

ESTUDIO DEL MECANISMO DE QUENCHING DE SEROALBÚMINA BOVINA POR IMAZETAPIR Y CLORIMURÓN-ETIL. EVALUACIÓN DE EFECTOS DE FILTRO INTERNO.

Maria Emilia Pacheco, Liliana Bruzzone

División Química Analítica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, calle 47 y 115, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.
E-mail: mepacheco@quimica.unlp.edu.ar

Introducción

El quenching de fluorescencia de la seroalbúmina bovina es un método importante para estudiar la interacción de varios compuestos con la proteína. En el presente trabajo se estudiaron las causas que dan lugar a una progresiva reducción de la intensidad de fluorescencia de SAB con la adición de concentraciones crecientes de los herbicidas imazetapir (IMA) y clorimurón-etil (CLO), se determinó la accesibilidad a los fluoróforos y se realizó un estudio de los posibles cambios en el entorno de los fluoróforos por espectrometría de fluorescencia sincrónica. En el caso de quenching estático, se calcularon también las constantes y los parámetros de unión correspondientes a la interacción con SAB.

Resultados

Se realizó un estudio de quenching de fluorescencia de SAB por los herbicidas excitando a 277 nm. La posición del máximo de emisión de SAB (347 nm) en presencia de los herbicidas (Figura 1) no se ve alterada, indicando que las propiedades del entorno de los residuos de Trp no se ven modificadas por su presencia.

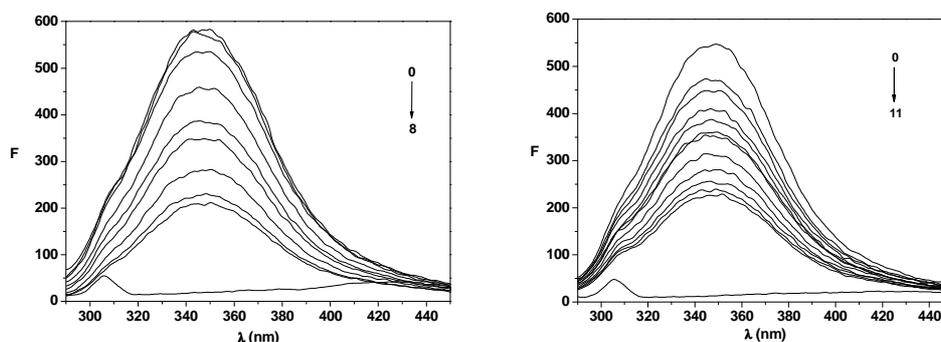


Figura 1. Espectros de emisión de fluorescencia de SAB; $\lambda_{ex} = 277$ nm; [SAB] = 2.04×10^{-7} M; (Izquierda) [IMA] $\times 10^5$ 0-8: 0, 0.372, 0.744, 1.86, 2.98, 4.09, 6.33, 8.19 y 9.3 M; (Derecha) [CLO] $\times 10^5$ 0-11: 0, 0.531, 1.06, 1.59, 2.86, 3.27, 3.68, 5.32, 6.95, 8.59, 9.40 y 10.2 M.

La intensidad de fluorescencia se corrigió por efectos de filtro interno utilizando la ecuación [1, 2]: $F_{corr} = F_{obs} \text{ antilog } [(A_{ex} + A_{em})/2]$. Aun habiendo realizado la corrección, se sigue observando una disminución en el máximo de intensidad de fluorescencia de SAB, lo que indicaría la presencia de mecanismos de quenching colisional y/o de fenómenos de unión.

A fin de determinar el mecanismo de quenching involucrado, se estudió la dependencia de la constante dinámica de quenching (k_q) con la temperatura y viscosidad haciendo uso de la ecuación de Stern-Volmer [1]. Se midieron las intensidades de fluorescencia a tres temperaturas (293, 300 y 306 K) y se las corrigió por efecto de filtro interno. En el caso de IMA, a mayor temperatura se observó una disminución de k_q , sugiriendo un quenching estático. Este resultado se confirmó al variar la viscosidad (η) de 0 a 23 cP y observar que no existe un cambio significativo en la relación F_o/F con $1/\eta$, y por lo tanto con k_q . Con CLO, al aumentar la temperatura se obtuvieron mayores valores de k_q y al variar η en un intervalo de 0 a 40 cP se observó una disminución aproximadamente lineal de F_o/F con $1/\eta$, indicando la presencia de un quenching dinámico.

Para un proceso de quenching estático, bajo la suposición que existen n sitios de unión iguales e independientes, el valor de la constante de unión K_A y el número de sitios de unión n pueden obtenerse representando $\log (F_o-F)/F$ vs $\log\{1/([D_i]-(F_o-F)[P_i]/F_o)\}$ [3]. La suposición es válida ya que al estar el herbicida ionizado al pH de trabajo (buffer Tris-HCl, pH = 7.4; IMA: pKa₁ = 2.1, pKa₂ = 3.9) no se espera que se quenchee la fluorescencia de los Trp-212 y por tanto existe solamente un sitio de unión posible (Trp-134 expuestos).

T	293 K	300 K	306 K
n	0.77	0.82	0.83
$K_A (M^{-1})$	1.51×10^5	3.77×10^4	1.98×10^4

La representación de $\ln K_A$ vs $1/T$ revela la existencia de un proceso de unión espontáneo y exotérmico, donde los enlaces de hidrógeno como las fuerzas de van der Waals juegan un rol importante [4, 5].

	$\Delta G_{293 K}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{300 K}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{306 K}$ (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
SAB-IMA	-28.85	-26.73	-24.92	-117.24	-301.69

El quenching de fluorescencia de proteínas por yoduro ha sido extensamente utilizado para estudiar la accesibilidad de los residuos de Trp y el cambio inducido por la unión de ligandos [6]. Se representó la ecuación de Stern-Volmer con $[Q] = [KI]$, manteniendo constantes las concentraciones de SAB y herbicida (se corrigió por filtro interno). De los resultados obtenidos se deduce que se forma un complejo de unión en la posición donde se encuentra el Trp-134 [7].

La espectrometría de fluorescencia sincrónica ha sido ampliamente utilizada para el estudio de los cambios que se producen en el entorno de un fluoróforo debido a la presencia de un quencher. Se realizaron los espectros sincrónicos de SAB con $\Delta\lambda = 60$ nm (entorno de Trp) en presencia de concentraciones crecientes de herbicida. Se registraron también los espectros de excitación y emisión. En los espectros sincrónicos, como así también en los de excitación, se observó un leve corrimiento del máximo de fluorescencia a mayores longitudes de onda, no observándose corrimiento alguno en los de emisión (Figuras 2 y 3). Al ser el espectro sincrónico una multiplicación de los espectros de excitación y emisión [8], la existencia de efectos de filtro interno ocasiona cambios en el mismo. Es así como el corrimiento en el máximo sincrónico no se atribuye a cambios conformacionales en la proteína, como generalmente se suele atribuir, si no a

efectos de filtro interno que producen cambios en el espectro de excitación y por ende en el sincrónico.

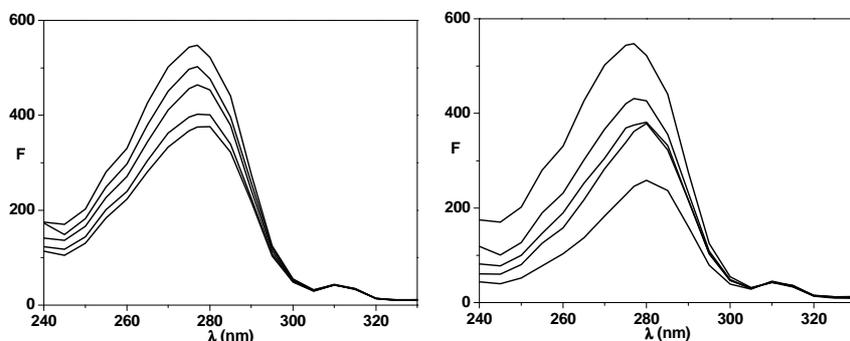


Figura 2. Espectros de excitación de SAB con imazetapir (izquierda) y clorimurón-etil (derecha).

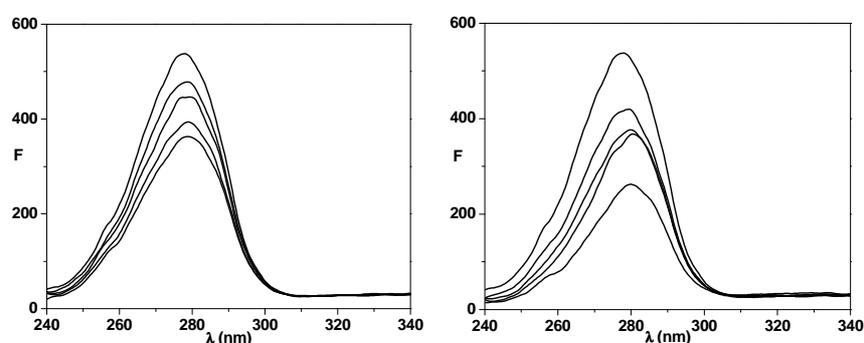


Figura 3. Espectros sincrónicos de SAB con imazetapir (izquierda) y clorimurón-etil (derecha).

Conclusiones

- Del estudio espectrofluorimétrico de la interacción de imazetapir y clorimurón-etil con seroalbúmina bovina se pudo establecer la existencia de un mecanismo de quenching estático (complejo de unión con Trp-134) y dinámico, respectivamente.
- La espectrometría de fluorescencia sincrónica reveló la existencia de un notable efecto de filtro interno, haciendo indispensable la corrección de los espectros de fluorescencia sincrónica para un estudio analítico apropiado.

Referencias

- [1] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed., Springer Publisher, New York, 2006.
- [2] C.A. Parker, Photoluminescence of Solutions, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1968.
- [3] S. Bi, L. Ding, Y. Tian, D. Song, X. Zhou, X. Liu, H. Zhang, J. Mol. Struct. 703 (2004) 37-45.
- [4] D.A. Leckband, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29 (2000) 1-26.
- [5] P.D. Ross, S. Subramanian, Biochemistry 20 (1981) 3096-3102.
- [6] M.K. Das, M.I. Khan, A. Surolia, Biochem. J. 195 (1981) 341-343.
- [7] N.S. Quiming, R.B. Vergel, M.G. Nicolas, J.A. Villanueva, J. Health Sci. 51 (2005) 8-15.
- [8] T. Vo-Dinh, Anal. Chem. 50 (1978) 396-401.