

Estudio de la conformación proteica.

Cuarta Parte

Existe una gran cantidad de técnicas que pueden emplearse en el estudio de las proteínas en el laboratorio. Aquí, nos detendremos en algunas de ellas. Nos importará entender los principios básicos y la teoría que permitirá, luego, aplicar estas herramientas al estudio conformacional de proteínas.

A esta altura, ya hemos comentado varias veces que requerimos, para nuestros experimentos, contar casi siempre, con la proteína de interés relativamente pura y, en general, con una pureza >95%. Por esto, cuando produzcamos una proteína recombinante o cuando aislemos una proteína a partir de una fuente natural (clara de huevo, leche, etc.), vamos a necesitar:

1. Algunas herramientas para poder evaluar el nivel de producción de la proteína recombinante y, posteriormente, evaluar el grado de pureza. Los laboratorios cuentan, típicamente, con sistemas para hacer electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE por ejemplo) y con un espectrofotómetro de buena calidad para medir la concentración de la proteína pura.

2. Otros equipos y conocer ciertas técnicas que nos permitan purificar la proteína de interés. Típicamente, a estas técnicas las conocemos con el nombre genérico de técnicas cromatográficas. Vamos a discutir los distintos tipos de separaciones por cromatografía: separación por exclusión molecular (separación tamaño) y separación por intercambio iónico (separación por carga).

3. Además vamos a necesitar manejar técnicas que nos permitan reconocer el estado de la proteína de interés. Por ejemplo, durante la producción o durante la purificación podría haberse degradado a través de la acción de proteasas o modificado químicamente, por ejemplo la proteína podría haberse oxidado. Entonces, vamos a necesitar herramientas para evaluar el peso molecular o la masa de la proteína (típicamente espectrometría de masa).

En este punto debemos tener en cuenta que lograr producir en bacterias una proteína recombinante o purificar una proteína de una fuente natural **no garantiza** que su estado conformacional sea el correcto. Por eso, necesitaremos técnicas e instrumentos que permitan evaluar el estado conformacional de las proteínas.

Entre estas técnicas vamos a dedicar unas páginas a discutir algunas espectroscopias muy útiles prestando atención fundamentalmente a cómo interacciona la luz diferencialmente, con cada uno de los estados conformacionales y cómo podemos aprovechar esto para hacer un diagnóstico correcto del estado conformacional de la proteína que estamos estudiando. Absorción UV, absorción de luz circularmente polarizada y fluorescencia, dispersión de luz.

Finalmente, nos introduciremos en una de las dos técnicas complejas que permiten obtener modelos experimentales de proteínas y de alta resolución, cristalografía y difracción de rayos X.

Geles de poliacrilamida

Es una de las técnicas analítica más, comúnmente, usadas en los laboratorios que trabajan con proteínas para la separación y caracterización de mezclas complejas de proteínas y pép-

tidos y para la estimación del peso molecular de este tipo de macromoléculas.

La estimación del peso molecular por geles de poliacrilamida en presencia del detergente SDS (ver más adelante) es, por lo general, muy buena. En la determinación se usan proteínas estándares de peso molecular conocido y comportamiento óptimo (marcadores de peso molecular).

Esencialmente, las partículas cargadas migran en el campo eléctrico hacia el polo de signo opuesto, si tienen carga positiva migrarán hacia el electrodo de polaridad negativa. Las proteínas, como cualquier otra molécula, también migrarán en el campo en función de su carga pero habrá que tener cuidado porque la carga dependerá de la secuencia de la proteína, es decir, de la composición en aminoácidos cargados (esto tiene relevancia, fundamentalmente, si la electroforesis se realiza en ausencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), ver más adelante) y, entre otras cosas, de la conformación, del pH (la variación de la carga de la proteína o del péptido con el pH se puede predecir), de la composición de iones del medio electroforético y de la temperatura.

El método más común, para el armado del gel, incluye una reacción de polimerización entre la acrilamida y la N, N'-metilenbisacrilamida. Esta reacción es catalizada por persulfato de amonio (APS) y por N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) en la que el APS es el iniciador de una reacción catalizada por radicales libres. Podemos pensar que un gel está formado por una trama intrincada con poros pequeños por los que las proteínas deben difundir. Se trata, específicamente, de una matriz de poliacrilamida entrecruzada. La concentración de acrilamida puede variar y, de esto, dependerá el tamaño de los poros y, por consiguiente, el entramado del gel y su poder resolutivo del gel para separar componentes de diversos tamaños.

Independientemente, del efecto de la carga, la movilidad en el gel de poliacrilamida se verá afectada por el tamaño molecular y por la forma de la macromolécula.

Además se suele usar un sistema que permite concentrar las proteínas en un volumen pequeño de tal manera que ingresen todas juntas (en principio) al gel separador. Para esto se prepara un gel que contiene dos fases: una fase concentradora (superior, en color gris en la figura) y una fase separadora (fase inferior). La composición y el pH de ambos geles son diferentes.

Este tipo de experimentos se pueden hacer en ciertas condiciones en las que la carga estará dada por un agente externo (cargado) que tendrá afinidad por las proteínas y se unirá de una manera más o menos homogénea.

El agente más, comúnmente, usado es el SDS, un detergente fuerte que es usado muy frecuentemente para desnaturalizar o desplegar proteínas. SDS desensambla la estructura y disocia los complejos de varias subunidades en encadenas polipeptídicas únicas. El SDS le otorga a todas las proteínas (a casi todas) las mismas propiedades conformacionales e

Puede ser importante tener en mente que el peso molecular de un aminoácido promedio formando parte de una cadena polipeptídica es de unos 113 Da (o 113 g/mol). Así una proteína de 110 aminoácidos tendrá un peso molecular cercano a los 12430 Da o 12.43kDa (12.43 kiloDalton).

El término electroforesis se refiere al movimiento de partículas cargadas (en nuestro caso proteínas) bajo la influencia de un campo eléctrico.

Es muy importante tener en cuenta que la acrilamida es neurotóxica cuando no está polimerizada. Por este motivo SIEMPRE se deben usar guantes y guardapolvo al preparar los geles.

impide que las proteínas interaccionen entre sí durante la electroforesis uniéndose a cuanto superficie apolar se presente. El proceso de unión del SDS a las proteínas aun no se conoce a fondo y la naturaleza de la conformación de los complejos SDS: proteína tampoco. Sin embargo los complejos resultantes parecerían tener algunas características comunes: son elongados y poseen flexibilidad conformacional, el largo sería proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica.

Además, este detergente enmascara la carga propia de la proteína y le otorga a todas las proteínas carga neta negativa. En general el SDS recubre uniformemente a las proteínas. En general una molécula de SDS se une cada dos aminoácidos en promedio (o 1.4g SDS/1g de proteína). Por esto la carga neta estará, directamente, relacionada con el tamaño.

Por lo general, las muestras en un gel con SDS se siembran en presencia de un colorante que migre hacia el polo positivo que no debe interferir en la migración de las proteínas (típicamente se usa azul de bromofenol) para seguir el desarrollo de la corrida (color azul en la **Figura 4-1**). La flecha roja indica el tiempo transcurrido. Este dependerá de la corriente y del voltaje aplicado. Una vez transcurrido el tiempo necesario, se desmontará con cuidado el gel (son muy frágiles) y se procesará para poder visualizar las bandas de proteínas. Con soluciones convencionales de tefido (azul de coomassie por ejemplo) podremos ver sin problemas bandas que contengan como mínimo 0.2 μ g. Se verán muy bien bandas que contengan 1 μ g de proteína. En nuestra figura hemos sembrado un gel hipotético. En dos de sus calles (calles 1 y 6) sembramos marcadores en el resto varias con proteínas puras. También se muestran dos calles de un gel real en el que se sembró la proteína β -lactamasa (ES β L, 29,5 kDa) luego de su purificación y marcadores de peso molecular conocido (M, con pesos moleculares de 29, 45 y 66 kDa).

Hay que tener presente que si bien, cuanto más grande más cargada estará la proteína, cuanto más grande más le costará a la proteína ingresar por los poros del gel y, en definitiva, más le costará migrar hacia el polo positivo a través de los geles de poliacrilamida.

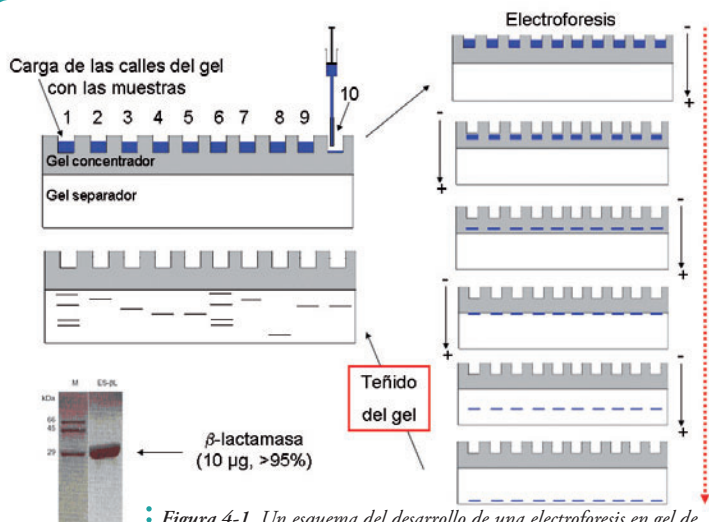
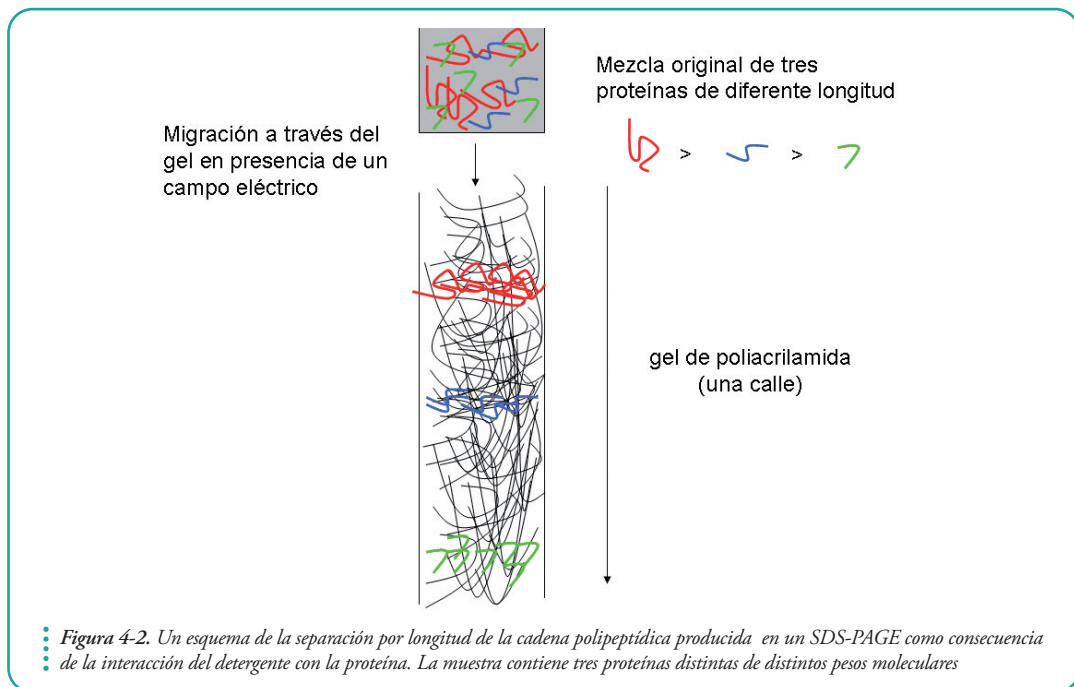


Figura 4-1. Un esquema del desarrollo de una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

En la fotografía se muestra el resultado de un SDS-PAGE; se trata de una proteína (ES β L) altamente purificada de peso molecular 29.500 Da. En la calle de la izquierda del gel se sembraron marcadores de peso molecular como referencia.(ver Figura 4-1)

Como consecuencia, los complejos SDS: proteína tienen una movilidad inversamente proporcional al logaritmo del largo de la cadena polipeptídica (**Figura 4-2**). Por esto mediante la comparación de la movilidad de una proteína desconocida con las movilidades de un conjunto de proteínas de pesos moleculares conocidos podemos inferir el peso molecular de nuestra proteína incógnita dentro del 10 % del valor real.



A pesar de esto, ciertas proteínas se comportan anómalamente. Esto suele estar relacionado, por lo menos en algunos casos, con una distribución de cargas en la superficie particular, estas proteínas suelen ser intrínsecamente muy ácidas o muy básicas, es decir que tienen alta densidad de carga negativa o positiva, respectivamente), y, en otros, con resistencia a la desnaturalización por SDS. En este último caso, se puede agregar a la muestra agente desnaturalizante (urea) para desplegar la proteína de interés. También se debe preparar el gel en presencia de urea. De todas maneras este tipo de geles (SDS-PAGE) nos dará información muy útil relacionada con la longitud de la cadena, pero no en relación a la conformación y a la carga.

Para garantizar la unión del SDS a la proteína, las muestras suelen calentarse a 100 °C en presencia de un exceso de este detergente.

Cromatografía de exclusión molecular

Las técnicas cromatográficas son un conjunto enorme de técnicas fundamentadas en el principio de retención selectiva. Su objetivo es separar los distintos componentes

de una mezcla (en nuestro caso proteínas) permitiendo, con posterioridad y mediante otras experimentos, identificar y determinar las concentraciones de dichos componentes en las fracciones separadas. Las técnicas cromatográficas son muy variadas pero, en todas ellas, hay una fase móvil (fluido, en nuestro caso un líquido) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria (un sólido o un líquido fijado en un sólido). Las macromoléculas interaccionarán de manera diferente con la fase estacionaria y, así, podrán ser separadas. En particular, la cromatografía de exclusión molecular es un método relativamente sencillo que originalmente se desarrolló para separar proteínas en procesos de purificación.

Sin embargo, este tipo de experimento también permite estudiar, finamente, las propiedades hidrodinámicas de las proteínas: calcular el radio de las mismas asumiendo que son más o menos esféricas. A partir de este dato experimental se puede calcular el peso molecular de la macromolécula. Este tipo de experimento requiere de la elaboración de una curva de calibración que se realizará midiendo el comportamiento de proteínas globulares de peso molecular conocido.

El equipo consta básicamente de:

a. una columna que está cargada con una matriz porosa formada por granos o bolitas de un polímero (tradicionalmente superosa, agarosa o sephadex, entre otros);

b. un sistema de bombas que impulsan la fase móvil (el *buffer*) a través de la columna, si el empaquetamiento no es muy denso puede usarse, simplemente, a la gravedad como fuerza propulsora de la fase móvil;

c. un sistema de inyección de muestra (hay diversos tipos de inyector, suelen contar con un loop de inyección (que es un tramo de tubería que se carga con la muestra y a través de una válvula queda conectado con la columna y desconectado de la jeringa de inyección);

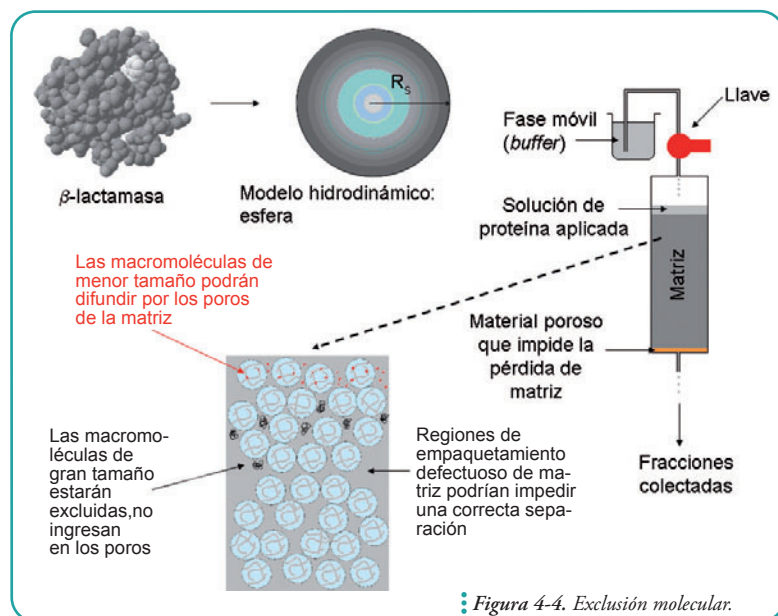
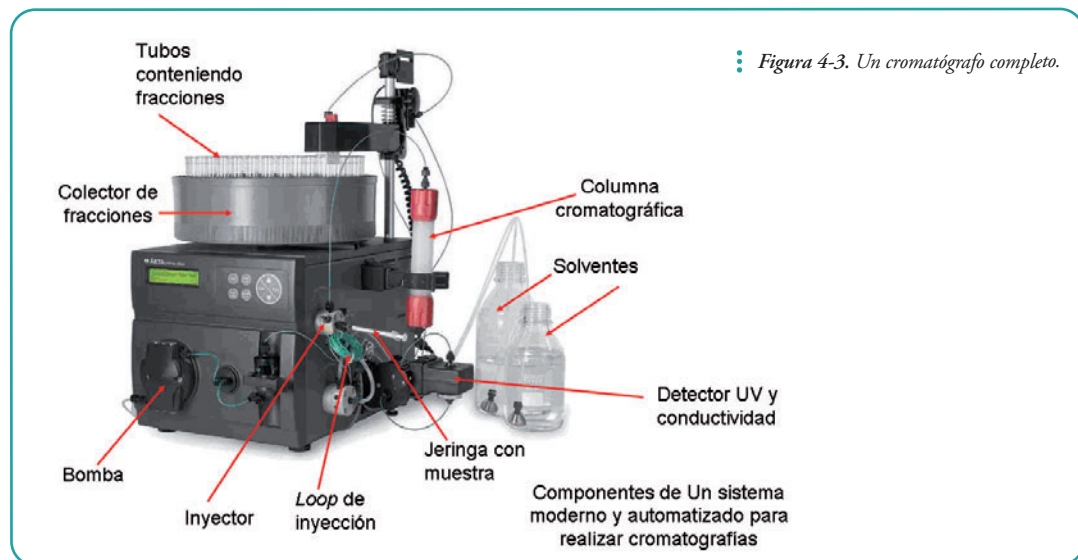
d. un sistema de detección: en nuestro experimento podremos evaluar la elución de las macromoléculas con detectores especiales (debido a que las macromoléculas tienen propiedades espectroscópicas particulares). Por ejemplo podremos medir absorción de luz (por absorbancia típicamente a 280 nm, absorben los residuos aromáticos y a 215 nm absorbe el enlace peptídico, ver más adelante), alternativamente podremos tomar fracciones (muestras) del material eluido y sembrar geles de poliacrilamida y verificar la presencia o ausencia de macromoléculas en cada una de las fracciones (**Figura 4-3**).

El grado de entrecruzamiento y el tipo de polímero permitirá una mejor resolución de la separación de los componentes de la mezcla en los distintos rangos de tamaño molecular.

Parte del espacio dentro de las bolitas de matriz es accesible a ciertas macromoléculas, sólo a las pequeñas, mientras que las de mayor tamaño no podrán ingresar. Así las macromoléculas de mayor tamaño, en promedio, recorrerán caminos más cortos dentro de la columna cromatográfica, en cambio, tanto las más pequeñas como los iones que forman parte de la solución y del regulador de pH (*buffer*) podrán ingresar, recorriendo en promedio caminos más largos por lo que tardarán más en eluir (salir por la parte inferior de la columna, junto con la fase móvil).

El tamaño de una proteína globular es el volumen promedio que ésta molécula ocupa en la solución (Figura 4-4). Podemos pensar, entonces, que existe una esfera que posee un radio determinado cuyas propiedades hidrodinámicas (coeficiente de difusión) serán similares a las de la proteína.

El radio de la esfera es frecuentemente expresado como el Radio de Stokes (R_s). Este parámetro es especialmente sensible a la forma y a las propiedades físicas de la proteína. Si la proteína no es globular el comportamiento será muy diferente al de una esfera.



Arriba, el comportamiento hidrodinámico de las proteínas globulares puede ser modelado por esferas de radio R_s ; la derecha, un esquema típico de una cromatografía en la que se emplea la gravedad para impulsar el solvente (o fase móvil); abajo, un esquema del fundamento de la separación por tamaño molecular. (ver Figura 4-4)

El R_s de dicha proteína puede ser estimado a partir de los datos de la exclusión molecular sólo si la columna cromatográfica utilizada es apropiadamente calibrada con proteínas que tienen aproximadamente la misma forma (también deben ser globulares), las mismas propiedades físicas. Para poder realizar este experimento debemos conocer los RS y los pesos moleculares de las proteínas utilizadas en la calibración.

Se puede ver que el R_s determinado por técnicas de exclusión molecular se correlaciona extremadamente bien con los valores obtenidos por otros métodos utilizados frecuentemente, como el cálculo a partir de la viscosidad intrínseca de la solución (Uversky, V., *Biochemistry*, 32 (1993), 13.288-13.298).

Para moléculas y proteínas globulares se puede calcular el radio hidrodinámico (R_s , el radio asumiendo que la macromolécula es esférica) como

$$\log R_s = 0,369 \times \log (PM) - 0,254$$

Donde PM es peso molecular (en Da) de la proteína.

Proteína	Peso molecular (Da)	Volumen de elución (mL)
Tiroglobulina	670.000	8,21
y globulina bovina	150.000	10,64
Ovoalbúmina de gallina	44.000	12,77
Mioglobina equina	17.000	14,06
Vitamina B12*	1.350	19,17

La vitamina B12 se utiliza como marcador por su pequeño tamaño. Este conjunto de marcadores puede ser preparado en el laboratorio.

Así podemos calcular con un mínimo de error los radios de las macromoléculas que usaremos como proteínas y moléculas estándares de tamaño molecular.

En nuestra primer cromatografía podremos inyectar los estándares (inyectamos el conjunto sólo si sabemos que estas proteínas no interaccionan entre sí).

El resultado será un cromatograma como el que se muestra en la **Figura 4-5**. En este cromatograma, cada pico se corresponde con un tipo de proteína o molécula, porque justamente se han elegido proteínas y moléculas que cubran un rango amplio de volúmenes de elución y que no se superpongan.

A partir de nuestro cromatograma podremos medir los volúmenes de elución de cada proteína estándar (ver **Figura 4-5**) para hacer una curva de calibración.

Una vez obtenidos los volúmenes de elución podremos, ya que conocemos los pesos moleculares de estas proteínas, calcular con la ecuación de arriba el radio hidrodinámico para cada una de ellas. Posteriormente si representamos el $\log (R_s)$ en función del volumen de elución veremos que hay una dependencia lineal (ver **Figura 4-6**). Esta será nuestra curva de calibración.

Debe quedar claro que si se inyecta una mezcla de proteínas los picos podrían superponerse si es que el comportamiento hidrodinámico fuera similar.

El próximo experimento consistirá en inyectar la proteína de interés, por ejemplo, una proteína cuyo radio hidrodinámico es desconocido. Con este nuevo experimento podremos determinar volumen de elución experimental a partir del cromatograma y posteriormente podremos calcular el radio hidrodinámico usando la regresión lineal obtenida en la curva de calibración (Figura 4-6) experimental.

$$\log(R_s) = 2,6236 - 0,09096 \times V_e$$

Donde V_e es el volumen de elución en mL. Así el radio hidrodinámico experimental para esta proteína calculado a través de cromatografía de exclusión molecular es $R_s = 24,9 \text{ \AA}$.

Es importante ver que, en este tipo de experimentos, debe controlarse muy bien el flujo de la cromatografía. El flujo es el volumen que pasa a través de la columna por unidad de tiempo (mL/min). El flujo permitido dependerá del tipo de polímero y del grado de compactación. Ambos experimentos (curva de calibración y cromatografía de muestra incógnita) deben realizarse en condiciones controladas.

Si conociéramos el valor del peso molecular de la proteína incógnita (por ejemplo 29500 Da) podríamos calcular el **radio hidrodinámico teórico** asumiendo que su forma es globular (que la proteína incógnita es, relativamente, esférica) usando la ecuación de arriba:

$$\log R_s = 0,369 \times \log(29.500) - 0,254$$

$$\log R_s = 0,369 \times 4,469 - 0,254$$

$$\log R_s = 1,395$$

$$R_s = 24,9 \text{ \AA}$$

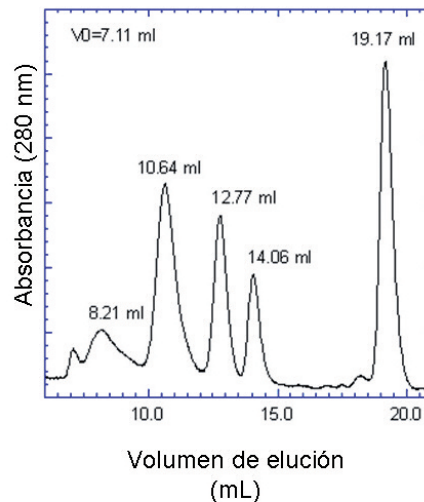


Figura 4-5. Perfil cromatográfico o cromatograma correspondiente a la elución de los marcadores de tamaño molecular; los marcadores fueron sembrados simultáneamente en una mezcla.

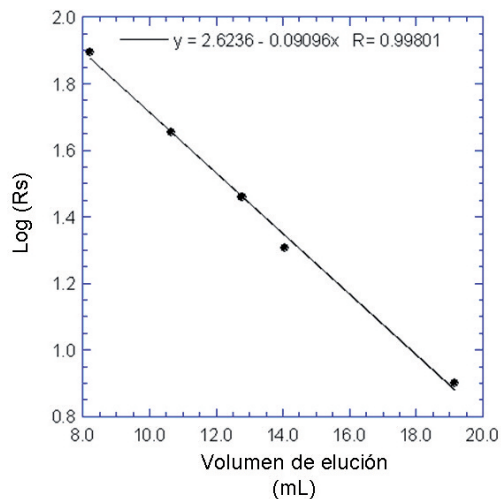


Figura 4-6. Curva de calibración.

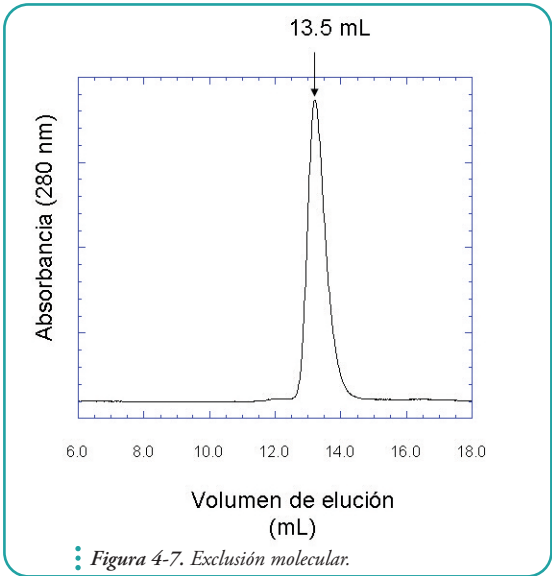
Correlación entre el logaritmo del radio hidrodinámico ($\log R_s$) y el volumen de elución de las proteínas globulares. (ver Figura 4-6.)

Una pregunta pertinente es

¿Por qué hacemos el experimento con la proteína incógnita si podemos calcular, directamente, el radio a través de la correlación entre peso molecular y $\log(R_g)$?

La respuesta es simple. *A priori*, no sabemos si la proteína es globular y tampoco conocemos la estructura cuaternaria de esta proteína. Dicho de otra forma, el resultado de nuestro experimento es, extremadamente, informativo: la proteína incógnita es globular (una esfera es un buen modelo de la proteína) y por otro lado en solución es monomérica.

De la comparación de ambos valores: el experimental y el teórico (en este caso ambos coinciden perfectamente) podríamos calcular el estado de agregación de la proteína: si se trata de un monómero o forma dímeros o tetrameros por ejemplo.



Cromatograma correspondiente a la β -lactamasa (una proteína globular de 29.500 Da). (ver Figura 4-7.)

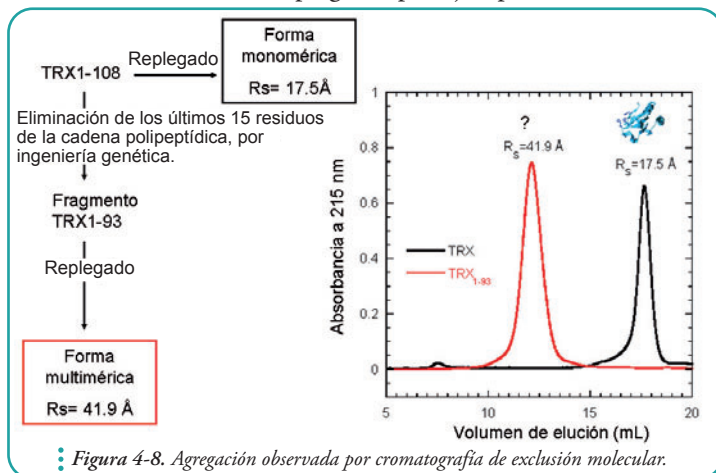
¿Podríamos calcular el R_g en forma teórica de los distintos arreglos cuaternarios posibles?

Subunidades	Arreglo	Peso molecular (Da)	Radio hidrodinámico (Å)
1	Monómero	29,500	24,9
2	Dímero	59,000	¿?
3	Trímero	88,500	¿?
4	Tetramero	118,000	¿?

La utilidad de este procedimiento es corriente en el laboratorio. Por ejemplo, cuando a una variante de tiorredoxina (que tiene una longitud de 108 residuos) que tiene dos mutaciones (un residuo de ácido glutámico y una glutamina se reemplazaron por histidina) se le eliminó la hélice C- terminal (un elemento de estructura secundaria completo) por técnicas de DNA recombinante se obtuvo un fragmento de menor longitud menor (93 aminoácidos, fragmento TRX 1-93) que después de purificado en condiciones desnaturalizantes se replegó a una forma que, curiosamente, ya no es monomérica, sino, aparentemente, octamérica (Figura 4-8). La agregación es un mecanismo muy común que permite ocultar superficie hidrofóbica que de otra manera se exponería al solvente.

Las cromatografías de exclusión molecular se pueden realizar en condiciones `nativas`, es decir, en solventes en los que va a estar estabilizado mayormente el estado nativo. Pero, también, se pueden llevar a delante en condiciones en las que se estabilicen proporciones de

ambos estados (nativo y desplegado) concentraciones intermedias de agentes caotrópicos, urea y GuHCl y, por último, concentraciones elevadas de agentes caotrópicos que estabilizan, únicamente, al estado desplegado, por ejemplo de GuHCl 5-6 M.



El caso de variantes de tiorredoxina. En trazo negro se muestra el cromatograma correspondiente a la proteína salvaje y en trazo rojo el correspondiente a una variante mutante de menor peso molecular pero que tiene alta tendencia a la agregación y forma especies multiméricas. (ver Figura 4-8)

Cabe mencionar que así como existe una correlación entre el logaritmo del peso molecular y el logaritmo del radio hidrodinámico para proteínas en estado nativo también podemos establecer correlaciones para los estados desplegados:

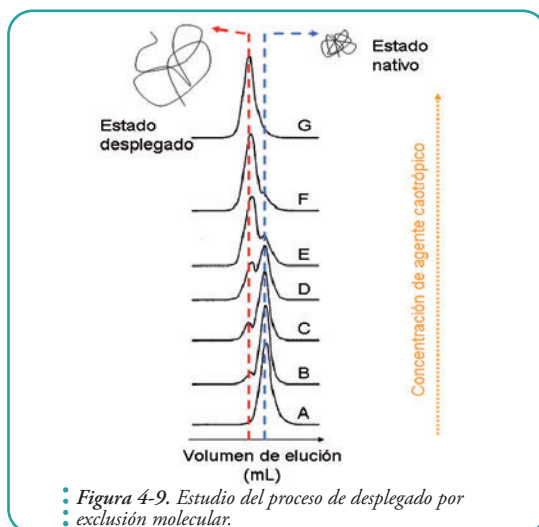
Para proteínas desplegadas en GuHCl vale:

$$\log(R_h) = -0,543 + 0,502 \times \log PM$$

Y para proteínas desplegadas en urea vale

$$\log(R_h) = -0,657 + 0,524 \times \log PM$$

Donde aquí también PM es el peso molecular (en Da) de la proteína. Estas ecuaciones también fueron obtenidas por V. Uversky, 1993.



En el cromatograma (A) el 100 % de las moléculas se encuentran, correctamente, plegadas en el estado nativo. En el cromatograma (G), que se ha realizado a una elevada concentración de GuHCl, (6,2 M) se encuentra estabilizado, únicamente, el estado desplegado que, por ser mucho menos compacto, eluye en un volumen menor. En concentraciones intermedias (4,1 M) ambas conformaciones coexisten formando dos picos (cromatograma D). La Figura está basada en un experimento realizado con la lisozima de clara de huevo, una proteína sumamente estable y utilizando una columna Supersora 12 (Uversky V. N. Biochemistry 1993,32, 13.288-1 3.298). Para poder hacer estos experimentos es importante demostrar, previamente, que las propiedades físicas de la columna no se alteran en estas condiciones. (ver Figura 4-9)

La existencia de intermediarios o estados, parcialmente, plegados estabilizados en concentraciones intermedias de agentes caotrópicos, también, puede ser evaluada por exclusión molecular. El seguimiento de cambios en el radio hidrodinámico (o el volumen de elución) será nuestra prueba experimental. Así se ha probado la existencia de estados compactos (en los que no cambia el radio hidrodinámico pero, sí cambian otras propiedades del estado nativo, por ejemplo el contenido de estructura terciaria).

Esto es lo que ocurre en el ejemplo que se muestra en la **Figura 4-10**. Se trata de la desnaturalización de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos (IFABP). Esta proteína pierde, aproximadamente, el 100% de su estructura terciaria cuando es incubada en GuHCl 2,0 M, sin embargo, en ese rango de concentraciones de desnaturalizante sufre una expansión incompleta: Desde el estado nativo (20 Å de radio) hasta un intermediario (28 Å). Si se incubaba la proteína con mayores concentraciones de desnaturalizante se observará un aumento progresivo del radio hasta alcanzar los 36 Å en el estado desplegado. El estado desplegado teórico se puede modelar con una esfera de radio $R_S = 35,5 \text{ Å}$.

La desnaturalización se produce en dos etapas: $N \leftrightarrow I$ con una pendiente elevada que se relaciona con un proceso cooperativo de exposición de superficie apolar al solvente y una segunda etapa $I \leftrightarrow U$, un proceso de desplegamiento mucho menos cooperativo.

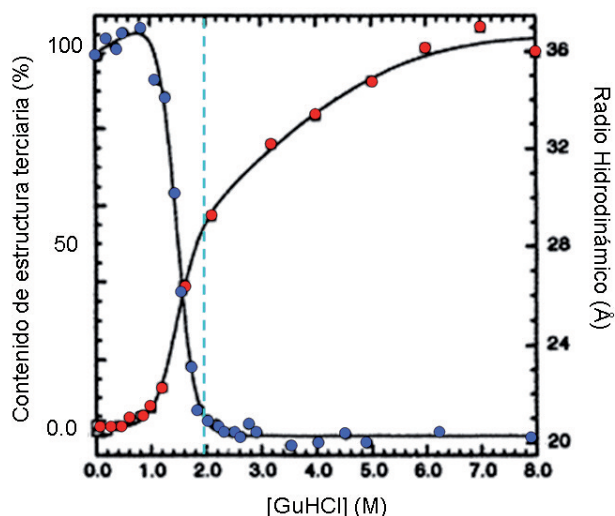


Figura 4-10. Desplegado de la proteína IFABP.

En rojo se muestra la variación en el radio hidrodinámico en función de la concentración de agente desnaturalizante. En azul la variación en el contenido de estructura terciaria. (ver Figura 4-10)

En resumen, hoy en día podemos utilizar este tipo de sistemas para llevar adelante diversos experimentos entre ellos:

- Fraccionamiento por tamaño.
- Separación de monómeros de mezclas con dímeros y agregados de alto peso molecular.
- Estimación del peso molecular
- Estimación del radio hidrodinámico

- Determinación de constantes de equilibrio (monómero \leftrightarrow dímero)
- Desalado, cambios de buffer
- Replegado en columna

Existen diversos tipos de matrices, cada una de ellas con propiedades que las hacen, sumamente, útiles en las distintas aplicaciones.

Otro medio muy, comúnmente, usado en el laboratorio es el Sephadex. Está formado por

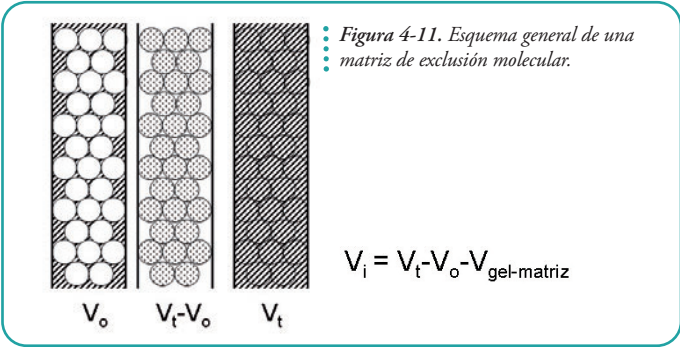
Dextrano (otro polímero) entrecruzado con epíclorhidrina. Es estable en el rango de pH 3-12. También como en el caso de la Superosa se han observado ciertas interacciones hidrofóbicas y el rango de estabilidad térmica es +4-40 °C.

Algunos de los Sephadex son:

Rango de Separación PM (Da)	
Sephadex G 25 Superfino	1.000 - 5.000
Sephadex G 50 Superfino	1.500 - 30.000
Sephadex G 100 Superfino	4.000 - 100.000

Así, por ejemplo, la Superosa consta de partículas de agarosa porosa entrecruzada de 13±2 μM. Es estable en el rango de pH 3-12. La Superosa 12 tiene un rango de separación de 1000-300000 Da, mientras que la Superosa 6 tiene un rango de separación que va desde 5000 a 5000000 Da, permitiendo esta última estudiar agregados de alto peso molecular. Es importante tener en cuenta que no soportan temperaturas mayores a 40°C ni menores a 4°C. Algunos investigadores han observado que este tipo de matriz interacciona con regiones hidrofóbicas de algunas proteínas retrasando su elución en la cromatografía.

Por ejemplo, si usamos una columna en la que se ha empaquetado Sephadex G25 y sembramos una proteína de 10.000, una de 30.000 y un compuesto de 250 Da el compuesto de 250 Da eluirá en un volumen mayor porque podrá ingresar en los poros de la matriz mientras que, ambas proteínas, serán excluidas (no ingresarán en los poros) y eluirán en el V_o (ver Figura 4-11) juntas (no se separarán)



Mencionaremos también al Superdex. Es un polímero de azarosa y dextrano. Es una matriz hidrofílica y es estable en el rango de pH 3-12 y de temperatura entre +4-40 °C.

La Superdex S-200 HR tiene un rango de separación que va desde 10000 a 600000 Da. Posee algunas cargas nega-

tivas, por esto, para apantallarlas debe utilizarse alta concentración de sales en la cromatografía. Si se utiliza baja concentración de sales se podrá observar el retraso de proteínas básicas (eluirán en volúmenes de elución mayores a los esperados) y la exclusión de proteínas ácidas (eluirán en volúmenes de elución menores a los esperados para sus pesos moleculares).

Interacción de las proteínas con la luz:

Espectroscopía UV aplicada al análisis conformacional de proteínas

La interacción de la luz con la materia causa transiciones entre distintos estados de energía de las moléculas.

La espectroscopia de absorción UV (ultravioleta) involucra la absorción de luz UV por parte de una molécula promoviendo el paso de un electrón (por esto decimos que son tran-

siciones electrónicas) desde un orbital molecular fundamental (los orbitales moleculares son el producto de la combinación de los orbitales atómicos) a un orbital excitado. La radiación aporta la energía suficiente para que se den las transiciones electrónicas entre orbitales. La separación energética entre estos orbitales moleculares corresponde a las frecuencias y longitudes de onda del UV.

Podemos recordar que la longitud de onda (λ) es inversamente proporcional a la frecuencia (f)

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

Donde la constante c vale 299.792.458 m/s (la velocidad de la luz) para las ondas electromagnéticas que viajan en el vacío.

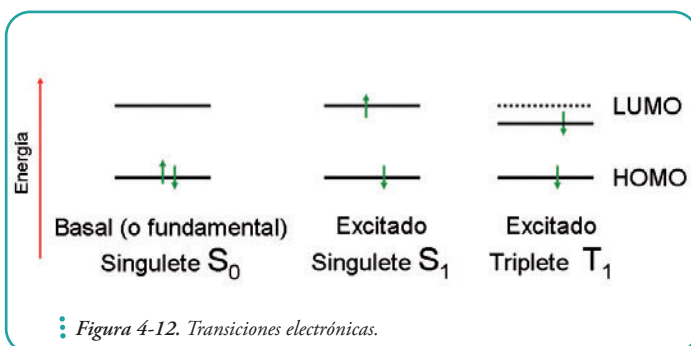
Cuando las ondas electromagnéticas penetran en un medio, como puede ser una solución acuosa (en la mayor parte de nuestros casos), la longitud de onda se reduce de forma proporcional al índice de refracción (η) de dicho medio, la frecuencia disminuye así la constante de la velocidad de la luz queda invariante.

$$\lambda_1 = \frac{\lambda_0}{\eta}$$

Donde λ_0 es la longitud de onda en el vacío y λ_1 es la longitud de onda en el nuevo medio (en la solución acuosa, por ejemplo). La longitud de onda de las radiaciones electromagnéticas, se expresa, por lo general, en función de la longitud de onda de estas radiaciones en el vacío y, en nuestro caso, las unidades de medida más comúnmente usadas serán los nanómetros ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$).

También es importante recordar que la frecuencia (y la longitud de onda) estará asociada con la energía de la onda electromagnética.

Los orbitales moleculares serán ocupados cada uno por dos electrones. El último orbital ocupado recibe el nombre genérico de orbital HOMO y el primer orbital desocupado, que es una región del espacio que tiene menor probabilidad que HOMO de ser ocupada por electrones, recibe el nombre genérico de orbital LUMO; LUMO es el orbital molecular desocupado de menor energía. En la **Figura 4-12** los electrones están representados por pequeñas flechas de color verde.



La absorción de energía promueve la ocupación del orbital LUMO con un electrón. Debemos notar que el sentido de las flechas verdes (arriba y abajo) no es arbitrario sino que por ciertas cuestiones de la física cuántica dos electrones no pueden ser idénticos (no pueden poseer los mismos números cuánticos). El sentido de las flechas está asociado al spin del electrón en cuestión. (ver Figura 4-12).

El proceso de absorción de energía (dada la interacción con una onda electromagnética de determinada frecuencia) por parte de un electrón y su promoción a un orbital LUMO (estado excitado) es un proceso muy rápido y está en el orden de 10^{-15} segundos (0.000000000000001 segundos).

Lo realmente interesante es que podemos medir este proceso (la absorción de energía por parte de electrones) mediante técnicas y equipamientos relativamente sencillos y comunes. Además, nos interesará, particularmente, porque la absorción estará relacionada con la cantidad de materia que absorba energía. Dicho de otro modo será entre otras cosas una excelente herramienta para determinar la concentración de proteínas en una solución.

Para esto debemos usar una cubeta transparente a la radiación, así podremos medir la intensidad del haz de luz una vez que ha atravesado la cubeta que contiene sólo *buffer* y, posteriormente, podremos medir la intensidad del haz de luz que ha atravesado la cubeta pero, ahora, presencia de la proteína: disolvemos la proteína en la misma solución *buffer*.

Se puede ver que

$$\frac{I_f}{I_0} = 10^{-\epsilon \cdot l \cdot C}$$

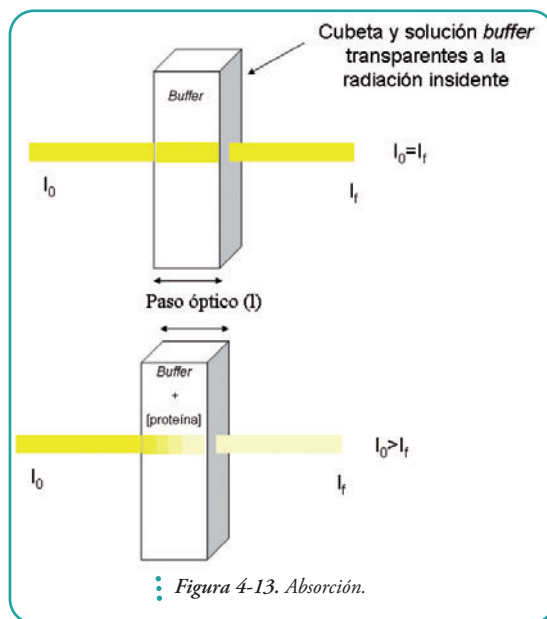
Donde I_f es la intensidad a la salida de la cubeta e I_0 es la intensidad en ausencia de absorción. El paso óptico de la cubeta es l (el tramo, por ejemplo en centímetros que atravesará la luz) y C es la concentración de la sustancia que absorbe. ϵ se conoce con el nombre de coeficiente de extinción y variará dependiendo de la longitud de onda y del tipo de sustancia y de su composición. En el caso de las proteínas variará dependiendo, por lo general, de la secuencia de aminoácidos de cada proteína, y de la longitud de onda a la que se realice el experimento.

En el laboratorio suele emplearse la medida de absorbancia porque la absorbancia es proporcional al paso óptico y a la concentración de la sustancia disuelta.

$$A = -\log \frac{I_f}{I_0}$$

Y por lo tanto, teniendo en cuenta la ecuación de más arriba,

Así, conociendo el coeficiente de extinción, podremos calcular la concentración si es que podemos



Arriba, una muestra que no absorbe luz, en efecto, la intensidad I_0 antes de atravesar la muestra es idéntica a la intensidad luego de atravesarla; en cambio, abajo la intensidad luego de atravesar la muestra es menor debido al proceso de absorción de luz (I_f). (ver Figura 4-13)

medir, experimentalmente, la absorbancia (Ley de Lambert-Beer). Casi todos los laboratorios en los que se trabaja con proteínas cuentan con un espectrofotómetro, este es el equipo que permite hacer estas mediciones.

Para poder determinar la concentración tendremos que contar con un coeficiente de extinción correctamente determinado.

Muchas proteínas contienen además de los residuos de amino ácidos otros grupos que pueden encontrarse unidos a ellas tanto de forma covalente como no covalentemente. Y en muchos casos, puede que estos grupos sean cromóforos y contribuyan al espectro de absorción de la proteína en la región del espectro que se conoce como UV-cercano (240-340 nm) o en el visible (400-750 nm).

La determinación correcta de la concentración proteica será indispensable para poder validar todos los estudios conformacionales que se le realicen a cada proteína porque las señales que determinaremos asociadas al contenido de estructura secundaria y terciaria, por lo general, también dependerán de la concentración proteica.

Algunos ejemplos de proteínas con grupos de este tipo son la hemoglobina que tiene un grupo hemo por subunidad, las proteínas con centros de hierro-azufre, y las flavoproteínas (que cuentan con grupos flavinas).

Una cuestión importante, que seguramente han notado, es que el equipo que permite hacer estas mediciones (el espectrofotómetro) debe ser capaz de recorrer un rango amplio de longitudes de onda (debe hacer un *barrido*), de tal forma que la muestra sea iluminada con cada una de las longitudes de onda. Para cada longitud de onda, se medirá la absorbancia.

En el caso de que la proteína no cuente con este tipo de grupo y tampoco tenga centros metálicos especiales (como los de unión a Zn, Ni, Mg o Cu, por ejemplo) podremos afirmar que la contribución a la absorción de luz estará dada por la cadena polipeptídica en si misma. Como veremos más adelante la estructura que esta adquiera en solución tendrá importantes efectos.

Un punto importante es identificar a los grupos que absorben luz en el rango de longitudes de onda que estudiamos:

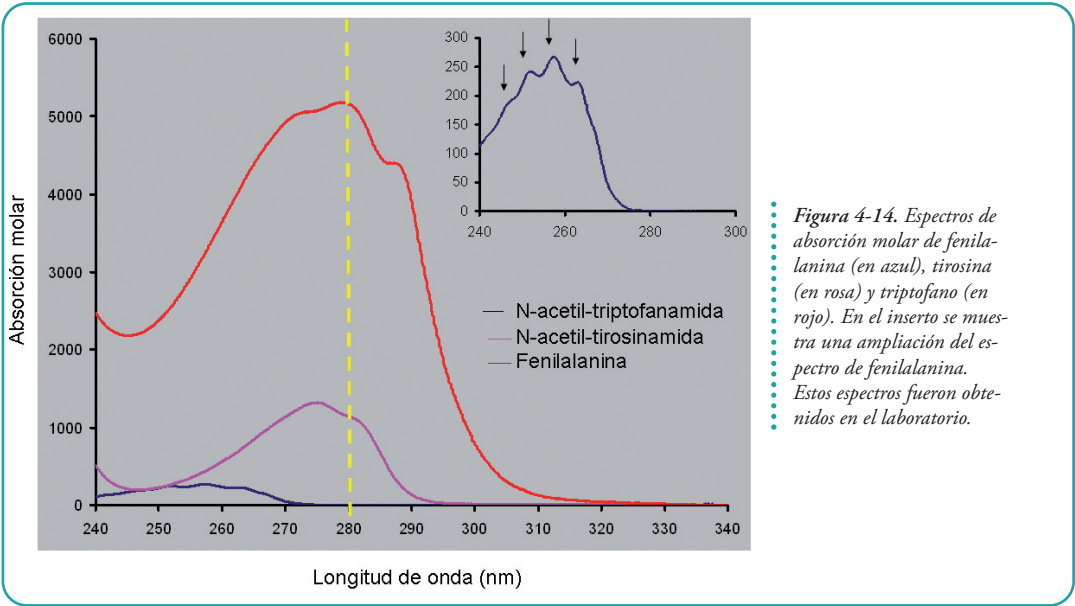
El ultravioleta lejano: El enlace peptídico.

En la región del ultravioleta lejano (entre 170 y 220 nm) absorbe el enlace peptídico. Existen dos tipos de transiciones electrónicas: electrones que se encuentran en orbitales llamados n se excitan y se promueven a orbitales que se conocen con el nombre de orbitales π^* (estas transiciones se observan a 220 nm). Por otro lado, electrones que se encuentran en orbitales π (son una combinación de orbitales atómicos p perpendiculares al enlace) también pueden promoverse a orbitales π^* , estas últimas son transiciones que se observan a 190 nm y producen bandas de absorción en esta región que serán predominantes.

Estas transiciones se basan en la teoría de los orbitales moleculares; los orbitales σ , π y n corresponden al estado basal o fundamental y los orbitales σ^* , π^* y n^* por el contrario son, como ya se dijo, de mayor energía y reciben el nombre de antienlazantes. Las transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ requieren mucha energía, y no serán observadas por métodos ópticos.

El ultravioleta cercano: Los residuos aromáticos.

En la región del ultravioleta cercano (entre 240 y 340 nm), en cambio, aportan al espectro de absorción UV los residuos aromáticos de triptofano, tirosina y fenilalanina. Por esto el espectro UV en esta región dependerá, básicamente, de la composición de aminoácidos. También tienen un pequeño aporte los puentes disulfuro (S-S).



En la **Figura 4-14** se muestra el aspecto de los espectros de *N-acetil-triptofanamida* (NATA), *N-acetil-tirosinamida* (NAYA) y fenilalanina (Phe). Estos compuestos, NATA y NAYA se utilizan como compuestos modelo de residuos de triptofano y tirosina inmersos en un entorno similar al enlace peptídico aportado por la cadena polipeptídica. Son los espectros de soluciones 1.0 M de cada compuesto aislado. Estos espectros se calculan en base a soluciones diluidas ($0.5 < \text{absorbancia} < 1$, máximo de longitud de onda), teniendo en cuenta los valores de los coeficientes de extinción molar (**Tabla 4-1**)

Coeficientes de extinción molar ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)	
<i>N-acetil-triptofanamida</i> (NATA)	5.390,00 (280 nm)
<i>N-acetil-tirosinamida</i> (NAYA)	1.390,00 (275 nm)
<i>Fenilalanina</i> (Phe)	284,57 (257,4 nm)
<i>Puente disulfuro</i> (S-S)	120,00 (280 nm)

Tabla 4-1. Coeficientes de extinción molar de grupos funcionales que absorben significativamente en la región del UV cercano (240-340 nm)

Así, la absorbancia a cada longitud de onda de estas soluciones será la absorción molar

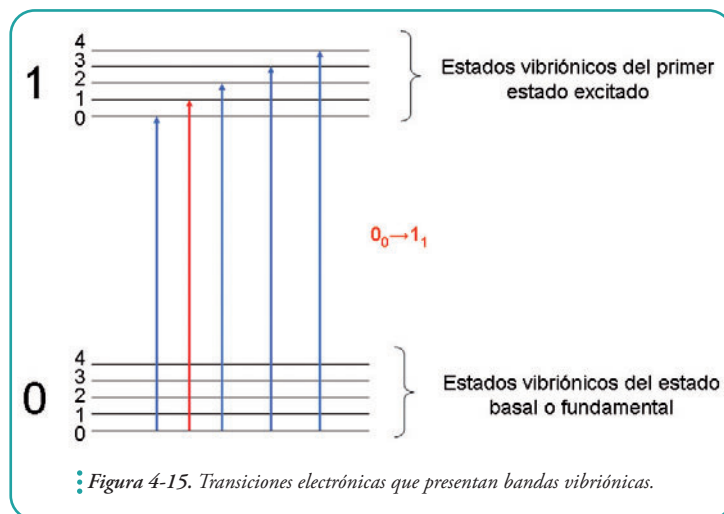
ya que se utiliza una cubeta de paso óptico 1 cm y las unidades de los coeficientes de absorción molar usados son en este caso $M^{-1}cm^{-1}$. El resultado es el valor de absorbancia (adimensional) ϵ .

$$A = \epsilon \times C \times l$$

$$A = \epsilon (cm^{-1} M^{-1}) \times 1 cm \times 1 M$$

$$A = \epsilon$$

Lo primero que resalta de estos espectros es que el espectro de NATA (nuestro modelo de triptofano) prevalece en todo el rango de longitudes de onda sobre los espectros de NAYA (modelo de tirosina) y al de fenilalanina. Particularmente, puede verse que en el rango de 295 a 300 nm Trp es el único residuo aromático que absorbe. Otro punto importante es que a 280 nm las fenilalaninas no absorben luz. En el laboratorio es muy común medir absorbancia a 280 nm como indicador de concentración; sabemos ahora que los residuos que aportan a esta longitud de onda son las tirosinas y los triptofanos. Por otro lado, en el caso de la fenilalanina pueden verse con mucho detalle varias bandas de absorción (el inserto en la **Figura 4-14**) señaladas con flechas. Estas bandas se conocen como bandas vibrónicas y surgen del efecto de las vibraciones en los enlaces del anillo aromático sobre la energía de los orbitales moleculares. Cada una de estas bandas corresponde a un nivel vibrónico distinto (ver **Figura 4-15**) y tiene asociada una frecuencia (una longitud de onda) y una energía. Aquellas bandas en las que la longitud de onda es mayor (menor frecuencia) tendrán asociada una energía menor.



Por ejemplo la transición $0_0 \rightarrow 1_0$ requerirá menor energía que la transición $0_0 \rightarrow 1_1$; aquí con los subíndices se denota los estados vibrónicos. (ver Figura 4-15)

Una pregunta sensata es

¿Qué pasa si la proteína de interés no posee en su secuencia ni tirosinas ni triptofanos?

Tendremos que ingeniar otros experimentos para poder calcular la concentración de proteína y no podremos realizar gran parte de los experimentos que incluyen pruebas sobre este tipo de residuo. Alternativamente, podríamos incluir por ingeniería genética

algún residuo aromático en la secuencia.

Otra pregunta que podemos hacernos es si es posible calcular el espectro de una proteína en base a la composición de aminoácidos de ésta. La respuesta es que sí, se puede.

Se puede modelar el espectro de una proteína desplegada en base a una suma de espectros de los residuos aromáticos y de los puentes disulfuro presentes en presencia de desnaturalizante.

¿Cuál será el espectro de la proteína β -lactamasa de *Bacillus licheniformis* que tiene en su secuencia tres triptofanos, siete fenilalanina, seis tirosinas y no tiene puentes disulfuro?

Para entender esta idea, podemos comenzar por contestar cuál será el coeficiente de extinción a 280 nm para esta proteína en estado desplegado.

Si conocemos la composición de residuos de la proteína y el número de puentes disulfuro (si es que la proteína tiene cisteínas formando puentes disulfuro), entonces podremos calcular el coeficiente de extinción.

$$\epsilon_{280nm} = n_{Trp} \times \epsilon_{Trp280nm} + n_{Tyr} \times \epsilon_{Tyr280nm} + n_{Phe} \times \epsilon_{Phe280nm} + n_{S-S} \times \epsilon_{S-S280nm}$$

	Urea 8 M	GuHCl 6M
Triptofano	5.635	5.685
Tirosina	1.300	1.285
S-S	115	125
Phe	0	0
Longitud de onda: 280 nm		

Si calculamos el coeficiente de extinción molar teniendo en cuenta los coeficientes de extinción de los compuestos modelo en presencia de alta concentración de agente caotrópico (en este ejemplo GuHCl 6M), el coeficiente de extinción de esta proteína será

$$\begin{aligned}\epsilon_{280nm} &= 3 \times 5.685 + 6 \times 1.285 + 7 \times 0 + 0 \times 125 \\ &= 24.565 M^{-1} cm^{-1}\end{aligned}$$

Efectivamente, éste es el coeficiente de extinción de la proteína desnaturalizada en GuHCl 6M.

En el estado nativo las bandas de absorción se suavizan porque cada residuo de la molécula está en un ambiente particular originando pequeñas diferencias y, a su vez, todas las bandas de absorción se superponen.

Algunos de los ambientes son más polares que otros y, algunos, serán definitivamente ambientes apolares, por ejemplo los residuos que estén en el corazón de la proteína. Una de las causas de la existencia de estas

Un punto importante es que todos los residuos en el estado desplegado estarán, por lo menos, en principio, igualmente expuestos al solvente. Esto no ocurre en el estado nativo, en el que cada residuo se encuentra en un ambiente particular. Por este motivo, el espectro del estado nativo será algo diferente al del estado desplegado y, por lo tanto, los coeficientes de extinción también.



diferencias entre los espectros de N y U es el cambio en la polaridad del entorno químico inmediato del residuo que absorbe. A pesar de que, en algunos casos, las diferencias son pequeñas (e incluso hay que hacer procesamientos matemáticos de derivación de los espectros) pueden ser lo suficientemente significativas para ser medidas y estudiadas. Estudiando estas particularidades podremos inferir propiedades del entorno de los aminoácidos en la estructura nativa. También podremos distinguir si una proteína está correctamente plegada o se encuentra desplegada o parcialmente plegada. En la **Figura 4-16** se muestra el espectro (absorción molar) de la proteína β -lactamasa. Puede verse que la región correspondiente a la fenilalaninas presenta ciertas irregularidades que se deben a las bandas vibrónicas. Además, en la región de superposición de Tyr y Trp se observan bandas que son características del estado nativo (en el inserto se amplía esta región del espectro). Con una flecha roja se muestra una de las bandas de absorción propias del triptofano (ver también **Figura 4-14**).

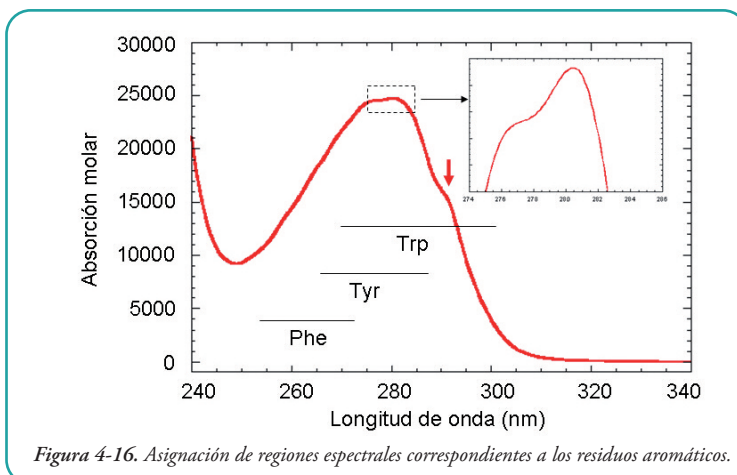


Figura 4-16. Asignación de regiones espectrales correspondientes a los residuos aromáticos.

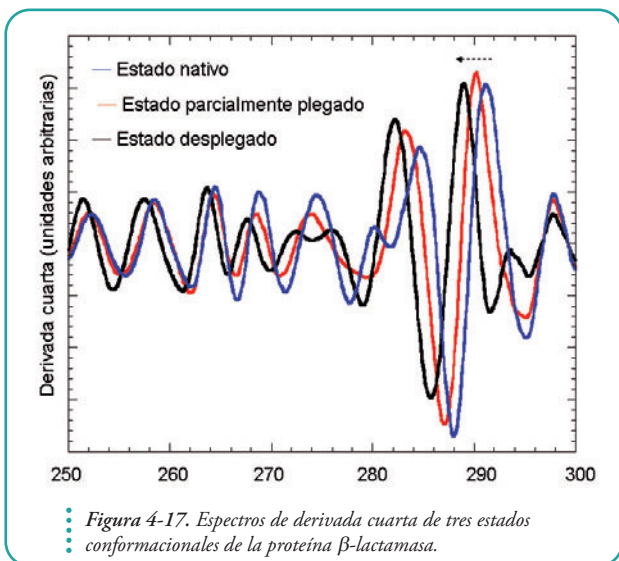
En el inserto se amplía la región del espectro que corresponde a la superposición de Tyr y Trp, aquí se observan bandas que son características del estado nativo. Con una flecha roja se identifica una de las bandas de absorción de triptofano. (ver Figura 4-16)

Las bandas de absorción, en el estado nativo, suelen estar desplazadas con respecto a las bandas de absorción del estado desplegado y, esto, suele ser muy notorio para los triptofanos; no siendo así para las tirosinas y, menos aún, para las fenilalaninas que son mucho menos sensibles al cambio de polaridad en el entorno químico.

Una de las maneras más sencillas para ver estas diferencias espectrales es derivar numéricamente los espectros. Este procedimiento y, en particular la derivación cuarta (que es sencilla de analizar porque sus máximos coinciden con los del espectro original), permite detectar cambios sutiles, corrimientos cercanos al nanometro.

En la **Figura 4-17** se muestra, como ejemplo, los espectros de derivada cuarta de tres estados conformacionales de la proteína β -lactamasa, el estado nativo, un estado parcialmente plegado obtenido mediante ingeniería genética de la proteína (que no altera la composición de residuos aromáticos de la proteína) y el estado desplegado modelado, como la suma de las contribuciones de los residuos de la proteína.

Podemos analizar el corrimiento de bandas de absorción desde un punto de vista algo más teórico. Como dijimos más arriba el espectro de absorción de una cadena polipeptídica plegada no es, exactamente, la suma de los espectros de los grupos que la constituyen.

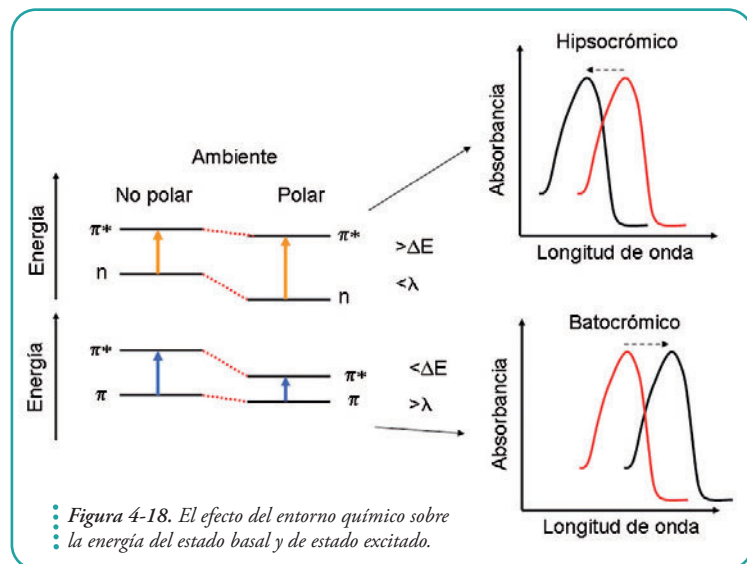


En azul el estado nativo, en negro el estado desplegado y en rojo un espectro correspondiente a una conformación parcialmente plegada. (ver Figura 4-17)

Podemos observar dos tipos de corrimiento para una banda de absorción: desplazamiento hipsocrómico y desplazamiento batocrómico. Estos desplazamientos que ocurren hacia una longitud de onda menor o mayor, respectivamente, se deben a cambios en la energía del estado fundamental y en la energía del estado

excitado. Estos cambios en la energía de los orbitales moleculares dependen de la polaridad del entorno y de la distribución de carga en estos estados.

En la Figura 4-18 se muestran dos transiciones electrónicas en las que ambos estados, el excitado y el basal, se estabilizan en el entorno polar pero estabilizará aún más el estado electrónico en el que la separación (distribución) de carga sea máxima. Cuando hay electrones no compartidos (electrones n), pueden formarse puentes de hidrógeno con el solvente polar, entonces, la transición requiere más energía (efecto hipsocrómico), en definitiva observaremos que la longitud de onda se desplaza a valores menores (menor longitud de onda, mayor energía asociada). En cambio en las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ los estados excitados son más



polares que los fundamentales y, por esto, un aumento en la polaridad del solvente hará que, por la interacción entre dipolos, disminuya más la energía del estado excitado que la del fundamental. Como consecuencia se requerirá menor energía para provocar esta transición en un solvente polar y la transición tendrá asociada una longitud de onda mayor (efecto batocrómico).

Fluorescencia

Hemos visto anteriormente cómo es que podemos excitar electrones y cómo podemos detectar el proceso de absorción de energía. También hemos visto que podemos sacar provecho de este fenómeno y obtener información acerca de una muestra de proteína en solución acuosa. Todavía más interesante, podemos obtener información sobre el estado conformacional de estas macromoléculas.

Una pregunta importante es cómo se desexcita el estado excitado. Y, yendo más a nuestro tema, cómo podemos aprovechar el proceso de desexcitación (la vuelta al estado basal o fundamental de los electrones) para obtener más información sobre el estado en que se encuentran las moléculas en la muestra.

Fluorescencia es uno de los procesos por los que una molécula excitada puede volver a su estado fundamental (de menor energía), en este caso la vuelta se hace con emisión de luz (emisión de un fotón). Este fotón que se emite en el proceso de desexcitación podrá ser detectado. El equipo que usaremos para su detección es el fluorómetro. Como las moléculas, una vez excitadas, se *relajan* (vuelven) rápidamente al estado vibracional de menor energía del primer estado electrónico excitado (por procesos que se conocen con el nombre de conversión interna) **la emisión de fluorescencia ocurre únicamente desde el estado excitado de menor energía** y esto ocurre porque los estados excitados de mayor energía se relajan al estado excitado de menor energía más rápidamente (en el orden del pico segundo, 10^{-12} s) de lo que tardarían en emitir un fotón (en el orden del nano segundo, 10^{-9} s) (ver **Figura 4-19**).

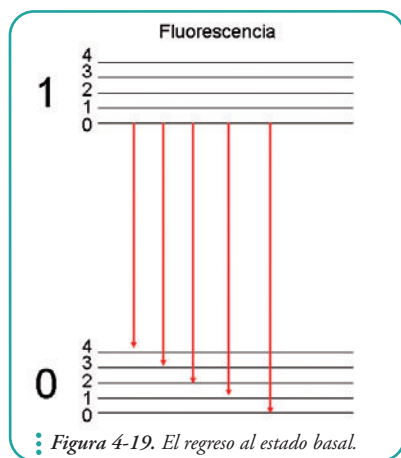
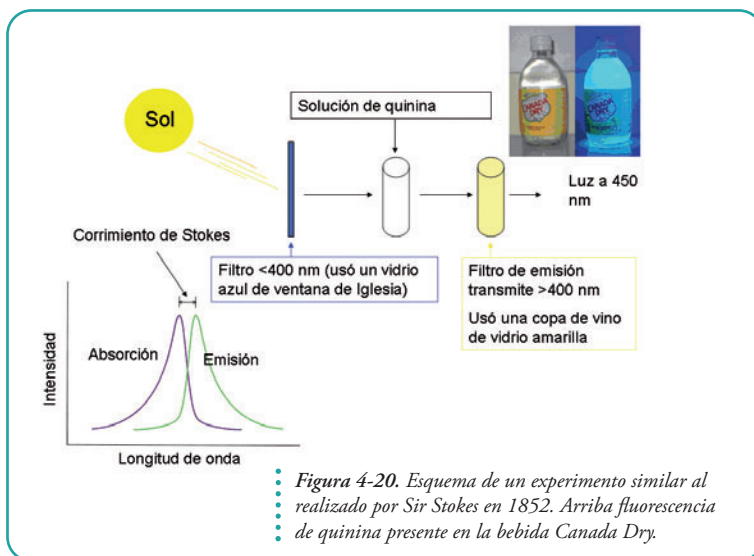


Figura 4-19. El regreso al estado basal.

La emisión de fluorescencia ocurre, únicamente, desde el estado excitado (1) de menor energía. Pueden observarse los subiveles vibrónicos correspondientes al estado basal (0). (ver Figura 4-19)

Esto se conoce como regla de Kasha, por el investigador que Michel Kasha y el proceso que determina un corrimiento de la longitud de onda de emisión de luz con respecto a la de absorción (corrimiento de Stokes) había sido descrito con mucha anterioridad (en el año 1852) por Sir G.G. Stokes quien realizó el experimento que se muestra en la **Figura 4-20**.

Sir Stokes muy ingeniosamente ubicó una serie de elementos ópticos de tal forma que pudo comprobar que, si iluminaba una solución sólo con longitudes de onda menores a 400 nm, existía un proceso por el cual la materia absorbía luz y emitía, posteriormente, radiaciones de longitudes de onda mayores a 400 nm (450nm). Para esto Sir Stokes usó, como elementos ópticos, ingeniosos filtros: un cristal azul de la ventana de una Iglesia que no dejaba pasar luz de longitudes de onda mayores a 400 nm y una copa de vino de cristal amarillo que impedía el paso de luz con longitudes de onda menores a 400. En definitiva si la sustancia no hubiera sido fluorescente, Sir. Stokes no hubiera observado

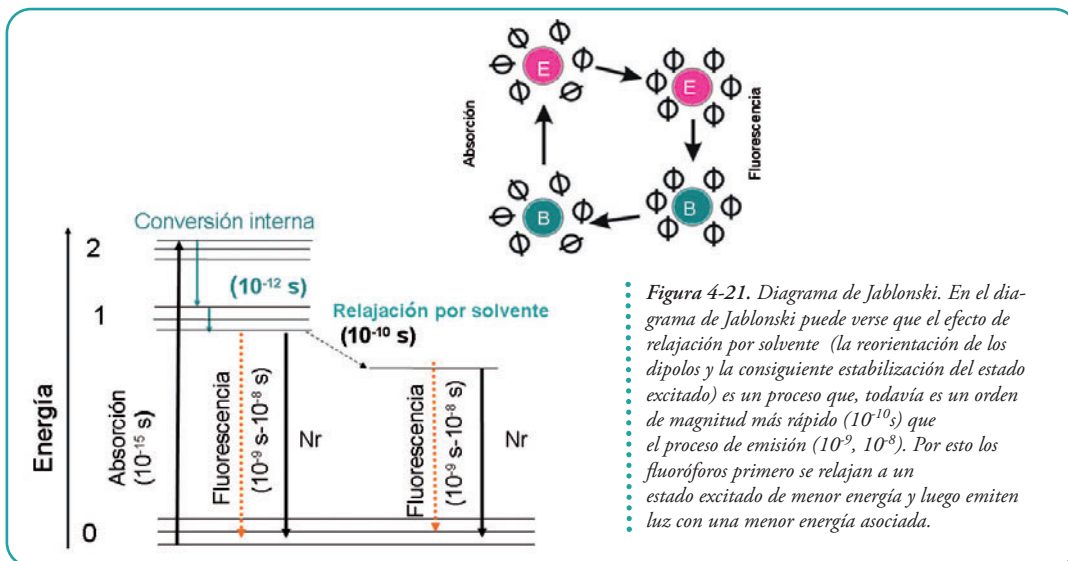


luz a través de la copa amarilla.

Existen otros procesos que modulan la longitud de onda de emisión de fluorescencia. Uno de ellos, que es importante para el estudio de la conformación de proteínas, es el de relajación por solvente. La reorientación de los dipolos de las moléculas de agua (solvente) entorno al estado excitado del fluoróforo (fluoróforo es toda molécula que tiene la capacidad

de fluorecer) puede disminuir la energía del estado excitado y, por lo tanto, el fotón emitido tendrá asociada una longitud de onda mayor (menos energética). En otras palabras, este reordenamiento de dipolos puede estabilizar al estado excitado. Este efecto se conoce como relajación del solvente. Los fluoróforos, que poseen un estado excitado con una mayor separación de cargas con respecto al estado basal, son más sensibles a este efecto, ya que las moléculas de solvente (agua) se reorientarán en su entorno. En la Figura 4-21 se muestra un esquema de este efecto (en el que B indica estado basal y E indica estado excitado) y el diagrama de Jablonski.

Es importante, a esta altura, que quede claro que la emisión es una de las formas de desexcitación. La desexcitación puede ocurrir por otras vías, entre estas otras, por

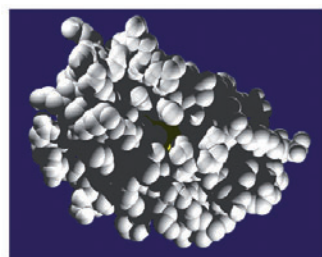


transferencia de esa energía a otras moléculas, colisiones, vibraciones; estas vías son no radiativas (no tienen asociada emisión de luz). Como veremos no todas las moléculas son fluoróforos. Los fluoróforos tienen propiedades químicas especiales.

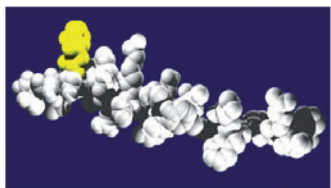
Tienen sistemas de electrones conjugados.

Para las proteínas los residuos de tirosina y triptofano son fluoróforos útiles en el rango de luz ultra violeta. En particular los residuos de triptofano son excelentes sondas para estudiar la conformación proteica por fluorescencia: el triptofano es muy sensible al entorno (por efecto de relajación de solvente).

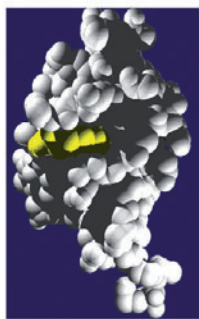
Es posible ver cambios en los espectros de emisión en respuesta a:



Azurina $\lambda_{\text{max}} = 308\text{nm}$



Glucagon $\lambda_{\text{max}} = 350.8\text{ nm}$



Proteína G $\lambda_{\text{max}} = 342.5\text{ nm}$

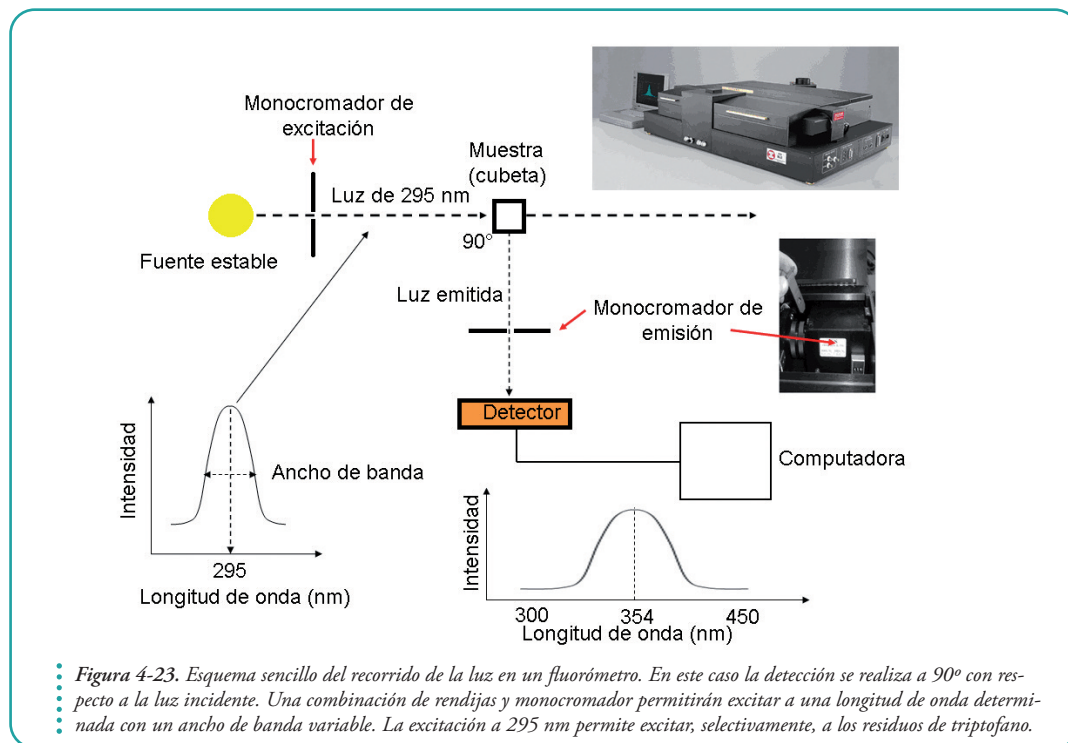
Figura 4-22. El entorno químico de triptofano en el interior de las proteínas modifica sus propiedades ópticas.

Tres proteínas distintas en las que un residuo de triptofano se encuentra en ambientes bien diferentes (color amarillo). En la azurina el triptofano está completamente oculto, emite fluorescencia con una longitud de onda extremadamente menor (308 nm) a la del triptofano disuelto en solvente acuoso (356 nm). En cambio, el triptofano del glucagón está expuesto al solvente y su emisión se produce a 350.8 nm; un caso intermedio es el de la proteína G en el que el triptofano emite a 342.5 nm de acuerdo con una exposición parcial al solvente. (ver Figura 4-22)

- Cambios conformacionales
- Asociación de subunidades
- Unión de sustratos
- Desnaturalización

Además la fluorescencia de triptofano es muy sensible a la de excitación por el choque con otras moléculas, tanto por grupos externos, por ejemplo por moléculas de agua, típicamente en el caso de triptofanos expuestos al solvente, como por grupos vecinos de la propia cadena polipeptídica. Por otro lado, los residuos de triptofano pueden ser excitados selectivamente a 295 nm, a esta longitud de onda los residuos de tirosina ya no absorben (ver absorción UV) y, así, se evita la excitación de las tirosinas.

Para poder excitar a una longitud de onda determinada y analizar la emisión en un rango deseado de longitudes de onda (espectro de emisión) los fluorómetros requieren ciertos componentes: un monocromador de excitación para fijar la longitud de onda de excitación y un monocromador de emisión para detectar fotones emitidos en las distintas longitudes de onda (ver **Figura 4-23**). Como se muestra en dicha figura, se excitará centrando la longitud de onda en un valor, pero con un ancho de banda que podrá ser variable (2, 4, 8 ó 16 nm por ejemplo).



Ahora sí, y volviendo a las proteínas, como hemos mencionado más arriba, el espectro de fluorescencia de triptofano variará según la accesibilidad al solvente de este residuo por lo menos por dos motivos:

- colisiones con moléculas de agua, que disminuirán la intensidad de fluorescencia porque las moléculas tendrán mayor probabilidad de desexcitarse por vías no radiativas y,
- relajación por solvente, en este caso lo que ocurre es un corrimiento de la longitud de onda de emisión hacia valores mayores (menos energéticos).

Además la fluorescencia de triptofano también variará acorde a la movilidad de la cadena polipeptídica, colisiones intra moleculares.

En la **Figura 4-24** se muestran espectros de fluorescencia de triptofano de la proteína β -lactamasa en tres estados conformacionales.

Como se puede ver en el estado nativo (estructura terciaria consolidada) las colisiones intra