana	131
5.4.2. Difusión rotacional y viscosidad local de apomioglobina en presencia de altas concentraciones de ribonucleasa A o de albúmina sérica humana	133
5.4.2.1. Apomioglobina en soluciones concentradas de ribonucleasa A	133
5.4.2.2. Apomioglobina en presencia de altas concentraciones de albúmina sérica humana	135
5.4.3. Difusión translacional y viscosidad local de apomioglobina en soluciones de ribonucleasa A y de albúmina sérica humana	137

---

<b>6. DISCUSIÓN</b>	149
<i>6.1. Propiedades de asociación de la apomioglobina en presencia de proteínas aglomerantes: ribonucleasa A y albúmina sérica humana</i>	151
6.1.1 Ventajas de los fluoróforos ANS y fluoresceína para la realización de estudios hidrodinámicos de anisotropía de fluorescencia	151
6.1.2. Equivalencia de las estructuras de apoMb-ANS y apoMb-FI en solución diluida	152
6.1.3. Dimerización de la apomioglobina en presencia de altas concentraciones de ribonucleasa A	156
6.1.3.1. La presencia de ribonucleasa A como proteína aglomerante no altera significativamente las propiedades espectroscópicas de apoMb-ANS	156
6.1.3.2. La presencia de la ribonucleasa A como proteína aglomerante favorece la formación de dímeros de apomioglobina	157
6.1.3.3. Flexibilidad conformacional del dímero de apomioglobina	162
6.1.3.4. Estimación de la proporción de monómero y dímero de apomioglobina en soluciones de distintas concentraciones de ribonucleasa A como proteína aglomerante	163
6.1.3.5. Exclusión de la heteroasociación de la apomioglobina con la ribonucleasa A	165
6.1.4. Ausencia de autoasociación de la apomioglobina en presencia de altas concentraciones de albúmina sérica humana	167
6.1.4.1. Cambios en las propiedades espectroscópicas de apoMb-FI debidos a la presencia de albúmina sérica humana como proteína aglomerante	167
6.1.4.2. La apomioglobina permanece en forma monomérica en presencia de la albúmina sérica humana como proteína aglomerante	168
6.1.5. Tendencia de la apomioglobina a la dimerización en determinadas condiciones de aglomeración macromolecular	169
<i>6.2. Desviación de la ley de Stokes-Einstein-Debye para la difusión rotacional y translacional de proteínas en condiciones de aglomeración macromolecular</i>	172
6.2.1. Efecto de la aglomeración macromolecular debida a altas concentraciones de proteína (ribonucleasa A y albúmina sérica humana) sobre la difusión rotacional de otra proteína (apomioglobina)	173

---

6.2.2. Efecto de la aglomeración macromolecular debida a la alta concentración de proteína (ribonucleasa A o albúmina sérica humana) sobre la difusión translacional de otra proteína (apomioglobina)	174
6.2.3. La aglomeración macromolecular debida a la alta concentración de proteína (ribonucleasa A o albúmina sérica humana), afecta en mayor medida a la difusión translacional que a la rotacional de otra proteína (apomioglobina)	177
<i>6.3. Anisotropía de fluorescencia y FCS, dos técnicas complementarias para estudios cuantitativos en medios aglomerados</i>	180
<i>6.4. Perspectivas futuras</i>	184
<b>7. CONCLUSIONES</b>	187
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	191

## Abreviaturas y símbolos

<i>A</i>	Absorbancia
<i>a</i>	parámetro estructural de las medidas de FCS
<i>a<sub>i</sub></i>	Actividad termodinámica de la especie <i>i</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEDANS	N-yodoacetilaminoetil-5-naftaleno-1-sulfonato
Alexa 488	Ácido Alexa fluor 488 carboxílico
Alexa 546	Ácido Alexa fluor 546 carboxílico
ANS	Sal amónica del ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico
ApoMb	Apomioglobina
ApoMb-Alexa 488	Apomioglobina marcada covalentemente con Alexa 488
ApoMb-Alexa 546	Apomioglobina marcada covalentemente con Alexa 546
ApoMb-ANS	Apomioglobina marcada con ANS
ApoMb-FI	Apomioglobina marcada covalentemente con fluoresceína
<i>a<sub>j</sub></i>	Factor preexponencial en la expresión de un decaimiento de intensidad de fluorescencia
BSA	Albúmina sérica bovina
<i>b<sub>j</sub></i>	Contribución fraccional del tiempo de correlación <i>i</i> al decaimiento de anisotropía de fluorescencia
ADC	Convertidor analógico digital
<i>C<sub>i</sub></i>	Concentración de la especie <i>i</i>
TAC	Convertidor tiempo amplitud
DMSO	Dimetil sulfóxido
<i>D<sub>r</sub></i>	Coefficiente de difusión rotacional
<i>D<sub>t</sub></i>	Coefficiente de difusión translacional
EDTA	Etilendiamitetetraacetato sódico dihidratado
<i>e</i>	Coefficiente de absorción molar
<i>Factor G</i>	Sensibilidad diferencial del sistema de detección
FAD	Flavín dinucleótido fosfato
FCS	Espectroscopía de correlación de fluorescencia
FIA	fluoresceína unida a través de un grupo yodoacetamido
FITC	5-isotiocianato de fluoresceína
FMN	Flavín mononucleótido fosfato

$F_{trip}$	Fracción de fluoróforo en el estado triplete
$f$	Tiempo de correlación rotacional
$G(t)$	Función de autocorrelación
GFP	Proteína fluorescente verde
$g_i$	Coefficiente de actividad termodinámica de la especie $i$
$h$	Hidratación
HEPES	Sal sódica del ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HSA	Albúmina sérica humana
$h$	Viscosidad
$[h]$	Viscosidad intrínseca
$I$	Intensidad de fluorescencia
$I(t)$	Decaimiento de intensidad de fluorescencia
$I(0)$	Intensidad de fluorescencia a tiempo cero
$I_{  }$ e $I_{\perp}$	Componentes polarizadas de la intensidad de fluorescencia
$J$	Flujo de sedimentación
$k$	Constante de Boltzman
$K$	Constante termodinámica de equilibrio
$K'$	Constante de equilibrio aparente
$L(t)$	Función instrumental experimental
$\lambda$	Longitud de onda
$M$	Masa molecular
$M_{app}^*$	Masa molecular de flotación aparente
Mb	Mioglobina
MCA	Analizador multicanal
$M^*$	Masa molecular de flotación
$m_i$	Potencial químico de la especie $i$
$n$	Intensidad de fluorescencia por unidad de molécula (brillo)
$N$	Número de partículas en el elemento de volumen
$N_A$	Número de Avogadro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
$r$	anisotropía de fluorescencia en estado estacionario
$R$	Constante de los gases ideales
$r_{\text{res}}$	Anisotropía residual

---

$r(0)$	Anisotropía a tiempo cero
$r(t)$	Decaimiento de anisotropía de fluorescencia
$R_0$	Distancia de Förster
$r_0$	Anisotropía intrínseca
RNasa A	Ribonucleasa A
RNasa A-FI	Ribonucleasa marcada covalentemente con fluoresceína
$r$	Densidad
$s$	Coefficiente de sedimentación
$s$	Desviación típica
$T$	Temperatura absoluta
$T_i$	Tiempo de difusión translacional de la especie $i$
$T_{trip}$	Tiempo de relajación del estado triplete
$t$	Tiempo de vida media de fluorescencia
$\langle t \rangle_1$	Tiempo de vida media de fluorescencia promediado por la amplitud
$\langle t \rangle_2$	Tiempo de vida media de fluorescencia promediado por la intensidad
$V$	Volumen molar
$\bar{v}_i$	Volumen específico parcial de la especie $i$
$w$	Concentración en mg/mL
$w$	Velocidad angular
$q$	Ángulo del semicono en el que difunde un fluoróforo con rotación restringida
$q_e$	Ángulo formado por el dipolo de emisión y el eje Z

*Resumen*

---

Una propiedad característica de los sistemas biológicos es su elevada concentración total de macromoléculas (entre 50 y 400 mg/mL), lo que implica una significativa ocupación de volumen (Ellis, 2001). En general, no existen especies únicas con una concentración tan alta, sino que son todas las macromoléculas, tomadas en conjunto, las que proporcionan esta elevada concentración total. Por ello, no nos referimos a este tipo de sistemas como concentrados, sino como aglomerados (“*crowded*”) (Minton, 2001).

Tradicionalmente, el conocimiento detallado de las velocidades, equilibrio y mecanismo de las reacciones bioquímicas se ha adquirido a partir de experimentos realizados en condiciones próximas a las ideales con una muy baja concentración total de macromoléculas (menor, aproximadamente, de 1 mg/mL). Sin embargo, la alta concentración de macromoléculas en los sistemas biológicos da lugar a interacciones de tipo no específico, que tienen un importante efecto sobre la termodinámica y la cinética de las reacciones, como las homo y heteroasociaciones, que tienen lugar en estos sistemas.

El estudio cuantitativo de las propiedades de las macromoléculas así como de sus interacciones en sistemas que simulan la aglomeración macromolecular existente “*in vivo*”, presenta grandes dificultades experimentales que afectan tanto al diseño como a la interpretación de los experimentos. Hasta la fecha, muy pocas técnicas biofísicas se han aplicado de forma satisfactoria al estudio de las interacciones entre macromoléculas en presencia de altas concentraciones de otras o de la misma macromolécula, siendo el equilibrio de sedimentación la más consolidada (Rivas et al, 1999a).

El objetivo global de este trabajo es desarrollar métodos avanzados de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos y de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), apropiados para el estudio cuantitativo de la estructura y dinámica de macromoléculas en condiciones de aglomeración macromolecular. Para el desarrollo de este objetivo, se ha seleccionado una proteína modelo bien caracterizada, la apoMb. La apoMb es una proteína que en solución diluida a pH 7.4 se encuentra en forma monomérica, mientras que en presencia de altas concentraciones de otras proteínas como la RNasa A da lugar a la formación de homodímeros (Wilf y Minton, 1981). En este trabajo, se han estudiado de forma comparativa las propiedades dinámicas y estructurales de la apoMb en soluciones de altas concentraciones de RNasa A y de HSA.



La apoMb se ha marcado alternativamente con varias sondas fluorescentes, ANS, fluoresceína, Alexa 488 y Alexa 546. Las primeras dos sondas se utilizaron para los experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal y las segundas para los de FCS. En todos los casos, se han estudiado las propiedades espectroscópicas de la apoMb marcada con el fluoróforo correspondiente, en solución diluida y en presencia de altas concentraciones de RNasa A y de HSA.

A lo largo de este trabajo, se han desarrollado y aplicado métodos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal para la identificación de las distintas especies de apoMb presentes en soluciones de alta concentración de HSA y de RNasa A. En las soluciones de HSA sólo se han encontrado monómeros de apoMb, mientras que en las de RNasa A se han detectado, además, homodímeros de apoMb. La explicación del diferente efecto de altas concentraciones de las dos proteínas sobre el equilibrio de dimerización de la apoMb, podría encontrarse en la diferente exclusión de volumen en las soluciones de HSA y de RNasa A a igualdad de concentración en mg/mL.

Los métodos de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal, han permitido detectar la presencia de flexibilidad de dominios en el dímero de la apoMb, en las soluciones de alta concentración de RNasa A, similar a la encontrada para la apoHb (Sassaroli et al, 1986).

Se ha estimado la proporción de monómeros y dímeros de apoMb en soluciones de distintas concentraciones de RNasa A mediante métodos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal. También se ha puesto un límite inferior a las constantes de equilibrio de dimerización aparente de la apoMb en presencia de distintas concentraciones de RNasa A como proteína aglomerante.

Los experimentos realizados han permitido distinguir entre la formación de homodímeros de apoMb y heterodímeros de apoMb y RNasa A, descartando los últimos.

En medios aglomerados, en los que el solvente no es continuo ni homogéneo, las leyes de la hidrodinámica clásica (Stokes-Einstein-Debye) dejan de ser válidas para describir la variación de los tiempos de correlación rotacional y de difusión translacional con la viscosidad macroscópica del sistema. Trabajos previos proponen una relación empírica potencial entre la viscosidad macroscópica y la microviscosidad rotacional (ecuación (5.12), Lavalette et al, 1999; Endre y Kuchel, 1986; Gavish, 1980) para determinados medios. Los experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal realizados en este trabajo, han probado la validez de esta relación

empírica para la descripción de la difusión rotacional de proteínas como la apoMb, monomérica o dimérica, en presencia de otras proteínas como la HSA o la RNasa A. El efecto de la aglomeración macromolecular sobre la difusión rotacional es único para cada pareja de especie que rota y especie aglomerante de modo que el parámetro  $q$  debe determinarse específicamente para cada sistema. Los valores obtenidos para este exponente  $q$  en este y otros trabajos son siempre menores que 1.

Por otro lado, se ha estudiado mediante una técnica de molécula única, FCS, la difusión translacional del monómero de apoMb en presencia de altas concentraciones de RNasa A o de HSA. Se ha propuesto una relación empírica, análoga a la utilizada para la difusión rotacional (ecuación (5.13)), para la descripción de la variación de los tiempos de difusión translacional obtenidos con la viscosidad macroscópica. También en este caso, el valor del parámetro  $q$  debe determinarse individualmente para cada pareja de especie que difunde y especie concentrada. Para la difusión translacional, la diferencia más llamativa con respecto a lo encontrado para la difusión rotacional es que el valor del parámetro  $q$  es en todos los casos mayor que 1.

En igualdad de condiciones de aglomeración macromolecular, la difusión translacional de una especie se ve más impedida que su difusión rotacional. Este mayor impedimento podría estar relacionado con la presencia de obstáculos que dificultan la difusión translacional y que afectan en menor medida a la difusión rotacional.

La información que las técnicas de FCS y anisotropía de fluorescencia proporcionan, al ser aplicadas a estudios en medios aglomerados, es en cualquier caso complementaria por lo que siempre que sea posible la mejor opción es su utilización conjunta. Sin embargo, en ocasiones, las características del sistema objeto de estudio pueden limitar la aplicación de alguna de las dos.

La viabilidad de la aplicación de los métodos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal y de FCS a los medios aglomerados demostrada en este trabajo, proporciona herramientas de potencial utilidad para el estudio cuantitativo de las propiedades e interacciones entre macromoléculas en este tipo de medios. Asimismo, estudios detallados como el aquí realizado, facilitan la interpretación de posibles ensayos de alto rendimiento y cribado, en sistemas con aglomeración macromolecular, en los que se utilicen algunas de estas técnicas, anisotropía de fluorescencia o FCS.

# *1. Introducción*

---

## 1. AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR. CONSECUENCIAS BIOQUÍMICAS, BIOFÍSICAS Y FISIOLÓGICAS

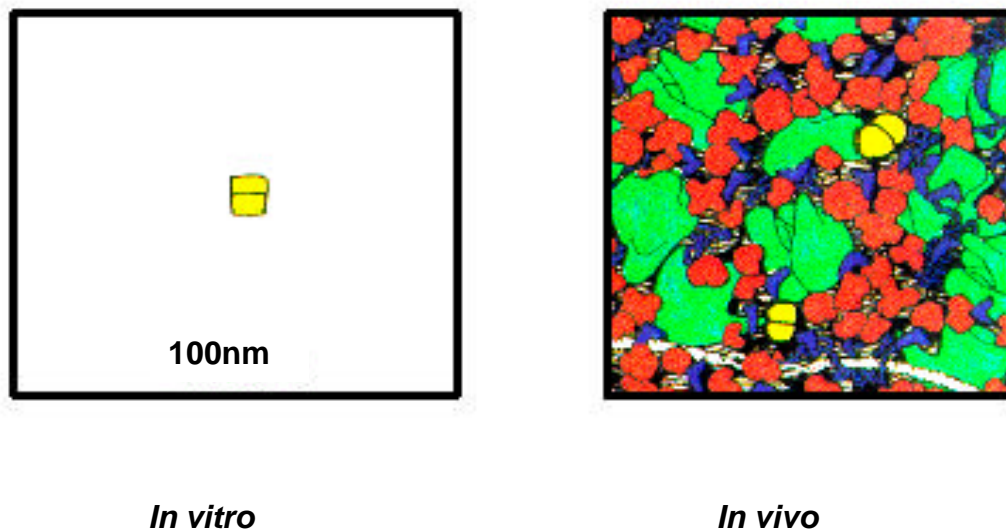
Una propiedad característica de los sistemas biológicos es la alta concentración total de macromoléculas (entre 50 y 400 mg/mL), que pueden encontrarse en solución o bien formando estructuras diversas, como es el caso de las fibras citoesqueléticas (Fulton, 1982; Zimmerman y Minton, 1993). Así, por ejemplo, el plasma sanguíneo contiene una concentración total de proteína del orden de 80 mg/mL (Ellis, 2001), la hemoglobina se encuentra a una concentración total de 330 mg/mL en el citosol del eritrocito, la matriz mitocondrial contiene una concentración total de proteínas de 500 mg/mL (Ralston, 1990) y el citoplasma bacteriano contiene una concentración de proteínas del orden de 300-400 mg/mL (Record et al, 1998; Zimmerman y Trach, 1991).

En general, en los sistemas biológicos, dicha concentración tan elevada no se debe a una única especie molecular, sino que se origina en la suma de una gran variedad de macromoléculas del sistema tomadas en conjunto, las cuales además dan lugar a una significativa ocupación de volumen (*Figura 1.1*). Por ello, en lugar de referirnos a estos sistemas como “concentrados”, nos referimos a ellos como aglomerados (“*crowded*”) o bien confinados, dependiendo de que las especies se encuentren en solución o formando estructuras (Minton, 2001).

En los experimentos “*in vitro*” se intenta controlar condiciones experimentales como el pH, la fuerza iónica o la composición del sistema, de modo que se asemejen, en la medida de lo posible, a las condiciones del medio biológico en el que se desarrolla el proceso objeto de estudio. Sin embargo, el conocimiento detallado de las velocidades, equilibrio y mecanismo de las reacciones bioquímicas, se ha adquirido a partir de experimentos realizados tradicionalmente en soluciones con muy baja concentración total (menor, aproximadamente, de 1 mg/mL) de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y/o polisacáridos) junto con sales tamponadoras y ligandos fisiológicos de bajo peso molecular (Ellis, 2001; Minton, 2001).

La alta concentración de macromoléculas en los sistemas biológicos da lugar a interacciones de tipo no específico entre las especies presentes, que tienen un importante efecto sobre la termodinámica y la cinética de las reacciones entre macromoléculas en los fluidos fisiológicos (Ellis, 2001). Por tanto, para determinar correctamente el papel fisiológico de una reacción particular o de un conjunto de reacciones caracterizadas “*in vitro*”, es importante considerar la posible influencia de la

aglomeración macromolecular, o del confinamiento, sobre la reacción en su medio biológico (Minton, 2001).



**Figura 1.1:** Comparación del entorno de una macromolécula en un experimento “in vitro” realizado en solución diluida con la situación “in vivo” de dicha macromolécula. La imagen amarilla representa la molécula de la chaperona molecular GroEL en tampón (“in vitro”) y en el interior del mismo volumen de citoplasma bacteriano donde dicha proteína ejerce su función. Figura tomada de Ellis y Hartl, (1996).

### 1.1. Interacciones no específicas. Fenómeno de exclusión de volumen

Las interacciones no específicas son aquellas que no dependen fuertemente de detalles de la estructura primaria, secundaria o terciaria de las macromoléculas, sino más bien de sus propiedades globales, como la carga neta, la polaridad y la forma macromolecular. Las interacciones no específicas pueden ser de tipo repulsivo (estéricas, electrostáticas...) o atractivo (electrostáticas, hidrofóbicas...) y, en general, son sustancialmente más débiles que las interacciones específicas.

La repulsión estérica es la más fundamental de todas las interacciones entre macromoléculas en solución, y está siempre presente a concentraciones finitas independientemente de la magnitud de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas

adicionales (Minton, 1997). Dado que dos moléculas no pueden ocupar la misma región del espacio, cuando la concentración de macromoléculas es muy alta, una proporción significativa de volumen está físicamente ocupada y, por tanto, no disponible para otras moléculas. Como ejemplo se puede considerar el caso más sencillo de moléculas idénticas todas ellas esféricas, en el que la posición de cada una queda perfectamente definida por la posición de su centro. En principio, lo más cercanos que pueden estar dos centros es una distancia igual a la suma de los radios de las dos partículas, de modo que alrededor de cada molécula hay un volumen en el cual los centros de otras están excluidos (Figura 1.2). Si se continúa añadiendo moléculas en la solución, las posiciones en las que es posible colocar cada molécula añadida se limita progresivamente. El espacio en el que cada molécula puede estar localizada está restringido al volumen de la solución del que no está excluida, es decir, el volumen disponible (Ralston, 1990).

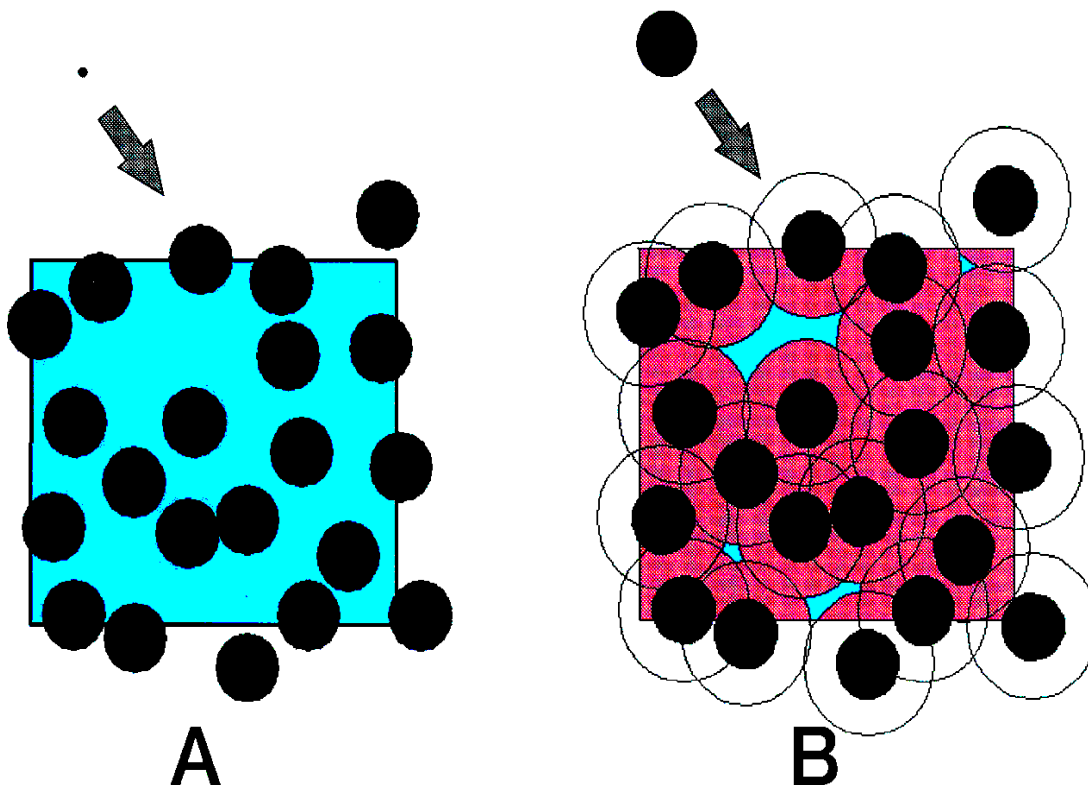
El volumen excluido y el volumen disponible en una solución, dependen de las formas y tamaños relativos de todas las especies presentes en la misma. Cuando a una solución con una alta concentración de partículas de un cierto tamaño se añade otra especie, entonces, si el tamaño de la nueva especie es pequeño en comparación con el de las especies ya presentes, el volumen disponible para esta nueva especie es aproximadamente la parte del volumen total no ocupada por las partículas previamente existentes. Sin embargo, si la nueva especie es de un tamaño comparable o superior al de las especies ya presentes, el volumen disponible es sustancialmente más pequeño que el volumen no ocupado por las partículas iniciales (Figura 1.2, Minton, 2001).

La concentración real,  $c$ , y la concentración efectiva o *actividad termodinámica*,  $a$ , de una especie en solución están relacionadas a través del denominado coeficiente de actividad,  $g$ , que tiene en cuenta las desviaciones con respecto al comportamiento ideal:

$$g = \frac{a}{c} \quad (1.1)$$

En una solución ideal, no existe interacción entre las moléculas de soluto, de modo que el coeficiente de actividad es igual a 1 y la actividad termodinámica de una especie es idéntica a su concentración. Sin embargo, en los sistemas en los que existe aglomeración macromolecular, la ocupación de volumen impone restricciones en la

posición que nuevas macromoléculas pueden ocupar en el espacio. Cuantas más partículas haya en la solución, menores son las posibilidades de distribución espacial de nuevas partículas, lo que conlleva a una disminución de la entropía del sistema. La disminución de la entropía del medio tiene como consecuencia el aumento de la energía libre del mismo, lo que implica que el coeficiente de actividad es mayor que 1 y, por tanto, la concentración efectiva de las especies es superior a su concentración real (Ralston, 1990). La diferencia entre las concentraciones efectiva y real de las especies, tiene importantes consecuencias sobre la cinética y la termodinámica de las reacciones que tienen lugar en los medios aglomerados (Ellis, 2001).



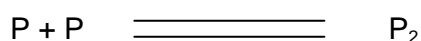
**Figura 1.2:** Volumen excluido (rojo y negro) y volumen disponible (azul) en una solución de alta concentración de partículas esféricas. Figura A: volumen disponible para una partícula de tamaño infinitesimal. Figura B: volumen disponible para una partícula de tamaño comparable al de las partículas ya presentes en el medio. Figura tomada de Minton, (2001).

## 1.2. Consecuencias termodinámicas de la aglomeración macromolecular

La exclusión de volumen en condiciones de aglomeración macromolecular afecta a los equilibrios químicos de reacciones entre macrosolutos mediante la desestabilización preferencial de reactivos o productos. En general, el estado más favorable será el que menos volumen excluye al resto de las especies presentes en el sistema. Por ejemplo, las conformaciones macromoleculares compactas excluyen menos volumen para otros macrosolutos que las extendidas, y los agregados oligoméricos o poliméricos macromoleculares, excluyen menos volumen para otros macrosolutos que un número igual de subunidades aisladas (*Figura 1.3*). Por tanto, en general, la aglomeración macromolecular proporciona una fuerza no específica para la compactación y la asociación de macromoléculas (Zimmerman y Minton, 1993; Minton, 1981; Minton, 1998a).

El aumento que la aglomeración macromolecular produce en las constantes de equilibrio de las reacciones de asociación, con respecto a las que se obtienen en las mismas condiciones pero en soluciones diluidas, puede ser de varios ordenes de magnitud dependiendo de los tamaños relativos de los reactivos y productos de la reacción y de la especie altamente concentrada del medio (Ellis, 2001). Un aspecto de importancia es que la aglomeración macromolecular aumenta la tendencia inherente de las macromoléculas a la asociación, pero no crea dicha tendencia “*de novo*”.

El caso más sencillo de una reacción de asociación macromolecular lo constituye la dimerización reversible de una proteína:



La constante termodinámica de asociación de este equilibrio se expresaría en términos de los coeficientes de actividad:

$$K = \frac{a_2}{a_1^2} \quad (1.2)$$

donde los subíndices 1 y 2 se refieren al monómero y dímero, respectivamente. Por otra parte, se suelen utilizar comúnmente constantes de equilibrio expresadas en términos de concentraciones de especies:



$$K' = \frac{[P_2]}{[P]^2} \quad (1.3)$$

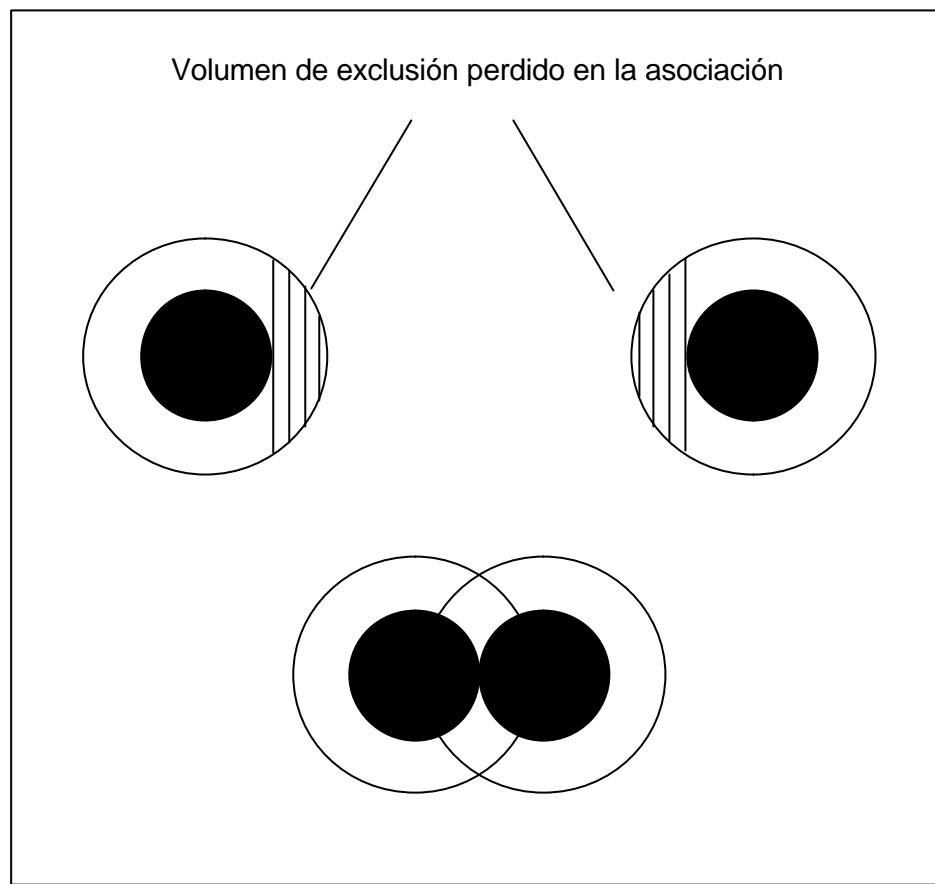
Esta constante  $K'$  es en realidad una constante aparente, que se relaciona con la constante termodinámica del equilibrio  $K$  mediante la siguiente expresión:

$$K' = K \frac{g_1^2}{g_2} \quad (1.4)$$

donde de nuevo los subíndices 1 y 2 se refieren al monómero y dímero, respectivamente. En soluciones diluidas ideales, los coeficientes de actividad son cercanos a la unidad y la constante de equilibrio aparente es aproximadamente igual a la constante real del equilibrio. Sin embargo, en condiciones de aglomeración macromolecular, como ya se ha indicado, los coeficientes de actividad de las especies del sistema toman valores muy diferentes de la unidad así como la relación de los mismos, de modo que la constante aparente difiere del valor termodinámico (Ralston, 1990).

### 1.3. Efecto de la aglomeración macromolecular sobre la velocidad de las reacciones

El efecto de la aglomeración macromolecular sobre la velocidad de reacción va a depender de cuál sea la etapa limitante de la velocidad global. En el caso de que la velocidad de la reacción dependa de la velocidad a la que los reactivos se aproximan unos a otros, entonces la reacción estará limitada por la difusión. Como la aglomeración macromolecular reduce la difusión translacional, entonces también disminuirá la velocidad de la reacción. La etapa limitante de la velocidad global de la reacción puede ser también la velocidad de conversión del estado de transición en productos. En este caso, si la formación del estado de transición está favorecida por la aglomeración macromolecular, como sucede en el caso de las reacciones de asociación por ejemplo, la velocidad de la reacción aumentaría. En el límite de alta ocupación de volumen, es de esperar que todas las reacciones estén limitadas por la difusión y que, por tanto, la aglomeración macromolecular de lugar a una disminución de su velocidad global (Minton, 2001).



**Figura 1.3:** La formación de un dímero a partir de dos monómeros esféricos produce una pérdida de volumen excluido a un soluto inerte, representado por las regiones rayadas. Figura tomada de Ralston, (1990)

#### 1.4. Aglomeración macromolecular y función biológica

En principio, la aglomeración macromolecular afecta el equilibrio y la cinética de cualquier reacción macromolecular en la que exista una diferencia significativa entre el volumen excluido a los reactivos y el excluido a los productos de la reacción. Estas reacciones incluyen las homo o heteroasociaciones, la condensación (cristalización, formación de fibras controlada por nucleación), la unión de macromoléculas a sitios de superficie específicos, la adsorción inespecífica a superficies y la isomerización de proteínas, incluido el plegamiento y desplegamiento (Lebowitz et al, 1965; Minton, 1981; Zimmerman y Minton, 1993; Ralston, 1990;

Minton, 1995, 2000a y b). La aglomeración puede incluso afectar a reacciones entre pequeñas moléculas catalizadas por enzimas, si el mecanismo de catálisis implica un cambio conformacional significativo del enzima (Minton, 1981, 2001)

Como se ha visto más arriba, la ocupación de volumen tiene un efecto muy importante sobre la reactividad de casi cualquier especie macromolecular, tanto concentrada como diluida, que desarrolle su función en un medio fisiológico. A partir de la teoría de exclusión de volumen, se ha estimado que pequeños cambios en la concentración intracelular total de macromoléculas, pueden tener como consecuencia importantes cambios en la reactividad de las especies (Minton, 1994). Por ello, todo tipo de células, desde las bacterianas a las humanas, disponen de uno o más mecanismos para el mantenimiento o la restauración del volumen celular en respuesta a cambios en la composición del fluido extracelular (Somero et al, 1992; Record et al, 1998).

Estudios recientes (Shtilerman et al, 2002; Uversky, 2001) han demostrado, que la aglomeración macromolecular en el citoplasma de las neuronas puede favorecer y acelerar la formación y estabilización de fibras amiloides directamente relacionadas con la enfermedad neurodegenerativa de Parkinson. Por lo tanto, el incremento de la incidencia de este tipo de enfermedades, relacionadas con la formación de fibras amiloides con la edad de los individuos, podría ser una consecuencia directa del aumento de la concentración total de proteína intracelular con la edad. Esta hipótesis está apoyada por la evidencia de una disminución significativa del contenido de agua en el cerebro con el envejecimiento (Naber et al, 1979; Zs-Nagy et al, 1981, 1982).

### **1.5. Aproximaciones experimentales al estudio del efecto de la aglomeración macromolecular sobre las reacciones entre macromoléculas**

El conocimiento detallado de los procesos que tienen lugar en el interior de las células vivas, en general, se adquiere mediante una aproximación en tres etapas. En primer lugar, a pesar de que las técnicas biofísicas aplicables a los sistemas “*in vivo*” están desarrollándose a gran velocidad, todavía es necesario estudiar las propiedades e interacciones de los componentes celulares que intervienen en los distintos procesos en condiciones próximas a las termodinámicamente ideales. En segundo lugar, es

necesario comprender el efecto de la presencia de moléculas que ocupan volumen sobre los parámetros experimentales y las interacciones entre las macromoléculas. Este conocimiento se puede adquirir, en parte, mediante estudios cuantitativos del fenómeno de la exclusión de volumen en sistemas modelo bien definidos. En tercer lugar, los resultados obtenidos en solución diluida y en medios aglomerados, serán de gran utilidad para la interpretación de las propiedades y parámetros de las interacciones determinadas "in vivo" (Ralston, 1990).

El estudio cuantitativo de la estructura y dinámica de macromoléculas en condiciones de aglomeración macromolecular presenta grandes dificultades experimentales, derivadas fundamentalmente de la elevada concentración total de macromoléculas en este tipo de sistemas. La mayor parte de las técnicas biofísicas comúnmente utilizadas para el estudio y caracterización de procesos bioquímicos en solución diluida, se encuentran con importantes problemas cuando son aplicadas al estudio de dichos procesos en sistemas con aglomeración macromolecular. Algunos de estos problemas afectan al diseño experimental. Así, por ejemplo, la elevada absorbancia, la dispersión de luz, los cambios de índice de refracción o la elevada magnitud de los fondos de fluorescencia, obligan a realizar modificaciones en los protocolos experimentales con respecto a los habitualmente utilizados en solución diluida. Por otro lado, las desviaciones del comportamiento ideal observadas en estas soluciones introducen dificultades en la interpretación de los resultados experimentales obtenidos con las distintas técnicas. Por ejemplo, como consecuencia de la no idealidad termodinámica, las masas moleculares aparentes determinadas para las especies presentes en los sistemas con aglomeración macromolecular, utilizando técnicas de ultracentrifugación analítica, deben ser corregidas con el fin de obtener los verdaderos valores. Las viscosidades microscópicas que actúan sobre la rotación o la translación de las especies moleculares en los medios con aglomeración macromolecular, difieren de la viscosidad macroscópica. Por ello, a partir de los coeficientes de difusión rotacional o translacional medidos en estas soluciones, es difícil determinar el tamaño de las correspondientes especies, si no se tiene información sobre la viscosidad microscópica.

El equilibrio de sedimentación es uno de los tres métodos clásicos para la medida directa de la actividad termodinámica de macromoléculas en solución, además de la medida de la presión osmótica y la dispersión de luz Rayleigh (Tanford, 1961). En principio, ninguna de estas técnicas parece adecuada para la medida de la actividad y estado de asociación de una especie trazadora en una solución con

aglomeración macromolecular. Sin embargo, las medidas y el análisis del equilibrio de sedimentación en condiciones de no idealidad con trazador, recientemente introducido por Rivas et al (1999a), permiten utilizar la técnica de equilibrio de sedimentación para la medida de coeficientes de actividad y propiedades de asociación de proteínas a baja concentración, en presencia de altas concentraciones de proteínas no relacionadas. Otra herramienta experimental con un gran potencial para estudios de propiedades moleculares de proteínas individuales en medios altamente aglomerados es, en principio, la espectroscopía de fluorescencia. Las técnicas de fluorescencia se utilizan habitualmente, con gran éxito, para la obtención de información cuantitativa sobre la conformación e interacciones de macromoléculas biológicas en solución diluida. Sin embargo, hasta ahora, el único intento de aplicación de estas técnicas al estudio de asociaciones en medios con aglomeración macromolecular, lo constituye un trabajo publicado por Wilf y Minton (1981). En este trabajo, se estudiaba la autoasociación de la proteína apoMb en presencia de altas concentraciones de proteínas no relacionadas, como la RNasa A, la lisozima o la  $\beta$ -lactoglobulina, mediante medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario. La aplicación y desarrollo de métodos avanzados de espectroscopía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos, así como de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), para el estudio de las propiedades dinámicas y estructurales de macromoléculas en condiciones de aglomeración macromolecular, puede ser de gran utilidad para la cuantificación de los procesos bioquímicos que tienen lugar en este tipo de medios y, por tanto, para un conocimiento más completo de los procesos fisiológicos y celulares.

## *2. Objetivos*

---

El **objetivo general** de este trabajo es desarrollar métodos avanzados de espectroscopía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos y de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), para la caracterización hidrodinámica y el estudio cuantitativo de las interacciones entre macromoléculas en condiciones de aglomeración macromolecular, que asemejen las existentes en los fluidos fisiológicos.

Para dicho estudio se ha seleccionado una proteína modelo física y químicamente bien caracterizada, la apomioglobina (apoMb), que en solución diluida, a pH 7.4, se encuentra en forma monomérica a las concentraciones estudiadas en este trabajo. En presencia de altas concentraciones de algunas proteínas no relacionadas, la apoMb autoasocia, dando lugar a la formación de dímeros (Wilf y Minton, 1981).

Los **objetivos específicos** que se han planteado en el desarrollo de la metodología propuesta han sido los siguientes:

1. *Identificar y caracterizar hidrodinámicamente distintas especies en condiciones de aglomeración macromolecular, mediante métodos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos.* El desarrollo de este objetivo se realizará mediante la identificación de la presencia de monómeros y/o dímeros de apoMb en soluciones concentradas de ribonucleasa A (RNasa A) o de albúmina sérica humana (HSA). Asimismo, se estudiará el efecto de altas concentraciones de RNasa A o de HSA, tanto sobre las conformaciones globales como sobre los posibles movimientos segmentales del monómero y el dímero de apoMb.

2. *Aplicar las técnicas de anisotropía de fluorescencia a la determinación de las proporciones de distintas especies macromoleculares, y de constantes de equilibrio de asociación aparentes, en medios aglomerados.* Para alcanzar este objetivo se determinarán las proporciones de monómero y dímero de apoMb y las constantes de dimerización aparentes en soluciones con concentraciones elevadas de RNasa A o HSA.

3. *Estudiar de forma comparativa el efecto de altas concentraciones de distintas especies sobre constantes de equilibrio de asociación aparentes.* El desarrollo de este objetivo se realizará mediante el estudio del efecto de altas concentraciones de RNasa A y de concentraciones del mismo orden de HSA sobre el equilibrio de dimerización de la apoMb.

4. *Estudiar, mediante técnicas de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal, el efecto de la aglomeración macromolecular sobre la difusión rotacional de*

las proteínas. Se pretende estudiar el efecto sobre la rotación global de una especie y sobre los posibles movimientos segmentales (flexibilidad) de la misma. Con este objetivo, se estudiará el efecto de la presencia de altas concentraciones de RNasa A y HSA sobre la rotación del dímero y el monómero de apoMb.

5. *Comprobar las condiciones de validez de la ecuación empírica ((ecuación 5.12), Endre y Kuchel, 1986; Lavalette et al 1999; Gennaro et al 1996; Gavish, 1980) que establece una relación potencial entre la viscosidad macroscópica y la microviscosidad rotacional, para la descripción de la difusión rotacional de proteínas en presencia de altas concentraciones de otras proteínas.* El desarrollo de este objetivo se realizará mediante el estudio de la difusión rotacional del monómero y el dímero apoMb en soluciones de alta concentración de RNasa A y de HSA utilizando métodos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal.

6. *Desarrollar una metodología que permita la aplicación de la técnica de FCS al estudio de la difusión translacional de proteínas en presencia de altas concentraciones de otras proteínas.* Para lograr este objetivo se estudiará la difusión translacional del monómero de apoMb en presencia de altas concentraciones de RNasa A y de HSA.

7. *Proponer relaciones empíricas entre la viscosidad local que actúa sobre la translación y la macroviscosidad, válidas para describir el efecto de la aglomeración macromolecular sobre la difusión translacional.*

8. *Comparar el efecto de la aglomeración macromolecular sobre la difusión rotacional y translacional de una misma especie en el mismo y en distintos medios.* El desarrollo de este objetivo se realizará mediante el estudio comparativo del efecto de la presencia de altas concentraciones de RNasa A o de HSA sobre la difusión rotacional y translacional de la apoMb.



### *3. Fundamento Teórico*

---

### 3.1. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un caso particular de luminiscencia en el que la excitación óptica de un cromóforo y la emisión desde el mismo, tienen lugar a través de estados electrónicos singletes. Algunas sustancias naturales, como las proteínas, muestran fluorescencia intrínseca como resultado de la presencia de grupos aromáticos en su estructura (triptófano, tirosina, fenilalanina, FMN, FAD, NADH...). Sin embargo, en ocasiones es necesario introducir fluoróforos extrínsecos (fluoresceína, ANS,...) con el fin de adecuar las propiedades espectrales de las sustancias a las necesidades de cada experimento.

La determinación de la intensidad de fluorescencia se puede realizar en estado estacionario, es decir, con excitación y observación constantes. También se pueden realizar determinaciones con resolución temporal, cuando la muestra se excita, por ejemplo por un pulso de luz de muy corta duración y la emisión se detecta por medio de un sistema de alta velocidad. El tiempo de vida media de fluorescencia de un fluoróforo es el tiempo promedio que la molécula permanece en el estado excitado antes de decaer al estado fundamental. Los tiempos de vida media de fluorescencia de los fluoróforos utilizados comúnmente suelen ser del orden de 2-15 ns. Debido a la corta escala de tiempos de la fluorescencia, las medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo requieren métodos ópticos y electrónicos muy complejos. A pesar de las dificultades experimentales, los estudios de fluorescencia con resolución temporal son muy útiles debido al gran volumen de información que proporcionan, en comparación con la información (promediada temporalmente) que se obtiene a partir de las medidas de estado estacionario. Los métodos habitualmente utilizados para medir intensidades de fluorescencia en la zona ultravioleta-visible pueden trabajar en el dominio de tiempos o de frecuencias. En el presente trabajo se ha utilizado el primero de los dos métodos, de dominio de tiempos, en el que la muestra se excita con un pulso de luz y se mide la variación temporal de la intensidad de fluorescencia.

El éxito de la espectroscopía de fluorescencia para los estudios dinámicos y estructurales de sistemas biológicos se debe a su gran sensibilidad, a su capacidad de respuesta a cambios en el microentorno de la molécula emisora, debido a la especificidad de las características de la fluorescencia (espectros, rendimiento cuántico, tiempos de vida media...) y a la posibilidad de proporcionar información espacial y temporal.

### 3.1.1. Tiempos de vida media de fluorescencia

El tiempo de vida media de fluorescencia ( $t$ ) es el tiempo promedio que las moléculas permanecen en el estado excitado después de la excitación. El tiempo de vida media de fluorescencia es una de las características más importantes de los fluoróforos, ya que representa la ventana experimental de tiempo para la observación de cualquier proceso dinámico.

La excitación de una muestra que contiene un fluoróforo con un pulso de luz infinitamente estrecho, tiene como consecuencia que un cierto número de moléculas del fluoróforo pasen al estado excitado. Para fluoróforos con un solo tiempo de vida media de fluorescencia, la intensidad de fluorescencia decae exponencialmente de acuerdo con la siguiente expresión:

$$I(t) = I(0) \exp(-t/\tau) \quad (3.1)$$

donde  $I(0)$  es la intensidad de fluorescencia a tiempo cero. El tiempo de vida media de fluorescencia ( $\tau$ ) es el tiempo en el que la intensidad de fluorescencia decae en un factor de  $1/e$  con respecto a su valor a tiempo cero ( $I(0)$ ).

Normalmente, sobretodo en el caso de moléculas biológicas, es difícil encontrar muestras que presenten decaimientos de intensidad de fluorescencia monoexponenciales. En estos casos, se utiliza un modelo multiexponencial, según el cual la intensidad de fluorescencia decae como una suma de decaimientos exponenciales:

$$I(t) = I(0) \sum_{i=1}^n a_i \exp(-t/\tau_i) \quad (3.2)$$

donde  $\tau_i$  son los tiempos de vida media de fluorescencia y  $a_i$  los factores preexponenciales, que representan la contribución fraccional de la especie con tiempo de vida media  $\tau_i$  al decaimiento de intensidad ( $\sum a_i = 1$ ). La existencia de varios tiempos de vida media de fluorescencia puede deberse a la presencia de varios fluoróforos en la muestra o bien de un único fluoróforo que se encuentra en distintos microentornos dentro del sistema. En éste último caso, los factores preexponenciales se pueden interpretar como la fracción de moléculas de fluoróforo en cada

microentorno. En general, los factores preexponenciales  $a_i$  contienen información sobre la concentración, el coeficiente de absorción molar y el rendimiento cuántico de fluorescencia de la especie  $i$ .

Para los decaimientos de intensidad de fluorescencia multiexponenciales, se pueden definir dos tipos de tiempos de vida media promedio (Valeur, 2002): el promediado por la amplitud ( $\langle t \rangle_1$ ) y el promediado por la intensidad de fluorescencia ( $\langle t \rangle_2$ ):

$$\langle t \rangle_1 = \frac{\sum_{i=1}^n a_i t_i}{\sum_{i=1}^n a_i} \quad (3.3)$$

$$\langle t \rangle_2 = \frac{\sum_{i=1}^n a_i t_i^2}{\sum_{i=1}^n a_i t_i} \quad (3.4)$$

### 3.1.2. Anisotropía de fluorescencia

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se han utilizado ampliamente para la obtención de información sobre la forma, el tamaño, la rigidez o la flexibilidad de moléculas biológicas. La técnica constituye asimismo una herramienta de gran utilidad para el estudio de interacciones moleculares proteína - proteína, proteína – ligando o proteína – ácidos nucleicos.

#### 3.1.2.1. Emisión de fluorescencia polarizada. Concepto de fotoselección

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se basan en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada. Cuando una población de fluoróforos se excita con luz linealmente polarizada, la probabilidad de excitación de una molécula de fluoróforo depende de la orientación de su momento dipolar de absorción con respecto a la dirección del vector campo eléctrico de la luz de

excitación. De este modo, se excitan preferentemente las moléculas de fluoróforo cuyo momento de transición está orientado en una dirección próxima a la del vector campo eléctrico de la luz de excitación, lo que se conoce como fotoselección (Lakowicz, 1999). La excitación selectiva da lugar a una población de fluoróforos parcialmente orientada y por tanto a una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada.

### 3.1.2.2. Despolarización de fluorescencia inducida por la rotación browniana.

Cualquier cambio en la orientación del momento dipolar de absorción del fluoróforo durante el tiempo de vida media del estado excitado, provoca una disminución de la anisotropía de la fluorescencia emitida. Existen numerosos factores que producen una despolarización de la fluorescencia emitida, entre los que se pueden mencionar las vibraciones torsionales, la transferencia de energía de excitación a otra molécula con diferente orientación y la difusión rotacional de la molécula excitada.

En soluciones fluidas, las moléculas se desplazan angularmente al azar debido al movimiento browniano inducido térmicamente, de modo que la distribución angular inicial de moléculas creada tras la excitación se va destruyendo progresivamente con el tiempo. A partir de la extensión con que se produce la despolarización de la fluorescencia, se puede obtener información sobre los movimientos moleculares, que dependen de la forma y tamaño de las moléculas, y sobre la fluidez del microentorno.

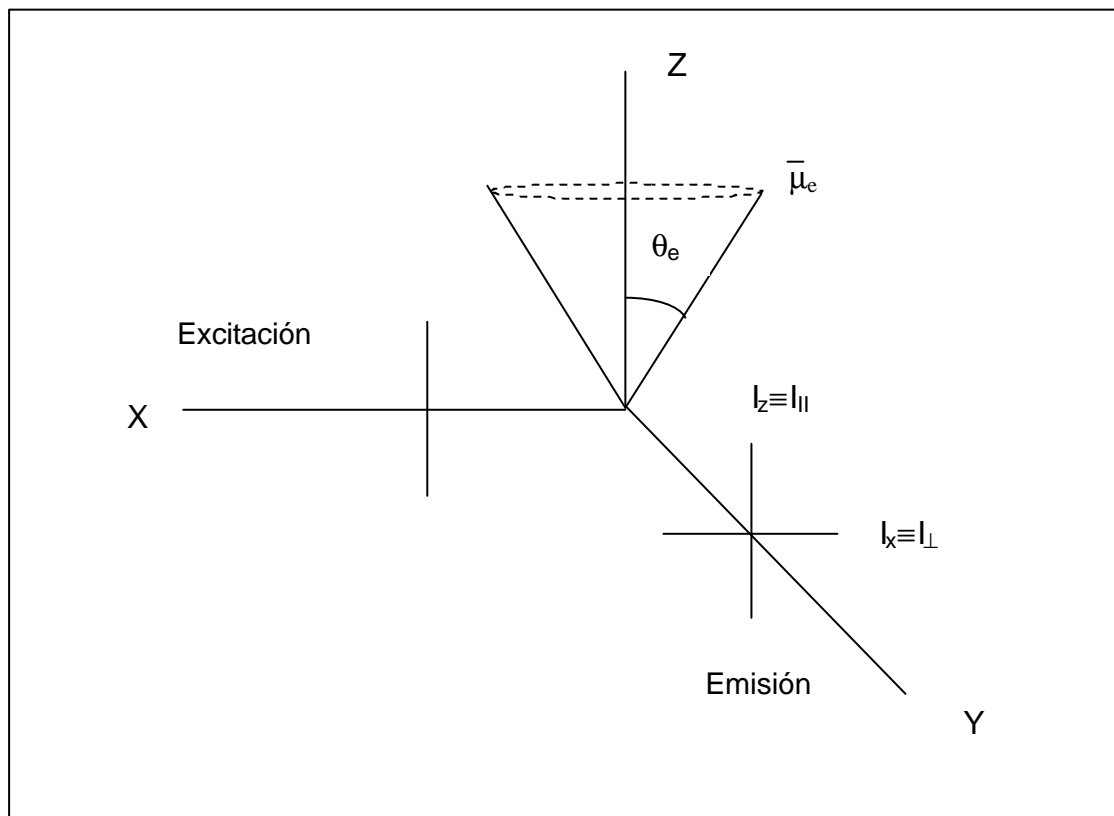
El curso temporal de la despolarización de fluorescencia depende de la relación existente entre el tiempo de vida media de fluorescencia y la velocidad de rotación de las moléculas fluorescentes. Cuando los tiempos de difusión rotacional son muy diferentes del tiempo de vida media de fluorescencia del fluoróforo, no se obtiene prácticamente información dinámica, ya que la rotación ocurre fuera de la ventana de tiempo del experimento. Cuando el tiempo de rotación de una molécula es mucho menor que el tiempo de vida media de fluorescencia de la sonda, se producen muchas rotaciones durante la duración del estado excitado y la intensidad de fluorescencia está totalmente despolarizada. En caso contrario, es decir, cuando la molécula rota muy despacio en comparación con el tiempo de vida media de fluorescencia del fluoróforo, la intensidad de fluorescencia decae antes de que se produzca una disminución significativa de la anisotropía.

### 3.1.2.3. Despolarización de fluorescencia en estado estacionario. Ecuación de Perrin-Weber

La anisotropía de emisión de fluorescencia en estado estacionario de una solución excitada con luz polarizada linealmente se puede calcular mediante la siguiente expresión (Jablonski, 1957):

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (3.5)$$

donde  $I_{||}$  e  $I_{\perp}$  son las componentes de la emisión de fluorescencia en las direcciones paralela y perpendicular respectivamente a la dirección del plano de polarización de la luz de excitación. En esta expresión  $I_{||} + 2I_{\perp}$  es proporcional a la intensidad total de fluorescencia (Figura 3.1).



**Figura 3.1:** Fluorescencia polarizada emitida por una población fotoseleccionada de fluoróforos.  $\theta_e$  es el ángulo que forman el momento de transición de la emisión y el eje Z del laboratorio.

La anisotropía de fluorescencia es función del ángulo promedio formado por el momento dipolar de emisión y la dirección de la polarización de la luz de excitación,  $\mathbf{q}_e$ . En el caso de fluoróforos con momentos dipolares de absorción y emisión paralelos, la anisotropía de fluorescencia se puede expresar como (Lakowicz, 1999):

$$r = \frac{3 \langle \cos^2 \mathbf{q}_e \rangle - 1}{2} \quad (3.6)$$

Cuando los dipolos de emisión están distribuidos al azar, sin ninguna orientación preferente, el valor de  $\langle \cos^2 \mathbf{q}_e \rangle$  es 1/3 y la anisotropía de fluorescencia es cero. Cuando, por el contrario, una población de emisores está totalmente alineada según el eje z, el valor de  $\langle \cos^2 \mathbf{q}_e \rangle$  es 1 y la anisotropía de fluorescencia es 1. En el caso de una población fotoseleccionada de fluoróforos, cuando los momentos dipolares de absorción y emisión son paralelos, el máximo valor posible del  $\langle \cos^2 \mathbf{q}_e \rangle$  es 3/5, de modo que la anisotropía de fluorescencia no puede ser superior a 0.4 (Lakowicz, 1999).

Una propiedad especialmente útil de la anisotropía de fluorescencia es la aditividad. La anisotropía de fluorescencia correspondiente a una mezcla de varios fluoróforos se puede expresar como (Valeur, 2002):

$$r = \sum_i f_i r_i \quad (3.7)$$

donde  $r_i$  es la anisotropía de cada una de las especies y  $f_i$  es la intensidad fraccional correspondiente a cada fluoróforo:

$$f_i = \frac{I_i}{I_T} \quad (3.8)$$

donde  $I_i$  es la intensidad de fluorescencia del fluoróforo  $i$  e  $I_T$  es la intensidad total de fluorescencia.

En el caso de un fluoróforo con un único tiempo de vida media de fluorescencia ( $\tau$ ), unido rígidamente a una esfera, la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario se puede expresar como (Perrin, 1926):

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{t}{f}} \quad (3.9)$$

donde  $r_0$  es la anisotropía intrínseca es decir, la anisotropía característica del fluoróforo en ausencia de movimientos. El valor de  $r_0$  es una propiedad específica de cada fluoróforo y depende de la orientación relativa de los momentos dipolares de transición de absorción y emisión.  $f$  es el tiempo de correlación rotacional del fluoróforo, que está relacionado con el coeficiente de difusión rotacional ( $D_r$ ) mediante la siguiente expresión:

$$f = (6D_r)^{-1} \quad (3.10)$$

En medios continuos y homogéneos, la ecuación de Stokes-Einstein-Debye establece la siguiente relación entre el tiempo de correlación rotacional de un rotor esférico y su volumen hidrodinámico:

$$f = \frac{\eta V}{kT} \quad (3.11)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad del medio,  $T$  la temperatura en Kelvin,  $k$  es la constante de Boltzman y  $V$  el volumen hidrodinámico de la especie que rota.

El volumen hidrodinámico de una proteína en solución acuosa se puede expresar en función de su masa molecular  $M$ , del volumen específico parcial  $\bar{v}$  y del grado de hidratación  $h$  (Cantor y Schimmel, 1980):

$$V = M(\bar{v} + h) \quad (3.12)$$

La hidratación de una proteína suele tomar valores entre 0.2 y 0.4 gramos de  $H_2O$  por gramo de proteína (Squire y Himmel, 1979).

Las ecuaciones (3.11) y (3.12) permiten estimar de forma aproximada el tiempo de correlación rotacional de una proteína, conocida su masa molecular, si se comportara en solución como un sólido rígido esférico (Lakowicz, 1999):



$$\mathbf{f} = \frac{hV}{RT} = \frac{hM}{RT} (\bar{\nu} + h) \quad (3.13)$$

En general, los tiempos de correlación rotacional determinados experimentalmente para las proteínas suelen ser mayores que los estimados a partir de la expresión (3.13), lo que se debe normalmente a la incompleta esfericidad de las mismas. La determinación de tiempos de correlación rotacional menores, suele ser un indicativo de flexibilidad molecular.

En el caso general de fluoróforos con más de un tiempo de correlación rotacional y más de un tiempo de vida media de fluorescencia, la expresión que se obtiene para la anisotropía en estado estacionario es la siguiente (Lillo, Tesis Doctoral, 1985):

$$\frac{r}{r_0} = \sum_i \sum_j \frac{\mathbf{b}_j \mathbf{f}_i}{1 + \frac{\mathbf{t}_i}{\mathbf{f}_j}} \quad (3.14)$$

donde  $\mathbf{f}_i = \frac{\mathbf{a}_i \mathbf{t}_i}{\sum_i \mathbf{a}_i \mathbf{t}_i}$  representa la contribución fraccional de cada tiempo de vida media

de fluorescencia  $\mathbf{t}_i$  a la intensidad de fluorescencia total y  $\mathbf{b}_j$  la contribución fraccional de cada tiempo de correlación rotacional  $\mathbf{f}_j$  al decaimiento de anisotropía de fluorescencia (ver *Fundamento Teórico 3.1.2.5*).

#### 3.1.2.4. Multiplicación de factores de despolarización. Regla de Soleillet

Un fenómeno de fotoselección da lugar a una población orientada de fluoróforos excitados cuya emisión está fuertemente polarizada. Cada desplazamiento angular del dipolo de emisión respecto del de absorción, da lugar a una despolarización de la fluorescencia que puede expresarse como un factor de despolarización  $d_i$ . De acuerdo con la regla de Soleillet (Soleillet, 1929), la anisotropía resultante depende del producto de los factores de despolarización:

$$r = r_0 \prod_i d_i \quad (3.15)$$

Cuando la despolarización de la fluorescencia tiene lugar como consecuencia de un cierto número de procesos sucesivos de reorientaciones locales, la anisotropía de fluorescencia se puede expresar como (Soleillet, 1929):

$$r = r_0 \prod_i \frac{3\langle \cos^2 \mathbf{q}_i \rangle - 1}{2} \quad (3.16)$$

donde  $\mathbf{q}_i$  representa el ángulo del desplazamiento del momento dipolar de emisión con respecto al de absorción, provocado por cada reorientación.

### 3.1.2.5. Despolarización de fluorescencia resuelta en el tiempo. Rotación global y dinámica local

La anisotropía de fluorescencia en estado estacionario representa un promedio temporal del decaimiento de anisotropía pesado por la intensidad de fluorescencia en cada instante. Por otra parte, la anisotropía de fluorescencia con resolución temporal proporciona información muy importante, ya que está directamente relacionada con la forma, el tamaño y la flexibilidad de la macromolécula.

La obtención del decaimiento de anisotropía de fluorescencia de un fluoróforo excitado con luz polarizada verticalmente, implica la medida experimental de los decaimientos de las componentes de la emisión de fluorescencia polarizadas vertical  $I_{||}(t)$  y horizontalmente  $I_{\perp}(t)$ . Los decaimientos de las componentes paralela y perpendicular de la emisión vienen dados por:

$$I_{||}(t) = \frac{1}{3} I(t) [1 + 2r(t)] \quad (3.17)$$

$$I_{\perp}(t) = \frac{1}{3} I(t) [1 - r(t)] \quad (3.18)$$

donde  $r(t)$  es el decaimiento de anisotropía de fluorescencia:

$$r(t) = \frac{I_{||}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{||}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (3.19)$$

La información que se puede obtener del análisis de un decaimiento de anisotropía de fluorescencia depende de la relación existente entre el tiempo de vida media del fluoróforo y los tiempos de correlación rotacional asociados a este fluoróforo. Como ya se ha comentado antes, las condiciones experimentales que permiten estudiar mejor los fenómenos de rotación, son aquellas en las que el tiempo de vida media del fluoróforo es del mismo orden que los tiempos de correlación rotacional que se desea medir.

**Rotores rígidos esféricos.** En el caso más simple, de un rotor esférico con un único tiempo de correlación rotacional, el decaimiento de anisotropía de fluorescencia se puede expresar como una función monoexponencial de la forma:

$$r(t) = r_0 \exp(-t/\mathbf{f}) \quad (3.20)$$

donde  $r_0$  es la anisotropía intrínseca del fluoróforo.

A medida que el modelo hidrodinámico del rotor se aleja de la simetría esférica, las expresiones para  $r(t)$  se hacen más complejas. Además, al movimiento global de la macromolécula objeto de estudio, se pueden superponer movimientos locales. En este caso, los decaimientos de anisotropía de fluorescencia se pueden expresar de forma más general como funciones multiexponenciales del tipo:

$$r(t) = r_0 \sum_i \mathbf{b}_i \exp(-t/\mathbf{f}_i) \quad (3.21)$$

donde,  $\mathbf{f}_i$  son los tiempos de correlación rotacional individuales y  $\mathbf{b}_i$  son las amplitudes fraccionales de cada movimiento ( $\sum_i \mathbf{b}_i = 1$ ).

**Rotores rígidos asimétricos.** Un rotor rígido totalmente asimétrico presenta tres coeficientes de difusión rotacional alrededor de los tres ejes principales de difusión de la molécula ( $D_1$ ,  $D_2$  y  $D_3$ ) y su decaimiento de anisotropía de fluorescencia se expresa como suma de varias exponenciales (Belford et al, 1972):

$$r(t) = r_0 \sum_i \mathbf{b}_i \exp(-t/\mathbf{f}_i) \quad (3.22)$$

donde los tiempos de correlación rotacional están relacionados con los coeficientes de difusión rotacional principales ( $D_1$ ,  $D_2$  y  $D_3$ ). En el caso general en el que los momentos de absorción y emisión no estén orientados a lo largo de uno de dichos ejes principales, el decaimiento de anisotropía es una suma de 5 exponenciales. Con las técnicas experimentales actuales no es posible determinar más allá de tres tiempos de correlación rotacional. (Small e Isenberg, 1977).

En el caso particular de los elipsoides de revolución, el decaimiento de anisotropía presenta tres tiempos de correlación rotacional,  $f_1$ ,  $f_2$  y  $f_3$ , aunque habitualmente sólo es posible resolver dos de ellos. Dichos tiempos de correlación rotacional dependen de los dos coeficientes de difusión rotacional ( $D_{||}$  y  $D_{\perp}$ )

$$f_1 = \frac{1}{2D_{\perp} + 4D_{||}}, f_2 = \frac{1}{5D_{\perp} + D_{||}} \text{ y } f_3 = \frac{1}{6D_{\perp}}$$

y sus amplitudes relativas son función de la orientación de los momentos dipolares de absorción y emisión respecto de los ejes de simetría del elipsoide (Figura 3.2).

**Rotación restringida.** Se entiende como rotación restringida aquella en la que el intervalo angular de rotación del fluoróforo está espacialmente limitado. En este caso, la difusión rotacional no produce una despolarización total de la fluorescencia, sino que la anisotropía se aproxima a un valor residual finito ( $r_{\infty}$ ) para tiempos largos comparados con el tiempo de vida media del fluoróforo. En el modelo más sencillo para el decaimiento de anisotropía de fluorescencia, se puede suponer que la anisotropía decae exponencialmente desde  $r_0$  hasta  $r_{\infty}$ :

$$r(t) = (r_0 - r_{\infty}) \exp(-t/f) + r_{\infty} = r_0 [b \exp(-t/f) + (1 - b)] \quad (3.23)$$

La expresión más general que relaciona el valor de  $r_{\infty}$  con el intervalo angular de rotación del fluoróforo es (Steiner y McAllister, 1957):

$$\frac{r_{\infty}}{r_0} = \frac{3 \langle \cos^2 \mathbf{q} \rangle - 1}{2} = 1 - b \quad (3.24)$$

donde  $\langle \cos^2 \mathbf{q} \rangle$  es el valor promedio de todos los posibles ángulos entre la dirección del momento dipolar de absorción (en el instante en que se produce absorción) y el momento de emisión (en el instante en que se produce la emisión). En otros modelos

como los propuestos por Kinoshita et al, (1977) y Lipari y Szabo (1980) se supone que la rotación del fluoróforo se encuentra restringida al interior de un cono.

**Superposición de movimientos locales restringidos a la rotación global.** En ocasiones, una molécula presenta, además de su movimiento global, movimientos segmentales rápidos que también contribuyen a la despolarización de la fluorescencia. Esto sucede, por ejemplo, en el caso de fluoróforos unidos covalentemente a una proteína. Si se admite que el movimiento segmental y el movimiento global son independientes, el decaimiento de anisotropía de fluorescencia se puede expresar como el producto de los términos responsables de la despolarización:

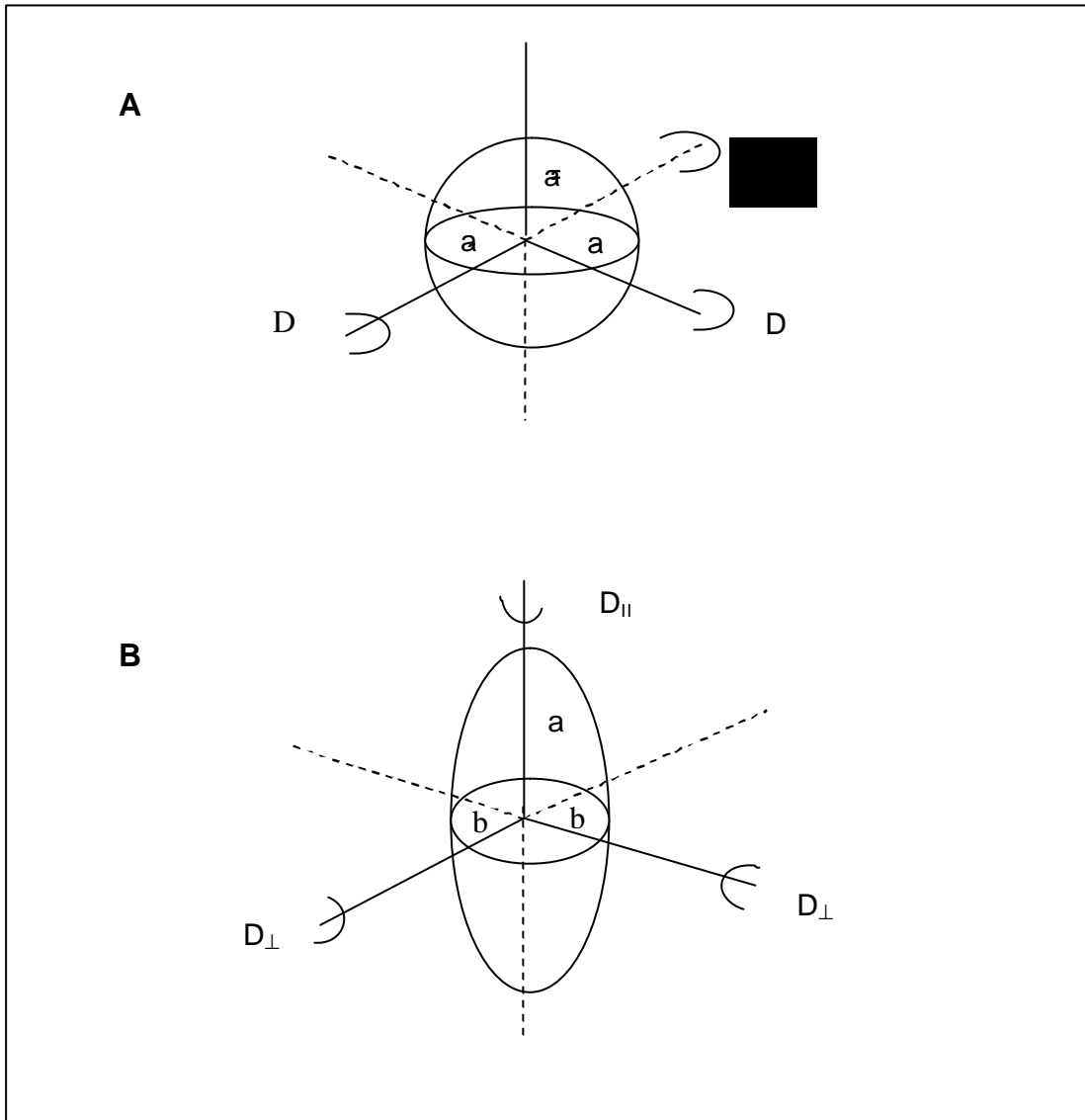
$$r(t) = r_0 [b \exp(-t/f_L) + (1-b)] \exp(-t/f_G) \quad (3.25)$$

donde  $f_L$  y  $f_G$  son los tiempos de correlación rotacional correspondientes a los movimientos local y global del fluoróforo y  $b$  la contribución fraccional del movimiento segmental a la despolarización de la fluorescencia. Operando en la expresión anterior, se obtiene:

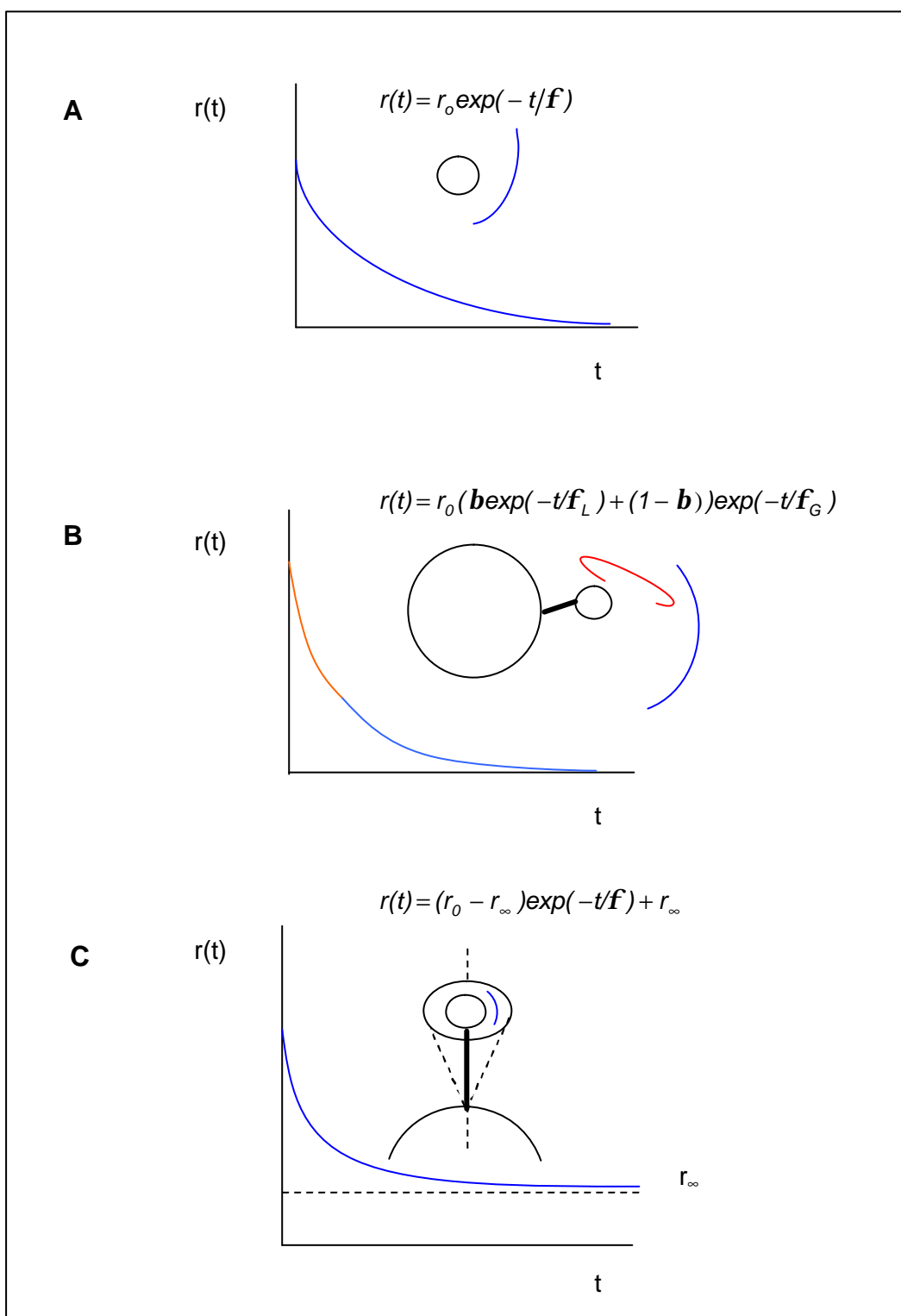
$$r(t) = r_0 [b \exp(-(t/f_L + t/f_G)) + (1-b) \exp(-t/f_G)] \quad (3.26)$$

En el caso de que  $f_L \ll f_G$  se tiene que  $\frac{1}{f_L} + \frac{1}{f_G} \approx \frac{1}{f_L}$  de modo que la expresión anterior se puede aproximar como:

$$r(t) = r_0 [b \exp(-t/f_L) + (1-b) \exp(-t/f_G)] \quad (3.27)$$



**Figura 3.2:** Ejes de simetría y coeficientes de difusión de una esfera (A) y de un elipsoide de revolución (B).



**Figura 3.3:** Forma del decaimiento de anisotropía de fluorescencia para un fluoróforo esférico que rota libremente (A), para un fluoróforo que presenta movimientos segmentales además del global (B) y para un fluoróforo esférico cuya rotación se encuentra restringida (C).

### 3.2. ESPECTROSCOPIA DE CORRELACIÓN DE FLUORESCENCIA (FCS)

La técnica de espectroscopia de correlación de fluorescencia, FCS, fue introducida a principios de los años 70 para el análisis de las fluctuaciones termodinámicas de los sistemas químicos (Magde et al, 1972; Elson y Magde, 1974; Ehrenberg y Rigler, 1974). En principio, la técnica de FCS se utilizó para estudios de cinética química a concentraciones muy diluidas en sistemas biológicos. Estudios teóricos y experimentales (Magde et al, 1974, Magde et al, 1978) demostraron pronto que con los métodos de FCS se podía medir no sólo coeficientes de difusión sino también constantes de velocidad, concentraciones y estado de agregación.

En la última década se han realizado importantes avances en el campo de la detección ultrasensible de la emisión de fluorescencia (Barnes et al, 1995; Eigen y Rigler, 1994; Nie y Zare, 1997). Se ha conseguido obtener elementos abiertos de volumen de observación extremadamente pequeños mediante el enfoque de la fuente de luz láser de excitación, lo cual combinado con fotodiodos de avalancha de elevada sensibilidad para la detección de fluorescencia y filtros de paso de banda altamente discriminativos, ha permitido la detección de moléculas únicas (Rigler y Widengren, 1990; Rigler et al, 1992,1993; Rigler y Mets, 1992, Eigen y Rigler, 1994, Widengren y Rigler 1998). Estos recientes avances han hecho posible la aplicación de la técnica de FCS en una amplia variedad de campos de la física, la química, la biología o la biomedicina.

FCS es una técnica muy poderosa para el estudio de interacciones de importancia biológica, como la hibridación entre oligonucleótidos y dianas de ADN o ARN o la interacción entre péptidos ligados y receptores aislados o unidos a células y entre antígenos y anticuerpos. Dado que la interacción puede ser analizada rápidamente en pequeños volúmenes de muestra y sin necesidad de separar el ligando unido del ligando libre, la técnica de FCS presenta una aplicabilidad importante en estudios de cribado de fármacos a gran escala (Rigler, 1995, Sterrer y Henco, 1997). Otra ventaja importante de las técnicas de FCS es que pueden aplicarse directamente en células vivas (Van Craenenbroeck y Engelborghs, 2000).

#### 3.2.1. Fundamento de la técnica

FCS, es una técnica muy sensible que permite el estudio de procesos dinámicos de moléculas fluorescentes bajo condiciones de equilibrio. En las medidas



de FCS se determinan las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia en un elemento abierto de volumen creado mediante una luz láser de excitación enfocada. En principio, puede ser medido cualquier proceso dinámico que produzca un cambio en la intensidad de fluorescencia.

En un experimento de FCS, la luz láser de excitación se enfoca en la muestra creando un pequeño elemento de volumen abierto. Este elemento de volumen puede ser tan pequeño como 0.2 fL (Hink y Visser, 1999). Las moléculas fluorescentes presentes en el elemento de volumen se excitan y se detecta su emisión de fluorescencia. Debido al movimiento Browniano, las moléculas entran y salen del elemento de volumen, lo cual produce fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia detectada. Estas fluctuaciones pueden ser medidas rápidamente con un detector rápido de fotones como un fotodiodo de avalancha y autocorrelacionadas automáticamente para construir la función de autocorrelación, que proporciona información sobre las propiedades de difusión de las partículas fluorescentes.

Dado que el número relativo de fluctuaciones de la fluorescencia aumenta al disminuir el número de partículas fluorescentes excitadas en el elemento de volumen seleccionado, es importante realizar los experimentos con la mínima cantidad de sonda fluorescente posible. En el pasado, la alta intensidad debida a la emisión de fondo de las muestras, hacía imposible reducir la concentración de fluoróforo sin que la señal de fluorescencia estuviera dominada por dicho fondo. Recientemente, el diseño de nuevas sondas fluorescentes y el aumento de la sensibilidad de la instrumentación óptica y electrónica, han permitido obtener volúmenes de detección por debajo de 1 fL, lo que produce una disminución de la contribución del fondo, un número más elevado de fluctuaciones relativas de la intensidad de fluorescencia y una menor fotodegradación de la sonda. Las concentraciones de fluoróforo para un experimento de FCS son actualmente del orden de  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  M, e incluso se han realizado medidas a concentraciones más bajas (Hink y Visser, 1999).

Los cambios en la intensidad de fluorescencia dentro del elemento de volumen pueden deberse a numerosos factores. El primer factor es, como se ha indicado, la difusión de las partículas del sistema dentro y fuera del elemento de volumen. Este fenómeno de la difusión dependerá del elemento de volumen, de modo que cuanto más grande sea dicho volumen más grande será el tiempo de residencia de las partículas dentro él (*Figura 3.4*). Cuando el elemento de volumen es pequeño en comparación con el volumen disponible a la partícula (que es el inverso de la concentración de partículas) se obtienen grandes fluctuaciones de la intensidad de

fluorescencia. En el caso contrario, es decir, cuando el elemento de volumen es grande en comparación con el volumen disponible a la partícula, lo que se obtiene son pequeñas fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia (*Figura 3.5*).

Una molécula pequeña difundirá mucho más rápidamente en el elemento de volumen que una grande, de modo que si un ligando fluorescente pequeño interacciona con una macromolécula, se producirá una disminución importante en su velocidad de difusión. La técnica de FCS permite, por tanto, detectar y cuantificar interacciones con una sensibilidad de molécula única.

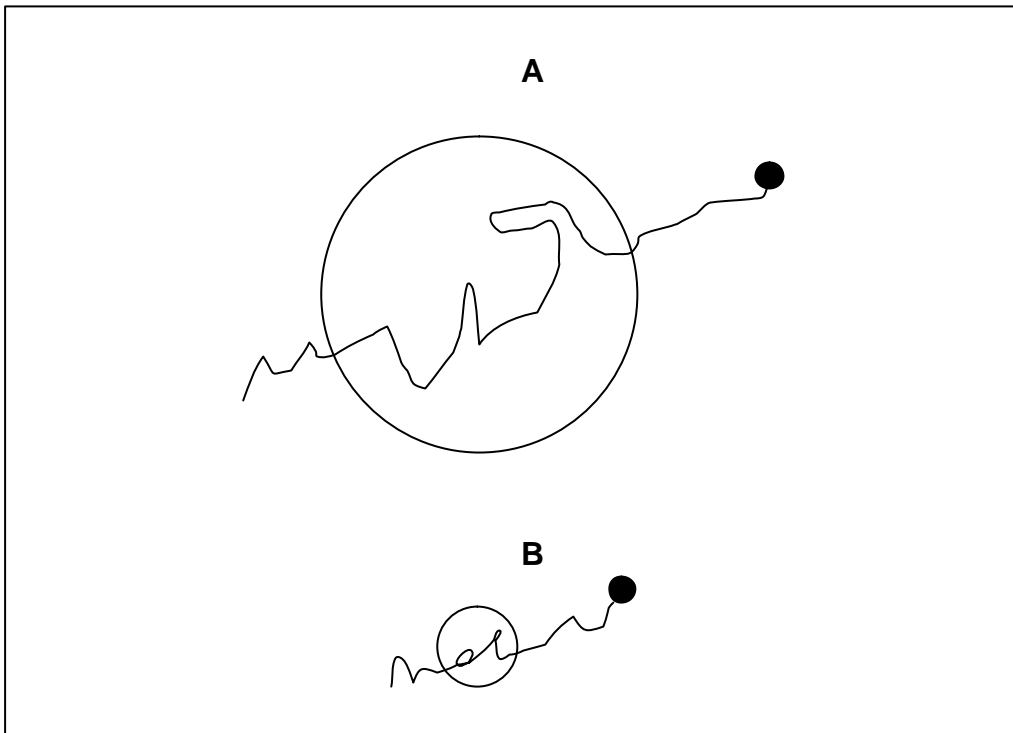
No sólo la difusión de las partículas produce cambios en la intensidad de fluorescencia detectada. Las reacciones químicas, tales como las cinéticas de asociación y disociación (Kinjo y Rigler, 1995; Rauer et al, 1996) y las reacciones fotoquímicas tales como las del estado triplete, también pueden dar lugar a dichos cambios en determinadas condiciones. De este modo, los métodos de FCS permiten estudiar equilibrios de asociación y disociación e incluso cambios conformacionales siempre y cuando ambos vayan acompañados de un cambio en la emisión de fluorescencia del fluoróforo (*Figura 3.6*).

### 3.2.2. Función de autocorrelación. Coeficiente de difusión translacional

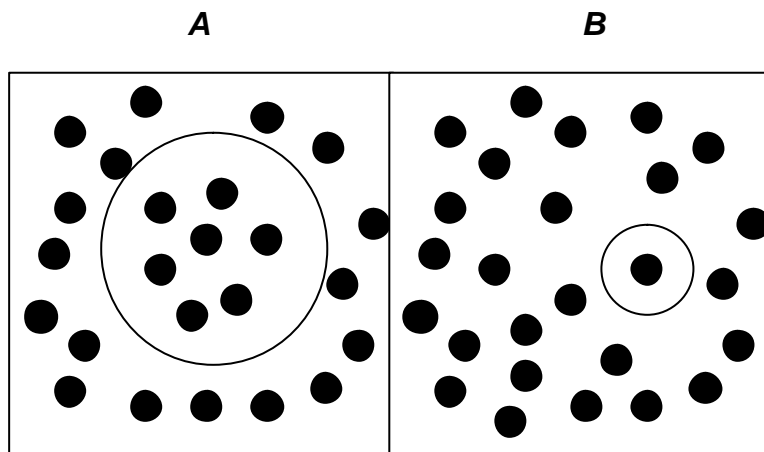
En un experimento de FCS se miden las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia alrededor del valor medio de dicha intensidad. Para analizar estas fluctuaciones, se calcula la función de autocorrelación ( $G(t)$ ), que relaciona la intensidad de fluorescencia  $I$  en un instante  $t$  con la intensidad de fluorescencia  $t$  segundos más tarde (Rigler et al, 1992):

$$G(t) = \frac{\langle I(t)I(t+t) \rangle}{\langle I \rangle^2} = \frac{\langle I \rangle^2 + \langle \delta I(t) \delta I(t+t) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (3.28)$$

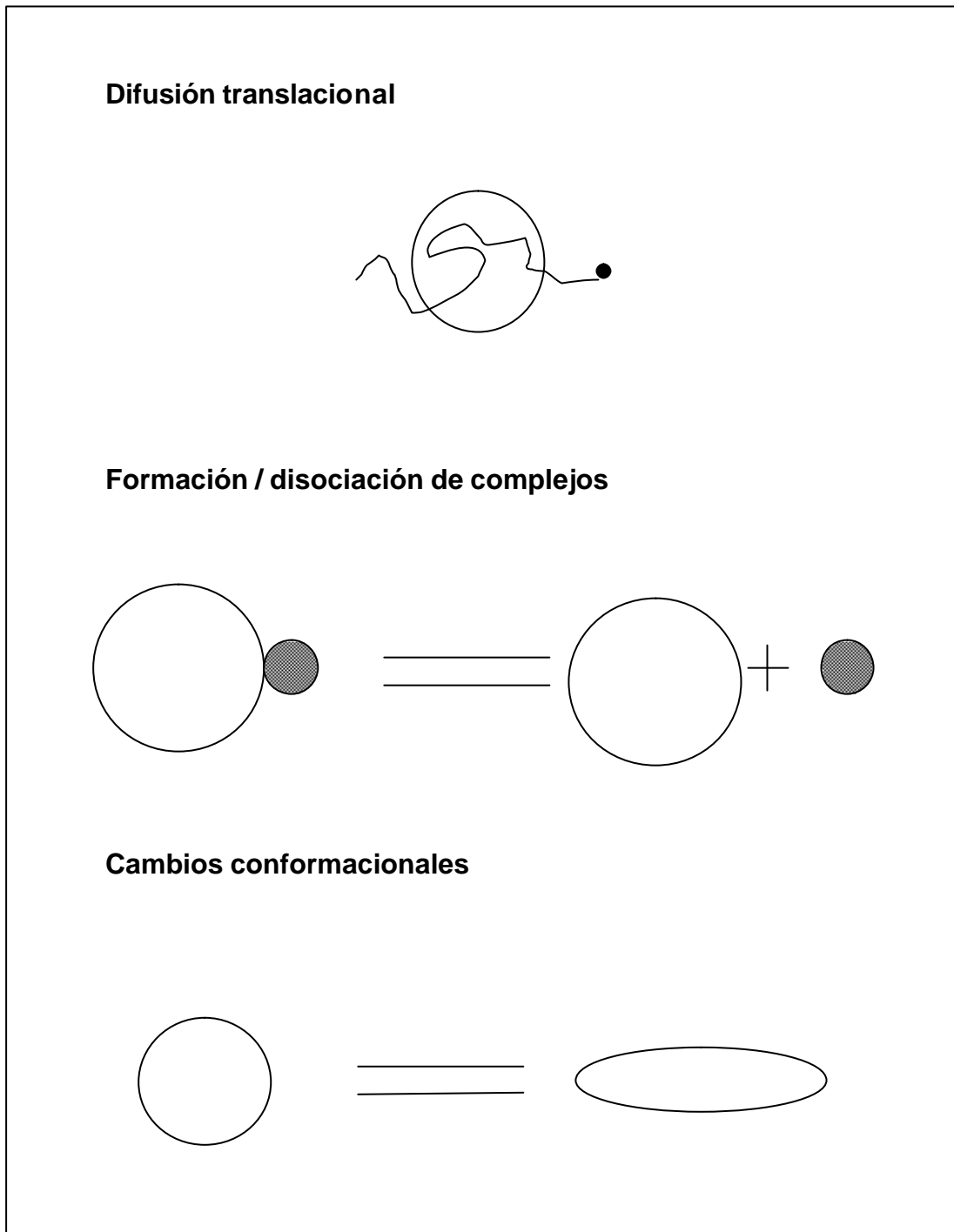
donde  $\delta I$  denota la fluctuación de la intensidad de fluorescencia alrededor de su valor medio  $\langle I \rangle$ . La intensidad de fluorescencia depende en cada caso de la concentración y de las propiedades espectroscópicas de la sonda, así como de la eficiencia de detección del sistema experimental (Visser y Hink, 1999).



**Figura 3.4:** Tiempos de residencia de partículas para distintos tamaños del elemento confocal de volumen de muestra. El tamaño del elemento de volumen en A es más grande que en B y, por tanto, el tiempo de residencia de la partícula será menor en este último caso.



**Figura 3.5:** Fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia en un experimento de FCS en función del tamaño relativo del elemento de volumen  $V_C$  y del volumen de disponible a la partícula  $V_D$  (inverso de la concentración de partículas). En el caso representado en A ( $V_C \gg V_D$ ), se tiene una elevada intensidad de fluorescencia promedio y pocas fluctuaciones, mientras que en el caso representado en B ( $V_C < V_D$ ) se tienen grandes fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia.



**Figura 3.6:** Representación de algunos de los procesos que pueden ser estudiados y caracterizados por la técnica de FCS. La formación de complejos y los cambios conformacionales sólo se pueden detectar si las intensidades de fluorescencia de los reactivos y productos de la reacción son distintas.

Dependiendo de cuales sean los procesos responsables de las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia, el valor de  $dl(t)$  se puede expresar en función de parámetros macroscópicos medibles, de manera que se puede obtener matemáticamente una forma más conveniente para  $G(t)$  (Van Craenenbroeck y Engelborghs, 2000). El caso más general es aquél en el que las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia se producen como consecuencia de la difusión de las distintas especies presentes en el sistema. Un factor adicional, que casi siempre hay que tener en cuenta, es la conversión al estado triplete del fluoróforo, debido a la elevada intensidad de los láseres utilizados como fuente de excitación. El estado triplete no es fluorescente, de modo que la extensión en la que el fluoróforo es transformado en este estado transitorio no emisor limita la intensidad de fluorescencia, contribuyendo a las fluctuaciones de la misma (Widengren, 2001).

Suponiendo que el volumen de detección tiene un perfil gaussiano en las tres dimensiones del espacio (Aragon y Pecora, 1976), la función de autocorrelación se puede escribir en función de las constantes de difusión translacional (Thompson, 1991) como:

$$G(\mathbf{t}) = 1 + \left( \frac{1 - F_{trip} + F_{trip} \exp(-\mathbf{t}/T_{trip})}{N(1 - F_{trip})} \right) \left[ \sum_i \frac{F_i}{\left(1 + \frac{\mathbf{t}}{T_i}\right) \left(1 + \frac{\mathbf{t}}{a^2 T_i}\right)^{1/2}} \right] \quad (3.29)$$

donde  $N$  es el número promedio de partículas que se observan simultáneamente en el volumen de detección,  $F_{trip}$  y  $T_{trip}$  representan la fracción de población y el tiempo de relajación del estado triplete respectivamente y  $T_i$  es el tiempo de difusión translacional de la especie  $i$ .  $F_i$  es la contribución de cada una de las especies presentes en el sistema. Cuando el rendimiento cuántico de todas las especies presentes es el mismo,  $F_i$  es la fracción molar de cada especie. En caso contrario,  $F_i$  depende además de los rendimientos cuánticos de las partículas del sistema (Meseth et al, 1999).  $a$  es el parámetro estructural que define la forma del elemento de volumen de detección, que viene determinado por el tamaño del foco del láser y de la apertura confocal, de modo que si ambos se mantienen constantes, el tamaño del elemento de volumen sería también constante (Wohland et al, 1999).  $a = w_2/w_1$  donde  $w_1$  y  $w_2$  se definen como la

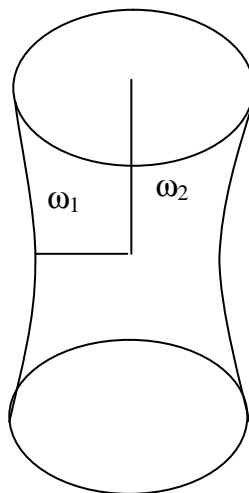
distancia radial y axial a la cual la intensidad del láser ha decaído en  $1/e^2$  (ver *Figura 3.7*).

El tiempo de difusión translacional de una partícula ( $T_i$ ) en un experimento de FCS se define como el tiempo necesario para que dicha especie se traslade una distancia  $w_1$ , y está relacionado con la constante de difusión translacional  $D_{t,i}$  a través de la ecuación de Einstein:

$$D_{t,i} = \frac{w_1^2}{4T_i} \quad (3.30)$$

Los valores del parámetro  $w_1$  y del parámetro estructural  $a$  se obtienen mediante calibrado del sistema con una solución de un compuesto cuya constante de difusión translacional sea conocida, por ejemplo rodamina 6G (ver *Materiales y Métodos 4.6*). Si la forma del volumen de detección se aproxima a la de un cilindro, los parámetros  $w_1$  y  $w_2$  permiten la estimación de su volumen:

$$V = \pi w_1^2 w_2 \quad (3.31)$$



**Figura 3.7** : Vista esquemática del elemento de volumen de detección de la muestra en un experimento de FCS.

### 3.3. EQUILIBRIO DE SEDIMENTACIÓN

La ultracentrifugación es un método clásico para el estudio de la estructura global de macromoléculas tales como proteínas en solución, a partir de la determinación de sus propiedades hidrodinámicas (Waxman et al, 1994). Los métodos de centrifugación analítica permiten, además, detectar y cuantificar especies de diferente masa molecular, por lo que se han utilizado ampliamente en el estudio de interacciones macromoleculares reversibles, que incluyen homo y heteroasociaciones proteína-proteína, proteína-ADN y ligando-receptor (Ralston, 1993; Rivas et al, 1999b). La técnica es especialmente útil para la caracterización cuantitativa de interacciones débiles, como es el caso de una buena parte de las interacciones macromoleculares con relevancia funcional en biología (Muramatsu y Minton, 1989; Rivas et al, 1999a).

En los experimentos de ultracentrifugación, la muestra se somete a la acción de un campo centrífugo, de modo que sobre las partículas actúan dos fuerzas contrapuestas, la fuerza centrífuga y la de difusión. El flujo de sedimentación,  $J_i$ , de una especie  $i$  sometida a la acción de un campo centrífugo viene dado por la ecuación de Lamm (Rivas et al, 1999b):

$$J_i = s_i \omega^2 r w_i - D_i \frac{\partial w_i}{\partial r} \quad (3.32)$$

donde  $\omega$  es la velocidad angular,  $r$  la posición radial,  $w_i$  la concentración en mg/mL de la especie  $i$  y  $s_i$  y  $D_i$  son los coeficientes de sedimentación y difusión de la partícula  $i$ , respectivamente, que vienen dados por las siguientes ecuaciones:

$$s_i = \frac{M_i (1 - \bar{v}_i \rho)}{N_A f_i} \quad (3.33)$$

$$D_i = \frac{RT}{N_A f_i} \quad (3.34)$$

donde  $\rho$  es la densidad del solvente,  $M_i$  y  $\bar{v}_i$  son la masa molecular y el volumen específico parcial de la especie  $i$ , respectivamente,  $T$  es la temperatura en Kelvin,  $R$  es

la constante de los gases ideales,  $N_A$  el número de Avogadro y  $f_i$  el coeficiente de fricción translacional.

Las dos aproximaciones experimentales básicas en los métodos de ultracentrifugación analítica son las denominadas equilibrio y velocidad de sedimentación. En los experimentos de velocidad de sedimentación, debido a que el campo centrífugo aplicado es muy elevado, la fuerza centrífuga supera a la de difusión, produciéndose un transporte neto de materia en el sistema. En los experimentos de equilibrio, el campo centrífugo aplicado es moderado, de modo que, si la muestra se centrifuga durante un tiempo suficiente, se alcanza la condición de equilibrio (Figura 3.8). En el equilibrio de sedimentación, los efectos opuestos de la centrifugación, que produce el alejamiento de las moléculas del centro de rotación, y de la difusión, que se opone a la formación de un gradiente de concentración de soluto en la solución, se compensan de manera que no existe un flujo molecular neto ( $J_i = 0$ ):

$$\frac{d \ln w_i}{dr^2} = \frac{M_i^* w^2}{2RT} \quad (3.35)$$

donde  $M_i^*$  es la masa molecular de flotación de la especie  $i$ , que viene dada por:

$$M_i^* = M_i (1 - \bar{v}_i \rho) \quad (3.36)$$

En condiciones de equilibrio de sedimentación se aplica la siguiente relación fundamental (Wills y Winzor, 1992, Rivas et al, 1999a):

$$\frac{d \mathbf{m}_i}{dr^2} = \frac{M_i^* w^2}{2RT} \quad (3.37)$$

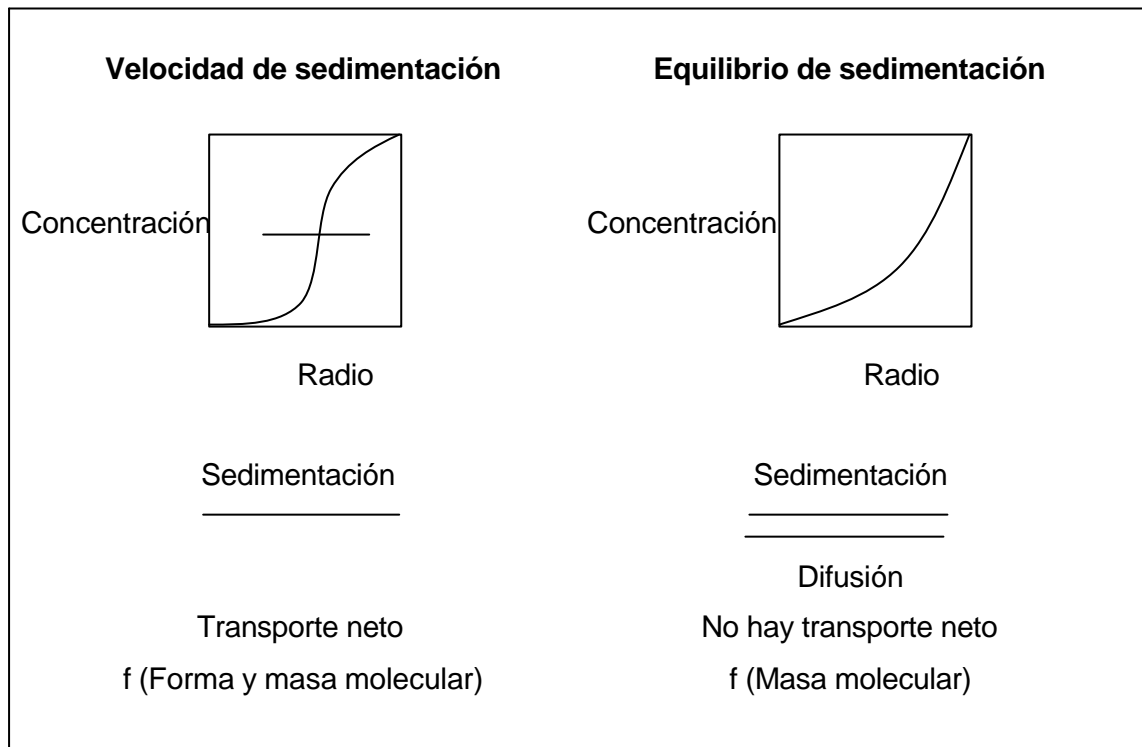
donde  $\mathbf{m}_i$  es el potencial químico de la especie  $i$ , dado por:

$$\mathbf{m}_i = \mathbf{m}_i^0 + RT \ln g_i + RT \ln w_i \quad (3.38)$$

donde  $\mathbf{m}_i^0$ ,  $g_i$  y  $w_i$  son el potencial químico estándar, el coeficiente de actividad y la concentración en mg/mL de la especie  $i$ , respectivamente. El coeficiente de actividad es una medida de la energía libre de interacción entre una molécula de la especie  $i$  y el



resto de las moléculas de la misma y otras especies, de modo que  $g$  es función de la concentración de todas las especies (Minton, 1983, 1998b).



**Figura 3.8:** Esquema de las dos aproximaciones experimentales en las técnicas de ultracentrifugación analítica: velocidad y equilibrio de sedimentación.

En la situación de equilibrio, el potencial químico de las especies no varía con la distancia radial, de modo que se obtiene un gradiente exponencial de concentración con la dicha distancia que no varía con el tiempo y que depende sólo de la masa molecular de la especie pero no de su forma.

A partir de la expresión (3.35) se puede determinar la masa molecular de flotación promedio a diferentes concentraciones, lo que permite detectar y estudiar la tendencia a la asociación de las especies presentes en la muestra centrifugada.

Combinando las ecuaciones (3.35) y (3.37), se tiene (Rivas et al, 1999b):

$$M_{i,app}^* = M_i^* - \sum_j w_j \left( \frac{\partial \ln g_i}{\partial w_j} \right) M_{j,app}^* \quad (3.39)$$

En condiciones ideales, el valor de los coeficientes de actividad de las especies es igual a 1 y por tanto,  $M_{i,app}^* = M_i^*$ . Sin embargo, en condiciones de no idealidad, el valor de los coeficientes de actividad es diferente de 1 y además es función de la concentración, de modo que el término de los coeficientes de actividad no se cancela y su valor se puede estimar empleando aproximaciones de la termodinámica estadística (Minton 1998b; Rivas et al, 1999b) que permitirían obtener los valores de  $M_i^*$  a partir de  $M_{i,app}^*$ .

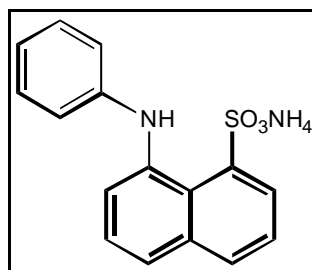
## *4. Materiales y Métodos*

#### 4.1. PROTEÍNAS, SONDAS FLUORESCENTES Y OTROS REACTIVOS

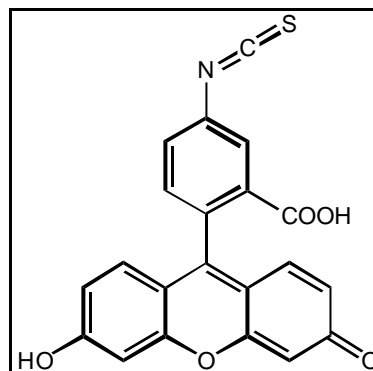
**Proteínas.** La mioglobina (Mb) del músculo esquelético de caballo cristalizada y liofilizada, la albúmina sérica humana (HSA) cristalizada y liofilizada y la ribonucleasa A (RNasa A) pancreática bovina cristalizada 5 veces procedían de Sigma (n<sup>o</sup> de catálogo M-0630, R-4875 y A-9511, respectivamente). Estas proteínas se utilizaron sin posterior purificación si bien previamente a cualquier procedimiento experimental, las proteínas se dializaron de forma exhaustiva frente al tampón correspondiente. Salvo que se indique lo contrario, el tampón utilizado para los experimentos fue fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

**Sondas fluorescentes.** El 5-Isotiocianato de fluoresceína (FITC), sal de dilitio del succinimidil éster del ácido Alexa flúor 488 carboxílico y sal de disodio del succinimidil éster del ácido Alexa flúor 546 carboxílico procedían de Molecular Probes (n<sup>o</sup> de catálogo F-1906, A-20000 y A-20002, respectivamente). La sal amónica del ácido 1-anilinoftalen-8-sulfónico (ANS) fue de Fluka (n<sup>o</sup> de catálogo 10417). Estas sondas se utilizaron sin purificación posterior.

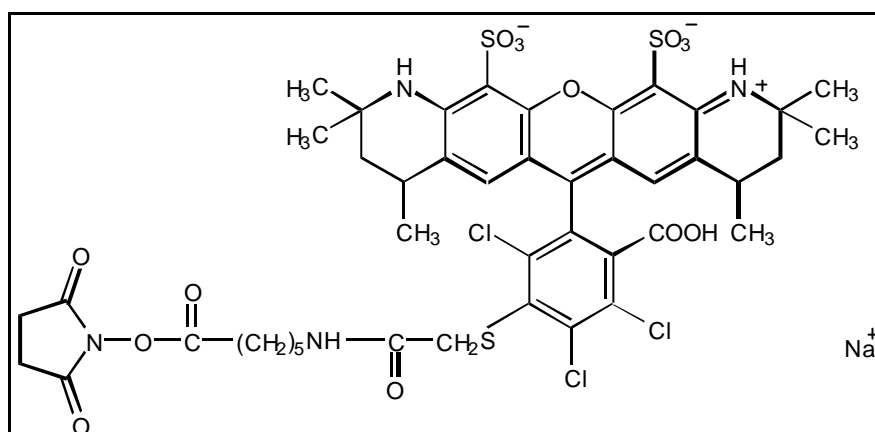
**Otros reactivos.** La acetona se obtuvo de Fluka, el hidrogenofosfato disódico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) de Riedel-De Haën AG Seelze-Hannover y el dihidrogenofosfato sódico dihidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) de Panreac. La sal sódica del ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES) y el cloruro sódico (NaCl) fueron de Sigma. El etilendiaminotetracetato sódico dihidratado (EDTA) fue de Merck. El dimetil sulfóxido (DMSO) para síntesis fue de Scharlau.



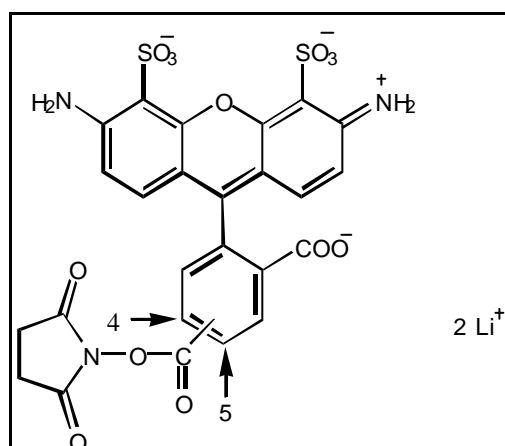
**ANS**



**FITC**



**ALEXA 546**



**ALEXA 488**

**Figura 4.1:** Estructura química de las sondas fluorescentes utilizadas en este trabajo.

## 4.2. PREPARACIÓN DE APOMIOGLOBINA

La apoMb se preparó a partir de la Mb mediante una modificación del método del ácido/acetona (Rossi-Fanelli et al, 1958; Wilf y Minton, 1981).

Se preparó una solución de Mb al 3 % (30 mg/mL) en agua destilada (Milli-Q), se enfrió en hielo y se añadió gota a gota lentamente sobre 30 volúmenes de una mezcla de acetona y HCl (3 mL de HCl 1 M por litro de acetona) vigorosamente agitada y enfriada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  con hielo seco. Terminada la adición la mezcla continuó siendo agitada y enfriada en las mismas condiciones durante 2 horas, después de lo cual se centrifugó a 10000 rpm (11000 x g) durante 15 minutos a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga Universal 30 RF Hettich Zentrifugen. El sobrenadante se desechó y el precipitado se disolvió en la mínima cantidad posible de agua Milli-Q enfriada en hielo, se dializó frente a 500 volúmenes de agua Milli-Q durante 6 horas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y luego frente a tampón HEPES 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2. Después de esta diálisis se formó un flóculo rosáceo de proteína desnaturalizada que se eliminó posteriormente por centrifugación a 10000 rpm (11000 x g) durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La eficiencia de eliminación de grupo hemo mediante este procedimiento se determinó espectrofotométricamente, por comparación de la relación de picos de absorbancia de la proteína a 405 y 280 nm antes y después de la eliminación del grupo hemo.

## 4.3. MARCADO DE PROTEÍNAS CON FLUORÓFOROS EXTRÍNSECOS

La introducción de sondas fluorescentes en proteínas, se realizó mediante la unión específica no covalente de la sonda a sitios hidrofóbicos de la proteína (apoMb con ANS) o bien mediante la unión covalente de la sonda a la proteína (apoMb con FITC, Alexa 488 y Alexa 546 y RNasa A con FITC).

**Marcado de apoMb con ANS.** El ANS forma en disolución un complejo 1:1 con la apoMb, presumiblemente mediante la ocupación del sitio de unión del grupo hemo en la Mb (Stryer, 1965). El marcado de apoMb con ANS se realizó por mezcla de soluciones de apoMb y ANS en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

**Marcados covalentes de apoMb y RNasa A.** Los marcados covalentes se realizaron por reacción del grupo reactivo de la sonda (isotiocianato o succinimidil éster) con los grupos amino alifáticos (extremo amino terminal y grupo amino de la cadena lateral de las lisinas) no protonados de la proteína.

El protocolo general seguido para el marcado covalente de las proteínas fue el siguiente:

Se preparó una solución de la proteína en tampón de pH adecuado. Para mantener los grupos amino alifáticos de la proteína no protonados, la reacción de marcado debe realizarse a pH ligeramente básico. El grupo amino de las lisinas tiene un  $pK_a$  en torno a 10.5 mientras que el  $pK_a$  del extremo amino terminal de las proteínas es más bajo, por ello el marcado es más selectivo a estos últimos grupos cuanto más bajo sea el pH de la reacción de marcado.

Por otro lado se preparó una solución concentrada de la sonda en DMSO. Se utilizó este disolvente orgánico debido a que la mayor parte de las sondas fluorescentes son muy poco solubles en tampones acuosos. La solución se preparó suficientemente concentrada para que la cantidad de DMSO finalmente añadida sobre la solución de proteína fuera menos del 10 % del volumen total. La sonda fluorescente se disolvió en DMSO inmediatamente antes de la adición sobre la solución de proteína, ya que los compuestos reactivos no son muy estables en solución.

A continuación se añadieron 50-100  $\mu$ L de la solución de sonda sobre 1 mL de la solución de proteína mientras ésta se mantenía en agitación. La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos - 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante.

Finalmente, la sonda no reaccionada se separó de la proteína por cromatografía de exclusión en gel en columnas HiTrap Desalting de Pharmacia Biotech, con un relleno de Sephadex G-25 y/o mediante diálisis exhaustiva. Las proteínas marcadas se guardaron congeladas a  $-20$  °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

En la *Tabla 4.1* se resumen las condiciones específicas de cada uno de los marcados covalentes de proteína realizados. Las condiciones se eligieron, en cada caso, en función del grado de marcado de la proteína deseado y de la cantidad de sonda fluorescente de que se disponía.

**Tabla 4.1:** Condiciones específicas de los distintos marcados covalentes de proteína.

Proteína	Sonda	Tiempo reacción	$C_{proteína}$ *	sonda:proteína <sup>#</sup>	Tampón
RNasa A	FITC	30 minutos	10 mg/mL	5:1	Fosfato 0.2M pH8.0
ApoMb	FITC	30 minutos	10 mg/mL	10:1	Fosfato 0.2M pH 8.0
ApoMb	Alexa 488	30 minutos	5 mg/mL	1:1	NaHCO <sub>3</sub> 0.2M pH 8.2
ApoMb	Alexa 546	1 hora	2 mg/mL	1:1	NaHCO <sub>3</sub> 0.2M pH 8.3

\* Los valores indicados se refieren a la reacción de marcado. # La relación sonda:proteína está dada en número de moles de sonda/mol de proteína.

#### 4.3.1. Determinación del grado de marcado

**Marcado de apoMb con ANS.** El número de moles de sonda por mol de proteína se estimó a partir de la constante de equilibrio de disociación del complejo ANS-proteína cuyo valor a 20 °C es  $3.4 \times 10^{-6}$  M (Stryer, 1965). La relación de marcado fue, en la mayor parte de los experimentos, 0.8 moles de ANS por mol de apoMb.

**Marcados covalentes.** El grado de marcado de una proteína con una sonda fluorescente depende de las características de la proteína y la sonda, así como de las condiciones de la reacción de marcado (concentración de sonda y proteína, número de moles de sonda por mol de proteína, pH, tiempo y temperatura). Para determinar el grado de marcado obtenido, se estimaron las concentraciones de sonda y proteína en la solución que se obtiene finalmente tras la eliminación de la sonda no unida a la proteína.

La concentración de sonda fluorescente se determinó espectrofotométricamente, a partir de la absorción en el máximo en la zona del visible, donde la proteína no absorbe. La concentración de proteína se determinó a partir de la absorción en el máximo en el ultravioleta (en torno a 280 nm) corregida por la contribución de la sonda fluorescente, que también absorbe en dicha zona del espectro.



$$C_{sonda} = \frac{A_{I_1}}{e_{I_1}^{sonda}} \quad (4.1)$$

$$C_{prot} = \frac{A_{I_2} - A_{I_1} F}{e_{I_2}^{prot}} \quad (4.2)$$

donde  $C_{sonda}$  y  $C_{prot}$  son las concentraciones molares de sonda y proteína respectivamente.  $I_1$  y  $I_2$  son las longitudes de onda correspondientes al máximo de absorción de la sonda en el visible y de la proteína en el ultravioleta respectivamente.  $A_{I_1}$  y  $A_{I_2}$  son las absorbancias de la solución de proteína marcada a las longitudes de onda  $I_1$  y  $I_2$  respectivamente.  $e_{I_1}^{sonda}$  y  $e_{I_2}^{prot}$  son los coeficientes de absorción molar de la sonda y la proteína a las longitudes de onda  $I_1$  y  $I_2$  respectivamente.  $F$  es un factor de corrección resultado del cociente de los coeficientes de absorción molar de la sonda a las longitudes de onda  $I_2$  y  $I_1$  ( $F = e_{I_2}^{sonda} / e_{I_1}^{sonda}$ ). En la *Tabla 4.2* se muestran los valores de  $F$  para las distintas sondas utilizadas.

**Tabla 4.2:** Valores del factor de corrección  $F$  para las distintas sondas.

Sonda fluorescente	F
FITC	0.34 (medido experimentalmente)
Alexa 488	0.11 (Molecular Probes, 2001)
Alexa 546	0.12 (Molecular Probes, 2001)

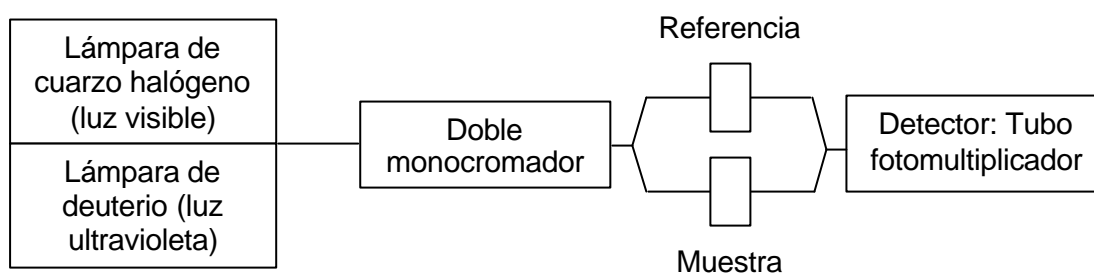
### 4.3.2. Utilización de las proteínas marcadas con fluoróforos extrínsecos como trazadores

En las soluciones preparadas con apoMb marcada con ANS la relación de marcado se pudo controlar fácilmente, lo que permitió ajustar la intensidad de emisión de fluorescencia y la absorbancia a la longitud de onda de excitación de las muestras, a las necesidades de cada experimento. Sin embargo, cuando el fluoróforo está unido covalentemente a la proteína, la relación de marcado es fija y sólo podría modificarse mediante nuevas reacciones de marcado. Esto supuso un problema en el caso de fluoróforos como la fluoresceína, cuyo elevado coeficiente de absorción a la longitud de onda de excitación así como su elevado rendimiento cuántico, dificultaron en la mayoría de los casos el trabajo con soluciones en las que toda la proteína estuviera marcada. Para resolver este problema, en las muestras preparadas con apoMb-FI o con RNasa A-FI para las medidas de fluorescencia y ultracentrifugación, la proteína marcada se utilizó como trazador. Es decir, que se prepararon muestras con una concentración fija de proteína-FI, completando la cantidad total deseada de proteína (apoMb o RNasa A) para cada muestra con proteína no marcada. La concentración de proteína-FI se eligió de modo que la señal de fluorescencia fuera adecuada para las condiciones experimentales y la absorbancia a la longitud de onda de excitación no fuera superior a 0.1 (para 1 cm de paso óptico) (ver *Materiales y Métodos 4.5.1*). En todos los casos se comprobaron las propiedades espectroscópicas del trazador en los distintos medios.

## 4.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Los espectros de absorción de las muestras se adquirieron en un espectrofotómetro ultravioleta-visible Varian Cary 3E, de doble haz y doble monocromador (190-900 nm  $\pm$  0.2 nm) cuya resolución espectral se puede seleccionar en un intervalo de 0.2-10 nm. La exactitud de los valores de la longitud de onda y de las medidas de absorción de dicho espectrofotómetro se comprobó mediante filtros calibrados (Ultraviolet Spectrometry Group, 1981a): 666-F1 (óxido de holmio) y 666-F2 (neutro) de Hellma. En la *Figura 4.2* se muestra un esquema simplificado del espectrofotómetro Cary 3E. Para las medidas se utilizaron cubetas de cuarzo Hellma (111.057-QS) de 0.5 x 0.5 cm o Starna de 0.2 x 1 cm.

Los espectros de absorción se adquirieron de forma rutinaria para la determinación de la concentración de proteína o de sonda fluorescente en las soluciones de trabajo, así como para la determinación del grado de marcado covalente de proteínas con fluoróforos extrínsecos (ver *Materiales y Métodos 4.3.1*). En la *Tabla 4.3* se resumen los coeficientes de absorción molar utilizados para las distintas proteínas y sondas.



**Figura 4.2:** Diagrama esquemático de un espectrofotómetro de doble haz.

**Tabla 4.3:** Coeficientes de absorción molar de las proteínas y sondas fluorescentes. Todos los valores corresponden a la proteína o sonda en tampón.

	$\lambda$ (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
<i>Proteínas</i>		
ApoMb	280	15700 (Wilf y Minton, 1981)
RNasa A	277.5	9800 (Torrent et al, 1999, Sela y Anfinsen, 1957)
HSA	280	34600 (Peters, 1996, Mach et al, 1992)
<i>Sondas fluorescentes</i>		
FITC	490	72800 (Diehl y Horchak-Morris, 1987)
ANS*	350	5000 (Stryer, 1965)
Alexa 488	494	71000 (catálogo de Molecular Probes, 2001)
Alexa 546	558	104000 (catálogo de Molecular Probes, 2001)

\* El valor indicado es el correspondiente al fluoróforo libre (no unido a proteína) en tampón.

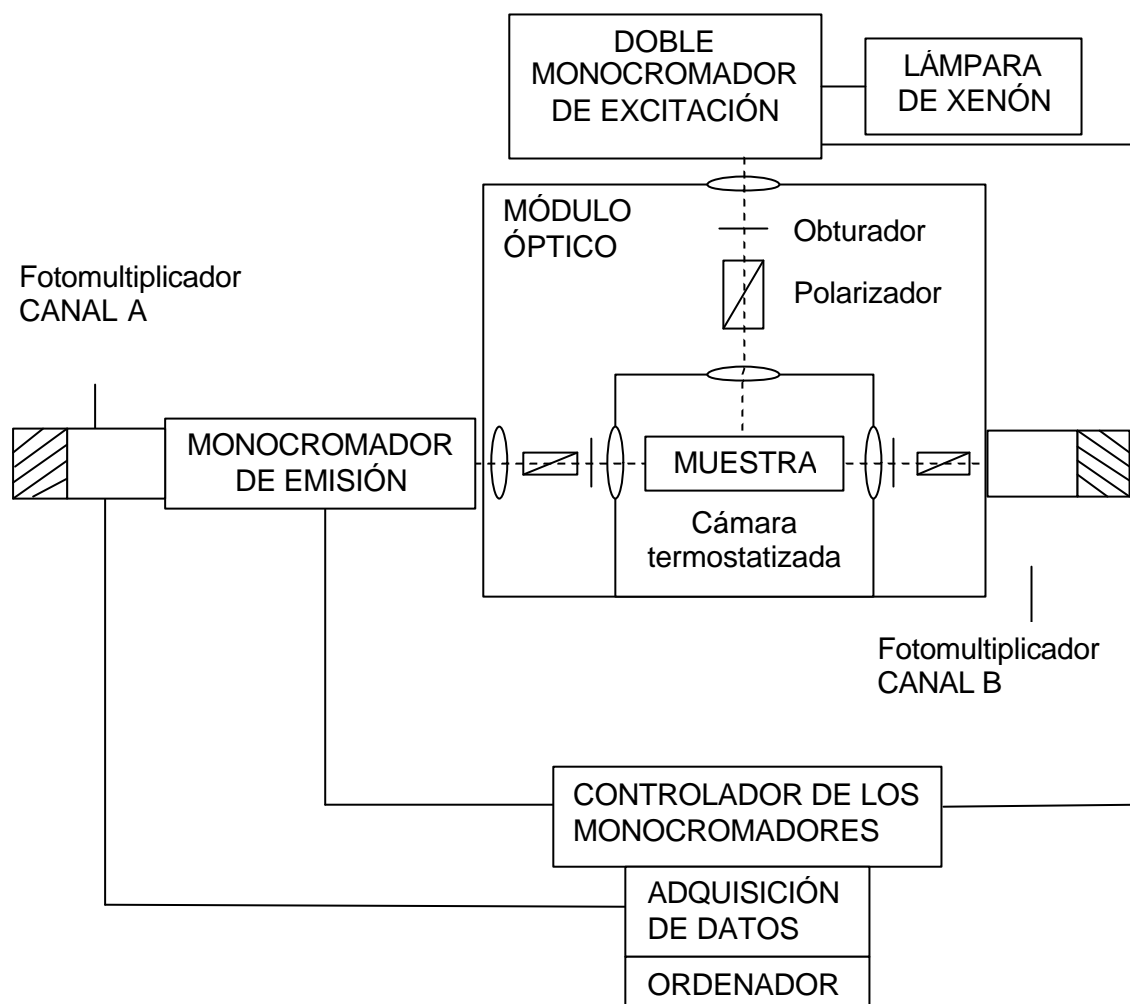
## 4.5. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La técnica de espectroscopia de fluorescencia se ha utilizado a lo largo de este trabajo para el estudio del estado de asociación de la apoMb, marcada con los fluoróforos fluoresceína o ANS, en solución diluida y en presencia de altas concentraciones de RNasa A o de HSA. También se ha utilizado esta técnica para el estudio de la difusión rotacional de la apoMb, marcada con las mismas sondas, en soluciones con una alta concentración de RNasa A o de HSA. Finalmente, algunos de los gradientes de equilibrio de sedimentación se obtuvieron a partir de medidas de fluorescencia realizadas en un lector de placas (ver *Materiales y Métodos 4.8*).

### 4.5.1. Espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario

Los espectros de fluorescencia así como las medidas de polarización de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en un espectrofluorímetro SLM 8000D o en un espectrofluorímetro SLM 8100. En la *Figura 4.3* se muestra un diagrama esquemático representativo de los dos espectrofluorímetros utilizados. La fuente de luz es una lámpara de xenón de alta presión Osram (450 W) que emite de forma continua desde 250 nm hasta el infrarrojo, siendo seleccionada la longitud de onda de excitación por medio de un doble monocromador. La fluorescencia emitida por la muestra se recoge perpendicularmente al haz de excitación y tras pasar por el monocromador de emisión es detectada por el fotomultiplicador. En el espectrofluorímetro SLM 8000D se operó con el fotomultiplicador en modo de conteo de fotones mientras que en el SLM 8100, en modo analógico.

Para las medidas se utilizaron cubetas de cuarzo Starna de 0.2 x 1 cm, Hellma (111.057-QS) de 0.5 x 0.5 cm y NSG Precision cells de 0.3 x 0.3 cm. El compartimento de las muestras se termostató a 20 °C con un baño de agua HETOFRIG (SLM 8000D) o LAUDA Ecoline RE 104 (SLM 8100) y la temperatura de la muestra se comprobó con un termopar (Digi-Sense de Cole-Parmer).



**Figura 4.3:** Esquema simplificado de los espectrofluorímetros SLM 8000D y SLM 8100.

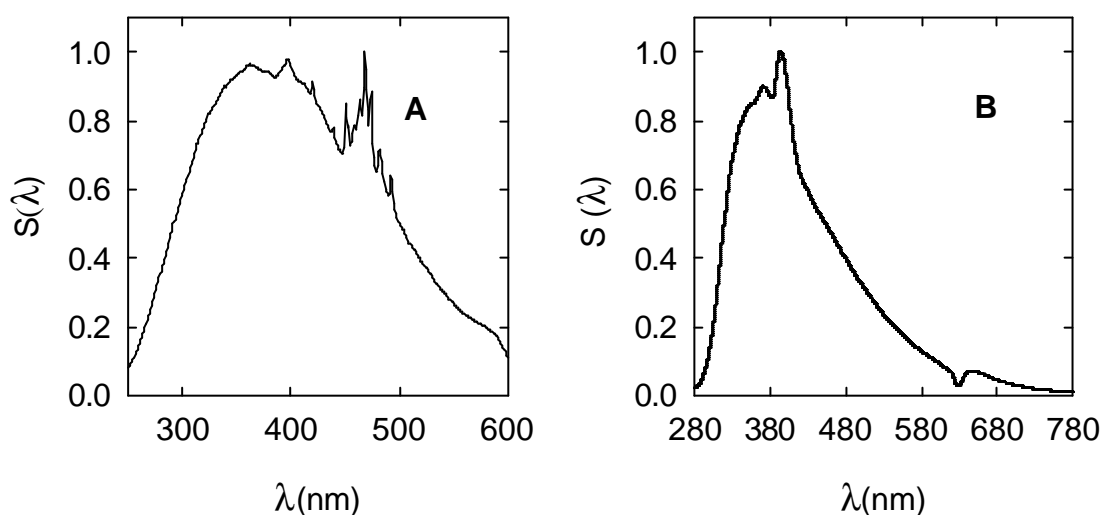
**Espectros de emisión y excitación.** El espectro de emisión de una sustancia se determina a partir de la variación de la intensidad de fluorescencia con la longitud de onda de emisión a una longitud de onda de excitación fija. Del mismo modo, la variación en la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación para una longitud de onda de emisión fija constituye el espectro de excitación.

**Corrección de los espectros de excitación y emisión de fluorescencia.** Los espectros de excitación y emisión de fluorescencia adquiridos en un espectrofluorímetro están distorsionados debido fundamentalmente a la dependencia con la longitud de onda de la respuesta del conjunto monocromador de emisión y fotomultiplicador del instrumento. La corrección de los espectros de fluorescencia es imprescindible para la determinación de rendimientos cuánticos, integrales de solapamiento o para la comparación de espectros obtenidos con distintos espectrofluorímetros.

*Corrección de los espectros de excitación.* La distorsión de los espectros de excitación se debe fundamentalmente a que la intensidad de la luz emitida por la fuente de excitación y la eficiencia de transmisión del monocromador de excitación son función de la longitud de onda. Los factores de corrección para los espectros de excitación del espectrofluorímetro SLM 8000D se obtuvieron mediante la utilización de un contador cuántico de Rodamina B (Melhuish, 1962), que absorbe virtualmente toda la luz incidente entre 220 y 600 nm (Cañadas, Tesis Doctoral, 2002). El rendimiento cuántico y el máximo de emisión de la rodamina B son independientes de la longitud de onda de excitación, por lo que la intensidad de emisión es proporcional al flujo de fotones de excitación. En la *Figura 4.4* se muestran los factores de corrección de excitación, obtenidos para el espectrofluorímetro SLM 8000 D con el polarizador de excitación en posición vertical.

*Corrección de los espectros de emisión de fluorescencia.* La distorsión de los espectros de emisión se debe fundamentalmente a la dependencia con la longitud de onda de la eficiencia del monocromador de emisión y de la respuesta del fotomultiplicador. Los factores de corrección de los espectros de emisión de fluorescencia del espectrofluorímetro SLM 8000D se obtuvieron en el laboratorio mediante la utilización de una lámpara calibrada de wolframio (Cañadas, Tesis

Doctoral 2002). Brevemente, el procedimiento seguido fue el siguiente: se determinó una pequeña fracción de la señal debida a la intensidad de la lámpara calibrada  $I(I)$  en función de la longitud de onda utilizando el sistema de detección del espectrofluorímetro. Los factores de corrección  $S(I)$  se obtienen dividiendo la función  $I(I)$  así obtenida entre la respuesta espectral de la lámpara  $L(I)$ . En la *Figura 4.4* se muestran los factores de corrección de emisión obtenidos para el espectrofluorímetro SLM 8000 D con el polarizador de emisión en posición de ángulo mágico ( $54.7^\circ$ ).



**Figura 4.4:** Variación con la longitud de onda de los factores de corrección para los espectros de excitación (A) y emisión (B), utilizados para la corrección de los espectros adquiridos con el espectrofluorímetro SLM 8000D. Los factores de corrección indicados, son adecuados para la corrección de espectros de excitación obtenidos con el polarizador de excitación en posición vertical y de emisión obtenidos con el polarizador de emisión en posición de ángulo mágico ( $54.7^\circ$ ).

**Distorsiones en las medidas de fluorescencia debidas a las características de la muestra.** Las distorsiones más comunes en la medida de la intensidad total de fluorescencia de soluciones de proteínas son debidas al efecto de filtro interno (de excitación o de emisión o autoabsorción), a la presencia de impurezas y a la polarización.

*Efecto de filtro interno de excitación.* Cuando la densidad óptica de la muestra a la longitud de onda de excitación es muy alta, una parte significativa de la luz incidente es absorbida antes de alcanzar la parte central de la cubeta, por lo cual la intensidad de fluorescencia detectada de la muestra deja de ser proporcional a la concentración de fluoróforo. Para evitar este efecto se trabajó con soluciones de absorbancia  $< 0.1$  (medida con una cubeta de 1 cm de paso óptico) a la longitud de onda de excitación.

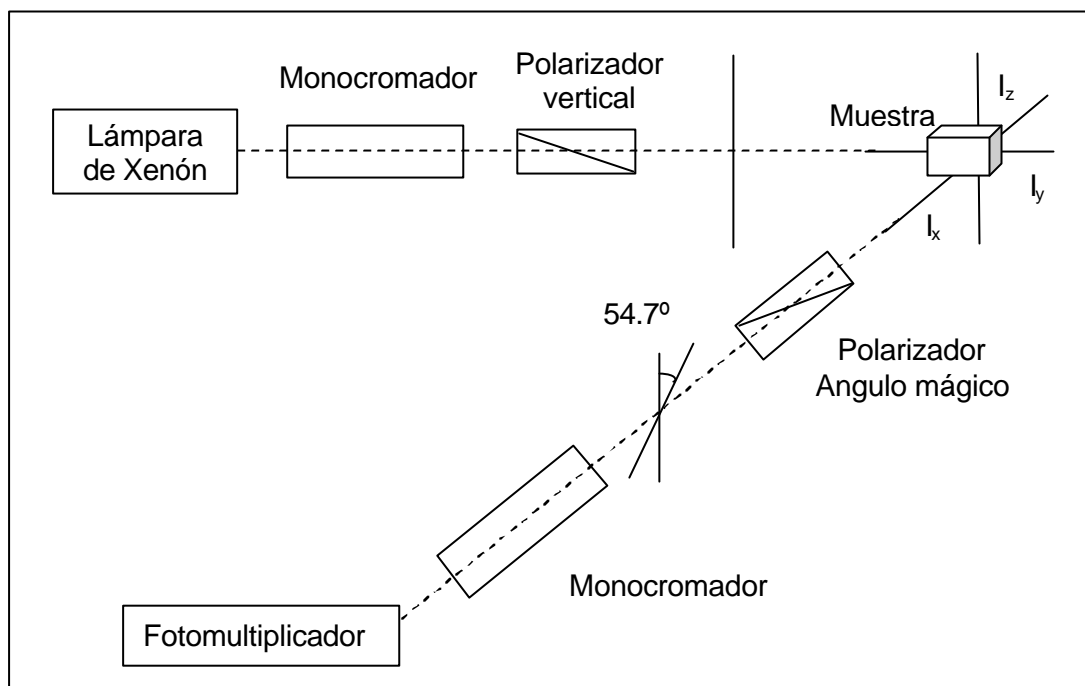
*Efecto de filtro interno de emisión o autoabsorción.* Cuando existe solapamiento entre los espectros de excitación y emisión de la muestra, a altas concentraciones puede producirse un efecto de reabsorción de la luz emitida que provoca un cambio en la forma del espectro de emisión en la región de solapamiento. Para evitar este efecto se trabajó con soluciones de absorbancia  $< 0.1$  (medida con una cubeta de 1 cm de paso óptico) a la longitud de onda de excitación.

*Efecto de la presencia de impurezas fluorescentes.* Cuando se excita una muestra, la señal de fluorescencia que se detecta a una determinada longitud de onda corresponde a la emisión de todas las sustancias fluorescentes presentes en dicha muestra con absorbancia no nula a la longitud de onda de excitación y que emitan en dicha zona. Si la muestra contiene impurezas fluorescentes, su contribución deberá ser restada a la señal de fluorescencia de la muestra con el fin de obtener la señal correspondiente al fluoróforo de interés. Otra posible contaminación de la señal de fluorescencia es la debida a la luz dispersa. Para corregir ambos efectos, en todos los casos se adquirieron espectros de fluorescencia del tampón o del tampón con proteína no marcada (fondo) en las mismas condiciones que para la muestra. Finalmente, los espectros del fondo se restaron al espectro de la muestra.

*Efectos de polarización.* Aún en ausencia de polarizadores, la luz procedente de un fluorímetro de red de difracción, como son los empleados en este trabajo, está parcialmente polarizada con lo cual, si la anisotropía de la muestra es diferente de cero, la emisión puede estar también polarizada. Como la eficiencia de transmisión de un monocromador y la intensidad de fluorescencia observada dependen de la polarización de la fluorescencia emitida, la polarización de la emisión puede generar errores sistemáticos en las medidas de fluorescencia. La solución que se adoptó para eliminar este problema y obtener una respuesta proporcional a la intensidad total de fluorescencia, fue colocar el polarizador de excitación en posición vertical y el de



emisión a  $54.7^\circ$  (ángulo mágico) (Spencer y Weber, 1970). En la *Figura 4.5* se muestra un esquema de los polarizadores en esta configuración. Todos los espectros de emisión presentados en este trabajo se han realizado en condiciones de ángulo mágico.



**Figura 4.5:** Esquema de una de las configuraciones de los monocromadores de excitación y emisión que permiten la detección de una señal proporcional a la intensidad de fluorescencia total, eliminando los efectos de polarización residual de la intensidad de excitación.

#### 4.5.1.1. Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario

**Medida experimental de la anisotropía de fluorescencia.** Las medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en los espectrofluorímetros SLM 8000 D y SLM 8100. Las muestras se excitaron con luz linealmente polarizada vertical y se midieron las componentes de la intensidad de fluorescencia polarizada en las direcciones paralela ( $I_{||}$ ) y perpendicular ( $I_{\perp}$ ) al plano de

polarización de la luz de excitación (*Figura 4.6*). Ambas componentes de la intensidad de fluorescencia se midieron alternativamente utilizando el mismo canal de emisión y, por tanto, el mismo fotomultiplicador (formato en L). Los espectrofluorímetros utilizados disponen de dos fotomultiplicadores, de modo que las componentes paralela y perpendicular de la intensidad de fluorescencia polarizada podrían haber sido medidas de forma simultánea (formato en T). Sin embargo, en esta última configuración, lo que se determina experimentalmente son relaciones de las componentes paralela y perpendicular de modo que no es posible eliminar la contribución del fondo.

**Cálculo de la anisotropía de fluorescencia.** En condiciones ideales, la anisotropía de fluorescencia se calcularía mediante la siguiente expresión (Jablonski, 1957):

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (4.3)$$

Sin embargo, en la expresión anterior fue necesario introducir dos correcciones. La primera se debe a la contribución de las impurezas fluorescentes presentes en la muestra, así como de la luz dispersa Raman y Rayleigh (fondo). La segunda corrección es debida a la diferente sensibilidad del canal de emisión a la luz polarizada horizontal y verticalmente (*factor G*).

**Contribución del fondo.** Cuando la muestra contiene impurezas fluorescentes, su contribución a las componentes paralela y perpendicular de la intensidad de fluorescencia polariza debe ser evaluada y restada, para obtener el valor correcto de la anisotropía de fluorescencia del fluoróforo objeto de estudio. Otro factor que puede afectar a la medida de la anisotropía es la presencia de luz dispersa, que a su vez está también polarizada. Para corregir estos dos efectos, se midió la solución tampón o tampón con proteína sin marcar en las mismas condiciones que la muestra. La contribución obtenida se restó a las componentes paralela y perpendicular de la intensidad de fluorescencia emitida por la muestra:

$$I_{||} = I_{||}^{muestra} - I_{||}^{fondo} \quad (4.4)$$

$$I_{\perp} = I_{\perp}^{muestra} - I_{\perp}^{fondo} \quad (4.5)$$

Donde  $I_{||}^{muestra}$ ,  $I_{\perp}^{muestra}$ ,  $I_{||}^{fondo}$  e  $I_{\perp}^{fondo}$  son las componentes paralela y perpendicular de la intensidad de fluorescencia polarizada de la muestra y del fondo respectivamente.

**Factor G** El *factor G* se puede definir como la relación de las sensibilidades del sistema de detección para la luz polarizada vertical y horizontalmente:

$$G = \frac{S_V}{S_H} \quad (4.6)$$

donde  $S_V$  y  $S_H$  son las sensibilidades del canal de emisión para la luz polarizada vertical y horizontal respectivamente. Si  $I_{||}^{exp}$ ,  $I_{||}^{real}$ ,  $I_{\perp}^{exp}$  e  $I_{\perp}^{real}$  son las componentes paralelas y perpendiculares de la emisión de fluorescencia medidas experimentalmente (superíndice exp) y reales (superíndice real) respectivamente se tiene:

$$I_{||}^{exp} = k S_V I_{||}^{real} \quad (4.7)$$

$$I_{\perp}^{exp} = k S_H I_{\perp}^{real} \quad (4.8)$$

donde  $k$  es un factor de proporcionalidad que tiene en cuenta factores instrumentales.

La anisotropía de fluorescencia se puede expresar como:

$$r = \frac{\left(\frac{I_{||}^{real}}{I_{\perp}^{real}}\right) - 1}{\left(\frac{I_{||}^{real}}{I_{\perp}^{real}}\right) + 2} \quad (4.9)$$

y sustituyendo las ecuaciones (4.7) y (4.8) se tiene la expresión finalmente utilizada para el cálculo de la anisotropía de fluorescencia:

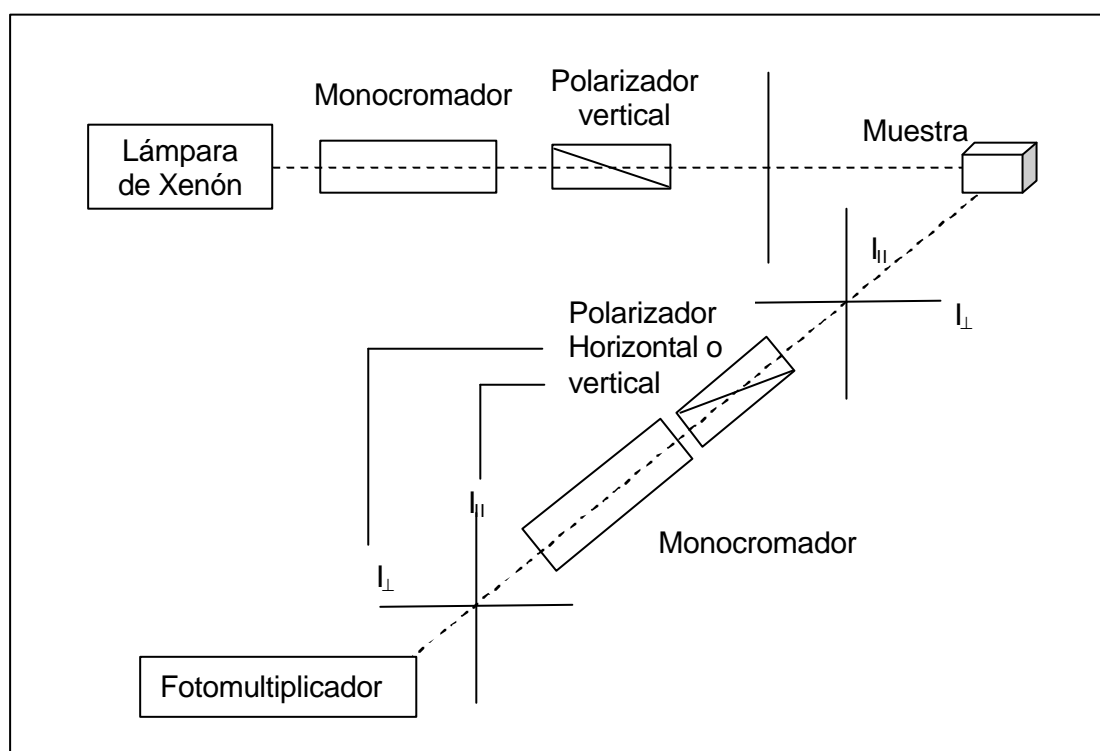
$$r = \frac{I_{||}^{exp} - G I_{\perp}^{exp}}{I_{||}^{exp} + 2G I_{\perp}^{exp}} \quad (4.10)$$

Experimentalmente, el valor del *factor G* se determinó utilizando luz de excitación polarizada horizontalmente (*Figura 4.7*). Cuando la muestra se excita con

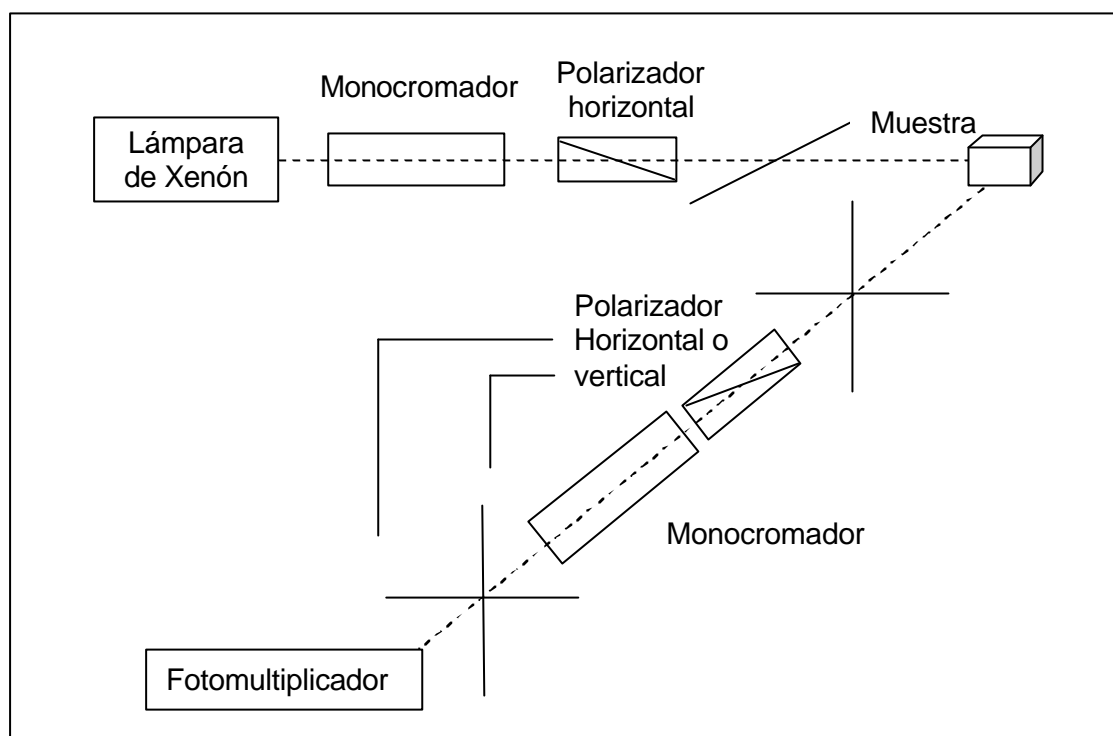
luz polarizada horizontalmente, las diferencias entre la intensidad medida con polarización vertical y horizontal en la emisión se deben únicamente a la diferente sensibilidad del sistema de detección a la luz polarizada. El valor del *factor G* se calculó mediante la expresión siguiente:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (4.11)$$

Donde  $I_{HV}$  e  $I_{HH}$  son las componentes polarizadas vertical y horizontalmente de la intensidad de fluorescencia emitida cuando la excitación está polarizada horizontalmente.



**Figura 4.6:** Diagrama esquemático de la medida experimental de la anisotropía de fluorescencia.



**Figura 4.7:** Esquema óptico de la medida experimental del factor  $G$ .

#### 4.5.2. Espectrometría de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos

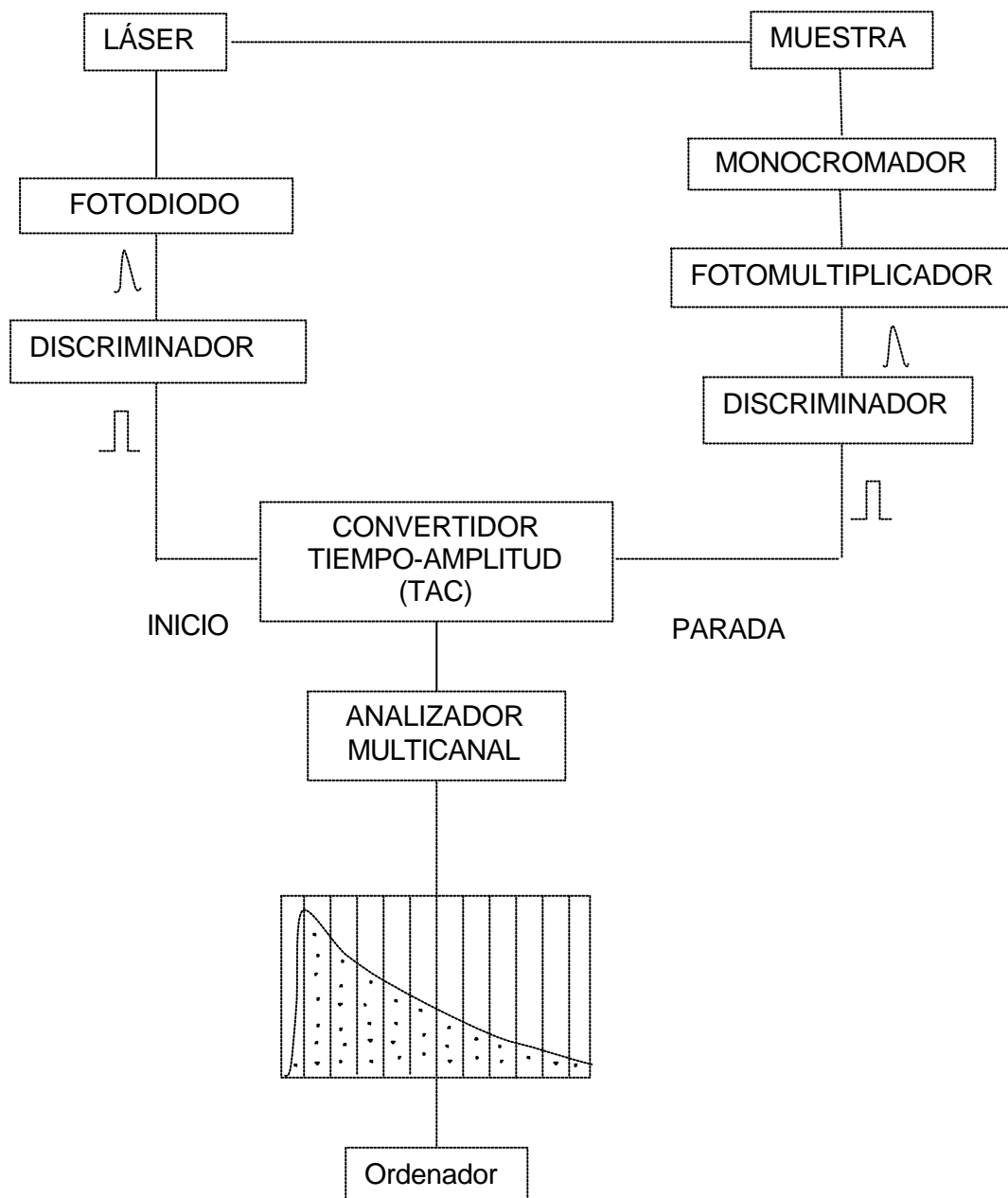
Las medidas de fluorescencia con resolución temporal fueron realizadas en el dominio de tiempos utilizando la técnica de conteo de fotones únicos correlacionados temporalmente (Yguerabide e Yguerabide, 1984; Ware, 1971; Birks y Munro, 1967; Birch, e Imhof, 1991; Lakowicz, 1999). La muestra es excitada mediante un corto pulso de luz y la respuesta fluorescente es detectada en función del tiempo.

Para la realización de estos experimentos se utilizaron dos espectrofluorímetros láser con resolución temporal de picosegundos optimizados para trabajar a las longitudes de onda de excitación de 460 nm (Lillo et al, 2002) y 393 nm (Organero et al, 2002). Los decaimientos de las muestras en las que el fluoróforo era fluoresceína se recogieron en nuestro laboratorio, mientras que los decaimientos de

muestras en las que el fluoróforo era ANS se obtuvieron en el laboratorio del Profesor A. Douhal (Universidad de Castilla La Mancha).

Las cubetas utilizadas fueron las mismas cubetas de cuarzo empleadas para las medidas de fluorescencia en estado estacionario. En las medidas realizadas en el sistema de nuestro laboratorio se emplearon las cubetas de paso óptico 0.3 x 0.3 cm y en las realizadas con el otro sistema, las de paso óptico 0.2 x 1 cm. En ambos instrumentos, el compartimento de la muestra se termostató a 20 °C con un baño de agua Heto. La temperatura de la muestra en la cubeta se comprobó con un termopar (Digi-Sense de Cole-Parmer).

En la *Figura 4.8* se muestra un esquema simplificado de un sistema de medida de fluorescencia con resolución temporal. En el montaje de nuestro laboratorio, la fuente de excitación es un láser sintonizable de Titanio/zafiro (Ti:Za, Tsunami, Spectra-Physics), bombeado por un láser de Nd:YVO<sub>4</sub> (Millenia, Spectra-Physics) que a su vez es bombeado por un láser continuo de diodos (Millenia, Spectra-Physics) que produce pulsos de 0.8-2 ps. En el otro montaje, la fuente de excitación es un láser de diodo con longitud de onda fija de excitación (393 nm). En asociación con el pulso óptico procedente de la fuente de excitación, se genera un pulso eléctrico que, a través de un discriminador, produce una señal de inicio en el convertidor de tiempo-amplitud (TAC). La muestra, al ser excitada, emite fluorescencia que se detecta a 90° del haz de luz de excitación. La detección del primer fotón provoca una señal de parada en el TAC, que produce un pulso cuya amplitud es proporcional al tiempo transcurrido entre las señales de inicio y parada. Las condiciones del sistema deben ser tales que no se detecte más de un fotón por pulso de excitación. El analizador multicanal (MCA) convierte el voltaje en una señal digital proporcional al tiempo, utilizando un convertidor analógico digital (ADC). Sumando muchos pulsos, el MCA construye un histograma de probabilidad de cuentas frente a valores de tiempo que representa el decaimiento de intensidad de fluorescencia de la muestra.



**Figura 4.8:** Diagrama esquemático de un sistema de medida de fluorescencia resuelta en el tiempo.

#### 4.5.2.1. Medida experimental de los tiempos de vida media de fluorescencia y de la anisotropía de fluorescencia con resolución temporal

Para la medida de los tiempos de vida media se recogieron decaimientos de la intensidad de fluorescencia de la muestra con luz de excitación polarizada verticalmente y con el polarizador de emisión en posición de ángulo mágico ( $I_{54}(t)$  o  $I_m(t)$ ). Para la obtención de los decaimientos de anisotropía se recogieron alternativamente, durante el mismo tiempo, decaimientos de las componentes paralela  $I_{||}(t)$  y perpendicular  $I_{\perp}(t)$  de la intensidad de fluorescencia excitando la muestra con luz polarizada verticalmente. En ambos casos se colocó un filtro de corte (SCHOTT KV) delante del monocromador con el fin de eliminar contaminaciones de luz dispersa de excitación residual.

Inmediatamente antes y después de cada medida se recogió en las mismas condiciones pero sin ningún filtro, la función de respuesta instrumental del sistema, utilizando para ello la luz dispersa emitida por agua Milli-Q a la misma longitud de onda de excitación.

Finalmente, y con el fin de eliminar la contribución del fondo, se recogieron los decaimientos del tampón o del tampón con proteína en idénticas condiciones al decaimiento de la muestra.

Las condiciones experimentales se ajustaron para evitar que el número de fotones emitidos por segundo superara los 10000 o 12000, correspondientes a la zona lineal de respuesta del detector. Típicamente los decaimientos de fluorescencia de la muestra se recogieron durante un tiempo suficiente para acumular un total de fotones superior a  $10^6$ .

Para obtener los decaimientos de anisotropía de fluorescencia es necesario determinar el valor del *factor G* del espectrómetro láser. El *factor G* se determinó considerando que la anisotropía de fluorescencia de estado estacionario ( $r$ ) estimada a partir de la integración de los decaimientos de las componentes paralela ( $I_{||}(t)$ ) y perpendicular ( $I_{\perp}(t)$ ) de la intensidad de fluorescencia, debe coincidir con la determinada utilizando el espectrofluorímetro de estado estacionario, para una misma muestra en idénticas condiciones experimentales:

$$r = \frac{\int_0^{\infty} I_{||}(t) dt - G \int_0^{\infty} I_{\perp}(t) dt}{\int_0^{\infty} I_{||}(t) dt + 2G \int_0^{\infty} I_{\perp}(t) dt} \quad (4.12)$$



#### 4.5.2.2. Análisis numérico de los decaimientos de fluorescencia. Técnicas de reconvolución iterativa

Se define la respuesta a un impulso de un sistema,  $i(t)$ , como la respuesta que se observaría con un instrumento ideal si el sistema se excita con un pulso de luz de duración cero y energía finita (función  $d$ ). El pulso de excitación de las fuentes de luz láser utilizadas en los experimentos tiene una cierta duración (unos pocos ps) y, además, el sistema de detección introduce distorsiones de decenas de picosegundos. Por ello, la respuesta de fluorescencia obtenida experimentalmente  $I_{exp}(t)$  es el resultado de la convolución de la respuesta ideal  $i(t)$  con la función de respuesta instrumental  $L'(t)$ . El grado de deformación en la medida depende de la duración de la función de respuesta instrumental en relación con las constantes de tiempo del decaimiento de fluorescencia.

Matemáticamente el concepto de convolución se expresa del siguiente modo:

$$I_{exp}(t) = \int_0^t L'(T) i(t-T) dT \quad (4.13)$$

donde  $T$  es el tiempo de inicio de la respuesta al pulso de excitación. El decaimiento experimental  $I_{exp}(t)$  es la suma de las respuestas a los impulsos  $i(t)$  creadas por todas las funciones  $d$  de excitación (pulsos  $d$ ) individuales que ocurren hasta el tiempo  $T$ . La función instrumental determinada experimentalmente a la longitud de onda de excitación,  $L(t)$ , es una buena aproximación a  $L'(t)$  siempre y cuando las distorsiones introducidas por el sistema de detección para  $L(t)$  e  $I_{exp}(t)$  sean lineales y las mismas para ambas medidas.

Las distorsiones introducidas en las magnitudes observadas por los sistemas de detección son varias. Los fotomultiplicadores introducen dos distorsiones temporales, una que desplaza el origen de la señal en la escala de tiempos y que se puede corregir fácilmente y otra en la zona de 0.7-5 ns que es más importante y que determina la anchura mínima del pulso que se puede obtener con el sistema. Otros componentes como los amplificadores, discriminadores, TAC y MCA producen distorsiones en los pulsos eléctricos que pueden ser lineales si se selecciona adecuadamente el tipo de módulos y las condiciones de operación.

El método utilizado para la obtención de las vidas medias de fluorescencia y el análisis del decaimiento de anisotropía, se denomina método de reconvolución

iterativa y se basa en el ajuste de mínimos cuadrados no lineales (Grinvald y Steinberg, 1974; Grinvald, 1976; Zimmerman et al, 1974, Beechem, 1992), que proporciona estimaciones de los parámetros que tienen la probabilidad más alta de ser correctos.

El análisis se realizó con el programa de reconvolución iterativa de mínimos cuadrados no lineales desarrollado en el *Laboratory for Fluorescence Dynamics* de la Universidad de Illinois (Urbana-Champaign). El error en los parámetros de ajuste se obtuvo a partir de un análisis riguroso de errores para un nivel de confianza del 67 % (Beechem et al. 1991).

**Análisis de los decaimientos de intensidad de fluorescencia.** Para el análisis de los resultados se asume que el decaimiento de intensidad de fluorescencia se puede expresar como una suma de exponenciales, de la forma:

$$i(t) = i(0) \sum_i a_i \exp(-t/t_i) \quad (4.14)$$

La función  $i(t)$  se convoluciona con la función instrumental  $L(t)$  y el resultado obtenido  $f(t)$  se compara con los datos experimentales  $I_{exp}(t)$ . Los valores de los factores preexponenciales  $a_i$  y de los tiempos de vida media de fluorescencia  $t_i$  se van variando utilizando como método de minimización el algoritmo de Marquardt (Marquardt, 1963). El proceso se repite hasta encontrar la función  $i(t)$  para la cual  $f(t)$  tenga el menor grado de disparidad con  $I_{exp}(t)$ . El grado de coincidencia de las funciones  $I_{exp}(t)$  e  $I_c(t)$  se determina cuantitativamente a partir del parámetro  $c^2$  reducido ( $c_R^2$ ). Si únicamente contribuyen errores al azar al valor de  $c_R^2$ , el valor esperado para  $c_R^2$  es próximo a la unidad:

$$c_R^2 = \frac{c^2}{n-p} \quad (4.15)$$

donde  $n$  es el número de datos,  $p$  el número de parámetros del ajuste y el término  $n-p$  representa el número de grados de libertad del ajuste.  $c^2$  viene dado por la siguiente expresión:

$$c^2 = \sum_{i=1}^n \frac{1}{s_i^2} [I_{exp}(t_i) - I_c(t_i)]^2 = \sum_{i=1}^n \frac{[I_{exp}(t_i) - I_c(t_i)]^2}{I_{exp}(t_i)} \quad (4.16)$$

En esta expresión la suma se extiende al número total de datos  $n$ .  $1/s_i^2$  es el factor de peso estadístico y  $s_i$  es la desviación estándar de cada dato, que para este caso viene dada de acuerdo con la distribución de Poisson, por la raíz cuadrada del número de fotones.

Otro diagnóstico de la corrección del ajuste es la distribución de residuos normalizados  $r_s(t_i)$ , que representan las diferencias entre las funciones experimental y ajustada:

$$r_s(t_i) = \frac{1}{s_i} [I_{exp}(t_i) - I_c(t_i)] \quad (4.17)$$

En general se consideró adecuado un ajuste que proporciona valores de  $c_R^2$  próximos a 1 y además da lugar a una distribución al azar de residuos.

**Análisis de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia.** El análisis de los parámetros de la anisotropía de fluorescencia es un análisis de tipo global, en el que se analizan simultáneamente las componentes paralela y perpendicular del decaimiento de intensidad de fluorescencia, y todos los parámetros se optimizan simultáneamente para obtener el mejor ajuste. Para el análisis de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia, se considera que cada componente de la intensidad de fluorescencia se puede expresar como:

$$I_{||}(t) = \frac{1}{3} \left( 1 + 2r_0 \sum_i b_i \exp(-t/\tau_i) \right) \sum_j a_j \exp(-t/\tau_j) \quad (4.18)$$

$$I_{\perp}(t) = \frac{1}{3} \left( 1 - r_0 \sum_i b_i \exp(-t/\tau_i) \right) \sum_j a_j \exp(-t/\tau_j) \quad (4.19)$$

Ambas componentes se convolucionan con la función instrumental del sistema  $L(t)$ . Las funciones obtenidas  $I_{||}^c(t)$  e  $I_{\perp}^c(t)$  se comparan con las funciones experimentales  $I_{||}^{exp}(t)$  e  $I_{\perp}^{exp}(t)$ . Los valores  $a_j$  y  $\tau_j$  se obtienen del análisis independiente del decaimiento de intensidad total de fluorescencia correspondiente.

Los valores de  $\mathbf{b}_i$  y  $\mathbf{f}_i$  se van variando hasta alcanzar un valor de  $c^2$  global reducido mínimo ( $c_{R,g}^2$ ), utilizando como método de minimización, el algoritmo de Marquardt (Marquardt, 1963).

$$c_{R,g}^2 = \frac{1}{n-p} \sum_{i=1}^n \frac{1}{s_{I_{\perp}(t)}^2} (I_{\perp}^{exp}(t_i) - I_{\perp}^c(t_i))^2 + \frac{1}{n-p} \sum_{i=1}^n \frac{1}{s_{I_{\parallel}(t)}^2} (I_{\parallel}^{exp}(t_i) - I_{\parallel}^c(t_i))^2 \quad (4.20)$$

Otro diagnóstico de la bondad del ajuste es la distribución de residuos  $r_s(t_i)$  normalizados:

$$r_{s\parallel}(t_i) = \frac{1}{s_i} (I_{\parallel}^{exp}(t_i) - I_{\parallel}^c(t_i)) \quad (4.21)$$

$$r_{s\perp}(t_i) = \frac{1}{s_i} (I_{\perp}^{exp}(t_i) - I_{\perp}^c(t_i)) \quad (4.22)$$

#### 4.5.3. Medidas de fluorescencia realizadas en un lector de placas

Estas medidas se realizaron en un lector de placas FLUOstar Galaxy de BMG Labtechnologies utilizando placas de 96 pocillos de color negro y de fondo redondeado Nunc Maxixorp.

La fuente de iluminación del lector de placas es una lámpara de destello de Xenón (flash lamp). El equipo dispone de varios conjuntos de guías ópticas, rellenas de líquido, que se seleccionaron según se quisiera medir intensidad o anisotropía de fluorescencia. Las longitudes de onda excitación y emisión se seleccionan por medio de filtros de interferencia. Existen dos canales de detección de la emisión y por tanto dos fotomultiplicadores.

Para las medidas de intensidad de fluorescencia la ganancia del fotomultiplicador se ajustó automáticamente, tomando como referencia el pocillo en el que se esperaba la mayor señal de fluorescencia.

El lector de placas se ha utilizado de forma sistemática para la reconstrucción de gradientes de equilibrio de ultracentrifugación de RNasa A o apoMb marcadas con

fluoresceína, en soluciones con alta concentración de proteína (ver *Materiales y Métodos 4.8*).

#### 4.5.4. Determinación de la constante de homodimerización aparente de apomioglobina en presencia de distintas concentraciones de ribonucleasa A por anisotropía de fluorescencia

Para la determinación de la constante de dimerización aparente de apoMb en presencia de distintas concentraciones de RNasa A, se prepararon muestras con una concentración fija de RNasa A (100, 150, 200 y 250 mg/mL) y distintas concentraciones de apoMb entre  $10^{-5}$  y  $9 \times 10^{-4}$  M, (0.17 y 15 mg/mL) marcada con ANS. Las muestras se dejaron equilibrar durante al menos 1 hora y luego se termostataron a 20 °C durante otra media hora. Se realizaron varias medidas de anisotropía de fluorescencia a diferentes tiempos para asegurar el correcto equilibrado y termostatizado de cada muestra.

**Análisis de la variación de la anisotropía para la obtención de constantes de dimerización aparente.** La variación de la anisotropía con la concentración total de apoMb se analizó utilizando el siguiente modelo (Chauvin et al, 1994):

$$r = r_d - (r_d - r_m) \frac{-1 + \sqrt{1 + 8K' C_{apoMb}}}{4K' C_{apoMb}} \quad (4.23)$$

donde  $r$  es la anisotropía de estado estacionario medida para una cierta concentración molar de apoMb ( $C_{apoMb}$ ),  $r_m$  y  $r_d$  son las anisotropías que se obtendrían si toda la apoMb estuviera en forma monomérica o dimérica respectivamente.  $K'$  es la constante de dimerización aparente que se define como  $k' = [D]/[M]^2$  donde  $[D]$  y  $[M]$  son las concentraciones molares de monómero y dímero en el equilibrio.

La ecuación (4.23) se obtiene a partir de la propiedad aditiva de la anisotropía (ecuación (3.7), ver *Fundamento Teórico 3.1.2.3*):

$$r = f_d r_d + f_m r_m \quad (4.24)$$

donde  $f_d$  y  $f_m$  son las fracciones molares de monómero y dímero si y sólo si la formación del dímero no da lugar a cambios en los parámetros de emisión de la sonda (ecuación (3.8), *Fundamento Teórico 3.1.2.3*).

#### 4.6. ESPECTROSCOPIA DE CORRELACIÓN DE FLUORESCENCIA (FCS)

La técnica de FCS se ha utilizado fundamentalmente para el estudio de la difusión translacional de la apoMb, marcada con Alexa 488 o con Alexa 546, en soluciones con una alta concentración de RNasa A o de HSA. Las medidas de FCS se realizaron en el laboratorio del Dr Visser (Universidad de Wageningen, Holanda).

##### 4.6.1. Procedimiento experimental

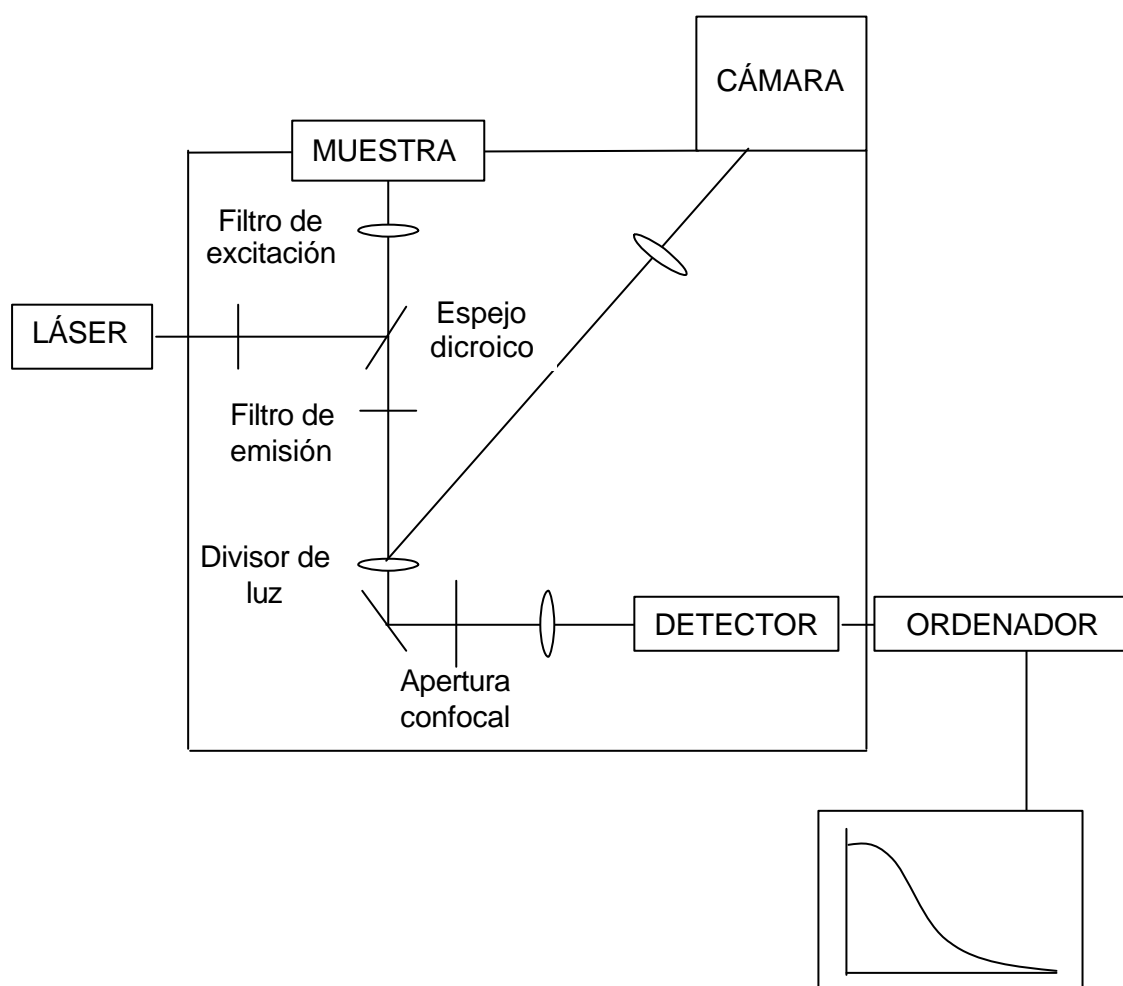
Las medidas de FCS se realizaron con un microscopio confocal invertido ConfoCor de Zeiss-EVOTEC (Hink y Visser 1999; Visser y Hink 1999).

En la *Figura 4.9* se muestra un esquema de un equipo de medida de espectroscopía de fluorescencia correlacionada. Las fuentes de luz fueron alternativamente un láser de ión Argon enfriado por aire (longitudes de onda de excitación de 488 y 514 nm) y un láser de Helio/Neon (luz de excitación de 543 nm). La luz láser de excitación se hace pasar por filtros de interferencia apropiados y por filtros dicróicos, se enfoca en la muestra por medio de un objetivo de inmersión y, finalmente, la fluorescencia emitida por la muestra es recogida por el mismo objetivo (*Figura 4.10*). De nuevo es necesario introducir filtros de banda y espejos dicróicos apropiados para separar la luz de excitación de la señal de fluorescencia emitida. Una apertura confocal, típicamente de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, elimina la luz fuera de foco. Finalmente, la fluorescencia emitida se detecta con un fotodiodo de avalancha, en modo de conteo de fotón único, cuya señal es procesada por un correlador.

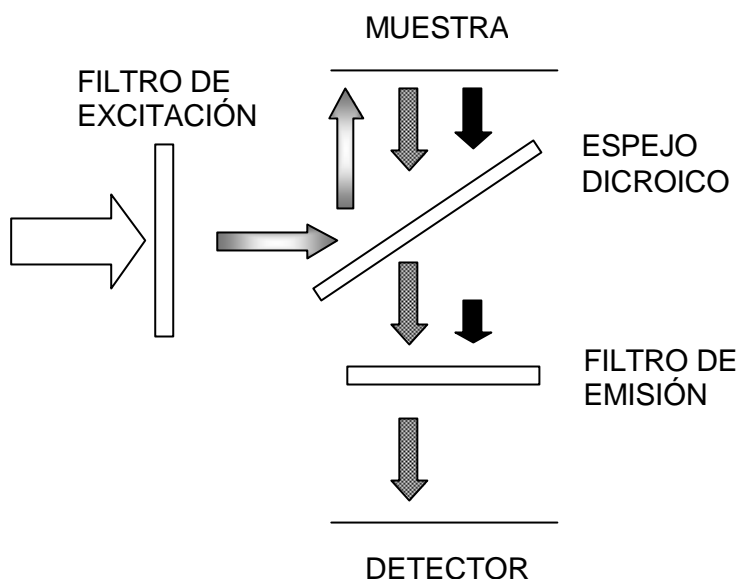
Las medidas se iniciaron sistemáticamente con el calibrado del sistema, es decir, con la determinación del parámetro estructural  $a=w_2/w_1$ . Dicho parámetro describe la forma del volumen de detección, que viene determinada por el tamaño del foco del láser y de la apertura confocal. El valor del parámetro  $a$  se mantendrá constante durante el experimento mientras no cambie el foco del láser y la apertura confocal. El calibrado se realizó utilizando compuestos como la rodamina 6 G o la tetrametil rodamina, cuya constante de difusión translacional se conoce con precisión:

$2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Hink y Visser, 1999). Se utilizó uno u otro compuesto de referencia según la longitud de onda de excitación del experimento: rodamina 6G para excitación a 488 nm y tetrametilrodamina para excitación a 543 nm.

Para las medidas de FCS se utilizaron placas negras con fondo de vidrio de 96 pocillos UniView de Whatman con un volumen de muestra en cada pocillo de 50  $\mu\text{L}$ . Cada muestra se midió 10 veces durante 1-2 minutos cada vez, para la obtención de las funciones de autocorrelación. La concentración de sonda para estos experimentos (Alexa 488 o Alexa 546 dependiendo de la longitud de onda de excitación) fue del orden de nM.



**Figura 4.9:** Esquema básico del equipo de FCS.



**Figura 4.10:** Esquema del efecto de los filtros de excitación y emisión y del divisor de luz.

#### 4.6.2. Análisis numérico de las funciones de autocorrelación

El modelo 1 utilizado para el análisis de los datos experimentales considera que, los cambios de intensidad de fluorescencia en el elemento de volumen de detección son debidos únicamente a la difusión de especies presentes y a la población y despoblación del estado triplete del fluoróforo (ecuación (3.29)). Para el caso de una sola especie:

$$G(t) = 1 + \frac{\left(1 - F_{trip} + F_{trip} \exp(-t/T_{trip})\right)}{N(1 - F_{trip})} \left( \frac{1}{\left(1 + \frac{t}{T_1}\right) \sqrt{1 + \frac{t}{a^2 T_1}}} \right) \quad (4.25)$$

donde  $N$  es el número promedio de moléculas fluorescentes en el volumen de detección.  $F_{trip}$  y  $T_{trip}$  son la población fraccional y el tiempo de relajación del estado triplete respectivamente y  $T_1$  ( $T_1 = w_1^2/4D_1$ ) es el tiempo de difusión translacional de la



especie fluorescente.  $D_1$  es la constante de difusión translacional.  $a$  es el parámetro estructural del montaje instrumental ( $a = w_2/w_1$ ).  $w_1$  y  $w_2$  son la distancia desde el eje óptico y la distancia en la dirección  $Z$  respectivamente, a la cual el láser ha disminuido en  $1/e^2$ . El perfil de excitación es Gaussiano en las tres dimensiones (ver *Figura 3.7*).

La evaluación de la contribución del fondo a la función de autocorrelación no resulta evidente. En los experimentos presentados en este trabajo, la señal debida al fondo está también correlacionada, por lo que en el modelo 2 utilizado, el fondo se ha tratado como una segunda especie fluorescente. La contribución del fondo en este caso, depende no sólo de la intensidad de fluorescencia emitida, sino también y fundamentalmente de número relativo de fotones emitidos por cada molécula (brillo) (Niswender et al, 1995). El modelo de análisis que tiene en cuenta la contribución del fondo es el siguiente (Brock y Jovin, 2001):

$$G(t) = 1 + \frac{\left(1 - F_{trip} + F_{trip} \exp(-t/T_{trip})\right)}{N(1 - F_{trip})} (\mathbf{x}_T Diff_T + \mathbf{x}_B Diff_B) \quad (4.26)$$

donde  $Diff_T$  y  $Diff_B$  son las contribuciones a la difusión de la especie trazadora (fluoróforo de interés) y de las especies que constituyen el fondo, respectivamente, y se pueden expresar como:

$$Diff_i = \frac{1}{\left(1 + \frac{t}{T_i}\right) \sqrt{1 + \frac{t}{a^2 T_i}}} \quad (4.27)$$

Donde el subíndice  $i$  hace referencia al trazador o a las especies del fondo.  $\mathbf{x}_T$  y  $\mathbf{x}_B$  son los factores fraccionales de peso para la contribución de la especie trazadora y del fondo a la función de autocorrelación, que se puede escribir como:

$$\mathbf{x}_i = \frac{f_i n_i^2}{\left(\sum_i f_i n_i\right)^2} \quad (4.28)$$

Donde el subíndice  $i$  hace referencia al trazador o el fondo.  $f_i$  es la fracción molecular relativa de cada especie:

$$f_i = N_i/N \quad (4.29)$$

donde  $N_i$  es el número de moléculas de la especie  $i$  y  $N$  el número total de moléculas.  $n_i$  es la intensidad de fluorescencia por molécula o brillo, que se define como:

$$n_i = I_i/N_i \quad (4.30)$$

donde  $I_i$  es la intensidad total de fluorescencia de la especie  $i$ .

El análisis preliminar de los resultados se llevó a cabo por medio del conjunto de programas FCS ACCESS suministrado con el instrumento EVOTEC / ZEISS. Se realizó un análisis más riguroso y detallado utilizando el programa FCS Data Processor, desarrollado por Digris\* et al (2001). Para el estudio de la contribución del fondo a la función de autocorrelación fue necesario modificar el programa FCS Data Processor (Hink, M). El programa ajusta la función de correlación a los datos experimentales por un método iterativo basado en el algoritmo de Marquardt. La bondad del ajuste se juzgó a partir del valor del parámetro  $\chi^2$  y partir de la distribución de residuos al azar. El análisis de errores se realizó para un nivel de confianza del 67 %.

\*Digris, AV, Skakoun VV, Novikov EG, Apanosovich VV, Hink MA y Visser AJWG (comunicación personal)

#### 4.7. MEDIDA DE LAS VISCOSIDADES MACROSCÓPICAS

La determinación de la viscosidad macroscópica de soluciones de HSA y RNasa A se realizó utilizando un microviscosímetro capilar de Ostwald, calibrado por el fabricante SCHOTT-GERÄTE GmbH. El volumen de solución de proteína empleado para cada medida fue de 2 mL. Durante la medida, el sistema se mantuvo termostatzado a  $20 \pm 0.1$  °C mediante un baño de agua. Para cada muestra la medida de la viscosidad se repitió 5 veces, siendo la precisión en la medida del tiempo 0.01 segundos. La determinación de la densidad de las distintas soluciones de

proteína se realizó por pesada de volúmenes conocidos de cada muestra, promediando el resultado de 10 medidas para cada muestra.

## 4.8. ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA. EQUILIBRIO DE SEDIMENTACIÓN

### 4.8.1. Procedimiento experimental

#### **Ultracentrifugación analítica de muestras de baja concentración de proteína.**

Estos experimentos fueron realizados con ayuda del Dr Carlos Alfonso, (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid), utilizando una ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-A equipada con un dispositivo de medida de absorción óptica ultravioleta-visible. Las muestras se centrifugaron en un rotor AnTi-50, utilizando celdas de doble sector, a 3 velocidades distintas (15 krpm, 18 krpm y 23 krpm) durante tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio (1-2 días). El equilibrado de las muestras a cada velocidad se comprobó mediante la superposición de barridos de absorción en función de la posición radial, tomados a tiempos diferentes. La adquisición de la línea base para la corrección de las señales de absorbancia se realizó después de centrifugar la muestra a 50000 rpm. Los experimentos se realizaron a 20 °C y el volumen de muestra empleado fue 70 µL. En la *Figura 4.11* se muestra un esquema de los barridos de absorbancia frente a la posición radial que se obtienen en un experimento típico así como su interpretación.

En este trabajo se han realizado experimentos de centrifugación de muestras poco concentradas (menos de 1 mg/mL) de apoMb y de RNasa A sin marcar fluorescentemente y de apoMb marcada con los fluoróforos, fluoresceína, Alexa 488 y Alexa 546. Para las muestras en las que la proteína no estaba marcada, los gradientes se obtuvieron a partir de medidas de absorbancia en la región del ultravioleta. En los casos en que la proteína estaba marcada con alguno de los fluoróforos indicados, los gradientes se obtuvieron a partir de medidas de absorbancia de la muestra en la región visible del espectro.

**Ultracentrifugación analítica de muestras de alta concentración de proteína.** Los experimentos de ultracentrifugación analítica con muestras de elevada concentración de proteína resultaron inviables, debido a la elevada absorbancia, a los cambios de índice de refracción y a la dispersión de luz, derivados de la alta concentración de

proteína presente en estas muestras. En la *Figura 4.12* se muestra un esquema del procedimiento experimental seguido para la realización de este tipo de experimentos (Darawshe, 1993), en los que se utilizó una ultracentrífuga preparativa como herramienta analítica. Este tipo de experimentos se habían realizado anteriormente con muestras en las que la proteína estaba marcada con isótopos radioactivos, o bien con compuestos que presentaban absorción en la zona visible del espectro. En este trabajo se ha estudiado la utilidad y las limitaciones de un marcado fluorescente de la proteína para la obtención de gradientes de equilibrio de sedimentación de dicha proteína, en presencia de altas concentraciones de la misma proteína o de otra no relacionada.

En cada tubo de centrifuga se colocaron 70  $\mu\text{L}$  de muestra sobre 90  $\mu\text{L}$  de un derivado fluorocarbonado inmiscible (FC 43 Beckman Spinco 306394), que sitúa la muestra a la altura apropiada, y se sellaron con 70  $\mu\text{L}$  de dimetil polisiloxano DOW CORNING 200, cuya función es evitar la evaporación del disolvente. Las muestras se centrifugaron en una ultracentrífuga preparativa Optima XL-A 90 de Beckman utilizando un rotor basculante SW 41 a 20 krpm a 20 °C durante el tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio de sedimentación (4-7 días). El tiempo necesario para el equilibrado de cada muestra, que depende fundamentalmente de su viscosidad macroscópica, fue calculado utilizando el programa SIMCEN (cedido por el Dr. A.P. Minton N.I.H., E.E.U.U.). Las muestras se fraccionaron mediante un microfraccionador automático de tubos de centrifuga Brandel FR-115, de acuerdo con su posición radial, en alícuotas de 3.5  $\mu\text{L}$  correspondientes a un incremento en la posición radial de 0.02 cm. Cada fracción se diluyó en tampón hasta un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  y su fluorescencia o absorbancia se midieron con un lector de placas FLUOStar o con el espectrofotómetro Cary 3E, respectivamente para reconstruir el gradiente de sedimentación de la muestra.

Para la obtención del gradiente de sedimentación de una especie molecular, es imprescindible que la propiedad que se mide (absorbancia, emisión de radioactividad, emisión de fluorescencia...) a cada distancia radial sea proporcional a la concentración de dicha especie y, además, que la constante de proporcionalidad no varíe al cambiar dicha posición radial. La relación entre la intensidad de fluorescencia emitida por un fluoróforo y su concentración puede verse alterada por una serie de factores que se resumen a continuación:

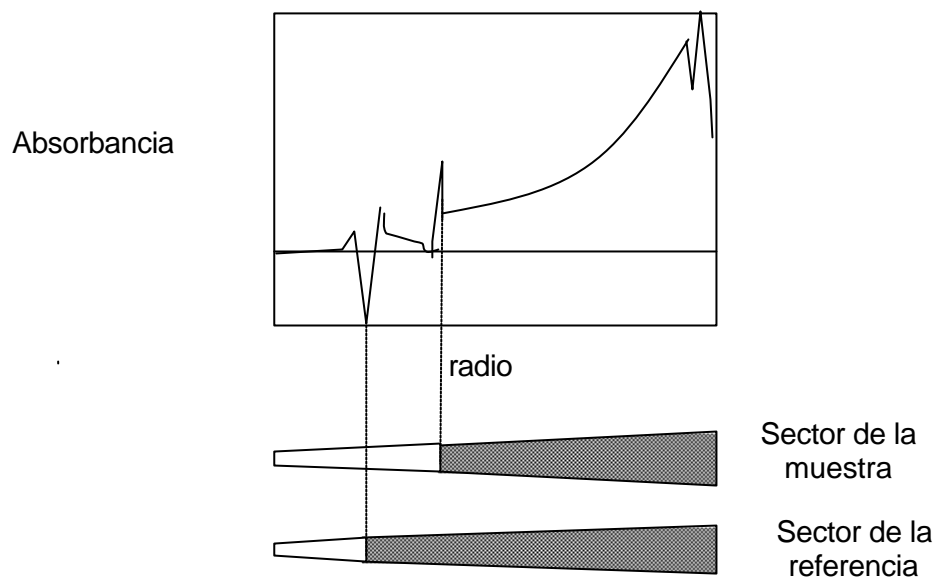
- la intensidad de fluorescencia emitida por un fluoróforo es directamente proporcional a su concentración sólo cuando su absorbancia a la longitud de onda de excitación es menor que 0.1 (ley de Lambert – Beer, error menor del 3%).

- las propiedades espectroscópicas del fluoróforo (rendimiento cuántico, espectro de fluorescencia) pueden variar con la concentración total de proteína.

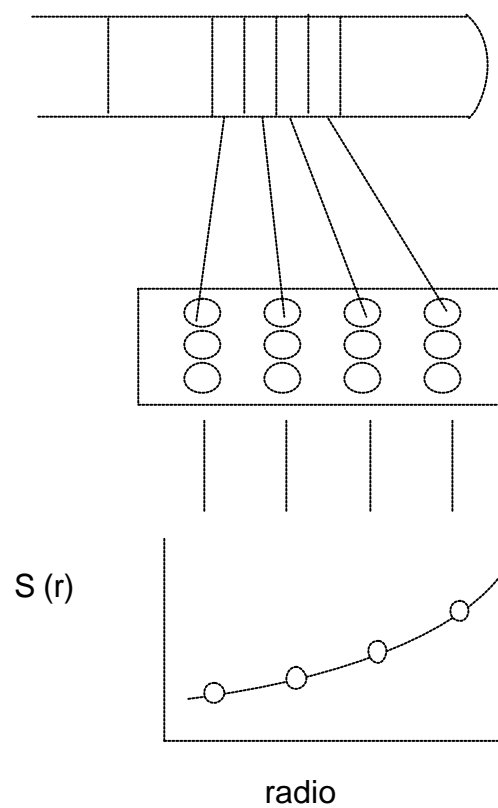
- la contribución del fondo de fluorescencia, debido a la proteína no marcada, que será distinta para cada fracción dependiendo de la concentración total de proteína de la misma.

Para evitar distorsiones en los gradientes obtenidos a partir de medidas de fluorescencia debidas a los factores indicados, la absorbancia final de las fracciones a partir de las cuales se obtuvieron los gradientes de equilibrio, se estimó a partir de la concentración de fluoróforo de la muestra que se iba a centrifugar y del factor de dilución de dichas fracciones. Además, cada pareja fluoróforo-proteína se caracterizó espectroscópicamente, como paso previo a la realización del experimento de centrifugación. Finalmente, la diferente contribución del fondo para cada fracción se eliminó maximizando la relación señal / fondo, hasta un punto en el que la contribución del fondo se hiciera despreciable en el intervalo de concentraciones de proteína del gradiente, mediante el ajuste de la concentración inicial de fluoróforo y de la dilución previa a la medida de la emisión de fluorescencia de las fracciones.

El procedimiento descrito se aplicó al estudio de soluciones de distintas concentraciones de RNasa A, entre 25 y 200 mg/mL, en ausencia de apoMb. Los experimentos se realizaron con dos tipos de muestras: unas que contenían exclusivamente RNasa A y otras en las que además de RNasa A se incorporó RNasa A-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M, 0.03 mg/mL) como trazador. Las muestras de menor concentración de RNasa A (25, 50, 75 y 100 mg/mL) se centrifugaron durante 4 días a 20000 rpm y 20 °C, mientras que las de 150 y 200 mg/mL se centrifugaron en idénticas condiciones pero durante 7 días, ya que debido a su elevada viscosidad necesitaban un tiempo superior de centrifugado para garantizar la condición de equilibrio. Las medidas de fluorescencia para la reconstrucción de los gradientes de muestras con RNasa A-FI se realizaron con longitudes de onda de excitación y emisión 488 y 520 nm respectivamente. Las medidas de absorción correspondientes a muestras de RNasa A no marcada se realizaron a una longitud de onda de 280 nm. Los experimentos se realizaron para cada muestra como mínimo por cuadruplicado.



**Figura 4.11:** Diagrama esquemático del resultado obtenido en un experimento de equilibrio de sedimentación realizado con una ultracentrífuga analítica.



**Figura 4.12:** Esquema del procedimiento experimental seguido para la centrifugación de muestras de elevada concentración de proteína.

#### 4.8.2. Análisis de los gradientes de equilibrio de sedimentación

Las masas moleculares promedio de flotación aparente ( $M_{app}^*$ ) se determinaron mediante el ajuste de los datos experimentales al modelo de sedimentación (Rivas et al, 1999b):

$$S(r) = S(r_0) \exp \left[ \frac{M_{app}^* \omega^2 (r^2 - r_0^2)}{2RT} \right] \quad (4.31)$$

donde  $S$  es una señal proporcional a la concentración,  $r_0$  es la posición radial de referencia y  $r$  es la posición radial.  $T$  es la temperatura en Kelvin,  $R$  es la constante de los gases y  $\omega$  la velocidad angular.

Los programas utilizados para el análisis de los gradientes de equilibrio fueron EQASSOC y XLAEQ (Beckman Instruments, Minton 1994).

La dependencia de la masa molecular de flotación aparente de una proteína con su concentración contiene información sobre el estado de asociación de dicha proteína. Sin embargo, dicha correlación no es trivial en el caso de medios no ideales (ver *Fundamento teórico 3.3*) y se requieren aproximaciones de la termodinámica estadística (Minton, 1998a; Zimmerman y Minton, 1993) para la estimación de los valores de los coeficientes de actividad de las especies. Estos procedimientos están siendo desarrollados por el Dr AP Minton (N.I.H., E.E.U.U.).

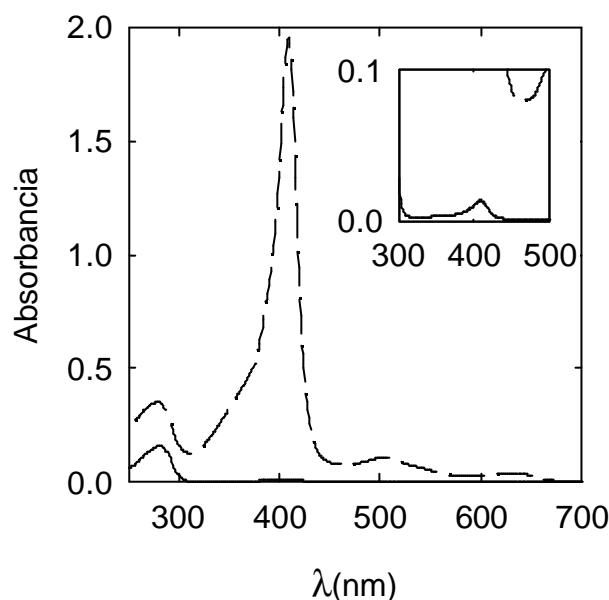
## *5. Resultados*

---



### 5.1. PREPARACIÓN DE APOMIOGLOBINA

El método del ácido/acetona utilizado para la obtención de apoMb a partir de Mb proporcionó proteína libre de grupo hemo en un 98 % con un rendimiento del 60 - 70 %. En la *Figura 5.1* se muestran los espectros de absorción de la Mb y de la apoMb obtenida por el método indicado. La pureza de la Mb de partida así como la integridad (no fragmentación) de la apoMb obtenida fueron comprobadas por electroforesis en gel de poliacrilamida del 15 %.



**Figura 5.1:** Espectros de absorción de Mb (- -) y apoMb ( $\beta_4$ ) en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. Los espectros corresponden a la misma concentración de Mb y apoMb. El espectro de absorción de la Mb presenta una intensa banda de absorción en la región de Soret (máximo en torno a 409 nm) característica del grupo hemo. Esta banda es apreciablemente más débil en el espectro de la apoMb debido a la eliminación de dicho grupo. En el recuadro se muestran los mismos espectros con una escala más apropiada para observar la banda residual de absorción de la apoMb en la región de Soret.

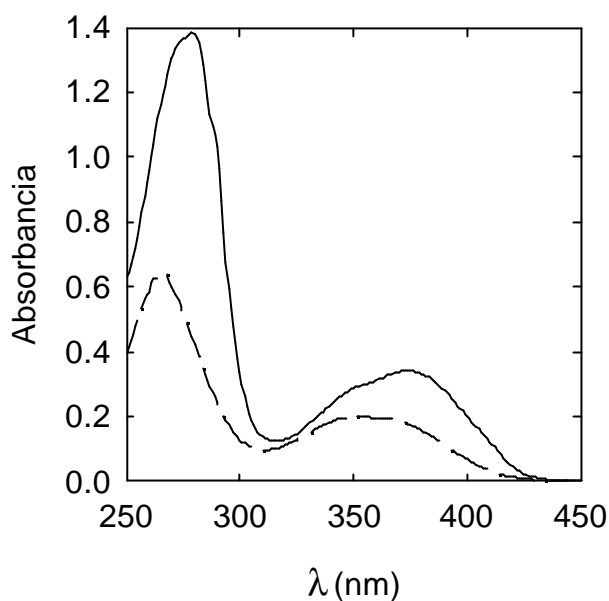
## 5.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MARCADOS FLUORESCENTES DE APOMIOGLOBINA Y RIBONUCLEASA A CON FLUORÓFOROS EXTRÍNSECOS

**Marcado de apoMb con ANS.** La incorporación del ANS al sitio de unión de la apoMb, provoca cambios importantes en las propiedades espectroscópicas de la sonda, como se puede ver en las *Figuras 5.2 y 5.3*. El espectro de absorción del ANS en tampón muestra una banda ancha con un máximo de absorción en torno a 350 nm. Al incorporarse a la proteína, el máximo se desplaza a 374 nm, observándose un hombro en torno a los 350 nm. El espectro de emisión se desplaza del verde para el ANS en solución, al azul (máximo a 465 nm) para el ANS unido a la apoMb. El cambio más notable se refiere al rendimiento cuántico de fluorescencia, que aumenta más de 200 veces, así, el rendimiento cuántico del ANS en solución es 0.004 mientras que cuando se une a apoMb su valor es de 0.98 (Stryer, 1965).

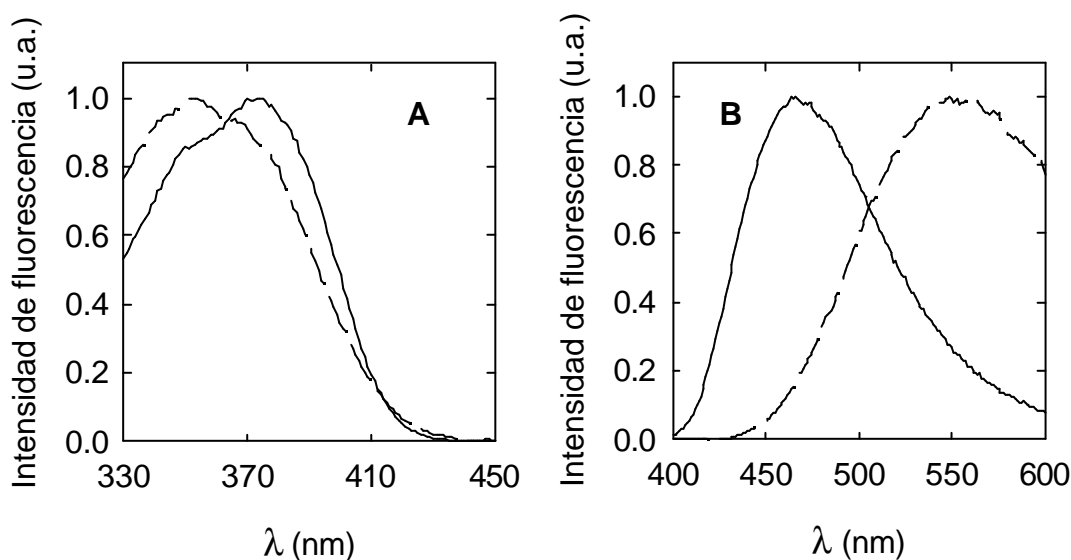
**Marcados covalentes de apoMb y RNasa A.** Todos los marcados covalentes realizados son de tipo no específico, a los grupos amino de los residuos amino terminal y a los residuos de lisina de la proteína (ver *Materiales y Métodos 4.3*). En la *Figura 5.4* se muestran los espectros de absorción de apoMb-FI, apoMb-Alexa 488, apoMb-Alexa 546 y RNasa A-FI, a partir de los cuales se calculó el grado de marcado de cada proteína. La relación molar de marcado obtenida en cada caso (*Tabla 5.1*), depende de las condiciones de la reacción de marcado, así como de las características específicas de cada sonda y proteína.

**Tabla 5.1:** Relación de marcado obtenida para los distintos marcados covalentes de proteína.

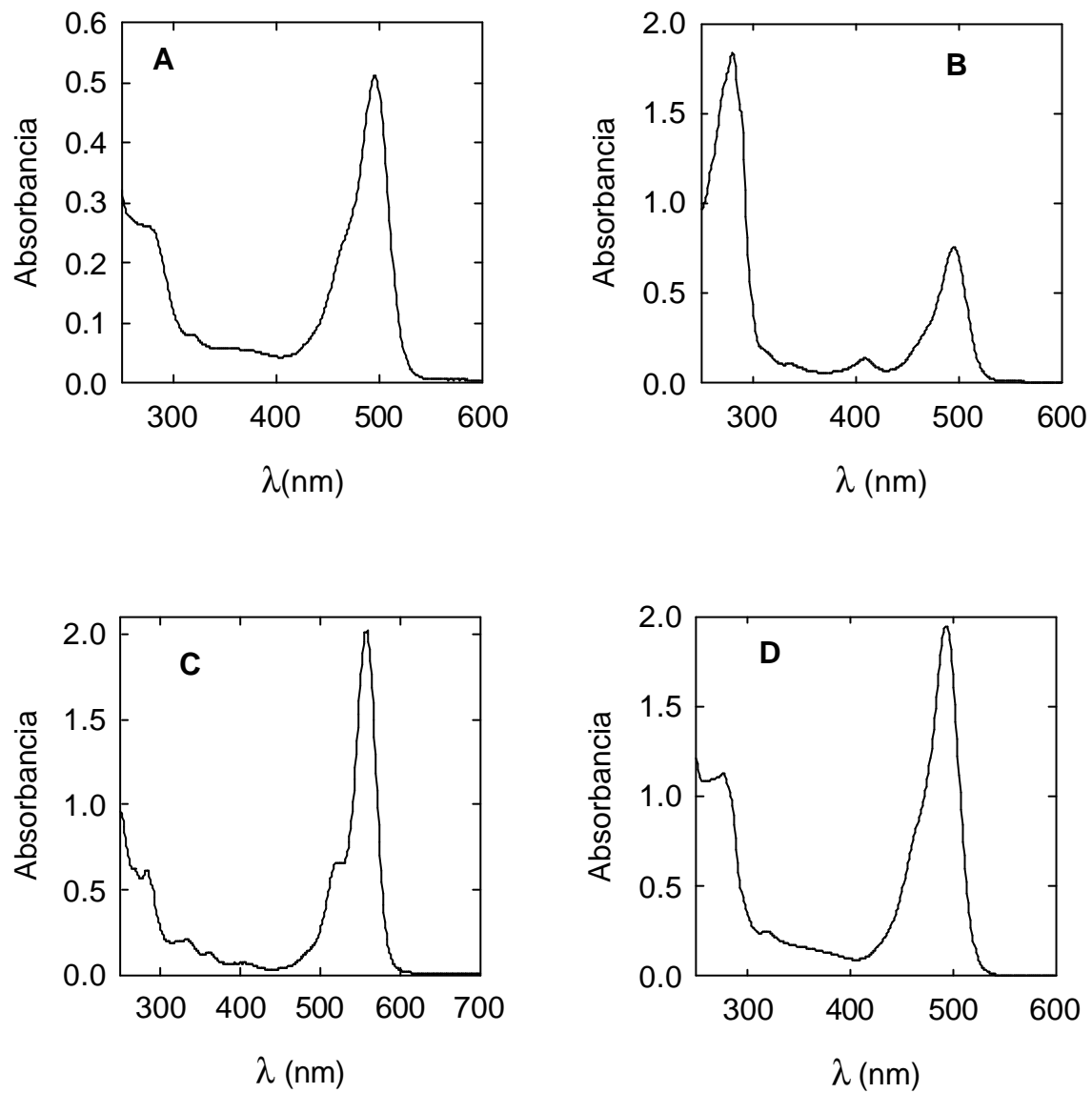
Proteína	Sonda	Moles de sonda / mol de proteína
ApoMb	FITC	1.1
ApoMb	Alexa 488	0.1
ApoMb	Alexa 546	0.8
RNasa A	FITC	0.5



**Figura 5.2:** Espectros de absorción de ANS (- -) en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 y de ANS unido a apoMb ( $\frac{3}{4}$ ) en el mismo tampón. El espectro de ANS en solución corresponde a una concentración  $0.8 \times 10^{-4}$  M. El espectro de apoMb-ANS se obtuvo para una concentración  $10^{-4}$  M de proteína y 0.8 moles de sonda / mol de proteína calculada a partir de la constante de disociación del complejo apoMb-ANS (Stryer, 1965).



**Figura 5.3:** Espectros de excitación (A) y emisión de fluorescencia (B) corregidos y normalizados de ANS en tampón (- -) y de apoMb-ANS ( $\frac{3}{4}$ ) en tampón. El tampón fue fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 y la temperatura, 20 °C. La longitud de onda de excitación para los espectros de emisión fue 375 nm y la de emisión para los espectros de excitación 465 nm.



**Figura 5.4:** Espectros de absorción de apoMb-FI (A), apoMb-Alexa 488 (B), apoMb-Alexa 546 (C) y RNasa A-FI (D) en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4. Los espectros presentados corresponden a una relación de moles de sonda / mol de proteína de 1.1 para ApoMb-FI, 0.1 para ApoMb-Alexa 488, 0.8 para ApoMb-Alexa 546 y 0.5 para RNasa A-FI.

### **5.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ALTA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN SOLUCIÓN (MEDIOS AGLOMERADOS) SOBRE LAS REACCIONES DE ASOCIACIÓN: APOMIOGLOBINA EN PRESENCIA DE RIBONUCLEASA A Y DE ALBÚMINA SÉRICA HUMANA**

En un estudio previo, utilizando técnicas de anisotropía de fluorescencia (Wilf y Minton, 1981) se postula que la apoMb forma dímeros en presencia de altas concentraciones de proteínas no relacionadas como la RNasa A, la lisozima o la beta-lactoglobulina, mientras que concentraciones del mismo orden de diversos polietilenglicoles no dan lugar a dicha dimerización. En esta parte del trabajo, se trató de confirmar y estudiar de forma cuantitativa la dimerización de la apoMb en presencia de altas concentraciones de RNasa A. Por otro lado, también se trató de determinar si altas concentraciones de otra proteína, la HSA, inducen la formación de dímeros de apoMb en solución. En ambos casos se realizó un estudio detallado utilizando técnicas de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos. Para las muestras con alta concentración de RNasa A, dichos estudios se complementaron con experimentos de ultracentrifugación.

#### **5.3.1. Comportamiento hidrodinámico de la apomioglobina en soluciones tampón**

El estudio del estado de asociación de la apoMb en presencia de altas concentraciones de RNasa A y de HSA, se llevó a cabo con soluciones de apoMb marcada con los fluoróforos ANS o fluoresceína. La elección de una u otra sonda para marcar la apoMb se realizó en función de las características de cada sistema, así como del tipo de experimento que se deseaba realizar en cada caso. En este apartado se describe el estudio de las propiedades hidrodinámicas de la apoMb-ANS y de la apoMb-FI en soluciones tampón en ausencia de otras proteínas. Dicho estudio tiene como finalidad comprobar el posible efecto de cada fluoróforo sobre el comportamiento hidrodinámico de la proteína, así como estudiar la equivalencia de apoMb-ANS y apoMb-FI en lo referente a sus conformaciones globales en solución.

En todos los experimentos que se presentan en este apartado se utilizó un tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 y la temperatura 20 °C.

### 5.3.1.1. Caracterización hidrodinámica de la apomioglobina marcada con ANS

El estudio se llevó a cabo con una solución de apoMb-ANS de concentración  $10^{-4}$  M de apoMb, con 0.8 moles de ANS unidos por mol de apoMb. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 393 y 465 nm, respectivamente.

**Decaimiento de intensidad de fluorescencia.** El decaimiento de intensidad de fluorescencia de apoMb-ANS en el tampón indicado (ver *Figura 5.12*), recogido en condiciones de ángulo mágico, se ajustó a una función biexponencial de la forma:

$$I(t) = I(0) \sum_{i=1}^2 a_i \exp(-t/t_i) \quad (5.1)$$

Como resultado del análisis del decaimiento de intensidad de fluorescencia se determinaron dos tiempos de vida media de 15.2 y 3.4 ns con contribuciones del 84 % y 16 % respectivamente. Los tiempos de vida media de fluorescencia promediados por la amplitud y por la intensidad de fluorescencia tienen un valor de 13.3 y 14.7 ns, respectivamente.

**Decaimiento de anisotropía de fluorescencia.** El decaimiento de anisotropía de fluorescencia de apoMb-ANS en tampón (*Figura 5.14*) se ajustó satisfactoriamente a una función monoexponencial de la forma:

$$r(t) = r(0) \exp(-t/\tau) \quad (5.2)$$

El valor de la anisotropía a tiempo cero,  $r(0)$ , obtenido a partir del ajuste,  $0.35 \pm 0.01$ , coincide dentro del error con el valor de la anisotropía intrínseca de la sonda ANS a las longitudes de onda de excitación y emisión del experimento (Hudson y Weber, 1973).

Del análisis del decaimiento se obtiene un único tiempo de correlación rotacional, de valor  $9 \pm 0.2$  ns, que corresponde al movimiento global de la proteína. Esto indica que el ANS, en el sitio de unión de la apoMb, no presenta ningún movimiento segmental.

La anisotropía de estado estacionario determinada para apoMb-ANS en tampón tiene un valor de  $0.134 \pm 0.005$ , para concentraciones totales de apoMb entre  $2 \times 10^{-6}$  M y  $10^{-4}$  M, independientemente de la proporción de ANS.

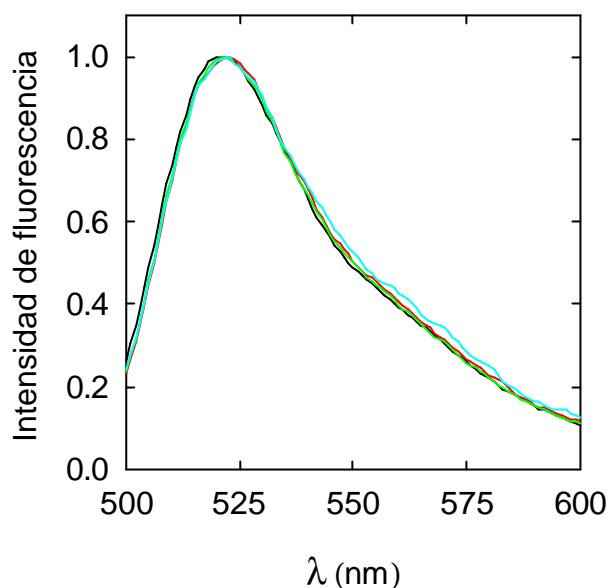
### 5.3.1.2. Caracterización hidrodinámica de la apomioglobina marcada con fluoresceína

El estudio hidrodinámico de la apoMb-FI se llevó a cabo utilizando dos técnicas: espectroscopía de fluorescencia y ultracentrifugación analítica.

#### a. Experimentos de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se realizaron con soluciones de apoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) a las que se añadió apoMb no marcada hasta completar la concentración total de apoMb necesaria para cada muestra ( $2 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  M). Las longitudes de onda de excitación y emisión en estos experimentos fueron 460 y 520 nm respectivamente. La contribución a la intensidad de fluorescencia del grupo hemo residual no eliminado en la preparación de apoMb, menor del 1 % para la muestra de mayor concentración de apoMb, fue restada en todos los experimentos.

**Espectros de emisión de fluorescencia.** No se han observado diferencias ni en la forma ni en la intensidad de los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para muestras con una concentración total de apoMb  $2 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M. Sin embargo, para la muestra de apoMb  $10^{-3}$  M, la intensidad de fluorescencia disminuye aproximadamente un 50 % respecto de los valores observados a concentraciones menores o iguales que  $10^{-4}$  M, produciéndose además un muy ligero ensanchamiento en la zona roja del espectro de emisión, como se puede observar en la *Figura 5.5*.



**Figura 5.5:** Espectros de emisión de fluorescencia corregidos y normalizados de apoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de apoMb no marcada para una concentración total de apoMb  $2 \times 10^{-6}$  M (línea negra),  $10^{-5}$  M (rojo),  $10^{-4}$  M (verde) y  $10^{-3}$  M (azul). La longitud de onda de excitación fue 460 nm. Los espectros se determinaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

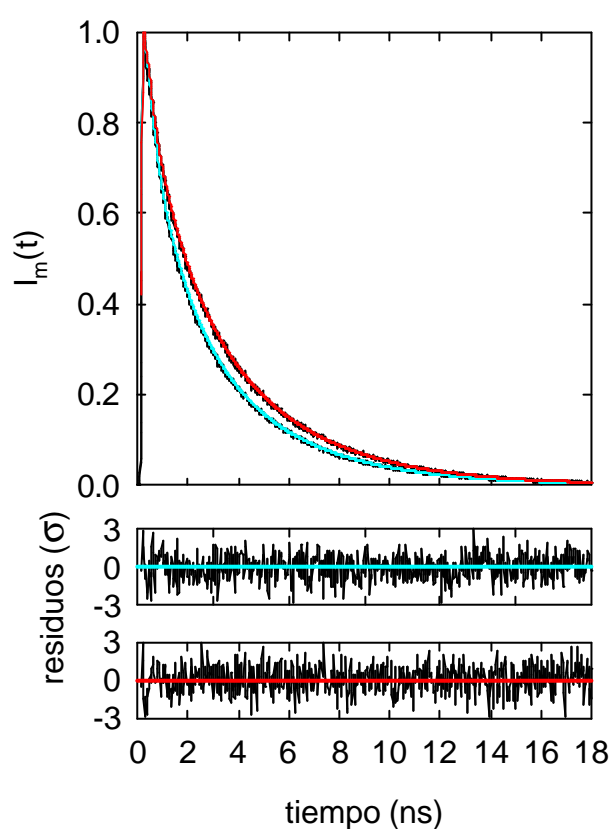
**Decaimientos de intensidad de fluorescencia.** Los decaimientos de intensidad de fluorescencia obtenidos para estas soluciones de apoMb-FI (Figura 5.6), fueron ajustados satisfactoriamente a un modelo de tres exponenciales, de la forma:

$$I(t) = I(0) \sum_{i=1}^3 a_i \exp(-t/t_i) \quad (5.3)$$

El comportamiento multiexponencial de los decaimientos de fluorescencia se puede explicar por la posibilidad de que el fluoróforo fluoresceína se encuentre en diferentes entornos en la proteína. En la *Tabla 5.2* se muestran los tiempos de vida media de fluorescencia  $t_i$  y sus factores preexponenciales  $a_i$ , así como los tiempos de vida media promediados por la amplitud ( $\langle t \rangle_1$ ) o por la intensidad de fluorescencia ( $\langle t \rangle_2$ ) en función de la concentración total de apoMb. Como se puede observar, los tres tiempos de vida media son esencialmente iguales, dentro del error, para todas las muestras. La contribución de los tres tiempos de vida media, así como los tiempos de vida media promedio, son los mismos para las muestras con una concentración total



de apoMb  $2 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M. Sin embargo, para la muestra de concentración total de apoMb  $10^{-3}$  M, se observa un incremento de la contribución de los tiempos de vida media más cortos con respecto a las muestras menos concentradas, lo que da lugar a una disminución significativa en los tiempos de vida media de fluorescencia promedio obtenidos.



**Figura 5.6:** Decaimientos normalizados de la intensidad de fluorescencia de apoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de apoMb no marcada para una concentración total de apoMb  $2 \times 10^{-6}$  M (rojo) y  $10^{-3}$  M (azul). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm, respectivamente. Los decaimientos de muestras de apoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de apoMb no marcada para una concentración total de apoMb  $10^{-5}$  M y  $10^{-4}$  M se superponen con el presentado para apoMb  $2 \times 10^{-6}$  M. La resolución temporal fue 13.1 ps / canal. Los decaimientos se recogieron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

**Tabla 5.2:** Parámetros de los decaimientos de intensidad de fluorescencia y tiempos de vida media de fluorescencia promedio de muestras de apoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de apoMb no marcada para una concentración total de apoMb  $2 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  M. Los factores preexponenciales  $a_i$  están normalizados. Los tiempos de vida media promediados por la amplitud  $\langle t \rangle_1$  y por la intensidad de fluorescencia  $\langle t \rangle_2$  se calcularon utilizando las ecuaciones (3.3) y (3.4) respectivamente (ver Fundamento Teórico 3.1.1). Los errores se calcularon para un nivel de confianza del 67 %. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

Concentración de apoMb (M)	$a_1$	$t_1$ (ns)	$a_2$	$t_2$ (ns)	$a_3$	$t_3$ (ns)	$c^2$	$\langle t \rangle_1$ (ns)	$\langle t \rangle_2$ (ns)
	$\pm 0.02$	$\pm 0.1$	$\pm 0.02$	$\pm 0.3$	$\pm 0.02$	$\pm 0.05$			
$2 \times 10^{-6}$	0.23	0.2	0.23	1.2	0.54	3.81	1.06	2.4	3.4
$10^{-5}$	0.23	0.3	0.24	1.4	0.53	3.88	1.09	2.5	3.5
$10^{-4}$	0.22	0.3	0.26	1.5	0.52	3.88	1.03	2.5	3.4
$10^{-3}$	0.28	0.3	0.31	1.4	0.41	3.83	1.02	2.1	3.2

La fluoresceína es un fluoróforo que puede encontrarse en distintos estados de ionización (forma protonada, forma neutra, forma monoaniónica y forma dianiónica) dependiendo del pH del medio (Sjöback et al, 1995; Klonis y Sawyer, 1996). En nuestras condiciones de pH el fluoróforo fluoresceína, accesible al disolvente, se encuentra en principio como una mezcla de las especies monoaniónica y dianiónica, con propiedades espectroscópicas muy diferentes y con proporciones que vendrían dadas por la constante de disociación de la fluoresceína,  $pK_a = 6.4$  (Sjöback et al, 1995; Klonis y Sawyer, 1996). Los tiempos de vida media de fluorescencia  $t_1$  y  $t_2$  determinados para las muestras de apoMb-FI estudiadas, son menores que los que cabría esperar para el monoanión (~3 ns) y el dianión (~4 ns) de fluoresceína en solución (Klonis y Sawyer, 1996), lo que indica que existe una fracción de moléculas de fluoresceína en un entorno que desactiva su emisión de fluorescencia. En las muestras de concentración total de apoMb  $10^{-3}$  M, se observa un ligero aumento de las proporciones de los tiempos de vida media de fluorescencia  $t_1$  y  $t_2$ , junto con una fuerte disminución en la intensidad de fluorescencia determinada en estado estacionario, con respecto a muestras de menor concentración total de apoMb. Estas dos diferencias podrían estar indicando un cambio en el microentorno de la

fluoresceína y, probablemente, en la conformación global de la apoMb e, incluso, en su estado de asociación, a concentraciones mayores o iguales que  $10^{-3}$  M, de tal modo que se desactiva la emisión de fluorescencia bien por un mecanismo colisional o bien por la formación de complejos no emisores en el estado fundamental.

### **Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal.**

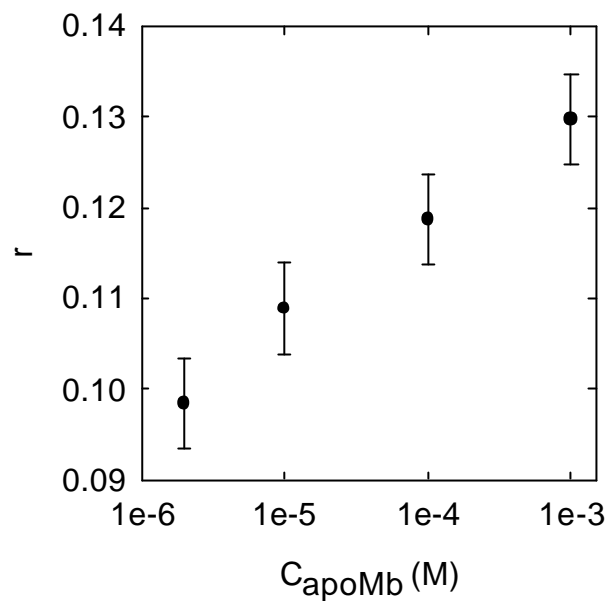
Se observó un aumento de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario de las muestras de apoMb-FI en presencia de apoMb, al aumentar la concentración total de apoMb (*Figura 5.7*).

En la *Figura 5.8* se muestran los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de apoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de distintas concentraciones totales de apoMb. Dichos decaimientos, fueron ajustados a una función biexponencial, correspondiente a la superposición de dos movimientos independientes:

$$r(t) = r(0) [b_L \exp(-t/f_L) + b_G \exp(-t/f_G)] \quad (5.4)$$

donde  $r(0)$  es la anisotropía a tiempo cero,  $f_L$  y  $f_G$  son los tiempos de correlación rotacional que se asocian al movimiento local de la fluoresceína y a la rotación global de la molécula de apoMb-FI, respectivamente.  $b_L$  y  $b_G$  son las amplitudes fraccionales correspondientes.

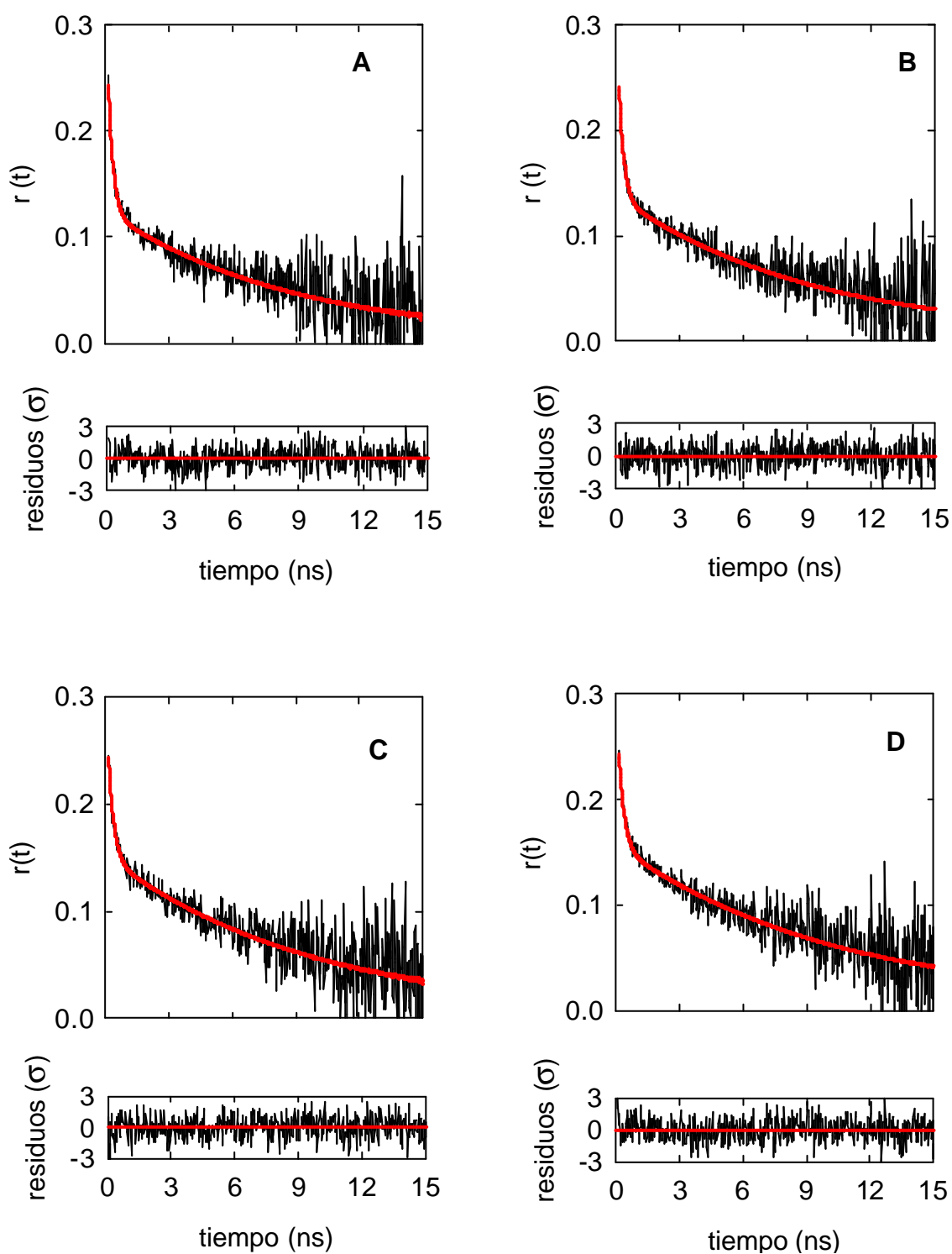
El valor de  $r(0)$  obtenido para todas las muestras fue 0.25. El valor de la anisotropía fundamental  $r_0$  de la fluoresceína es  $r_0 = 0.4$  para la longitud de onda de excitación de estos experimentos (Chen y Bowman, 1965). La gran diferencia entre este valor teórico de  $r_0$  y el determinado experimentalmente,  $r(0)$ , indica la posible presencia de componentes rápidas de despolarización ( $< 50$  ps) no resueltas en el experimento.



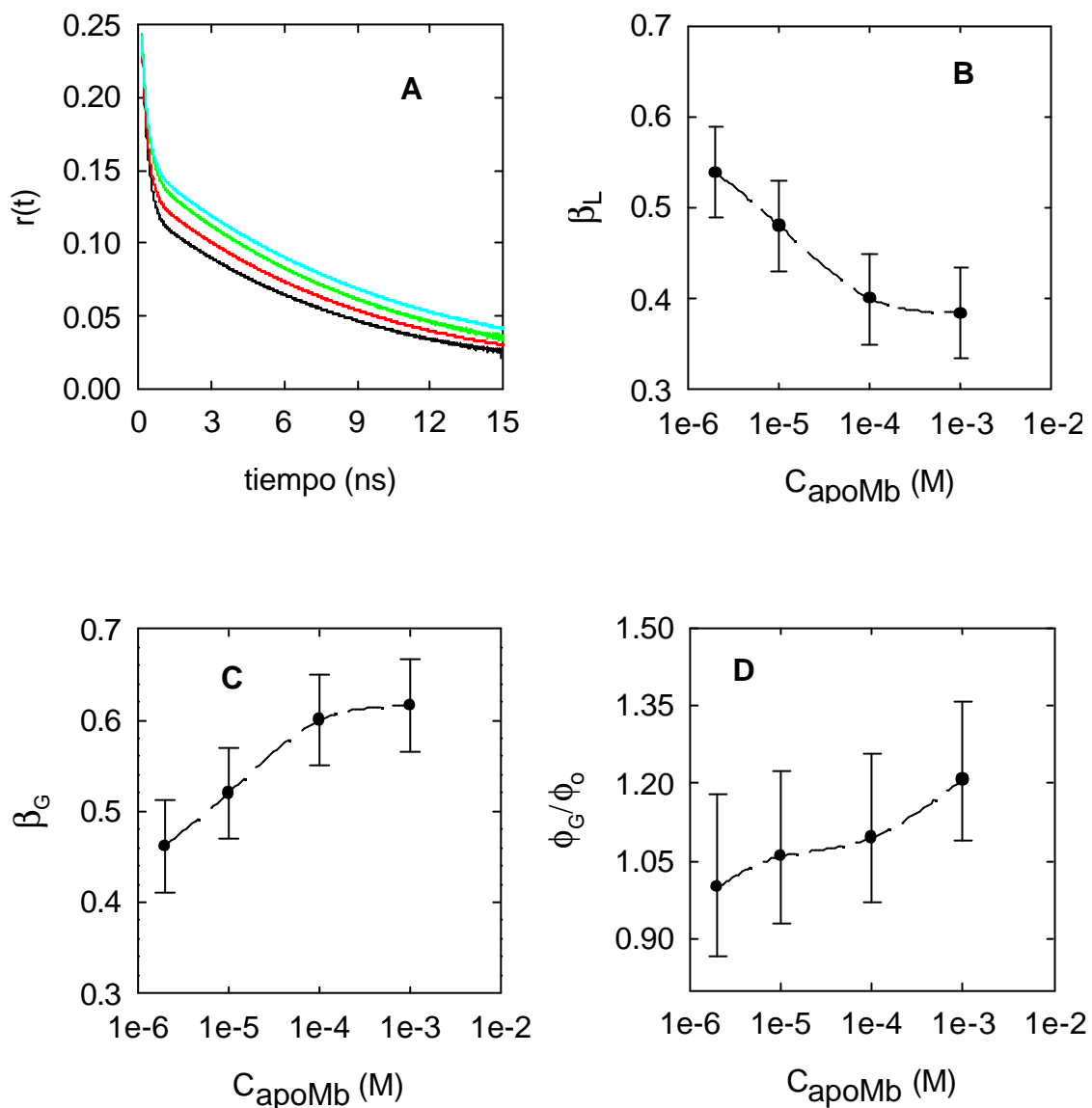
**Figura 5.7:** Anisotropía en estado estacionario de apoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) en presencia de apoMb no marcada en función de la concentración total de apoMb (marcada y no marcada). La escala del eje de abscisas se ha puesto en forma logarítmica. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

**Tabla 5.3:** Parámetros de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de muestras de apoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de apoMb no marcada para distintas concentraciones totales de apoMb (marcada y no marcada). El valor de  $r(0)$  fue 0.25. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4. Las amplitudes fraccionales están normalizadas. Los errores se calcularon para un nivel de confianza del 67 %.

Concentración de apoMb (M)	$b_L$ $\pm 0.05$	$f_L$ (ns) $\pm 0.1$	$b_G$ $\pm 0.05$	$f_G$ (ns) $\pm 1.3$	$c^2$
$2 \times 10^{-6}$	0.54	0.2	0.46	9.1	1.07
$10^{-5}$	0.48	0.2	0.52	9.6	1.07
$10^{-4}$	0.40	0.2	0.60	9.9	1.08
$10^{-3}$	0.38	0.2	0.62	11.0	1.10



**Figura 5.8:** Decaimientos de anisotropía de fluorescencia de apoMb-FI  $2 \times 10^6$  M en presencia de apoMb no marcada para una concentración total de apoMb (marcada y no marcada) de  $2 \times 10^6$  M (A),  $10^5$  M (B),  $10^4$  M (C) y  $10^3$  M (D). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. La resolución temporal fue 13.1 ps / canal. Los decaimientos se obtuvieron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.



**Figura 5.9:** Representación de los parámetros de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de muestras de apoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de apoMb no marcada en función de la concentración total de apoMb (marcada y no marcada). A: Comparación de los ajustes de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de muestras de apoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de apoMb no marcada para una concentración total de apoMb  $2 \times 10^{-6}$  M (línea negra),  $10^{-5}$  M (rojo),  $10^{-4}$  M (verde) y  $10^{-3}$  M (azul). B y C: Variación de la contribución fraccional del movimiento local de la fluoresceína ( $b_L$ ) y del movimiento global de la apoMb-FI ( $b_G$ ) al decaimiento de anisotropía con la concentración total de apoMb. D: Variación del tiempo de correlación rotacional global, normalizado por su valor a concentración total de apoMb  $2 \times 10^{-6}$  M ( $\phi_0$ ), con la concentración total de apoMb. En las figuras B, C y D la escala de concentraciones de apoMb está en forma logarítmica. Los decaimientos se obtuvieron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

La contribución del movimiento segmental de la molécula de fluoresceína ( $b_L$ ) a la despolarización de la fluorescencia va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración total de apoMb en la solución (*Tabla 5.3* y *Figura 5.9*). El valor promedio del ángulo  $q$  en el que difundiría la sonda, se calculó para cada concentración de apoMb utilizando la ecuación (3.24) (ver *Fundamento Teórico 3.1.2.5*). Los valores estimados para este ángulo oscilan entre los 37 y los 30 grados para muestras de concentración total de apoMb  $2 \times 10^{-6}$  y  $10^{-3}$  M respectivamente, lo que estaría indicando un muy ligero aumento de la restricción del movimiento de la sonda a medida que aumenta la concentración total de apoMb, que explicaría el aumento que se observa en la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario con la concentración de proteína.

Como se puede observar en la *Tabla 5.3*, el tiempo de correlación rotacional asociado a la oscilación independiente de la sonda permanece constante dentro del error para todas las muestras, mientras que el correspondiente al movimiento global va aumentando sensiblemente a medida que aumenta la concentración total de apoMb (*Figura 5.9*). En principio, la variación del  $f_G$  podría deberse a varios factores, entre los que se puede mencionar un cambio conformacional, una autoasociación de la apoMb o bien la combinación de ambos.

El valor del tiempo de correlación rotacional determinado para apoMb-ANS para una concentración de apoMb  $10^{-4}$  M (9 ns) es compatible con la forma monomérica de la apoMb. Por tanto, el ligero aumento en la anisotropía de estado estacionario y en el valor de  $f_G$  observado para las muestras de concentración total de apoMb menor o igual que  $10^{-4}$  M, podrían ser el resultado de pequeños cambios conformacionales, que llevarían asociados cambios locales en el microentorno de la fluoresceína, proporcionando un entorno más restringido al fluoróforo.

El comportamiento de la muestra de concentración total de apoMb  $10^{-3}$  M se diferencia del correspondiente a concentraciones totales de apoMb menores. En este caso, además del cambio conformacional de la apoMb, el aumento en el tiempo de correlación rotacional global determinado, parecería indicar la presencia de fracciones de agregados, probablemente dímeros, de apoMb en una proporción menor del 15 %.

## b. Experimentos de ultracentrifugación analítica

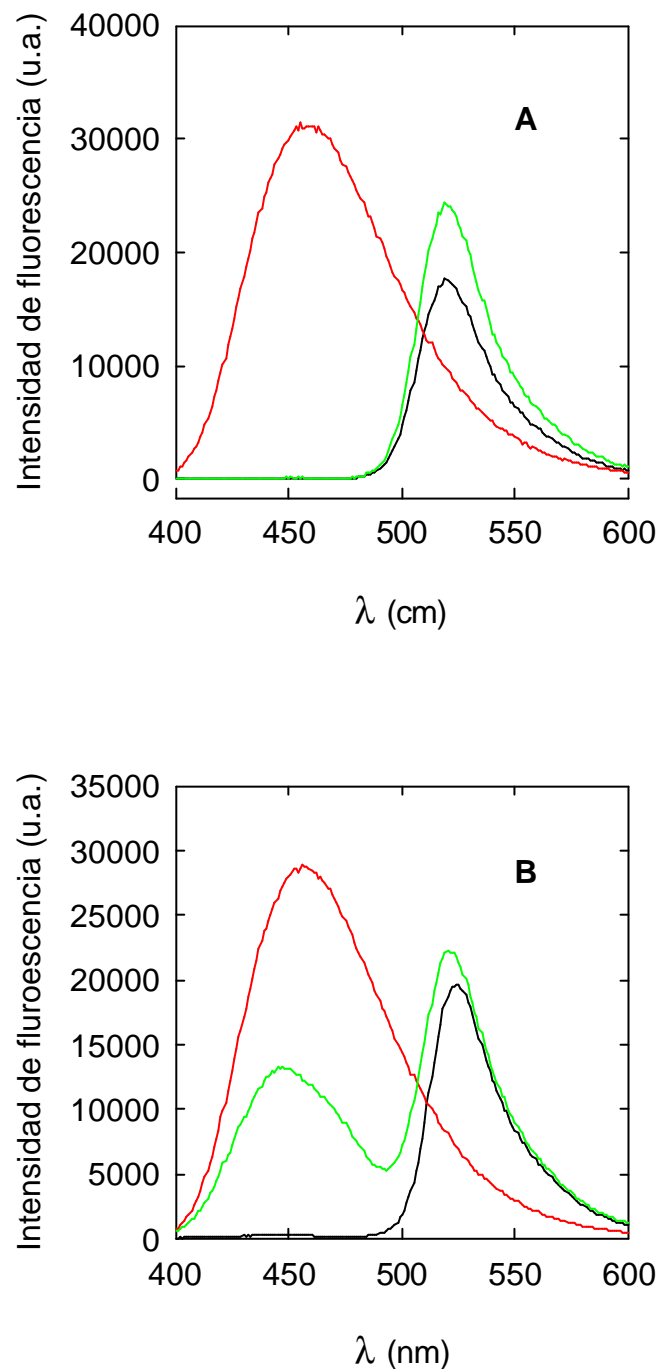
Se realizaron experimentos de ultracentrifugación analítica con las mismas muestras de apoMb de concentraciones  $2 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M, con y sin apoMb-FI como trazador ( $2 \times 10^{-6}$  M). Las muestras se centrifugaron a 22000 rpm a una temperatura de 20 °C hasta alcanzar el equilibrio. El ajuste de los datos experimentales se realizó tomando como volumen específico parcial de la apoMb  $0.74 \text{ cm}^3/\text{g}$  (Van Den Oord et al, 1969) y para la densidad de la solución  $1.007 \text{ g/mL}$  (calculado con el programa SEDNTERP (obtenido del servidor de RASMB, Laue et al, 1992). Los valores obtenidos para las masas moleculares fueron del orden de  $17500 \pm 2000$ , donde el error se ha estimado a partir de los valores obtenidos para distintas preparaciones. No hay grandes diferencias entre las masas moleculares promedio obtenidas para muestras marcadas y sin marcar y tampoco se observa ningún cambio apreciable al aumentar la concentración de apoMb.

### 5.3.1.3. Estudio comparativo de las conformaciones globales de apoMb-FI y apoMb-ANS

Los experimentos de anisotropía de fluorescencia y de ultracentrifugación presentados en este trabajo, se han realizado con apoMb-FI o con apoMb-ANS según resultara más conveniente para cada sistema. Resulta importante, por tanto, comprobar en la medida de lo posible si las moléculas de apoMb-FI y apoMb-ANS presentan características estructurales similares.

Como ya se ha visto, a concentración  $10^{-4}$  M, apoMb, apoMb-ANS y apoMb-FI permanecen en estado monomérico (ver *Resultados 5.3.1.1 y 5.3.1.2*). Sin embargo, queda por comprobar si la unión covalente de la fluoresceína da lugar a cambios conformacionales locales en la apoMb. Uno de los aspectos que se ha comprobado es si la presencia de fluoresceína unida covalentemente a la proteína altera la afinidad de la apoMb por la molécula de ANS. Si la apoMb-FI mantuviera la capacidad de unión de ANS, esto estaría indicando la conservación de la estructura de la apoMb en la apoMb-FI, al menos en lo que respecta al sitio hidrofóbico de unión del ANS.





**Figura 5.10.** A: Espectros de emisión de fluorescencia de apoMb  $5 \times 10^{-6}$  M con ANS  $4 \times 10^{-5}$  M (rojo), apoMb-FI  $5 \times 10^{-6}$  M (línea negra) y apoMb-FI  $5 \times 10^{-6}$  M con ANS  $4 \times 10^{-5}$  M (verde). B: Espectros de emisión de fluorescencia de apoMb  $2.5 \times 10^{-5}$  M con ANS  $2.5 \times 10^{-5}$  M (rojo), apoMb-FI  $2.5 \times 10^{-5}$  M con ANS  $2.5 \times 10^{-5}$  M (línea negra) y apoMb-FI  $2.5 \times 10^{-5}$  M con ANS  $2.5 \times 10^{-5}$  M y apoMb  $2.5 \times 10^{-5}$  M (verde). La longitud de onda de excitación fue 393 nm. Los espectros se tomaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

En la *Figura 5.10* se muestran los espectros de emisión de fluorescencia con longitud de onda de excitación 393 nm de una solución de apoMb-FI a la que se ha añadido ANS. Como se puede observar, no aparece ninguna banda de emisión en la zona en la que emitiría el ANS unido a apoMb (máximo en torno a 465 nm), mientras que la banda de emisión de fluoresceína unida a apoMb experimenta un ligero incremento con respecto a la correspondiente a la apoMb-FI en ausencia de ANS. La ausencia de emisión de fluorescencia en la zona de la apoMb-ANS tendría en principio dos explicaciones, podría ser que la apoMb-FI no uniera ANS o bien que la apoMb-FI uniera ANS pero no se observara su emisión debido a un proceso de transferencia de energía entre el ANS y la fluoresceína, proceso que se ha observado anteriormente en apoHb marcada con fluoresceína (Sassaroli, 1984).

Los espectros de emisión del ANS y de excitación de la fluoresceína presentan un considerable solapamiento y, aunque la fluoresceína está distribuida al azar en la apoMb, la distancia entre el ANS y la fluoresceína no puede ser mayor que el diámetro de la apoMb, aproximadamente igual que el de la Mb que tiene un valor de 3.5 nm (Papadopoulos S, 2000). Como la distancia de Förster,  $R_0$ , para la pareja ANS - fluoresceína es del orden de 5 nm (Sassaroli, 1984), se podría esperar que el proceso de transferencia de energía fuera muy efectivo. El hecho de que la desaparición de la emisión del ANS venga acompañada de un aumento de la emisión de la fluoresceína, respecto de soluciones de la misma concentración de apoMb-FI en ausencia de ANS, apoyaría la hipótesis de la transferencia de energía.

Para poder distinguir entre las dos posibilidades propuestas, ausencia de unión de ANS por parte de la apoMb-FI o bien transferencia de energía entre ANS y fluoresceína, se preparó una solución de apoMb-FI  $2.5 \times 10^{-5}$  M en presencia de ANS a la misma concentración y se añadió apoMb hasta una concentración  $2.5 \times 10^{-5}$  M. El espectro de emisión de fluorescencia de dicha solución a una longitud de onda de excitación de 393 nm se muestra en la *Figura 5.10*. En el caso de que la apoMb-FI no uniera ANS, el fluoróforo se encontraría en su totalidad en forma libre en la solución inicial de apoMb-FI y ANS, de modo que al añadir apoMb se produciría la formación de complejo apoMb-ANS en una concentración  $2.4 \times 10^{-5}$  M de acuerdo con la constante de disociación del complejo apoMb-ANS de  $3.4 \times 10^{-6}$  M (Stryer, 1965). Si, por el contrario, la apoMb-FI uniera ANS con una constante de unión comparable a la de la apoMb, entonces el ANS se repartiría por igual entre la apoMb-FI y la apoMb, de modo que tendríamos una concentración de ANS-apoMb-FI de  $1.2 \times 10^{-5}$  M y de apoMb-ANS de  $1.2 \times 10^{-5}$  M. Como se puede ver en la *Figura 5.10*, la emisión de fluorescencia de la

muestra a 465 nm con longitud de onda de excitación 393 nm, es la que correspondería a una solución de concentración de apoMb-ANS  $1.2 \times 10^{-5}$  M. Por lo tanto, parece que la apoMb-FI une ANS con una constante de unión similar a la de la apoMb y, además, el proceso de transferencia de energía entre el ANS y la fluoresceína dentro de la ANS-apoMb-FI es muy efectivo. La pequeña deformación del espectro de emisión de fluorescencia que se observa en la zona del ANS (máximo hacia 465 nm) se debe a un efecto de filtro interno de emisión, como consecuencia del solapamiento de los espectros de emisión del ANS y de excitación de la fluoresceína y de la elevada absorción de la muestra en la zona de la fluoresceína (máximo en torno a 495 nm).

Por otro lado, es de destacar que la emisión de fluorescencia de una solución de apoMb-FI con ANS cuando se excita a 520 nm es de la misma intensidad que la de una muestra de la misma concentración de apoMb-FI pero sin ANS. A 520 nm absorbe la fluoresceína pero no el ANS, de modo que la emisión se debe únicamente a la fluoresceína.

### **5.3.2. Estudio del Estado de asociación de la apomioglobina en presencia de altas concentraciones de ribonucleasa A**

Estudios previos de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario de apoMb en presencia de altas concentraciones de RNasa A, han sido interpretados en términos de capacidad de dimerización de la apoMb, tendencia que parece ir en aumento a medida que se incrementa la concentración de RNasa A (Wilf & Minton, 1981). El objetivo principal de esta parte del trabajo ha sido desarrollar la metodología de polarización de fluorescencia resuelta en el tiempo para el estudio de interacciones en medios complejos, en concreto de la autoasociación de la apoMb en presencia de altas concentraciones de RNasa A. Para ello se realizaron experimentos de fluorescencia con muestras de apoMb-ANS y de apoMb-FI en soluciones de altas concentraciones de RNasa A. De forma paralela, se realizaron experimentos de equilibrio de sedimentación de muestras de alta concentración de RNasa A en ausencia de apoMb, con el fin de estudiar su estado de asociación a distintas concentraciones.

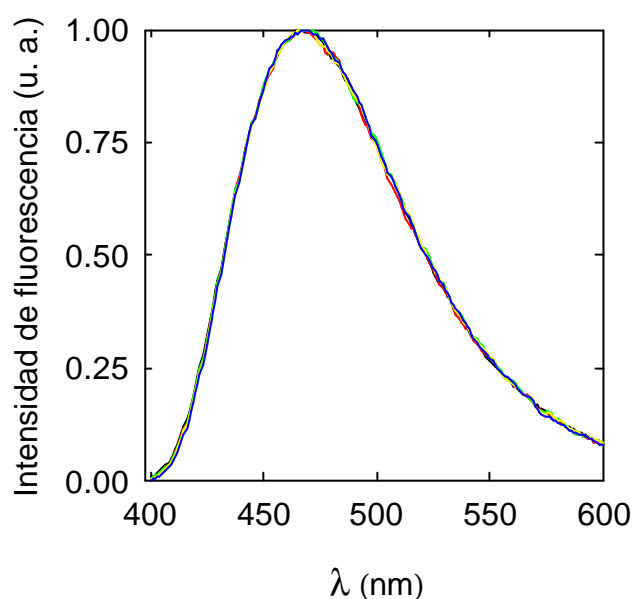
#### **5.3.2.1. Experimentos de fluorescencia con apomioglobina marcada con ANS**

Estos experimentos de fluorescencia se realizaron con muestras de apoMb-ANS en presencia de distintas concentraciones de RNasa A desde 0 a 250 mg/mL. La concentración de apoMb en estas muestras fue en todos los casos  $10^{-4}$  M (1.7 mg/mL) con 0.8 moles de ANS por mol de apoMb. Las muestras se equilibraron después de su preparación durante un mínimo de 30 minutos. El tiempo necesario para el equilibrado de estas soluciones se comprobó mediante medidas sucesivas de anisotropía en estado estacionario a distintos tiempos.

A la emisión de fluorescencia obtenida para cada muestra se le restó la correspondiente a una solución de RNasa A de la misma concentración en presencia de apoMb  $10^{-4}$  M no marcada (fondo). La contribución del fondo fue menor del 4 % de la intensidad total para la muestra de mayor concentración de RNasa A (250 mg/mL).

Las longitudes de onda de excitación y emisión para estos experimentos fueron 393 y 465 nm respectivamente. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 y la temperatura 20° C.

**Espectros de emisión de fluorescencia.** La forma de los espectros de emisión de fluorescencia de las muestras es similar para todas las concentraciones estudiadas de RNasa A como se puede ver en la *Figura 5.11*. Sin embargo, se observa una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida a medida que aumenta la concentración de RNasa A, que en cualquier caso no supera el 10 % para 250 mg/mL de RNasa A.

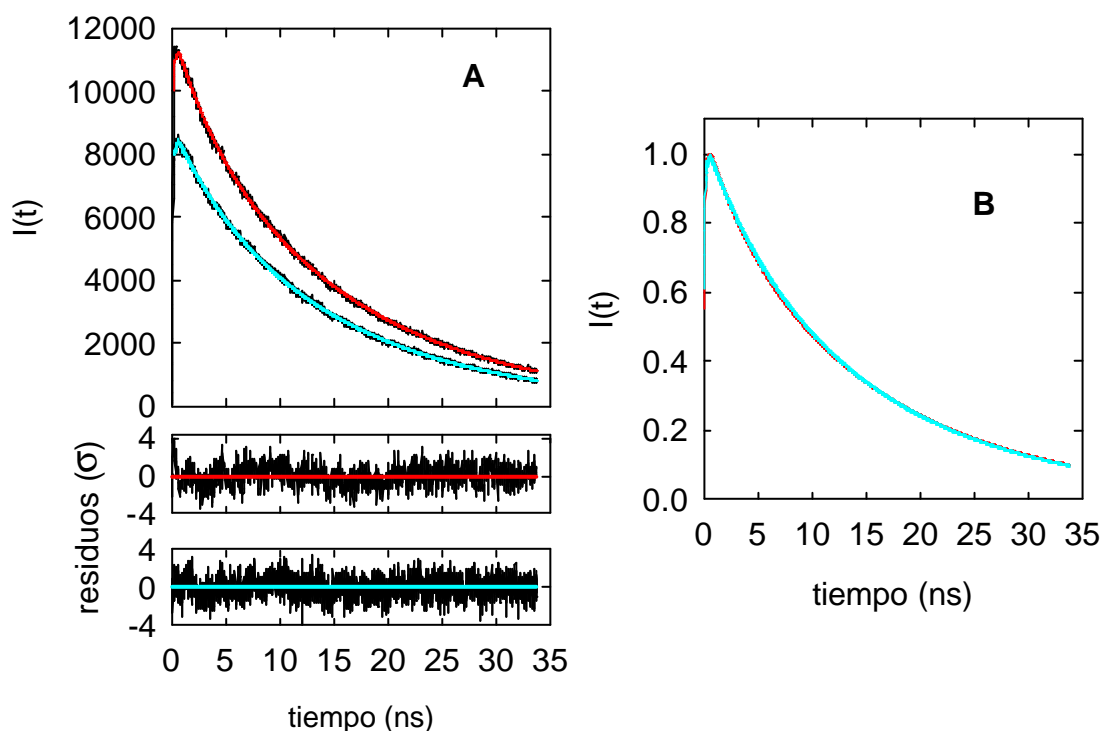


**Figura 5.11:** Espectros de emisión de fluorescencia corregidos y normalizados de muestras de apoMb-ANS (apoMb  $10^{-4}$  M con 0.8 moles de ANS / mol de apoMb) en presencia de distintas concentraciones de RNasa A (0, 50, 100, 150, 225, 250 mg/mL). La longitud de onda de excitación fue 393 nm. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

**Decaimientos de intensidad de fluorescencia.** Los decaimientos de la intensidad de fluorescencia (*Figura 5.12*) recogidos para muestras de apoMb-ANS en presencia de RNasa A se ajustaron a una función biexponencial de la forma:

$$I(t) = I(0) \sum_{i=1}^2 a_i \exp(-t/t_i) \quad (5.5)$$

El análisis individual de los decaimientos obtenidos para cada concentración de RNasa A proporcionó dos tiempos de vida media de fluorescencia, uno más largo en torno a 15 ns y otro más corto en torno a 3-5 ns, dependiendo de la concentración de RNasa A. Debido a esta similitud en los tiempos de vida media se realizaron dos intentos de análisis global de todos los decaimientos: uno en el que los dos tiempos de vida media se suponían iguales para todas las muestras y otro en el que sólo el tiempo de vida media más largo se suponía igual para todas las muestras. El análisis más satisfactorio fue este último, en el que el tiempo de vida media más largo es idéntico para todas las concentraciones de RNasa A. Como se puede ver en la *Tabla 5.4*, el tiempo de vida media de fluorescencia más corto aumenta ligeramente al aumentar la concentración de RNasa A, aunque su contribución es muy pequeña de modo que el tiempo de vida media de fluorescencia promedio se mantiene constante dentro del error para las distintas concentraciones de RNasa A.

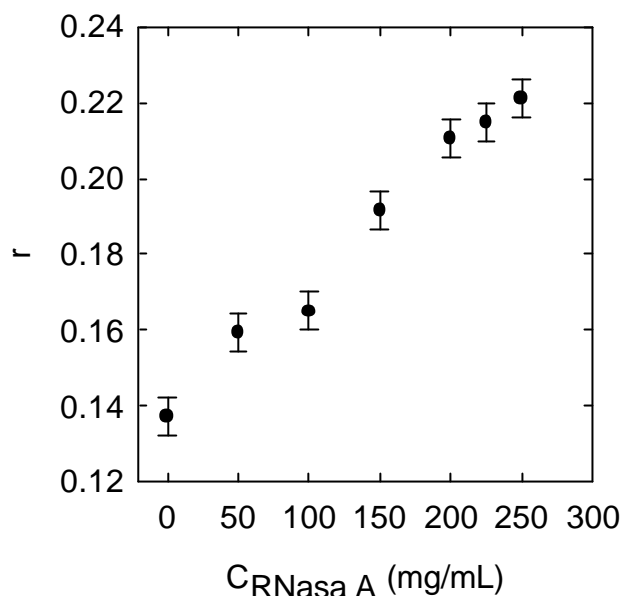


**Figura 5.12** : Decaimientos de intensidad de fluorescencia de apoMb-ANS (apoMb  $10^{-4}$  M con 0.8 moles de ANS / mol de apoMb) en ausencia de RNasa A (rojo) y en presencia de 250 mg/mL de RNasa A (azul) normalizados (B) y sin normalizar (A). La resolución temporal fue de 12.2 ps / canal. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

**Tabla 5.4:** Parámetros de los decaimientos de intensidad de fluorescencia y tiempos de vida media de fluorescencia promedio de muestras de ApoMb-ANS (apoMb  $10^{-4}$  M y 0.8 moles de ANS / mol de apoMb) en presencia de distintas concentraciones de RNasa A (0-250 mg/mL). Los resultados presentados corresponden a un análisis global de los decaimientos de intensidad de fluorescencia en el que la vida media larga se ha considerado igual para todas las muestras. Los factores preexponenciales  $a_i$  están normalizados. Los tiempos de vida media promediados por la amplitud  $\langle t \rangle_1$  y por la intensidad de fluorescencia  $\langle t \rangle_2$  se calcularon utilizando las ecuaciones (3.3) y (3.4) respectivamente (ver Fundamento Teórico 3.1.1). Los errores se calcularon para un nivel de confianza del 67 %. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 393 y 465 nm respectivamente. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

Concentración de RNasa A (mg/mL)	$a_1$ $\pm 0.02$	$t_1$ (ns) $\pm 0.3$	$a_2$ $\pm 0.02$	$t_2$ (ns) $\pm 0.1$	$\langle t \rangle_1$ (ns)	$\langle t \rangle_2$ (ns)
0	0.16	3.4	0.84	15.2	13.3	14.7
50	0.15	3.5	0.85	15.2	13.4	14.7
100	0.14	3.6	0.86	15.2	13.6	14.8
150	0.15	4.0	0.85	15.2	13.5	14.7
225	0.16	5.5	0.84	15.2	13.6	14.6
250	0.15	5.5	0.85	15.2	13.7	14.6

**Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario.** Los valores de la anisotropía de estado estacionario de muestras de apoMb en presencia de distintas concentraciones de RNasa A se muestran en la *Figura 5.13*. Para longitudes de onda de excitación y emisión 375 y 465 nm, respectivamente, los valores de anisotropía de estado estacionario obtenidos coinciden con los publicados previamente (Wilf y Minton, 1981). A medida que se incrementa la concentración de RNasa A se produce un aumento de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario. En principio, este aumento podría deberse a varios factores, un aumento en la viscosidad del sistema, una tendencia a la autoasociación de la apoMb, una tendencia a la asociación entre la apoMb y la RNasa A al aumentar la concentración de RNasa A, o bien a la combinación de dos o más de estos factores.



**Figura 5.13** : Variación de la anisotropía en estado estacionario de muestras de apoMb-ANS (apoMb  $10^{-4}$  M con 0.8 moles de ANS por mol de apoMb) con la concentración de RNasa A a longitudes de onda de excitación y emisión 393 y 465 nm respectivamente. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

**Decaimientos de anisotropía de fluorescencia.** Con el fin de obtener más información sobre el comportamiento hidrodinámico de las especies presentes en el sistema, se realizaron experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal. Los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de muestras de apoMb-ANS con RNasa A (Figura 5.14) se ajustaron a un modelo de dos exponenciales de la forma:

$$r(t) = r(0)[b_1 \exp(-t/f_1) + b_2 \exp(-t/f_2)] \quad (5.6)$$

Donde  $f_1$  y  $f_2$  son los tiempos de correlación rotacional correspondientes a la especie o especies fluorescentes presentes en la disolución y  $b_1$  y  $b_2$  las amplitudes fraccionales correspondientes a cada movimiento.

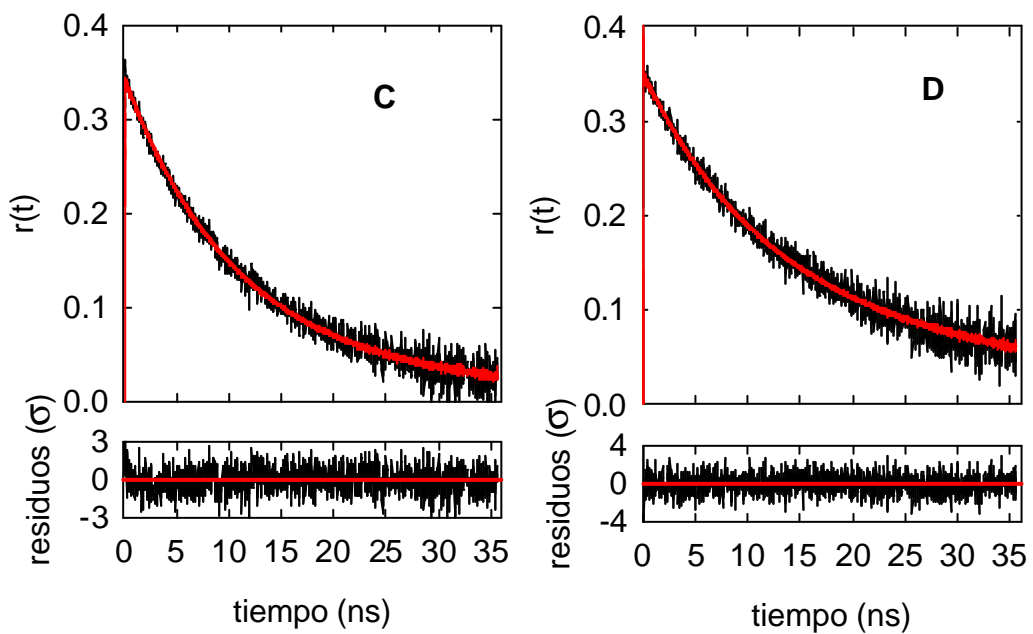
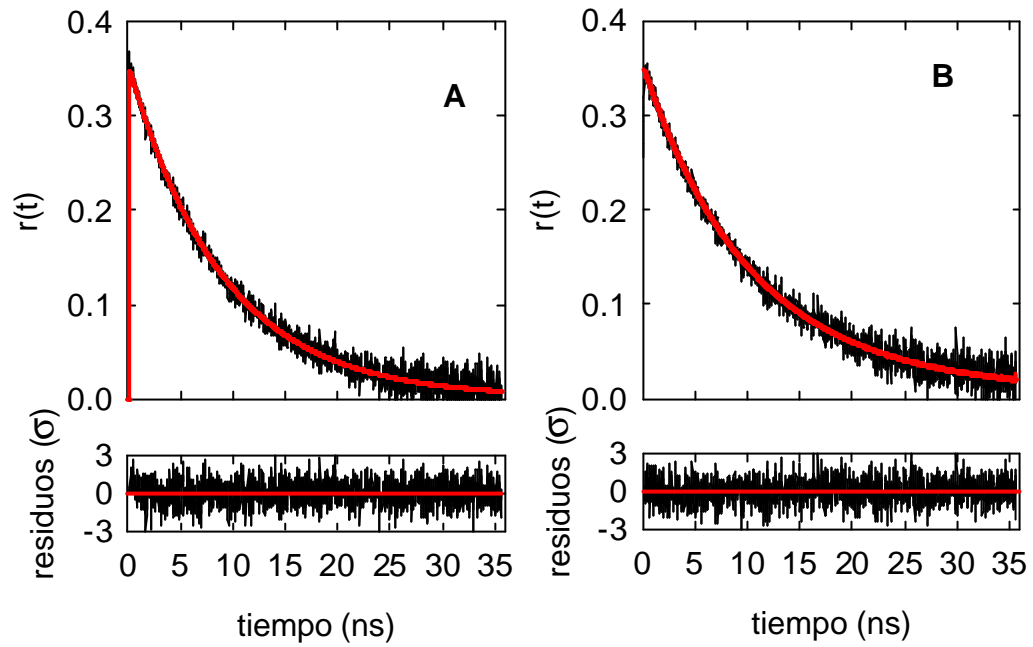


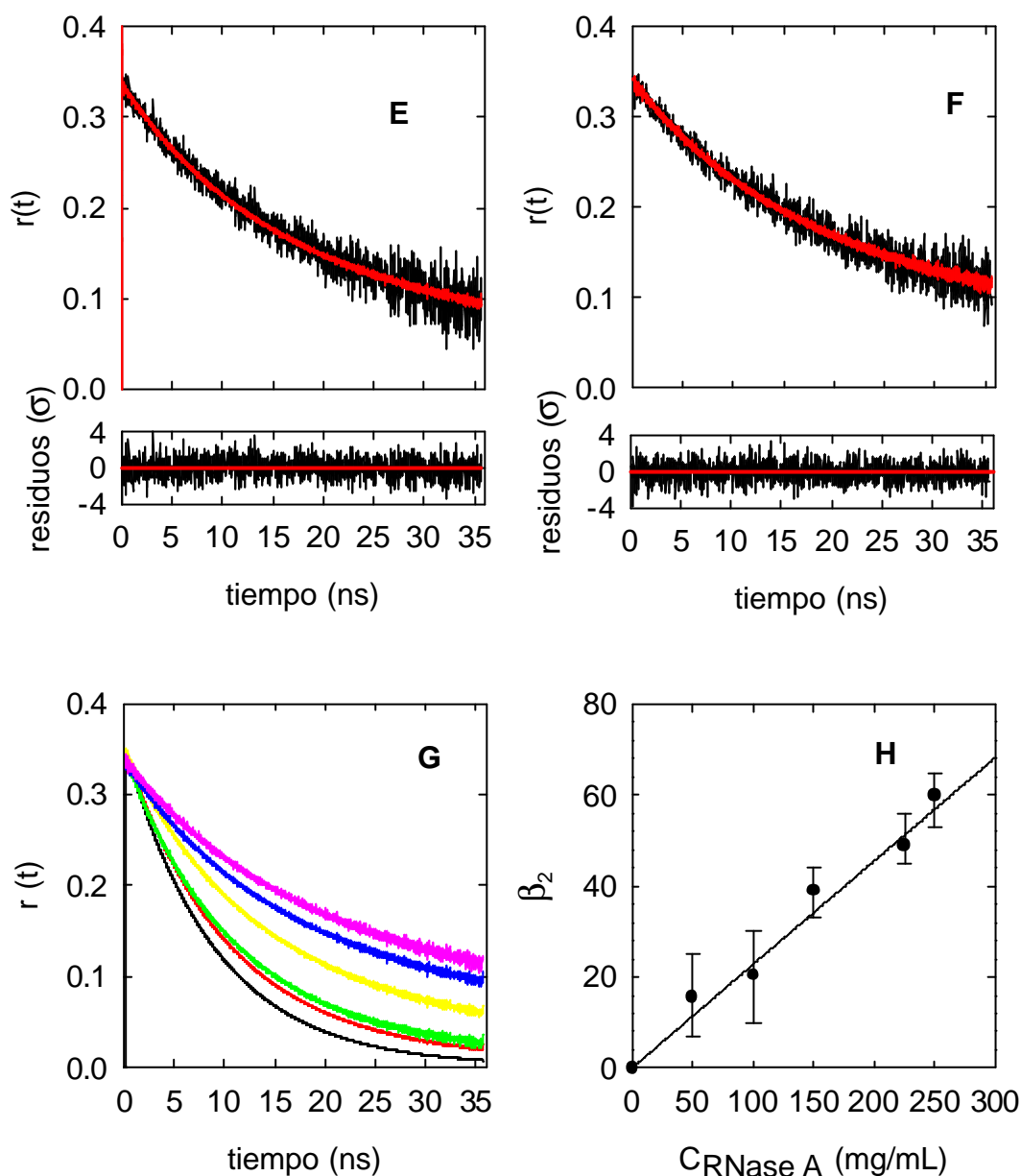
Los valores de  $r(0)$  obtenidos en los ajustes coinciden, dentro del error, con el valor de la anisotropía intrínseca de la sonda a las longitudes de onda del experimento (Hudson y Weber, 1973).

En la *Tabla 5.5* se puede observar que los valores de  $f_1$  y  $f_2$  van aumentando a medida que aumenta la concentración de RNasa A. Además, la contribución fraccional  $b_2$  del tiempo de correlación rotacional más grande aumenta al aumentar la concentración de RNasa A.

**Tabla 5.5:** *Parámetros de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de muestras de ApoMb-ANS (apoMb  $10^{-4}$  M con 0.8 moles de ANS unido por mol de apoMb) en presencia de distintas concentraciones de RNasa A (0-250 mg/mL). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 393 y 465 nm respectivamente. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4. Las amplitudes fraccionales están normalizadas. Los errores se calcularon con un nivel de confianza del 67 % y los intervalos de error asimétricos aparecen debajo del número correspondiente entre paréntesis.*

Concentración de RNasa A (mg/mL)	$r(0)$ $\pm 0.01$	$b_1$	$f_1$ (ns)	$b_2$	$f_2$ (ns)	$c^2$
0	0.35	1	9.0 (8.8-9.2)	-	-	1.32
50	0.34	0.85 (0.75-0.93)	9.4 (8.8-10.1)	0.15 (0.17-0.25)	24 (23-25)	1.19
100	0.34	0.80 (0.70-0.90)	9.9 (9.0-10.8)	0.20 (0.10-0.30)	28 (25-30)	1.27
150	0.35	0.61 (0.56-0.67)	10.8 (9.9-11.9)	0.39 (0.33-0.44)	36 (30-46)	1.20
225	0.34	0.51 (0.44-0.55)	12.2 (10.7-14.0)	0.49 (0.45-0.56)	52 (41-69)	1.22
250	0.34	0.40 (0.35-0.47)	12.4 (10.7-14.6)	0.60 (0.53-0.65)	54 (45-69)	1.22





**Figura 5.14:** Decaimientos de anisotropía de fluorescencia de apoMb-ANS (apoMb  $10^4$  M con 0.8 moles de ANS por mol de apoMb) en ausencia de RNasa A (A) y en presencia de 50 mg/mL (B), 100 mg/mL (C), 150 mg/mL (D), 225 mg/mL (E) y 250 mg/mL (F) de RNasa A. En G se comparan los ajustes correspondientes a los decaimientos de anisotropía anteriores en ausencia de RNasa A (línea negra) y en presencia de 50 mg/mL (rojo), 100 mg/mL (verde), 150 mg/mL (amarillo), 225 mg/mL (azul), 250 mg/mL (rosa). En H se muestra la variación de la contribución del tiempo de correlación más largo al decaimiento de anisotropía con la concentración de RNasa A. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 393 y 465 nm respectivamente. La resolución temporal fue 12.2 ps / canal. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

### 5.3.2.2. Experimentos de fluorescencia con apomioglobina marcada con fluoresceína

En esta parte del trabajo se realizó un estudio de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de apoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) en presencia de apoMb (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M (1.7 mg/mL)) y de RNasa A a una concentración de 200 mg/mL. Los resultados obtenidos se compararon con los que se obtuvieron para apoMb-ANS en presencia de RNasa A en las mismas condiciones. Los decaimientos de intensidad y anisotropía de fluorescencia se recogieron con longitudes de onda de excitación y emisión de 460 y 520 nm respectivamente. El tampón fue también fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

**Decaimiento de intensidad de fluorescencia.** El decaimiento de intensidad de fluorescencia fue ajustado a una función suma de tres exponenciales de la forma:

$$I(t) = I(0) \sum_{i=1}^3 a_i \exp(-t/\tau_i) \quad (5.7)$$

El resultado obtenido en el análisis se muestra en la *Tabla 5.6*. Se observa una disminución de los tiempos de vida media de fluorescencia, así como un aumento de la contribución de los tiempos de vida media más cortos con respecto a los determinados para apoMb-FI en ausencia de RNasa A (ver *Tabla 5.2*). La forma de los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para esta solución coincide con la correspondiente a una solución de apoMb-FI de la misma concentración, aunque su intensidad es ligeramente inferior.

**Anisotropía fluorescencia de estado estacionario y con resolución temporal.** El valor de la anisotropía de estado estacionario de esta solución de apoMb-FI en presencia de 200 mg/mL de RNasa A fue  $0.150 \pm 0.005$ .

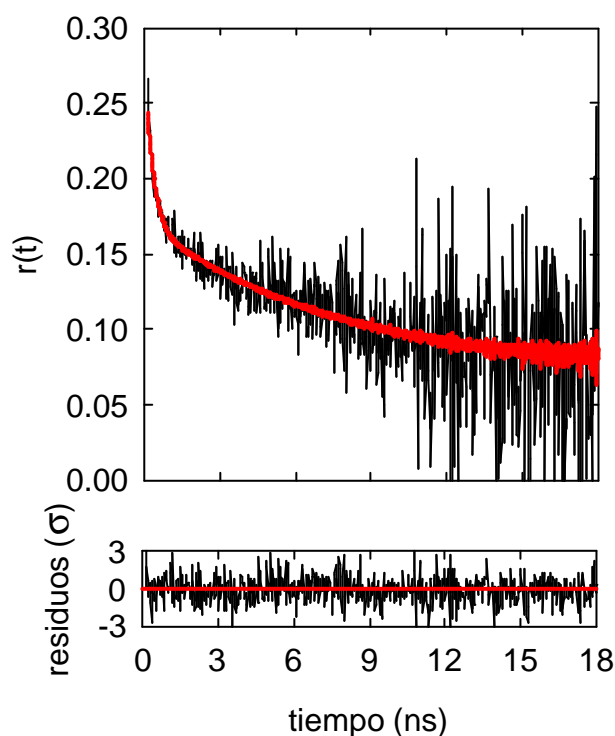
El decaimiento de anisotropía de fluorescencia obtenido para esta muestra (*Figura 5.15*) se ajustó a un modelo de dos exponenciales más una constante:

$$r(t) = r(0) [b_1 \exp(-t/\tau_1) + b_2 \exp(-t/\tau_2) + b_\infty] \quad (5.8)$$

Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 5.7*.

**Tabla 5.6:** Parámetros del decaimiento de intensidad de fluorescencia y tiempos de vida media de fluorescencia promedio de una muestra de ApoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M) y de RNasa A a concentración 200 mg/mL. Los factores preexponenciales  $a_i$  están normalizados. Los tiempos de vida media promediados por la amplitud  $\langle t \rangle_1$  y por la intensidad de fluorescencia  $\langle t \rangle_2$  se calcularon utilizando las ecuaciones (3.3) y (3.4) respectivamente (ver Fundamento Teórico 3.1.1). Los errores se calcularon para un nivel de confianza del 67 %. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4. El valor del  $c^2$  obtenido fue 1.15.

$a_1$	$t_1$	$a_2$	$t_2$	$a_3$	$t_3$	$\langle t \rangle_1$	$\langle t \rangle_2$
	(ns)		(ns)		(ns)	(ns)	(ns)
$\pm 0.02$	$\pm 0.04$	$\pm 0.01$	$\pm 0.2$	$\pm 0.03$	$\pm 0.07$		
0.30	0.26	0.27	1.3	0.43	3.7	2.1	3.2



**Figura 5.15:** Decaimiento de anisotropía de fluorescencia de apoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M (1.7 mg/mL)) y de 200 mg/mL de RNasa A. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. La resolución temporal fue de 13.1 ps / canal. Los decaimientos se recogieron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

**Tabla 5.7:** Parámetros del decaimiento de anisotropía de fluorescencia de ApoMb-FI  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M) y de 200 mg/mL de RNasa A. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4. Las amplitudes fraccionales están normalizadas. Los errores se calcularon con un nivel de confianza del 67 % y los intervalos de error asimétricos aparecen debajo del número correspondiente entre paréntesis.

$r(0)$	$b_1$	$f_1$ (ns)	$b_2$	$f_2$ (ns)	$b_{\forall}$	$c^2$
	$\pm 0.1$	$\pm 0.08$	$\pm 0.1$		$\pm 0.1$	
0.25	0.33	0.28	0.4	8 (5-14)	0.3	1.12

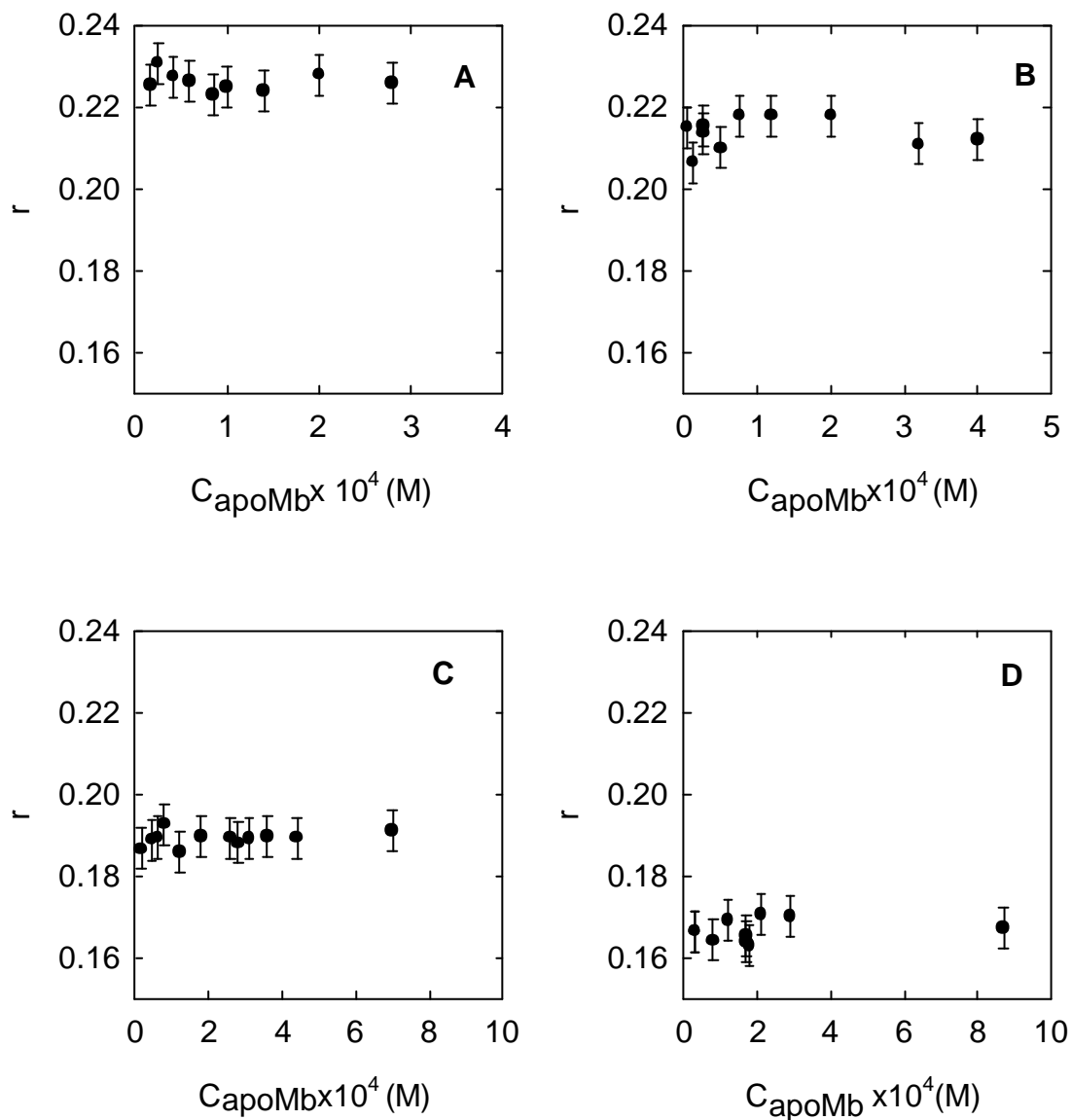
El tiempo de correlación rotacional,  $f_1$ , se asignó al movimiento segmental independiente de la molécula de fluoresceína. El tiempo más largo,  $f_2$ , es del orden del tiempo de correlación rotacional más corto determinado para apoMb-ANS con RNasa A, con lo cual cabrían asignaciones análogas a las que allí se hicieron (ver *Resultados 5.3.2.1*). La fluoresceína en apoMb-FI presenta un tiempo de vida media de fluorescencia ( $\langle t \rangle_1 = 2$  ns) muy inferior al del ANS, de modo que no permite determinar tiempos de correlación rotacional mayores que unos 10 ns. La contribución de tiempos de correlación rotacional más largos, aparece englobada en la expresión para  $r(t)$  como una anisotropía límite  $r_{\forall}$  (ver *Fundamento Teórico 3.1.2.5*). El tiempo de correlación rotacional correspondiente al movimiento segmental de la fluoresceína, así como su contribución a la despolarización de la fluorescencia, son del mismo orden que los encontrados para muestras de apoMb-FI en tampón (*Resultados 5.3.1*). Esto hace suponer que el movimiento restringido de la fluoresceína es equivalente tanto en el monómero como en el dímero de apoMb. La contribución relativa a la despolarización de la fluorescencia del tiempo de correlación rotacional  $f_2$  ( $b_2$ ) y del movimiento global de la especie de mayor tamaño ( $b_{\forall}$ ) es aproximadamente un 60 y 40 % respectivamente, lo que estaría en acuerdo con los resultados obtenidos para apoMb-ANS en presencia de RNasa A.

### 5.3.2.3. Experimentos de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario a concentración fija de Ribonucleasa A y con concentraciones variables de apomioglobina

Los experimentos descritos en *Resultados 5.3.2.1* y *5.3.2.2* permitieron identificar la formación de especies de mayor tamaño que la apoMb monomérica a medida que se incrementaba la concentración de RNasa A, para una concentración total fija de apoMb ( $10^{-4}$  M). En esta parte del trabajo, se pretende explorar la variación de la proporción de esa nueva especie con la concentración de apoMb, para diferentes concentraciones fijas de RNasa A, por medio de medidas de anisotropía de fluorescencia de estado estacionario. Las medidas se realizaron a 20 °C a longitudes de onda de excitación y emisión 393 y 465 nm.

La contribución de la señal de fluorescencia del fondo de RNasa A a la señal total es inferior a un 10 % para una concentración de apoMb  $10^{-5}$  M y una concentración de RNasa A de 250 mg/mL. Por debajo de esta concentración de apoMb, la concentración de ANS unido a la proteína es muy baja y la señal de fluorescencia disminuye notablemente de modo que la contribución del fondo no permite hacer una buena estimación de la anisotropía. Por este motivo, no se realizaron medidas a concentraciones de apoMb por debajo de  $10^{-5}$  M. Para las muestras medidas la contribución del fondo fue restada en todos los casos. Los efectos de filtro interno de las muestras estudiadas no fueron apreciables. Los experimentos se realizaron con muestras de apoMb-ANS con distinta proporción de ANS por mol de proteína (entre 0.2 y 0.8), sin que ello afectara a los valores de anisotropía de fluorescencia obtenidos para una misma concentración de apoMb y RNasa A. Para las muestras con una concentración de RNasa A de 150 mg/mL, se realizaron medidas de anisotropía a distintas longitudes de onda de excitación y emisión como control de posibles efectos de transferencia de energía o de filtro interno obteniéndose el mismo resultado para todas las condiciones probadas.

La variación de la anisotropía de fluorescencia con la concentración total de apoMb que se obtuvo para muestras con una concentración total de RNasa A de 100, 150, 200 o 250 mg/mL, es la indicada en la *Figura 5.16*. Como se puede observar, no se detecta un cambio apreciable en la anisotropía de fluorescencia al aumentar la concentración de apoMb en el intervalo estudiado, a las distintas concentraciones de RNasa A.

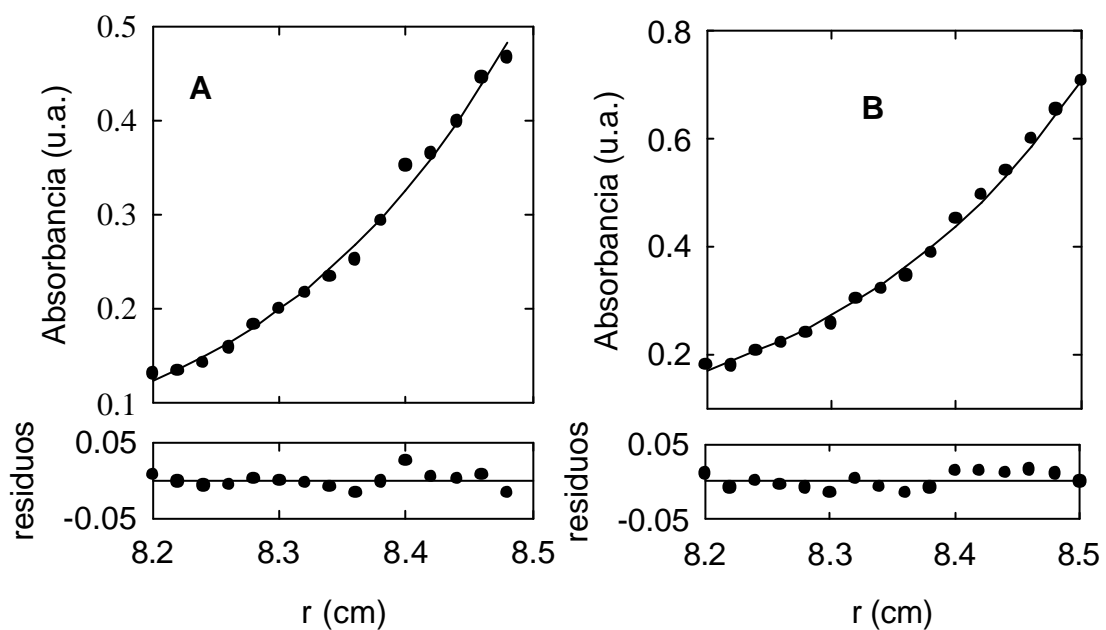


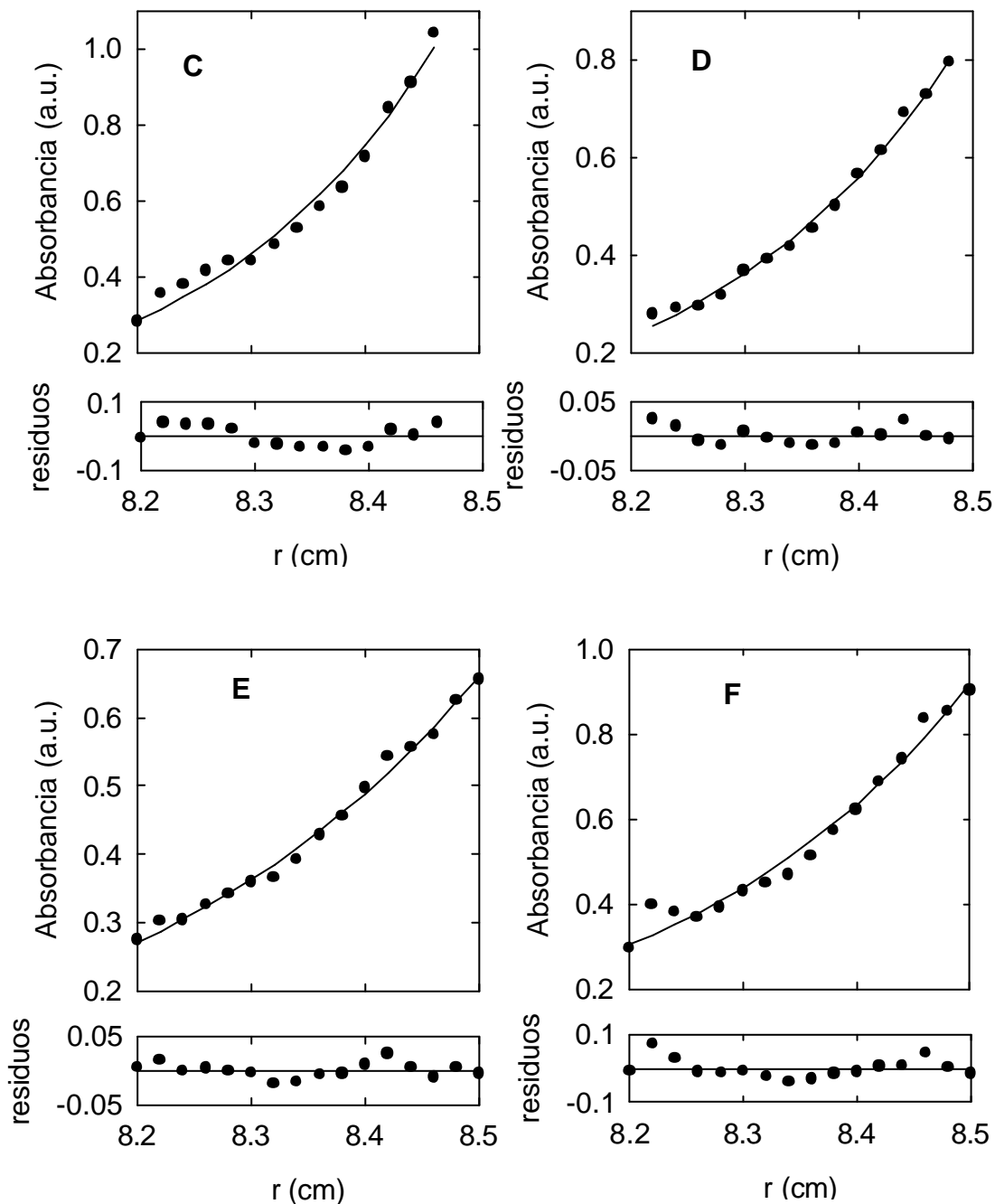
**Figura 5.16:** Variación de la anisotropía de fluorescencia de estado estacionario con la concentración de apoMb para concentraciones fijas de RNasa A 250 mg/mL (A), 200 mg/mL (B), 150 mg/mL (C) y 100 mg/mL (D). En todos los casos la apoMb estaba marcada con ANS. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 393 y 465 nm respectivamente. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.



### 5.3.2.4. Experimentos de equilibrio de sedimentación de ribonucleasa A altamente concentrada

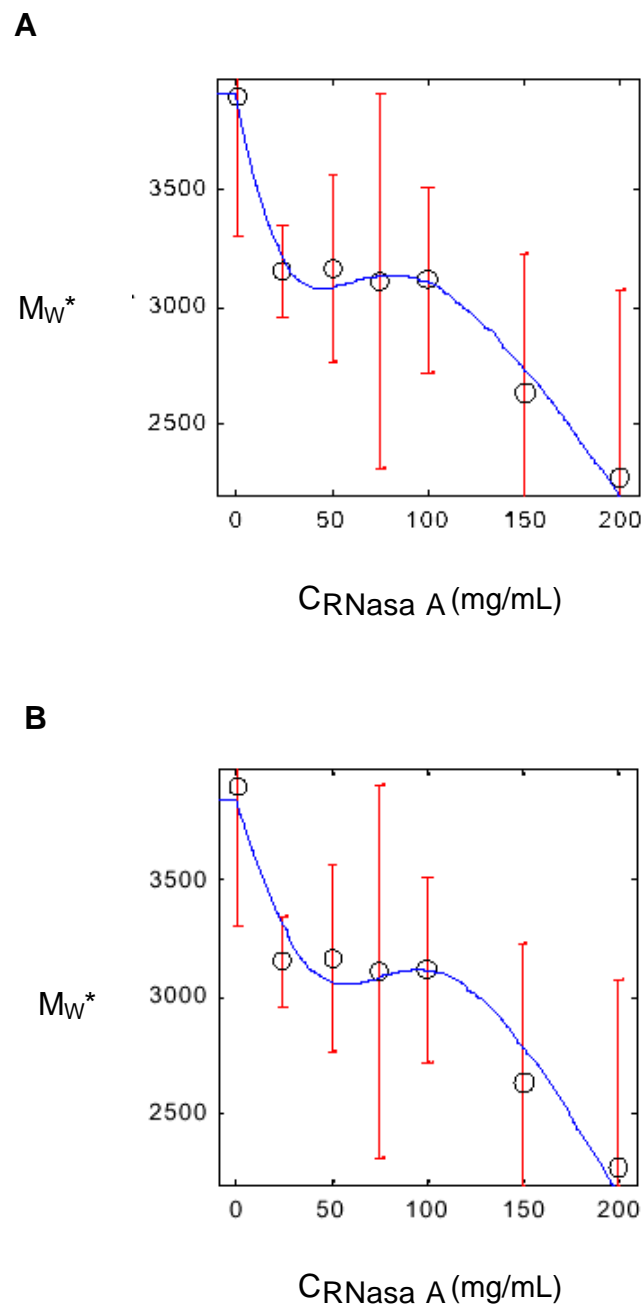
En la *Figura 5.17* se muestran los gradientes de equilibrio de sedimentación obtenidos para soluciones de distinta concentración de RNasa A así como los ajustes con el programa XLAEQ (Beckman Instruments, Minton 1994) a partir de los cuales se obtuvieron las masas moleculares de flotación. Los resultados obtenidos para muestras con RNasa A-FI como trazador, fueron comparables con los que se obtuvieron para muestras que contenían sólo RNasa A dentro del error experimental, lo que indica que el marcado con fluoresceína no afecta a las propiedades de la RNasa A en lo referente a su estado de asociación.



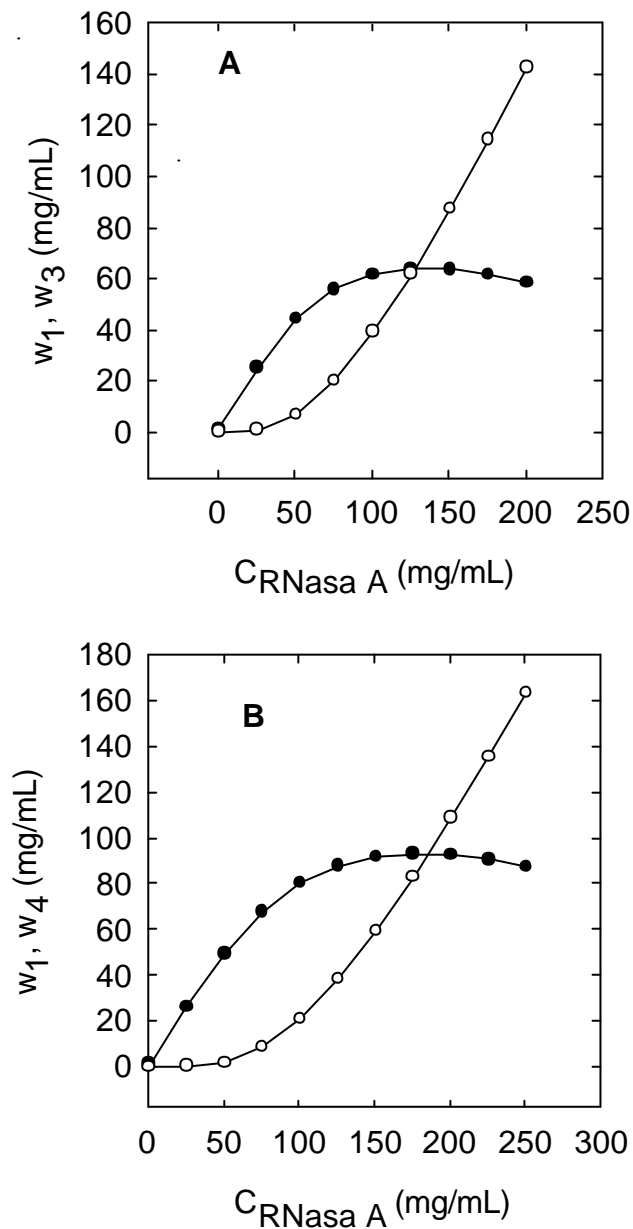


**Figura 5.17 :** Gradientes de equilibrio de sedimentación de soluciones de RNasa A de concentración 25 mg/mL (A), 50 mg/mL (B), 75 mg/mL (C), 100 mg/mL (D), 150 mg/mL (E) y 200 mg/mL (F). Las muestras se centrifugaron a 20000 rpm a 20 °C. La longitud de onda a la que se midió la absorción fue 280 nm. Los experimentos se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

Del análisis de la variación de  $M_{ap}^*$  con la concentración de proteína, se obtuvo información sobre la tendencia a la asociación de la RNasa A. Dicho análisis fue amablemente realizado por el Dr. A.P. Minton (N.I.H., U.S.A.) (ver *Materiales y Métodos 4.8.2*). Los datos experimentales resultaron incompatibles con un modelo en el que la RNasa A se mantuviera monomérica en todo el intervalo de concentraciones. Por ello se estudiaron otros modelos sencillos de asociación: monómero - dímero, monómero - trímero, monómero - tetramero y monómero - pentámero. Los resultados experimentales son compatibles con los modelos monómero - trímero y monómero - tetramero y excluyen las posibilidades monómero - dímero y monómero - pentámero. El ajuste de los datos experimentales a los modelos monómero-trímero y monómero-tetramero se muestra en la *Figura 5.18*. La proporción de cada una de las especies presentes en la solución para una determinada concentración de RNasa A, calculada a partir de las constantes de asociación estimadas a partir del análisis de los datos experimentales, se muestra en la *Figura 5.19*.



**Figura 5.18:** Variación de la masa molecular de flotación aparente con la concentración de RNasa A. Los ajustes corresponden a un modelo monómero - trímero (A) y a un modelo monómero - tetramero (B). Los experimentos se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.



**Figura 5.19:** Variación de la concentración en mg/mL de monómero (·) y trímero (o) (panel A) o de monómero y tetramero (o) (B) con la concentración total de RNasa A. Los experimentos se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

### 5.3.3. Estudio del estado de asociación de la apomioglobina en presencia de altas concentraciones de albúmina sérica humana

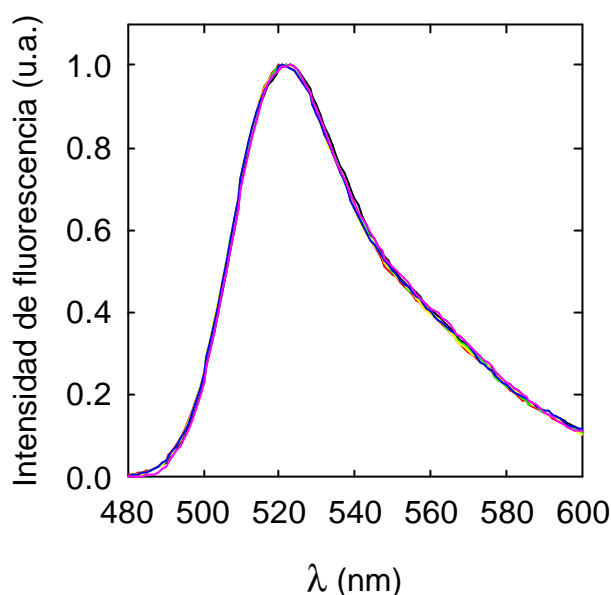
En esta parte del trabajo, se pretende aplicar la espectroscopia de fluorescencia con resolución temporal para la obtención de información cuantitativa sobre las propiedades hidrodinámicas y el estado de asociación y de la apoMb en soluciones de alta concentración de HSA. La utilización del ANS como sonda para marcar la apoMb en soluciones que contienen HSA es inviable ya que la HSA presenta a su vez sitios de unión de dicho fluoróforo (Weber y Young, 1964). Por ello, todos los experimentos de fluorescencia correspondientes a este sistema se realizaron con muestras de apoMb-FI.

Para estos experimentos se prepararon muestras con apoMb-FI como trazador a concentración  $2 \times 10^{-6}$  M (en presencia de apoMb no marcada hasta una concentración total  $10^{-4}$  M (1.7 mg/mL)) y la cantidad correspondiente de HSA (0-200 mg/mL). Después de su preparación, las muestras se dejaron equilibrar durante al menos 30 minutos antes de ser medidas. La HSA utilizada para estos experimentos presenta trazas de impurezas fluorescentes que absorben y emiten en el intervalo de longitudes de onda de trabajo. Una de estas impurezas parece ser la bilirrubina, que forma un complejo muy estable con la HSA mediante la unión a sitios hidrofóbicos (Beaven et al, 1974, McDonagh et al, 1989 Lamola et al, 1982). Se realizaron varios intentos de eliminación de dichas impurezas con escaso éxito, también se probó con muestras de HSA comercial de distintas especificaciones de pureza pero no presentaban ninguna ventaja frente a la inicialmente elegida. En cualquier caso, la contribución del fondo de HSA para la muestra de mayor concentración de HSA probada (200 mg/mL) es del orden del 10 % de la señal total de fluorescencia. La contribución del fondo de HSA fue restada en todos los casos a la señal de la muestra con fluoróforo.

Las longitudes de onda de excitación y emisión para estos experimentos fueron 460 y 520 nm respectivamente el tampón, fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 y la temperatura 20 °C.

**Espectros de emisión de fluorescencia.** La forma de los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para las distintas muestras de apoMb-FI es la misma independientemente de la concentración de HSA presente. Sin embargo, se observa un descenso en la intensidad de fluorescencia en estado estacionario a medida que

aumenta la concentración de HSA, que para la muestra de 200 mg/mL de HSA, es de un 25 % respecto del valor obtenido en ausencia de HSA.



**Figura 5.20:** Espectros de emisión de fluorescencia corregidos y normalizados de apoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M (1.7 mg/mL)) y HSA (5, 25, 50, 100 y 200 mg/mL). La longitud de onda de excitación fue 460 nm. Los espectros se tomaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

**Decaimientos de intensidad de fluorescencia.** Los decaimientos de la intensidad de fluorescencia obtenidos para muestras de apoMb-FI en presencia de HSA (Figura 5.21) se ajustaron a un modelo de tres exponenciales de la forma:

$$I(t) = I(0) \sum_{i=1}^3 a_i \exp(-t/\tau_i) \quad (5.9)$$

Los tres tiempos de vida media obtenidos en los correspondientes análisis individuales fueron semejantes para todas las muestras de apoMb-FI

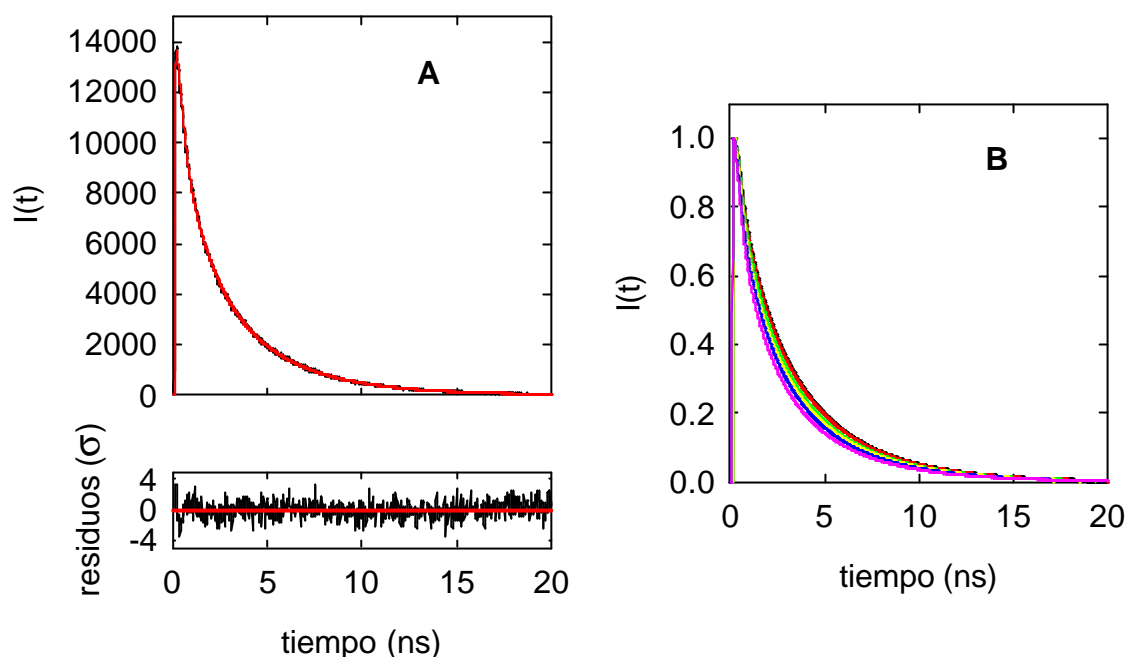
independientemente del contenido de HSA, por ello, se decidió realizar un análisis global de todos los decaimientos en el que cada uno de los tres tiempos de vida media se suponían iguales para todas las muestras.

En la *Tabla 5.8* se presentan los resultados del análisis global. Se observa un aumento de la contribución de los tiempos de vida media cortos, a medida que se incrementa la concentración de HSA. Esto se traduce en una disminución de los tiempos de vida media promedio que en el caso de  $\langle t \rangle_1$ , para 200 mg/mL de HSA, resulta ser coincidente con la disminución detectada en la intensidad de fluorescencia en estado estacionario.

**Tabla 5.8:** *Parámetros de los decaimientos de intensidad de fluorescencia y tiempos de vida media de fluorescencia promedio de muestras de ApoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M (1.7 mg/mL)) además de la correspondiente concentración de HSA. Los resultados presentados corresponden a un análisis global de todos los decaimientos de intensidad. El valor del  $c_g^2$  obtenido fue 1.12. Los factores preexponenciales  $a_i$  están normalizados. Los tiempos de vida media promediados por la amplitud  $\langle t \rangle_1$  y por la intensidad de fluorescencia  $\langle t \rangle_2$  se calcularon utilizando las ecuaciones (3.3) y (3.4) respectivamente (ver Fundamento Teórico 3.1.1). Los errores se calcularon para un nivel de confianza del 67 %. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4*

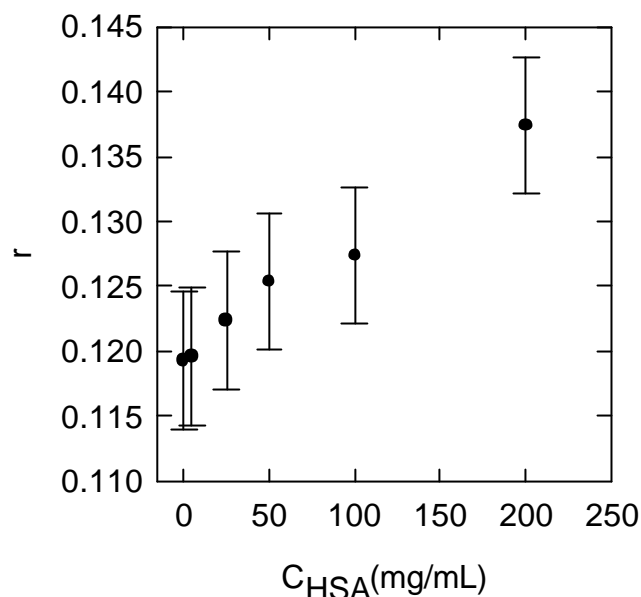
Concentración de HSA (mg/mL)	$a_1$ $\pm 0.02$	$t_1$ (ns) $\pm 0.04$	$a_2$ $\pm 0.01$	$t_2$ (ns) $\pm 0.2$	$a_3$ $\pm 0.03$	$t_3$ (ns) $\pm 0.07$	$\langle t \rangle_1$ (ns)	$\langle t \rangle_2$ (ns)
0	0.22	0.28	0.26	1.5	0.52	3.87	2.5	3.4
5	0.23	0.28	0.26	1.5	0.51	3.87	2.4	3.4
25	0.25	0.28	0.30	1.5	0.45	3.87	2.3	3.3
50	0.30	0.28	0.28	1.5	0.42	3.87	2.1	3.3
100	0.30	0.28	0.31	1.5	0.39	3.87	2.1	3.2
200	0.35	0.28	0.31	1.5	0.34	3.87	1.9	3.1





**Figura 5.21:** A: decaimiento de la intensidad de fluorescencia en condiciones de ángulo mágico de apoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M (1.7 mg/mL)) y de 200 mg/mL de HSA. B: decaimientos de intensidad de fluorescencia en condiciones de ángulo mágico normalizados de apoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M (1.7 mg/mL)) (línea negra) y en presencia de 5 mg/mL (rojo), 25 mg/mL (verde), 50 mg/mL (amarillo), 100 mg/mL (azul) y 200 mg/mL (rosa) de HSA. La resolución temporal fue 13.1 ps / canal. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Los decaimientos se recogieron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

**Anisotropía de fluorescencia estado estacionario y con resolución temporal.** Se determinó la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario de apoMb en presencia de distintas concentraciones de HSA utilizando apoMb-FI como trazador. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 5.22*. La anisotropía de fluorescencia de las muestras aumenta al aumentar el contenido de HSA. Como se comentó para las muestras de apoMb-ANS en presencia de RNasa A (*Resultados 5.3.2.1*), este aumento puede deberse a varios factores, el aumento de la viscosidad, una posible autoasociación de la apoMb, una asociación de la apoMb con la HSA o bien a la combinación de dos o más de éstos factores.



**Figura 5.22:** Variación de la anisotropía de estado estacionario de apoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) en presencia de apoMb (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M) en función de la concentración de HSA presente en la solución. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

Se realizaron experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal, con el fin de caracterizar hidrodinámicamente y cuantificar la especie o especies de apoMb presentes en las soluciones de alta concentración de HSA. Los decaimientos de anisotropía de fluorescencia obtenidos para apoMb en presencia de HSA con apoMb-FI como trazador (Figura 5.23) se ajustaron en todos los casos a un modelo biexponencial de la forma:

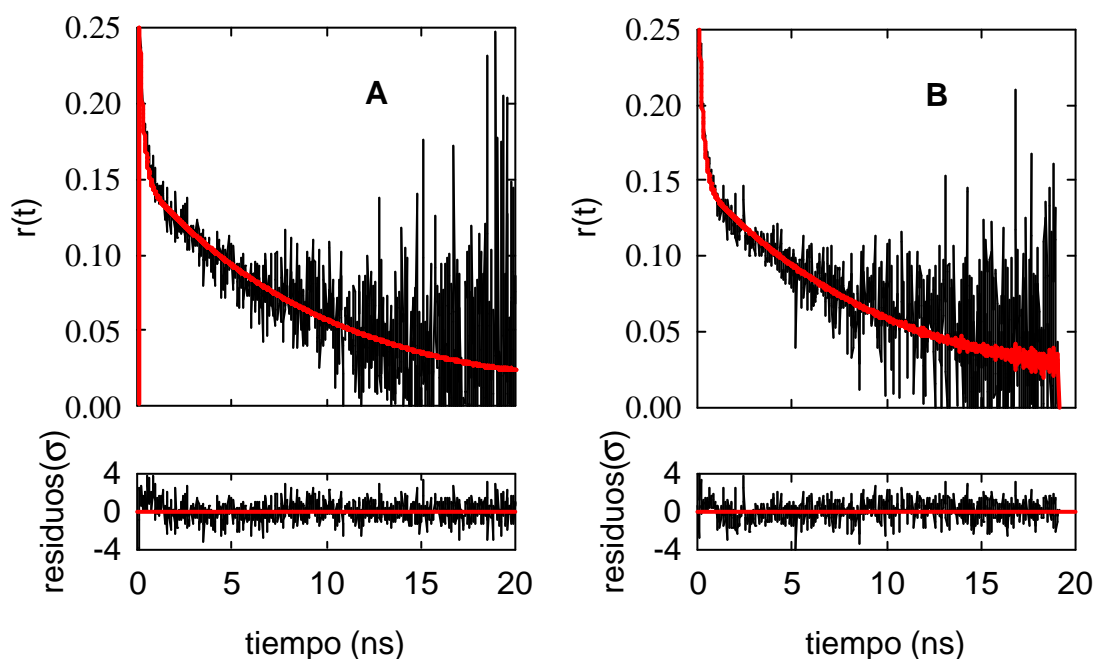
$$r(t) = r(0) [b_L \exp(-t/f_L) + b_G \exp(-t/f_G)] \quad (5.10)$$

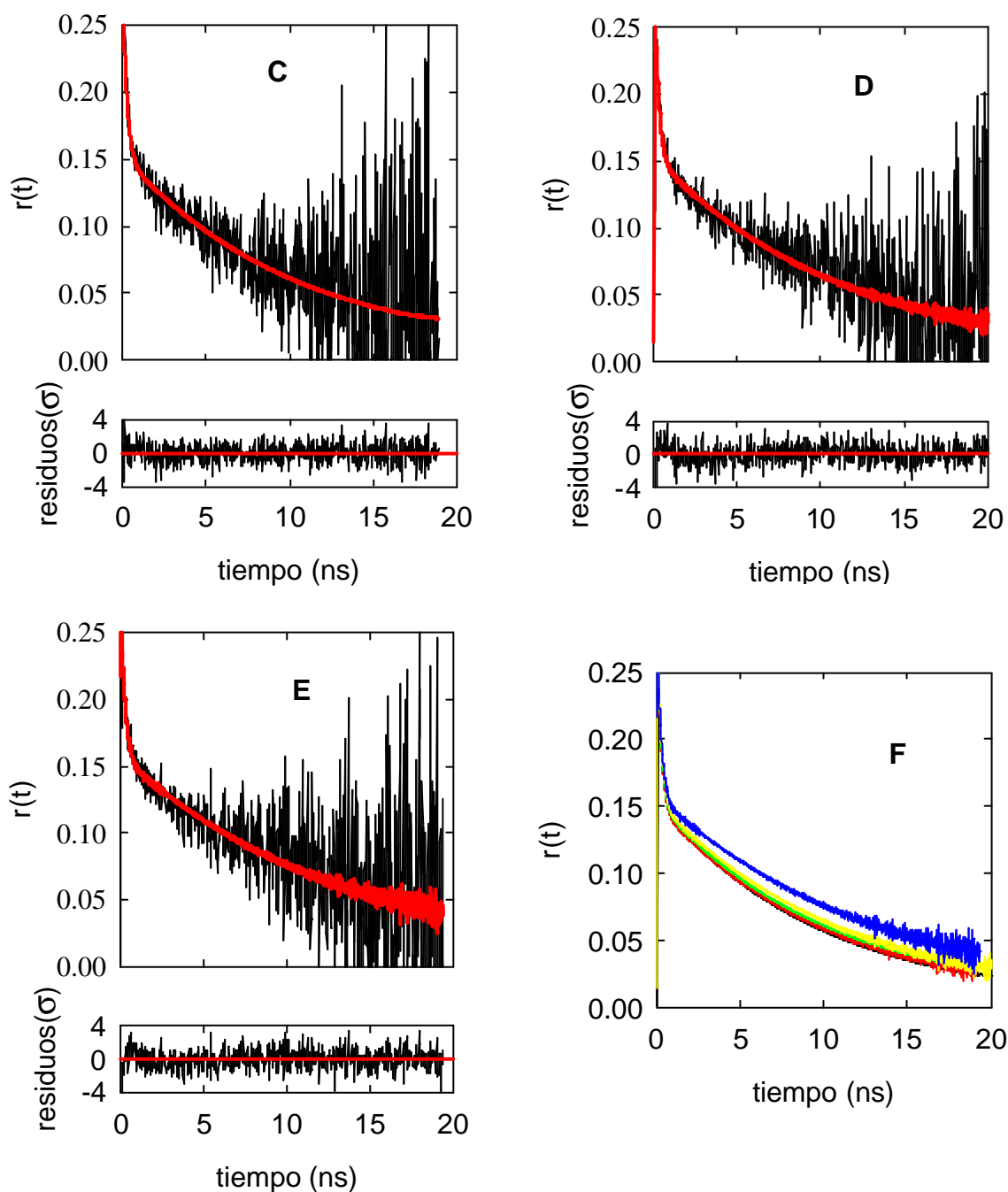
donde  $r(0)$  es la anisotropía a tiempo cero,  $f_L$  y  $f_G$  son los tiempos de correlación rotacional asociados al movimiento local de la fluoresceína y a la rotación global de la apoMb-FI respectivamente y  $b_L$  y  $b_G$  son sus amplitudes fraccionales.

El valor del  $r(0)$  obtenido, 0.25, es bastante más bajo de lo que cabría esperar para una sonda como la fluoresceína, cuyo  $r_0$  es del orden de 0.4 a la longitud de onda

de excitación (Chen y Bowman, 1965). Esto indica que están teniendo lugar procesos de despolarización muy rápidos ( $< 50$  ps) que no son resueltos por el instrumento.

En la *Tabla 5.9* se presentan los parámetros de los decaimientos de anisotropía. Como se puede observar, el movimiento local de la fluoresceína en la apoMb permanece inalterado a medida que se va añadiendo HSA, mientras que el movimiento global de la apoMb se va haciendo cada vez más lento. La contribución de cada movimiento a la despolarización de la fluorescencia es la misma dentro del error independientemente de la concentración de HSA. El aumento del tiempo de correlación rotacional más largo al aumentar la concentración de HSA se puede explicar por el aumento de la viscosidad de la solución (ver *Resultados 5.4.2*) sin necesidad de recurrir a la posible formación de nuevas especies.





**Figura 5.23:** Decaimientos de anisotropía de fluorescencia de apoMb-FI ( $2 \times 10^6$  M) en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M, 1.7 mg/mL) en presencia de 5 mg/mL (A), 25 mg/mL (B), 50 mg/mL (C), 100 mg/mL (D) y 200 mg/mL (E) de HSA. F: decaimientos de anisotropía de fluorescencia normalizados de apoMb-FI ( $2 \times 10^6$  M) en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M) en presencia de 5 mg/mL (línea negra), 25 mg/mL (rojo), 50 mg/mL (verde), 100 mg/mL (amarillo) y 200 mg/mL (azul) de HSA. La resolución temporal fue 13.1 ps / canal. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Los decaimientos se recogieron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

**Tabla 5.9:** Parámetros de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de muestras de ApoMb-FI ( $2 \times 10^{-6}$  M) en presencia de apoMb no marcada (concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M (1.7 mg/mL)) además de la correspondiente concentración de HSA. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 460 y 520 nm respectivamente. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4. Las amplitudes fraccionales están normalizadas. Los errores se calcularon para un nivel de confianza del 67 % y los intervalos de error asimétricos aparecen debajo del número correspondiente entre paréntesis.

Concentración de HSA (mg/mL)	$r(0)$	$b_L$ $\pm 0.02$	$f_L$ (ns)	$b_G$ $\pm 0.02$	$f_G$ (ns)	$c^2$
0	0.25	0.40	0.2	0.60	9.9	1.08
5	0.25	0.40	0.2	0.60	10.2 (9.6-10.8)	1.12
25	0.25	0.40	0.2	0.60	10.6 (9.4-12.2)	1.18
50	0.25	0.40	0.2	0.60	10.7 (9.4-12.6)	1.14
100	0.25	0.39	0.2	0.61	11.4 (10.1-12.8)	1.21
200	0.25	0.38	0.2	0.62	13.6 (11.6-15.8)	1.22

#### 5.4. EFECTO DE LA ALTA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN SOLUCIÓN (MEDIOS AGLOMERADOS) SOBRE LA DIFUSIÓN ROTACIONAL Y TRANSLACIONAL DE PROTEÍNAS: APOMIOGLOBINA EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE RIBONUCLEASA A O DE ALBÚMINA SÉRICA HUMANA

En esta parte del trabajo se realizó un estudio detallado del efecto de la viscosidad microscópica, a veces también llamada “microviscosidad”, que actúa sobre la rotación y la traslación de la apoMb en soluciones con una alta concentración de RNasa A o de HSA. La información sobre la difusión rotacional de la molécula se obtuvo a partir de los experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal descritos en *Resultados 5.3*. Para la obtención de información sobre la difusión translacional se realizaron experimentos de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS).

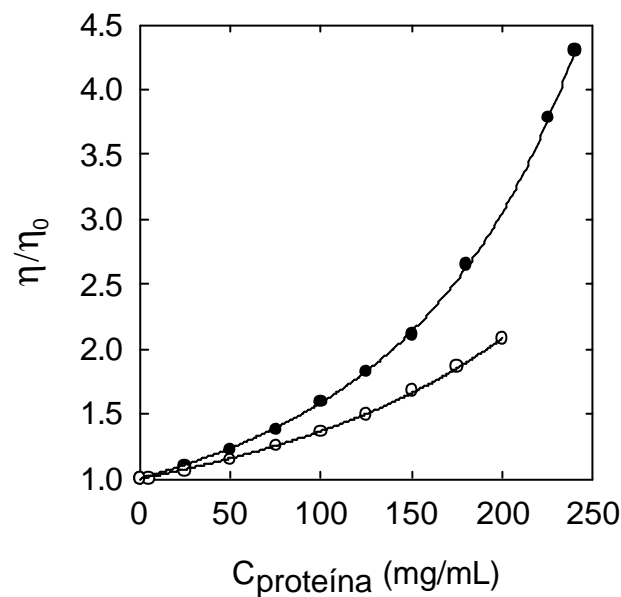
##### 5.4.1. Viscosidad macroscópica de soluciones de ribonucleasa A y de albúmina sérica humana

En la *Figura 5.24* se muestra una representación de los valores de la viscosidad macroscópica de soluciones de distinta concentración de RNasa A y de HSA determinados experimentalmente (*Materiales y Métodos 4.7*). Como se puede observar, la viscosidad correspondiente a las soluciones de RNasa A es superior a la correspondiente a soluciones de HSA para una misma concentración de proteína (en mg/mL). En dicha figura se muestra también el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Mooney (Mooney, 1951; Ross y Minton, 1977):

$$\frac{h}{h_0} = \exp\left(\frac{Ac}{1 - Bc}\right) \quad (5.11)$$

donde  $h$  es la viscosidad macroscópica de la solución determinada para cada concentración de proteína,  $h_0$  es la viscosidad del tampón,  $A$  es un parámetro característico de las interacciones hidrodinámicas y  $B$  es proporcional a un factor de autoaglomeración. El valor de  $h_0$  para el tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C es 1.026 cP (calculado con el programa SEDNTERP (obtenido

del servidor de RASMB (Laue et al, 1992)). En la ecuación originalmente propuesta por Mooney,  $c$  correspondía a la fracción de volumen de la proteína, sin embargo, en nuestro caso  $c$  se ha tomado como la concentración de proteína en mg/mL. Dado que las densidades de las soluciones de RNasa A y HSA determinadas experimentalmente son muy próximas a 1 (entre 1.00 y 1.03 para HSA y entre 1.00 y 1.04 para RNasa A), las dos variables son proporcionales, de modo que la utilización de fracciones de masa en vez de fracciones de volumen sólo se traduce en que los valores de A y B obtenidos no son valores absolutos sino relativos (Lavalette et al, 1999). En la *Tabla 5.10* se muestran los valores de A y B obtenidos en el ajuste de los datos experimentales.



**Figura 5.24:** Variación de la viscosidad macroscópica relativa de soluciones de HSA (o) y RNasa A (·) con la concentración total de proteína. Los datos experimentales se han ajustado a la ecuación (5.11) (ecuación de Mooney generalizada). Los valores de los parámetros A y B obtenidos fueron  $(3.94 \pm 0.05) \times 10^{-3}$  y  $(1.47 \pm 0.03) \times 10^{-3}$  respectivamente para RNasa A y  $(2.7 \pm 0.1) \times 10^{-3}$  y  $(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-3}$  respectivamente para HSA. Para el tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C la viscosidad es 1.026 cP (calculado con el programa SEDNTERP (obtenido del servidor de RASMB (Laue et al, 1992))).

**Tabla 5.10:** Valores de los parámetros A y B de la ecuación generalizada de Mooney para soluciones de HSA y RNasa A en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

Proteína	$A \times 10^3$	$B \times 10^3$
RNasa A	$3.94 \pm 0.05$	$1.47 \pm 0.03$
HSA	$2.7 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.1$

#### 5.4.2. Difusión rotacional y viscosidad local de apomioglobina en presencia de altas concentraciones de ribonucleasa A o de albúmina sérica humana

Los parámetros de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de apoMb en presencia de distintas concentraciones de RNasa A y de HSA presentados en *Resultados 5.3.2 y 5.3.3*, contienen información sobre la rotación browniana de la apoMb en estos medios con aglomeración macromolecular. Los tiempos de correlación rotacional determinados dependen básicamente del volumen y la forma de la especie que rota y de la viscosidad local que actúa sobre dicha rotación.

##### 5.4.2.1. Apomioglobina en soluciones concentradas de ribonucleasa A

Los decaimientos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de apoMb-ANS en presencia de distintas concentraciones de RNasa A (*Resultados 5.3.2.1*) fueron ajustados a un modelo de dos tiempos de correlación rotacional,  $f_1$  y  $f_2$ . Estos dos tiempos de rotación experimentan un incremento al aumentar la concentración de RNasa A (ver *Tabla 5.5*). El aumento que se produce es, en ambos casos, inferior al que se obtendría si los tiempos de correlación rotacional correspondientes a cada concentración de RNasa A fueran proporcionales a la viscosidad macroscópica de la solución (ver *Figura 5.25*). Además, el efecto de la viscosidad es mayor sobre el tiempo de rotación más largo,  $f_2$ , que sobre el menor,  $f_1$ ,



lo que se indica que las interacciones que afectan a la difusión rotacional varían con el tamaño relativo de la especie que rota y de las circundantes.

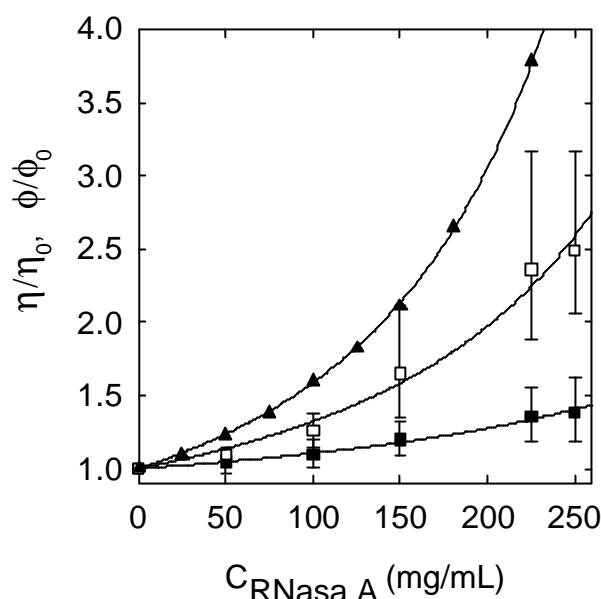
El comportamiento observado para los tiempos de difusión rotacional de especies en medios en los que no se verifican las relaciones de Stokes-Einstein-Debye, se ajusta en general a la siguiente relación empírica (Gavish, 1980, Lavalette et al 1999, Endre y Kuchel, 1986):

$$\frac{f_i}{f_{i,0}} = \exp\left(\frac{Aqc}{1-Bc}\right) \quad (5.12)$$

donde  $f_i$  es el tiempo de correlación rotacional asociado a cada especie o movimiento determinado para cada concentración de RNasa A,  $f_{i,0}$  es el tiempo de correlación que correspondería a esa especie o movimiento en tampón,  $q$  es un factor empírico y  $A$ ,  $B$  y  $c$  son las mismas magnitudes que en la ecuación de Mooney. La ecuación (5.12) se obtiene suponiendo una dependencia potencial de la "microviscosidad" rotacional con

la viscosidad macroscópica del tipo  $\frac{f}{f_0} = \left(\frac{h}{h_0}\right)^q$ , y aplicando la ecuación de Mooney (5.11).

La variación de los tiempos de correlación rotacional determinados en este trabajo para apoMb-ANS, con la concentración de RNasa A, se ajustó satisfactoriamente a la ecuación (5.12). Los valores del parámetro  $q$  obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales fueron  $0.219 \pm 0.006$  para el tiempo de correlación rotacional más corto,  $f_1$ , y  $0.61 \pm 0.05$  para el más largo,  $f_2$ . El valor de  $f_{1,0}$  se midió experimentalmente y se fijó en el ajuste (ver *Resultados 5.3.1*), sin embargo,  $f_{2,0}$  no se pudo medir experimentalmente de modo que se obtuvo a partir del ajuste. El valor de  $f_{2,0}$  obtenido del ajuste,  $22 \pm 2$  ns es del mismo orden que el valor publicado para el tiempo de correlación rotacional de la apohemoglobina marcada con ANS en tampón fosfato,  $22.34 \pm 0.75$  ns (Sassaroli et al, 1986)



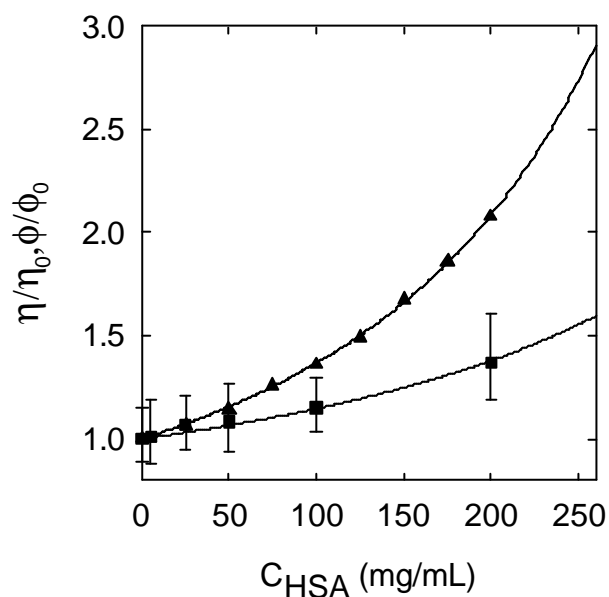
**Figura 5.25:** Incremento de la viscosidad macroscópica relativa (triángulos) y de los tiempos de correlación rotacional  $f_1$  (cuadrados rellenos) y  $f_2$  (cuadrados vacíos) relativos determinados para apoMb-ANS (ver Resultados 5.3.2.1) con la concentración de RNasa A en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C. Las líneas continuas corresponden a los ajustes de los datos experimentales a la ecuación de Mooney (5.11) para la viscosidad macroscópica y a la ecuación (5.12) para los tiempos de correlación rotacional. El subíndice 0 indica el valor de la magnitud correspondiente en tampón.

#### 5.4.2.2. Apomioglobina en presencia de altas concentraciones de albúmina sérica humana

Como resultado del análisis de los experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de muestras de apoMb-FI en presencia de HSA se obtuvieron dos tiempos de correlación rotacional, uno de 0.2 ns correspondiente al movimiento segmental de la fluoresceína y otro más largo que correspondería al movimiento global de la apoMb (ver *Tabla 5.9*). El tiempo de correlación rotacional más corto permanece inalterado al aumentar la concentración total de HSA o, lo que es lo mismo, no es sensible al aumento de la viscosidad macroscópica producido por la adición de HSA. Este resultado estaría indicando que la difusión restringida de la fluoresceína en el microentorno de la apoMb no se afecta por la presencia en el medio de una alta

concentración de moléculas de HSA. Sin embargo, el tiempo de correlación rotacional correspondiente al movimiento global de la apoMb se ve más afectado por el aumento de la concentración de HSA. Como se puede observar en la *Figura 5.26*, el aumento del tiempo de rotación con la concentración de HSA es inferior al que se produciría si los tiempos de correlación rotacional obtenidos fueran proporcionales a la viscosidad macroscópica para cada concentración de HSA.

También en este caso, la variación obtenida para el tiempo de difusión rotacional correspondiente al movimiento global de la apoMb-FI con la concentración de HSA, se ajustó satisfactoriamente a la ecuación (5.12) (*Figura 5.26*). El valor obtenido para el factor  $q$  fue  $0.44 \pm 0.02$ .



**Figura 5.26:** Incremento de la viscosidad macroscópica relativa (triángulos) y del tiempo de correlación rotacional  $f_2$  (cuadrados) relativo determinado para apoMb-FI (ver Resultados 5.3.3) con la concentración de HSA en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C. Las líneas continuas corresponden a los ajustes a la ecuación de Mooney (5.11) para la viscosidad macroscópica y a la ecuación (5.12) para los tiempos de correlación rotacional. El subíndice 0 indica el valor de la magnitud correspondiente en tampón.

### 5.4.3. Difusión translacional y viscosidad local de apomioglobina en soluciones de ribonucleasa A y de albúmina sérica humana

El objetivo en esta parte del trabajo ha sido estudiar el efecto de la alta concentración de proteína presente en los sistemas con aglomeración macromolecular sobre la difusión translacional de las especies presentes en dichos medios desde un punto de vista microscópico. La técnica elegida para el estudio de la difusión translacional de la apoMb en soluciones con alta concentración de RNasa A o de HSA, fue la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS).

Para las muestras en las que la proteína que estaba presente con alta concentración era la RNasa A, fue posible realizar medidas a dos longitudes de onda de excitación: 488 y 543 nm. Para las medidas a 488 nm se prepararon muestras con apoMb-Alexa 488 mientras que para las medidas a 543 nm se prepararon muestras con apoMb-Alexa 546. En el caso de las muestras en las que la proteína concentrada era HSA, la elevada intensidad de fluorescencia de las impurezas de la HSA cuando se excitaba a 488 nm saturaba el detector, lo que hizo inviables las medidas a esa longitud de onda de excitación, por lo que sólo se realizaron medidas a 543 nm.

Experimentos de equilibrio de sedimentación realizados con muestras de apoMb-Alexa 488 y apoMb-Alexa 546 a concentraciones de proteína en torno a 1 mg/mL en tampón, permitieron determinar pesos moleculares idénticos a los encontrados para la apoMb, lo que indica que ninguna de estas dos sondas produce ningún tipo de fragmentación o autoasociación de la apoMb.

Las funciones de autocorrelación obtenidas experimentalmente se ajustaron satisfactoriamente a un modelo simple (modelo 1) (ecuación (4.25), ver *Materiales y Métodos 4.6.2*) en el que la variación de la fluorescencia en el elemento de volumen se debe a la difusión de una sola especie. Dicho modelo incluía las correcciones debidas a la contribución de la población y despoblación del estado triplete de la sonda.

Tanto la RNasa A como la HSA contienen trazas de impurezas fluorescentes. Sin embargo, como ya se vio en *Materiales y Métodos 4.6.2*, la contribución de una impureza fluorescente a la función de autocorrelación no es trivial y depende de dos factores. Por un lado depende de la relación entre la intensidad total de fluorescencia del fluoróforo de interés y de la impureza en la muestra objeto de estudio y por otro, de la relación entre la intensidad de fluorescencia por molécula (brillo) del fluoróforo y de la impureza. En la *Tabla 5.11* se muestran los valores de la intensidad de

fluorescencia y de la intensidad de fluorescencia por unidad de molécula para varias muestras y sus fondos correspondientes. Para evaluar la contribución de las trazas de impurezas fluorescentes a la función de autocorrelación, se obtuvo para cada muestra la función de autocorrelación correspondiente a su fondo (RNasa A o HSA a la concentración apropiada). Dicha función se analizó utilizando el modelo de difusión de una sola especie (modelo 1, ecuación (4.25)) para obtener el tiempo de difusión translacional correspondiente a las impurezas. Finalmente se realizó un segundo análisis de las funciones de autocorrelación obtenidas para cada muestra utilizando el modelo que tiene en cuenta el fondo (ecuación (4.26), ver *Materiales y Métodos 4.6.2*). En este modelo (modelo 2), se fijó el tiempo de difusión translacional obtenido para las impurezas como resultado del análisis de la función de autocorrelación del fondo.

En las *Figuras 5.27, 5.28 y 5.29* se muestran las funciones de autocorrelación obtenidas para distintas muestras de apoMb-Alexa 488 y apoMb-Alexa 546 en presencia de altas concentraciones de RNasa A y HSA. En dichas figuras se muestran también los ajustes de las funciones de autocorrelación obtenidas utilizando el modelo 2 arriba indicado. En todos los casos, incluso para las muestras de mayor concentración de HSA o RNasa A, los ajustes a los modelos 1 y 2 y los tiempos de difusión translacional de la apoMb determinados a partir del ajuste de los datos experimentales a ambos modelos, son indistinguibles. Sorprendentemente, estos resultados indican que el fondo no contribuye significativamente en ningún caso de los analizados a la función de autocorrelación. Este efecto despreciable del fondo no es evidente si se observa la contribución de dicho fondo a la intensidad de fluorescencia total, que en algunos casos es superior al 60 %. Sin embargo, hay que resaltar que el brillo del fluoróforo es más de 6 veces mayor que el correspondiente al fondo y la contribución de este parámetro a la función de autocorrelación es proporcional al cuadrado de su valor.

Por otro lado, el brillo obtenido para soluciones de apoMb-Alexa 488 o apoMb-Alexa 546 en presencia de altas concentraciones de proteína (HSA o RNasa A) no es el mismo que en solución diluida, sino apreciablemente menor. Esto se debe a que la fluorescencia por unidad de molécula que se obtiene para estas muestras es un promedio del brillo de cada molécula pesado por el número de moléculas de cada tipo. En estas muestras, en el elemento de volumen tenemos dos tipos de moléculas, las de apoMb-Alexa 488 o apoMb-Alexa 546, que tienen un brillo mayor pero que son menos abundantes y las de las impurezas fluorescentes (de la RNasa A o de la HSA), que son apreciablemente menos brillantes, pero mucho más abundantes.

**Tabla 5.11:** Intensidad de fluorescencia ( $I_i$ ) y fluorescencia por unidad de molécula ( $n_i$ ) para varios fluoróforos y sus fondos correspondientes. Los subíndices  $T$  y  $B$  hacen referencia al fluoróforo de interés o trazador y a las impurezas que constituyen el fondo respectivamente.

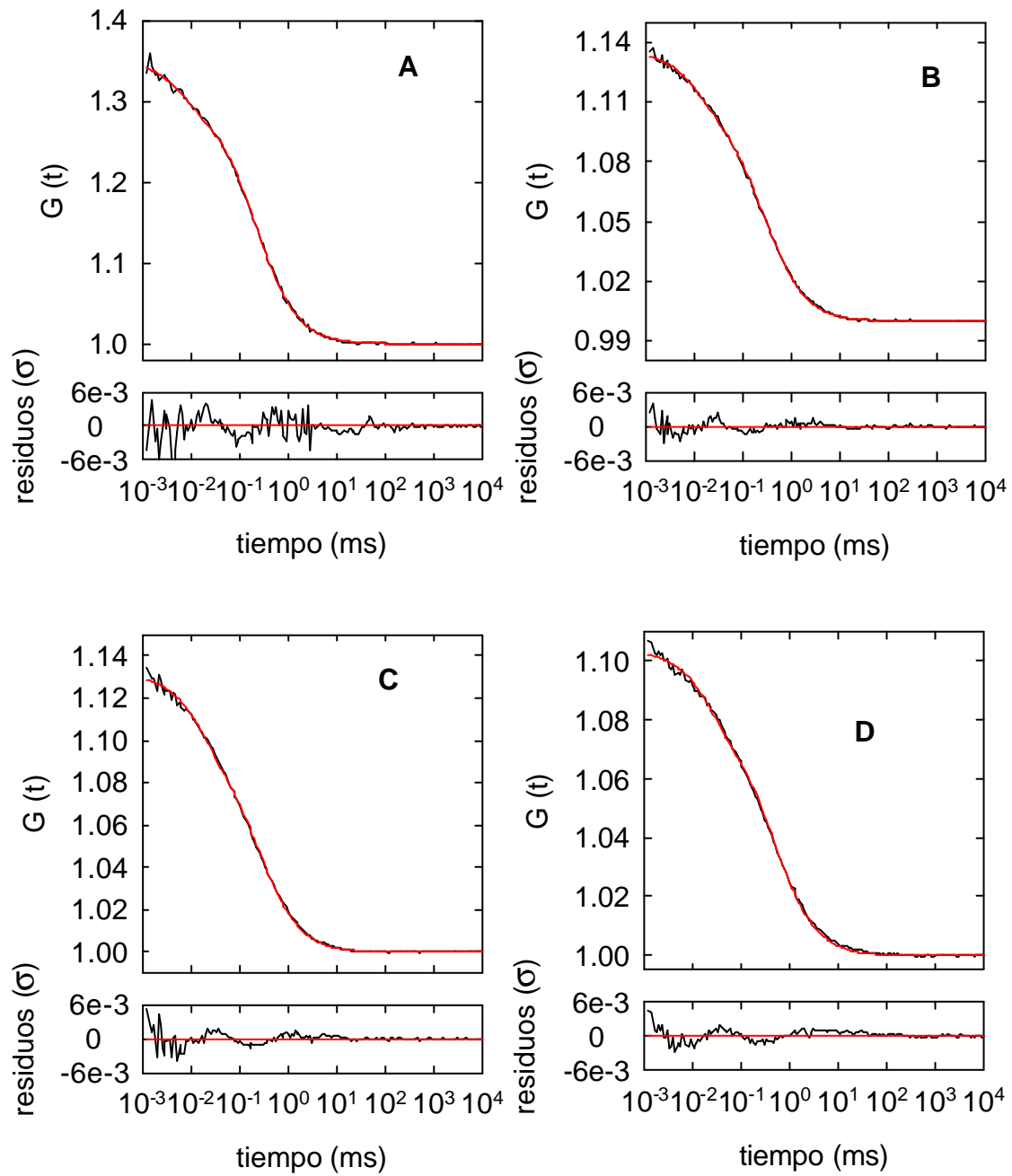
Proteína altamente concentrada (250 mg/mL)	Fluoróforo (concentración)	$I_T$ (kHz)	$I_B$ (kHz)	$n_T$ (kHz)	$n_B$ (kHz)
RNasa A	apoMb-Alexa 488 (20 nM)	190	70	23	3.5
RNasa A	apoMb-Alexa 546 (50 nM)	100	14	23	3.5
HSA	apoMb-Alexa 546 (25 nM)	130	80	23	3

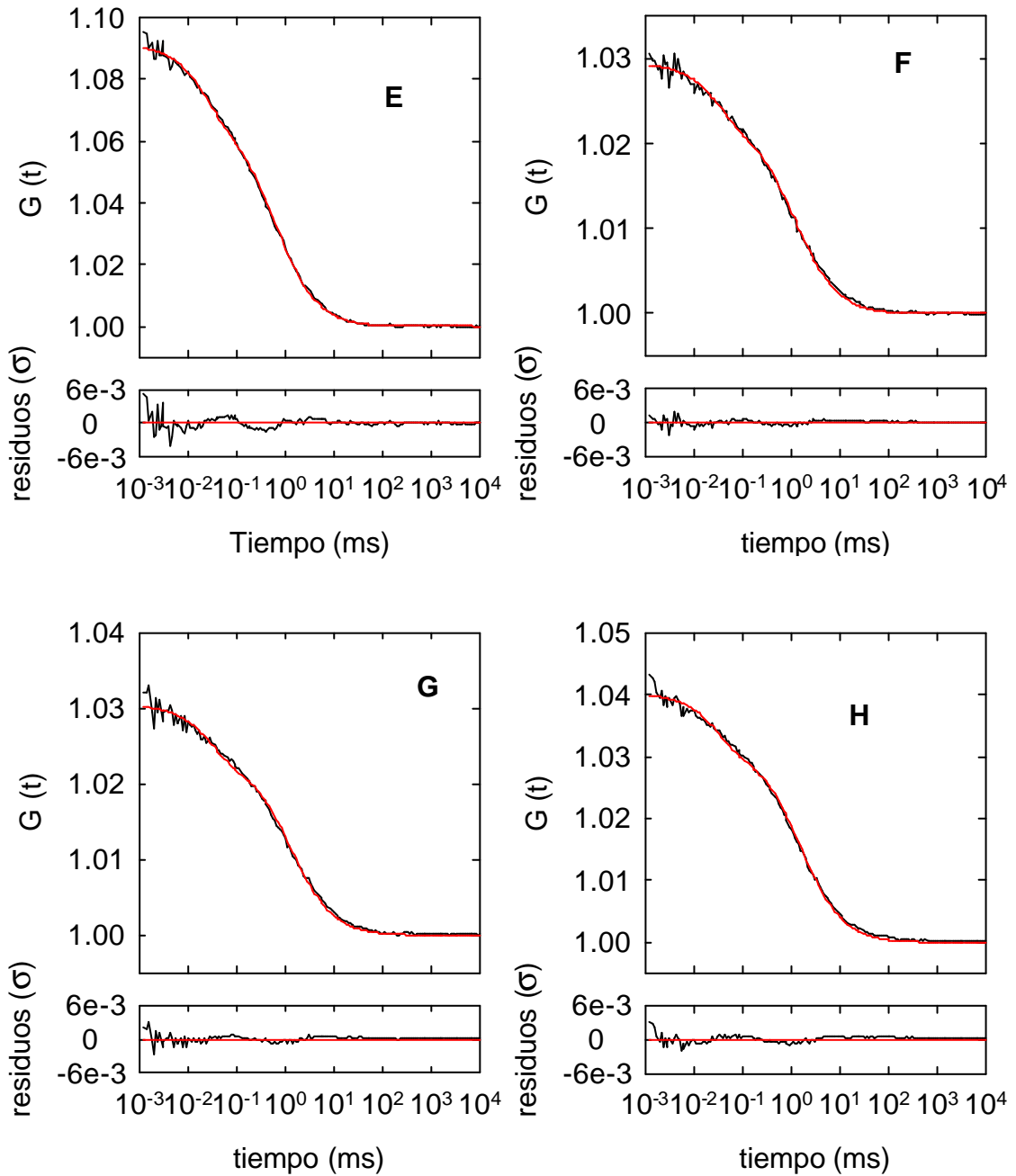
Los tiempos de difusión translacional determinados para apoMb-Alexa 488 o apoMb-Alexa 546 a cada concentración de RNasa A o HSA se representan en la *Figura 5.30*. Como se puede ver, en el caso de las soluciones de RNasa A, los valores de los tiempos de difusión translacional obtenidos para muestras de apoMb-Alexa 488 y apoMb-Alexa 546 fueron comparables dentro del error experimental. El aumento que se produce en el tiempo de difusión translacional con la concentración de RNasa A o HSA es, en todos los casos, superior al estimado si dicho tiempo fuera proporcional a la viscosidad macroscópica de la solución.

La variación de los tiempos de difusión translacional de apoMb determinados experimentalmente con la concentración de RNasa A o de HSA se ajustó satisfactoriamente a una ecuación análoga a la (5.12):

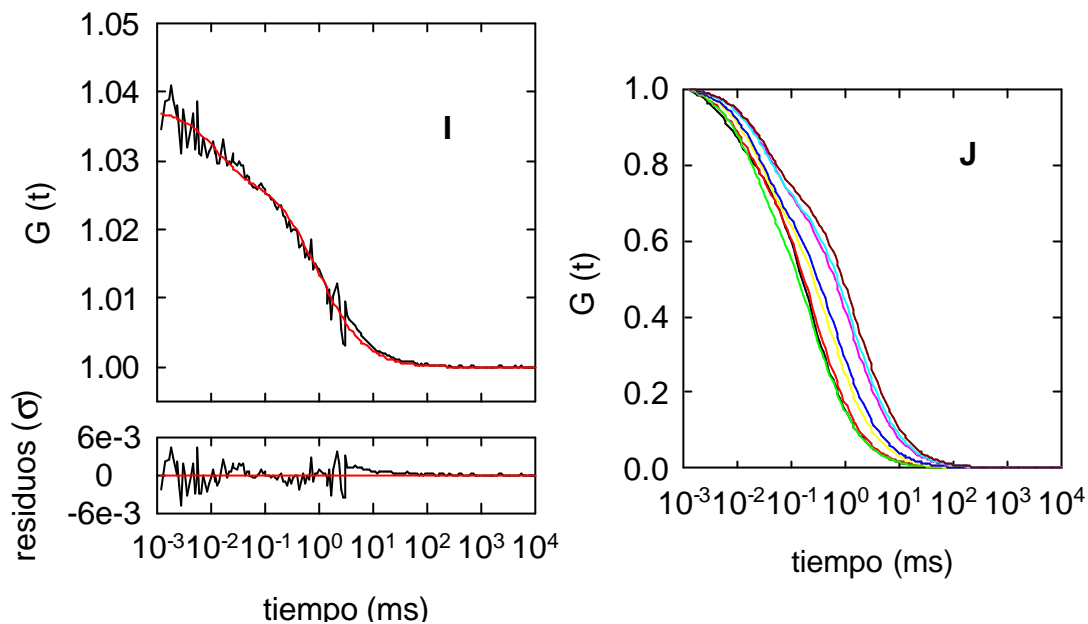
$$\frac{T_i}{T_{i,0}} = \exp\left(\frac{Aqc}{1 - Bc}\right) \quad (5.13)$$

donde  $T_i$  es el tiempo de difusión translacional obtenido para apoMb a cada concentración de RNasa A o HSA,  $T_{i,0}$  es el tiempo de difusión translacional que se obtendría para apoMb en tampón,  $q$  es un factor empírico y  $A$ ,  $B$  y  $c$  son las mismas magnitudes que en la ecuación de Mooney (5.11). Los valores de  $q$  obtenidos fueron  $1.35 \pm 0.04$  para apoMb en soluciones de RNasa A y  $1.28 \pm 0.04$  para apoMb en soluciones de HSA. El valor de  $T_{i,0}$  se midió experimentalmente y se fijó en el ajuste, el valor obtenido fue  $195 \pm 5 \mu\text{s}$ .

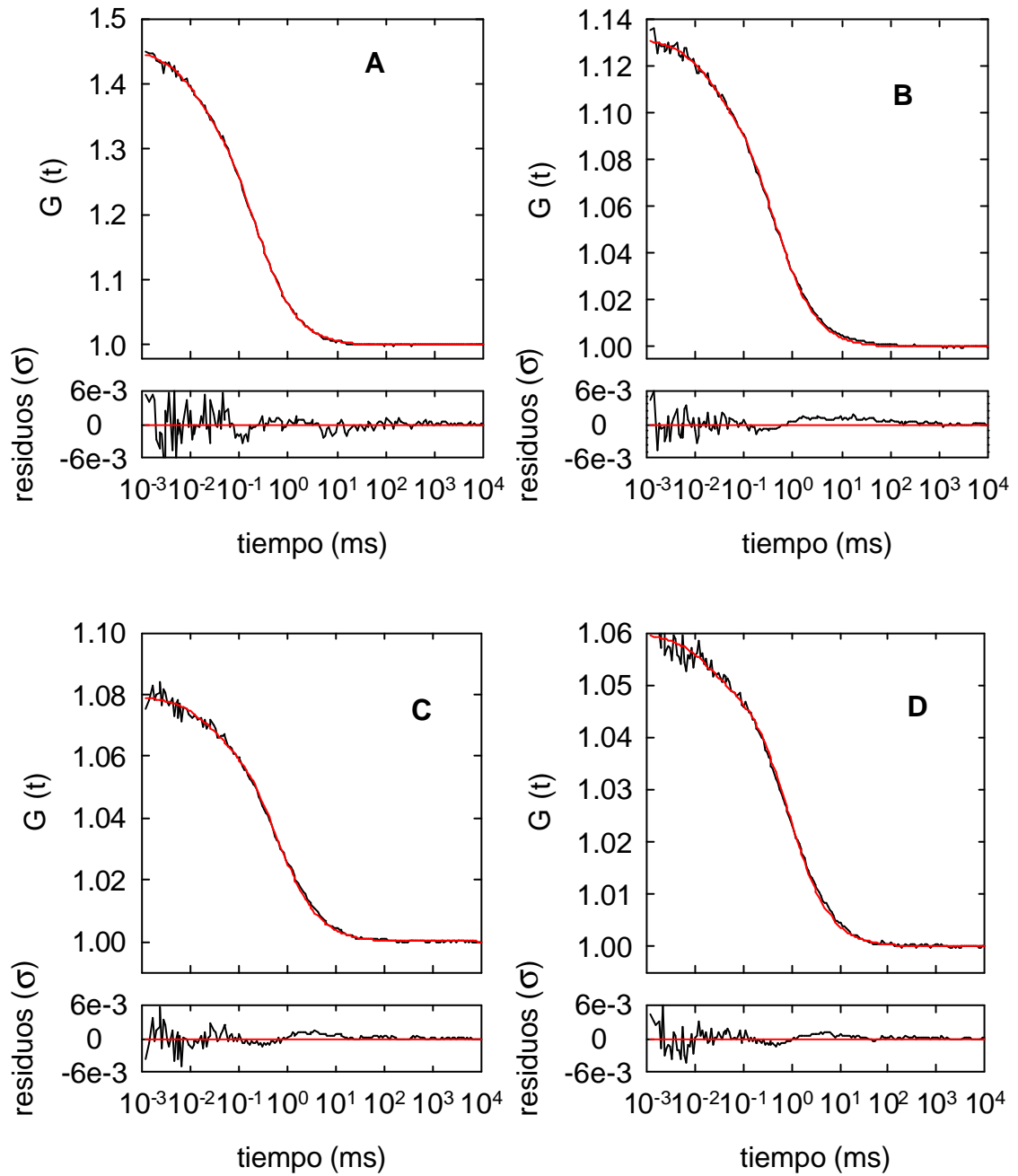


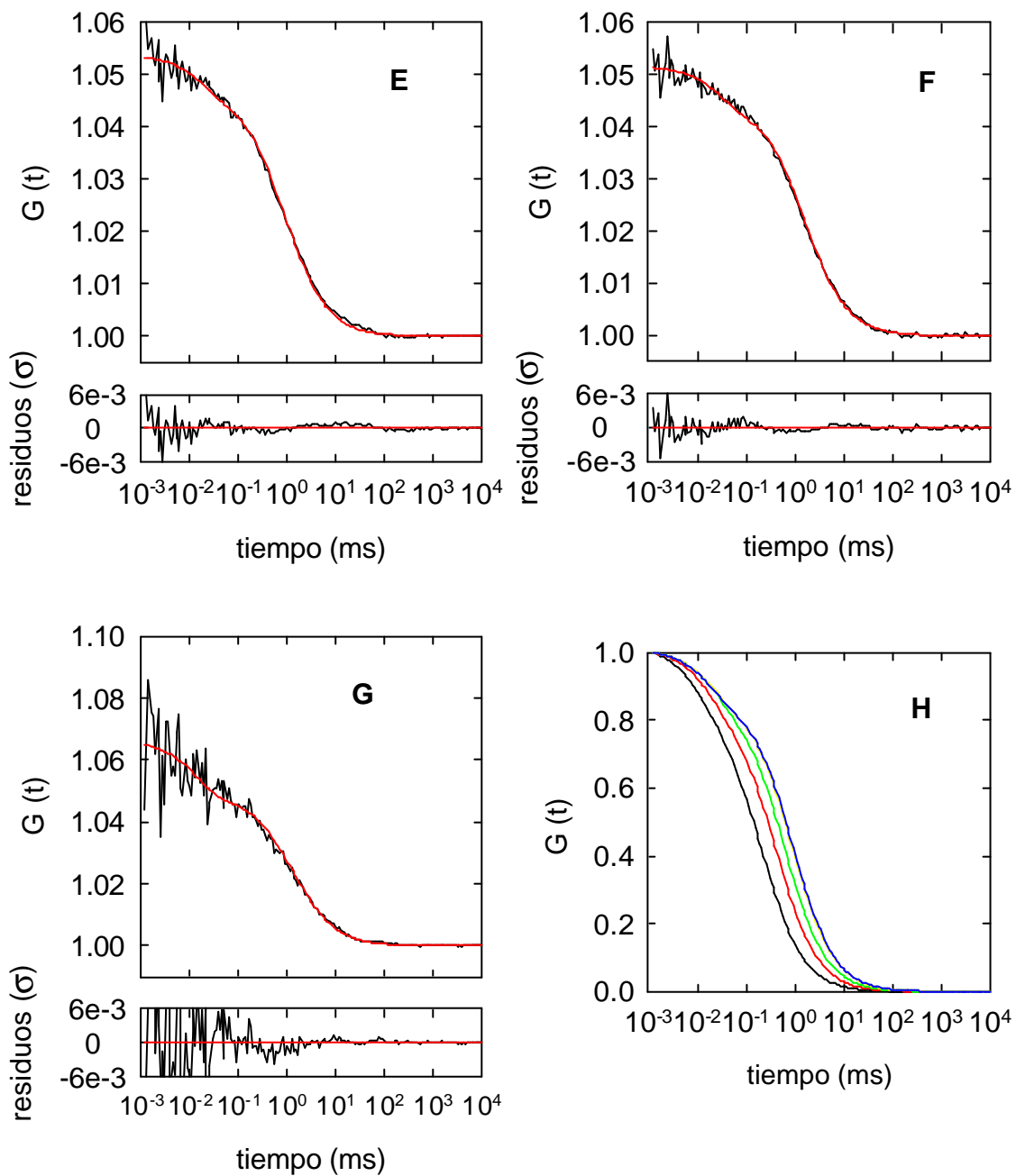




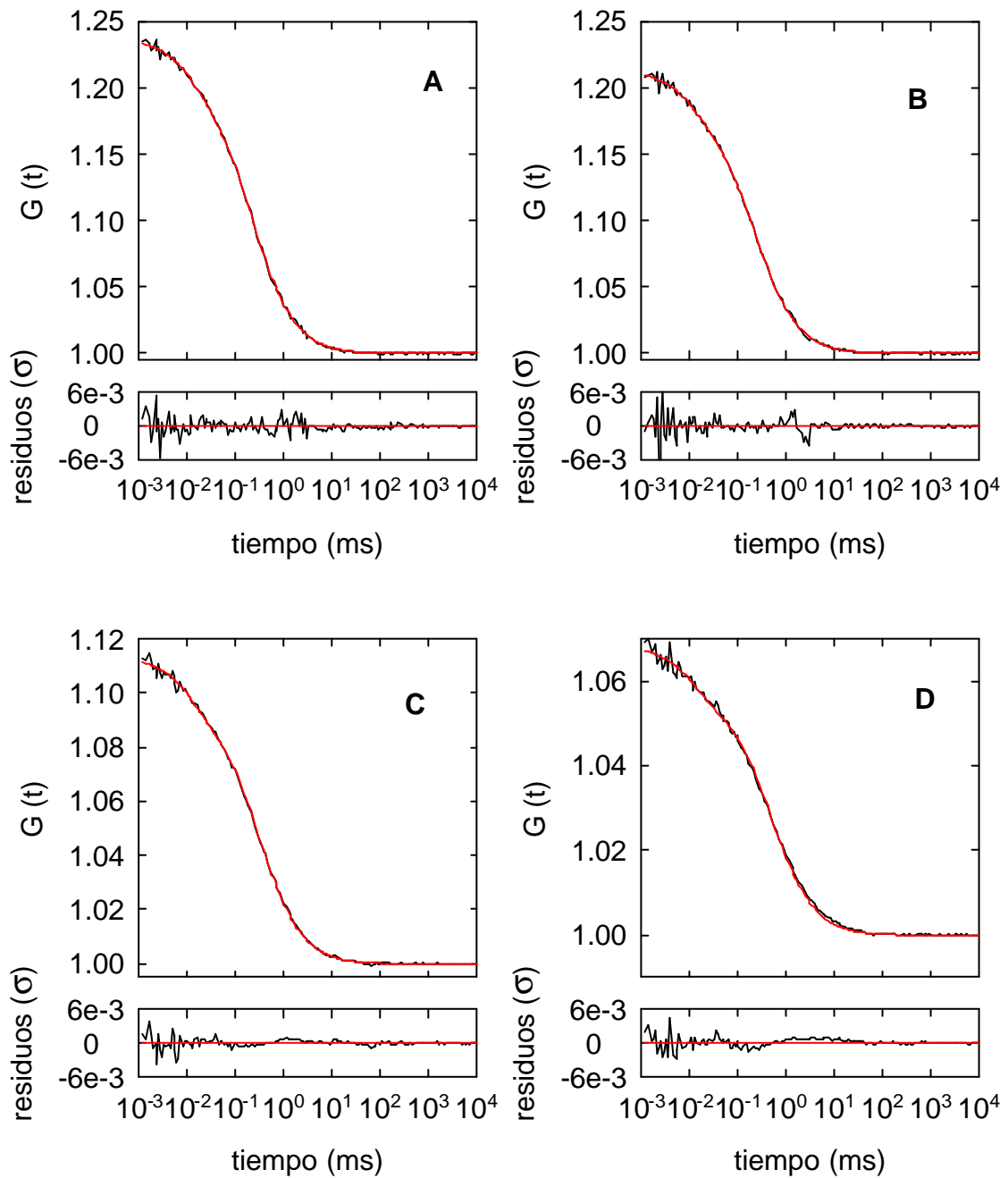


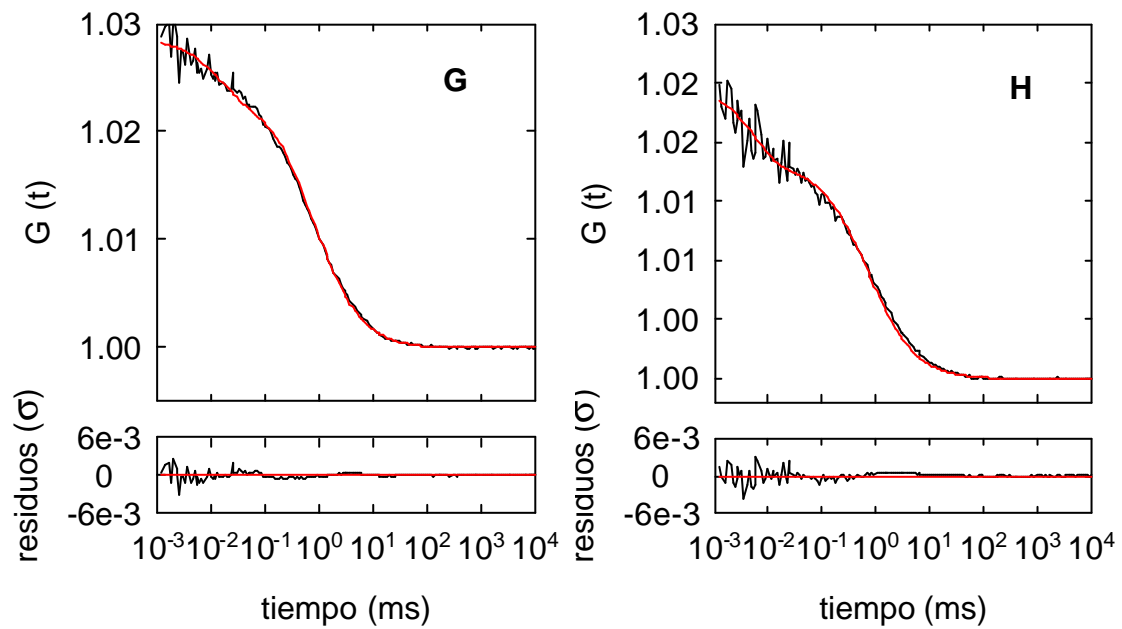
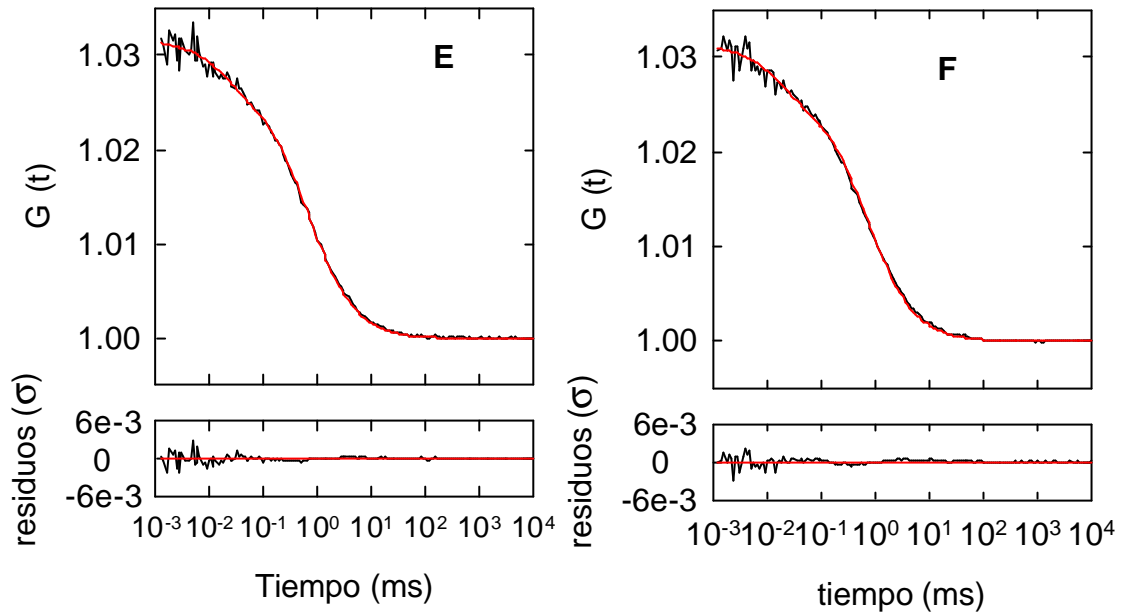
**Figura 5.27:** Funciones de autocorrelación obtenidas para apoMb-Alexa 488 en ausencia de RNasa A (A) y en presencia de 25 mg/mL (B), 50 mg/mL (C), 100 mg/mL (D), 150 mg/mL (E), 200 mg/mL (F), 225 mg/mL (G) y 250 mg/mL (H) de RNasa A. En I se presenta la función de autocorrelación obtenida para 250 mg/mL de RNasa A y en J los ajustes normalizados de la función de autocorrelación para apoMb-Alexa 488 con las distintas concentraciones de RNasa A indicadas en los paneles anteriores (0 negro, 25 rojo, 50 verde, 100 amarillo, 150 azul oscuro, 200 rosa, 225 azul claro y 250 rojo oscuro). Los ajustes presentados corresponden al modelo 2, que tiene en cuenta la contribución del fondo (ecuación (4.26)). La longitud de onda de excitación fue 488 nm. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

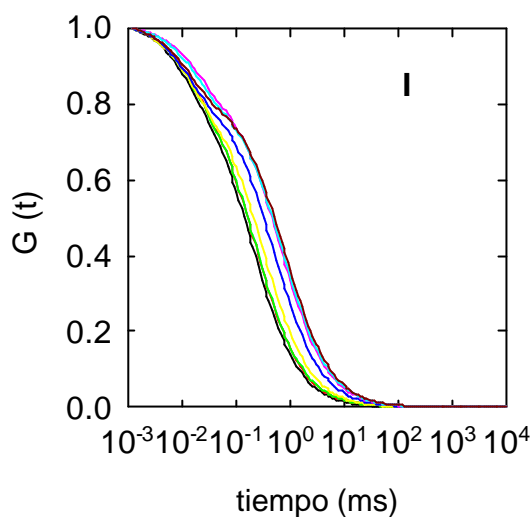




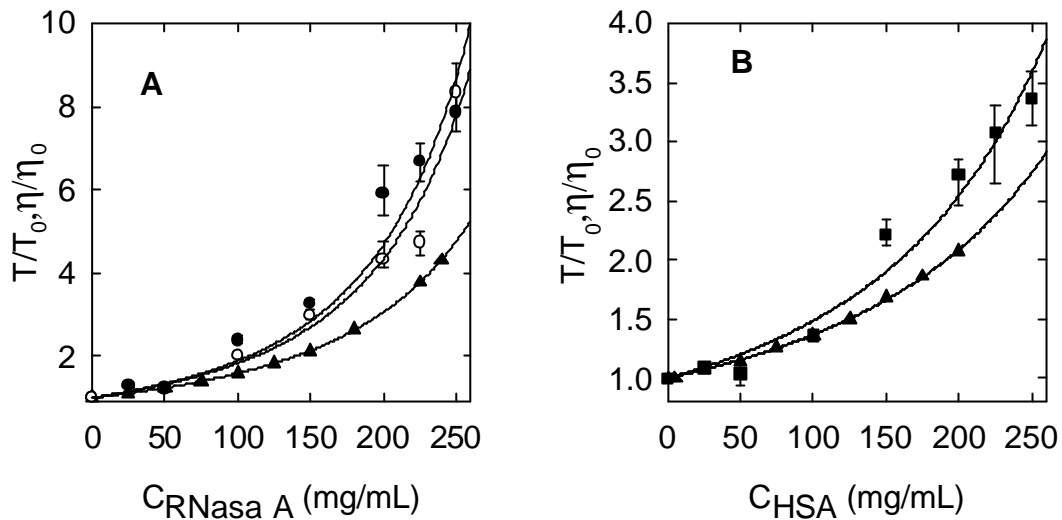
**Figura 5.28:** Funciones de autocorrelación obtenidas para apoMb-Alexa 546 en ausencia de RNasa A (A) y en presencia de 100 mg/mL (B), 150 mg/mL (C), 200 mg/mL (D), 225 mg/mL (E), 250 mg/mL (F), de RNasa A. En el panel G se presenta la función de autocorrelación obtenida para 250 mg/mL de RNasa A y en el panel H los ajustes normalizados de la función de autocorrelación para apoMb-Alexa 546 con las distintas concentraciones de RNasa A indicadas en los paneles anteriores (0 negro, 100 rojo, 150 verde, 200 amarillo, 225 azul oscuro, 250 rosa). Los ajustes presentados corresponden al modelo 2, que tiene en cuenta la contribución del fondo (ecuación (4.26)). La longitud de onda de excitación fue 543 nm. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.







**Figura 5.29:** Funciones de autocorrelación obtenidas para apoMb-Alexa 546 con 25 mg/mL (A), 50 mg/mL (B), 100 mg/mL (C), 150 mg/mL (D), 200 mg/mL (E), 225 mg/mL (F) y 250 mg/mL (G) de HSA. En H se presenta la función de autocorrelación obtenida para 250 mg/mL de HSA A y en I los ajustes normalizados de la función de autocorrelación para apoMb-Alexa 546 con las distintas concentraciones de HSA indicadas en los paneles anteriores (25 negro, 50 rojo, 100 verde, 150 amarillo, 200 azul oscuro, 225 rosa, 250 azul claro). Los ajustes presentados corresponden al modelo 2, que tiene en cuenta la contribución del fondo (ecuación (4.26)). La longitud de onda de excitación fue 543 nm. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.



**Figura 5.30:** A: Incremento de la viscosidad macroscópica relativa (triángulos) y del tiempo de difusión translacional relativo para muestras de apoMb-Alexa 488 (círculos rellenos) o de apoMb-Alexa 546 (círculos vacíos) con la concentración de RNasa A. B: Incremento de la viscosidad macroscópica relativa (triángulos) y del tiempo de difusión translacional relativo para muestras de apoMb-Alexa 546 (cuadrados rellenos) con la concentración de HSA. Las líneas continuas corresponden a los ajustes a la ecuación de Mooney (5.11) para la viscosidad macroscópica y a la ecuación (5.13) para los tiempos de difusión translacional. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C. El subíndice 0 indica el valor de la magnitud correspondiente en tampón.

## *6. Discusión*

---



## **6.1. PROPIEDADES DE ASOCIACIÓN DE LA APOMIOGLOBINA EN PRESENCIA DE PROTEÍNAS AGLOMERANTES: RIBONUCLEASA A Y ALBÚMINA SÉRICA HUMANA**

### **6.1.1. Ventajas de los fluoróforos ANS y fluoresceína para la realización de estudios hidrodinámicos de anisotropía de fluorescencia**

Los estudios de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal de la apoMb, tanto en solución diluida como en presencia de otras proteínas, se han realizado alternativamente con muestras en las que la apoMb estaba marcada con ANS o con fluoresceína, dependiendo de las características de cada experimento.

La elección del ANS como sonda para la realización de estudios hidrodinámicos de soluciones de la apoMb se basa en su tiempo de vida media de fluorescencia, más largo que el de sondas como la fluoresceína, que hacen del ANS una sonda apropiada para el estudio de la rotación de especies del tamaño de los dímeros de apoMb. Por otro lado, el ANS, se une al sitio hidrofóbico de la apoMb de tal forma que no presenta movimientos locales que contribuyan a la despolarización de la emisión de fluorescencia, lo que facilita la interpretación de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia. Sin embargo, al ser su unión a la apoMb de tipo no covalente, su uso es inviable en soluciones en las que, además de la apoMb, alguna de las especies presentes en el sistema contiene sitios de unión de esta sonda, como sucede en el caso de la HSA. En los experimentos de ultracentrifugación, el uso de esta sonda es también limitado ya que debido a su unión no covalente a la proteína, la emisión de fluorescencia depende no sólo de la concentración de proteína sino también de la constante de unión del ANS a la apoMb.

El fluoróforo fluoresceína, se eligió para el marcaje covalente de la apoMb debido a su elevado coeficiente de absorción y rendimiento cuántico de fluorescencia. Además, la fluoresceína es un fluoróforo muy sensible a las propiedades electrostáticas del medio. La ventaja que presenta frente al ANS es que su unión a la proteína es covalente y por tanto puede ser utilizado en presencia de proteínas como la HSA o bien en experimentos de ultracentrifugación. Las mayores desventajas de esta sonda son su reducido tiempo de vida media de fluorescencia y su movimiento segmental, que contribuye significativamente a la despolarización de la fluorescencia, lo que reduce la precisión en la medida de los tiempos de correlación correspondientes al movimiento global de la apoMb-FI.

### 6.1.2. Equivalencia de las estructuras de apoMb-ANS y apoMb-FI en solución diluida

**Interpretación de los tiempos de vida media determinados para apoMb-ANS y apoMb-FI en solución diluida.** Tanto las soluciones de apoMb-ANS como de apoMb-FI presentan decaimientos de intensidad de fluorescencia multiexponenciales, con dos y tres tiempos de vida media de fluorescencia, respectivamente (ver *Resultados* 5.3.1.1 y 5.3.1.2). En las muestras de apoMb-FI la explicación de este comportamiento multiexponencial es más sencilla, ya que el fluoróforo fluoresceína puede encontrarse en distintos entornos dentro de la proteína al tratarse de un marcaje de tipo no específico. Sin embargo, en las muestras de apoMb-ANS, la interpretación no es tan evidente, ya que el ANS se une al sitio altamente apolar que deja la eliminación del grupo hemo en la apoMb, con una estequiometría 1:1 (Stryer, 1965), de modo que los dos tiempos de vida media resueltos no se pueden asignar a dos sitios de unión diferentes dentro de la proteína con entornos diferentes para la sonda. Sin embargo, la componente corta que se obtiene ha sido observada con anterioridad en los decaimientos de intensidad de fluorescencia del ANS, así como de otros naftalenos sustituidos, tanto unidos a proteínas como en mezclas de agua y solventes orgánicos. Solamente en solventes orgánicos puros, el fluoróforo ANS muestra un decaimiento monoexponencial (Robinson et al, 1978). Una posible explicación de este tiempo de vida media más corto sería la solvatación de la sonda dentro del bolsillo hidrofóbico de la proteína (Sassaroli et al, 1984).

**Comportamiento hidrodinámico del monómero de apoMb en solución.** Los tiempos de correlación rotacional determinados en este trabajo correspondientes al movimiento global de la apoMb son  $9 \pm 0.2$  ns para la apoMb-ANS y  $9.9 \pm 1.3$  ns para la apoMb-FI (ambos para una concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M). El error en la medida del tiempo de correlación rotacional global de la muestra de apoMb-FI es mayor que el asociado a las muestras de apoMb-ANS debido fundamentalmente a dos factores. En primer lugar, el tiempo de vida media de fluorescencia de apoMb-ANS ( $\langle t \rangle_1 = 13.3$  ns) es del orden de 5 veces mayor que el de apoMb-FI ( $\langle t \rangle_1 = 2.5$  ns). En segundo lugar, la fluoresceína unida a la apoMb presenta movimientos segmentales que contribuyen de forma muy significativa a la despolarización de fluorescencia en la primera parte del decaimiento. En general, la presencia de movimientos segmentales disminuye el grado de resolución de los decaimientos de anisotropía en la zona de

tiempos más largos, que es de donde se obtienen los parámetros hidrodinámicos correspondientes al movimiento global de la apoMb.

Medidas experimentales de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal, en las que se utilizaba la fluorescencia intrínseca de la apoMb debida a sus dos residuos de triptófano (Tcherkasskaya et al, 2000), proporcionan valores del tiempo de correlación rotacional asociado al movimiento global de la apoMb a 25 °C (viscosidad 0.89 cP) de  $7.3 \pm 1$  ns. En el presente trabajo, las medidas de los coeficientes de correlación rotacional se han realizado a 20 °C en un tampón de viscosidad 1.03 cP (calculada con el programa SEDNTERP (obtenido del servidor de RASMB, Laue et al, 1992)). Haciendo la correspondiente corrección por la viscosidad, el tiempo de correlación rotacional de  $7.3 \pm 1$  ns determinado a 25 °C, tendría un valor de  $9.3 \pm 1$  ns a 20 °C, que coincide dentro del error con los tiempos de correlación rotacional medidos experimentalmente en este trabajo. Finalmente, los valores obtenidos no difieren esencialmente de los medidos por ésta y otras técnicas para Mb (Wang et al, 1997).

Si la apoMb se comportara desde el punto de vista hidrodinámico como una esfera rígida de masa 17000 Da en nuestras condiciones de trabajo (20 °C y  $\eta = 1.03$  cP), el tiempo de correlación rotacional que le correspondería calculado con la ecuación (3.13) (ver *Fundamento Teórico 3.1.2.3*) sería de 7.0 ns (suponiendo un grado de hidratación de 0.23 g de agua/g de proteína). Los tiempos determinados experimentalmente son ligeramente mayores, lo que indicaría una desviación con respecto a la forma esférica o un grado de hidratación superior al indicado.

Si se asume que la molécula de apoMb tiene la forma de un elipsoide de revolución prolato con una relación axial de aproximadamente 2 (Tcherkasskaya et al, 2000), en lugar de un único tiempo de correlación rotacional, teóricamente, deberían obtenerse tres tiempos de correlación rotacional  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  y  $\tau_3$ , que dependen de los dos coeficientes de difusión rotacional  $D_{||}$  y  $D_{\perp}$  (ver *Fundamento Teórico 3.1.2.5*). Sin embargo, para relaciones axiales menores o iguales que 2, esos tres tiempos no son muy diferentes y lo que se determina experimentalmente es un promedio. Los valores de los coeficientes de difusión rotacional  $D_{||}$  y  $D_{\perp}$  se han estimado (Cantor y Schimmel, 1980) para una relación axial de 2 utilizando un valor del parámetro de Simha de 2.908 (Simha, 1940) y la viscosidad intrínseca de la apoMb  $[\eta] = 3.4 \pm 0.4 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$  (Griko et al, 1988). Los valores de  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  y  $\tau_3$ , estimados a partir de  $D_{||}$  y  $D_{\perp}$  son 8.0 ns, 11.1 ns y 12.7 ns respectivamente. La contribución de los tres tiempos de correlación rotacional

al decaimiento de anisotropía y por tanto al valor promedio determinado experimentalmente, depende de la orientación relativa del momento dipolar de emisión del fluoróforo con respecto al eje de revolución del elipsoide.

El marcado fluorescente de la apoMb con fluoresceína es de tipo no específico, de modo que se puede suponer que la sonda está distribuida al azar en la proteína. Para el caso en que la sonda está distribuida al azar, el valor del tiempo de correlación rotacional promedio que se determinaría experimentalmente se puede estimar a partir de las dimensiones del elipsoide  $\langle f \rangle = \frac{1}{4D_{\perp} + 2D_{\parallel}}$  (Lillo, Tesis doctoral, 1985). En el

caso de la apoMb, el valor del tiempo de correlación rotacional promedio que se obtendría sería de 9.8 ns, que coincide en muy buena aproximación con el obtenido experimentalmente para apoMb-FI. En la apoMb-ANS, la sonda tiene una localización y orientación específicas en la proteína. El hecho de que el tiempo de correlación rotacional determinado experimentalmente para apoMb-ANS se aproxime al valor estimado para  $f_{\parallel}$ , estaría indicando que el momento dipolar de emisión del ANS está formando un ángulo menor que  $90^{\circ}$  con el eje de revolución del elipsoide.

Los tiempos de correlación rotacional global de apoMb-ANS y de apoMb-FI en solución diluida a concentraciones menores iguales que  $10^{-4}$  M son compatibles con una molécula de apoMb ligeramente asimétrica, del tamaño de un monómero de apoMb. Las diferencias observadas en los valores experimentales pueden explicarse por una diferente orientación de los momentos dipolares de los fluoróforos en apoMb-ANS y en apoMb-FI.

### **Conformación del monómero de apoMb marcado con fluoresceína o con ANS.**

La capacidad de unión del fluoróforo ANS por parte de la apoMb, se utiliza comúnmente como diagnóstico de posibles cambios en la estructura de la dicha proteína (Bismuto, et al, 1996). Así, un cambio en la estructura que implicara la desorganización de la región de unión del grupo hemo, daría lugar a una pérdida de la capacidad de unión de ANS. Los resultados presentados en el apartado 5.3.1.3 indican que la apoMb-FI une ANS y, además, con una constante de unión aproximadamente del mismo orden de la observada para apoMb sin marcar con fluoresceína. Por otro lado, el comportamiento espectroscópico de la fluoresceína, a longitudes de onda de excitación a las que no existe absorción del ANS, son idénticas en apoMb-FI con y sin ANS unido. Estos resultados indican, por un lado, que el marcaje de la apoMb con fluoresceína no produce cambios importantes en su

estructura, al menos no en la zona del bolsillo hidrofóbico de unión del grupo hemo y, por otro lado, que el microentorno de la fluoresceína es muy similar en la apoMb-FI en presencia y en ausencia de ANS unido, lo cual parece sugerir que las conformaciones de la apoMb en ambos casos no son muy distintas. Los resultados obtenidos a partir de los experimentos anisotropía de fluorescencia, así como de ultracentrifugación analítica, parecen indicar que la presencia de la fluoresceína en la apoMb no induce ninguna tendencia a la autoasociación en solución diluida, al menos a concentraciones totales de apoMb menores o iguales que  $10^{-4}$  M.

En las condiciones de pH en las que se han realizado los experimentos descritos en este trabajo (pH 7.4), la apoMb se encuentra en su estado nativo. El estado nativo de la apoMb, aunque presenta un menor contenido de hélice  $\alpha$  que la Mb, retiene la mayor parte de los motivos estructurales de ésta, es decir, un corazón hidrofóbico estable y compacto y un dominio más desordenado (Haouz et al, 1998, Hughson et al, 1990; Cocco y Lecomte, 1994; Johnson y Walsh, 1994; Barrik y Baldwin, 1993). Estudios recientes han detectado en la apoMb nativa características similares a las que se encuentran en un glóbulo fundido, que la hacen menos estable y compacta que la Mb (Tanaka et al, 2000; Griko et al, 1988), aunque no se trata de una proteína desordenada. La correlación encontrada entre las propiedades del estado de glóbulo fundido y la estructura nativa de la apoMb, sugiere que dicha estructura nativa se encuentra fluctuando entre varias conformaciones diferentes (Lin et al, 1994). Los pequeños cambios observados en la contribución de los tiempos de vida media de fluorescencia, así como el sutil aumento de la restricción del movimiento segmental de la fluoresceína en las muestras de apoMb-FI a medida que aumenta la concentración de apoMb (ver *Resultados 5.3.1.2*), podrían ser debidos pequeños cambios en las proporciones de las distintas conformaciones de la apoMb que se encuentran en equilibrio.

En conclusión, la conformación global de las proteínas marcadas con sondas fluorescentes apoMb-ANS y apoMb-FI no es diferente de la de apoMb de acuerdo con nuestros datos experimentales.

### 6.1.3. Dimerización de la apomioglobina en presencia de altas concentraciones de ribonucleasa A

#### 6.1.3.1. La presencia la ribonucleasa A como proteína aglomerante no altera significativamente las propiedades espectroscópicas de apoMb-ANS

Las propiedades espectroscópicas del ANS en la apoMb-ANS se mantienen esencialmente inalteradas independientemente de la concentración de RNasa A presente en la solución. Cabe mencionar sin embargo dos pequeños cambios, un ligero aumento del tiempo de vida media de fluorescencia más corto,  $t_1$  (ver *Tabla 5.4*) y una leve disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia en estado estacionario, a medida que se incrementa la concentración de RNasa A de la solución.

De los dos tiempos de vida media de fluorescencia encontrados para las soluciones de apoMb-ANS en presencia de RNasa A, el más largo (15.2 ns) y de mayor contribución, es idéntico en el intervalo de concentraciones de RNasa A estudiado (0 a 250 mg/mL), mientras que el más corto parece ir aumentando sensiblemente a medida que aumenta la concentración de RNasa A. Como ya se ha indicado, la componente corta en el tiempo de vida media de fluorescencia de la apoMb-ANS parece estar directamente relacionada con la presencia de moléculas de agua en el interior del bolsillo hidrofóbico de la apoMb (ver *Discusión 6.1.2*). En las soluciones que, además de apoMb, contienen altas concentraciones de RNasa A, el contenido de agua en el sitio hidrofóbico de la apoMb podría verse alterado, afectando al valor del tiempo de vida media de fluorescencia más corto del ANS. La apoMb en solución parece presentar varias conformaciones en equilibrio (ver *Discusión 6.1.2*), la presencia de RNasa A podría estabilizar preferencialmente una o varias de estas conformaciones de modo que cambiara la conformación promedio, que es lo que se determina con estas técnicas, con la concentración de RNasa A. Este efecto podría ser una consecuencia directa de la exclusión de volumen que, en principio, favorecería las conformaciones más compactas frente a aquellas que ocupan más volumen (Ralston 1990; Minton, 2001). En cualquier caso, la contribución del tiempo de vida media más corto al área total del espectro de emisión de fluorescencia es muy pequeña y además los cambios observados son muy sutiles, de modo que el tiempo de vida media de fluorescencia promedio se mantiene esencialmente constante dentro del error en el intervalo de concentraciones de RNasa A investigado.

El otro cambio que se observa es una gradual disminución de la intensidad de fluorescencia en estado estacionario cuando la muestra se excita a 393 nm a medida que aumenta la concentración de RNasa A en el medio (ver *Resultados 5.3.2.1*). Esta disminución es inferior al 10 % para 250 mg/mL de RNasa A con respecto a apoMb-ANS en ausencia de RNasa A. Dado que los tiempos de vida media de fluorescencia promedio se mantienen prácticamente constantes dentro del error para las distintas concentraciones de RNasa A y que la forma del espectro es la misma en todos los casos (ver *Resultados 5.3.2.1*), la disminución de la intensidad de fluorescencia no está relacionada con procesos de desactivación de la fluorescencia de tipo dinámico.

Además, la RNasa A presenta una ligera absorción, que puede llegar a ser importante a concentraciones del orden de 250 mg/mL, a la longitud de onda de excitación (393 nm), por lo que a altas concentraciones la disminución de la intensidad de fluorescencia en estado estacionario se puede explicar fundamentalmente por un efecto de filtro interno.

En conclusión, las propiedades espectroscópicas de apoMb-ANS no se alteran por la presencia de concentraciones de RNasa A en el intervalo de 0 a 250 mg/mL.

### **6.1.3.2. La presencia de la ribonucleasa A como proteína aglomerante favorece la formación de dímeros de apomioglobina**

A lo largo de este trabajo se han presentado básicamente tres tipos de experimentos de fluorescencia complementarios, a partir de los cuales se puede obtener información cuantitativa sobre la autoasociación de la apoMb en presencia de altas concentraciones de RNasa A:

*Experimento E1:* (ver *Resultados 5.3.2.1*) Se determinó la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario a concentración fija de apoMb-ANS (apoMb  $10^{-4}$  M y 0.8 moles de ANS por mol de apoMb), en presencia de distintas concentraciones de RNasa A (entre 0 y 250 mg/mL). Los resultados obtenidos con longitudes de onda de excitación y emisión 375 y 465 nm respectivamente, coinciden dentro del error con los publicados por Wilf y Minton (1981).

*Experimentos RT:* (ver *Resultados 5.3.2.1*) Se realizaron medidas de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal a concentración fija de apoMb-ANS (apoMb  $10^{-4}$  M y 0.8 moles de ANS por mol de apoMb), a varias concentraciones de RNasa A (entre 0 y 250 mg/mL). En todos los casos se obtuvieron decaimientos

biexponenciales de anisotropía de fluorescencia con dos tiempos de correlación rotacional  $f_1$  y  $f_2$ .

*Experimento E2:* (ver *Resultados 5.3.2.3*) Se estudió la variación de la anisotropía fluorescencia en estado estacionario de apoMb-ANS con la concentración de apoMb (entre  $10^{-5}$  y  $3\text{-}9 \times 10^{-4}$  M o, lo que es lo mismo, entre 0.17 y 5-15 mg/mL) en presencia de distintas concentraciones fijas de RNasa A (100, 150, 200 y 250 mg/mL). El resultado que se obtuvo en todos los casos fue siempre prácticamente un valor constante. Es decir, que la anisotropía de fluorescencia de la solución no es sensible al incremento de la concentración de apoMb, en el intervalo de concentraciones de apoMb y de RNasa A estudiado.

La hemoglobina es una proteína tetramérica, sin embargo, la eliminación del grupo hemo de su estructura tiene como consecuencia más importante un cambio en el estado de asociación, de modo que la apoHb es un dímero (Sassaroli, et al, 1984, 1986). Debido a la similitud de la estructura de la apoMb con la de las subunidades de la apoHb, se utiliza en esta discusión como referencia para el estudio del comportamiento hidrodinámico del dímero de apoMb.

A partir del análisis global de los resultados obtenidos, es posible cuantificar y caracterizar las especies, monómero y dímero, presentes en las soluciones de apoMb en presencia de distintas concentraciones de RNasa A. El modelo más simple que explica el conjunto de los experimentos implicaría la autoasociación de la apoMb dando lugar a la formación de homodímeros flexibles, en una proporción que aumenta a medida que se incrementa la concentración de RNasa A de la solución.

Dado que para las soluciones de apoMb-ANS en tampón se determinó un único tiempo de correlación rotacional, la determinación de un segundo tiempo de correlación rotacional  $f_2$  más lento en presencia de RNasa A, estaría indicando la formación de una especie de mayor tamaño en la solución. El valor de este tiempo de correlación rotacional  $f_2$  extrapolado a concentración cero de RNasa A es del orden de  $22 \pm 2$  ns (*Resultados 5.4.2.1*), valor que coincide dentro del error con el tiempo de correlación rotacional correspondiente al movimiento global de la apoHb,  $22.3 \pm 0.8$  ns (Sassaroli et al, 1986).

El aumento de anisotropía de fluorescencia observado en los *experimentos E1* se debería a un aumento de la proporción de dímero de apoMb a medida que aumenta la concentración de RNasa A. Para una concentración de RNasa A de 250 mg/mL, toda la apoMb estaría en forma de dímero, ya que la anisotropía de fluorescencia coincide con la obtenida para una solución de apoHb en presencia de la misma



concentración de RNasa A (Wilf y Minton, 1981). Esta hipótesis es compatible con evidencias experimentales previas de flexibilidad de dominios en el dímero de apoHb, con tiempos de correlación rotacional asociados del orden del correspondiente al movimiento global del monómero de apoMb (Sassaroli et al, 1986). Según esto, el tiempo de correlación rotacional  $\tau_1$  obtenido en los *experimentos RT* correspondería a la combinación del movimiento local (flexibilidad) del dímero y global del monómero de apoMb.

La ausencia de cambios apreciables en la anisotropía de fluorescencia con la concentración de apoMb en los *experimentos E2*, es compatible con la coexistencia a bajas concentraciones de apoMb de dos especies, el monómero y el dímero flexible de apoMb, con valores de anisotropía de estado estacionario asociados muy parecidos. En cualquier caso, el valor de la constante de dimerización aparente debería ser muy elevado y en el intervalo de concentraciones de apoMb estudiado la proporción de dímero sería mayoritaria. Para intentar determinar un límite para los valores de la constante de equilibrio, consistente con las anisotropías de fluorescencia determinadas en los *experimentos E2*, se realizaron simulaciones numéricas basadas en la siguiente ecuación (ecuación (4.23), ver *Materiales y Métodos 4.5.4*):

$$r = r_d - (r_d - r_m) \frac{-1 + \sqrt{1 + 8 K' C_{apoMb}}}{4 K' C_{apoMb}} \quad (6.1)$$

donde  $r_d$  y  $r_m$  son las anisotropías de fluorescencia correspondientes a una solución en la que toda la apoMb estuviera en forma de dímero y en forma de monómero respectivamente.  $K'$  es la constante de equilibrio aparente de dimerización de la apoMb  $k' = [D]/[M]^2$  donde  $[D]$  y  $[M]$  son las concentraciones de monómero y dímero en el equilibrio. La ausencia de cambios en los tiempos de vida media de ANS con la concentración de RNasa A, permiten la utilización de la expresión simplificada anterior, en la que no aparece ningún parámetro relacionado con las características espectroscópicas de cada especie.

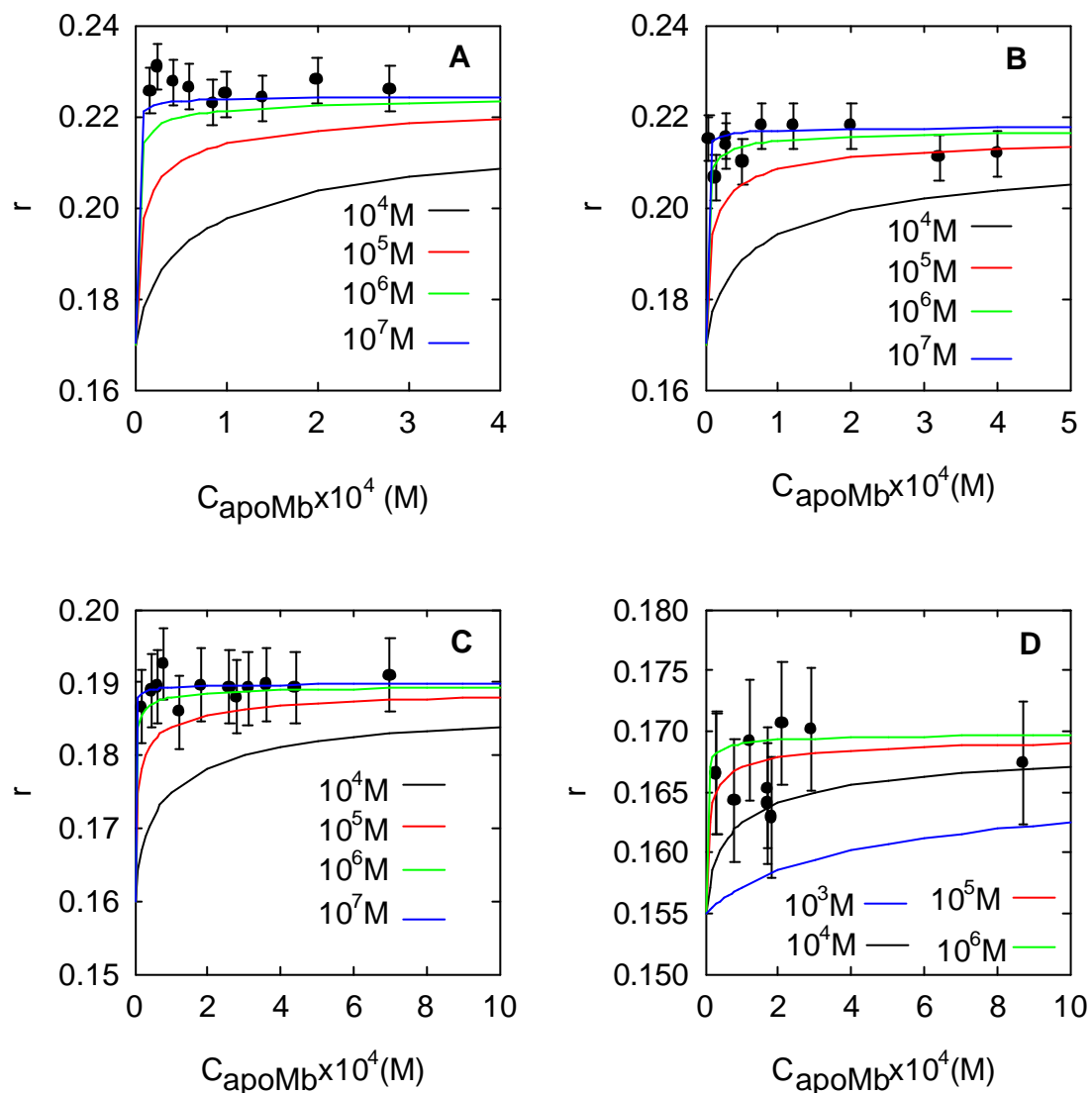
Los valores de  $r_d$  se igualaron al de la anisotropía en la meseta obtenida en cada caso, mientras que para calcular los valores de  $r_m$  se utilizó la ecuación (3.14) (ver *Fundamento Teórico 3.1.2.3*), tomando como valor del tiempo de correlación rotacional del monómero  $\tau_m$  el valor de  $\tau_1$  determinado en los *experimentos RT* (ver *Resultados 5.3.2.1*). Se realizaron simulaciones numéricas suponiendo distintos

valores de  $r_m$  dentro de un intervalo de anisotropías de  $\pm 0.02$ , sin que ello afectara a los resultados obtenidos.

Los resultados experimentales obtenidos (ver *Figura 6.1*), son compatibles con valores de la constante de equilibrio mayores o iguales que  $10^4 M^{-1}$  para una concentración de RNasa A de 100 mg/mL, mayores o iguales que  $10^5 M^{-1}$ , para soluciones de concentración de RNasa A 150 mg/mL y mayores o iguales que  $10^6 M^{-1}$  para soluciones de RNasa A de concentraciones 200 y 250 mg/mL.

A pesar de que los tiempos de correlación rotacional determinados para apoMb-FI en presencia de RNasa A (ver *Resultados 5.3.2.2*) son mucho menos precisos que los determinados para apoMb-ANS en las mismas condiciones, los valores obtenidos para aquella, son compatibles con el mismo modelo de autoasociación de la apoMb. Este resultado sugiere que el proceso de autoasociación es una característica intrínseca de la apoMb, que no está relacionada con la presencia del fluoróforo ANS en su estructura.

La posibilidad de que la apoMb se mantuviera en forma monomérica en todo el intervalo de concentraciones de RNasa A se ha excluido de la discusión, ya que no es compatible con los valores de los tiempos de correlación rotacional  $\tau_2$  determinados en los *experimentos RT*. Así, por ejemplo, para una concentración de RNasa A de 150 mg/mL el valor determinado para  $\tau_2$  es 36 (29-46) ns, sin embargo, el tiempo de correlación rotacional que se obtendría para la rotación global del monómero de apoMb, aún en el supuesto de que la microviscosidad que actúa sobre su rotación fuera la macroviscosidad de la solución de RNasa A de 150 mg/mL, sería de 19 ns (9 ns x 2.1).



**Figura 6.1 :** Variación de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario con la concentración de apoMb para concentraciones fijas de RNasa A de 250 mg/mL (A), 200 mg/mL (B), 150 mg/mL (C) y 100 mg/mL (D). En todos los casos la apoMb estaba marcada con ANS. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 393 y 465 nm respectivamente. En cada gráfico, las líneas continuas corresponden a simulaciones numéricas de la anisotropía basadas en la ecuación (6.1) para distintos valores de la constante de equilibrio aparente. Los valores de la constante aparente para cada curva se indican en la figura. Los valores de  $r_a$  se fijaron para cada concentración de RNasa A al valor de la anisotropía en la meseta obtenida en cada caso, mientras que para calcular los valores de  $r_m$  se utilizó la ecuación (3.14) (ver Fundamento Teórico 3.1.2.3) tomando como valor de  $f_m$  el valor del tiempo de correlación rotacional  $f_1$  obtenido del análisis de los experimentos RT en cada caso (ver Resultados 5.3.2.1). Se realizaron simulaciones numéricas suponiendo distintos valores de  $r_m$  dentro de un intervalo de anisotropías de  $\pm 0.02$ , sin que ello afectara a los resultados obtenidos. Las medidas se realizaron a 20 °C en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4.

### 6.1.3.3. Flexibilidad conformacional del dímero de apomioglobina

Experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal, realizados con muestras de apoHb marcada con distintos fluoróforos en solución diluida (Sassaroli et al, 1986), indican que la apoHb presenta flexibilidad interna, con movimientos segmentales dominados por la movilidad de las subunidades monoméricas. En dicho trabajo, se utilizaron sondas como fluoresceína unida a través de un grupo yodoacetamido (FIA) o el N-yodoacetilaminoetil-5-naftalen-1-sulfonato (AEDANS), para detectar el movimiento segmental de las subunidades de la apoHb. El tiempo de correlación rotacional determinado para el movimiento segmental de la apoHb en este trabajo era de  $12 \pm 1.5$  ns, que es del mismo orden que el observado en este trabajo para el monómero de apoMb en solución diluida (*Resultados 5.3.1*).

En el trabajo de Sassaroli et al (1986), se describen también experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal en los que la apoHb estaba marcada con el fluoróforo ANS. En dichos experimentos, los decaimientos de anisotropía eran monoexponenciales, de modo que el ANS sólo era sensible al movimiento global de la apoHb ( $22.3 \pm 0.8$  ns) y no a la oscilación de las subunidades monoméricas. Es importante destacar que el grado de resolución de este experimento era menor que el de los presentados en este trabajo, debido a que a las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas, la anisotropía intrínseca del ANS tiene un valor de 0.12 (0.34 en el presente trabajo). Además, la relación señal/ruido en esos decaimientos era menor debido a las limitaciones instrumentales en ese momento.

Hay un factor adicional que explicaría que, en general, en un experimento en condiciones de aglomeración macromolecular va a ser posible resolver un mayor número de tiempos de correlación rotacional, que en un experimento de las mismas características en solución diluida, y es el diferente efecto de la aglomeración macromolecular sobre los distintos tiempos de correlación rotacional. El efecto general observado de la aglomeración macromolecular sobre los tiempos de correlación rotacional de las especies presentes en el medio, es un aumento de dichos tiempos. Sin embargo, el factor de aumento de cada tiempo de correlación rotacional, no es el mismo para los distintos movimientos sino que, en general, los más lentos se ven incrementados en mayor proporción que los más rápidos (ver *Resultados 5.4.2*). De este modo, tiempos de correlación rotacional demasiado próximos para ser resueltos en solución diluida, se van separando por efecto de la aglomeración macromolecular

hasta hacerse suficientemente diferentes como para poder ser detectados por separado en un experimento de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal.

En conclusión, el dímero de apoMb presenta movimientos segmentales de dominios, del mismo orden de tiempos que los determinados para el movimiento global del monómero de apoMb en las mismas condiciones, que son más fáciles de detectar en condiciones de aglomeración macromolecular que en solución diluida.

#### 6.1.3.4. Estimación de la proporción de monómero y dímero de apomioglobina en soluciones de distintas concentraciones de ribonucleasa A como proteína aglomerante

En el modelo de dimerización de la apoMb en presencia de RNasa A descrito anteriormente, se propone que el dímero de apoMb presenta una flexibilidad de dominios del orden del movimiento global del monómero de apoMb. En este caso, la determinación de proporciones de monómero y dímero de apoMb, para cada concentración de RNasa A, a partir de las amplitudes fraccionales  $b_i$  de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia no es trivial. En general, el tiempo de correlación rotacional más corto,  $\tau_1$ , es una combinación de los correspondientes al movimiento global del monómero de apoMb y al movimiento segmental del dímero de apoMb siempre que se tenga una proporción de monómero en el medio,

Se han estimado las proporciones de monómero y dímero de apoMb para cada concentración de RNasa A asumiendo, en primera aproximación, que se mantiene constante el grado de flexibilidad del dímero de apoMb en el intervalo de concentraciones de RNasa A estudiado. Este grado de flexibilidad se ha igualado al determinado para una solución de apoMb de concentración  $10^{-4}$  M en presencia de 250 mg/mL de RNasa A, suponiendo que en estas condiciones toda la apoMb se encuentra en forma dimérica. En este caso, la relación entre las amplitudes fraccionales correspondientes a los movimientos segmental  $\beta_d^L$  y global del dímero  $\beta_d^G$  sería:

$$\frac{\beta_d^G}{\beta_d^L} = \frac{0.6}{0.4} \quad (6.2)$$

Estos valores de las amplitudes fraccionales, corresponden a un movimiento segmental del dímero bastante restringido, con un valor promedio para el ángulo  $q$  en el que difundiría cada subunidad del orden de  $31^\circ$  (calculado utilizando la ecuación (3.24) *Fundamento Teórico 3.1.2.5*).

Los decaimientos de anisotropía de fluorescencia de apoMb-ANS para cada concentración de RNasa A se pueden expresar como (ver *Resultados 5.3.2.1*):

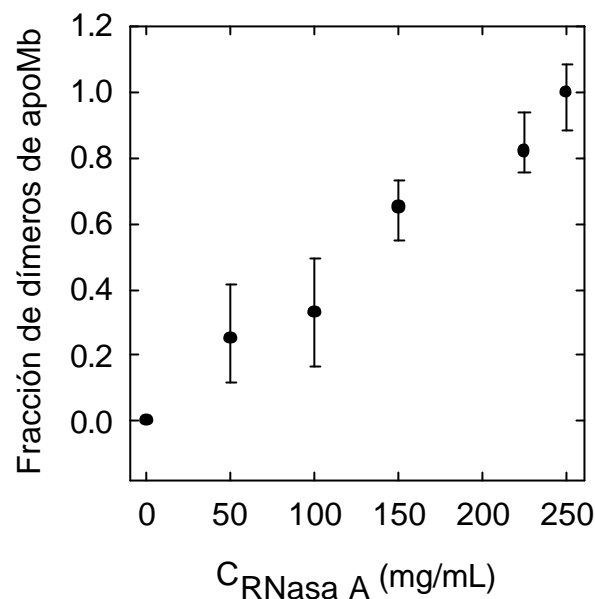
$$r(t) = r(0) \left[ (\beta_m^G + \beta_d^L) \exp(-t/\tau_1) + \beta_d^G \exp(-t/\tau_2) \right] \quad (6.3)$$

donde se supone que los tiempos de correlación rotacional correspondientes al movimiento global del monómero y segmental del dímero coinciden y su valor es  $\tau_1$  (ver *Resultados 5.3.2.1*). Los subíndices  $m$  y  $d$  hacen referencia al monómero y al dímero de apoMb respectivamente y los superíndices  $L$  y  $G$  a los movimientos local y global respectivamente. Teniendo en cuenta la relación anteriormente indicada (ecuación (6.2)) entre las amplitudes fraccionales de los movimientos local y global del dímero de apoMb se tiene:

$$\beta_m^G = \beta_1 - \frac{0.4}{0.6} \beta_2 \quad (6.4)$$

Donde  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son las amplitudes fraccionales determinadas para los tiempos de correlación rotacional  $\tau_1$  y  $\tau_2$  respectivamente (ver *Resultados 5.3.2.1*). Dado que la formación de dímeros de apoMb no produce cambios en la intensidad de la fluorescencia emitida por el ANS, el coeficiente  $\beta_m^G$  representa la fracción de monómero de apoMb, a partir de la cual se puede calcular la fracción de dímero de apoMb presente a cada concentración de RNasa A ( $1 - \beta_m^G$ ) (*Figura 6.2*).

Los datos presentados en dicha figura demuestran claramente que el efecto de concentraciones elevadas de RNasa A sobre el equilibrio de dimerización de la apoMb, es un incremento de la proporción de homodímeros a medida que aumenta la concentración de RNasa A presente en la solución.



**Figura 6.2:** Estimación de la proporción de dímero de apoMb en función de la concentración de RNasa A para una concentración total de apoMb  $10^{-4}$  M en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

#### 6.1.3.5. Exclusión de la heteroasociación de la apomioglobina con la ribonucleasa A

Un aspecto que también se ha tenido en cuenta en la interpretación de los resultados obtenidos, es que en las soluciones de apoMb con una alta concentración de RNasa A se formen especies mixtas de asociación de la apoMb y la RNasa A. Dado que en los experimentos de equilibrio de sedimentación se ha detectado la presencia de trímeros o tetrámeros, además de monómeros, en las soluciones concentradas de RNasa A (ver *Resultados 5.3.2.4*), en principio estas especies mixtas podrían ser tanto heterodímeros de apoMb y RNasa A como agregados de mayor tamaño.

En principio, las mesetas que se obtienen en los experimentos de *experimentos E2* (ver *Discusión 6.1.3.2*) serían compatibles con la hipótesis de formación de especies de heteroasociación. En todos los casos, incluso a 100 mg/mL ( $8 \times 10^{-3}$  M) de RNasa A, el exceso de concentración de RNasa A frente a la apoMb ( $10^{-5}$  M -  $9 \times 10^{-4}$  M) es tan grande, que suponiendo constantes de afinidad para la heteroasociación del

orden de  $10^3 \text{ M}^{-1}$  o superior, toda la apoMb que se va añadiendo a lo largo del experimento se iría uniendo al exceso de RNasa A presente en el medio. De este modo, para cada concentración de RNasa A, en todo el intervalo de concentraciones de apoMb tendríamos la misma especie o distribución de especies con una anisotropía de fluorescencia constante.

Sin embargo, la hipótesis de la heteroasociación de la apoMb y la RNasa A, tanto en el caso de formación de heterodímeros como de agregados de mayor tamaño, encaja con dificultad con los *experimentos E1* y con los *experimentos RT* (ver *Discusión 6.1.3.2*), así como con los resultados obtenidos por Wilf y Minton (1981) para la apoMb y la apoHb en presencia de RNasa A o de otras proteínas no relacionadas.

En los *experimentos RT*, se obtienen dos tiempos de correlación rotacional  $f_1$  y  $f_2$ . Si la especie que se forma es un agregado de mayor tamaño que un dímero, entonces el  $f_2$ , difícilmente puede corresponder a su movimiento global, sobretodo teniendo en cuenta que al extrapolar a concentración cero de RNasa A, se obtiene un valor de  $21.8 \pm 1.5 \text{ ns}$  (ver *Resultados 5.4.2.1*) para  $f_2$  que coincide con el correspondiente a una especie del tamaño del dímero de apoMb (Sassaroli et al, 1986). Entonces tanto el  $f_1$  como el  $f_2$ , corresponderían en todo caso a movimientos de dominios de la especie de gran tamaño. Además, en los experimentos realizados no se observa ningún tipo de anisotropía residual ( $r_{\text{v}}$ ), de modo que los movimientos segmentales indicados serían suficientes para despolarizar la emisión de fluorescencia totalmente, lo que implica que el agregado debería ser altamente desordenado o flexible.

En el caso de que la especie que se forme sea un heterodímero de apoMb y RNasa A, dado que el tamaño de la RNasa A es muy similar al de la apoMb, el tiempo de correlación rotacional  $f_2$  se asignaría a la rotación global del heterodímero de modo análogo a como se hizo para el dímero de apoMb. Sin embargo, en este caso, como ya se ha indicado, al existir un gran exceso de RNasa A frente a la concentración de apoMb para todas las concentraciones de RNasa A, la apoMb se encontraría en forma de heterodímero en todo el intervalo de concentraciones de RNasa A estudiado. En este caso, el tiempo de correlación rotacional  $f_1$  determinado en los *experimentos RT* correspondería al movimiento segmental de las subunidades del heterodímero y el aumento que se observa en la contribución fraccional del  $f_2$  a la anisotropía de



fluorescencia con la concentración de RNasa A, sólo se explicaría como un aumento gradual de la restricción del movimiento segmental del heterodímero.

El punto más débil de la hipótesis de la heteroasociación es que no explica cómo el comportamiento de la anisotropía de fluorescencia de las soluciones de apoMb en presencia de RNasa A se va aproximando al observado para soluciones de apoHb a medida que se incrementa la concentración de RNasa A (Wilf y Minton, 1981). Por un lado, se podría suponer que el producto de heteroasociación de la apoMb y la RNasa A presentara un comportamiento hidrodinámico similar al de la apoHb, aunque habría que explicar por qué esto sucede a altas concentraciones de RNasa A mientras que a bajas concentraciones de RNasa A el comportamiento es diferente. La única explicación sería que tanto la apoMb como la apoHb estuvieran asociando con la RNasa A. Es importante recordar que el estudio comparativo de la anisotropía de fluorescencia de apoMb-ANS y apoHb-ANS se realizó no sólo en presencia de altas concentraciones de RNasa A, sino también de  $\beta$ -lactoglobulina y de lisozima (Wilf y Minton, 1981). En los tres casos se observó el mismo comportamiento para la apoMb y la apoHb a altas concentraciones de la proteína no relacionada. Resulta difícil pensar que en todos los casos tanto la apoMb como la apoHb estén heteroasociando, con la proteína altamente concentrada generando complejos con el mismo comportamiento hidrodinámico a altas concentraciones de proteína.

#### **6.1.4. Ausencia de autoasociación de la apomioglobina en presencia de altas concentraciones de albúmina sérica humana**

##### **6.1.4.1. Cambios en las propiedades espectroscópicas de apoMb-FI debidos a la presencia de albúmina sérica humana como proteína aglomerante**

La presencia de HSA en las soluciones de apoMb-FI da lugar a una disminución en la intensidad de la fluorescencia en estado estacionario ( $I_{exc}$  460 nm), (ver *Resultados 5.3.3*), que para 200 mg/mL de HSA resulta ser de un 25 % respecto de la correspondiente a una solución de apoMb-FI en ausencia de HSA. Sin embargo, la forma de los espectros de emisión, es la misma para todas las concentraciones de HSA (0-200 mg/mL).

La presencia de HSA en las soluciones de apoMb-FI no afecta al valor de cada uno de los tres tiempos de vida media de fluorescencia determinados (ver *Tabla 5.8*).

Sin embargo, si que provoca cambios en sus contribuciones relativas a la intensidad de fluorescencia total. A medida que aumenta la concentración de HSA en la solución, la contribución de los dos tiempos de vida media de fluorescencia más cortos va aumentando progresivamente, lo que provoca una disminución en los tiempos de vida media promedio de fluorescencia determinados para apoMb-FI. Los cambios detectados tanto en la intensidad de fluorescencia como en los tiempos de vida media de fluorescencia promedio son indicativos de un proceso de apagamiento dinámico de la fluorescencia en soluciones de HSA.

#### **6.1.4.2. La apomioglobina permanece en forma monomérica en presencia de la albúmina sérica humana como proteína aglomerante**

Los experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de muestras de apoMb-FI en presencia de HSA, indican que en el intervalo de concentraciones de HSA investigado (0-200 mg/mL), la apoMb se mantiene en forma monomérica. Los tiempos de correlación rotacional determinados a partir de estos experimentos presentan mayor error que los obtenidos con apoMb-ANS. En las soluciones que contienen HSA, no es posible utilizar el fluoróforo ANS para marcar la apoMb debido a que la HSA presenta sitios de unión para esta sonda. Aunque, el tiempo de vida media de la fluoresceína, menor que el correspondiente al ANS, no permite caracterizar con precisión el comportamiento hidrodinámico de especies del tamaño de la apoMb dimerica, si que aporta información sobre su posible presencia en la solución.

Para todas las concentraciones de HSA, los decaimientos obtenidos son biexponenciales, con un tiempo de correlación rotacional en torno a los 0.2 ns, que corresponde al movimiento segmental de la fluoresceína, y otro más largo que se asigna al movimiento global de la apoMb-FI (*Tabla 5.9*). Los valores obtenidos para el tiempo de correlación rotacional más largo son próximos al correspondiente a la apoMb en solución diluida (ver *Resultados 5.3.1*). Además, el valor más grande obtenido, 13.5 ns, para una concentración de HSA de 200 mg/mL, es muy inferior al que correspondería a un dímero de apoMb incluso en solución diluida (22 ns). El tiempo de vida media de fluorescencia de la fluoresceína es mucho más corto que los tiempos de correlación rotacional que se esperarían para el movimiento global del dímero de apoMb en una solución de viscosidad elevada. Por ello, la presencia de

dímeros de apoMb en la solución daría lugar a una anisotropía residual en los decaimientos de anisotropía de fluorescencia, que no se observa en ningún caso.

La contribución del aleteo de la fluoresceína unida a la apoMb al decaimiento de anisotropía de fluorescencia permanece inalterada, dentro del error, por la adición de HSA. Este resultado indica que tanto la amplitud de este movimiento como su velocidad no se están modificando por la presencia de una alta concentración de moléculas de HSA en el medio.

#### **6.1.5. Tendencia de la apomioglobina a la dimerización en determinadas condiciones de aglomeración macromolecular**

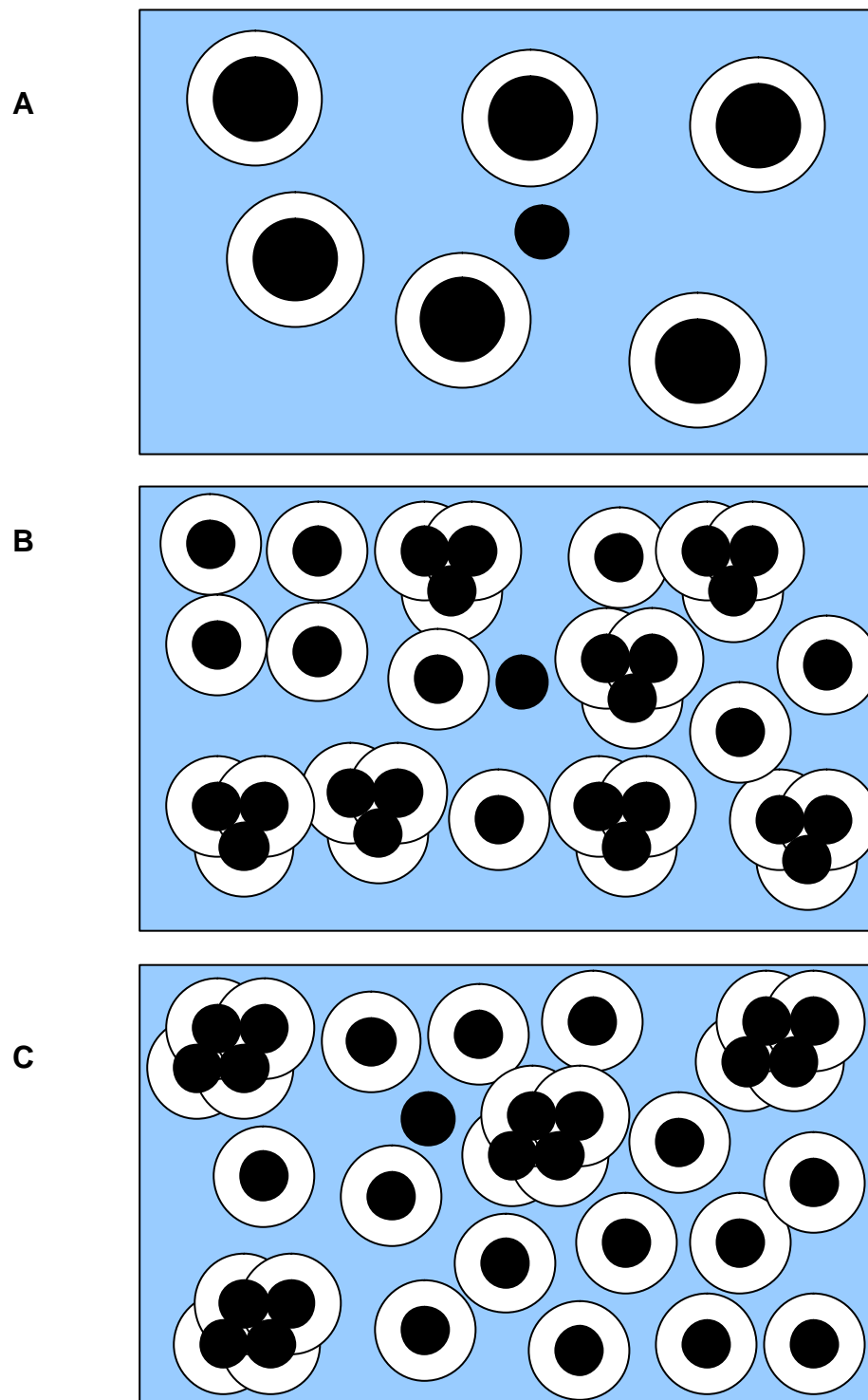
La hemoglobina es un tetrámero constituido por dos tipos de subunidades. Las subunidades  $\beta$  aisladas tienden a formar tetrámeros estables en solución diluida (Antonini y Brunori, 1971). Dado que la estructura tridimensional de la apoMb es muy similar a la de las subunidades  $\beta$  de la Hb, parece lógico suponer que quizá la Mb podría presentar también capacidad de autoasociación en determinadas condiciones (Wilf y Minton, 1981). De hecho, a ciertos valores del pH, distintos de los de nuestro trabajo, se han observado dímeros de apoMb de caballo en solución diluida (Tcherkasskaya et al, 2000) e incluso se sabe que mioglobinas como la de esperma de ballena (Ward y Winzor, 1984) o la de *Nassa mutabilis* (Coletta et al, 1988), exhiben una cierta tendencia a dimerizar.

En las soluciones de apoMb de concentración  $10^{-4}$  M a pH 7.4 caracterizadas en este trabajo, no se observan dímeros de apoMb. Sin embargo, los resultados obtenidos, en presencia de altas concentraciones de ciertas proteínas aglomerantes, son compatibles con la presencia de dímeros de la apoMb en estos medios. Una posible explicación es que, a pesar de la tendencia de la apoMb a la autoasociación, la energía libre de formación de agregados de apoMb sería demasiado alta para que su formación se observe en solución diluida a la concentración indicada. La presencia de una alta concentración de especies macromoleculares no relacionadas en las soluciones de apoMb tiene como consecuencia que una parte importante del volumen se encuentre ocupada, lo que según la teoría de la aglomeración macromolecular produciría un aumento de las constantes de asociación. Sin embargo, altas concentraciones de algunas especies permiten la detección de dímeros de apoMb en solución mientras que en presencia de concentraciones del mismo orden de otras especies, no se detectan dímeros de apoMb para unas mismas condiciones de pH y

concentración de apoMb. Según los resultados experimentales presentados en este trabajo, se detecta la formación de dímeros de apoMb en presencia de RNasa A pero no en presencia de HSA. Análogamente, Wilf y Minton, (1981) detectaron dímeros de apoMb en soluciones de lisozima y  $\beta$ -lactoglobulina pero no en soluciones de distintos polietilenglicoles. La explicación de estas diferencias puede deberse a la distinta exclusión de volumen producida por las distintas especies en la solución.

La HSA se mantiene monomérica en todo el intervalo de concentraciones estudiado (0-200 mg/mL) (resultados no publicados), mientras que el modelo más sencillo compatible con los resultados de obtenidos a partir de experimentos de ultracentrifugación para la RNasa A (*Resultados 5.3.2.4*) es un equilibrio monómero-trímero o monómero-tetrámero, a lo largo de todo el intervalo de concentraciones. La masa molecular de la HSA es del orden de 66500 Da (Peters, 1996), mientras que la de la RNasa A es de 13000 Da. Tanto el trímero como el tetrámero de RNasa A, tendrían masas moleculares (39000 y 52000 Da respectivamente) inferiores a las del monómero de HSA. Si consideramos una solución de HSA o de RNasa A de concentración 200 mg/mL, en el caso de la HSA tendríamos por cada litro de solución  $3 \times 10^{-3}$  moles de HSA, mientras que en la solución de RNasa A, asumiendo un modelo monómero-trímero tendríamos unos  $3.6 \times 10^{-3}$  moles de trímero y unos  $4.5 \times 10^{-3}$  moles de monómero y  $2 \times 10^{-3}$  moles de tetrámero y  $7.1 \times 10^{-3}$  moles de monómero, para el modelo monómero - tetrámero. Independientemente del modelo de asociación de la RNasa A (monómero-trímero o monómero-tetrámero), para una misma concentración de RNasa A y de HSA en g/L, en un elemento de volumen determinado, el número de especies en las soluciones de RNasa A es mayor que en las de HSA. En la *Figura 6.3* se representa de forma idealizada la diferencia en el volumen excluido y el volumen disponible para una molécula de apoMb, estimada a partir de los cálculos anteriores, en una solución de 200 mg/mL de RNasa A o de HSA.

Además de la exclusión de volumen, pueden existir otras interacciones no específicas de tipo electrostático o hidrofóbico que favorezcan en mayor o menor medida la autoasociación de la apoMb en distintas soluciones aglomeradas. Es por esto que en el momento actual, los estudios de interacciones en medios con aglomeración macromolecular semejantes a los medios fisiológicos, el esfuerzo se debe dirigir a la caracterización cuantitativa del mayor número posible de sistemas. La posibilidad de extrapolación de los comportamientos observados a otros sistemas será tanto más fiable cuanto más amplio sea el conocimiento de distintos medios aglomerados.



**Figura 6.3:** Representación idealizada del volumen excluido (gris y blanco) y el volumen disponible (azul) para una molécula de apoMb en una solución de concentración 200 mg/mL de HSA (A) o de RNasa A suponiendo un modelo de asociación monómero-trímero (B) o monómero-tetrámero (C). Las especies están consideradas todas ellas esféricas y sus tamaños están dibujados a escala en relación con sus masas moleculares. La esfera alrededor de cada molécula de HSA o RNasa A de radio la suma de los radios de cada una más el radio de la apoMb indica que los centros de dos moléculas no pueden estar más próximos que la suma de sus radios. La especie en negro es una molécula de apoMb.

## 6.2. DESVIACIONES DE LA LEY DE STOKES-EINSTEIN-DEBYE PARA LA DIFUSIÓN ROTACIONAL Y TRANSLACIONAL DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DE AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR

La ecuación de Stokes-Einstein-Debye describe la dependencia de los coeficientes de difusión rotacional ( $D_r$ ) y translacional ( $D_t$ ) de una partícula esférica con la viscosidad macroscópica del medio en el que tiene lugar la difusión:

$$D_r = \frac{kT}{8\pi\eta r^3} \quad (6.5)$$

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (6.6)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad macroscópica del medio,  $T$  la temperatura en Kelvin,  $k$  la constante de Boltzman,  $V$  el volumen hidrodinámico de la especie que rota y  $r$  el radio hidrodinámico de dicha especie.

Estas ecuaciones se basan en la hidrodinámica clásica y requieren la hipótesis de un medio continuo y homogéneo. Resultados experimentales han demostrado su validez para pequeñas moléculas en solventes puros de diferente viscosidad (Ben-Amotz y Drake, 1988). Sin embargo, se han encontrado desviaciones significativas de la ecuación de Stokes-Einstein-Debye para macromoléculas que difunden en medios en los que el disolvente contiene una elevada concentración de partículas cuyo tamaño deja de ser despreciable en comparación con el de la macromolécula (Endre y Kuchel, 1986; Lavalette et al 1999; Gennaro et al 1996; Swaminathan et al 1997). Dicha situación se da en los medios con aglomeración macromolecular objeto de estudio de este trabajo. Las medidas de anisotropía de fluorescencia y de FCS realizadas en este trabajo (*Resultados 5.4*), han permitido determinar los tiempos de correlación rotacional y de difusión translacional de la apoMb (monomérica o dimérica) en presencia de altas concentraciones de RNasa A o de HSA. Estos tiempos son inversamente proporcionales a los coeficientes de difusión correspondientes (ver *Fundamento Teórico 3.1* y *3.2*). Las relaciones entre los tiempos determinados a distintas concentraciones de proteína respecto de los determinados en tampón, predicen un valor para la viscosidad que es diferente del valor de la viscosidad macroscópica (medido con un viscosímetro). Para explicar esta diferencia se introduce

el concepto de viscosidad microscópica (“microviscosidad” (Tanford, 1980)), que sería la viscosidad local que actúa sobre la difusión de la macromolécula.

### **6.2.1. Efecto de la aglomeración macromolecular debida a altas concentraciones de proteína (ribonucleasa A y albúmina sérica humana) sobre la difusión rotacional de otra proteína (apomioglobina)**

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se tiene que el efecto de la presencia de altas concentraciones de RNasa A sobre la rotación de un monómero o de un dímero de apoMb es diferente (ver *Resultados 5.4.2.1*). Para una misma concentración de RNasa A, la rotación global del dímero de apoMb se ve mucho más impedida que la del monómero. Suponiendo que la interacción entre la apoMb monomérica o dimérica y las moléculas de RNasa A presentes en el medio es puramente hidrodinámica, el mayor impedimento observado para la rotación del dímero respecto de la del monómero, se puede interpretar como que, en general, cuanto mayor es el tamaño de la especie que rota, mayor es la influencia hidrodinámica de las especies presentes en el medio sobre su rotación (Endre y Kuchel, 1986). El efecto de la aglomeración macromolecular debida a altas concentraciones de HSA o RNasa A sobre la difusión rotacional del monómero de apoMb, en el intervalo de concentraciones estudiado, no es muy significativo y dentro del error se puede considerar prácticamente el mismo.

Consideraciones análogas se pueden hacer para los movimientos segmentales de partes de la molécula y sus movimientos globales. En el modelo de difusión de la apoMb presentado en este trabajo, se supone que la rotación global del monómero de apoMb y la flexibilidad de dominios del dímero de apoMb suceden en la misma zona de tiempos. Según esto, el tiempo de correlación rotacional correspondiente al movimiento de las subunidades del dímero de apoMb, se vería también menos afectado que su movimiento global por la presencia de RNasa A. La diferencia entre el efecto de la concentración de HSA sobre el movimiento global de la apoMb-FI y el movimiento segmental de la fluoresceína, es todavía más llamativa al ser el tamaño de la molécula de fluoresceína mucho más pequeño que el de la apoMb en comparación con el de la HSA. Así, el tiempo de correlación rotacional correspondiente al aleteo de la fluoresceína (0.2 ns) permanece inalterado en todo el intervalo de concentraciones de HSA, mientras que el movimiento global de la apoMb si que se ve afectado por la presencia de concentraciones crecientes de HSA.

En resumen, en los experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal descritos en este trabajo, los tiempos de correlación rotacional determinados para las distintas especies presentes en soluciones con una alta concentración de proteína (HSA o RNasa A), no se corresponden en ningún caso con los que se obtendría si la viscosidad que actuara sobre la rotación de las especies fuera la viscosidad macroscópica de la solución (ver *Figuras 5.25 y 5.26*).

La existencia de una viscosidad local o efectiva que actúa sobre la rotación, y que difiere de la viscosidad macroscópica, introduce dificultades adicionales en la interpretación de los experimentos de anisotropía de fluorescencia realizados en medios aglomerados. Si se desconoce el valor de esta viscosidad efectiva que actúa sobre la rotación de las especies, es muy difícil determinar su tamaño a partir de los tiempos de correlación rotacional obtenidos experimentalmente. Por ello, la obtención de relaciones generales que permitan estimar el valor de la microviscosidad a partir de la viscosidad macroscópica o de otras propiedades medibles será de gran utilidad.

La viscosidad local que actúa sobre la rotación tiene un valor único para cada especie en cada medio (Endre y Kuchel, 1986), sin embargo, la dependencia de los tiempos de correlación rotacional determinados en este trabajo con la concentración de proteína, parece ajustarse en todos los casos a la ecuación (4.12) (ver *Resultados 5.4.2*). El valor encontrado para el parámetro  $q$  ha sido siempre menor que 1, análogamente a lo encontrado por diversos autores para moléculas que difunden en medios en los que las especies altamente concentradas son dextranos o proteínas (Lavalette et al, 1999; Endre y Kuchel, 1986; Yedgar et al, 1995; Gennaro et al, 1996). Según esto, la viscosidad local que actúa sobre la rotación sería siempre menor que la viscosidad macroscópica de la solución y su valor va a depender de la relación de tamaños entre la especie que rota y las moléculas que constituyen el medio aglomerante.

### **6.2.2. Efecto de la aglomeración macromolecular debida a la alta concentración de proteína (ribonucleasa A o albúmina humana) sobre la difusión translacional de otra proteína (apomioglobina)**

Los experimentos de FCS, realizados con muestras de apoMb-Alexa 488 o apoMb-Alexa 546 en presencia de altas concentraciones de RNasa A o bien de HSA, nos permitieron obtener información sobre la difusión translacional de una proteína en medios con aglomeración macromolecular (ver *Resultados 5.4.3*).



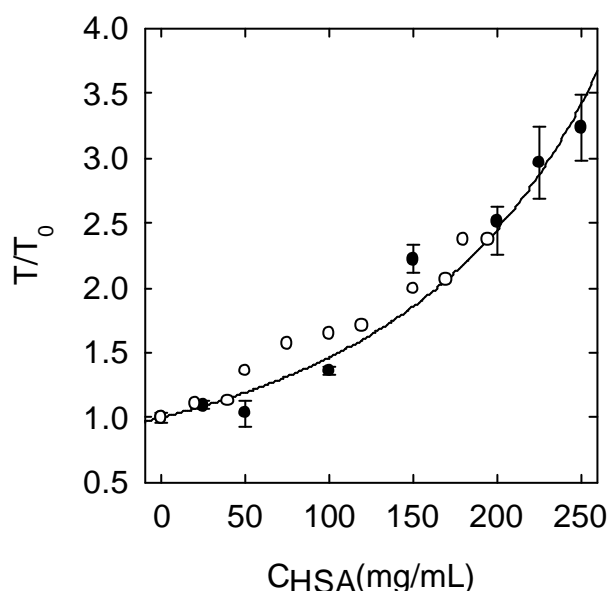
En los experimentos de FCS, la concentración de apoMb-Alexa 488 o apoMb-Alexa 546 en las distintas soluciones fue en todos los casos del orden nM, sin que se añadiera ninguna cantidad de apoMb no marcada a la solución. De este modo, se garantizaba que aún en presencia de altas concentraciones de RNasa A, la apoMb permaneciera en la solución en forma monomérica.

Los resultados obtenidos a partir de las medidas de FCS realizadas en este trabajo, indican que, para una misma concentración de RNasa A o de HSA en mg/mL, el impedimento observado para la difusión translacional de la apoMb es mucho mayor en las soluciones concentradas de RNasa A que en las de HSA. El valor de la microviscosidad translacional, análogamente a lo observado para la difusión rotacional, también depende de la relación de tamaños de la especie que cuya difusión se está estudiando y de la especie altamente concentrada presente en el sistema. El resultado obtenido es compatible con experimentos previos (Muramatsu y Minton, 1988a y b) según los cuales, en general, el impedimento en la difusión de una macromolécula para una misma concentración en mg/mL de la especie que la rodea, aumenta al disminuir el tamaño de dicha especie. En ausencia de interacciones entre la apoMb y la RNasa A o la HSA, distintas de las puramente hidrodinámicas, la interpretación de este resultado podría estar relacionada con el hecho de que la probabilidad de que la apoMb se encuentre con obstáculos en su difusión translacional, es mayor en una solución de RNasa A que en una de HSA a igualdad de concentraciones en mg/mL (ver *Figura 6.3*).

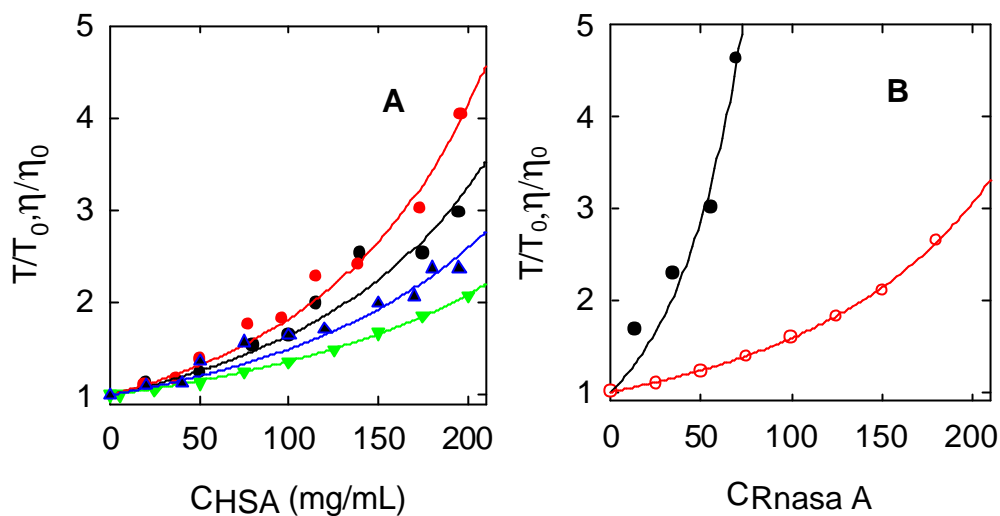
Debido a que FCS es una técnica de molécula única, los resultados obtenidos corresponden a una población muy reducida de moléculas de la solución, cuyo comportamiento podría diferir del comportamiento promedio observado con técnicas macroscópicas. Sin embargo, es importante resaltar que los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando FCS como técnica para el estudio de la difusión translacional de la apoMb en presencia de HSA, se superponen dentro del error (*Figura 6.4*) con los obtenidos por Muramatsu y Minton (1988a) para la apoMb en presencia de BSA. En este trabajo, se utilizaba una técnica macroscópica de medida de coeficientes de difusión translacional basada en medidas de absorbancia (Attri y Minton, 1983; Muramatsu y Minton, 1988b).

Igual que para la difusión rotacional, también el comportamiento observado en los tiempos de difusión translacional determinados en este trabajo, difiere del que se obtendría si la viscosidad local que actúa sobre la traslación fuera igual a la viscosidad macroscópica de la solución.

La variación del tiempo de difusión translacional de la apoMb con la concentración de proteína (RNasa A o de HSA), se ajustó satisfactoriamente a la ecuación (5.13) análoga a la utilizada para describir la difusión rotacional (ver *Resultados 5.4.3*). La única diferencia más importante es que para la difusión translacional, los valores del parámetro  $q$  obtenidos, son en todos los casos mayores que 1. Este resultado indica que, en los ejemplos estudiados, la viscosidad local o efectiva que actúa sobre la traslación tiene un valor superior al de la viscosidad macroscópica de la solución. Dado que en este trabajo sólo se han estudiado dos casos particulares, es difícil decir si el comportamiento observado para la microviscosidad translacional con respecto a la viscosidad macroscópica, tiene carácter general. Sin embargo, se han tomado de la bibliografía varios ejemplos de medidas de coeficientes de difusión translacional de proteínas (Muramatsu y Minton, 1988a), en medios con una alta concentración de proteína y se han comparado con los valores de la viscosidad macroscópica correspondientes a esas soluciones. En todos los casos se ha encontrado el mismo comportamiento, es decir, que la variación de la microviscosidad translacional con la concentración de proteína es adecuadamente descrito por la ecuación (5.13) y además el valor encontrado para el parámetro  $q$  es siempre mayor que 1 (ver *Figura 6.5*).



**Figure 6.4:** Comparación de los tiempos de difusión translacional relativos de apoMb en soluciones con alta una concentración de HSA determinados en este trabajo (círculos rellenos), con los valores publicados para apoMb en presencia de BSA (o) (Muramatsu y Minton, 1988a). Los resultados de este trabajo corresponden a medidas de FCS. Los valores publicados corresponden a una técnica macroscópica basada en medidas de absorbancia (Attri y Minton, 1983; Muramatsu y Minton, 1988a y b).

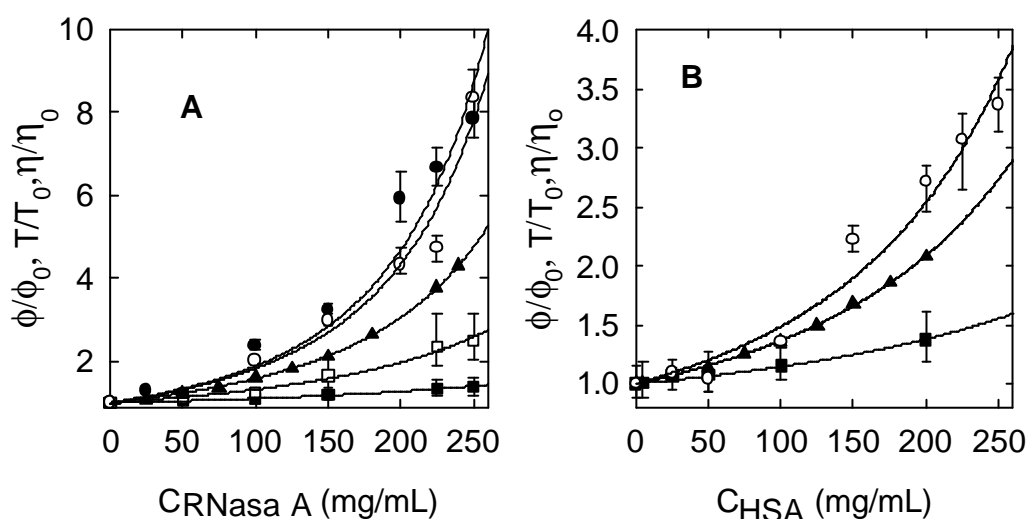


**Figura 6.5:** *Tiempos de difusión translacional relativos de diferentes proteínas en presencia de altas concentraciones de otra proteína y viscosidad macroscópica relativa de la solución concentrada de proteína. El subíndice 0 se refiere a los valores en tampón. Las líneas continuas corresponden a los ajustes a la ecuación de Mooney (ecuación (5.11)) para la viscosidad macroscópica y a la ecuación (5.13) (ver Resultados 5.4.3) para la microviscosidad translacional. A: Aldolasa (rojo), mioglobina (azul) y BSA (negro) en presencia de altas concentraciones de BSA y viscosidad relativa de soluciones de HSA (verde). Los valores de la viscosidad macroscópica de soluciones de HSA son los medidos en este trabajo y se consideran muy próximos a los que se obtendrían para una solución de BSA de igual concentración. B: Aldolasa en presencia de RNasa A (negro) y viscosidad relativa de las soluciones de RNasa A (rojo). Los valores de la viscosidad macroscópica de soluciones de RNasa A son los medidos en este trabajo. Los valores de los tiempos de difusión translacional se tomaron de Muramatsu y Minton (1988a). los valores de  $q$  obtenidos fueron  $1.31 \pm 0.04$ ,  $1.61 \pm 0.06$  y  $1.94 \pm 0.04$  para mioglobina, BSA y aldolasa respectivamente en presencia de BSA y  $5.0 \pm 0.1$  para aldolasa en presencia de RNasa A.*

### 6.2.3. La aglomeración macromolecular debida a la alta concentración de proteína (ribonucleasa A o albúmina sérica humana), afecta en mayor medida a la difusión translacional que a la rotacional de otra proteína (apomioglobina)

Si se comparan los resultados obtenidos en este trabajo para la difusión rotacional y translacional de apoMb en medios con una alta concentración de RNasa A o de HSA, en ambos casos se tiene un comportamiento que se desvía del predicho por las leyes clásicas de la difusión (ecuaciones de Stokes-Einstein-Debye (6.5) y

(6.6)) para las viscosidades macroscópicas determinadas. En la *Figura 6.6* se puede observar que, en general, la difusión translacional se encuentra más impedida que la rotacional para una misma especie en el mismo medio. Además, el aumento que se produce en el tiempo de difusión rotacional de la apoMb, tanto monomérica como dimérica, con la concentración de HSA o de RNasa A es inferior al que se obtendría si fuera la viscosidad macroscópica de la solución la que actuara sobre al rotación de la apoMb. Sin embargo, el aumento que se produce en el tiempo de difusión translacional de la apoMb, con la concentración de HSA o de RNasa A es superior al que se produciría en caso de que la viscosidad local, que actúa sobre la difusión translacional, fuese igual a la viscosidad macroscópica.



**Figura 6.6:** Incremento relativo de la viscosidad macroscópica ( $h/h_0$ ,  $\blacktriangle$ ), del tiempo de correlación rotacional ( $f/f_0$ ) y del tiempo de difusión translacional ( $T/T_0$ ) de apoMb con la concentración de RNasa A (A) o de HSA (B). En A los símbolos círculo relleno y  $\circ$  corresponden a los tiempos de difusión translacional obtenidos para muestras de apoMb-Alexa 488 y apoMb-Alexa 546 respectivamente y los símbolos cuadrado relleno y vacío corresponden a los tiempos de correlación rotacional  $f_1$  y  $f_2$  obtenidos para apoMb-ANS en presencia de RNasa A (ver Resultados 5.4.2). En B los símbolos  $\circ$  y cuadrado relleno corresponden a los tiempos de difusión translacional de apoMb-Alexa 546 y rotacional ( $f_c$ ) de apoMb-FI respectivamente en presencia de HSA (ver Resultados 5.4.2). Las líneas continuas corresponden a los ajustes a la ecuación de Mooney (ecuación (5.11)) para las viscosidades macroscópicas y a las ecuaciones (5.13) y (5.12) para los tiempos de difusión translacional y de correlación rotacional respectivamente. El subíndice 0 indica el valor de la magnitud correspondiente en tampón. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4 a 20 °C.

En todos los experimentos paralelos de difusión rotacional y translacional presentados en este trabajo, el resultado que se ha encontrado es que la difusión translacional se encuentra más impedida que la difusión rotacional para una misma especie que difunde en el mismo medio aglomerado. Este resultado parece ser de carácter general y ya ha sido observado para moléculas que difunden en el citoplasma. Así, por ejemplo, el tiempo de difusión rotacional de un fluoróforo pequeño, similar a la fluoresceína (BCECF), en el citoplasma celular es sólo 1.1-1.4 veces mayor que en agua (Fushimi y Verkman, 1991; Bicknese et al, 1993) mientras que su tiempo de difusión translacional aumenta 3.7 veces con respecto al determinado en agua (Kao et al, 1993). Dicho efecto ha sido también observado para macromoléculas como la proteína fluorescente GFP para la cual, el tiempo de difusión rotacional se encuentra incrementado en el citoplasma en un factor de 1.5 con respecto a su valor en solución diluida, mientras que su tiempo de difusión translacional lo está en un factor de 3.2 veces comparado con el determinado en agua (Swaminathan et al, 1997; Potma et al, 2001).

Todos estos resultados sugieren, (ver *Figura 6.8*) que la difusión rotacional de una partícula que ocurre a través de pequeños desplazamientos angulares se encuentra relativamente libre de impedimentos en soluciones en las que la especie que rota es de un tamaño inferior al espacio entre las partículas que ocupan volumen en la solución (Drake y Klafter, 1990). Por el contrario la difusión translacional, que implica desplazamientos lineales del orden de varios diámetros moleculares, se ve fuertemente impedida posiblemente por las colisiones con otras especies presentes en la solución (Verkman, 2002).

Los métodos experimentales presentados en este trabajo permiten identificar especies moleculares y cuantificar los efectos de la microviscosidad sobre su difusión rotacional y translacional en medios aglomerados. La acumulación de información, semejante a la obtenida aquí, para un gran número de sistemas macromoleculares permitirá proponer relaciones empíricas que serán de gran utilidad en el estudio de las interacciones en medios aglomerados utilizando las técnicas de FCS y espectroscopia de fluorescencia.

### 6.3. ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA Y FCS, DOS TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS PARA ESTUDIOS CUANTITATIVOS EN MEDIOS AGLOMERADOS

A lo largo de este trabajo, se ha demostrado la utilidad de dos técnicas, la anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos y la espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), para la obtención de información cuantitativa sobre la estructura, dinámica e interacciones entre proteínas en medios con aglomeración macromolecular.

En principio, la aplicación de este tipo de técnicas a sistemas aglomerados no resulta evidente, debido fundamentalmente a problemas derivados de la elevada concentración de especies presentes en el medio, como son los fondos o la desviación de las ecuaciones hidrodinámicas clásicas (ecuaciones de Stokes-Einstein-Debye, (6.5) y (6.6)), que suponen que el medio es homogéneo y se comporta como un continuo.

Normalmente, incluso las proteínas de gran pureza suelen contener trazas de impurezas, algunas de ellas fluorescentes. A bajas concentraciones de proteína, estas trazas de impurezas, no suponen un problema especial para las medidas de fluorescencia. Sin embargo, en los medios aglomerados la concentración de moléculas es tan elevada, que estas simples trazas de impurezas pueden afectar de forma importante a la relación señal/ruido. La contribución de la emisión de los fondos, en los experimentos de anisotropía de fluorescencia, viene determinada por la intensidad de fluorescencia asociada a las especies del medio. En las medidas de FCS, la contribución de los fondos a la función de autocorrelación depende no sólo de la intensidad de fluorescencia sino también de la intensidad de fluorescencia por unidad de molécula o brillo (ver *Materiales y Métodos 4.6.2*). La selección de condiciones como el tipo de fluoróforo empleado para cada marcaje o de las longitudes de onda de excitación y emisión, permite obtener señales de fluorescencia suficientemente libres de la contribución de los fondos. Así por ejemplo, las medidas de FCS con muestras de apoMb-Alexa 488 en presencia de altas concentraciones de HSA, resultaron inviables debido a la elevada intensidad de fluorescencia del fondo de la HSA a la longitud de onda de excitación de 488 nm. Sin embargo, las medidas fueron viables utilizando apoMb marcada con Alexa 546 y seleccionando como longitud de onda de excitación 543 nm.

La desviación de las ecuaciones de Stokes-Einstein-Debye observada en los medios con aglomeración macromolecular, dificulta la interpretación de los resultados obtenidos por medio de las técnicas de FCS y anisotropía de fluorescencia en términos de forma y tamaño de las especies moleculares. Por ello, la obtención de leyes generales que relacionen parámetros como los tiempos de correlación rotacional o los tiempos de difusión translacional con magnitudes medibles como la viscosidad macroscópica, es de gran importancia para la interpretación de los resultados obtenidos cuando estas dos técnicas se aplican al estudio de medios aglomerados. En este trabajo, se ha comprobado la validez de la ecuación (5.12) para describir el comportamiento de la difusión rotacional de proteínas en presencia de altas concentraciones de otras proteínas. También se ha propuesto una expresión análoga (ecuación (5.13)), que parece adecuada para describir el comportamiento de la difusión translacional de proteínas, en medios aglomerados en los que la especie altamente concentrada es otra proteína.

Existe un claro solapamiento entre el tipo de problemas que se pueden resolver mediante las técnicas de anisotropía de fluorescencia y de FCS, siendo la información que proporcionan complementaria. A la hora de diseñar un experimento de FCS o de anisotropía de fluorescencia en medios aglomerados, será necesario tener en cuenta una serie de factores que se resumen a continuación. En ocasiones, las características específicas de un sistema pueden determinar que una de las dos técnicas sea más apropiada para resolver un problema concreto, sin embargo, en los casos en que sea posible convendrá utilizarlas de forma complementaria.

Las medidas de difusión rotacional mediante anisotropía de fluorescencia presentan una mayor sensibilidad a cambios en el tamaño y la forma de las especies que las de difusión translacional utilizando FCS, ya que las primeras son dependientes del volumen de las especies mientras que las segundas dependen de su radio. Para el caso de una esfera, el tiempo de correlación rotacional  $f$  es proporcional a  $r^{-3}$  mientras que el tiempo de difusión translacional  $T$  es proporcional a  $r^{-1}$ .

En general, para que dos especies puedan ser identificadas mediante la función de autocorrelación, es necesario que la diferencia entre sus coeficientes de difusión translacional sea del orden de 2 o mayor (Meseth et al, 1999). Esto equivale, por ejemplo, a la diferencia de tamaños existente entre un monómero y un tetrámero suponiendo una forma esférica para ambos. En el caso de un dímero, el coeficiente de difusión translacional es aproximadamente un 25 % menor que el valor correspondiente al monómero (Müller et al, 2001). Por ese motivo, el estudio de la

dimerización de la apoMb en presencia de RNasa A se realizó utilizando la anisotropía de fluorescencia. En el caso en que las intensidades de fluorescencia por unidad de molécula de dos especies sean suficientemente distintas, se ha propuesto el método del histograma de conteo de fotones, que permite distinguir en un experimento de FCS especies con coeficientes de difusión similares (Müller et al, 2001; Chen et al, 1999).

En contrapartida, en un experimento de anisotropía de fluorescencia, la determinación de tiempos de correlación rotacional de especies está limitada a una ventana de tiempos del orden de 5-10 veces el tiempo de vida media de fluorescencia del fluoróforo. Los tiempos de vida media de fluorescencia de las sondas de uso más general suelen tener valores entre 2 y 15 ns, aunque existen algunos fluoróforos como ciertos derivados organometálicos de rutenio (Szmackinski, 1996; L, Jiménez-Hernández et al, 2000) con tiempos de vida media de fluorescencia de varios cientos de ns. En este sentido, FCS sería una técnica muy útil para el estudio de la unión de moléculas pequeñas a otras de mucho mayor tamaño como sucede, por ejemplo, en las interacciones antígeno – anticuerpo, o bien en los casos en que se formen agregados de proteína de gran tamaño.

Otra diferencia importante entre las técnicas de FCS y de anisotropía de fluorescencia, es que las primeras aportan información sobre la difusión translacional global de las especies, mientras que las segundas permiten estudiar además de la rotación global de la macromolécula, la contribución de movimientos segmentales dentro de la misma. En el caso de partículas flexibles, los coeficientes de difusión translacional determinados son el promedio de los correspondientes a todas las posibles conformaciones. Sin embargo, si la sonda está localizada adecuadamente, las medidas de anisotropía de fluorescencia proporcionan información sobre la flexibilidad interna de las moléculas así como de posibles cambios conformacionales que no son detectados por las técnicas de FCS. Así, por ejemplo, en este trabajo, se muestra como la anisotropía de fluorescencia con resolución temporal permite detectar movimientos segmentales dentro del dímero de apoMb en presencia de altas concentraciones de RNasa A. En estudios en los que el objetivo sea la cuantificación de especies de tamaños suficientemente diferentes, la técnica de FCS presentaría la ventaja de una interpretación más sencilla.

La elección de la sonda fluorescente más apropiada para marcar la proteína en un experimento de FCS es más sencilla que para un experimento de anisotropía de fluorescencia, estando determinada fundamentalmente por la fotoestabilidad y la



elevada fluorescencia por unidad de molécula. En un experimento de FCS, cuestiones como la movilidad segmental de la sonda o el tiempo de vida media de fluorescencia no son parámetros importantes. Sin embargo, en un experimento de anisotropía de fluorescencia, el tiempo de vida media de la sonda debe ser del orden de los tiempos de correlación rotacional de las especies que se deseen medir. La unión covalente del cromóforo en sitios de la proteína muy expuestos al tampón tiene como ventaja la eliminación de posibles interacciones entre el fluoróforo y la proteína que afecten a la función de la misma. Sin embargo, tienen como desventaja la contribución al decaimiento de anisotropía de movimientos segmentales poco restringidos, que limitan la detección de los movimientos realmente relevantes dentro de la especie.

En cuanto a las limitaciones en el intervalo de concentraciones de fluoróforo que permite utilizar cada una de las técnicas, en principio, el límite superior no sería un problema. Normalmente, siempre existe la posibilidad de utilizar en la muestra la cantidad adecuada de proteína marcada como trazador y completar la cantidad total necesaria con proteína no marcada, tal y como se ha hecho en este trabajo en los experimentos en los que la sonda era fluoresceína. El límite inferior de concentraciones de fluoróforo es aproximadamente el mismo para un experimento de FCS que para uno de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal (nM) (Matayoshi y Swift, 2001).

A diferencia de los experimentos de equilibrio de sedimentación, los parámetros hidrodinámicos determinados en FCS y anisotropía de fluorescencia no se ven afectados por la no idealidad termodinámica. Las dos técnicas espectroscópicas, aportan información sobre la proporción de las distintas especies moleculares presentes en los sistemas con aglomeración macromolecular, a partir de las cuales se podrían estimar valores de las constantes de equilibrio aparentes. En el caso de la dimerización de la apoMb en presencia de RNasa A, se ha podido estimar la proporción de monómero y dímero de apoMb para las distintas concentraciones de RNasa A a partir de los experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal. La determinación de constantes de asociación aparentes de apoMb, a partir de experimentos de anisotropía de estado estacionario, se ha visto limitada por factores experimentales como el bajo rendimiento cuántico de la sonda ANS en comparación con los fondos de fluorescencia, así como por la presencia de flexibilidad en el dímero de apoMb. De cualquier modo, esos experimentos han sido de gran utilidad para acotar los posibles valores de la constante de dimerización en los distintos medios (ver *Discusión 6.1.3.2*).

En el momento en el que se inició este trabajo, existían ya en la bibliografía ejemplos de aplicación de las técnicas de equilibrio de sedimentación al estudio de interacciones en medios con aglomeración macromolecular (Rivas et al, 1999a; Muramatsu y Minton, 1989). A la luz de los resultados obtenidos en este trabajo, las técnicas de FCS y anisotropía de fluorescencia con resolución temporal son claramente dos alternativas complementarias que pueden resultar de gran utilidad para estudios cuantitativos en este tipo de medios.

Tanto las técnicas de FCS como las de anisotropía de fluorescencia se están utilizando actualmente en experimentos de cribado de alto rendimiento en soluciones diluidas (Sterrer y Henco, 1997). Estudios detallados como el presentado en este trabajo permitirán optimizar su extensión a medios aglomerados más semejantes a los medios fisiológicos en los que realmente ejercen su función las macromoléculas biológicas.

#### **6.4. PERSPECTIVAS FUTURAS**

En los últimos años se han producido importantes avances instrumentales en las técnicas de microscopía de fluorescencia con resolución temporal que están permitiendo empezar a estudiar interacciones de forma cuantitativa a nivel celular. A pesar de la complejidad de estos métodos, se están observando comportamientos muy diferentes a los determinados en soluciones diluidas (Bastiaens, 2000; Gautier et al, 2001).

La obtención de información cuantitativa sobre las interacciones entre macromoléculas en medios con aglomeración macromolecular, es de gran importancia para la comprensión del comportamiento de dichas macromoléculas en el medio celular. En principio, este tipo de sistemas exhiben propiedades más homogéneas y definidas que los sistemas biológicos reales, por lo cual las medidas en ellos realizadas presentan menores complicaciones experimentales que las medidas realizadas directamente en células y fluidos fisiológicos. Sin embargo, con respecto a los medios ideales diluidos, los sistemas aglomerados representan un gran salto en lo referente a la complejidad del diseño e interpretación de los experimentos.

El diseño de un experimento "*in vitro*" en condiciones de aglomeración macromolecular no es una tarea sencilla. Sigue siendo muy importante controlar factores que también se tienen en cuenta en los experimentos en solución diluida

como el pH, la fuerza iónica o las concentraciones de las especies. También es importante seleccionar adecuadamente las especies que mejor simulen la ocupación de volumen en un medio fisiológico. Dichas especies deben además ser inertes con respecto a las macromoléculas objeto de estudio, es decir, que no deben interactuar de manera específica con ellas. Algunas de las especies que habitualmente se han utilizado para simular la ocupación de volumen son los dextranos, dada su baja capacidad de interacción con otras especies. Sin embargo, en nuestro trabajo, hemos utilizado proteínas como la HSA o la RNasa A. En principio, las proteínas son menos inertes que los dextranos, sin embargo, ciertos fluidos fisiológicos como el plasma sanguíneo e incluso el citoplasma, contienen una alta concentración de las mismas por lo cual parecen más adecuadas para la simulación de la ocupación de volumen en este tipo de medios fisiológicos.

El otro problema fundamental con el que nos encontramos es el de las limitaciones de la aplicación de las técnicas biofísicas para el estudio de interacciones en medios con aglomeración macromolecular. Las técnicas biofísicas ampliamente utilizadas para la obtención de información cuantitativa sobre las interacciones macromoleculares en solución diluida, encuentran grandes problemas tanto experimentales como de interpretación al ser aplicadas en este tipo de medios. Hasta el momento, se han aplicado muy pocas técnicas de forma satisfactoria para el estudio de las propiedades de las macromoléculas en medios con aglomeración macromolecular (Ellis, 2001), siendo el equilibrio de sedimentación la más consolidada (Rivas et al, 1999a).

La viabilidad de la aplicación de técnicas como la anisotropía de fluorescencia o FCS en medios aglomerados, demostrada en este trabajo, proporciona herramientas de gran utilidad para la obtención de información cuantitativa sobre las propiedades de las macromoléculas en estos medios. Sin embargo, aún queda mucho camino por recorrer. Es importante comprender el papel de la viscosidad local que actúa sobre la difusión rotacional o translacional, fundamental para la interpretación de los parámetros determinados por ambas técnicas. El diseño y síntesis de sondas de tiempos de vida media de fluorescencia más largos, facilitaría enormemente el diseño de experimentos de anisotropía de fluorescencia en estos medios aglomerados, en los que la elevada viscosidad produce un aumento en los tiempos de correlación rotacional de las especies. Finalmente, la optimización de los procesos de purificación de proteínas hacia la eliminación de impurezas fluorescentes, proporcionaría un aumento de la relación señal/ruido en los experimentos de fluorescencia, lo que puede

contribuir de forma importante al avance de la aplicación de estas técnicas a los medios con aglomeración macromolecular.

Dado que la información que proporcionan las distintas técnicas biofísicas es en la mayor parte de los casos complementaria, el abordaje pluridisciplinar es el único que puede ayudar a resolver un problema tan complejo como es la comprensión de los procesos que tienen lugar en los medios aglomerados.

## *7. Conclusiones*

---

Las conclusiones que se pueden extraer de este estudio son las siguientes:

1. Se demuestra la utilidad de las técnicas de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de ps y de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), tal como se han desarrollado en este trabajo para la obtención de información cuantitativa sobre las propiedades hidrodinámicas de especies moleculares y sus interacciones, en medios con aglomeración macromolecular.

2. Se describen métodos de marcado fluorescente de apoMb así como técnicas de investigación de la conformación global de las proteínas marcadas. De esta forma se concluye que la conformación en solución de la apoMb, apoMb-ANS y apoMb-FI es muy similar, y muy próxima a la de Mb.

3. Los métodos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de ps han permitido estudiar la autoasociación de proteínas en medios aglomerados. Se ha detectado la formación de dímeros de apoMb favorecida por el grado de aglomeración macromolecular generado mediante concentraciones variables de RNasa A.

4. Se ha podido estudiar la presencia de movimientos segmentales dentro de una proteína en un medio aglomerado mediante las técnicas de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal de ps. Los dímeros de apoMb presentan un alto grado de flexibilidad segmental, en la misma zona de tiempos que la correspondiente a la rotación global de la forma monomérica de la apoMb.

5. Las técnicas de anisotropía de fluorescencia han permitido estimar la proporción de distintas especies en un medio aglomerado. Se ha estimado la proporción de monómero y dímero de apoMb en presencia de distintas concentraciones de RNasa A como proteína aglomerante.

6. La caracterización difusional detallada de las especies mono y diméricas de apoMb ha permitido poner un límite inferior a la constante aparente de equilibrio de dimerización de apoMb en función del grado de aglomeración del medio (concentración de RNasa A).

7. La presencia de RNasa A como proteína aglomerante favorece la formación de dímeros de apoMb permitiendo su detección en solución, sin embargo, en soluciones de HSA del mismo orden de concentraciones no se detecta la formación de dímeros de apoMb. Esta diferencia del efecto de la aglomeración se interpretó a partir de la diferente magnitud del volumen excluido en las soluciones de HSA y RNasa A, que es apreciablemente mayor en este último caso a igualdad de concentración en mg/mL.

8. La utilización complementaria de las técnicas de anisotropía de fluorescencia y de FCS puestas a punto en este trabajo, puso en evidencia las importantes desviaciones que tienen lugar en los tiempos de difusión rotacional y translacional de las proteínas en medios aglomerados, respecto a las predicciones de la ecuación de Stokes-Einstein-Debye. Asimismo se muestra que estas desviaciones en función del grado de aglomeración son diferentes para los parámetros difusivos rotacionales y translacionales siendo mayores en este último caso.

9. En soluciones en las que la especie aglomerante es la RNasa A, la difusión rotacional del dímero de apoMb se ve más afectada que la del monómero de apoMb para la misma concentración de RNasa A en mg/mL. El impedimento observado para la difusión translacional del monómero de apoMb es mayor en soluciones en las que la aglomeración macromolecular se debe a la RNasa A que en aquellas en las que se debe a la HSA (para iguales concentraciones en mg/mL)

10. El comportamiento difusivo rotacional de proteínas (monómero y el dímero de apoMb) en medios aglomerados constituidos por otras proteínas (RNasa A o HSA), se pudo describir formalmente utilizando la expresión empírica propuesta previamente para otros medios (Lavalette et al. 1999, Endre y Kuchel, 1986), en la que se propone una dependencia potencial de la viscosidad microscópica con la macroviscosidad (ecuación (5.12)). El parámetro  $q$  tomaba valores menores que la unidad.

11. En el caso de los fenómenos difusivos translacionales de proteínas (apoMb) en medios aglomerados constituidos por otras proteínas (RNasa A o HSA), se pudo utilizar una ecuación empírica análoga (ecuación (5.13)). La diferencia más llamativa es que en este caso, el valor del parámetro  $q$  es siempre mayor que 1.

## *Bibliografía*

---



Antonini E y Brunori M (1971). En *Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands*. North-Holland, Amsterdam.

Aragon S R y Pecora R (1976). "Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics". *J. Chem. Phys.* **64**: 1791-1803.

Attri AK y Minton AP (1983). "An automated method for determination of the molecular weight of macromolecules via sedimentation equilibrium in a preparative ultracentrifuge". *Anal. Biochem.* **133**: 142-52.

Barnes M D, Whitten, WB y Ramsey JM (1995) "Detecting single molecules in liquids". *Anal. chem*, **67**: A418-23.

Barrick D y Baldwin RL (1993). Stein and Moore Award address. The molten globule intermediate of apomyoglobin and the process of protein folding". *Protein Sci.* **2**:869-76.

Bastiaens PI y Pepperkok R (2000). "Observing proteins in their natural habitat: the living cell". *Trends Biochem. Sci.* **25**: 631-7.

Beaven GH, Chen SH, d' Albis A y Gratzer WB. (1974). "A spectroscopic study of the haemin--human-serum -albumin system". *Eur. J. Biochem.* **41**: 539-46.

Beechem JM (1992). "Global analysis of biochemical and biophysical data". *Methods Enzymol.* **210**: 37-54.

Beechem JM, Gratton E, Ameloot M, Knutson JR y Brand L (1991). "The global analysis of fluorescence intensity and anisotropy decay data: Second-generation theory and programs". En *Topics in Fluorescence Spectroscopy vol.2*, Editado por Lakowicz JR. Plenum Press, New York. 241-305.

Belford GG, Belford RL y Weber G (1972). "Dynamics of fluorescence polarization in macromolecules". *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* **69**: 1392-3.

Ben-Amotz D y Drake JM (1988). "The solute size effect in rotational diffusion experiments: a test of microscopic friction theories". *J. Chem. Phys.* **89**: 1019-1029.

Bicknese S, Periasamy N, Shohet SB y Verkman AS (1993). "Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: measurement by evanescent field frequency-domain microfluorimetry". *Biophys. J.* **65**: 1272-82.

Birch DJS e Imhof RE (1991). "Time-domain fluorescence spectroscopy using time-correlated single-photon counting". En *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol 1. Techniques*. Editado por Lakowicz J.R. Plenum Press, New York. 1-95.

Birks JB y Munro IH (1967). "The fluorescence lifetimes of aromatic molecules". *Progress in react. Kin.* **4**: 239-303.

Bismuto E, Sirangelo I, Irace G y Gratton E (1996). "Pressure-induced perturbation of apomyoglobin structure: fluorescence studies on native and acidic compact forms". *Biochemistry.* **35**: 1173-8.

Brock R y Jovin TM (2001). "Fluorescence correlation Microscopy & Fluorescence correlation Spectroscopy in cell biology ". En *Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and applications*. Editado por Rigler R y Elson ES. Springer series in chemical physics, Verlag Berlin Heidelberg. 133-61.

Cañadas O (2002). "Propiedades fotofísicas, dinámica conformacional e interacción con microtúbulos de derivados fluorescentes de taxol, utilizando espectroscopía láser de polarización en el picosegundo". *Tesis Doctoral*. Universidad de Alcalá.

Cantor CR y Schimmel PR (1980). En *Biophysical Chemistry*. Editado por Freeman WH y Co. San Francisco.

Chauvin F, Brand L y Roseman S (1994). "Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Characterization of the Escherichia coli enzyme I monomer/dimer equilibrium by fluorescence anisotropy". *J. Biol. Chem.* **269**: 20263-9.

Chen R.F. y Bowman R.L. (1965). "Fluorescence polarization: Measurement with ultraviolet-polarizing filters in a spectrophotometer". *Science*. **147**: 729-732.

Chen Y, Müller JD, So PT y Gratton E (1999). "The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy". *Biophys. J.* **77**: 553-67.

Cocco MJ y Lecomte JT (1994). "The native state of apomyoglobin described by proton NMR spectroscopy: interaction with the paramagnetic probe HyTEMPO and the fluorescent dye ANS". *Protein Sci.* **3**: 267-81.

Coletta M, Ascenzi P y Brunori M (1988). "Kinetic evidence for a role of heme geometry on the modulation of carbon monoxide reactivity in human hemoglobin". *J. Biol. Chem.* **263**: 18286-9.

Darawshe S, Rivas G y Minton AP (1993). "Rapid and accurate microfractionation of the contents of small centrifuge tubes: application in the measurement of molecular weight of proteins via sedimentation equilibrium". *Anal. Biochem.* **209**:130-5.

Diehl H y Horchak-Morris N (1987). "Studies on fluorescein: the absorbance of fluorescein in the ultraviolet as a function of pH". *Talanta.* **34**: 739-41.

Drake RD y Klafter J (1990). "Dynamics of confined molecular systems". *Phys. Today* **43**: 46-55.

Ehrenberg y Rigler (1974). "Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations". *Chem. Phys.* **4**: 390-401

Eigen M y Rigler R (1994). "Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 5740-7

Ellis RJ (2001). "Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment". *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**: 114-9.

Ellis RJ y Hartl FU (1996). "Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function". *FASEB J.* **10**: 206.

Elson EL y Magde D (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy: Conceptual basis and theory". *Biopolymers.* **13**: 1-27

Endre ZH y Kuchel PW (1986). "Viscosity of concentrated solutions and of human erythrocyte cytoplasm determined from NMR measurement of molecular correlation times. The dependence of viscosity on cell volume". *Biophys. Chem.* **24**: 337-56.

Fulton AB (1982). "How crowded is the cytoplasm?". *Cell.* **30**: 345-7.

Fushimi K y Verkman AS (1991). "Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry". *J. Cell Biol.* **112**: 719-25.

Gautier I, Tramier M, Durieux C, Coppey J, Pansu RB, Nicolas JC, Kemnitz K y Coppey-Moisan M (2001) "Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFT-tagged proteins". *Biophys. J.* **80**: 3000-8.

Gavish B (1980). "Position /dependent viscosity effects on rate coefficients" *Phys. Rev. Lett.* 1160-1163.

Gennaro AM, Luquita A y Rasia M (1996). "Comparison between internal microviscosity of low-density erythrocytes and the microviscosity of hemoglobin solutions: an electron paramagnetic resonance study". *Biophys. J.* **71**: 389-93.

Griko YV, Privalov PL, Venyaminov SY y Kutysenko VP (1988). "Thermodynamic study of the apomyoglobin structure". *J. Mol. Biol.* **202**: 127-38.

Grinvald A (1976). "The use of standards in the analysis of fluorescence decay data". *Anal. Biochem.* **75**: 260-280.

- Grinvald A y Steinberg IZ (1974). "On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares". *Anal. Biochem.* **59**: 583-598.
- Haouz A, Glandieres JM, Zentz C, Pin S, Ramstein J, Tauc P, Brochon JC y Alpert B (1998). "Solvent effects on horse apomyoglobin dynamics". *Biochemistry.* **37**: 3013-9.
- Hink M y Visser AJWG (1999). "Characterization of membrane mimetic systems with fluorescence". En *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*. Editado por Retting W, Strechmel, B, Schrader S y Seifert H. Springer. 101-118.
- Hudson EN y Weber G (1973) "Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents". *Biochemistry.* **12**: 4154-61.
- Hughson FM, Wright PE y Baldwin RL (1990). "Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate". *Science.* **249**: 1544-8.
- Jablonski A. (1957) "Decay of photoluminescence of solutions". *Acta Phys. Polon.* **26**: 471.
- Jimenez-Hernandez ME, Orellana G, Montero F, Portoles MT (2000). "A ruthenium probe for cell viability measurement using flow cytometry, confocal microscopy and time-resolved luminescence". *Photochem. Photobiol.* **72**: 28-34.
- Johnson RS y Walsh KA (1994). "Mass spectrometric measurement of protein amide hydrogen exchange rates of apo- and holo-myoglobin". *Protein Sci.* **3**: 2411-8.
- Kao HP, Abney JR y Verkman AS (1993). "Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm". *J. Cell Biol.* **120**: 175-84.
- Kinjo M y Rigler R (1995). "Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy". *Nucleic Acids Res.* **23**:1795-9.
- Kinosita K, Kawato S e Ikegami A (1977). "A theory of fluorescence polarization decay in membranes". *Biophys. J.* **20**: 289-305.

Klonis N. y Sawyer W.H. (1996). "Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution". *J. Fluorescence*. **6**: 147-157.

Lakowicz JR (1999). En *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2ª Edición. Editado por Lakowicz JR. Kluwer Academic-Plenum Publishers.

Lamola AA, Landon DO, Kochevar IE y Harber LC (1982). "An instrument for action spectrum studies in dermatology". *Photochem. Photobiol.* **35**: 285-90.

Laue TM, Shah BD, Ridgeway TM y Pelletier S L (1992). En *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Editado por Harding S, Rowe A, and Horton J. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 90-125

Lavalette D, Tetreau C, Tourbez M y Blouquit Y (1999). "Microscopic viscosity and rotational diffusion of proteins in a macromolecular environment". *Biophys. J.* **76**: 2744-51.

Lebowitz JL, Helfand, E y Praestgaard, E (1965). "Scaled particle Theory of fluid mixtures" *J. Chem. Phys.* **43**:774-9

Lillo MP (1985). "Polarización de fluorescencia y rotación browniana. Aplicación a macromoléculas biológicas". *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.

Lillo MP, Cañadas O, Dale RE y Acuña A U (2002). "Location and properties of the taxol binding center in microtubules: A picosecond laser study with fluorescent taxoids". *Biochemistry*. **41**:12436-12449.

Lin L, Pinker RJ, Forde K, Rose GD y Kallenbach NR (1994). "Molten globular characteristics of the native state of apomyoglobin". *Nat. Struct. Biol.* **1**:447-52.

Lipari G y Szabo A (1980). "Effect of librational motion on fluorescence depolarization and nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules and membranes". *Biophys. J.* **30**:489-506.

Mach H, Middaugh CR y Lewis RV (1992). "Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins". *Anal. Biochem.* **200**: 74-80.

Magde D, Elson EL y Webb W W (1972). "Thermodynamic fluctuations in a reacting system measurement by fluorescence correlation spectroscopy". *Phys. Rev. Lett.* **29**: 705-11.

Magde D, Elson EL y Webb WW (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy. II. Experimental realization". *Biopolymers.* **13**: 29-61

Magde D, Webb WW y Elson EL, (1978). "Fluorescence correlation spectroscopy. 3. Uniform translation and laminar flow". *Biopolymers.* **17**: 361-76

Marquardt DW (1963). "An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters". *Soc. Ind. Appl. Math.* **11**: 431-441.

Matayoshi E y Swift K (2001) "Applications of FCS to protein –ligand interactions: comparison with fluorescence polarization" En *Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and applications*. Editado por Rigler R y Elson ES Springer series in chemical physics, Verlag Berlin Heidelberg. 85-97.

McDonagh AF, Agati G, Fusi F y Pratesi R (1989). "Quantum yields for laser photocyclization of bilirubin in the presence of human serum albumin. Dependence of quantum yield on excitation wavelength". *Photochem. Photobiol.* **50**: 305-19.

Melhuish WH (1962). "Calibration of spectrofluorometers for measuring corrected emission spectra" *J. Opt. Soc. Amer.* **52**: 1256-8.

Meseth U, Wohland T, Rigler R y Vogel H. (1999). "Resolution of fluorescence correlation measurements". *Biophys. J.* **76**: 1619-31.

Minton AP (1981). "Excluded volume as a determinant of macromolecular structure and reactivity". *Biopolymers*, **20**: 2093-2120.

Minton AP (1983). "The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences". *Mol. Cell. Biochem.* **55**: 119-40.

Minton AP (1994). "Influence of macromolecular crowding on intracellular association reactions: possible role in volume regulation". En *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. Editado por Strange K. Boca Raton. CRC Press: 181-190.

Minton AP (1995). "Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity. II. Effects of weakly attractive interactions between confined macrosolutes and confining structures". *Biophys. J.* **68**: 1311-22.

Minton AP (1997). "Influence of excluded volume upon macromolecular structure and associations in 'crowded' media". *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 65-9.

Minton AP (1998a). "Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion". *Methods Enzymol.* **295**: 127-49.

Minton AP, (1998b). En *Energetics of Biological macromolecules* parte B. Editado por Ackers, G y Johnson M. Academic Press, San Diego. **295**: 127-149

Minton AP (2000a). "Effect of a concentrated "inert" macromolecular cosolute on the stability of a globular protein with respect to denaturation by heat and by chaotropes: a statistical-thermodynamic model". *Biophys. J.* **78**: 101-9.

Minton AP (2000b). "Implications of macromolecular crowding for protein assembly". *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 34-9.



Minton AP (2001). "The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media". *J. Biol. Chem.* **276**: 10577-80.

Molecular Probes Inc, (2001). En *Handbook of fluorescent probes and research products*. 8ª edición. Leiden, Holanda.

Mooney M (1951). "The viscosity of a concentrated suspension of spherical particles". *J. Colloid. Sci.* **6**: 162-170.

Müller JD, Chen Y, y Gratton E (2001). "Photon counting Histogram statistics". En *Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and applications*. Editado por Rigler R y Elson ES Springer series in chemical physics, Verlag Berlin Heidelberg. 411-437.

Muramatsu N y Minton AP (1988a). "Tracer diffusion of globular proteins in concentrated protein solutions". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**: 2984-8.

Muramatsu N y Minton AP (1988b). "An automated method for rapid determination of diffusion coefficients via measurements of boundary spreading". *Anal. Biochem.* **168**: 345-51.

Muramatsu N y Minton AP. (1989). "Hidden self-association of proteins". *J. Mol. Recognit.* **1**:166-71.

Naber D, Korte U y Krack K (1979). "Content of water-soluble and total proteins in the aging human brain". *Exp. Gerontol.* **14**: 59-63.

Nie S y Zare RN (1997). "Optical detection of single molecules". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**: 567-96.

Niswender KD, Blackman SM, Rohde L, Magnuson MA y Piston DW (1995). "Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits". *J. Microsc.* **180**: 109-16.

Organero JA, Tormo L y Douhal A, (2002). "Caging ultrafast proton transfer and twisting motion of 1-hidroxi-2-acetonaphthona". *Chem. Physics letters*. **363**: 409-414.

Papadopoulos S, Jurgens KD y Gros G (2000). "Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction. Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction". *Biophys. J.* **79**: 2084-94.

Perrin F (1926). "Polarisation de la lumière de fluoesscence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité". *J. Phys. Radium V, Ser. 6, 7*: 390-401.

Peters T Jr (1996). En "All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications" Academic press, San Diego.

Potma EO, de Boeij WP, Bosgraaf L, Roelofs J, van Haastert PJ y Wiersma DA (2001) "Reduced protein diffusion rate by cytoskeleton in vegetative and polarized dictyostelium cells". *Biophys. J.* **81**: 2010-9.

Ralston G, (1993) "Introduction to analytical Ultracentrifugation". Beckman-Coulter, CA

Ralston GB (1990). "Effects of crowding in protein solutions". *Journal of chemical education*. **67**: 857-60.

Rauer B, Neumann, E, Widengren J y Rigler R, (1996). "Fluorescence correlation spectroscopy of the interaction kinetics of tetramethylrhodamin alfa-fungarotoxin with Torpedo Californica acetylcholine receptor". *Biophys. Chem.* **58**: 3-12.

Record MT Jr, Courtenay ES, Cayley S y Guttman HJ (1998). "Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments". *Trends. Biochem. Sci.* **23**: 190-4.

Rigler R (1995). "Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology." *J. Biotechnol.* **41**: 177-86.

Rigler R y Mets U (1992). "Difusión of single molecules through a Gaussian laser beam". *SPIE Proc.* **1921**: 239-248.

Rigler R y Widengren J (1990). En *Bioscience*. Editado por Klinge B y Ownan C. Lund University Press, Lund. 180-3.

Rigler R, Mets U, Widengren J, y Kask P (1993). "Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion". *Eur. Biophys. J.* **22**: 169-75.

Rigler R, Widengren J y Mets, U (1992). En *Fluorescence Spectroscopy*. Editado por Wolfbeis OS. Springer Verlag, Berlin. 13-24.

Rivas G, Fernandez JA y Minton AP (1999a). "Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium: theory, experiment, and biological significance". *Biochemistry.* **38**: 9379-88.

Rivas G, Stafford W y Minton AP. (1999b) "Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation". *Methods.* **19**: 194-212.

Robinson, GW, Caughney, TA y Auerbach RA (1978). En *Advances in Laser Chemistry*. Editado por Zewail AH. Springer, New York. 108-25.

Ross PD y Minton AP (1977). "Hard quasispherical model for the viscosity of hemoglobin solutions". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**: 971-6.

Rossi-Fanelli A, Antonini E y Caputo A (1958). "Structure of hemoglobin. I. Physicochemical properties of human globin". *Biochim. et Biophys. Acta* **30**: 608-15.

Sassaroli M, Bucci E, Liesegang J, Fronticelli C y Steiner RF (1984). "Specialized functional domains in hemoglobin: dimensions in solution of the apohemoglobin dimer labeled with fluorescein iodoacetamide". *Biochemistry.* **23**: 2487-91.

Sassaroli M, Kowalczyk J y Bucci E (1986). "Probe dependence of correlation times in heme-free extrinsically labeled human hemoglobin". *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 624-8.

Sela M y Anfinsen C B. (1957) "Spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease". *Biochim. et Biophys. Acta.* **24**: 229-35.

Shtilerman MD, Ding TT y Lansbury PT Jr. (2002). "Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease?". *Biochemistry.* **41**: 3855-60.

Simha, R. (1940). "The influence of Brownian movement on the viscosity of solutions". *J. Phys. Chem.* **44**: 25-34.

Sjöback R., Nygren J. y Kubista M. (1995). "Absorption and fluorescence properties of fluorescein". *Spectrochimica Acta Part A.* **51**: L7-L21.

Small EW e Isenberg I (1977). "Hydrodynamic properties of a rigid molecule: rotational and linear diffusion and fluorescence anisotropy". *Biopolymers.* **16**: 1907-28.

Soleillet P (1929). "Sur les paramètres caractérisant la polarisation partielle de la lumière dans les phénomènes de fluorescence". *Ann. Phys. Biol. Med.* **12**: 23-97.

Somero GN, Osmond CB y Bolis CM (1992). En *Water and Life*. Springer-Verlag, Berlin.

Spencer RD y Weber G (1970). "Influence of brownian rotations and energy transfer upon the measurement of fluorescence lifetimes". *J. Chem. Phys.* **52**: 1654-63.

Squire P y Himmel ME (1979). "Hydrodynamics and protein hydration". *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **196**, 1, 165-77.

Steiner RF y McAllister AJ (1957). "Use of the fluorescence technique as an absolute method for obtaining mean relaxation times of globular proteins". *J. Polym. Sci.* **24**: 105.

Sterrer S y Henco K. (1997). "Fluorescence correlation spectroscopy (FCS): a highly sensitive method to analyze drug-target interactions". *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **17**: 511-20.

Stryer L (1965). "The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites". *J. Mol. Biol.* **13**: 482-95.

Swaminathan R, Hoang CP y Verkman AS (1997). "Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion". *Biophys. J.* **72**: 1900-7.

Szmacinski H, Terpetschnig E y Lakowicz JR (1996). "Synthesis and evaluation of Ru-complexes as anisotropy probes for protein hydrodynamics and immunoassays of high-molecular-weight antigens". *Biophys. Chem.* **62**: 109-20.

Tanaka N, Ikeda C, Kanaori K, Hiraga K, Konno T y Kunugi S. (2000). "Pressure effect on the conformational fluctuation of apomyoglobin in the native state". *Biochemistry.* **39**: 12063-8.

Tanford C (1961). En *Physical Chemistry of Macromolecules*. John Wiley & Sons. New York. 710.

Tanford C (1980) en *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, 2a edición. Willey & Sons, New York. 233

Tcherkasskaya O, Ptitsyn OB y Knutson JR (2000). "Nanosecond dynamics of tryptophans in different conformational states of apomyoglobin proteins". *Biochemistry.* **39**: 1879-89.

Thompson NL (1991). "Fluorescence correlation spectroscopy". En *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Editado por Lakowicz, JR. Plenum Press. New York. **1**: 1337-378.

Torrent J, Connelly JP, Coll MG, Ribo M, Lange R y Vilanova M. (1999). "Pressure versus heat-induced unfolding of ribonuclease A: the case of hydrophobic interactions within a chain-folding initiation site". *Biochemistry*. **38**: 15952-61.

Uversky NV, Cooper EM, Bower SK, Li J y Fink A L (2001). "Accelerated  $\alpha$  -synuclein fibrillation in crowded milieu". *Febs Letters*. **515**: 99-103

Valeur B, (2002). En *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.

Van Craenenbroeck E y Engelborghs Y. (2000) "Fluorescence correlation spectroscopy: molecular recognition at the single molecule level". *J. Mol. Recognit*. **13**: 93-100.

Van den Oord AHA, Wesdorp JJ, Van Dam y Verheij JA, (1969). "Occurrence and nature of equine and bovine myoglobin dimers". *European J. Biochem*. **10**:140-145

Verkman AS (2002). "Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments". *Trends Biochem. Sci*. **27**: 27-33.

Visser AJWG y Hink MA (1999). "New perspectives of fluorescence correlation spectroscopy". *Journal of Fluorescence*. **1**: 81-7.

Wang D, Kreutzer U, Chung Y y Jue T (1997). "Myoglobin and hemoglobin rotational diffusion in the cell". *Biophys. J*. **73**: 2764-70.

Ward LD y Winzor DJ (1984). "Self-association of sperm whale metmyoglobin" *Arch. Biochem. Biophys*. **234**: 125-8

Ware WR (1971). En *Creation and detection of the excited state, 1A*. Editado por Lamola AA y Dekker M. New York. 213-302.

Waxman, E, lawis WR, Laue TM y Ross JBA (1994). "Refining Hydrodynamic shapes of proteins: The combination of data from analytical ultracentrifugation and Time resolved fluorescence anisotropy decay". En *Modern Analytical ultracentrifugation*. Editado por Schuster TM y Laue TM. Birkhäuser, Boston.

Weber G y Young LB, (1964). "Fragmentation of bovine serum albumin by pepsin.II. isolation, aminoacids composition and physical properties of the fragments" *J. Biol. Chem.*, **239**: 1424-1431.

Widengren J (2001). "Photophysical Aspects of FCS Measurements". En *Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and applications*. Editado por Rigler R y Elson ES. Springer series in chemical physics, Verlag Berlin Heidelberg. 277-301.

Widengren J y Rigler R (1998). "Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces". *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **44**:857-79.

Wilf J y Minton AP. (1981) "Evidence for protein self-association induced by excluded volume. Myoglobin in the presence of globular proteins". *Biochim. Biophys. Acta*. **670**: 316-22.

Wills PR y Winzor D J (1992). En *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*. Editado por Harding S, Rowe A y Horton. J. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 311-330.

Wohland T, Friedrich K, Hovius R y Vogel H. (1999). "Study of ligand-receptor interactions by fluorescence correlation spectroscopy with different fluorophores: evidence that the homopentameric 5-hydroxytryptamine type 3As receptor binds only one ligand". *Biochemistry*. **38**: 8671-81.

Yedgar S, Tetreau C, Gavish B y Lavalette D (1995). "Viscosity dependence of O2 escape from respiratory proteins as a function of cosolvent molecular weight". *Biophys. J.* **68**: 665-70.

Yguerabide J e Yguerabide E (1984). En *Optical techniques in biological reserch*. Cap. 4. Editado por Rousseau DL. Academic Press Inc., Orlando. 181-290.

Zimmerman HE, Werthemann DP y Kamm KS (1974). "Single Photon counting and magic multipliers in direct measurement of singlet excited state di- $\pi$ -methane rearrangment rates in the picosecond range. Mechanistic organic photochemistry. LXXXIII". *J. Am. Chem. Soc.* **96**: 439-449.

Zimmerman SB y Minton AP (1993). "Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* **22**: 27-65.

Zimmerman SB y Trach SO (1991). "Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* **222**: 599-620.

Zs-Nagy I, Nagy K y Lustyik G (1982). "Protein and water contents of aging brain". *Exp. Brain Res. Suppl* **5**: 118-122.

Zs-Nagy I, Nagy K, Zs-Nagy V, Kalmar A y Nagy E (1981). "Alterations in total content and solubility characteristics of proteins in rat brain and liver during aging and centrophenoxine treatment". *Exp. Gerontol.* **16**: 229-240.