

Tesis de Posgrado

Asociación de proteínas oligoméricas : Transición entre el equilibrio estocástico y determinístico

Erijman, Leonardo

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Erijman, Leonardo. (1990). Asociación de proteínas oligoméricas : Transición entre el equilibrio estocástico y determinístico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2349_Erijman.pdf

Cita tipo Chicago:

Erijman, Leonardo. "Asociación de proteínas oligoméricas : Transición entre el equilibrio estocástico y determinístico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2349_Erijman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis

2349

g. 2

1

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ASOCIACION DE PROTEINAS OLIGOMERICAS.
TRANSICION ENTRE EL EQUILIBRIO ESTOCASTICO Y DETERMINISTICO

Autor:
Leonardo Erijman

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

Director: Dr. Alejandro Paladini
coDirector: Dr. Gregorio Weber

Lugar de trabajo
Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y
Biología Molecular (INGEBI)
y
Departamento de Bioquímica
Universidad de Illinois

- 2349 -

g. 2

1990

a Eli

a mis padres

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Alejandro A. Paladini por sus enseñanzas, aporte crítico y confianza, que han sido muy valiosas para la concreción de esta tesis.

Al Prof. Gregorio Weber por la gentileza al recibirme en su laboratorio, su gran ayuda, comprensión y su generosa transmisión de conocimientos. La posibilidad de trabajar a su lado fue un auténtico privilegio.

Al Dr. Héctor N. Torres, por haberme permitido desarrollar mi Tesis en INGEBI, por su confianza y apoyo. A la Dra. María Teresa Tellez-Iñón por sus enseñanzas, su permanente aliento y afecto. A la Dra. Mirta M. Flawia, por su constante apoyo, estímulo y entusiasmo docente. Al Dr. Gerardo Glikin por sus consejos y su interés. A todos los jefes de grupo de INGEBI por su ayuda.

A mi querido amigo y compañero Jorge P. Muschietti por su infinita paciencia, su incondicional ayuda y su permanente amistad.

A Patricia Levy Yeyati, Horacio Martinetto, Gabriela Levitus por su amistad y compañerismo. A Javier Cáceres, Ricardo Attar, Jorge Caamaño y Daniel Altschuler por sus consejos, aliento y acompañamiento telefónico.

A Graciela Bianchini, Omar Coso, Alejandro Schijman, Guillermo Taccioli, Mercedes Goin, María Laura Gomez, Bettina Orman, Fernando Bravo, Pablo Rabinowicz, Andrés Muro, Erich Grotewold y el resto de mis compañeros de INGEBI, por todos los buenos momentos compartidos.

A Javier Fernandez Velazco, Irene Baroli, Bill Atkins, Fay Farris y Jerson Silva por la ayuda, compañía y consejos en Urbana-Champaign.

A Norberto Malarini por su optimismo y por el excelente trabajo gráfico y armado de las figuras.

A Adriana Urman, Gabriel Paisán y Mariano Rodriguez por todos los favores recibidos.

A María Julia Alvarez, Leonor Acevedo y Norberto Contreras por el apoyo técnico.

A la Universidad de Buenos Aires por las Becas de Investigación otorgadas.

INDICE

	Página
1 . INTRODUCCION	1
1.1 PROTEINAS OLIGOMERICAS.....	2
1.1.1 CONSIDERACIONES GENERALES.....	2
1.1.2 DISOCIACION INDUCIDA POR PRESION.....	3
1.1.3 DEPENDENCIA ANOMALA RESPECTO DE LA CONCENTRACION.....	6
1.1.4 CURVA ANOMALA DE DISOCIACION.....	11
1.1.5 DERIVA CONFORMACIONAL.....	12
1.2 CONSIDERACIONES SOBRE LAS PROTEINAS ESTUDIADAS.....	15
1.2.1 ENOLASA.....	15
1.2.2 HEXOQUINASA.....	16
1.2.3 GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA.....	17
1.2.4 LACTATO DESHIDROGENASA.....	18
1.3 USO DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA EL ESTUDIO DE LA ASOCIACION DE PROTEINAS OLIGOMERICAS.....	20
1.3.1 CARACTERISTICAS DE LA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA..	20
1.3.2 USO DE TRANSFERENCIA DE ENERGIA DE EXCITACION ELECTRONICA PARA EL ESTUDIO DE AGREGADOS MOLECULARES..	23
2 . MATERIALES Y METODOS.....	29
2.1 PREPARACION DE MUESTRAS.....	30

2.1.1	<i>BUFFER</i>	30
2.1.2	PROTEINAS.....	30
2.1.3	DETERMINACION DE CONCENTRACIONES ENZIMATICAS.....	30
2.1.4	DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	31
2.1.4.1	Lactato deshidrogenasa.....	31
2.1.4.2	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.....	31
2.1.4.3	Hexoquinasa.....	32
2.1.5	MARCACION DE PROTEINAS Y DETERMINACION DE LA RELACION DE SUSTITUCION.....	34
2.1.5.1	Isotiocianato de 5-fluoresceina.....	34
2.1.5.2	7-dimetilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)- 4-metilcumarina.....	34
2.1.5.3	ácido 2'(N,N-dimetil)amino-6-naftoil- 4- <i>trans</i> -ciclohexanoico (DANCA).....	35
2.1.5.4	Cloruro de 2-dietilaminonaftaleno-5-sulfónico (2,5-DENS).....	36
2.1.5.5	Cloruro de 1-metoxinaftaleno-4-sulfónico (1,4-MENS).....	36
2.2.	INSTRUMENTACION.....	38
2.2.1	BOMBA DE ALTA PRESION.....	38
2.2.2	POLARIZACION.....	41
2.2.3	EMISION DE FLUORESCENCIA.....	43
2.2.4	VIDAS MEDIAS.....	44
2.2.5	CALIBRACION DE MONOCROMADORES Y ANALIZADOR MULTICANAL..	46
2.3	CALCULOS.....	56
2.3.1	EFECTO DE UN INCREMENTO "INSTANTANEO" EN LA PRESION....	56

3 .	RESULTADOS Y DISCUSION.....	60
3.1	DISOCIACION INDUCIDA POR PRESION HIDROSTATICA.....	61
3.2	METODO DE HETEROTRANSFERENCIA.....	64
3.3	METODO DE HOMOTRANSFERENCIA.....	72
3.4	ESTRUCTURA CUATERNARIA DINAMICA.....	84
3.5	DERIVA CONFORMACIONAL, DISOCIACION E INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES.....	88
3.6	EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	97
3.7	ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DINAMICA DEL EQUILIBRIO DISOCIACION-REASOCIACION PARA DIMEROS Y TETRAMEROS....	102
3.8	REASOCIACION DE AGREGADOS "INCORRECTOS" EN LA LDH....	115
3.9	FORMACION DE AGREGADOS: LIMITACION DE LA HIPOTESIS DE AUTOENSAMBLADO.....	124
3.10	HETEROGENEIDAD EN LAS POBLACIONES NATIVAS DE AGREGADOS MOLECULARES.....	128
4 .	CONCLUSIONES.....	131
5 .	BIBLIOGRAFIA.....	135

1. INTRODUCCION

1.1 PROTEINAS OLIGOMERICAS

1.1.1 CONSIDERACIONES GENERALES

En los últimos años han sido elucidados los mecanismos generales de regulación de un importante número de procesos biológicos. Los complejos de proteínas oligoméricas juegan un papel central en el desarrollo de tales funciones. La regulación de actividades biológicas es resultado de pequeñas cooperatividades o acoplamientos de energías libres entre los equilibrios de unión de todas las especies involucradas, incluyendo moléculas efectoras capaces de alterar la afinidad de ligandos. Tales interacciones cooperativas o alostéricas entre ligandos están frecuentemente asociadas a afinidades entre subunidades de proteínas. El conocimiento de los mecanismos que gobiernan la modulación de las funciones biológicas depende de la caracterización de las interacciones entre los diferentes componentes de tales complejos macromoleculares.

La información cuantitativa sobre las fuerzas de asociación entre cadenas en los sistemas oligoméricos ha estado parcialmente limitada debido a la alta afinidad y multiplicidad de las interacciones involucradas. La fuerza con la cual están unidas entre sí las subunidades en una proteína oligomérica es determinada por la energía libre de asociación, pero este importante parámetro termodinámico ha sido medido en unos pocos casos entre los cientos de proteínas oligoméricas bien estudiadas. Esta ausencia de datos es atribuida a la frecuentemente pequeña constante de disociación, debido a lo cual la determinación de grados de disociación se debe realizar a muy altas diluciones. La mayoría de

Introducción

los enfoques experimentales destinados a determinar los roles funcionales de las subunidades dependen de la posibilidad de producir la disociación reversible en las proteínas. Las variables usuales para perturbar un sistema son la temperatura o la composición química del medio, tales como cambios en el pH, fuerza iónica, uso de solventes orgánicos y otros agentes químicos.

Los cambios en temperatura provocan simultáneamente cambios en volumen y energía térmica, lo que dificulta la separación de ambos efectos. Además, las proteínas en solución son particularmente sensibles a ligeros cambios en temperatura y aún pequeños aumentos pueden producir cambios estructurales irreversibles. Existe una amplia gama de reactivos disociantes, tales como urea, clorhidrato de guanidinio y NaCNS, pero su uso efectivo en una proteína puede ser inapropiado para otra y, lo que es más importante, todos estos agentes disociantes favorecen simultáneamente el desplegamiento de las cadenas polipeptídicas.

La presión hidrostática, en el rango de una a 10^4 atmósferas, es una variable termodinámica muy conveniente. Su uso elimina muchas de las dificultades inherentes al estudio de equilibrios con alta afinidad, aislando aquellos efectos que dependen exclusivamente del volumen. En sistemas biológicos la presión permite variar continuamente las distancias intermoleculares proporcionando información sobre las mismas que no es posible lograr de otro modo (Weber y Drickamer, 1983)

1.1.2 DISOCIACION INDUCIDA POR PRESION

La aplicación de presión a un dado sistema químico en equilibrio desplaza el equilibrio en la dirección que tiende a aliviar la perturbación, esto es favoreciendo las formas en las que

Introducción

el sistema ocupa el menor volumen, de acuerdo al principio de Le Chatelier. Esto surge del hecho que la derivada de la función de energía libre de Gibbs respecto de la presión es el cambio de volumen para esa reacción:

$$dG/dp = \Delta V_T \quad [1.1]$$

Si el cambio de volumen para la formación de productos es negativo y grande, en valor absoluto, la aplicación de la presión desplazará el equilibrio en esa dirección. De hecho, el uso de altas presiones hidrostáticas es un método general para inducir la disociación reversible de proteínas oligoméricas a concentraciones en las cuales el proceso puede ser seguido a través de diversas técnicas espectroscópicas. Este efecto fue demostrado en todos los casos estudiados hasta el presente y se debe fundamentalmente a que el sistema presenta un volumen menor en forma disociada, en la que el solvente ocupa los espacios libres que resultan del empaquetamiento imperfecto de los átomos en las interfases entre subunidades (Paladini y Weber, 1981b). Además, como consecuencia de la existencia de uniones salinas en las interfases (observadas, por ejemplo, en la hemoglobina y en la lactato deshidrogenasa), la hidratación de las cargas iónicas expuestas en los monómeros es más eficiente debido a la electrostricción, con una contribución promedio de -25 ml mol^{-1} para cada puente salino (Rodgers *et al.*, 1988). Torgerson *et al.* (1979) designaron con el nombre de *sitios duros* tales interacciones incompresibles en las interfases que son, en consecuencia, desestabilizadas por la presión. La aplicación de altas presiones también puede promover la desnaturalización de cadenas polipeptídicas.

Introducción

cas monoméricas; sin embargo esto ocurre a presiones superiores a 4 kbar, mientras que la disociación reversible de proteínas oligoméricas es observada a presiones debajo de 3 kbares (Heremans, 1982). Dada la diferencia en susceptibilidades frente a la presión, de las estructuras ternarias y cuaternarias en proteínas, la combinación de altas presiones y métodos espectroscópicos de análisis, posibilita la obtención de información relativa a la interacción proteína-proteína con mínimos efectos directos sobre el plegamiento de las cadenas que las forman.

La disociación depende de la concentración con un exponente que a su vez es dependiente del orden de la reacción de asociación de subunidades. Esto permite distinguir entre la disociación inducida por aplicación de presión de un posible efecto directo de dicha perturbación sobre la propiedad espectroscópica que está siendo analizada, o de efectos indirectos a través de cambios de primer orden en la conformación de las proteínas que componen el agregado, todos los cuales son independientes de la concentración.

En un experimento típico se pueden graficar, para un dado oligómero, los cambios observados en una determinada propiedad espectroscópica en función de la presión aplicada. En los extremos correspondientes a las regiones de bajas y altas presiones se observan, generalmente, valores constantes que, se asume, representan al agregado sin disociar y a las subunidades aisladas, respectivamente. La constante de disociación a presión p (K_p) y la constante de disociación a presión atmosférica (K_a) están relacionadas según:

$$K_p = K_{atm} \exp(p\Delta V^\circ/RT) \quad [1.2]$$

Introducción

donde ΔV° es el cambio de volumen standard de asociación (Paladini y Weber, 1981b). Introduciendo el grado de disociación a presión p (α_p), se puede escribir, para el caso de una reacción de disociación de orden n :

$$K_p = n^n c^n - 1 \alpha_p^n / (1 - \alpha_p) \quad [1.3]$$

de [1.2] y [1.3]

$$\ln [(\alpha_p^n / (1 - \alpha_p))] = p \Delta V^\circ / RT + \ln (K_{atm} / n^n c^n - 1) \quad [1.4]$$

La dependencia lineal entre la presión y el logaritmo de la constante de disociación aparente a la presión p ha sido verificada en todos los casos estudiados.

1.1.3 DEPENDENCIA ANOMALA RESPECTO DE LA CONCENTRACION

Cuando se emplean dos concentraciones de proteína C_1 y C_2 , la diferencia en el valor de presión en la cual se observa un grado de disociación α es:

$$p_2 - p_1 = (n-1) RT \ln C_2 / C_1 / \Delta V^\circ \quad [1.5]$$

Esto significa que para un mismo cambio de volumen standard de asociación, la diferencia en la presión necesaria para inducir un dado grado de disociación (por ejemplo 50%) aumenta con el número de partículas que componen el agregado.

Introducción

El cambio de volumen debido a la asociación (ΔV^0) puede ser calculado de la pendiente del gráfico del grado de disociación α vs. la presión p (ecuación [1.4], ΔV_p) o por el desplazamiento de esta recta para dos concentraciones diferentes (ecuación [1.5], ΔV_c). En los dímeros estudiados los valores de ΔV calculados a través del cambio en el grado de disociación con la presión a concentración constante y por la diferencia en la presión necesaria para promover un 50% de disociación son coincidentes, dentro del error experimental ($\pm 15\%$). Por otro lado, la disociación inducida por presión de la eritrocuerina del anélido *Glossocolex paulistus* (una hemoglobina extracelular, compuesta por 16 subunidades hexaméricas, o 96 monómeros, Gomes et al., 1989), es casi independiente de la concentración, y la cápside del virus BMV (Silva y Weber, 1987) presenta el mismo perfil de disociación para todas las concentraciones estudiadas. Sin embargo, la ecuación [1.2], que establece la dependencia termodinámica del grado de disociación con la presión aplicada se cumple tanto en estos grandes agregados como en los dímeros. Los tetrámeros estudiados muestran una situación intermedia entre los límites descritos: los valores de ΔV calculados por el desplazamiento de las curvas de compresión a distintas concentraciones (ΔV_c) son tres a cinco veces mayores que las que se derivan del cambio en el grado de disociación con la presión para una dada concentración (ΔV_p); en otras palabras, el cambio en la presión a la cual se obtiene 50 % de disociación es menor que el previsto por la ecuación [1.4]. La tabla I muestra los valores de ΔV_p y ΔV_c obtenidos para varios dímeros y tetrámeros. Esto parece indicar que en la organización de complejos oligoméricos ocurre una transición a nivel de tetrámeros entre el comportamiento normal que presentan los dímeros y el "irregular" observado en agregados de mayor orden.

TABLA I: VOLUMENES STANDARD DE ASOCIACION (&V_C, &V_P) Y ENERGIAS LIBRES DE ASOCIACION (&G) DE DIMEROS Y TETRAMEROS

	&G	&V _P	&V _C
dímero			
β ₂ trp sintetasa ¹	-12.8	170	170
enolasa ²	-9.5	55	47
hexoquinasa ³	-12.6	120	172
tetramero			
LDH porcino ⁴	-36.3	170	680
GAPDH levadura ⁵	-34.9	235	783

1: Silva *et al.*, 1986.

2: &G de Xu & Weber, 1982; &V este estudio.

3: Ruan & Weber, 1988.

4: King & Weber, 1986a.

5: Ruan & Weber, 1989.

Energías libres (&G) en kcal/mol; Volúmenes de asociación (&V) en ml/mol.

Los valores de &G y &V fueron obtenidos a partir de mediciones de polarización de fluorescencia de proteínas dansiladas, excepto &G para la enolasa, que proviene de experimentos de dilución.

Introducción

Para explicar estos hechos, Weber (Ruan & Weber, 1989; Weber, 1989) sugirió la existencia de heterogeneidad de las energías libres de asociación en la población nativa de tetrámeros.

La figura 1 muestra el cálculo de la disociación promovida por presión para dos concentraciones que difieren en un factor de diez entre sí. Se asumió que la población de proteínas consiste en tres fracciones con energías de asociación de $-6RT$, 0 y $+9RT$, en la proporción $0.21:0.58:0.21$ respectivamente. La figura inferior corresponde al mismo cálculo, esta vez el cálculo fue realizado suponiendo que la población de tetrámeros podía ser descrita mediante una distribución gaussiana de energías libres compuesta por 11 fracciones, con una desviación standard del promedio de $7.5RT$ y $-5RT$. De las figuras surge que la existencia de heterogeneidad provoca como resultado valores de ΔV_c cercanos al cambio real de volumen en la reacción de disociación, pero que los valores son anormalmente pequeños cuando el cálculo se realiza considerando el cambio en el grado de disociación con la presión. La comparación entre ambas figuras muestra, además, que al aumentar el número de fracciones con diferentes energías libres de asociación en la población inicial de proteína, es más difícil detectar dicha heterogeneidad a través de cambios en la pendiente de la curva de disociación vs. presión.

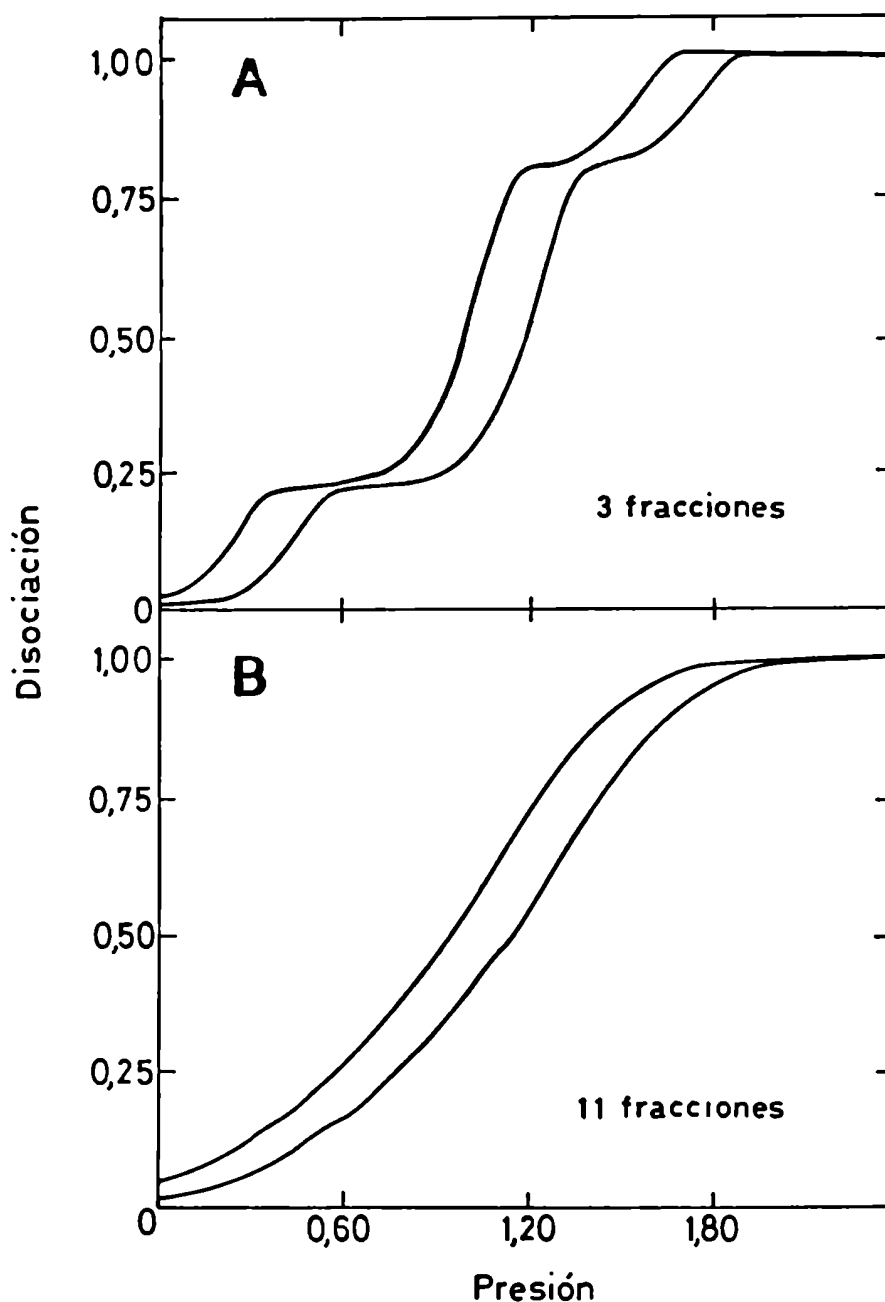


Figura 1: Cálculo del grado de disociación de un tetrámero en función de la presión aplicada, para dos concentraciones que difieren en un orden de magnitud. La solución de proteína consiste en
 (a) 3 fracciones con energías libres de asociación de ΔG -6RT, ΔG y ΔG +9RT, en la proporción 0.21:0.58:0.21
 (b) una distribución gaussiana de energías libres compuesta por 11 fracciones, con una desviación standard del promedio de 7.5RT y -5RT (Weber, 1989).

1.1.4 CURVA ANOMALA DE DISOCIACION

Para un equilibrio oligómero-monómero de orden n , la diferencia entre las concentraciones en las cuales el grado de disociación es 0.1 ($C_{0.1}$) y 0.9 ($C_{0.9}$), está dada, en teoría, por la siguiente relación (obtenida a partir de [1.3]):

$$\log C_2/C_1 = (n+1)/(n-1) \cdot \log 9 \quad [1.6]$$

Sin embargo, Xu y Weber (1982), observaron que en la enolasa de levadura dicho rango de concentraciones era igual a 1.7 unidades de logaritmo, valor significativamente inferior a 2.86, esperado para un dímero ($n=2$). Este estrechamiento en el intervalo logarítmico de concentraciones de proteína en la curva de dilución es atribuido a un cambio progresivo en la conformación a medida que la proteína se disocia, implicando de este modo que los potenciales químicos de los monómeros y el oligómero varían dependiendo del tiempo que las subunidades se encuentran asociadas o disociadas (Xu y Weber, 1981; Weber, 1986).

En principio todas las proteínas oligoméricas son disociadas a grandes diluciones. Sin embargo las técnicas físicoquímicas corrientes no son lo suficientemente sensibles para dar datos precisos a las bajas concentraciones de trabajo. En tetrámeros ($n=4$) el rango de concentraciones teórico es de 1.59 unidades de logaritmo, y hasta el presente, no se tienen datos experimentales que permitan realizar la comparación con los valores teóricos.

1.1.5 DERIVA CONFORMACIONAL

Una serie de estudios de dímeros, tetrameros (Silva *et al.*, 1986; King y Weber, 1986; Ruan y Weber, 1988, 1989) mostraron que luego de la disociación inducida por presión, los monómeros sufren un cambio progresivo en la conformación, en forma dependiente del tiempo en que las subunidades permanecieron disociadas, de modo análogo a las modificaciones desarrolladas durante la disociación por dilución. Este proceso, al cual se denominó deriva conformacional (*conformational drift*), es responsable de la pérdida parcial de afinidad entre subunidades, de la histéresis en la asociación luego de eliminada la perturbación hidrostática, de la pérdida reversible de actividad enzimática y de las alteraciones en algunas propiedades espectroscópicas.

Asimismo, observaciones realizadas en la lactato deshidrogenasa y en la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa indicaron la existencia de dos formas tetraméricas termodinámicamente estables: A y A*. A una dada temperatura y presión, la partición entre estas formas está determinada por las energías libres de asociación ΔG y ΔG^* y los correspondientes volúmenes estándar de asociación ΔV y ΔV^* . La forma A* está caracterizada por un cambio de volumen aparente de asociación y una energía libre de asociación mucho mayor. Las diferencias en estos parámetros termodinámicos indican que en ningún momento de la disociación por acción de la presión coexistiría el tetramero nativo con una fracción detectable del tetramero inactivo. A temperatura ambiente los tetrameros inactivos se originan solamente por descompresión, pero a baja temperatura (0-4°C) persisten indefinidamente.

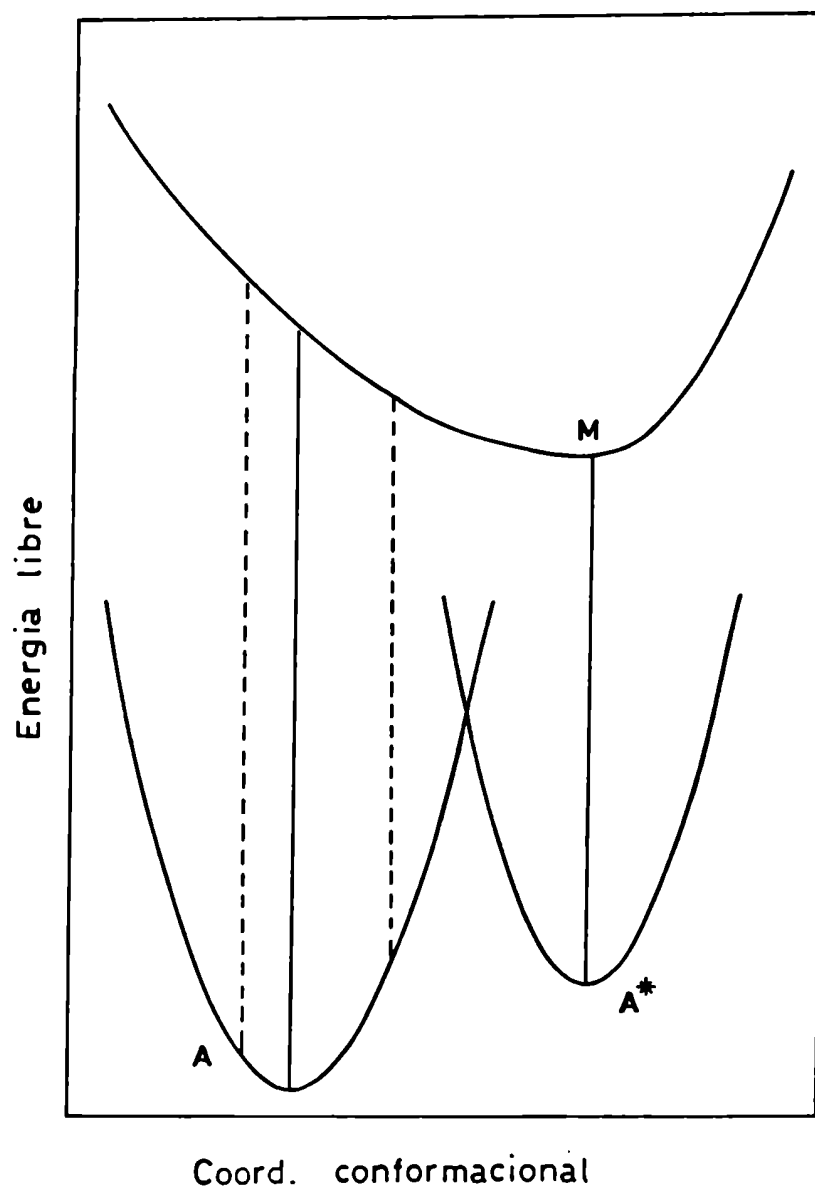


Figura 2: diagrama que muestra la dependencia de la energía libre de Gibbs respecto de la coordenada de conformación de oligómeros nativos (A) y de los oligómeros que han sufrido deriva conformacional (A*). (Ruan & Weber, 1989).

Introducción

La recuperación de las características individuales se produce cuando estas soluciones son incubadas a temperatura ambiente durante un tiempo que varía según el tratamiento al que han sido sometidas.

A partir de estas observaciones King y Weber (1986b) y Ruan y Weber (1989) propusieron diagramas de energía libre para la disociación y reasociación de oligómeros (figura 2). La disociación y reasociación están representadas por líneas verticales, ya que corresponden a procesos microscópicos más rápidos que los subsiguientes cambios conformacionales de los monómeros.

La recuperación de la deriva conformacional se produce tanto en dímeros como en tetrámeros, pero en el caso de los dímeros no se han encontrado condiciones que permitan aislar un agregado indefinidamente estable A^* , con propiedades enzimáticas y espectroscópicas alteradas, como es posible hacerlo en los tetrámeros (Ruan y Weber, 1989). El análisis de la figura 2 sugiere que esta diferencia puede atribuirse al hecho que la conformación correspondiente al mínimo de energía libre del monómero cae dentro de la superficie de energía libre del dímero, pero más allá que la del tetrámero; en otras palabras, la diferencia entre las conformaciones correspondientes al monómero aislado respecto del monómero en el agregado son considerablemente mayores cuanto mayor es el número de subunidades que forman el agregado. King y Weber (1986b) señalaron que la formación de estos agregados estables explican la crioinactivación de enzimas oligoméricas.

1.2 CONSIDERACIONES SOBRE LAS PROTEINAS ESTUDIADAS

Para la presente tesis se han seleccionado dímeros y tetrameros de distintos orígenes, en base al conocimiento de las respectivas estructuras cristalinas, y por haber sido objeto de una detallada investigación mediante el uso de altas presiones hidrostáticas. A continuación se brinda un resumen de las conclusiones originadas en experimentos previos, que son de interés para el presente estudio.

1.2.1 ENOLASA

La enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa) es un dímero de peso molecular 90.000, que cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Esta es la segunda reacción de la secuencia glicolítica en la cual se genera un compuesto de fosfato de alta energía. La enzima tiene un requerimiento absoluto respecto de un catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}), que forma un complejo con la enzima previo a la unión del sustrato. Las interacciones hidrofóbicas son de importancia primaria en la asociación entre subunidades. La enolasa de levadura fue la primera proteína oligomérica cuya disociación por efecto de la presión fue estudiada exitosamente utilizando la despolarización intrínseca y de un fluoróforo externo, el 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonilo (dansilo)(Paladini y Weber, 1981b). El cambio de volumen calculado según ambas técnicas resultó coincidente (-65 ± 8 ml), y en base a las determinaciones realizadas se obtuvo el valor de 9 kcal/mol para la energía libre de disociación de la enolasa disuelta en buffer Tris-HCl, pH 7.3, en presencia de exceso de magnesio, a 12°C.

Introducción

Como se indicó anteriormente, la disociación de la enolasa tiene lugar sobre un rango de concentraciones significativamente menor al que corresponde a una única energía libre de asociación entre monómeros, hecho atribuido a la deriva conformacional de los monómeros disociados.

1.2.2 HEXOQUINASA

La hexoquinasa es un dímero compuesto por dos subunidades iguales de 48 kD, que cataliza la fosforilación dependiente de ATP de hexosas (Colowick, 1973)



La presencia de activadores alostéricos puede aumentar su actividad hasta 10 veces (Kosow & Rose, 1971), en parte debido al desplazamiento del equilibrio monómero-dímero hacia el dímero. Estudios de rayos X mostraron que la unión de la glucosa induce un cambio conformacional desde una forma inactiva a una activa.

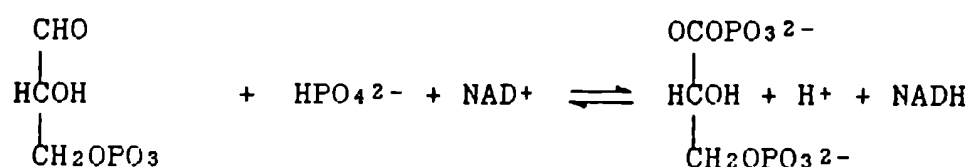
La disociación de la enzima por efecto de la presión fue investigada utilizando técnicas de espectroscopía de fluorescencia (Ruan y Weber, 1988). Para la isoenzima P2 se determinó una energía libre de asociación de los monómeros a presión atmosférica K_{atm} de -14.2 kcal/mol a 20°C y -11.4 kcal/mol a 0°C. La asociación de los monómeros procede con un cambio positivo en entalpía, lo que señala que la entropía es capaz de compensar en exceso la negativa entalpía de hidratación de las interfases entre subunidades.

Introducción

Luego de un ciclo de compresión y descompresión 0°C, se produce un efecto de histéresis, y la proteína presenta menor energía libre y volumen de asociación. La actividad enzimática, las propiedades espectroscópicas y el estado de agregación de la proteína nativa son recuperadas individualmente con diferentes velocidades y en forma dependiente del tiempo durante el cual las subunidades permanecieron separadas entre sí, lo que implica la existencia de complejos cambios conformacionales en los monómeros aislados (Ruan y Weber, 1988).

1.2.3 GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA

La gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) cataliza reversiblemente la oxidación y fosforilación de D-gliceraldehído-3-fosfato (G-3P) en una reacción que acopla la oxidación de un aldehído con la síntesis de un anhídrido fosfato de alta energía, 1,3-difosfoglicerato (DPGA), de acuerdo con el siguiente esquema:



La GAPDH se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo una enzima clave en la conversión de glucosa a ácido pirúvico, un paso esencial en el metabolismo de carbohidratos en la mayoría de los organismos. Representa alrededor del 20% del total de proteína soluble en levadura y hasta el 10% en músculo. Ha sido aislada en forma cristalina de un número importante de especies, presentando una alta homología en las respectivas

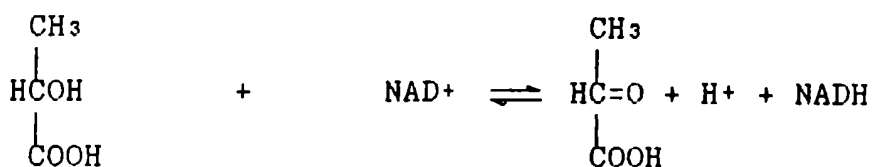
Introducción

secuencias aminoacídicas. Sin embargo existen importantes diferencias entre distintas especies; principalmente, la unión del NAD a la enzima de levadura muestra cooperatividad positiva, mientras que la cooperatividad en la unión del NAD a la enzima de músculo es negativa. Este hecho da lugar a una gran diferencia entre las constantes de disociación, determinadas cinética y espectroscópicamente, y explica las discrepancias producidas respecto del número e independencia de sitios de unión del NAD (Harris & Waters, 1976).

Sólo la forma tetramérica, compuesta por cuatro subunidades idénticas y un peso molecular total de 146.000, es activa. La asociación de monómeros en tetrámeros se produce con un cambio de entalpía de -14 kcal/mol y un aumento de 18 kcal/mol en la entropía a 25°C (Ruan y Weber, 1989).

1.2.4 LACTATO DESHIDROGENASA

La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza reversiblemente la oxidación de ácido láctico a ácido pirúvico.



Se encuentra distribuida en casi todos los tejidos animales, microorganismos y plantas, en donde forma el centro de un balanceado equilibrio entre el anabolismo y catabolismo de hidratos de carbono. En animales superiores, todas las L-LDH son tetrámeros de peso molecular de 145.000 (Everse & Kaplan, 1973). Las

Introducción

subunidades de la LDH existen como 2 formas estructurales principales, nombradas como H, que es aislada de músculo cardíaco, y M, purificada de músculo esquelético, lo que da lugar a cinco diferentes isoenzimas de la molécula tetramérica. Las isoenzimas presentan significativas diferencias en composición aminoacídica, estructura helicoidal y otras propiedades estructurales y cinéticas.

Las enzimas lactato deshidrogenasa bovina y porcina son disociadas reversiblemente a pH neutro cuando se aplican presiones de hasta 2 kbar a soluciones entre 0.1 y 10 μ M (Muller *et al.*, 1981a, 1981b; King & Weber, 1986a). Las características de esta enzima luego de ciclos de disociación-reasociación inducida por presión, son muy similares a los de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Presenta una remarcable histéresis, con una diferencia de hasta 1 kbar en las presiones en las cuales hay un 50% de asociación, para las curvas de compresión y descompresión. Además, luego de la reasociación, tiene lugar la formación de un tetrámero, estable a baja temperatura, con la actividad enzimática disminuída y una menor afinidad entre subunidades comparado con la proteína nativa (King y Weber, 1986a).

1.3 USO DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA EL ESTUDIO DE LA ASOCIACION DE PROTEINAS OLIGOMERICAS

1.3.1 CARACTERISTICAS DE LA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

El uso extensivo de los métodos de fluorescencia en investigación química y bioquímica se basa en la inherente sensibilidad de esta técnica y la escala favorable de tiempo del fenómeno de fluorescencia. Todos los procesos que ocurren con una frecuencia igual o mayor que la inversa del intervalo de tiempo entre la absorción y emisión de la radiación son potencialmente capaces de alterar las características espectrales del compuesto fluorescente bajo observación. La emisión de fluorescencia se produce alrededor de 10^{-8} segundos (10 nseg) después de la absorción de luz. Varios procesos moleculares ocurren durante ese período: difusión o transporte de pequeñas moléculas a través de una distancia de varios nanómetros, movimientos rotacionales de proteínas y/o sus residuos internos, reacciones de transferencia de protones, reorientaciones dipolares en el estado excitado y otros (Lakowicz, 1983). Los parámetros característicos de fluorescencia, por lo tanto, son de gran utilidad ya que son capaces de revelar aspectos dinámicos de los sistemas biológicos, en particular en el estudio de proteínas y su interacción con otras macromoléculas.

La demostración de la disociación requiere la observación de concentraciones de proteínas del orden de 10-1000 veces la constante de disociación a presión atmosférica, lo cual corresponde generalmente a concentraciones del orden de micromolar. Este rango de diluciones puede ser estudiado convenientemente utilizando métodos ópticos de análisis, algunos de los cuales se detallan a continuación.

Introducción

La observación de cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia (rendimiento cuántico) y distribución de energías (número de onda promedio o centro de masa) son métodos de gran sensibilidad, y han sido utilizados para demostrar cambios en el estado de agregación promovidos por efecto de perturbaciones hidrostáticas. La absorción y fluorescencia de moléculas orgánicas en solución consiste usualmente en bandas aproximadamente gaussianas con anchos medios de 500-2000 cm^{-1} . El espectro de fluorescencia puede ser caracterizado por el centro de masa de la emisión:

$$j_g = \frac{\sum F_i j_i}{\sum F_i} \quad [1.7]$$

donde F_i es la intensidad del fotón emitido al número de onda j_i . Habitualmente se puede medir j_g con una precisión de $\pm 20-30 \text{ cm}^{-1}$. La utilidad de j_g proviene del hecho que los desplazamientos del espectro de fluorescencia son el resultado de cambios en la interacción del fluoróforo con el entorno y, por lo tanto están sujetos a la conservación de la energía: la energía ganada en la interacción molecular iguala a la pérdida de energía del estado excitado, de modo que la magnitud del desplazamiento espectral observado da una idea de la extensión, y a veces el carácter, de los cambios en el entorno del fluoróforo (Weber, 1987; MacGregor & Weber, 1986). Los residuos triptofano presentes en las interfase entre subunidades de las proteínas oligoméricas son a menudo expuestos a un entorno con mayor polaridad (el solvente) como producto de la disociación, con un desplazamiento hacia el rojo de la emisión entre 300-1000 cm^{-1} en los diferentes casos.

Introducción

Los cambios en la dispersión de la luz y la polarización de fluorescencia de un fluoróforo unido covalentemente a una macromolécula, permiten registrar cambios promedio en el volumen de las partículas responsables de la emisión, de donde se puede deducir en forma directa el grado de disociación del sistema. La dispersión de la luz es particularmente útil para seguir la disociación de un agregado de gran tamaño en pequeñas subunidades (Heremans, 1982).

La polarización de fluorescencia de un fluoróforo que forma parte de la macromolécula (ya sea triptofano o un grupo extrínseco unido covalentemente) por su parte, es más útil cuando el agregado y el oligómero difieren en un factor de 2 o 4, es decir dímeros (Paladini & Weber, 1981b; Silva *et al.*, 1986; Royer *et al.*, 1986; Ruan & Weber, 1988; Verjoski-Almeida *et al.* 1986) y tetrámeros (King & Weber, 1986; Ruan & Weber, 1989). Los cambios en la polarización de fluorescencia reflejan, en general, cambios en la velocidad rotacional del fluoróforo. Para el caso de rotaciones libres con simetría esférica (Weber, 1952):

$$1/p - 1/3 = (1/p_0 - 1/3)(1 + 3\tau/P) \quad \cdot [1.8]$$

donde p es la polarización observada, p_0 es la polarización en la ausencia de movimiento, P es el tiempo de relajación rotacional y τ el tiempo de vida media.

Varios procesos dinámicos contribuyen a la polarización de estado estacionario. Luego de la disociación de oligómeros en subunidades, los movimientos rotacionales de toda la proteína y la libertad de rotación del fluoróforo unido covalentemente, están menos restringidas estéricamente. Esta mayor libertad de

movimiento causa una disminución en la anisotropía, siempre que el cromóforo tenga un tiempo de vida media suficientemente largo como para distinguir entre el tamaño de las partículas involucradas (ver Materiales y Métodos). El ácido 1-dimetilamino-5-sulfónico y su isómero 2:5, con vidas medias de 14 ns y 28 ns respectivamente, son frecuentemente utilizados para los experimentos de polarización de estados estacionario.

Los residuos triptofano (principales responsables de la fluorescencia intrínseca en las proteínas) tienen una vida media de aproximadamente 2-4 ns, demasiado corta en comparación con el tiempo de relajación rotacional de la macromolécula; en consecuencia no se produce apreciable movimiento de la macromolécula como un todo durante la vida del estado excitado. Sin embargo puede ocurrir despolarización de la fluorescencia, debido a cambios en la movilidad local de dichos residuos, ocasionados indirectamente por la eliminación de restricciones luego de producida la disociación.

1.3.2 USO DE TRANSFERENCIA DE ENERGIA DE EXCITACION ELECTRONICA PARA EL ESTUDIO DE AGREGADOS MOLECULARES

Uno de los mecanismos de desactivación no radiativa del estado excitado es la transferencia de energía desde la molécula fluorescente en el estado excitado a un aceptor de energía apropiado en el estado fundamental, en un rango de distancias de 15 a 70 Å. Si la segunda molécula también es fluorescente, la energía transferida puede ser emitida como fluorescencia característica del aceptor. Las distancias involucradas, si bien son comparables con las dimensiones de varias macromoléculas biológicas, son re-

Introducción

lativamente pequeñas relativas a la longitud de onda de la radiación (generalmente entre 3000 a 6000 Å). Forster (Forster, 1949) desarrolló una teoría cuantitativa considerando que el proceso de transferencia se produce a través de un acoplamiento directo entre los dipolos de emisión del dador y el dipolo de absorción del aceptor. Utilizando este mecanismo, calculó la velocidad del proceso de transferencia no radiativa como:

$$k_t = 1/\tau(8,79 \cdot 10^{-5}) \chi^2 \cdot n^{-4} \cdot \phi_D \cdot J_{DA} \cdot r^{-6} \quad [1.9]$$

donde τ y ϕ_D son, respectivamente, la vida media del estado excitado y el rendimiento cuántico del dador; n es el índice de refracción de la luz visible en el medio donde el proceso tiene lugar y R es la distancia en Å entre el dador y aceptor. χ^2 , el factor de orientación es definido como:

$$\chi^2 = (\cos\theta_{DA} - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 = (\sin\theta_D\sin\theta_A\cos\theta - 2\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \quad [1.10]$$

Los ángulos involucrados se muestran en la figura 3. J_{DA} , la integral de solapamiento espectral queda definida como:

$$J_{DA} = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \left[\int f_D(\lambda) d\lambda \right] \quad [1.11]$$

donde $f_D(\lambda)$ es espectro de emisión corregido del dador en cuantos por unidad de intervalo de longitud de onda; $\epsilon_A(\lambda)$ es el coeficiente de extinción molar del aceptor en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; λ es la longitud de onda en nanómetros.

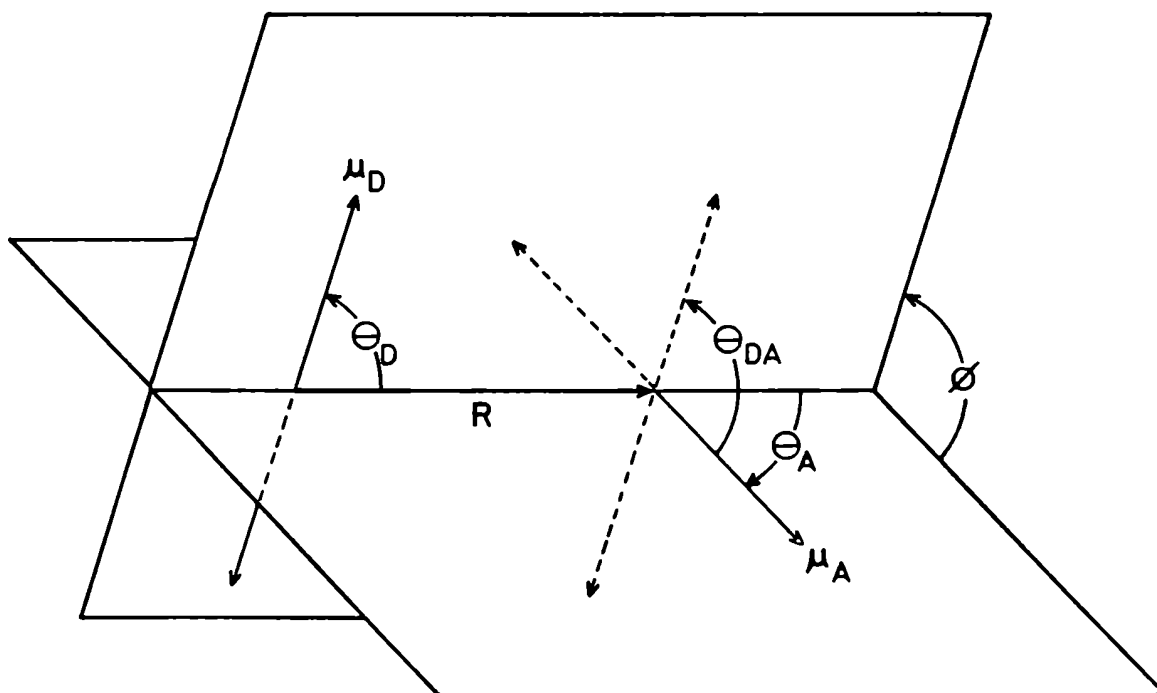


Figura 3: diagrama que muestra los ángulos usados en la definición de χ^2 . μ_D es el vector dipolo de emisión del dador; μ_A es el vector dipolo de absorción del aceptor. R es el vector formado por la unión de los centros de ambos cromóforos.

Introducción

Resulta conveniente abreviar la ecuación [1.9] como:

$$k_t = 1/\tau(R_0/R)^6 \quad [1.12]$$

donde $R_0^6 = (8,79 \cdot 10^{-5}) \chi^2 n^{-4} \rho_D J_D A$

R_0^6 recibe el nombre de "distancia crítica de Forster". Representa la distancia a la cual la velocidad de transferencia de energía no radiativa (k_t) iguala a la suma de las velocidades de todos los otros modos de desactivación del primer estado excitado del dador (Σk_i):

$$k_t = k_f + \Sigma k_i \text{ cuando } R = R_0 \quad [1.13]$$

siendo k_f la constante de velocidad de emisión de fluorescencia.

R_0^6 está relacionada con las propiedades espectrales del dador y aceptor a través de los factores $n^{-4} \rho_D J_D A$, y a la orientación relativa de los dipolos de emisión del dador y el dipolo de absorción del aceptor, a través de χ^2 . χ^2 , que puede variar entre 0 y 4 no es fácilmente determinable experimentalmente.

La transferencia de energía no radiativa ha sido utilizada como herramienta en la investigación de la organización de complejos biomoleculares, obteniendo información acerca de distancias entre cromóforos (extrínsecos e intrínsecos) de proteínas y ácidos nucleicos y cambios en la conformación producidos por desnaturalización o unión de sustratos (Stryer, 1978).

La elección del par dador aceptor debe hacerse en base a las propiedades espectroscópicas de los compuestos. La primera consideración deriva de la dependencia funcional de la eficiencia E respecto de la distancia, R , entre dador y aceptor:

Introducción

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad [1.14]$$

Para un dado par de compuestos, E es una función sensible de R solo cuando el rango de distancias entre fluoróforos es $0.5 R_0 < R < 1.9 R_0$. Las medidas más sensibles se realizan cuando R_0 iguala la distancia a medir. Los factores que determinan R_0 están indicados en la ecuación [1.9]. Examinando esta ecuación, se puede ver que R_0 aumenta cuanto mayores son ϵ_D y J_{DA} . Para hacer máximo este último se debe elegir un par en donde se cumplen las siguientes condiciones: (i) que exista una buena superposición entre el espectro de emisión del dador y el espectro de absorción del aceptor, (ii) que el aceptor tenga un coeficiente de extinción grande y (iii) que la región de superposición se encuentre en la región de menor energía del espectro (mayores λ).

Las siguientes consideraciones derivan de la optimización experimental de las condiciones para monitorear la transferencia de energía no radiativa: se deben elegir pares de donador-aceptor en los cuales los espectros de emisión de ambos fluoróforos están bien resueltos, de tal modo que la emisión del dador no contamine en lo posible la emisión producida por el aceptor como resultado de la transferencia. Adicionalmente, es conveniente que el ϵ_{\max} del dador se encuentre en la región de un mínimo relativo de $\epsilon(\lambda)$ del aceptor. A la longitud de onda de excitación λ_{exc} , la relación $\epsilon_A(\lambda_{exc})/\epsilon_D(\lambda_{exc})$, debe ser mínima para obtener máxima sensibilidad de la técnica.

La posibilidad de producir la disociación entre subunidades por aplicación de altas presiones permite la formación de moléculas híbridas en las que distintas subunidades están marcadas con un fluoróforo diferente. Como la transferencia de energía elec-

Introducción

trónica de excitación requiere de la proximidad física de los fluoróforos, si se elige un par apropiado, con el espectro de emisión del dador superpuesto con el espectro de excitación del aceptor, la reasociación de un oligómero híbrido en sus componentes debe producir la aparición de fluorescencia del aceptor, originada en la excitación a través de la interacción dipolo-dipolo con el dador (*sensitized fluorescence*). Este es un fenómeno de tipo "todo o nada", ya que solamente aquellas subunidades que han sido disociadas y se han reasociado formando parte de un oligómero híbrido, pueden transferir energía. Esta propiedad permite distinguir entre las moléculas que han sido disociadas, de aquellas que no han sido afectadas por la perturbación hidrostática.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 PREPARACION DE MUESTRAS

2.1.1 BUFFER

El buffer utilizado a lo largo de este estudio fue Tris hidroximetilamino metano (Tris; Sigma), debido a la baja dependencia de su pK respecto de la presión hidrostática (Zipp & Kauzmann, 1973). Las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de cada experimento, en agua deionizada y purificada por pasaje a través de sistema Millipore ($R < 18 \text{ M}\Omega$).

La adición de ditiotreitól en las soluciones *buffer*, en los casos en que se señala, se hizo con el propósito de evitar el agregado inespecífico de subunidades disociadas a través de puentes disulfuro.

2.1.2 PROTEINAS

Se utilizaron las siguientes preparaciones comerciales:

<u>Enzima</u>	<u>Fuente</u>
Lactato deshidrogenasa (corazón porcino)	Boehringer
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (levadura)	Boehringer
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (m. conejo)	Sigma
Hexoquinasa (levadura)	Boehringer
Enolasa (levadura)	Calbiochem

2.1.3 DETERMINACION DE CONCENTRACIONES ENZIMATICAS

Las concentraciones de proteínas se midieron utilizando el método de Lowry *et al* (1951), o por espectrofotometría, utilizando los siguientes coeficientes de extinción (280 nm):

Materiales y Métodos

LDH	1.4 cm ² /mg	Jaenicke <i>et al.</i> , 1968
GAPDH (sn 0.1%)	0.89	Kirschner y Voigt, 1968
Hexoquinasa (sn 0.1%)	8.85	Colowick, 1973
Enolasa	80600M ⁻¹ cm ⁻¹	Paladini y Weber, 1981

2.1.4 DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

2.1.4.1 Lactato deshidrogenasa

El ensayo de actividad se basa en la reducción de piruvato a lactato (Eventoff *et al.*, 1974). La velocidad de reacción fue determinada a través de la disminución de absorbancia del NADH a 340 nm. El ensayo se realizó a temperatura ambiente (aprox 22°C). La mezcla de reacción se preparó disolviendo 1.7 mg de piruvato de sodio y 6 mg de NADH en 50 ml de buffer fosfato de sodio (50mM) pH= 7.2. La concentración final de piruvato y NADH fue 0.3 mM y 0.15 mM respectivamente. En un experimento típico 2 ml de esta solución se colocaron en una cuveta de 1. cm de paso óptico. Inmediatamente se agregaron 10-20 µl de una solución diluida de enzima y se determinó la disminución de absorbancia a 340 nm.

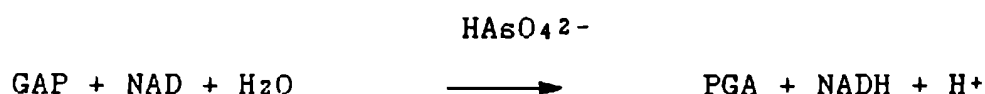
2.1.4.2 Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

Reacción que cataliza:



Materiales y Métodos

El uso de arsenato en lugar de fosfato da como resultado la formación de 1-arseno-3-fosfoglicerato, que es rápidamente hidrolizado de forma no enzimática a 3-fosfoglicerato, haciendo la reacción total irreversible.



La medición de la actividad enzimática de la GAPDH se basa en el incremento de absorbancia a 340 nm, correspondiente a la formación de NADH a partir de NAD (Velick, 1974). La reacción se realizó a temperatura ambiente en una cuveta de 1 cm de paso óptico, conteniendo: 50 mM de buffer pirofosfato, pH=8.5, 2.7 ml; 15 mM NAD, 50 μ l; 15 mM D-gliceraldehído-3-fosfato, 50 μ l, 0.3 M arsenato de sodio, 50 μ l y 100 μ l de enzima. La reacción se inició por adición de arsenato y se registró el incremento en la absorbancia de la densidad óptica a 340 nm durante los primeros cinco minutos.

2.1.4.3 Hexoquinasa



La actividad enzimática de la hexoquinasa fue determinada espectrofotométricamente en presencia de un indicador ácido-base (rojo cresol), cuyo pKa (8.25) es idéntico al del buffer utilizado (glicil-glicina) (Darrow y Colowick, 1974). La cantidad de ácido producido en la reacción es equivalente a la cantidad de buffer

Materiales y Métodos

básico neutralizado, que a su vez es proporcional a la cantidad de indicador básico neutralizado. Leyendo a una longitud de onda donde sólo la forma básica del indicador absorbe, el descenso en densidad óptica es una medida cuantitativa del ácido producido (o fosfato transferido). El procedimiento consiste en agregar a una solución conteniendo 2.5 ml de solución stock (0.006% de rojo cresol, 1.6% $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$; 0.1 M ATP; 0.1 M NaOH; 0.1 M glicilglicina-NaOH, pH 9.0) y 0.4 ml de una solución 0.2 M de glucosa, 100 μl de enzima y medir la velocidad de cambio en la densidad óptica a 560 nm.

2.1.5 MARCACION DE PROTEINAS Y DETERMINACION DE LA RELACION DE SUSTITUCION

2.1.5.1

a) Reactivo: Isotiocianato de 5-fluoresceína (isómero I) (FLUKA)

b) Procedimiento: típicamente los conjugados de fluoresceína fueron preparados disolviendo 5 mg del isotiocianato en 1 ml de dimetilformamida (DMF) anhidra y agregando un exceso molar de 10:1 del reactivo disuelto a una solución 10^{-5} M de proteína en buffer carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,2. La concentración de dimetilformamida en la mezcla de reacción en ningún caso resultó mayor de 1.5%. Luego de 5-12 horas de reacción, el exceso de fluoróforo que no reaccionó se eliminó por cromatografía en una columna de Sephadex G-25 fine (Pharmacia). El conjugado fluoresceína-proteína fue ulteriormente dializado a 4°C por varias horas, realizando varios cambios contra el buffer correspondiente a cada proteína. La concentración de fluoróforo unido covalentemente se determinó usando los coeficientes de extinción molar de 42500 y 22500 a 490 nm y 280 nm respectivamente (Gennis *et al.*, 1972).

2.1.5.2

a) Reactivo: 7-dimetilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina (Molecular Probes).

Materiales y Métodos

b) Procedimiento: se utilizó el mismo protocolo que para la marcación con fluoresceína. La concentración de fluoróforo conjugado se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar de 29000 ($\lambda=383$ nm).

2.1.5.3

a) Reactivo: ácido 2'(N,N-dimetil)amino-6-naftoil-4-*trans*-ciclohexanoico (DANCA). Sintetizado por F. Farris y G. Weber (Biochemistry Department, University of Illinois, no publicado). La activación del grupo carboxilo se realizó formando el anhídrido sulfúrico mixto (Hudson, 1970): 0.3 mmoles de DANCA se mezclaron con 2.7 mmoles de DMF-SO₃ (FLUKA) y 3 mmoles de trietilamina, bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 30 minutos. El anhídrido mixto así formado es estable por varios meses guardado en un desecador a -20°C.

b) Procedimiento: Una alícuota del anhídrido mixto se diluyó por un factor 50-100 en buffer fosfato 0.1 M, pH 8.0. Un exceso de un orden de magnitud (en mol) de esta solución diluída se agregó a una solución de proteína (1-10 mg/ml) a 4°C y se dejó reaccionar 30-60 minutos. Pasado ese tiempo la mezcla de reacción se sembró en una minicolumna Dowex 2x8 (200-400 mesh), la cual retiene el colorante que no reaccionó o que ha sido hidrolizado, pero no a la proteína conjugada. La concentración de fluoróforo unido se determinó espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción molar de 14000 a 360 nm (MacGregor y Weber, 1986).

Materiales y Métodos

2.1.5.4

a) Reactivo: Cloruro de 2-dietilaminonaftaleno-5-sulfónico (2,5-DENS). Fue preparado a partir de la sal de sodio del ácido correspondiente por reacción con PCl_5 . Un gramo del sulfonato se mezcló con igual peso de PCl_5 en un mortero, calentado moderadamente con un manto calefactor. Luego de 15-20 minutos se agregó agua, se dejó hidrolizar el PCl_5 por otros 15 minutos y se filtró. Se recristalizó con etanol y se guardó a -20°C en un desecador.

b) Procedimiento: Se agregaron 20 μl de una solución de reactivo disuelto en acetona a 1 ml de enzima (5-10 mg/ml) con constante agitación a 4°C . La reacción se dejó continuar en cámara fría por 10-14 hs. Posteriormente el exceso de fluoróforo que no reaccionó se eliminó por cromatografía en columna de Sephadex G-25. A continuación la proteína marcada fue dializada a 4°C como se indicó previamente. La determinación de la relación de sustitución se realizó utilizando el coeficiente de extinción molar de $2090 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el fluoróforo. La concentración de proteína en este caso se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951) ya que la alta absorbancia del fluoróforo a 280 nm hace inaceptable la determinación directa de absorbancia a esa longitud de onda.

2.1.5.5

a) Reactivo: cloruro de 1-metoxinaftaleno-4-sulfónico: fue preparado de igual forma que el cloruro de 2,5-DENS.

Materiales y Métodos

b) Procedimiento: Se utilizó un protocolo idéntico al descrito precedentemente para el 2,5-DENS.

En todos los casos se determinó que las proteínas marcadas conservaron por lo menos 90% de la actividad enzimática original, medida según los métodos descritos en la sección precedente.

2.2. INSTRUMENTACION

2.2.1 BOMBA DE ALTA PRESION

La bomba utilizada para los experimentos a alta presión fue diseñada por Paladini (1981). Está construida con un acero llamado Vascomax 300. El cuerpo de la bomba es cilíndrico y contiene una entrada superior, a través de la cual se presuriza, y tres o cuatro ventanas laterales. Una de las ventanas es utilizada para transmitir la luz de excitación, mientras que las otras dos, perpendiculares a la primera transmiten la luz de emisión. Las ventanas son de cuarzo fundido y presentan las siguientes características: T19 suprasil; birrefringencia: 5nm/cm, prácticamente no fluorescentes y ópticamente planas, con las siguientes dimensiones: diámetro: 0.5 ± 0.05 pulgadas, espesor: 0.30 ± 0.05 pulgadas. En el interior de la celda se coloca una cuveta cilíndrica de cuarzo fundido de 1 ml de volumen y 10 mm de diámetro. La celda se apoya sobre una base de bronce que evita movimientos de la cuveta respecto de las ventanas. La tapa de la cuveta es un tubo de polietileno, con uno de sus extremos sellado por calor. El propósito de este tubo es permitir la equilibración de la presión entre el medio hidrostático (etanol) y la muestra dentro de la cuveta, previniendo al mismo tiempo la mezcla de los mismos. En las figuras 4 y 5 se observan fotografías de los elementos descriptos.

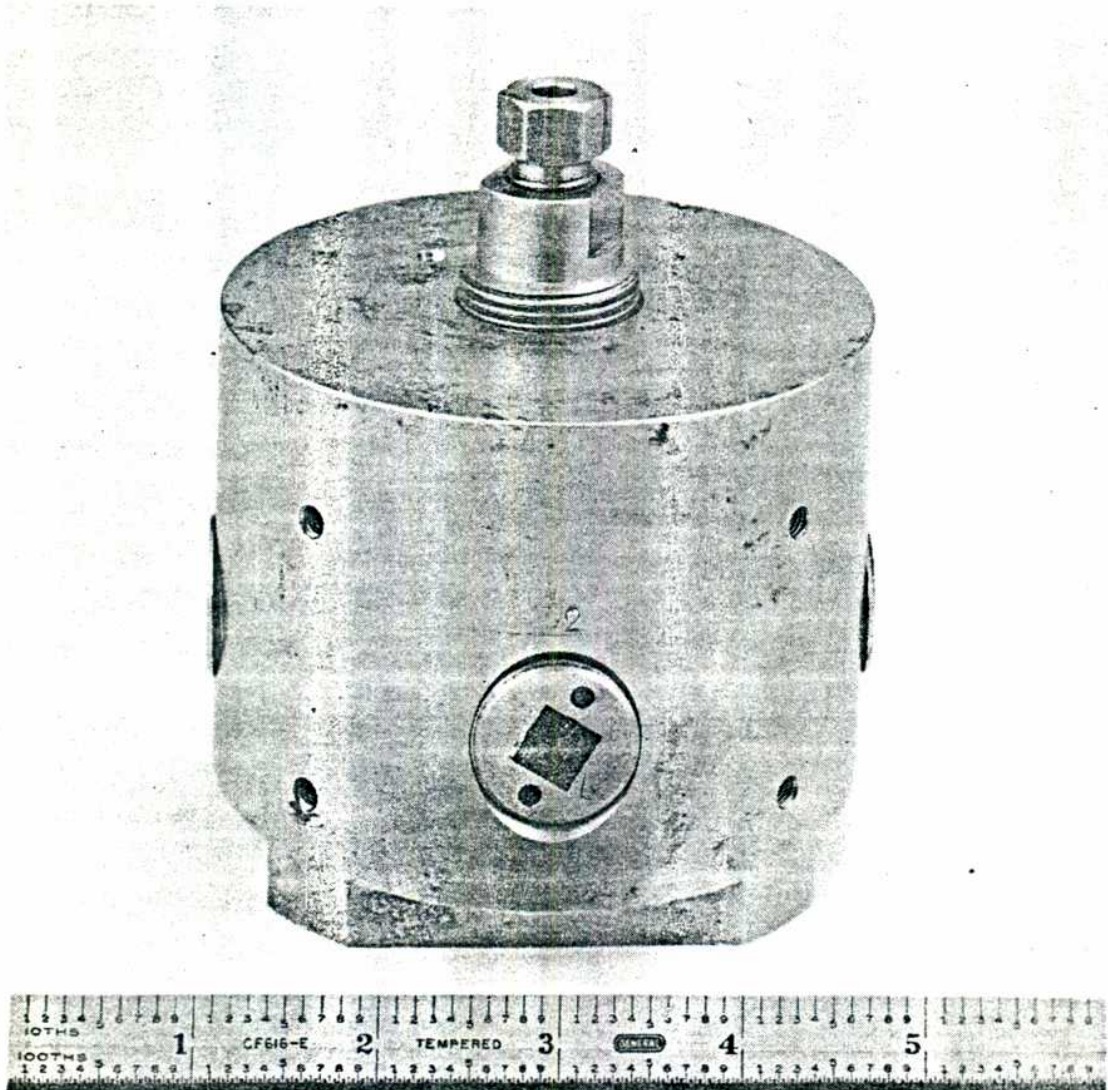


Figura 4: Vista lateral de la bomba de alta presión. La presión es aplicada a través de la entrada superior (Paladini, 1981).

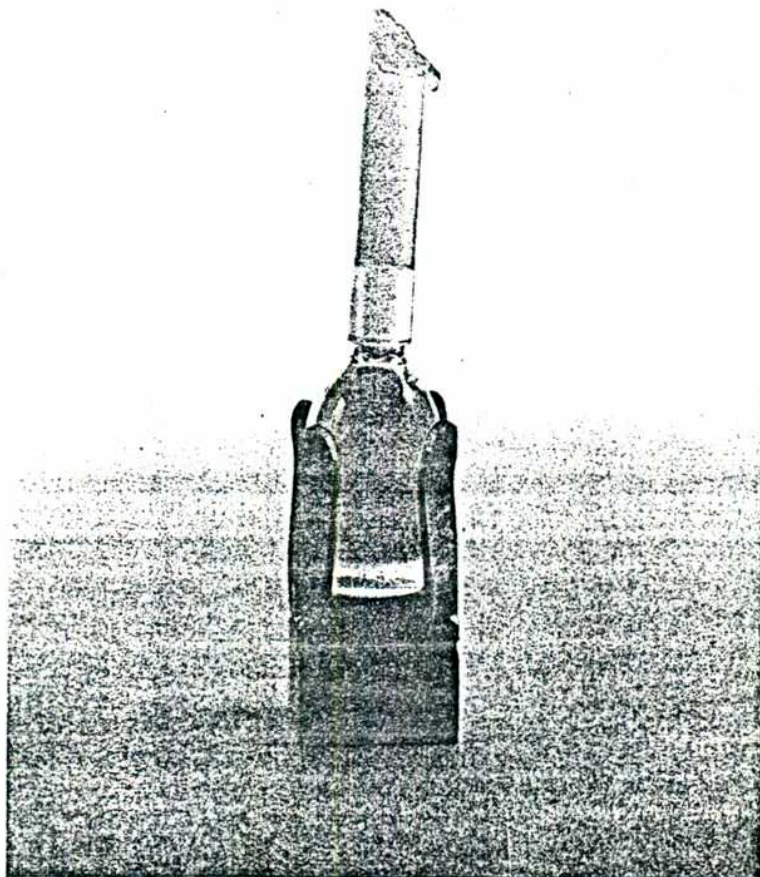


Figura 5: Cuveta cilíndrica de cuarzo y base de bronce. La tapa de la cuveta es un tubo de polietileno, con uno de sus extremos sellado por calor (Paladini, 1981).

El etanol que rodea la cuveta es transparente en todo el rango de longitudes de onda utilizadas y su uso tiene la ventaja de hacer desaparecer las superficies curvas de la cuveta cilíndrica debido a la proximidad entre los respectivos índices de refracción. Una descripción más detallada de la instrumentación se puede hallar en la literatura (Paladini, 1986).

Para la compresión se utilizó una bomba de pistón, operada manualmente, fabricada por High Pressure Equipment Company (Erie, PA). La medición de los niveles de presión se realizó con un manómetro Heise Burdon.

La temperatura del sistema fue regulada introduciendo la cámara de presión dentro de una camisa de bronce por donde se hizo circular un fluido refrigerado (metanol), a través de un baño termostático.

2.2.2 POLARIZACION

Los experimentos de polarización de fluorescencia bajo presión se realizaron utilizando formato L (Paladini y Weber 1981a). Se determinó la relación entre los componentes paralelo y perpendicular de la emisión, cuando la muestra fue excitada con luz verticalmente polarizada ($S_{\parallel V}/S_{\perp V}$), y se calculó la polarización aparente utilizando la siguiente ecuación:

$$p_L = (S_{\parallel V}/S_{\perp V}) - 1 / (S_{\parallel V}/S_{\perp V}) + 1 \quad [2.1]$$

EL valor calculado fue corregido para compensar la birrefringencia de las ventanas de cuarzo de la bomba de presión, la cual es inducida por la presión hidrostática (Paladini y Weber,

Materiales y Métodos

1981a). Los datos fueron analizados usando el programa provisto por ISS (Champaign, Illinois; USA).

2.2.3 EMISION DE FLUORESCENCIA

Los espectros de emisión fueron obtenidos en un espectrofluorómetro Hitachi (Mod. F-3010), conectado a una computadora externa IBM PC-AT.

Algunos espectros de emisión fueron adquiridos en un espectrofluorómetro SLM 4800 (SLM-AMINCO; Urbana, Il.; USA), que posee accesorio de comunicación para transmisión de datos a una computadora externa Hewlett-Packard 9825.

Para experimentos de cinética se utilizó como fuente de excitación una lámpara de arco de Mercurio-Xenon (Ushio, Japón) y la emisión fue analizada con un OSMA (Optical Spectrometric Multichannel Analyzer mod. ST-120; Princeton Instruments, Inc.). Este instrumento consiste básicamente en un detector multicanal controlado por computadora, lo que permite adquirir espectros completos en tiempos muy cortos (desde 15 segundos) con altas velocidades de adquisición.

Los espectros fueron cuantificados por especificación del centro de masa:

$$j_p = \sum j_i F_i / \sum F_i \quad [1] \quad [2.2]$$

donde F_i es la fluorescencia emitida en el número de onda j_i y la sumatoria es realizada en todo el rango del espectro que posee valores apreciables de F .

2.2.4 VIDAS MEDIAS

Las determinaciones de vidas medias se efectuaron con un fluorómetro de multifrecuencia de fase y modulación SLM 48000, controlado por una computadora JAMECO PC-Turbo XT. Como fuente de excitación se utilizó un Laser Ion Argon Spectra-Physics modelo 2020 (363.8 nm), cuya emisión fue modulada por una celda Pockels para obtener un rango de frecuencias entre 5 y 150 MHz. La emisión fue observada a través de un filtro Corning 3-68 (λ mayores de 500 nm). Como referencia se utilizó una solución acuosa de glucógeno de hígado de conejo, como dispersante elástico (*scatterer*) ($\tau=0.0$ ns), o alternativamente usando POPOP como standard de vida media perfectamente conocida (1.35 ns).

El método consiste en la determinación de la diferencia de fase y demodulación relativa de la luz emitida por la muestra, respecto de la excitación, cuando la muestra es excitada con luz cuya intensidad es modulada sinusoidalmente a diferentes frecuencias (Gratton y Limkeman, 1983). Debido al tiempo de vida finito del estado excitado, la fase de la emisión modulada del fluoróforo es retrasada respecto de la excitación en un ángulo ϕ . Más aún, la emisión es menos modulada (demodulada), relativa a la excitación. La diferencia en el ángulo de fase ϕ y el factor de demodulación M son medidos a diferentes frecuencias. A partir de estos datos experimentales se calculan las vidas medias de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\tan[\phi] = \omega\tau\phi \quad [2.3]$$

Materiales y Métodos

$$M = [1+(\omega\tau M)^2]^{1/2} \quad [2.4]$$

donde ω es la frecuencia angular de modulación.

Los valores de fase y modulación medidos fueron analizados asumiendo una suma de exponenciales o bien por un método alternativo que involucra el uso de modelos de distribución continua (Alcala *et al.*, 1987). En ambos casos la calidad del ajuste (*fit*) fue juzgado a través del valor de χ -cuadrado (χ^2), definido como

$$\chi^2 = \Sigma\{[(\vartheta_c - \vartheta_m)/\sigma_\vartheta]^2 + [(M_c - M_m)/\sigma_M]^2\}/(2n - f - 1) \quad [2.5]$$

La suma se lleva a cabo sobre los valores medidos a n frecuencias de modulación y f es el número de grados de libertad. Los símbolos ϑ y M corresponden a los valores de diferencia de fase y demodulación relativa respectivamente, mientras que los subíndices c y m indican los valores calculados y medidos. σ_ϑ y σ_M son, los respectivos errores experimentales. El error experimental estimado, usado en los análisis fue tomado como 0.5° en la fase y 0.005 en la modulación, sobre la base de la desviación standard de valores promedios para fase y modulación a cada frecuencia.

2.2.5 CALIBRACION DE MONOCROMADORES Y ANALIZADOR MULTICANAL.

La calibración de monocromadores de emisión y excitación en espectrofluorómetros (Miller, 1981; Mielenz, 1983) es un método de rutina en los que se utiliza una lámpara de mercurio, cuyo espectro de emisión posee líneas muy bien definidas. Normalmente se utilizan una o varias líneas de emisión de este elemento. La técnica, sin embargo presenta algunas dificultades prácticas: se deben esperar 45 minutos hasta que la lámpara alcance la temperatura de trabajo, la geometría del compartimento de muestras debe ser modificada, se requieren cuidados extremos en la manipulación de la lámpara debido a su fragilidad, su costo es alto y se necesita experiencia en la interpretación del espectro ya que muchas de las líneas están muy próximas entre sí.

En las primeras etapas del trabajo se desarrolló un método alternativo que se basa en intercalar un filtro de holmio o didymio entre un fluoróforo apropiado y el monocromador de emisión. Los filtros mencionados son usualmente empleados para evaluar el estado de calibración de la longitud de onda en monocromadores de espectrofotómetros (ASTM Standards, 1983; McNeirmey & Slavin, 1962) y son accesorios comunes de dichos instrumentos.

El método de calibración se basa en el aprovechamiento de las características bandas de absorción de los filtros de vidrio, las cuales modifican la fluorescencia emitida por un fluoróforo.

Se han propuesto tres protocolos diferentes para la realización de la calibración y una alternativa al uso de filtros que consiste en el aprovechamiento de la estructura fina del espectro de absorción del benceno en fase vapor (Paladini & Erijman, 1988).

Materiales y Métodos

TABLA II: RANGOS DE EMISION DE LOS DIFERENTES FLUOROFOROS UTILIZADOS Y BANDAS DE ABSORCION DE LOS FILTROS DE HOLMIO Y DIDIMIO

Fluoróforo/solvente	excitacion (nm)	emisión (nm)	holmio ^a (nm)	didimio ^b (nm)
Xileno/ciclohexano	275.0	275.0-320.0	279.4 287.5	
Indol/etanol	295.0	300.0-400.0	333.7 360.9 385.9	
DPH/ciclohexano	375.0	380.0-550.0	418.7 445.8 ^c 453.2 460.0 536.2	
Rodamina 6G/etanol	515.0	520.0-650.0	536.2 637.5	572.5 585.3

^a McNeirney & Slavin, 1962

^b Obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240

^c Esta banda no es usada como standard de calibración, por lo tanto el valor indicado fue obtenido con el espectrofotómetro Shimadzu UV-240 y se aplica únicamente a nuestro filtro de holmio.

Materiales y Métodos

Para el método de calibración de monocromadores de espectrofluorómetros se utilizaron una serie de compuestos fluorescentes con alto rendimiento cuántico, de uso común en laboratorio, seleccionados de manera tal que las respectivas emisiones cubrieran diferentes secciones del rango de longitudes de onda de absorción de los filtros de holmio y didimio (tabla II). Los fluoróforos utilizados fueron rodamina 6G, difenilhexatrieno (DPH), indol y xileno. Como solventes se utilizaron etanol, ciclohexano y benceno.

La rodamina 6G y el indol fueron disueltos en etanol; DPH y xileno se disolvieron en ciclohexano. Las concentraciones de estas soluciones fueron ajustadas de manera que la absorbancia resultara inferior a 0.05 a las respectivas longitudes de onda de excitación.

Las soluciones de fluoróforos se colocaron en el compartimiento de muestras y se seleccionó en cada caso la longitud de onda de excitación apropiada. No se buscaron condiciones particulares respecto de la apertura de ranura (o de selección de ancho de banda), más que la del compromiso entre el uso de la menor apertura posible capaz de permitir la obtención de una razonable relación entre señal y ruido, y la resolución de longitudes de onda requerida en la calibración. Se utilizó una apertura de 1.0 nm, con la colección de datos cada 0.5 nm.

Se adquirió en esas condiciones el espectro de emisión de fluorescencia del fluoróforo, y sin modificar la disposición del instrumento se adquirió un segundo espectro, esta vez con el filtro de holmio, o didimio intercalado entre la muestra y el monocromador de emisión. En este caso se produjeron deformaciones en la emisión de aquél debido a las bandas de absorción características del filtro (figura 6).

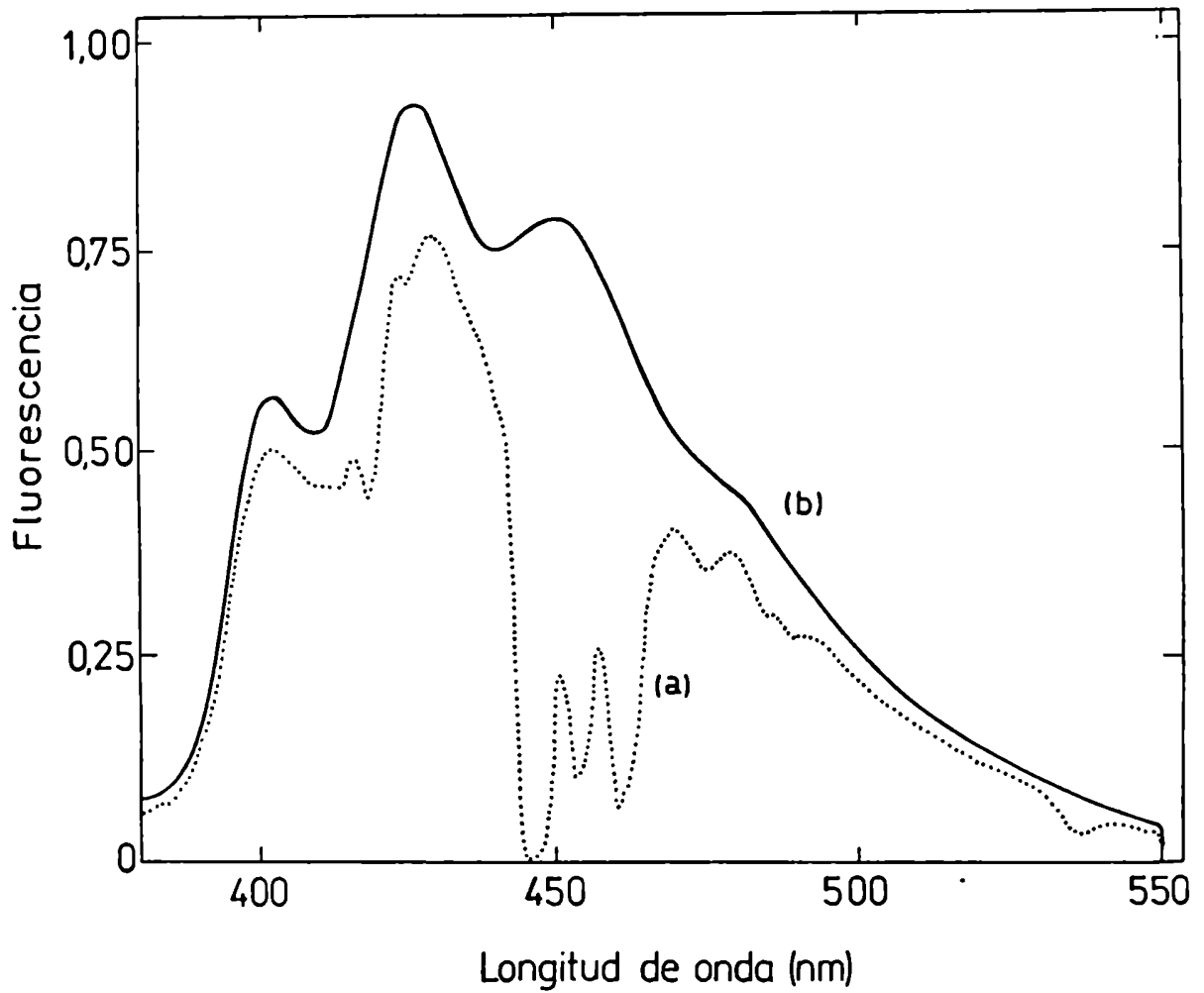


Figura 6: Espectro de emisión corregido de DPH en ciclohexano (0.025g/l) (a) con y (b) sin el filtro de óxido de holmio insertado entre la muestra y el monocromador de emisión. $\lambda_{exc} = 375$ nm.

Materiales y Métodos

El número de valles producidos depende del grado de superposición en las longitudes de onda de la luz emitida por el fluoróforo y la localización de las bandas de absorción del filtro utilizado.

Estos dos espectros, luego del suavizado de las curvas, en los casos en que fue necesario, fueron divididos y, a continuación, se tomó el logaritmo del cociente. El resultado fue un nuevo espectro representativo de la absorción del filtro intercalado, en el intervalo de longitudes de onda en que fueron adquiridos los espectros.

La comparación de las posiciones de las bandas obtenidas con las descritas en la literatura para el filtro utilizado (ASTM Standards, 1983) permitió evaluar la calibración y linealidad de la longitud de onda del monocromador. El uso de DPH en ciclohexano permitió la resolución de varias bandas de absorción del filtro de holmio en la región de 380 a 550 nm (figura 6).

La utilización de un solo fluoróforo no permitió una calibración adecuada para una región mayor de 100 nm. Por esa razón se utilizaron cuatro fluoróforos diferentes para cubrir la mayoría de las bandas de absorción de los filtros de holmio y didimio (de 275 nm a 650 nm).

El uso de cuatro fluoróforos implica, básicamente, la repetición del mismo protocolo cuatro veces. En este caso se requirió la aplicación de un programa de computación, que se desarrolló, para la computadora HP 9825 (en lenguaje HP Basic), el cual realiza automáticamente las operaciones de división, toma de logaritmo, solapamiento de los espectros obtenidos en cada intervalo de longitudes de onda y determinación automática de los máximos de absorción.

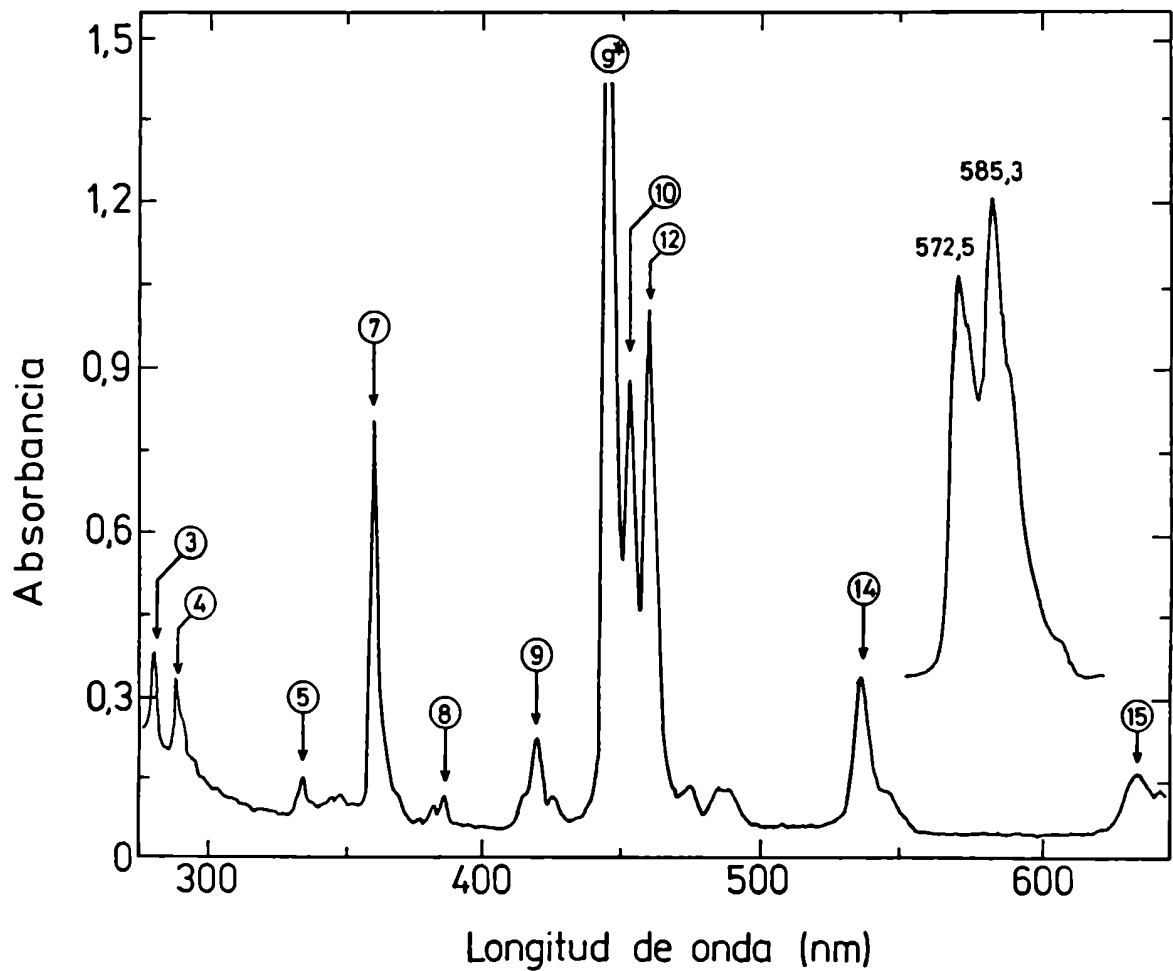


Figura 7: Espectro de absorción del filtro de óxido de holmio. Las longitudes de onda de excitación para cada uno de los fluoróforos están dadas en la tabla II. Los números de identificación de las bandas son los indicados por los standards de ASTM (1983). Se incluye una región correspondiente a las bandas de absorción del filtro de didimio (572.5 nm y 583.5 nm).

Materiales y Métodos

La ganancia electrónica y otras condiciones instrumentales fueron modificadas para optimizar los espectros obtenidos con cada fluoróforo. Como resultado se obtuvieron ocho espectros, que fueron procesados como se indicó, para producir las bandas de absorción de los filtros estudiados (figura 7). La comparación con los valores de literatura para los dos filtros se muestra en la tabla III. De acuerdo a estos resultados el cálculo del error standard en la calibración del monocromador de emisión fue de ± 0.1 nm. En ambos casos se otorgó igual peso a todas las bandas, por lo cual el error ha sido sobreestimado.

Este método de calibración de monocromadores en espectrofluorómetros, también fue utilizado para la calibración del detector de arreglo de diodos, utilizando en este caso el programa de procesamiento de datos que acompañan al instrumento (Princeton Instruments, Inc.).

El uso de filtros de vidrio no es un requerimiento exclusivo del método de calibración. Como un ejemplo alternativo se utilizaron las series de bandas fuertes de estructura fina en la región de 230 a 270 nm del espectro de absorción del benceno en fase vapor (Friedel & Orchin, 1951). Ya que en ese rango de longitudes de onda es difícil encontrar un fluoróforo con alto rendimiento cuántico, se seleccionó el orden cero (luz blanca) en el monocromador de excitación y en el compartimiento de muestras se colocó una cuveta triangular con la cara a 45° , cubierta con una película de óxido de magnesio. Con esta configuración instrumental, el orden cero de excitación se reflejó hacia el monocromador de emisión y se utilizó el método descrito previamente para determinar las bandas de absorción del vapor de benceno (figura 8).

Materiales y Métodos

TABLA III: POSICION DE LAS BANDAS DE ABSORCION DEL FILTRO DE HOLMIO, MEDIDAS A EL METODO DE CALIBRACION Y SU DESVIACION RESPECTO DE LOS VALORES DE ASTM.

Número de banda (Fig 4)	Posicion de la banda de Holmio (nm)			DIF1	DIF2
	ASTM std	Shimadzu	SLM 4800		
3	279.37±0.05	279.1	279.1	0.0	+0.2
4	287.5 ±0.10	287.7	287.4	-0.3	-0.2
5	333.7 ±0.10	333.6	333.8	+0.2	+0.1
7	360.9 ±0.10	360.7	360.6	-0.1	-0.3
8	385.9 ±0.20	385.8	385.6	-0.2	-0.3
9	418.7 ±0.20	418.6	418.9	+0.2	+0.1
9*		445.9	445.9	+0.1	
10	453.2 ±0.20	453.3	453.4	+0.1	+0.2
12	460.0 ±0.20	460.0	460.2	+0.2	+0.2
14	536.2 ±0.20	536.3	536.3	0.0	+0.1
15	637.5 ±0.20	637.3	637.1	-0.2	-0.4

DIF1 fue calculada restando el valor medido con el espectrofluorómetro SLM4800 del valor medido con el espectrofotómetro Shimadzu UV-240.

DIF2 fue calculada restando el valor medido con el espectrofluorómetro SLM4800 del valor indicado por McNeirney & Slavin, 1962..

Materiales y Métodos

Sólo se determinaron las posiciones de las tres bandas más fuertes, las cuales se encontraron ubicadas, de acuerdo a lo determinado en el fluorómetro SLM 4800, en 259.0 nm, 252.7 nm y 246.8 nm. Con estos valores el error standard estimado fue de ± 0.2 nm en la calibración del monocromador de emisión.

No fue posible la utilización de un espejo en lugar de diferentes fluoróforos como fuente de luz, debido a las bandas de emisión presentes en la región visible de las lámparas de arco de Xenón. Los cambios extremadamente grandes en la intensidad de luz impidieron la medición de un perfil suave de la lámpara aún en rangos tan pequeños como 50 a 100 nm si no se cambiaba la ganancia de los fotomultiplicadores. En estas condiciones la resolución de las bandas de absorción de los filtros es prácticamente imposible.

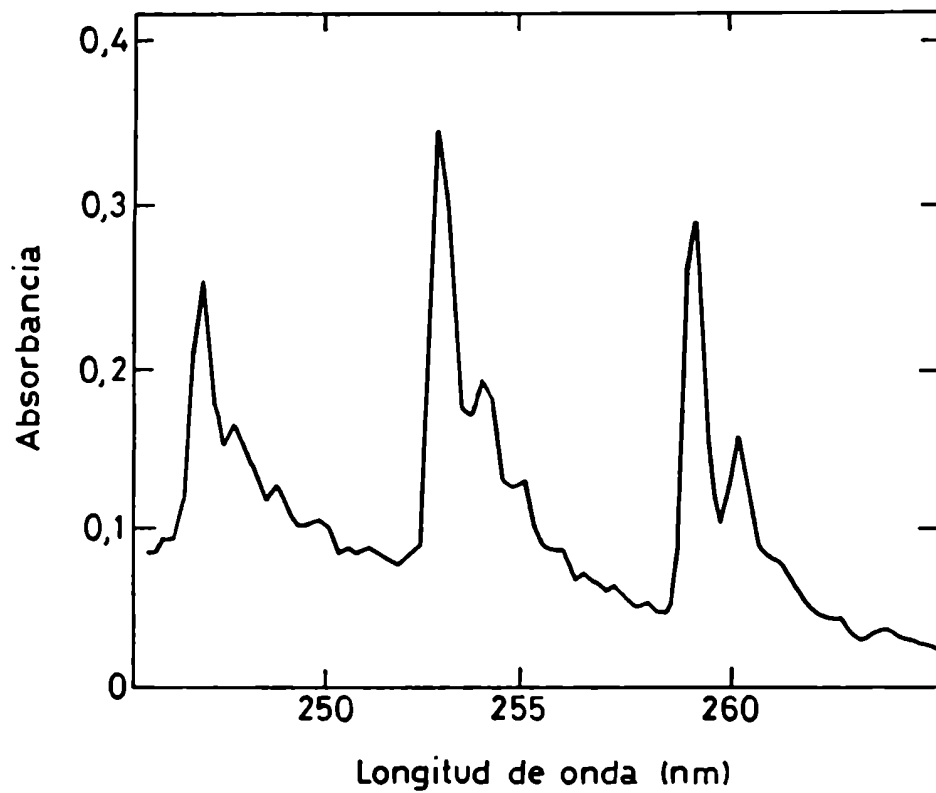


Figura 8: Bandas de absorción del vapor de benceno, detectadas con el espectrofluorómetro SLM 4800. Como luz de excitación se utilizó el orden cero del monocromador.

2.3 CALCULOS

2.3.1 EFECTO DE UN INCREMENTO "INSTANTANEO" EN LA PRESION

Se estimaron la contribuciones complementarias de los cambios en las velocidades de disociación $k_-(p)$ y asociación $k_+(p)$ para los cambios totales de la constante de disociación $K(p)$ bajo presión.

$$K(p) = K(atm) \exp(pV/RT) \quad [2.6]$$

reemplazando $K(p)$ por la relación $k_-(p)/k_+(p)$

$$k_-(p) = k_-(atm) \exp(fpV/RT) ; \quad k_+(p) = k_+(atm) \exp(-(pV/RT)(1-f)) \quad [2.7]$$

f es una factor que mide la influencia de la presión sobre las velocidades opuestas de equilibración. Su valor está comprendido entre 0 y 1. Si $f=1$ el incremento en $K(p)$ es debido totalmente a un incremento en la disociación; si $f=0$ depende solamente de un decrecimiento de la velocidad de reasociación de las subunidades disociadas. Se realizó una estimación práctica de f , asumiendo que su valor es independiente de la presión. Para ello se definieron dos procesos sucesivos. En el primero de ellos se aumenta rápidamente la presión desde presión atmosférica hasta la presión necesaria para alcanzar un grado de disociación $\alpha=1/2$; luego de alcanzar el equilibrio se produce un aumento subsiguiente en la presión hasta la presión en que la disociación es total (Silva et al., 1986). Las correspondientes relajaciones están caracterizadas por los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente.

Materiales y Métodos

Representan los tiempos en los cuales se alcanzan e^{-1} de las amplitudes correspondientes a los cambios en el grado de disociación.

El cambio diferencial en la disociación da de un dímero en un tiempo dt está representado por

$$da = \{k_{-}(p)(1-\alpha)C - 4k_{+}(p)\alpha^2 C^2\} dt \quad [2.8]$$

donde $k_{-}(p)$ y $k_{+}(p)$ corresponden a las velocidades de disociación y reasociación respectivamente a la nueva presión p . Introduciendo estos nuevos valores de las velocidades de asociación y reasociación

$$da = \{1-\alpha-4\alpha^2(C/K_0)\exp(p\frac{1}{2}V/RT)\} \{k_{-}\exp(-p\frac{1}{2}V/RT)C\} dt \quad [2.9]$$

Comenzando con un valor apropiado de C/K_0 , que origine un valor pequeño de disociación a presión atmosférica α_0 , se calculó el incremento da sobre un diferencial de tiempo dt (las unidades de tiempo son $1/\{Ck_{-}\exp(-p\frac{1}{2}V/RT)\}$); luego

$$\alpha_1 = \alpha_0 + da \quad [2.5]$$

El procedimiento fue repetido hasta alcanzar asintóticamente 50% de disociación. A continuación se realizó el mismo cálculo, comenzando esta vez con el valor de equilibrio α y reemplazando $p\frac{1}{2}$ por la presión en la cual se alcanza casi completa disociación. Las figuras 9a y 9b representan las curvas teóricas para la doble relajación descrita.

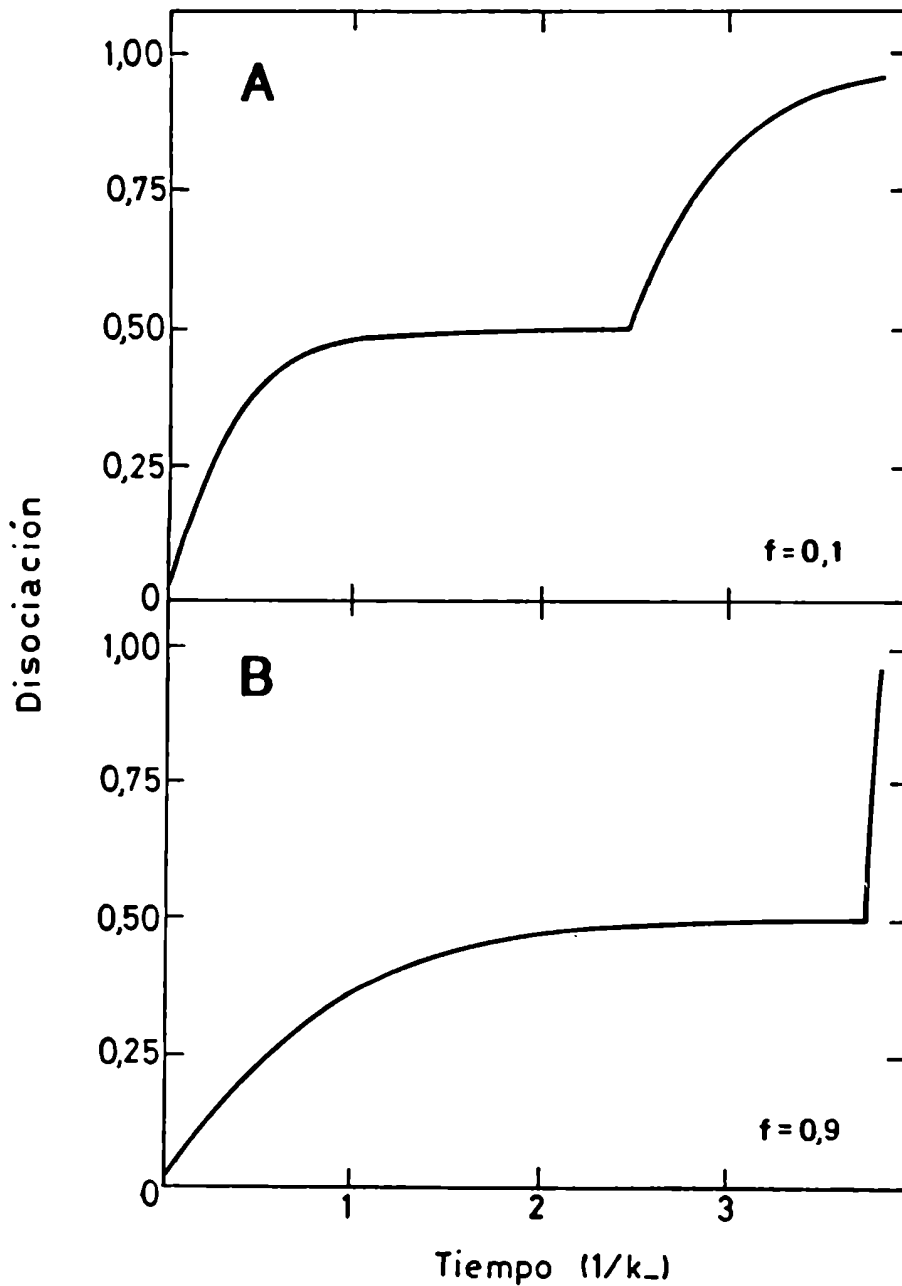


Figura 9: Curva de tiempo de la disociación de una población homogénea de dímero luego de dos aplicaciones "instantáneas" sucesivas de presión. (a) La presión afecta preferencialmente la velocidad de disociación ($f= 0.9$). (b) La presión afecta preferencialmente la velocidad de disociación ($f= 0.1$). Los cálculos fueron realizados utilizando la ecuación [2.9]. La disociación a presión atmosférica es 0.02, alcanzando los valores de equilibrio 0.49 y 0.98 respectivamente, luego de los dos incrementos de presión.

Materiales y Métodos

Si $f=0.1$, $t_1/t_2=0.68$, y si $f=0.9$, $t_1/t_2=28.0$, una diferencia lo suficientemente grande para permitir una rápida estimación práctica de los efectos de la presión sobre las velocidades de asociación y disociación. Análogamente se pueden determinar los valores correspondientes a la doble relajación para el equilibrio tetramero-monómero, con un procedimiento similar, en los cuales se desestima una posible contribución de dímero. En tal caso α^2 es remplazado por α^4 , y C por C^3 en las ecuaciones precedentes. Para un tetramero $t_1/t_2=0.61$ si $f=0.1$ y $t_1/t_2=75.4$, si $f=0.9$. En ambos casos $\log(t_1/t_2)$ presenta una estricta dependencia lineal respecto de f (figura 32).

3 . RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados y Discusión

3.1 DISOCIACION INDUCIDA POR PRESION HIDROSTATICA

Los métodos físicos usados para determinar la disociación de complejos biomoleculares por acción de altas presiones son de gran utilidad en la determinación de los parámetros fisicoquímicos que caracterizan la interacción entre las subunidades que componen dicho complejos. La figura 10 muestra la variación en la polarización de fluorescencia de una solución 0.5 μM de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa sometida a la acción de presiones de hasta 2.4 kbar. Se asume que las regiones constantes en los límites de bajas y altas presiones corresponden respectivamente al tetrámero sin disociar y a las subunidades que resultan de la disociación total. En las regiones donde la disociación es parcial el sistema es heterogéneo, compuesto por cantidades variables de tetrámeros y monómeros (se considera que se trata de un equilibrio tetrámero-monómero, donde las cantidades de dímeros y otros intermediarios presentes no son significativas). Es conveniente remplazar la polarización (P) por la anisotropía (A), relacionada según:

$$A = 2/3 (1/P - 1/3)^{-1} \quad [3.1]$$

debido a que esta última permite la adición las contribuciones individuales de los componentes responsables de la emisión (Weber, 1952).

Resultados y Discusión

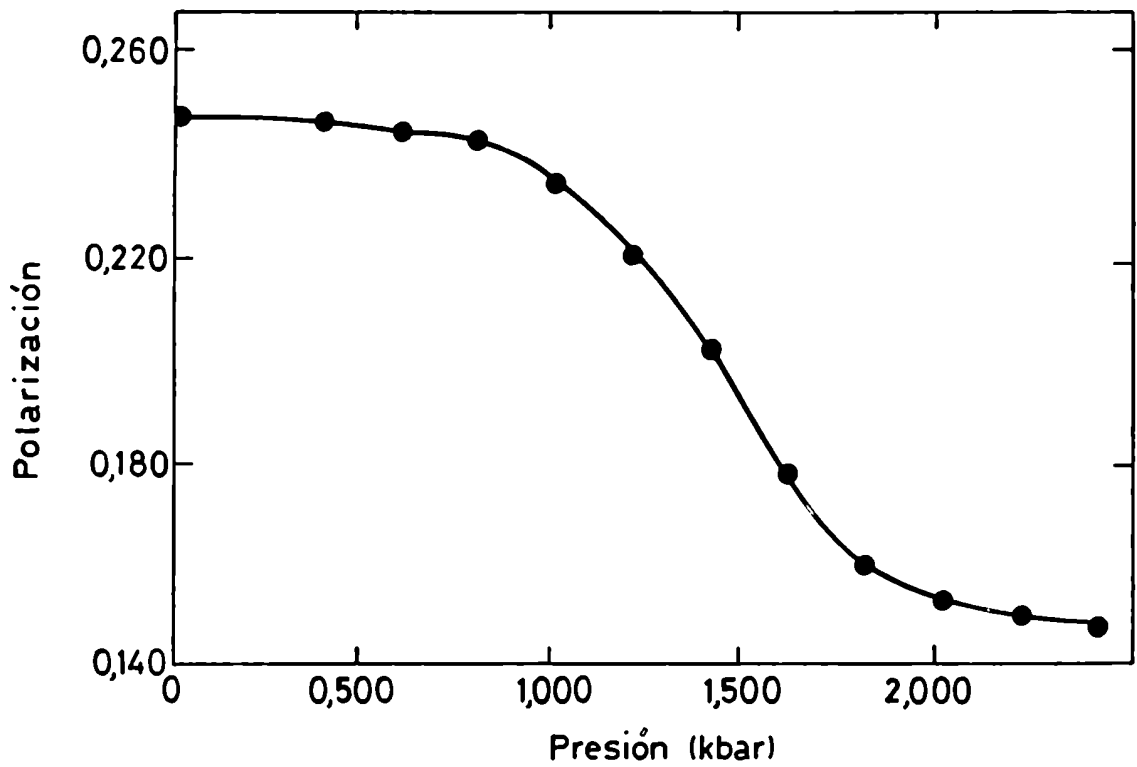


Figura 10: Cambios en la polarización de GAPDH-DENS de levadura inducidos por presión hidrostática. La concentración de GAPDH fue de 10^{-8} M en 0.05 M Tris, 1 mM DTT, 1 mM EDTA; pH=7,5. Temperatura 2°C. λ_{exc} : 360 nm. La emisión fue detectada a través de filtros Corning 3-73 y una capa de 3 mm de solución de NaNO_2 2M.

Resultados y Discusión

De esta manera, la anisotropía observada para grados intermedios de disociación es:

$$A = \frac{A_T I_T + A_M I_M}{I_T + I_M} \quad [3.2]$$

donde I_T e I_M son las intensidades de fluorescencia de las poblaciones de tetrámeros y monómeros, respectivamente (Paladini y Weber, 1981b). Como se puede observar, el uso de [3.2] sólo permite obtener un promedio de las propiedades espectroscópicas del total de la población de moléculas responsables de la emisión, y se carece de información respecto de las características individuales de las especies presentes.

Para superar esta limitación se desarrollaron métodos que utilizan la transferencia de energía de excitación electrónica entre dos fluoróforos unidos covalentemente a sendas subunidades en una proteína. En este caso las subunidades que no han sido disociadas contribuyen a la emisión de fluorescencia con la misma intensidad antes y después de la perturbación. Por lo tanto, los cambios espectrales son producidos únicamente por aquellas partículas que han sido afectadas por la acción de la presión.

Se utilizaron dos métodos, basados respectivamente en la transferencia entre fluoróforos dador y aceptor de distinta naturaleza química (método de heterotransferencia) o entre fluoróforos de igual tipo (método de homotransferencia).

Resultados y Discusión

3.2 METODO DE HETEROTRANSFERENCIA

Dos soluciones idénticas de proteínas (dímero o tetramero) fueron marcadas covalentemente a presión atmosférica, con el dador y el aceptor respectivamente, utilizando los métodos descritos en la sección de Materiales y Métodos. En la figuras 11 y 12 se observan los espectros de absorción y emisión de los dos pares de fluoróforos utilizados. La figura 11 corresponde al par 7-dimetilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina (cumarina, dador) e isotiocianato de fluoresceína (FITC, aceptor), conjugados al dímero hexoquinasa y la figura 12 a los conjugados de la misma proteína del par 1-metoxinaftalen-4-sulfonato (dador) y ácido 2'(N,N-dimetil)amino-6-naftoil-4-trans-ciclohexanoico (DANCA, aceptor). Hay una significativa superposición entre la emisión de los dadores y la absorción de los respectivos aceptores, que hace posible la transferencia cuando ambos están covalentemente unidos a subunidades vecinas dentro de un mismo oligómero. En ambos casos los aceptores son fluorescentes y su emisión está claramente resuelta de la emisión del dador.

Para la excitación se seleccionó una longitud de onda en la cual la radiación es absorbida preferentemente por el dador (385 nm en el caso del par cumarina/fluoresceína y 310 nm para el otro par). Dada la insignificante disociación a presión atmosférica, no se registró apreciable intercambio entre subunidades durante el corto tiempo (aproximadamente dos minutos) necesario para el registro del espectro, luego de mezclar alícuotas iguales de ambas soluciones.

Resultados y Discusión

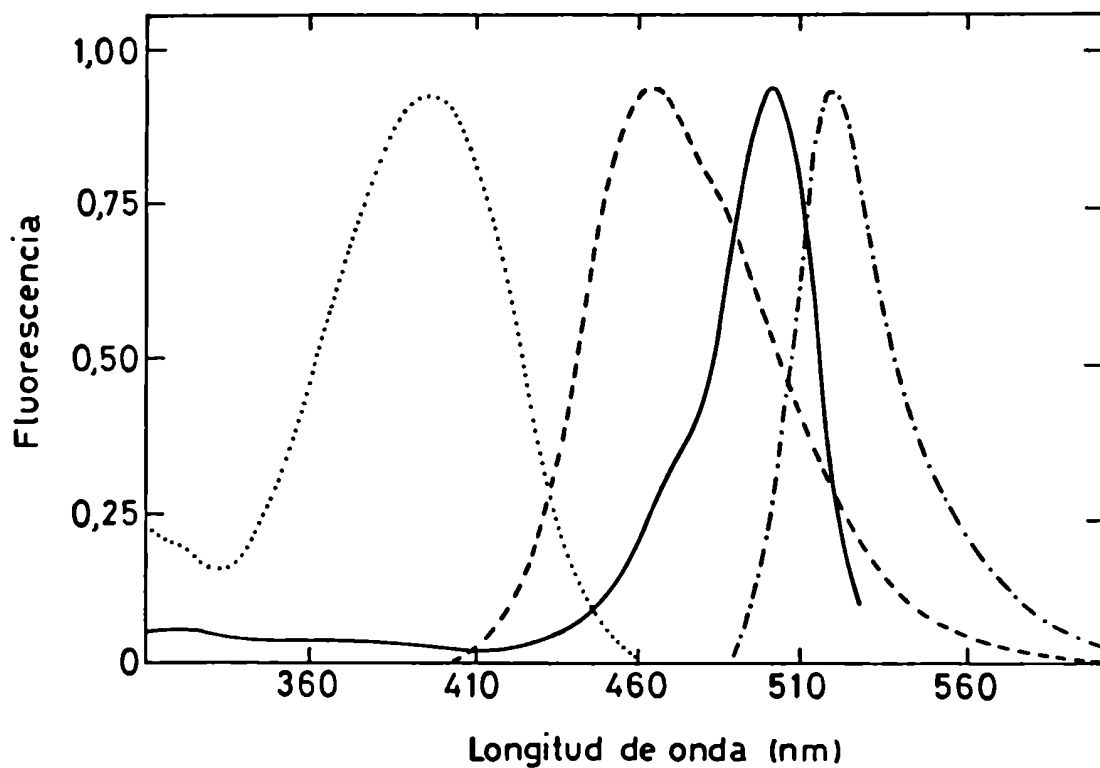


Figura 11: Espectros de absorción y fluorescencia (normalizados) de dador (cumarina) y aceptor (fluoresceína) de transferencia de energía de excitación electrónica.
..... absorción de cumarina.
-.-.- fluorescencia de cumarina (λ_{exc} : 310 nm).
— absorción de fluoresceína.
-.-.- fluorescencia de fluoresceína (λ_{exc} : 360 nm).

Resultados y Discusión

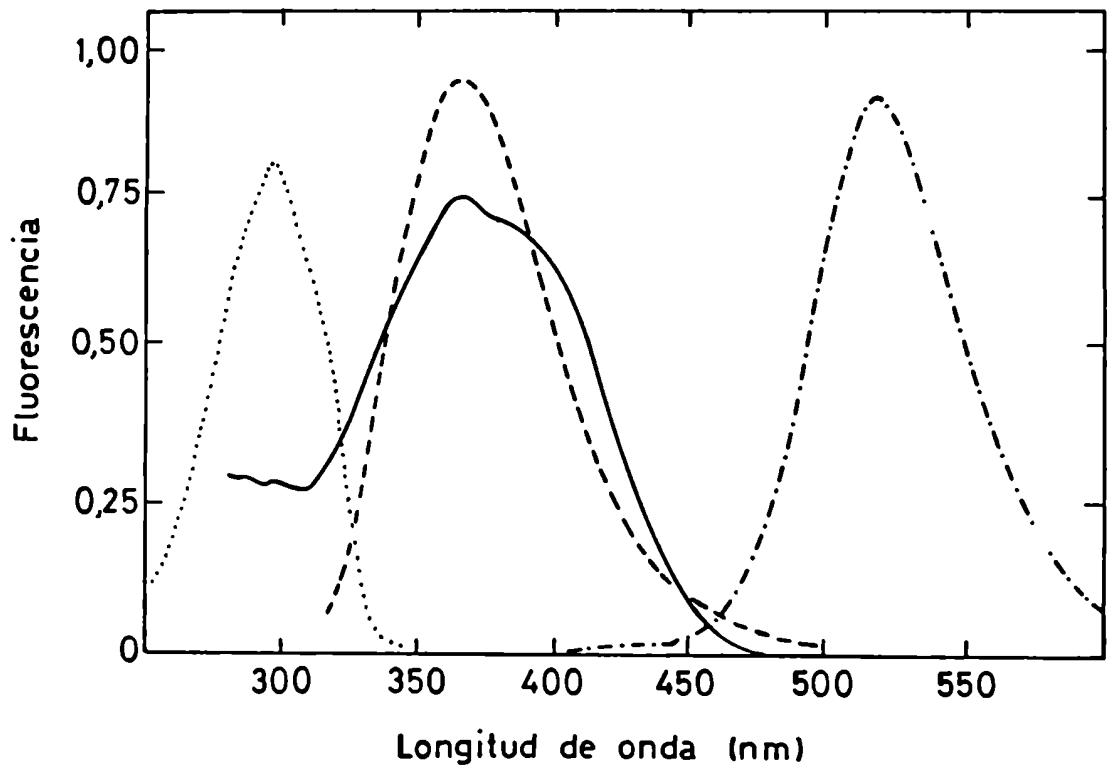


Figura 12: Espectros de absorción y fluorescencia (normalizados) de dador (4-metoxi-1-naftalensulfonato, MENS) y aceptor (DANCA) de transferencia de energía de excitación.
..... absorción de MENS.
--- fluorescencia de MENS (λ_{exc} : 310 nm).
— absorción de DANCA.
- - - fluorescencia de DANCA (λ_{exc} : 360 nm).

Resultados y Discusión

De este modo quedó definida la emisión de fluorescencia en ausencia de transferencia ($J=0$, línea sólida en la figura 13). Aún en ausencia de transferencia se produce excitación directa del aceptor a través de la luz de excitación. Por lo tanto, el espectro de fluorescencia observado es la suma de las contribuciones individuales del dador (que llamaremos D_0) y del aceptor (que será llamada A_0).

Cuando una fracción β de la excitación del dador es transferida al aceptor, la nueva distribución espectral pasa a ser:

$$D_\beta = D_0 \cdot (1 - \beta) \quad [3.3]$$

$$A_\beta = A_0 \cdot (1 + q\beta) \quad [3.4]$$

donde q es la fracción de fotones transferidos desde el dador hacia el aceptor, que son emitidos como fluorescencia del aceptor. La fracción β queda entonces definida, a partir de [3.3] y [3.4] por:

$$\beta = 1 - (D_\beta / D_0) = (A_\beta / A_0 - 1) / q \quad [3.5]$$

Sobre la misma solución inicial se aplicó entonces una presión suficiente como para promover la completa disociación del oligómero (2.2 kbar, cf. figura 10), y luego de 30 minutos, necesarios para alcanzar el equilibrio, se descomprimió hasta presión atmosférica para permitir la reasociación de las subunidades disociadas, evitando de este modo correcciones por la fracción disociada que contribuye al espectro pero no a la transferencia.

Resultados y Discusión

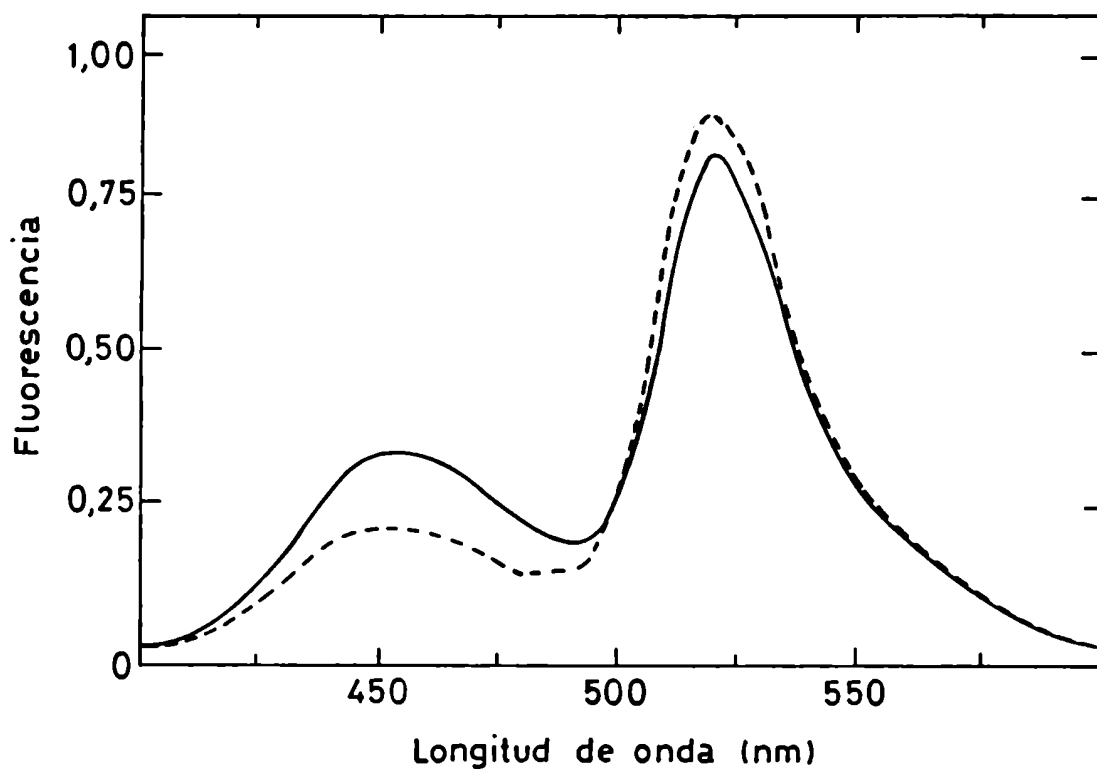


Figura 13 Espectro de fluorescencia que muestra el intercambio entre subunidades de GAPDH de levadura, marcadas independientemente con cumarina y fluoresceína.
— solución inicial
--- 2.2 kbar, 30 minutos.
Temperatura: 2°C λ_{exc} : 385 nm.

Resultados y Discusión

El nuevo espectro caracterizó la máxima transferencia posible ($J=1$), debido a una distribución al azar de las subunidades ($\beta = \beta_{\max}$; fig. 13).

Cuando la mismas soluciones se mantuvieron, en otros experimentos, durante un tiempo t a una presión capaz de producir un grado intermedio de disociación α y se descomprimió para permitir la reasociación, la fracción β_t se obtuvo mediante la suma de dos contribuciones: $\alpha\beta_{\max}$ que es el resultado de la reasociación al azar entre las moléculas disociadas y $(1-\alpha)\beta_x$ que representa el intercambio de subunidades de los tetrámeros no disociados:

$$\beta(t) = \alpha\beta_{\max} + (1-\alpha)\beta_x \quad [3.6]$$

paralelamente, β_x es una función del tiempo en la forma

$$\beta_x(t) = \beta_{\max} \{1 - \exp(-t/\tau_x)\} \quad [3.7]$$

donde τ_x es el tiempo característico para la reducción de la fracción aún no disociada a un valor igual a e^{-1} del valor original. A partir de las ecuaciones [3.6] y [3.7] se deduce como aumenta con el tiempo la fracción de la excitación del dador que es transferida al aceptor:

$$\beta(t) = \alpha\beta_{\max} + (1-\alpha)\beta_{\max} \{1 - \exp(-t/\tau_x)\} \quad [3.8]$$

Estas ecuaciones describen la forma más simple del intercambio de subunidades. Los casos más complejos requerirían una suma de exponenciales con valores crecientes de τ_x .

Resultados y Discusión

Cabe señalar que dado que los reactivos utilizados para modificar las enzimas son de igual naturaleza química y reactividad, que las reacciones fueron realizadas en idénticas condiciones y que las enzimas modificadas presentaron similar actividad específica (correspondiente al 90% de la proteína nativa), es improbable la existencia de cualquier asociación preferencial entre las subunidades marcadas.

El aumento en la fracción de subunidades intercambiadas provoca un descenso en la emisión de fluorescencia del dador y un aumento en la intensidad de emisión del aceptor. El centro de masa de la emisión de la mezcla de fluoróforos se desplaza linealmente respecto de la fracción de subunidades intercambiadas, tal como se observa en la figura 14. A partir de este resultado la cuantificación del intercambio entre subunidades fue realizada en forma directa, midiendo en cada caso el centro de masa de la emisión de fluorescencia de la mezcla como medida proporcional al porcentaje de transferencia.

Resultados y Discusion

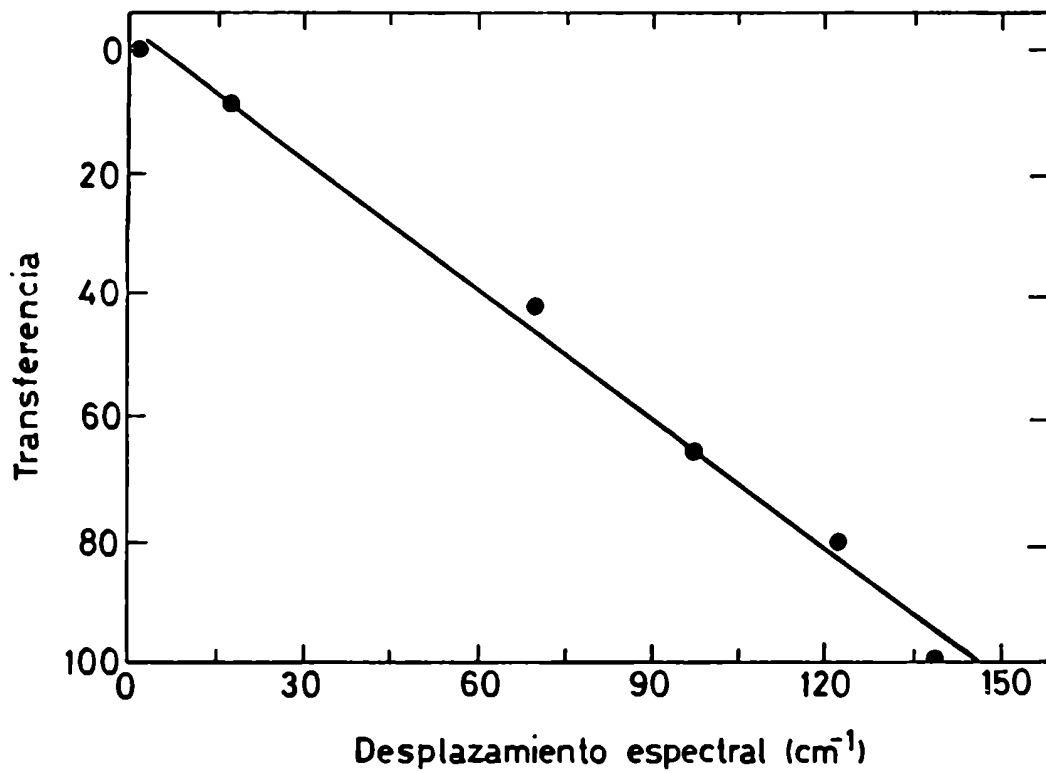


Figura 14: Relación lineal entre el centro de masa de la emisión de fluorescencia y la transferencia de energía. El máximo desplazamiento espectral resultó 150 cm^{-1} y la linealidad con el porcentaje de transferencia estuvo dentro de $\pm 7 \text{ cm}^{-1}$.

Resultados y Discusión

3.3 METODO DE HOMOTRANSFERENCIA

En este caso la solución de proteína se marcó con isotiocianato de fluoresceína hasta un grado que, idealmente, cada subunidad contenía sólo una molécula de fluoresceína, lo que fue verificado según el método indicado en la sección de Materiales y Métodos. La fluoresceína presenta un pequeño desplazamiento de Stokes, lo que implica que los espectros de emisión y excitación del fluoróforo presentan una considerable superposición (figura 11). Por lo tanto se produce transferencia de energía de excitación cuando dos moléculas de fluoresceína se encuentran en subunidades vecinas de un mismo oligómero.

Una de las consecuencias de la transferencia de energía no radiativa es el descenso en el tiempo de vida media del estado excitado de las moléculas dadoras. La figura 15 muestra la dependencia respecto de la frecuencia de modulación de la luz de excitación de las diferencias de fase y demodulación relativas de una solución de GAPDH:fluoresceína, en presencia de un exceso (10 veces) de enzima sin marcar, sometida a completa disociación (2.2 kbar a 0°C durante 30 minutos, línea punteada), y el correspondiente control, mantenido a 0°C y a presión atmosférica (línea sólida), medido con el fluorómetro de multifrecuencia de fase y modulación (ver Materiales y Métodos).

Hay un corrimiento hacia menores frecuencias en las curvas de diferencia de fase y demodulación para la muestra reasociada luego de haber sido disociada por efecto de la presión.

Resultados y Discusión

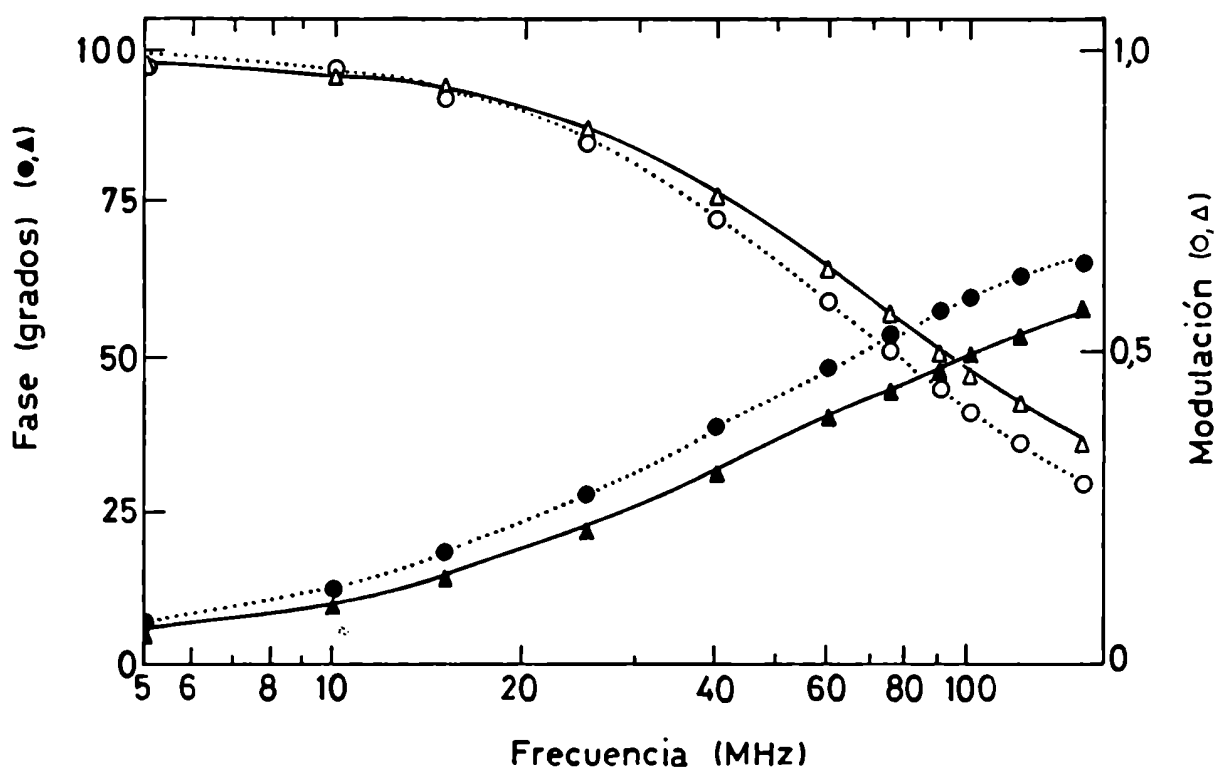


Figura 15: Diferencia de fase (● , ▲) y demodulación (○ , △) de GAPDH:fluoresceína/GAPDH (1:10), como función de la frecuencia de modulación. Las curvas continuas son las calculadas a partir de las vidas medias y factores preexponenciales dados en el texto y la tabla IV.
 △ , ▲ y — : mezcla de GAPDH:fluoresceína control.
 ○ , ● y : mezcla presurizada a 2.2 kbares; 30 min.

Resultados y Discusión

TABLA IV: ANALISIS DEL DECAIMIENTO DE GAPDH:FLUORESCINA

tratamiento	α_1	τ_1	α_2	τ_2	χ^2	τ_p
	1.0	2.6	-		95.4	
	0.75	3.42	0.25	0.9	1.5	2.77
+	1.0	3.1	-		28.5	
+	0.83	3.91	0.17	1.3	1.2	3.48

Los valores de vidas medias en ns.

$$\tau_p = \alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2$$

La tabla IV muestra el análisis de los datos suponiendo la existencia de componentes discretos. La asignación de los resultados experimentales a un único decaimiento monoexponencial es claramente inaceptable, de acuerdo al elevado valor de χ^2 . Por el contrario, los datos se ajustan adecuadamente a un modelo de decaimiento doble exponencial (ver Materiales y Métodos). Este análisis muestra dos componentes de 3.42 ns y 0.91 ns correspondientes al 75% y 25% de la emisión total, respectivamente. Luego del ciclo de compresión-descompresión aparecen dos componentes con 3.91 ns (83% de la emisión) y 1.3 ns (17% de la intensidad total). El tiempo de vida media promedio calculado a partir de los valores fraccionales de intensidad fue 3.48 ns para la solución presurizada y 2.77 ns para el control.

Resultados y Discusión

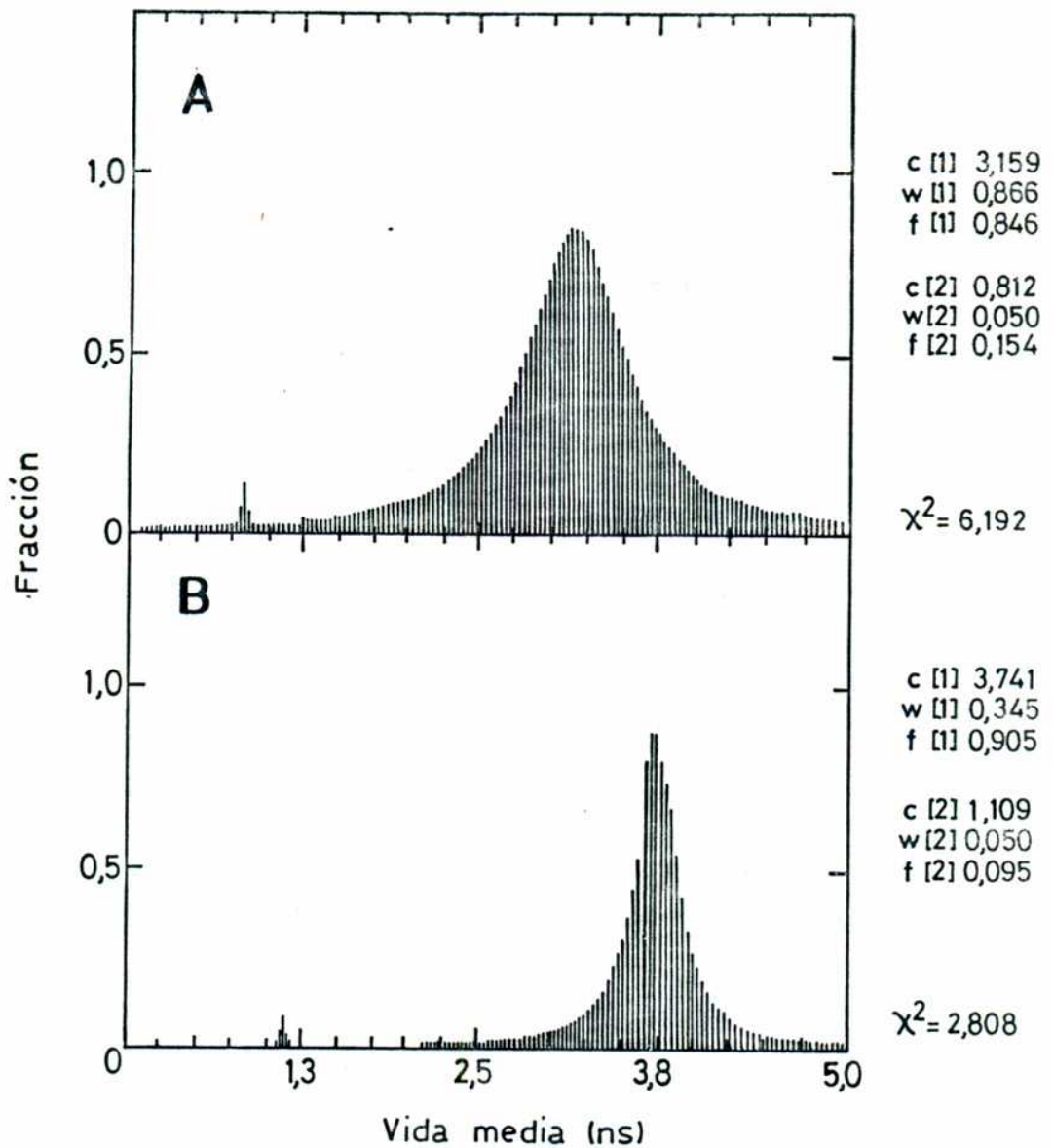


Figura 16: Distribución de vidas medias de fluorescencia de GAPDH:fluoresceína/GAPDH (1:10) a 23°C.

(a) mezcla control (b) mezcla presurizada a 2.2 kbar
Los parámetros que describen la distribución son el centro de la misma (c), el ancho a media altura (w) y el valor fraccional de intensidad (f).

Resultados y Discusión

La transferencia secuencial de energía entre moléculas a través de interacción dipolar, puede aumentar la probabilidad de producir desactivación del estado excitado a través de mecanismos no radiativos, debido a una mayor eficiencia de apagamiento por interacción con el entorno, lo que explica los valores más altos de vida media de las muestras en donde la transferencia de energía no radiativa está ausente.

Los datos fueron también evaluados utilizando una distribución continua de vidas medias (Gratton *et al.*, 1987). Este método de análisis puede proveer una mejor descripción del decaimiento del fluoróforo, especialmente cuando éste es producto de una compleja combinación de diferentes procesos.

Los resultados obtenidos utilizando una distribución bimodal Lorentziana se muestran en la figura 16. Los valores de χ^2 comparables a los obtenidos con el método de componentes discretos. Claramente, el decaimiento asociado a la GAPDH-fluoresceína sin presurizar es más complejo, debido a la homotransferencia. En la muestra presurizada se observa un desplazamiento hacia mayores vidas medias y un afinamiento en la distribución, correspondiente a una mayor homogeneidad en la emisión (figura 16).

Estas observaciones pueden ser explicadas de la siguiente forma. En la muestra original, previa a la presurización, se produce transferencia entre moléculas de fluoresceína en subunidades que forman parte de un mismo tetramero (figura 17, círculos llenos). Luego del ciclo de compresión-descompresión se reasocian tetrameros híbridos y, debido al exceso de proteína sin marcar, sólo una de las subunidades de cada tetramero tiene, en promedio, una molécula de fluoresceína unida covalentemente, y consecuentemente las posibilidades de homotransferencia prácticamente se reducen a un mínimo.

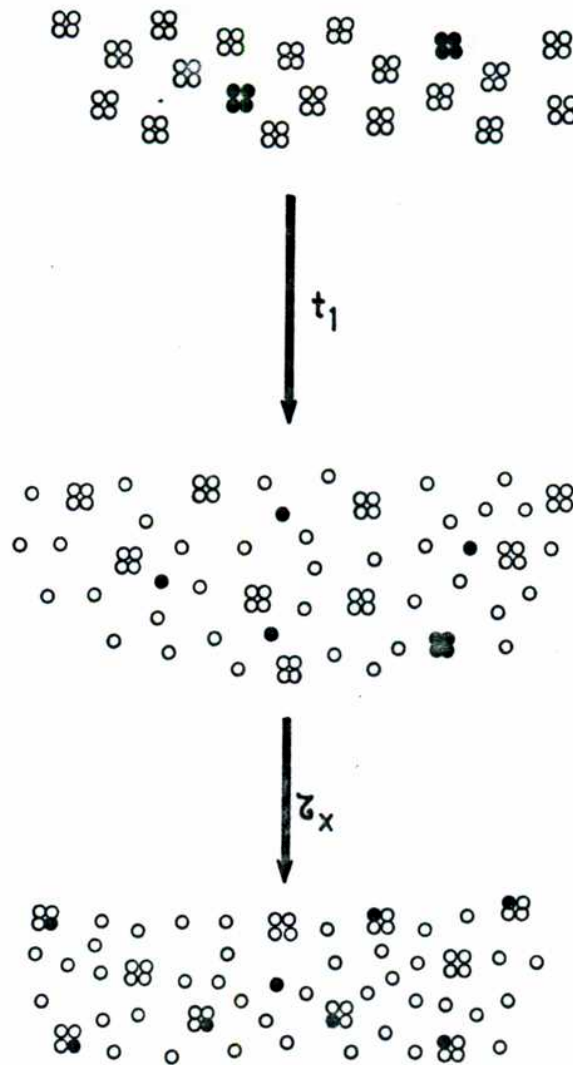


Figura 17: Esquema que representa el intercambio de subunidades entre tetrameros marcados con fluoresceína y un exceso de proteína sin marcar. La constante de tiempo t_1 caracteriza a la disociación de los tetrameros en monómeros, mientras que τ_x caracteriza el tiempo de relajación para el proceso en el que se reemplazan tetrameros conteniendo todas la subunidades marcadas por otros en los cuales sólo una de ellas tiene unido el fluoróforo.

Resultados y Discusión

Otra consecuencia de la transferencia de energía no radiativa es la despolarización de la radiación emitida, debido al acoplamiento de múltiples dipolos de absorción-emisión antes de la emisión de un fotón (Forster, 1948; Weber, 1954; Weber, 1966).

La disminución observada en la anisotropía r_1 está relacionada con la anisotropía en ausencia de transferencia, r_0 por la relación

$$r_0/r_1 = 1 + T/\Gamma \quad [3.9]$$

donde T es la probabilidad de transferencia de excitación de un fluoróforo no excitado originalmente y Γ la probabilidad de la emisión (Weber & Daniel, 1966; Weber & Anderson, 1968).

Los resultados experimentales obtenidos en esta tesis con todas las proteínas estudiadas, que han sido marcadas en una extensión considerable (con un mínimo de 3 moléculas de fluoresceína por tetrámero, y dos por dímero), indican que la despolarización de la fluorescencia debido a la transferencia no radiativa entre fluoresceínas presentes en el mismo agregado domina la anisotropía observada: cuando se produce la disociación la transferencia de energía no radiativa es mínima y la polarización de la emisión crece hasta un máximo determinado por el tiempo de vida media de la fluoresceína unida covalentemente y la velocidad rotacional de las subunidades.

Cuando se mezcla una solución de tetrámero marcada con fluoresceína (o un fluoróforo de similares características) con un exceso de la misma proteína sin marcar, y se incrementa la

Resultados y Discusión

presión hasta un valor en el cual se produce 50% de disociación del oligómero la anisotropía de estado estacionario medida (r_s) aumentará por dos causas, que se asumen independientes:

1- La disociación produce la separación de subunidades hasta una distancia en la cual la transferencia de energía de excitación no es posible.

2- El intercambio entre subunidades marcadas no disociadas y otras no marcadas, presentes en gran exceso.

Cuando ambos procesos tienen lugar, la anisotropía aumentará hasta un valor igual a

$$r_s = r_m + (1-\alpha)r_t \quad [3.10]$$

donde r_m es la anisotropía correspondiente al monómero aislado y r_t la anisotropía de emisión de un tetrámero que contiene una sola subunidad marcada.

Cabe señalar que cuando las subunidades se encuentran asociadas, los movimientos laterales de la macromolécula (y/o la libertad rotacional del cromóforo unido covalentemente) están estéricamente más impedidas que cuando están en forma disociada. Debido a la restricción de los movimientos despolarizantes durante la vida del estado excitado, la anisotropía del oligómero r_t debería ser, en consecuencia, mayor que la de los monómeros aislados, r_m . Sin embargo, la despolarización originada en movimientos Brownianos es despreciable cuando la velocidad de difusión rotacional es mucho menor que la velocidad de emisión de fluorescencia. Esto es ilustrado mediante la ecuación de Perrin

$$r_o/r = 1 + (\tau/\theta) \quad [3.11]$$

Resultados y Discusión

En esta ecuación r_0 es la anisotropía observada en ausencia de cualquier proceso despolarizante extrínseco, τ es el tiempo de vida media y θ es el tiempo de relajación rotacional.

Para un tiempo de relajación rotacional de 200 ns para el tetrámero y de 50 ns para el monómero, y una vida media del fluoróforo de 4 ns, $r_t/r_m = 1.05$. Para un grado de disociación α de 1/2, r_s no varía mucho de r_m y r_t ; por lo tanto, puede ser tomado como un único valor, característico de la anisotropía de emisión en ausencia de transferencia de energía. En consecuencia, cuando se aplica presión a una solución de tetrámero hasta un valor capaz de producir un grado de disociación α intermedio entre 0 y 1 la anisotropía observada varía en función del tiempo de acuerdo a las dos causas señaladas más arriba:

$$r_a(t) = r_1 + (r_s - r_1)\{1 - \exp(-t/t_1)\} \quad [3.12]$$

$$r_x(t) = r_1 + (r_s - r_1)\{1 - \exp(-t/\tau_x)\} \quad [3.13]$$

siendo r_1 la anisotropía característica cuando se alcanza el equilibrio a un grado de disociación α .

La primera ecuación describe el cambio en la anisotropía debida a la disociación de los tetrámeros con una constante de tiempo t_1 y la segunda ecuación representa el remplazo de tetrámeros conteniendo todas la subunidades marcadas por otros en los cuales sólo una de ellas tiene unido el fluoróforo (figura 17). La anisotropía observada varía en función del tiempo del siguiente modo:

$$r(t) = \alpha r_a(t) + (1 - \alpha) r_x(t) \quad [3.14]$$

Resultados y Discusión

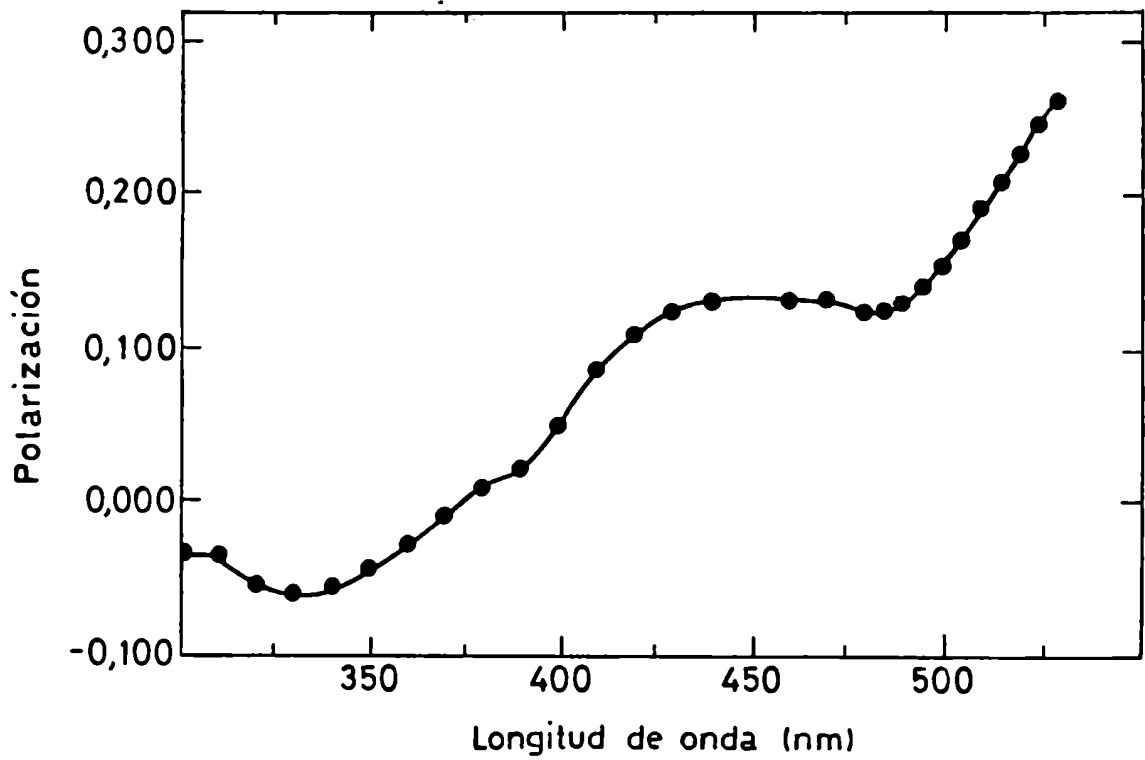


Figura 18: Espectro de polarización de GAPDH-fluoresceína. La emisión fue detectada a través de un filtro Corning 3-67 y una capa de 3mm de espesor de NaNO_2 2M.

Resultados y Discusión

La homotransferencia es también verificada por la dependencia de la longitud de onda de excitación para la polarización en la muestra no presurizada: cuando se excita la muestra en la región de menor energía de su espectro de absorción se observa virtualmente la desaparición de la transferencia, hecho que se evidencia por un aumento en el valor de polarización (figura 18). Este fenómeno ha sido descrito con anterioridad como efecto del rojo lejano y ocurre sin excepción en los casos de moléculas aromáticas, aunque la causa de este efecto no se conoce aún con precisión (Weber y Shinitzky, 1970; Dale y Bauer, 1971).

La figura 19 muestra el perfil de la disociación de una solución $5 \cdot 10^{-8}$ M de FITC-GAPDH. La línea sólida corresponde a la curva teórica para el equilibrio de disociación tetramero-monómero calculada para $C/C_2 = 60$ y un cambio de volumen standard por asociación de los monómeros (ΔV°) de 220 ml. Estos valores coinciden con los que Ruan y Weber (1989) calcularon a partir de las curvas de compresión de la GAPDH de levadura un ΔV° de 200-230 ml y C_2 como 0.15-0.95 nM, utilizando la dependencia respecto de la presión del centro de masa de la emisión intrínseca y la polarización de fluorescencia de conjugados de 2,5-DNS de la proteína. La coincidencia en los resultados obtenidos demuestra que el aumento en polarización refleja fehacientemente el cambio en el estado de agregación de la proteína.

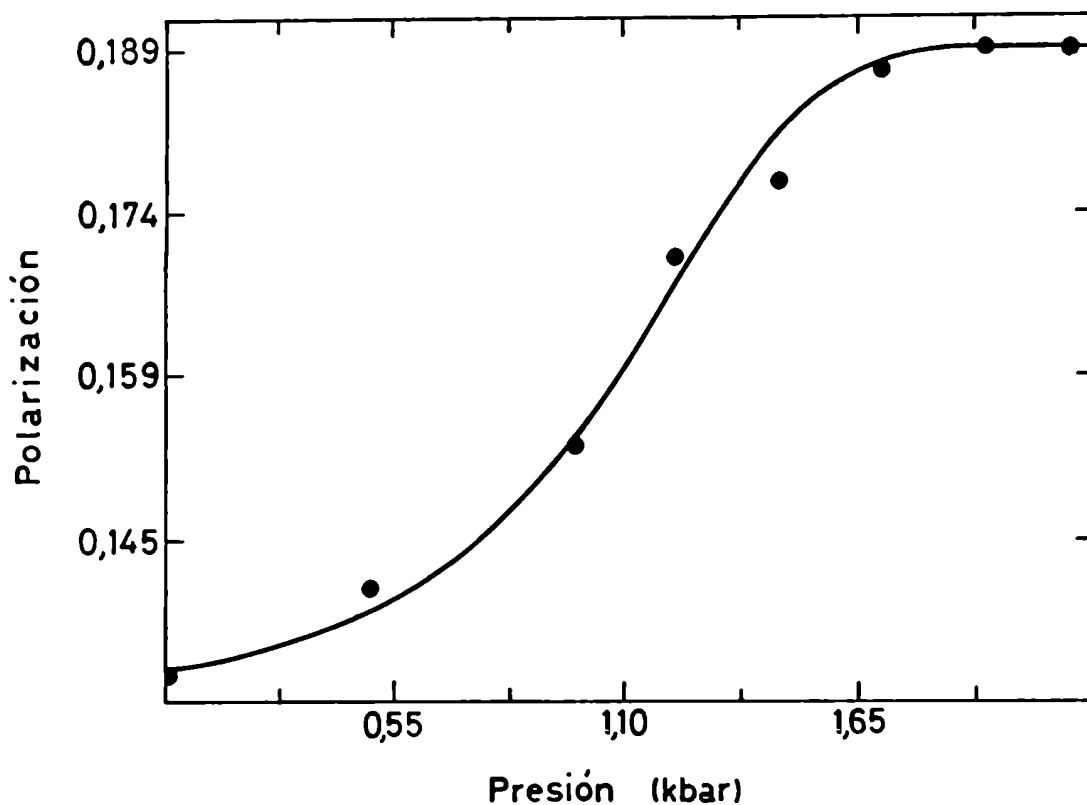


Figura 19: Cambios en la polarización de GAPDH-fluoresceína, inducidos por presión. $[GAPDH] = 5 \cdot 10^{-8} M$; $T = 2^{\circ}C$. λ_{exc} : 360 nm. La emisión fue detectada a través de filtros Corning 3-69 y una capa de 3 mm de solución de $NaNO_2$ 2M. La línea sólida representa la curva teórica para el equilibrio de disociación tetramero-monómero calculada para $C/C_{\frac{1}{2}} = 60$ y un cambio de volumen standard por asociación de los monómeros (ΔV°) de 220 ml.

3.4 ESTRUCTURA CUATERNARIA DINAMICA

La técnica de hibridización descrita precedentemente (heterotransferencia) puede ser utilizada como método para la evaluación de la interacción entre subunidades en proteínas oligoméricas, en las cuales los niveles de disociación no son detectables por técnicas físicoquímicas corrientes. La determinación de las velocidades de disociación a través del intercambio de subunidades, con la formación de moléculas híbridas puede dar información sobre las energías de interacción entre subunidades, en ausencia de una perturbación externa.

Cuando se mezclan soluciones equimolares de proteínas oligoméricas marcadas diferencialmente con fluoróforos dador y aceptor respectivamente, a una temperatura de 23°C, a una concentración en la que la presencia de monómero libre es prácticamente indetectable, se observa un rápido intercambio entre las distintas subunidades, reflejado por el incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia del aceptor a expensas de un descenso en la correspondiente al dador. En sendos experimentos, la GAPDH de levadura y la LDH de corazón porcino, presentaron el máximo de intercambio entre las 3 y 4 horas, con un tiempo medio de alrededor de 60 minutos (figura 20). Este fenómeno presentó una fuerte dependencia de la temperatura: cuando la incubación de la mezcla se realiza entre 0°C y 4°C no se detecta intercambio durante las primeras 8 horas analizadas.

Resultados y Discusión

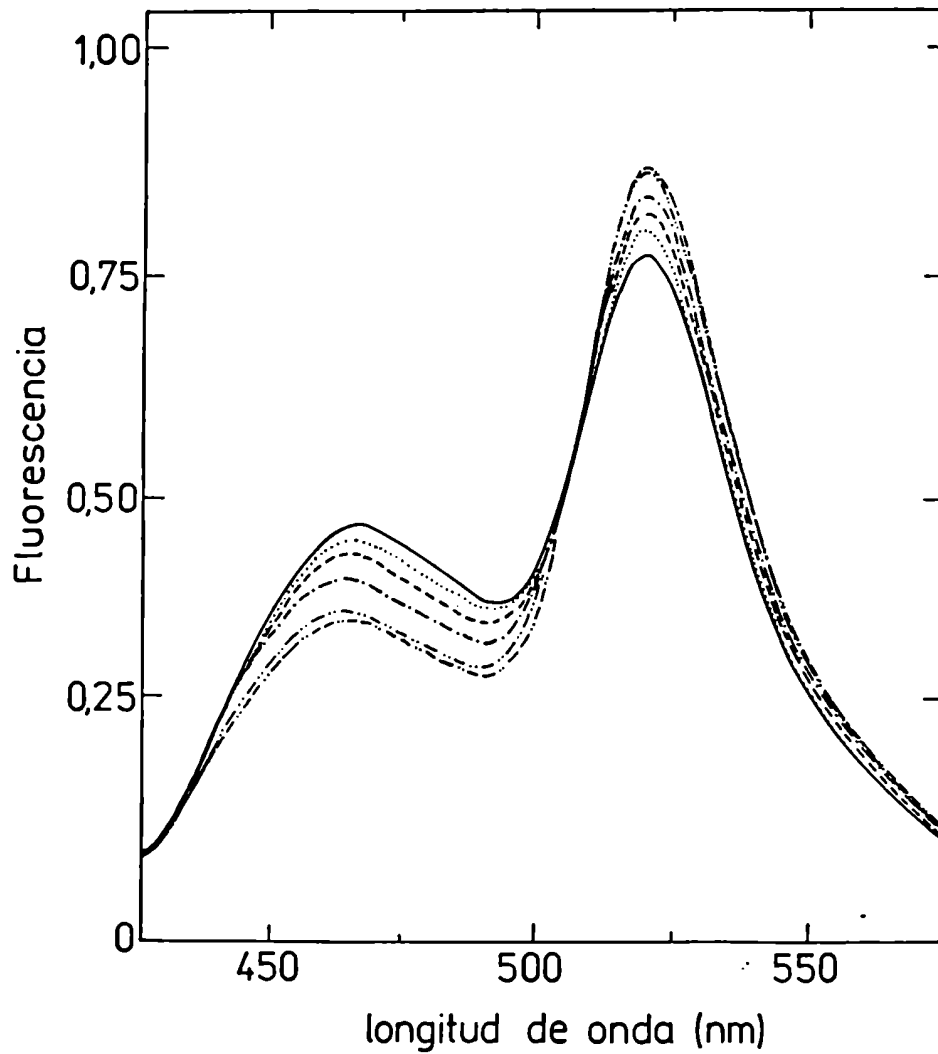


Figura 20: Soluciones 1 μM de GAPDH marcadas independientemente con cumarina y fluoresceína fueron mezcladas a 23°C. Los espectros de emisión de fluorescencia fueron adquiridos a los siguientes tiempos: — 0 min.; 20 min.; --- 40 min.; - - - - 60 min.; - · - · - 120 min. y 180 min. λ_{exc} : 385 nm.

Resultados y Discusión

La solución incubada a 23°C durante 4 horas fue sometida, a continuación, a una presión de 2.4 kbar durante 30 minutos para promover la completa disociación de los tetrámeros. A continuación, luego de esperar 10 minutos para permitir la reasociación, se registraron los mismos espectros de emisión, lo cual sugiere que se había alcanzado el máximo de transferencia de energía de excitación, correspondiente a una distribución al azar entre subunidades marcadas con ambos fluoróforos.

Los resultados sugieren que todos los contactos entre las cadenas polipeptídicas en los agregados se rompen y vuelven a formar. Las velocidades a las que ocurren estos procesos dinámicos son dependientes de la temperatura. Además se demuestra que una cantidad finita de subunidad está siempre presente en equilibrio con los oligómeros. Para concentraciones de proteína oligomérica del orden de micromolar o mayor, las subunidades libres son indetectables por métodos físicos corrientes, ya que corresponden a concentraciones de 10^{-10} M o menores. Por lo tanto, la presencia de otro oligómero de la misma estructura, aunque marcada diferencialmente, lleva a la formación de híbridos en un tiempo que varía en función de las condiciones del entorno (temperatura, pH, fuerza iónica, etc).

La observación que el intercambio de subunidades puede ocurrir a presión atmosférica en estos oligómeros no es única entre proteínas con estructura cuaternaria. Se sabe que para la hemoglobina, un tetrámero compuesto de dos cadenas α y dos cadenas β , si se mezclan subunidades con diferentes movilidades electroforéticas se forman tetrámeros híbridos (Bunn & McDonough, 1974). Una situación similar ha sido descripta para la asociación de la tropomiosina de *Rana esculenta* (Lehrer et al., 1989), un heterodimero

Resultados y Discusión

formado a altas temperaturas, por intercambio de subunidades a partir de los correspondientes homodímeros, que a su vez son estables a temperaturas menores de 15°C. Agregados más complejos, como el α -cristalino bovino (compuesto por alrededor de 40 subunidades de tipo A- y B- de 20kD en proporción 3:1 (van den Oetealaar *et al.*, 1990) también presentan una "estructura cuaternaria dinámica", según ha sido detectada por resolución de complejos híbridos formados utilizando técnicas electroforéticas. En este caso también la temperatura juega un papel crucial, siendo indetectable el intercambio a 5°C (van den Oetealaar *et al.*, 1990). Asimismo se determinó que una glicoproteína de membrana, la glicoproteína de cubierta (Proteína G) del virus de estomatitis vesicular, que en la capsida viral esta probablemente como trimero, presenta a 27°C un equilibrio trímoro-monómero, con un tiempo medio de intercambio de subunidades de 3 minutos (Lyles *et al.*, 1990).

Esta particular dinámica, en ausencia de factores que promueven la disociación, como el caso de grandes diluciones o altas presiones, o agentes químicos como la urea o clorhidrato de guanidinio, podría ser una característica universal de las proteínas oligoméricas. Los resultados presentados en esta tesis demuestran que es el caso en oligómeros simples, compuestos por subunidades iguales, tales como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y hexoquinasa.

El método de transferencia de energía electrónica de excitación posibilita extender los estudios de formación de híbridos entre otros oligómeros compuestos por cadenas idénticas, diferentes tipos de subunidades, hibridización entre proteínas nativas y mutantes en un dado organismo e incluso en proteínas homólogas de organismos heterólogos.

Resultados y Discusión

3.5 DERIVA CONFORMACIONAL, DISOCIACION E INTERCAMBIO DE SUB-UNIDADES

King y Weber (1986) demostraron que soluciones de lactato deshidrogenasa porcina incubadas a 4°C por varios días pierden la mayor parte de su actividad enzimática en forma dependiente de la concentración, y que esta pérdida era revertida cuando dichas soluciones se llevaban a temperatura ambiente. Además, la inactivación a bajas temperaturas es paralela a la hibridización detectada por electroforesis entre las isoenzimas de corazón y músculo. Mueller et al (1981) mostraron que la LDH porcina pierde la mitad de su actividad enzimática cuando es incubada a una presión de 0.5 kbar durante un período de varias horas. En esas condiciones no se produce apreciable disociación de la enzima, según indican las medidas de polarización de fluorescencia (King y Weber, 1986a).

La figura 21 muestra el intercambio entre subunidades de GAPDH de levadura, marcadas respectivamente con ácido 1-metoxinaftalen-4-sulfónico como dador y DANCA como aceptor luego de una incubación a 2°C, durante 6 hs a una presión de 0.75 kbar. Para estas condiciones de incubación el grado de disociación α es menor que 0.1, según indican experimentos de polarización de fluorescencia de la enzima marcada con 2,5-DENS (fig 10). Sin embargo se observa una modificación en los espectros de emisión del dador y aceptor entre los correspondientes a la condición inicial (línea sólida) y los obtenidos luego del tratamiento mencionado. En esas condiciones el intercambio entre subunidades no había sido completado: la línea --- corresponde al

Resultados y Discusión

espectro adquirido luego de la reasociación de la misma solución que fue sometida a una completa disociación (40 minutos a 2.2 kbar).

Resultados y Discusion

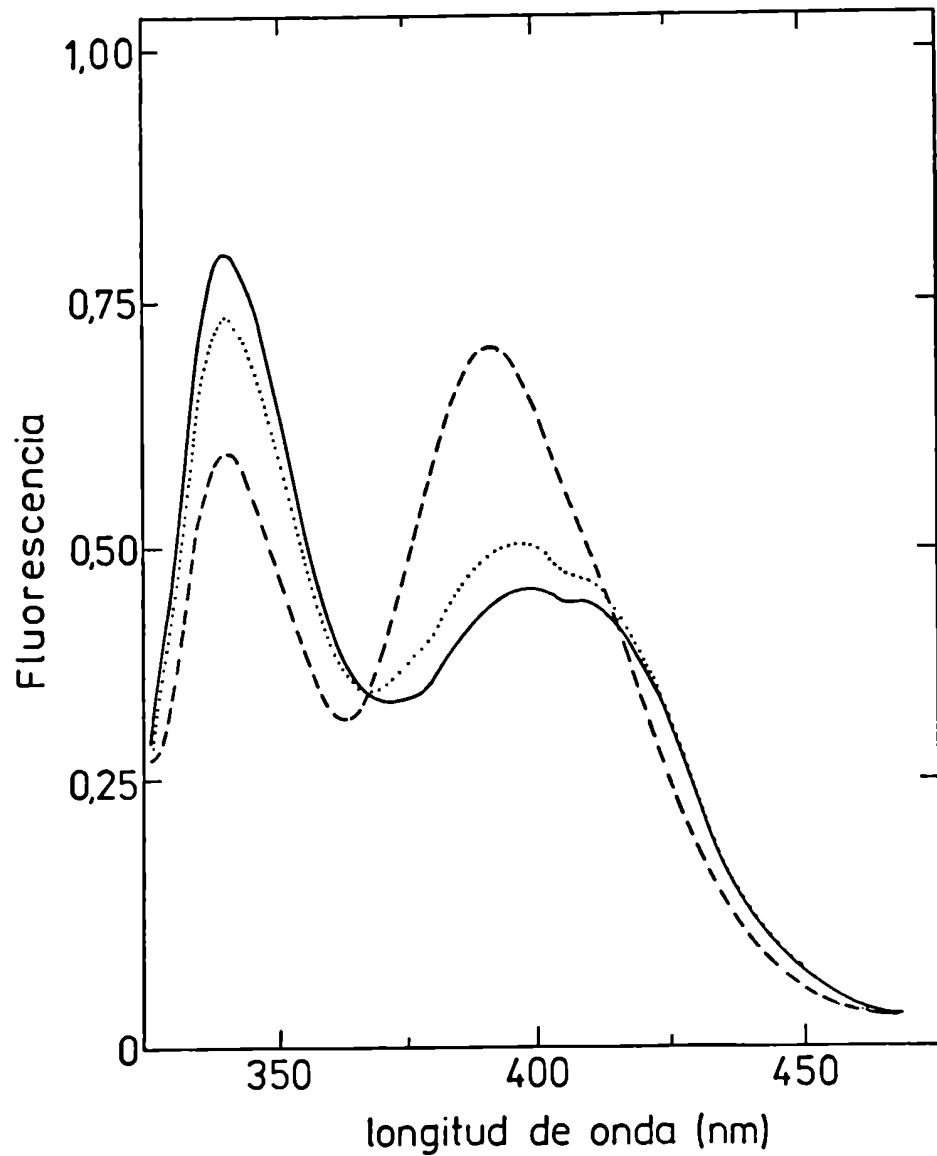


Figura 21: Espectros de emisión de fluorescencia que muestran el intercambio entre subunidades de GAPDH de levadura, marcadas con ácido 1-metoxinaftalen-4-sulfónico como dador y DANCA como aceptor. λ_{exc} : 310 nm
— mezcla inicial ($t=0$).
..... incubación a 2°C; 6 hs a 0.75 kbar.
--- incubación a 2°C, 40 minutos a 2.2 kbar.

Resultados y Discusión

El ácido 2'-(N,N-dimetil)amino-6-naftoil-4-*trans*-ciclohexanoico (DANCA) es un fluoróforo polar, y como tal, exhibe grandes diferencias en la distribución electrónica de sus estados fundamental y excitado. En consecuencia es muy sensible a la polaridad del sistema biológico que lo rodea (McGregor & Weber, 1986). La fuerte dependencia de la energía e intensidad de su emisión con el entorno hace engorrosa la cuantificación de la transferencia de energía de excitación cuando es usado como aceptor; sin embargo, esta propiedad permite realizar una comparación cualitativa de algunos aspectos conformacionales de las proteínas a las cuales está unido en forma covalente.

Cuando una mezcla de proteína, marcada selectivamente con fluoróforo dador y aceptor es mantenida a presión atmosférica, a temperaturas menores de 5°C, no se detecta apreciable intercambio entre subunidades en las primeras seis horas analizadas. En la figura 22 se observan los cambios en GAPDH (levadura) con 1,4-MENS-DANCA, luego de 10 días a 4°C. La transferencia de energía entre dador y aceptor unidos a subunidades vecinas dentro del mismo oligómero se manifiesta por el descenso en la emisión del dador debido a la absorción del grupo aceptor. Este, por su parte, además de aumentar la intensidad de emisión por fluorescencia debida a la transferencia de energía no radiativa, presenta un significativo desplazamiento hacia mayores energías, respecto de la emisión inicial, lo cual representa una clara evidencia de la mayor hidrofobicidad del nuevo entorno del fluoróforo. Todos los grupos amino libres en la proteína son potencialmente reactivos, de tal modo que es válido asumir que la localización espacial de los fluoróforos es al azar sobre la superficie de la proteína.

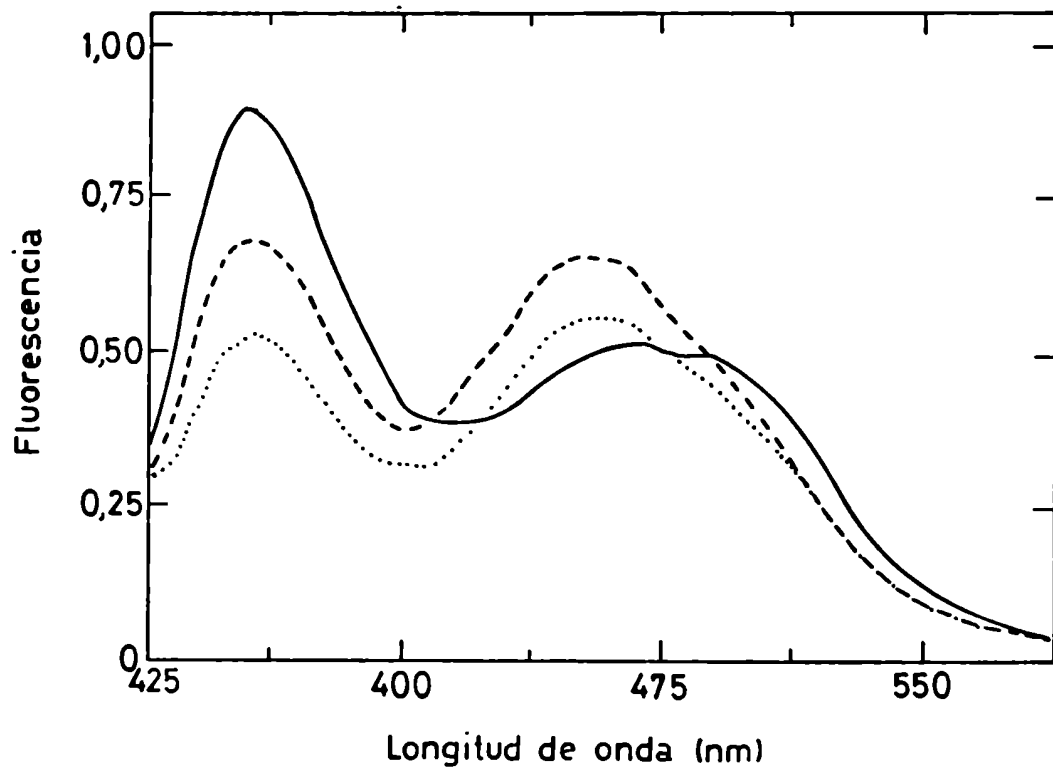


Figura 22: Espectros de emisión de fluorescencia que muestran el intercambio entre subunidades de GAPDH de levadura, marcadas con MENS como dador y DANCA como aceptor. — mezcla inicial (t= 0). ---- incubación a 4°C, durante 10 días hs a patm. incubación a 20°C, durante 60 min.; p= 2.4 kbar. λ_{exc} : 385 nm.

Resultados y Discusión

Los resultados parecen indicar que algunos residuos presentes en la superficie de las subunidades de la especie nativa se encuentran, luego del cambio progresivo en la conformación que sufren los monómeros aislados, cercanos a la interfase entre subunidades, la cual, según indican las estructuras cristalográficas de rayos X, presenta interacciones más hidrofóbicas que en la superficie molecular (Grau *et al.*, 1981). En la figura 22 se observa que los cambios sufridos por una solución idéntica de proteína, sometida a 2.4 kbares durante un periodo de 60 minutos, a 20°C presenta un espectro de emisión de iguales características, lo cual sugiere que los progresivos cambios conformacionales desarrollados en los monómeros como consecuencia de la exposición al solvente, de las superficies normalmente internas e hidrofóbicas, luego de la disociación son independientes del factor que promueve dicha disociación (Weber, 1987).

Por otra parte, se analizó en forma paralela la formación de híbridos y la inactivación a bajas temperaturas que ocurre en los tetrámeros. La figura 23 muestra la dependencia temporal de la inactivación en frío para diferentes concentraciones de lactato deshidrogenasa de corazón porcino. Para las tres concentraciones estudiadas se alcanza un *plateau* a los 6 días, en una forma que puede ser representada por una única exponencial (líneas sólidas en el gráfico). En los tres casos coinciden el tiempo de relajación, con diferente factor preexponencial. La variación del centro de masa de la emisión de una mezcla 1 μ M de la misma enzima marcadas con fluoresceína y cumarina presenta un perfil que coincide con la pérdida de actividad.

Resultados y Discusión

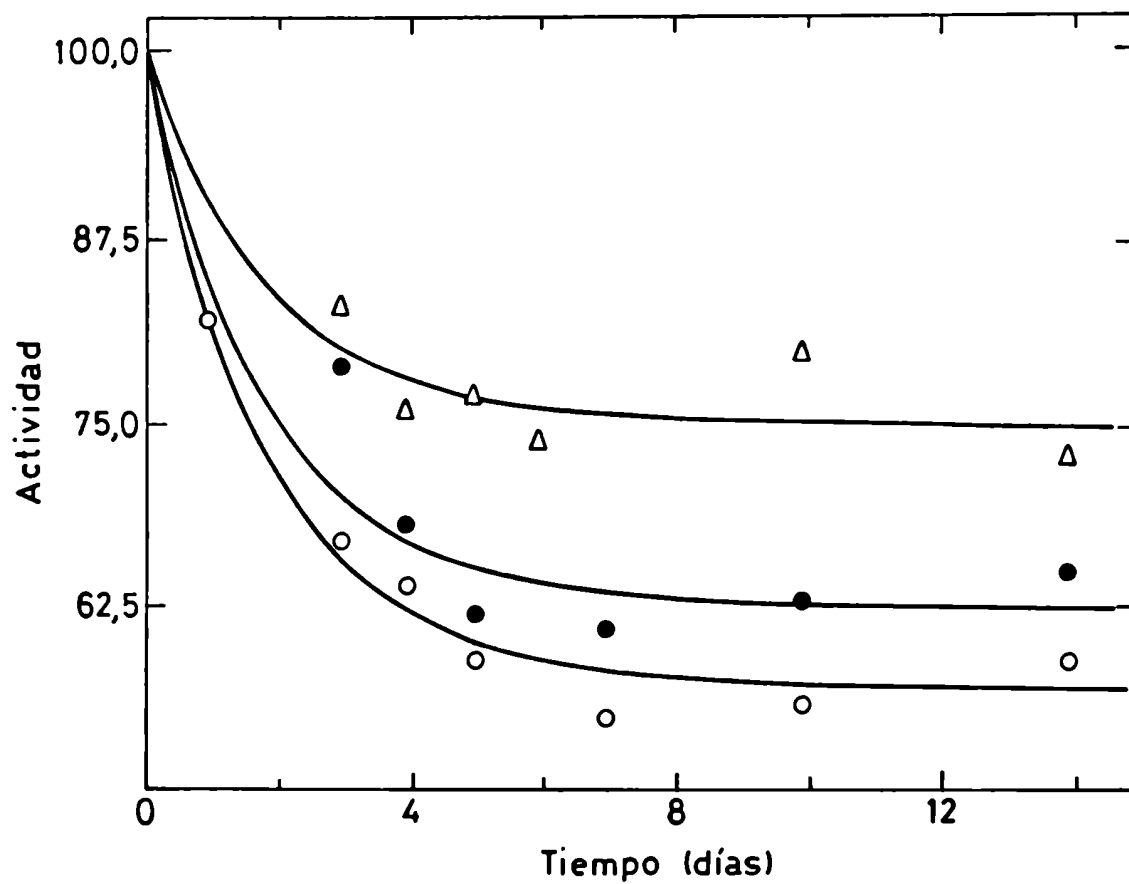


Figura 23: Actividad remanente de soluciones de LDH de corazón porcino respecto de la solución original, en función del tiempo de incubación a 4°C.

- 0.1 μM.
- 1 μM.
- △ 10 μM.

Resultados y Discusión

Esta dependencia de la concentración indica que las formas activas e inactivas coexisten en un verdadero equilibrio. La relación entre especies activas e inactivas es altamente dependiente de la concentración, y está probablemente determinada por el tiempo promedio que pasan las subunidades en forma aislada y asociada respectivamente.

Los resultados obtenidos confirman que tanto la crioinactivación, como la inactivación por presión, tienen lugar a través de ciclos de disociación, derivamiento conformacional y reasociación en tetrámeros inactivos. Utilizando la transferencia de energía no radiativa es posible verificar la generalidad de este fenómeno observando la formación de híbridos, aún en proteínas que no presentan isoformas.

En los dímeros se producen también ciclos microscópicos de disociación-asociación (figura 24). Dos soluciones idénticas de hexoquinasa, compuestas por una mezcla de subunidades marcadas respectivamente con MENS y DANCA, presentan las mismas características espectrales luego de ser mantenidas a baja temperatura por un período de 10 días o ser sometidas a la acción de alta presión, respectivamente. No obstante, en ambos casos la actividad enzimática recuperada es comparable a los controles mantenidos a temperatura ambiente y presión atmosférica y no se han encontrado condiciones que permitan aislar una especie dimérica modificada, en forma estable, como ocurre en los tetrámeros. Esta observación es concurrente con el hecho de que no se conoce hasta el presente ningún dímero sensible a la inactivación por frío.

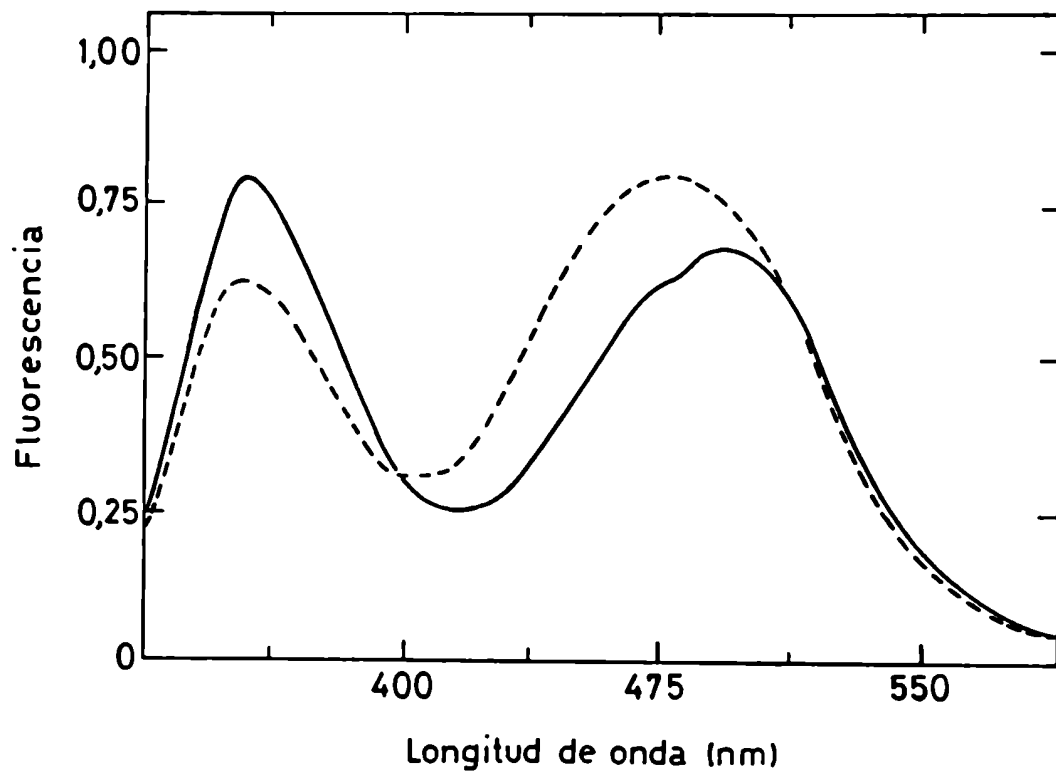


Figura 24: Espectros de emisión de fluorescencia que muestran el intercambio entre subunidades de hexoquinasa de levadura a bajas temperaturas, marcadas respectivamente con MENS como dador y DANCA como receptor. λ_{exc} : 310 nm.
— mezcla inicial (t= 0).
--- incubación a 4°C, por 10 días hs a patm.

Resultados y Discusión

3.6 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se estudió el efecto de la temperatura sobre el intercambio de subunidades en la enzima lactato deshidrogenasa de corazón porcino a presión atmosférica y a alta presión. Una solución 2 μM de esta enzima fue dividida en tres alícuotas. Una de ellas fue sometida a 1.4 kbar durante 4 horas a 0°C. Las otras dos fueron incubadas por el mismo período, a presión atmosférica, a 0°C y 25°C respectivamente. En la figura 25 se observa el resultado del experimento. La solución incubada a una presión capaz de promover un 50% de disociación, muestra luego de la reasociación, que se ha producido intercambio entre las subunidades que han sido disociadas, con la formación de tetrámeros mixtos, que contienen dador y aceptor de energía de excitación (línea rayada). En la solución mantenida a 25°C y presión atmosférica durante el mismo período, se observa máxima transferencia de energía de excitación entre subunidades marcadas con dador y aceptor respectivamente (línea sólida). Como se señaló anteriormente, no se registran cambios en el espectro de la solución que es incubada a 0°C (no se muestra).

Cuando se analizó el efecto de la presión a 23°C, los espectros de las soluciones expuestas a la acción de la presión correspondiente a media disociación, durante cuarenta minutos, y el control a presión atmosférica coinciden entre sí (líneas punteada y rayada, figura 26) y a su vez con el espectro correspondiente a la proteína reasociada luego de completa disociación (que no está mostrado). El espectro inicial (línea sólida) no se modifica por incubación de la mezcla 3 horas a 0°C.

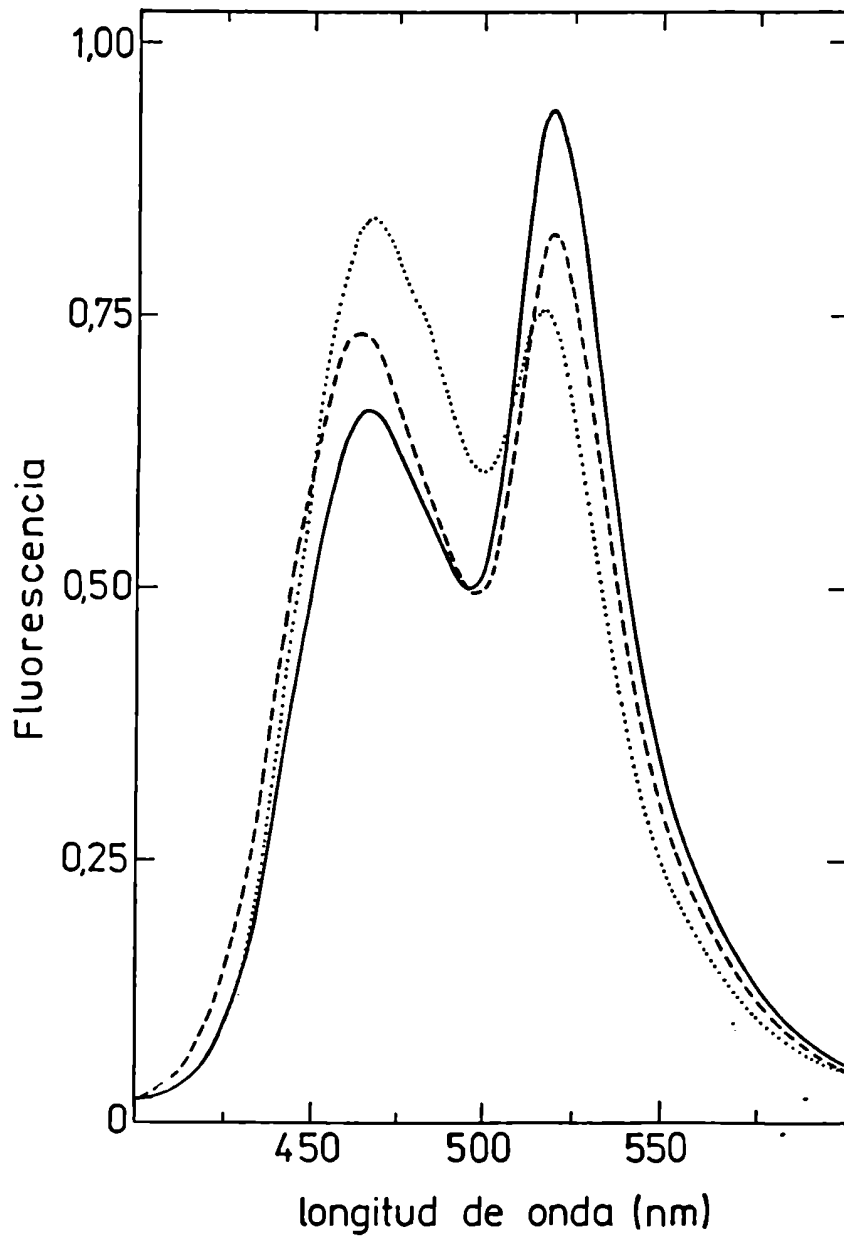


Figura 25: Espectros de emisión de fluorescencia de una mezcla equimolar de soluciones de H₄ LDH de corazón porcino marcadas respectivamente con cumarina y fluoresceína (concentración total 2 μ M).
..... solución inicial (t=0).
--- incubada a 1.4 kbar durante 4 horas a 0°C.
— incubadas durante 4 hs., a patm; 25°C.
Los espectros fueron determinados 10 minutos luego de la descompresión. λ_{exc} : 385 nm.

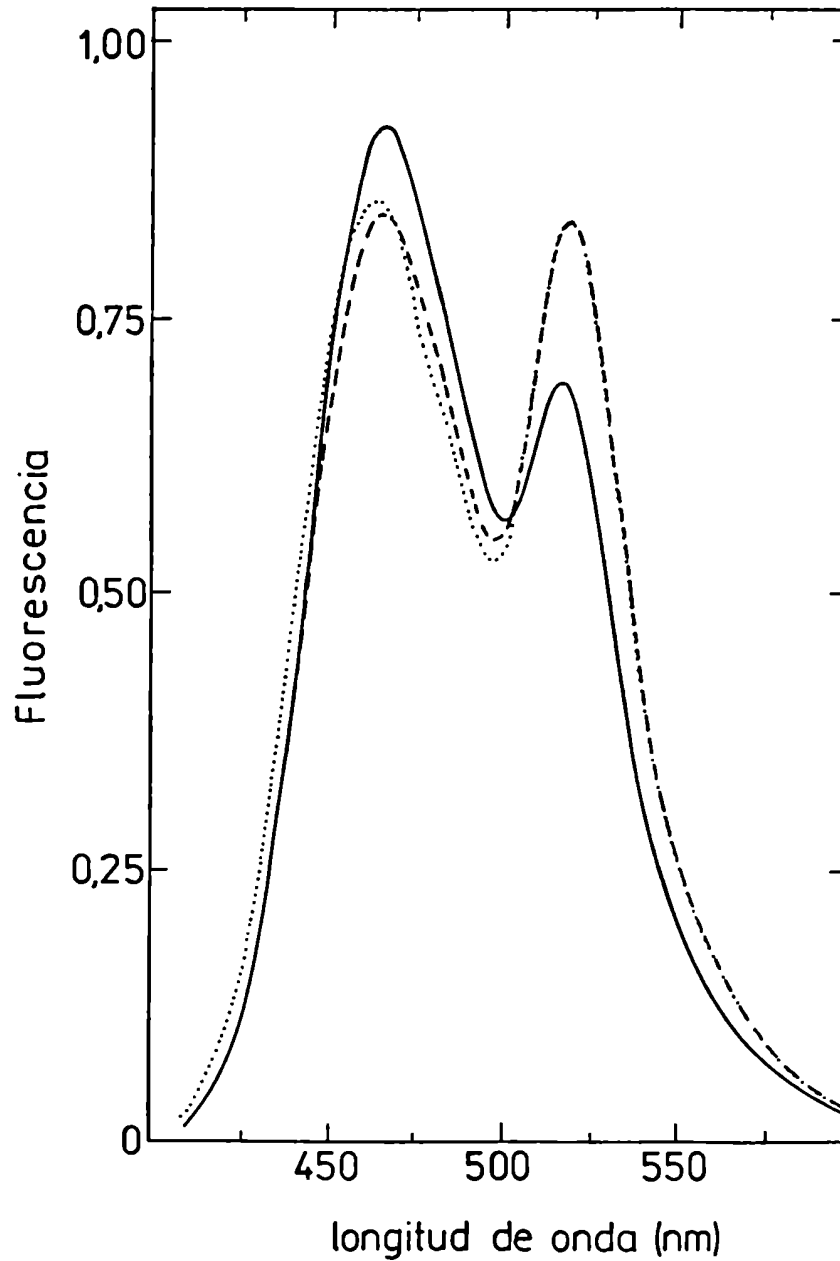


Figura 26: Espectros de emisión de fluorescencia de una mezcla equimolar de soluciones de H_4 LDH de corazón porcino marcadas respectivamente con cumarina y fluoresceína. — solución inicial ($t=0$). incubada a 1.4 kbar durante 3 horas a $25^\circ C$. --- incubadas durante 3 hs., a $patm$ a $25^\circ C$. Los espectros fueron determinados 10 minutos luego de la descompresión. λ_{exc} : 385 nm.



Resultados y Discusión

Estos resultados indican que la estructura cuaternaria de los tetrámeros es lo suficientemente lábil como para permitir el rápido intercambio de subunidades entre oligómeros a temperaturas superiores a 20°C y que la presión está ejerciendo un efecto negativo sobre la reasociación de los monómeros a bajas temperaturas, ya que inhibe el completo intercambio entre las subunidades que se observa en el control incubado durante el mismo intervalo a presión atmosférica (figura 25).

Resultados y Discusion

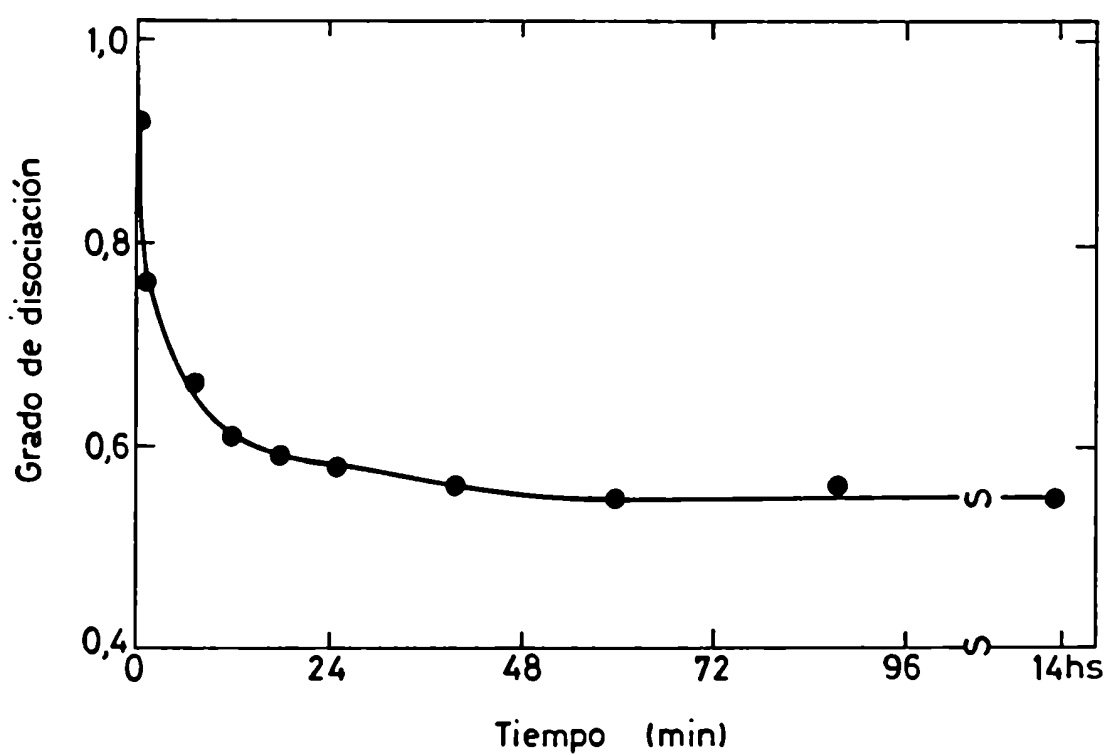


Figura 27: Evolución del grado de disociación de una solución 0,5 μ M de GAPDH-DENS incubada a 1,4 kbar, en función del tiempo, medida a través de la polarización de fluorescencia. λ_{exc} : 360 nm.

Resultados y Discusión

3.7 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DINAMICA DEL EQUILIBRIO DISOCIACION-REASOCIACION PARA DIMEROS Y TETRAMEROS

El tiempo para alcanzar virtualmente un completo equilibrio luego de aplicación de presión (t_1) resultó del orden de 10 a 30 minutos (figura 27), tiempo que coincide con los de disociación determinados previamente para idénticos sistemas (Paladini y Weber, 1981, King y Weber, 1986, Ruan y Weber, 1988, 1989).

Típicamente se estableció un grado de disociación de 0.5 mediante la aplicación de una presión adecuada y se determinó el subsiguiente intercambio entre las subunidades de la fracción no disociada por los cambios en la transferencia de energía de excitación electrónica entre fluoróforos unidos covalentemente a las partículas.

Si mediante la aplicación de presión se alcanza un grado de disociación α , se espera que a un tiempo t luego de la compresión:

$$J(p) = (1-\alpha) \cdot (1 - \exp(-t/\tau_x)) \quad [3.15]$$

donde $J(p)$ es la fracción intercambiada a presión p y τ_x es el tiempo característico para la reducción de la fracción de subunidades no intercambiadas a $1/e$ de su valor original.

Una mezcla de soluciones equimolares de lactato deshidrogenasa $5 \cdot 10^{-7}$ M marcadas independientemente con fluoresceína y coumarina, fueron incubadas a 0°C bajo una presión de 1.4 kbar (correspondiente a 50% de disociación) durante 0, 3, 6 y 14 horas. En la figura 28 se observan los espectros de emisión tomados 10 minutos luego de la descompresión.

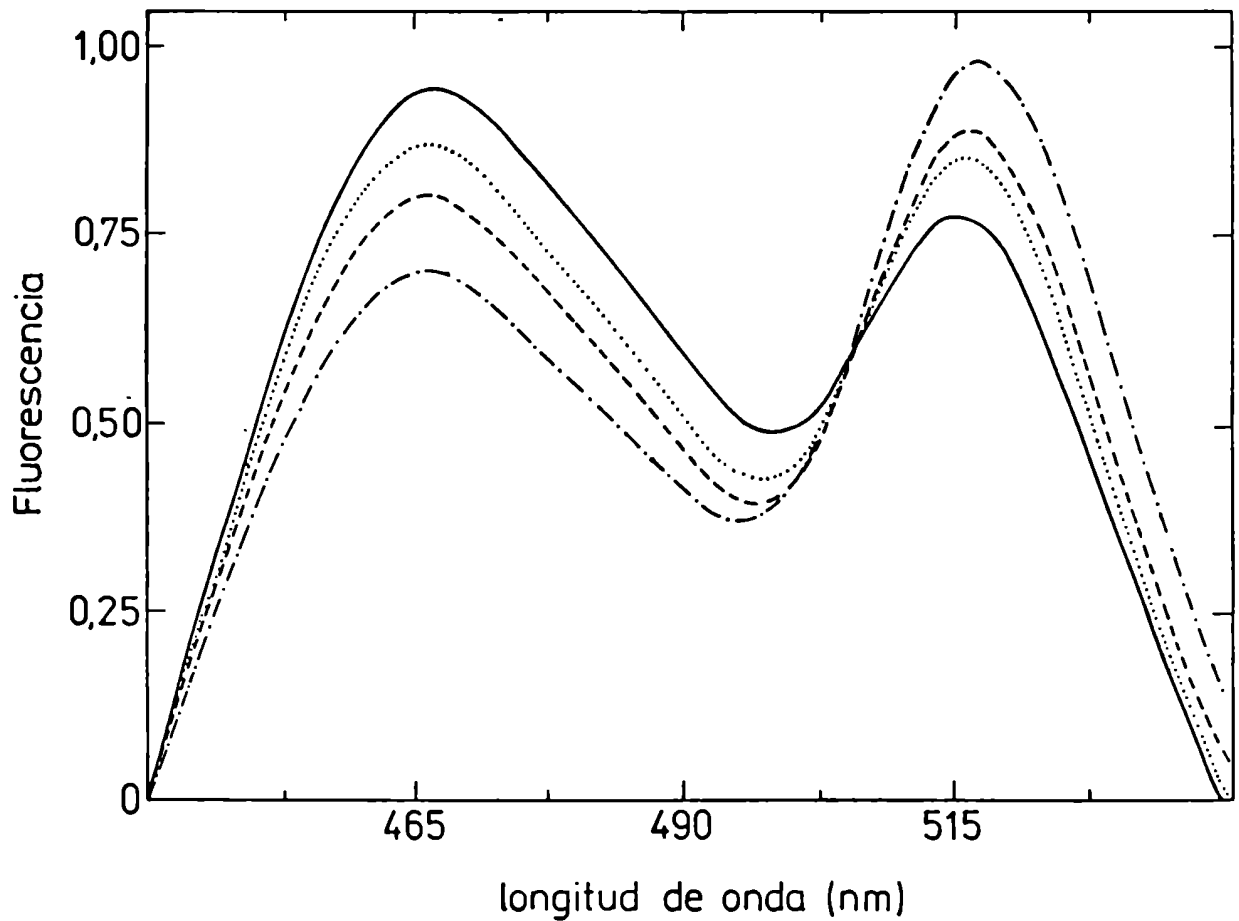


Figura 28: Espectros de emisión de fluorescencia de una mezcla equimolar de soluciones de H₄LDH de corazón porcino marcadas respectivamente con cumarina y fluoresceína fueron mezcladas y presurizadas hasta 1.4 kbar (50% de disociación) a 0°C por los siguientes tiempos: — 0 horas; 3 horas; --- 6 horas; -.-.- 14 horas. Los espectros fueron determinados 10 minutos luego de la descompresión. λ_{exc} : 385 nm.

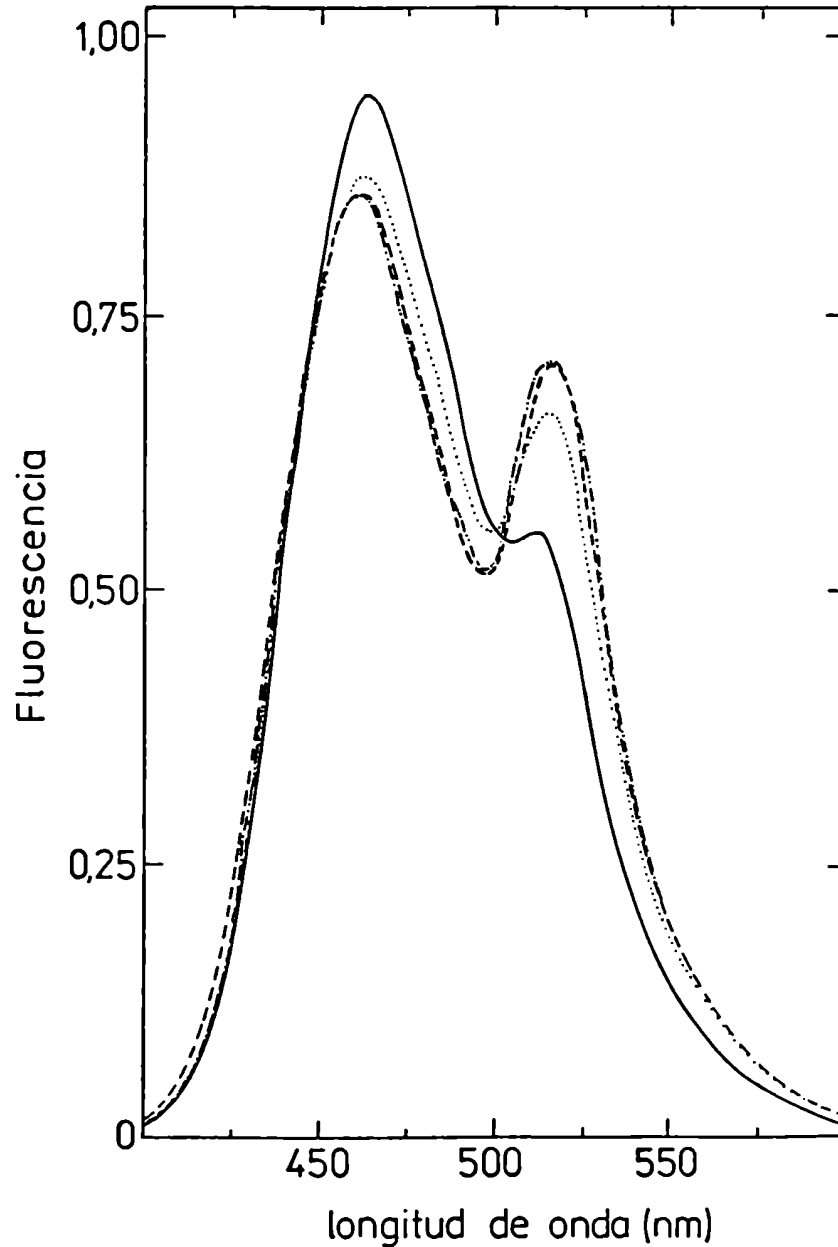


Figura 29:: Espectros de emisión de fluorescencia de una mezcla equimolar de soluciones de H₄LDH de corazón porcino marcadas respectivamente con cumarina y fluoresceína fueron mezcladas y presurizadas hasta 1.4 kbar (50% de disociación) a 25°C por los siguientes tiempos: — 0 horas; ---- 2 horas; -.-.- 5 horas. 2 horas a 25°C y presión atmosférica..... Los espectros fueron determinados 10 minutos luego de la descompresión. λ_{exc} : 385 nm.

Resultados y Discusión

La figura 29 muestra el mismo experimento realizado a 25 °C. Los valores de t_x/t_1 dan valores de 15 a 40 a bajas temperaturas. En los dímeros y en los tetrameros a 25°C, por el otro lado, el tiempo para que se produzca un completo intercambio entre las subunidades es comparable al del intercambio monómero-oligómero.

En el caso de la homotransferencia, cuando la solución de proteína marcada con fluoresceína se mezcló con un exceso de proteína sin marcar y se aplicó una presión que resultó en 50% de disociación, la polarización aumentó por dos causas diferentes: (1) La disociación en monómeros, los cuales se encuentran a una distancia a las que la transferencia no es posible; y (2) la separación de subunidades marcadas en los agregados, a medida que se forman nuevos agregados híbridos por reasociación de subunidades con y sin fluoróforo unido. Estos dos efectos pueden ser resueltos en el tiempo solamente en el caso en que las velocidades con que se producen la disociación y el intercambio de subunidades difiera en por lo menos un orden de magnitud.

En la figura 30 se observan los cambios en la polarización de estado estacionario de la GAPDH-fluoresceína, con un exceso molar de proteína sin marcar de un orden de magnitud, en una concentración final de 10^{-7} M. La línea sólida es la curva teórica para una suma de tres exponenciales con tiempos de relajación de 6 min, 98 min y 235 minutos y una amplitud relativa de 0.50, 0.25 y 0.25 respectivamente. A estos valores se les asigna el siguiente significado físico: la primera relajación corresponde al tiempo necesario para que se alcance el equilibrio del tetramero con sus subunidades, tal como ha sido detectado por otros métodos (t_1 , figura 17).

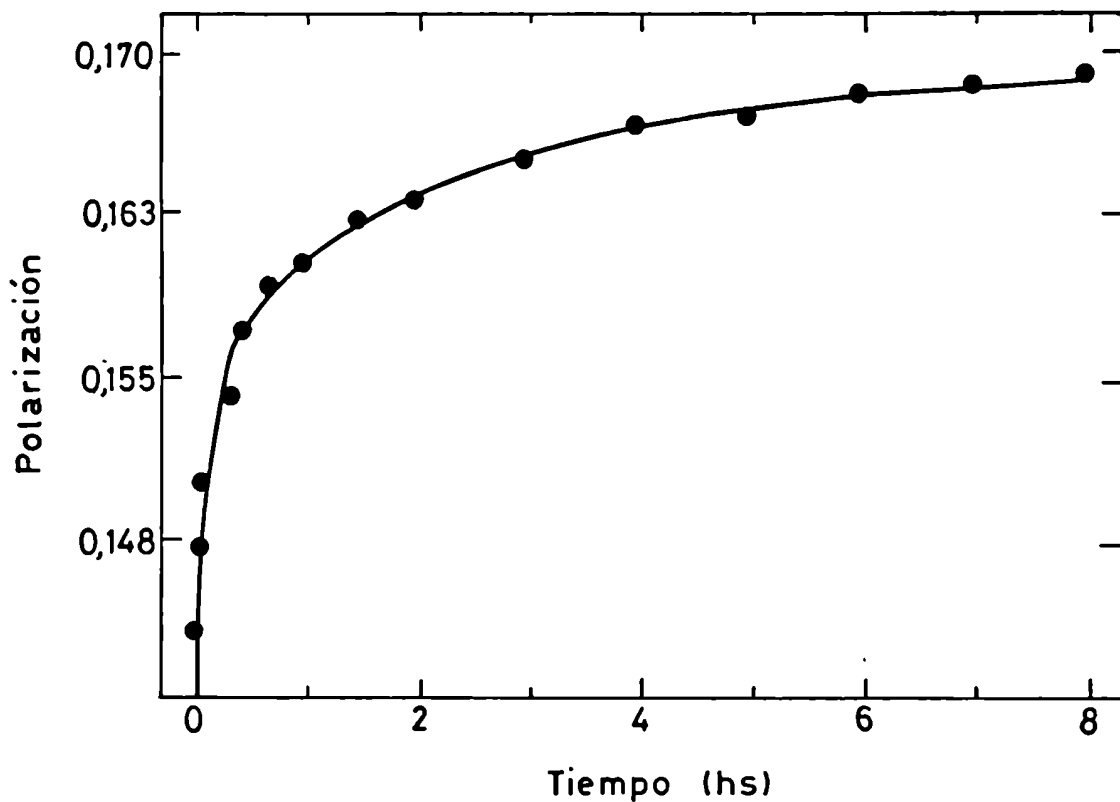


Figura 30: Evolución de la polarización de fluorescencia de una solución de GAPDH-fluoresceína (3 moléculas por tetramero), luego de ser mezclada con un exceso molar de 10 veces de solución sin marcar. $p = 1.4$ kbar ; Temp: 0°C . La línea sólida representa la suma de 3 exponenciales con tiempos de relajación/amplitudes relativas de 6min/0.50, 98 min/0.25 y 235 min/0.25.

Resultados y Discusión

Este proceso es llevado a cabo por la disociación de la mitad de las moléculas de tetrámero presentes en la preparación inicial (de allí la amplitud de 0.5). Los otros dos tiempos de relajación, dan cuenta de la mitad restante de las moléculas que no fueron disociadas en primera instancia. En este otro grupo los tiempos son respectivamente 16 y 39 veces más lentos que los correspondientes a la primera relajación, y son debidas al intercambio entre las subunidades disociadas con la población heterogénea de tetrámeros remanente (τ_x , figura 17).

Estos resultados muestran claramente que el equilibrio de disociación se alcanza en tiempos que son, por lo menos un orden de magnitud menores que aquellos necesarios para el intercambio entre las subunidades disociadas y las no disociadas.

Se realizó una estimación práctica del efecto de la presión sobre las velocidades de disociación $k_-(p)$ y asociación $k_+(p)$. Dicho efecto fue caracterizado por el factor f , cuyo valor está comprendido entre 0 y 1, y mide la influencia de la presión en las velocidades opuestas de equilibración. Como fue indicado en la sección de Materiales y Métodos, si $f=1$ el incremento en $K(p)$ es debido totalmente a un incremento en la disociación; si $f=0$ depende solamente de un decrecimiento de la velocidad de reasociación de las subunidades disociadas. Se realizó una estimación práctica de f , asumiendo que su valor es independiente de la presión, para lo cual se midieron los tiempos de relajación para alcanzar el equilibrio luego de un rápido aumento en la presión desde presión atmosférica hasta la presión necesaria para alcanzar $\alpha=1/2$, y el tiempo de relajación para un aumento subsiguiente en la presión desde la media disociación hasta la presión en que la disociación es total. Las correspondientes re-

Resultados y Discusión

lajaciones están caracterizadas por los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente, en los cuales se alcanzan e^{-1} de las correspondientes amplitudes de los cambios en el grado de disociación.

Se evaluaron experimentalmente los tiempos de relajación t_1 y t_2 para distintas proteínas, para lo cual se determinó el cambio en el centro de masa de la emisión intrínseca de las mismas, utilizando un analizador óptico multicanal, luego de incrementar rápidamente la presión, primero hasta 1.4 kbares y luego hasta 2.3 kbares. La enolasa, a una concentración de $1 \mu\text{M}$, exhibe un tiempo de relajación de 20 minutos, cuando se aumenta rápidamente la presión hasta producir 50% de disociación (figura 31b). Del mismo modo que se describió para el dímero β_2 de la triptofano sintetasa (Silva *et al*, 1986), la velocidad de disociación correspondería en este caso a la velocidad de disociación a presión atmosférica ($k = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Cuando la presión es incrementada hasta provocar la disociación completa el equilibrio es alcanzado en menos de un minuto (figura 31b). Debido a la gran diferencia entre esta velocidad de disociación y aquella observada cuando la solución se encontraba originalmente a presión atmosférica, es indudable que el aumento en la constante de disociación con la presión se debe a un efecto positivo de ésta sobre la velocidad de disociación.

En los tetrámeros estudiados, por el contrario, ambos procesos ocurren con velocidades comparables, como se observa para las dos relajaciones para una solución $1 \mu\text{M}$ de GAPDH (figura 31a).

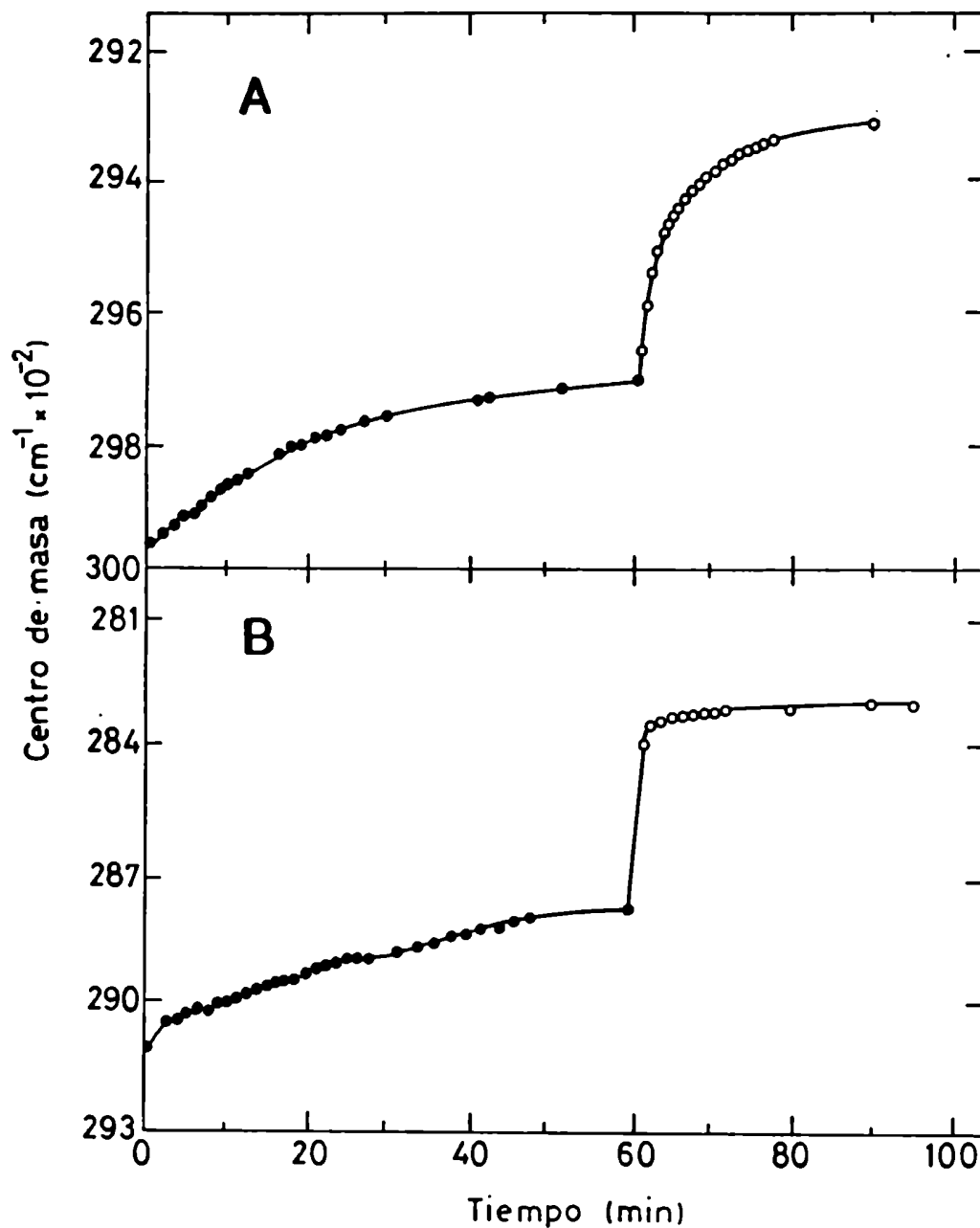


Figura 31: Variación del centro de masa de la emisión intrínseca luego de dos aplicaciones "instantáneas" sucesivas de presión. Las determinaciones se hicieron utilizando el analizador multicanal. Temp: 0°C C_{prot}: 1 μM.
 (a) GAPDH de levadura. $f= 0.3$.
 (b) enolasa de levadura $f= 0.8$.

Resultados y Discusión

Este experimento fue repetido con una serie de dímeros y tetrámeros y el resultado se muestra en la tabla V. Los valores de f para los dímeros y tetrámeros estudiados, a 0°C y 25°C, determinados de acuerdo a la dependencia lineal descrita en la sección de Materiales y Métodos, se graficaron en la figura 32. Resulta claro de este gráfico y de la comparación de los gráficos 31a y b con los gráficos 8a y b, que el efecto de la presión en dímeros es principalmente a través de una aceleración de la disociación ($f > 0.4$), mientras que en tetrámeros la presión actúa preferencialmente disminuyendo la velocidad de reasociación ($f < 0.25$). Este último hecho explica parcialmente el hecho que el tiempo necesario para que se intercambien las subunidades cuando se establece un grado intermedio de disociación (t_x), a bajas temperaturas, sea más de un orden de magnitud superior al tiempo requerido para alcanzar el equilibrio monómero-tetrámero (t_1).

El efecto preferencial de la presión sobre las velocidades de disociación en dímeros y de asociación en tetrámeros no es suficiente para interpretar completamente todas las observaciones experimentales presentadas. Cuando a un tetrámero en solución se le aplica una presión capaz de producir un dado grado de disociación (por ejemplo $\alpha = 0.5$), el equilibrio se mantiene por varias horas (figura 27). Para mantener dicho grado de disociación los tetrámeros que no han sido disociados en primera instancia no se pueden disociar a una velocidad mayor que la velocidad de reasociación de los monómeros. Esto significa que la mitad de las proteínas que han sido disociadas inicialmente a una velocidad mucho mayor, cuando la presión se incrementó hasta el valor correspondiente a un 50% de disociación deben ser diferentes de aquellas que no han sido disociadas inicialmente.

Resultados y Discusión

TABLA V: TIEMPOS DE RELAJACION LUEGO DE UN RAPIDO INCREMENTO EN LA PRESION (t_1 Y t_2 , Y DE INTERCAMBIO DE SUBUNIDADES (τ_x))

	0°C			25°C		
	τ_x	t_1	t_2	τ_x	t_1	t_2
dímeros						
β_2 trp sintetasa					15	<2
enolasa		20	<1			
hexoquinasa	40	10	4			
tetrameros						
LDH porcino	360	4	6	40	2	<2
GAPDH levadura	>360	20	10	60	12	5

Tiempos de relajación en minutos.

t_1 y t_2 fueron determinados a partir del cambio en el centro de masa luego de la aplicación de presión (ver figura 31).

Resultados y Discusión

En otras palabras, la solución original de tetrámeros consiste una población heterogénea de especies con distinta susceptibilidades a la presión, o lo que es equivalente, distinta energía libre de asociación de los monómeros.

Estas diferencias explican también las siguientes observaciones experimentales: luego de compresión hasta media disociación y subsiguiente descompresión hasta presión atmosférica, un segundo ciclo de compresión no provoca incremento adicional en la despolarización de una mezcla de GAPDH y GAPDH:fluoresceína (en relación molar 10:1). El mismo resultado se obtiene en experimentos utilizando la heterotransferencia: se obtiene idéntico espectro de emisión al final de cada ciclo de compresión hasta 50% de disociación y reasociación. Esto indica que las moléculas que se disocian en el segundo ciclo son las mismas que habían sido disociadas en el primero.

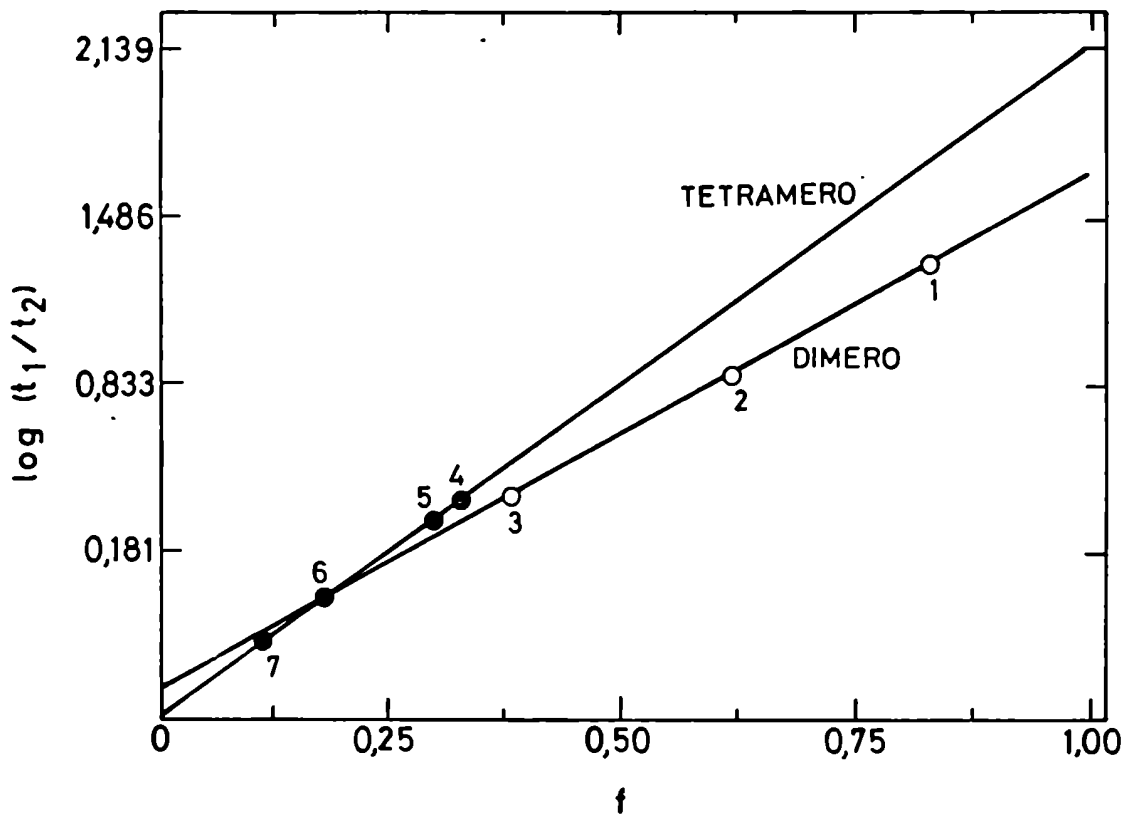


Figura 32: Dependencia lineal de f respecto del logaritmo del cociente entre dos tiempos de relajación sucesivos, t_1 y t_2 (fig 31) para dímeros y tetrameros. Los valores determinados experimentalmente fueron colocados en las líneas respectivas para mostrar las diferencias entre dímeros (círculos abiertos) y tetrameros (círculos cerrados).
 1: enolasa; 2: β_2 triptofano sintetasa; 3: hexoquinasa;
 4,5: GAPDH; 6,7: LDH.
 1,3,5,7: medidos a 0°C; 2,4,6: medidos a 25°C.

Resultados y Discusion

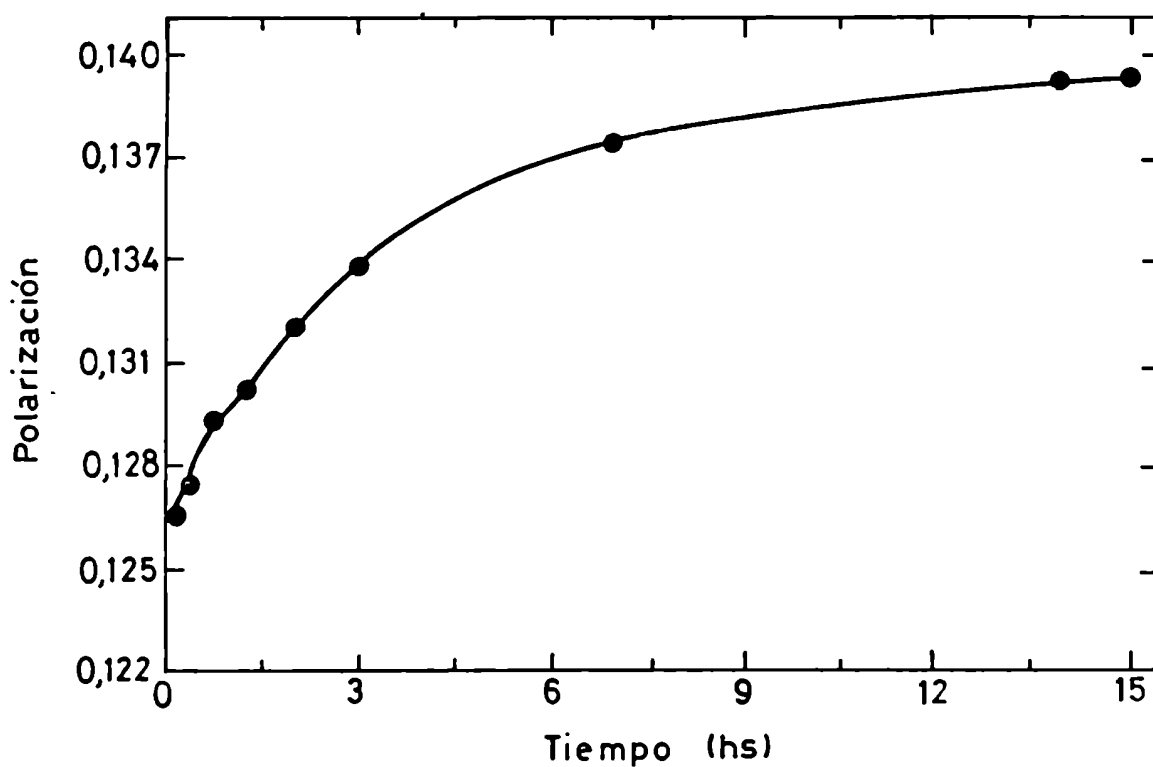


Figura 33: Cambios en la polarización de fluorescencia de una solución $5 \cdot 10^{-7}M$ de lactato deshidrogenasa de corazón porcino luego de descomprimir parcialmente a $0^{\circ}C$, desde una presión en donde se encuentra completamente disociadas (>2.2 kbar) hasta el valor correspondiente al 50% de disociación del oligómero nativo. Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 10.

Resultados y Discusión

3.8 REASOCIACION DE AGREGADOS "INCORRECTOS" EN LA LDH

Finalmente se determinó la velocidad reasociación cuando se descomprime parcialmente una solución, desde una presión en donde las proteínas se encuentran completamente disociadas (>2.2 kbar) hasta el valor correspondiente al 50% de disociación del oligómero nativo. El tiempo de relajación de este proceso es descrito por el valor t_{-2} . Como fue señalado con anterioridad, luego de la disociación los monómeros aislados comienzan a sufrir un cambio en la conformación que determina la pérdida parcial de afinidad respecto de la reasociación. Este efecto es revelado por la histéresis en la recuperación de una determinada propiedad espectroscópica, durante ciclos de compresión-descompresión (Silva et al, 1986; King y Weber, 1986; Ruan y Weber, 1988,1989). Esto significa que el tetrámero inactivo (*drifted*) no se forma apreciablemente bajo presiones del orden de p_4 o mayores. Sin embargo, como se observa en la figura 33, se produce una recuperación parcial de la polarización de GAPDH o LDH DENS-fluoresceína, aunque a una velocidad extremadamente lenta. Lo que resulta interesante del gráfico es el hecho que el tiempo t_{-2} resulta del mismo orden de magnitud que el tiempo τ_x , necesario para que se produzca el intercambio entre subunidades, diferencialmente afectadas por la presión.

La reasociación de tetrámeros inactivos resultó inesperada, ya que experimentos previos (King y Weber, 1986a; Ruan y Weber, 1989) mostraban la presencia de histéresis, luego de la descompresión parcial de soluciones de tetrámeros expuestas a presiones que provocaban disociación total de las mismas. Se diseñó el siguiente experimento para investigar las propiedades físicas y enzimáticas de las especies reasociadas.

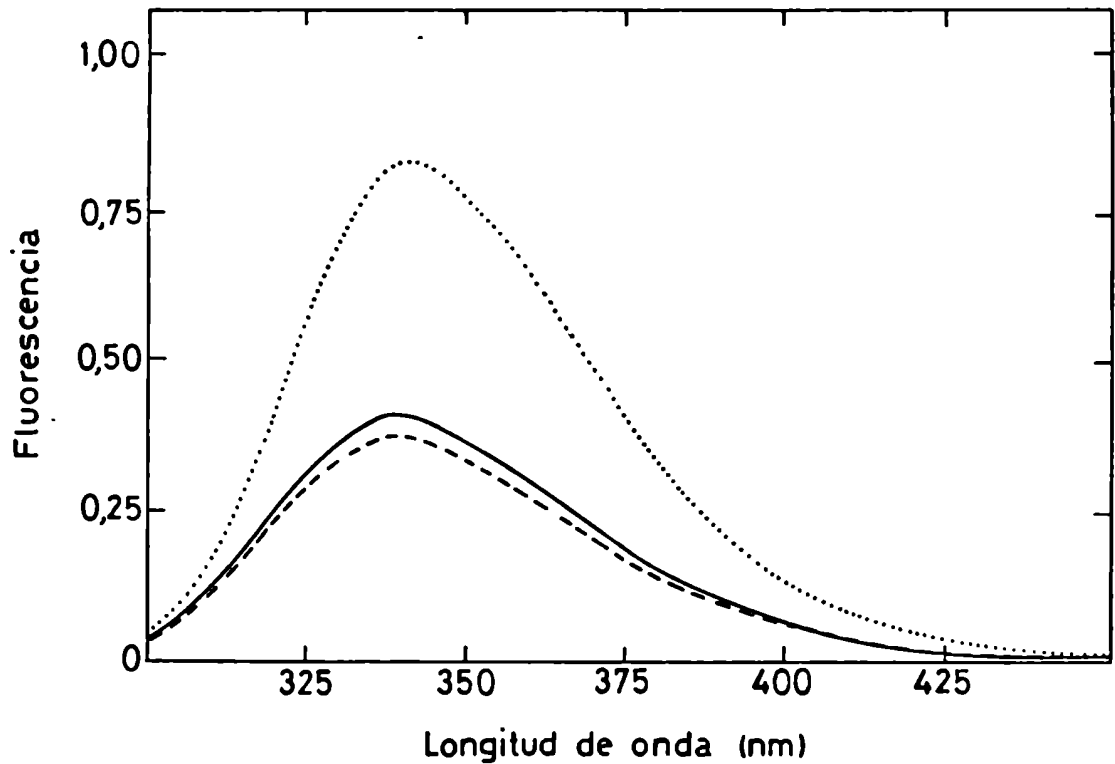


Figura 34: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de soluciones de LDH de corazón porcino ($1\mu\text{M}$) tomados a $\text{patm.}\lambda_{\text{exc}}: 295 \text{ nm}$; $\text{Temp.: } 0^\circ\text{C}$.
--- muestra comprimida hasta 2.2 kbar y rápidamente descomprimida (solución 1).
— muestra comprimida hasta 2.2 kbar, descomprimida parcialmente hasta 800 bares (14 horas) y descomprimida finalmente hasta presión atmosférica (solución 2).
..... muestra control (solución 3).

Resultados y Discusión

Tres soluciones de lactato deshidrogenas (concentración $1\mu\text{M}$) fueron sometidas a los siguientes tratamientos (a 0°C):

Solución 1: compresión hasta 2.2 kbar (para promover disociación total) y rápida descompresión hasta presión atmosférica.

Solución 2: compresión hasta 2.2 kbar (para promover disociación total) y descompresión parcial hasta 800 bares (14 horas) y descompresión final hasta presión atmosférica.

Solución 3: control (a presión atmosférica).

Más del 90 % de la actividad del control está ausente en las soluciones disociadas completamente por medio de la presión (soluciones 1 y 2). Sin embargo, en la solución 1 dicha actividad se recupera casi completamente luego de un período variable (entre 2 y 6 horas a temperatura ambiente. No se observó recuperación de la actividad en las condiciones ensayadas para la solución 2.

Los emisión intrínseca, debido a los residuos triptofano, por excitación a 295 nm es similar en ambas soluciones presurizadas, las cuales muestran un descenso en la intensidad de emisión y un ligero desplazamiento hacia mayores energías de aproximadamente 100 cm^{-1} respecto de la solución control (figura 34).

Ambas soluciones presurizadas se unen con gran afinidad al ANS, con un incremento de 10 y 12 veces, para las soluciones 1 y 2 respectivamente, en la fluorescencia respecto de la solución control (figura 35).

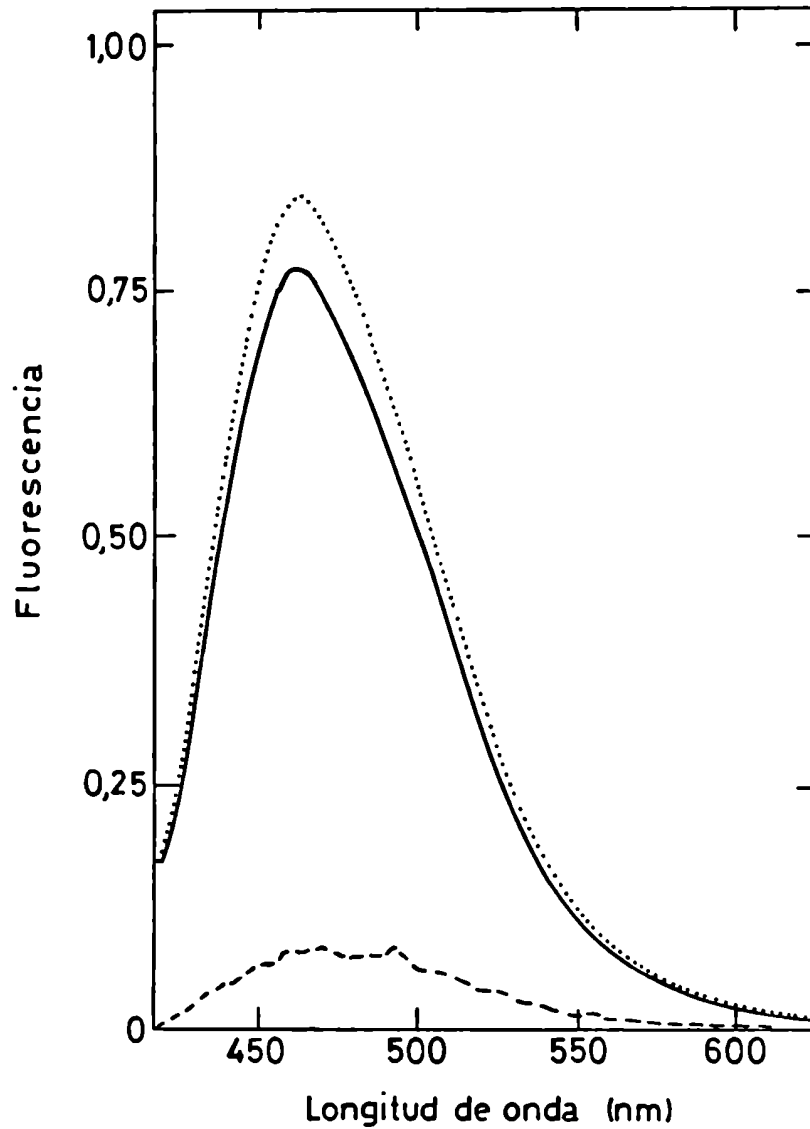


Figura 35: Espectro de complejos de LDH ($5 \cdot 10^{-8}$ M) con 1-anilino-8-naftalensulfonato ($5 \cdot 10^{-5}$ M). λ_{exc} : 360 nm.
..... muestra comprimida hasta 2.2 kbar y rápidamente descomprimida (solución 1).
— muestra comprimida hasta 2.2 kbar, descomprimida parcialmente hasta 800 bar (14 horas) y descomprimida finalmente hasta presión atmosférica (solución 2).
---- muestra control (solución 3).

Resultados y Discusión

Se sabe que el 1-anilino-8-naftalensulfonato se une con alta afinidad a varias deshidrogenasas, ocupando el lugar del NAD (Ellenrieder et al, 1972). Estas diferencias, como fue postulado previamente para la GAPDH (Ruan y Weber, 1989), indican una apreciable modificación conformacional cerca del sitio activo.

Identicamente a lo observado para la GAPDH de levadura (Ruan y Weber, 1989), el espectro de absorción diferencial entre la LDH inactivada por presión y la LDH nativa muestra un desplazamiento relativo hacia el azul de la transición L_b (revelado por el mínimo en 280 nm)(figura 36a). La diferencia en absorción de la proteína que ha sido disociada y permitido su reasociación a una presión intermedia (solución 2) muestra una característica distintiva que sugiere la posibilidad de formación de un complejo de transferencia de carga (TC, figura 36b). Dichos complejos aparecen como resultado de la transferencia de densidad electrónica desde un dador de electrones a un aceptor de electrones y la contribución energética es debida principalmente a interacciones electrostáticas y de polarización. Los residuos triptofano, tirosina y fenilalanina pueden actuar como potenciales dadores de densidad electrónica en la formación complejos de transferencia de carga. La formación de estos complejos requiere un ajustado arreglo espacial de grupos dadores y aceptores; ligeros cambios en la estructura de la proteína, que pueden afectar la accesibilidad de ciertos grupos capaces de formar complejos de TC, pueden determinar importantes efectos en el espectro de absorción.

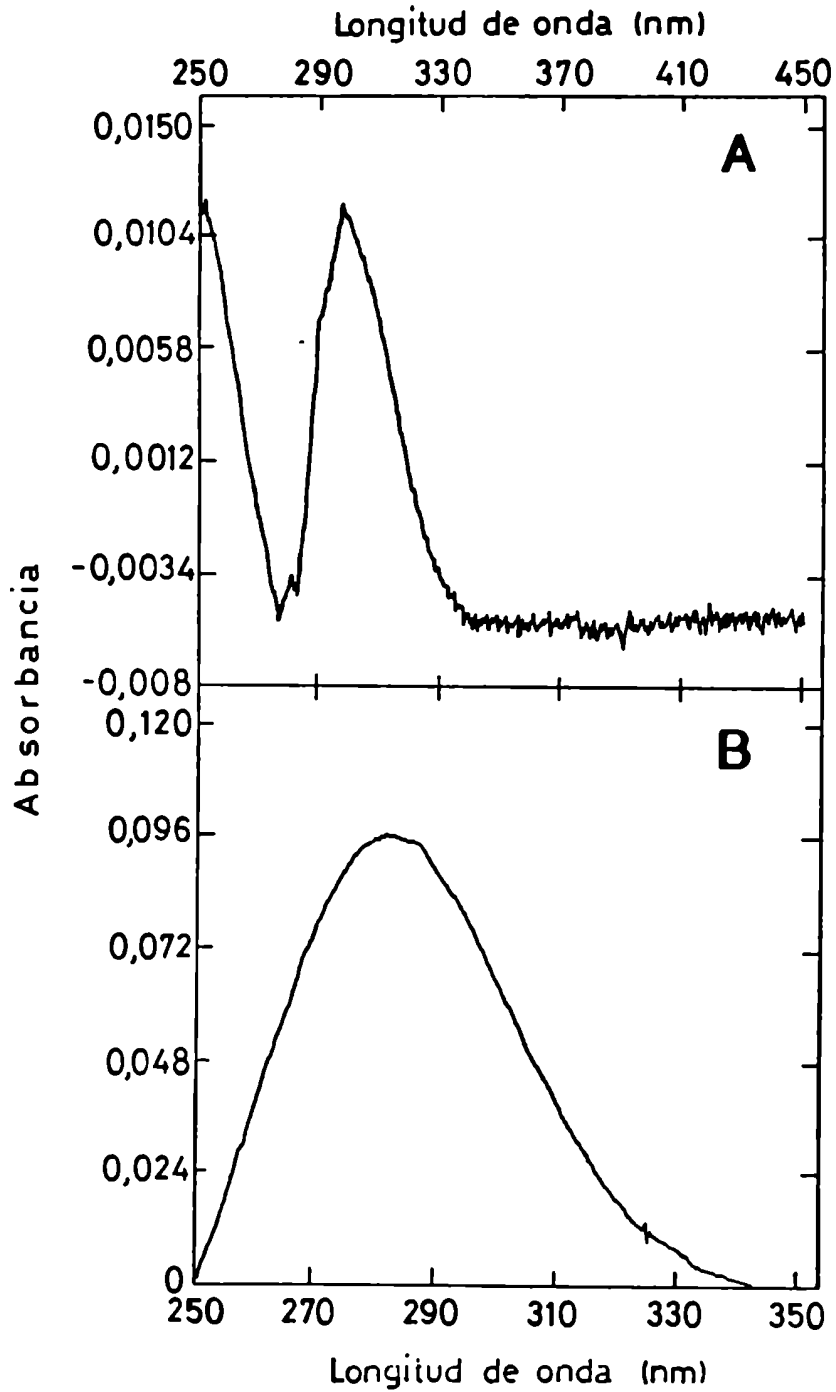


Figura 36: Espectros diferenciales de absorbancia. A las soluciones de LDH 1 y 2, obtenidas como se indica en el texto, se les restaron el espectro de absorción de la LDH nativa, de la misma concentración.
(a) solución 1 menos solución 3.
(b) solución 2 menos solución 3.
Los números refieren al texto y la figura 34.

Resultados y Discusión

La posibilidad de formación de complejos de TC entre residuos triptofano y anillos histidina en proteínas nativas o asociaciones de proteínas, fue sugerido por Shinitzy *et al.*, 1966) sobre la base de estudios de fluorescencia de mezclas de histidina y triptofano. Dichos complejos podrían contribuir a las fuerzas que determinan la estructura terciaria y cuaternaria de proteínas. No obstante, a pesar que son teóricamente posibles, no existe hasta el presente verificación experimental de su existencia. La dificultad proviene del hecho que los complejos de indol-imidazol, al igual que los complejos de indol-piridina (Shifrin *et al.*, 1964) pertenece a un grupo de complejos de transferencia de carga para los cuales no se detecta banda de absorción característica desplazada hacia mayores longitudes de onda, como es el caso de la mayoría de los complejos de TC, sino que aparece en el rango de absorción de los componentes, es decir en el rango 240-320 nm, dentro de la región de absorción del triptofano. No es posible el diseño de un experimento que permita identificar sin ambigüedad cuales son los residuos que están involucrados en la interacción descrita. Las estructuras que provienen de los mapas de difracción de rayos X (figura 37; Grau *et al.*, 1981) permiten especular la participación de la histidina 183 de una cadena y el triptofano 190 de otra cadena, que se encuentran próximos en el eje cristalográfico p. La verificación experimental requiere la modificación química de algunos de los residuos postulados o el reemplazo de los mismos por medio de métodos de genética molecular, por otros residuos que no son capaces de participar en el mismo tipo de interacciones.

Resultados y Discusión

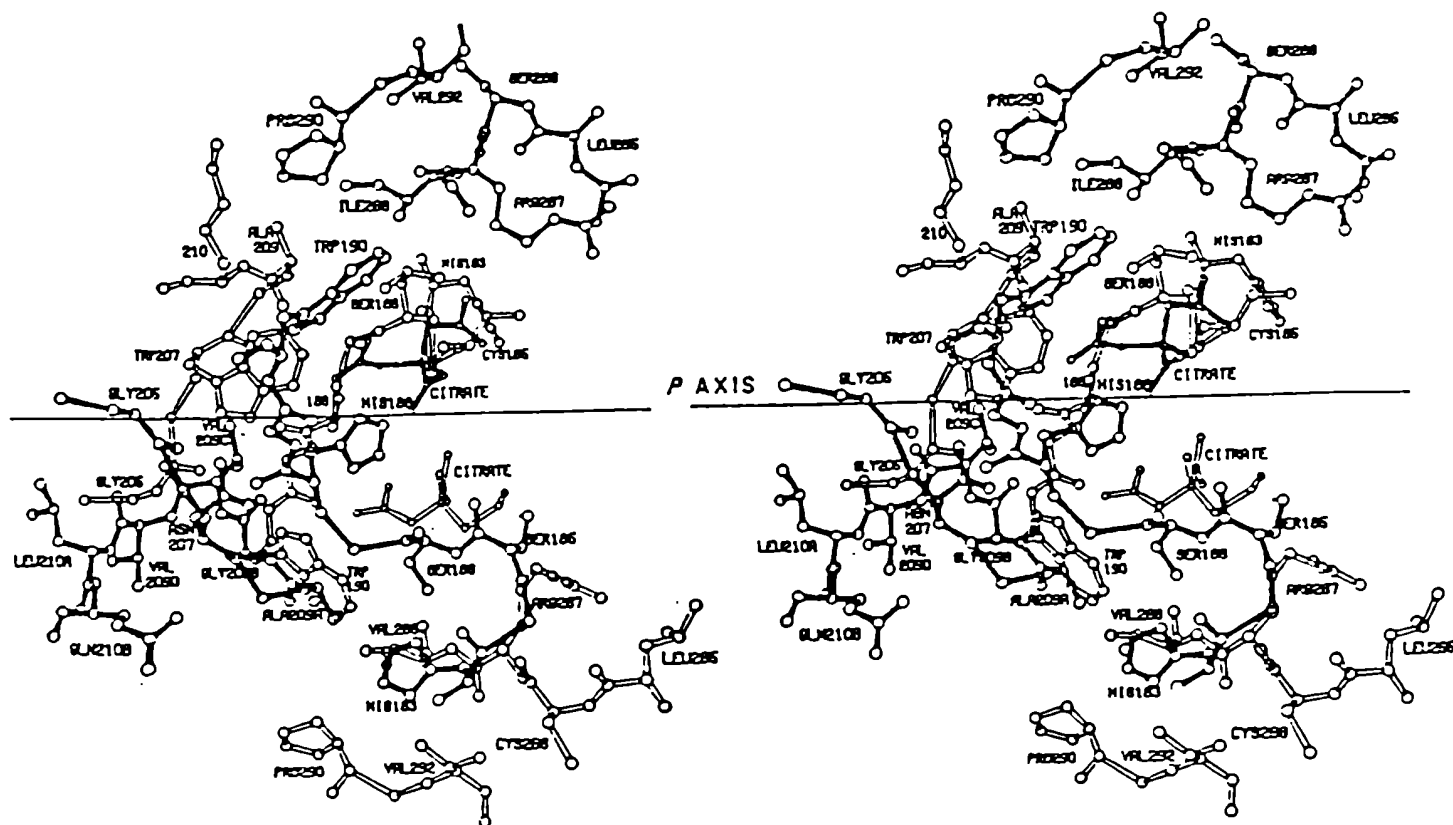


Figura 37: Estereodiagrama correspondiente a las interacciones en el eje P, entre subunidades en la lactato deshidrogenasa de corazón porcino.

Se señalan algunos aminoácidos que forman parte de las principales interacciones, incluyendo la histidina 183 y el triptofano 190. (Grau *et al*, 1981).

Resultados y Discusión

Debido al factor de azar en las interacciones moleculares, existe la posibilidad que ocurran de "reacciones secundarias". Como consecuencia, las células cometen pequeños errores con cierta frecuencia, y aún reacciones energéticamente desfavorables pueden ocurrir eventualmente. Los errores podrían ser evitados completamente sólo en el caso en que la célula pudiera desarrollar mecanismos con diferencias infinitas de energía entre distintas alternativas.

En estos experimentos se prueba que las condiciones del entorno en las que se encuentran las macromoléculas pueden influir de una forma fundamental en la formación de la estructura final. En los casos estudiados la estricta reproducibilidad de los resultados señala la participación de asociaciones específicas. Esto no implica necesariamente que una interacción específica da lugar a la estructura nativa, ya que, además de otras diferencias, las proteínas resultantes carecen de actividad enzimática. La formación de una interacción específica que da lugar a la estructura correcta podría estar relacionada con el requerimiento de moléculas chaperonas para el correcto ensamblado de complejos agregados (Ellis y Hemmingsen, 1989).

Resultados y Discusión

3.9 FORMACION DE AGREGADOS: LIMITACION DE LA HIPOTESIS DE AUTOENSAMBLADO.

La actividad biológica de las proteínas, en particular su actividad regulatoria y catalítica, depende en gran medida de su estructura tridimensional, es decir la conformación en solución y sus cambios. A su vez, la conformación es función de (a) las interacciones intramoleculares no covalentes, entre varios grupos funcionales de la macromolécula y (b) interacciones similares con el medio que la rodea: solvente, solutos y otras moléculas de proteína. Un tema central en biología molecular es la como se establece la estructura terciaria (y cuaternaria) en las proteínas, a partir de su estructura primaria.

Un dogma básico indica que la información genética reside y es transmitida únicamente en forma de secuencias lineales de nucleótidos, los genes, que son expresados y traducidos posteriormente para dar lugar a secuencias lineales de aminoácidos. Un corolario derivado en forma empírica y lógica, pero independiente de lo anterior, está estrechamente ligado al dogma central. Este otro principio, desarrollado desde el clásico trabajo de Anfinsen sobre la renaturalización de la ribonucleasa (Anfinsen, 1973) sostiene que la información necesaria y suficiente para especificar la estructura tridimensional, y en consecuencia la función, de un dado polipéptido reside solamente en su secuencia aminoacídica. Otros sistemas más complejos han sido, desde entonces, renaturalizados *in vitro*, dando lugar respectivamente, a proteínas funcionalmente activas y a complejos ácido nucleico-proteínas, incluyendo la formación de partículas

Resultados y Discusión

infecciosas de virus del mosaico del tabaco (Klug, 1979) y subunidades funcionales de ribosomas bacterianos a partir de sus componentes disociados (Nomura, 1973).

Sin embargo el proceso de autoensamblado no parece ser de cumplimiento universal, sino que presenta ciertas limitaciones. Recientemente se han identificado ciertas actividades enzimáticas que ejercen influencia sobre el plegamiento de proteínas *in vitro* y se acepta generalizadamente que cumplen una importante función *in vivo*. Se sabe actualmente que reacciones lentas de plegamiento de proteínas son aceleradas por una prolil *cis/trans* isomerasa (Lang *et al.* 1987) y más recientemente se aislaron de *Neurospora crassa* y células humanas, otras dos enzimas, homólogas entre sí, con actividad de prolil isomerasa, no relacionadas con la anterior (Tropschug *et al.*, 1990; Standaert *et al.* 1990). El rearrreglo de uniones disulfuro en polipéptidos es también acelerado enzimáticamente. En estos casos su participación está limitada a la cinética del proceso, ya que no determinan el camino a través del cual se desarrolla el plegamiento. No obstante, la isomerización de residuos prolina es un proceso intrínsecamente lento, y estas enzimas podrían servir como un dispositivo capaz de alternar la conformación de una proteína blanco entre formas inactivas y activas.

Nuevas evidencias sugieren que durante el plegamiento de las proteínas y su interacción con otras moléculas participan agentes externos al sistema. Un número fundamental de procesos celulares, además de la síntesis de proteínas, involucran una transiente exposición hacia el exterior de superficies con gran capacidad de interacción, es decir regiones hidrofóbicas o altamente cargadas, significativas en cuanto al contacto inter o intramolecular

Resultados y Discusión

(replicación de ADN, transporte de proteínas, recuperación de *stress* (shock de calor) (Ellis y Sommerfield, 1989). Por ejemplo, polipéptidos que atraviesan las membranas lo hacen en estado desplegado, de tal manera que se necesitan mecanismos moduladores del plegamiento de ambos lados de la membrana. La hipótesis del autoensamblado en su más estricta formulación asume que todas las interacciones entre estas superficies expuestas son totalmente específicas, aunque consideraciones energéticas muestran que el proceso de reconocimiento molecular nunca puede ser perfecto, (Alberts *et al.*, 1989). Por lo tanto parece probable que durante este proceso exista una cierta probabilidad para que ocurran interacciones inespecíficas que conducirían a la formación de estructuras no funcionales.

Todas las células se enfrentan con el problema general de prevenir la formación de estructuras incorrectas durante la exposición transiente de superficies interactivas. Los llamados chaperones moleculares (Ellis y Hemmingsen, 1989) son una familia ubicua de proteínas cuya función es la mediación en el plegamiento de algunas proteínas y el ensamblado de agregados oligoméricos en otras. Recientemente se mostró que las proteínas de respuesta a *stress* (Hsp70), que son constituyentes de células normales y se producen en abundancia en células expuestas a varios tipos de *stress* metabólico, se unen transientemente a porciones recién sintetizadas de otras proteínas y a medida que la proteína naciente madura, las Hsp70 se disocian para permitir el plegamiento de la proteína y el ensamblado de subunidades monoméricas en oligómeros (Beckman *et al.*, 1990).

Para muchas proteínas oligoméricas, tales como la aspartato transcarbamilasa de *Escherichia coli*, la presencia de subunidades es fácilmente explicada por la variedad de actividades o propie-

Resultados y Discusión

dades regulatorias adquiridas como resultado de la formación de complejos a partir de las proteínas individuales. Sin embargo, con las proteínas oligoméricas que contienen idénticas cadenas polipeptídicas, tal es el caso de las enzimas estudiadas en la presente tesis, no existe una explicación unívoca para la existencia de subunidades. Recientes investigaciones mostraron que en algunas proteínas oligoméricas los sitios activos están localizados en las interfases entre las cadenas polipeptídicas y que la actividad catalítica requiere de la participación conjunta de residuos aminoacídicos de cada cadena polipeptídica adyacente. Para tales enzimas, los monómeros son intrínsecamente inactivos, ya que carecen del "sitio activo compartido". Se puede postular, en otros casos, que los monómeros individuales se pliegan en una estructura terciaria compacta con superficies no polares expuestas, que las hacen insolubles y en esos casos la formación de oligómeros contribuye a la solubilidad de las enzimas funcionales. La formación de oligómeros produciría, por supuesto, proteínas de mayor tamaño, dificultando de este modo la permeabilidad a través de las membranas y también disminuiría la presión osmótica de varias organelas conteniendo grandes concentraciones de proteínas. Para varias proteínas, la formación de oligómeros confiere indudablemente mayor estabilidad respecto de los monómeros que las constituyen. En algunos casos las interacciones entre subunidades en los oligómeros activos causan cambios conformacionales en los monómeros, los cuales por sí mismos podrían no pliegarse para dar la conformación activa (Banaszak, L. *et al.* 1981).

3.10 HETEROGENEIDAD EN LAS POBLACIONES NATIVAS DE AGREGADOS MOLECULARES

Cuando una molécula de proteína, fluctuando alrededor de su conformación de equilibrio, encuentra otra molécula similar, forma un complejo con una baja energía libre de asociación, debido a los desfavorables contactos intermoleculares. El sistema, en adelante, comienza a acomodarse hacia una nueva energía promedio apropiada para el complejo. Sin embargo, las asociaciones moleculares son reversibles, y cuando ocurre una disociación espontánea, la macromolécula se relaja hacia su estado original. Si el complejo tiene tiempo suficiente para equilibrarse térmicamente antes que ocurra la disociación este proceso no provoca consecuencias. Pero cuando la vida media del complejo es relativamente corta, comparada con la relajación conformacional y el intercambio de energía con el entorno, la disociación espontánea se produce antes que la equilibración térmica tenga lugar y, mientras tanto, en el sistema se está produciendo una deriva conformacional hacia el nuevo estado energético de equilibrio. Más aún, mientras la proteína relaja hacia su estado original, puede encontrar otra molécula y repetirse el proceso. De acá se desprende, en términos cualitativos, que en tales circunstancias ni el monómero ni el oligómero van a alcanzar su verdadero estado de equilibrio, sino que pasarán la mayor del tiempo en grados intermedios de energía. Además, como la velocidad de encuentro molecular dependerá de la concentración, las energías promedio observadas de la subunidad aislada y asociada dependerán también de la concentración. Esto lleva a la interesante conclusión que los parámetros termodinámicos para el proceso de asociación molecular,

Resultados y Discusion

tales como la constante de equilibrio, dependen de la concentración, en una forma no clásica, y son controlados por las cinéticas relativas de los procesos de relajación inter- e intramolecular (Xu y Weber, 1981). A bajas concentraciones las asociaciones moleculares son raras y el complejo tiene una vida media demasiado corta para permitir la relajación hacia una conformación más favorable. Pero a altas concentraciones esta situación se revierte: la disociación espontánea, siendo un proceso de primer orden, continúa a la misma velocidad, pero el monómero libre no puede relajarse ya que encuentra rápidamente a otra molécula con la cual se asocia. Consecuentemente la energía interna promedio de la proteína asociada o disociada depende de la concentración y del grado de disociación en una forma inesperada desde el punto de vista convencional de los equilibrios de asociación molecular, pero que explican las observaciones experimentales en las proteínas estudiadas (Xu y Weber, 1981; Cooper, 1988, este trabajo).

La evaluación del proceso descrito a través de la figura 1, en la que se representa la energía libre de Gibbs en función de una coordenada conformacional (Weber, 1989), muestra claramente que el proceso de disociación, relajación parcial de los monómeros y reasociación de los mismos, conduce a la formación de agregados con ciertas diferencias conformacionales (aunque de igual tamaño, según indican los experimentos de polarización de fluorescencia), hecho que permite explicar la existencia de heterogeneidad en las poblaciones nativas de proteínas oligoméricas. La misma aparece como consecuencia natural de las diferencias en las conformaciones entre el monómero aislado y asociado.

Resultados y Discusión

Las velocidades de interconversión de las especies tetraméricas con diferentes susceptibilidades a la presión y la reasociación de los monómeros inactivos pueden ser pensadas como provenientes de un origen común: los movimientos de grupos adyacentes en las interfases entre subunidades. A mayores temperaturas (>25°C) estos movimientos son rápidos y el equilibrio es típicamente estocástico. A bajas temperaturas están parcialmente inhibidos y tanto el intercambio entre subunidades de las fracciones tetraméricas de diferente estabilidad, como el ajuste de las superficies monoméricas necesario para reconstruir los tetrámeros activos, están inhibidos en un grado similar. La primera circunstancia explica la estabilidad de las fracciones tetraméricas en comparación con los tiempos de equilibración y la segunda explica el extremadamente lento intercambio entre subunidades bajo la acción de la presión.

4. CONCLUSIONES

Conclusiones

En el presente trabajo se desarrolló la técnica de transferencia de energía electrónica de excitación entre fluoróforos dador y aceptor unidos covalentemente a proteínas, para el estudio de asociaciones moleculares. Las técnicas de hibridización del tipo de las usadas originalmente en el estudio de isoenzimas han sido de gran utilidad para el análisis de la "comunicación" entre cadenas polipeptídicas. Como muy a menudo no se dispone de variantes de una dada proteína oligomérica, es necesario producir proteínas alteradas a través de una específica modificación química. Usualmente se recurre al uso de anhídridos que reaccionan con grupos amino libres de las proteínas, convirtiendo residuos positivamente cargados en grupos cargados negativamente, lo cual produce generalmente una importante alteración en el comportamiento cromatográfico y movilidad electroforética de la proteína modificada (Meighen, *et al.*, 1970). El uso de reactivos fluorescentes permite la realización de estudios de hibridización en cualquier sistema, introduciendo la sensibilidad inherente a la espectroscopía de fluorescencia, con la ventaja adicional de no producir grandes modificaciones en la carga iónica, cuyos efectos sobre la conformación podrían ser severos.

Utilizando la presión hidrostática como variable capaz de producir la modificación en el grado de disociación, se demostró el intercambio entre subunidades en partículas no disociadas. Se realizó un estudio comparativo de la dinámica del equilibrio de disociación-asociación en dímeros y tetrámeros.

En dímeros sometidos a presiones capaces de inducir 50% de disociación, el intercambio entre subunidades se produce a una velocidad que se aproxima a la velocidad de disociación. En los

Conclusiones

tetrámeros: gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa a temperaturas menores de 4°C, los tiempos para el intercambio de subunidades son casi dos órdenes de magnitud mayores que los tiempos para lograr el equilibrio de disociación, mientras que a temperatura ambiente ambos tiempos resultan comparables.

Se determinó que el efecto de la presión consiste en incrementar preferencialmente la velocidad de disociación en dímeros y la de disminuir la velocidad de reasociación en tetrámeros. A partir de estas observaciones se concluyó que los tetrámeros constituyen una población heterogénea de partículas, cada una de las cuales es disociada por una presión de acuerdo a propiedades moleculares que pueden ser retenidas por un período de tiempo mucho mayor que el necesario para alcanzar el equilibrio de disociación.

El carácter determinístico de los procesos moleculares observados en una escala macroscópica, es el resultado de la estadística de un número suficientemente grande de eventos estocásticos independientes, por lo cual es razonable suponer que en algún nivel de la organización biológica, el comportamiento estocástico sea remplazado por el determinismo a nivel molecular. Observaciones previas indican que esto claramente el caso en los equilibrios de asociación en agregados de múltiples subunidades, como las cápsidas virales (Silva y Weber, 1988), eritrocuerina (Silva *et al.*, 1989) o hemocianina (Gomes *et al.*, 1990).

Las observaciones descriptas en la presente tesis demuestran que la transición estocástica-determinística es ya evidente en la asociación de subunidades monoméricas para formar un tetrámero.

Conclusiones

Las relaciones complejas entre las partes de una macromolécula conducen aparentemente a una severa restricción de los movimientos moleculares locales, pero sólo hasta un grado que permite lo que en el caso límite daría características individuales a cada partícula, suficientemente persistente como para conferir carácter determinístico a algunos de los procesos en los cuales participa.

5. BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. en *Molecular Biology of the Cell* (1989) Garland Publishing, Inc.; New York & London, pp. 94-95.
- Alcala, J., Gratton, E. Prendergast, F. (1987) *Biophysical J.* 51: 587.
- Anfinsen, C. (1973) *Science* 181: 223.
- Annual Book of ASTM (1983) pp. 785-791, method E925-83, ASTM, Philadelphia.
- Banaszak, L., Birtkoft, J. & Barry, C (1981) "Protein-protein interaction" (C. Frieden & L. Nichol eds.) New York (J. Wiley & Sons).
- Beckmann, R., Mizzen, L. & Welch, W. (1990) *Science* 248: 850.
- Brewer, J., Faini, G., Wu, C., Gross, L., Carreira, L. & Woijcik, R. (1978) en "Physical Aspects of Protein Interactions", N. Catsimpoulas, Ed. Elsevier., pp 57-60.
- Bunn, B. & McDonough, R. (1974) *Biochemistry* 13: 988.
- Colowick, S. (1973) en "The Enzymes", P. Boyer ed. vol 9, pp 2-31.
- Cooper, A. (1988) *J. Mol. Liq.* 39: 195.
- Dale, D. & Bauer, S. (1971) *Acta Phys Pol* A40: 853.
- Darrow, R. y Colowick, S. (1974) *Meth. Enzymol.*, Vol XXV: 226.
- Ellenrieder, G., Kirschner, K. & Schuster, I. (1972) *Eur. J. Biochem.* 26: 220.
- Ellis, J. & Hemmingsen, S. (1989) *TIBS* 14: 339.
- Ellis, J., van der Vies, M. & Hemmingsen, S. (1989) *Biochem. Soc. Symp.* 55: 145.
- Eventoff, W., Olsen, K. & Marvin, H. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 341: 327.

Bibliografía

- Everse, J. & Kaplan, N. (1973) *Advances in Enzymol.* (A. Meiter, ed.) Vol 37: pp 61-66.
- Forster T. (1948) *Z. Naturforsch* 49: 321.
- Friedel, R. & Orchin, M. (1951) en *Ultraviolet Spectra of Aromatic Compounds*, John Wiley and Sons, New York.
- Gennis, L., Gennis, R. & Cantor, C. (1972) *Biochemistry* 11: 2517.
- Gomes, F., Pereira, E., Bonafé, C. & Silva, J. (1990) en *Invertebrate Dioxigen Carriers*. Suchs & Suchs eds. Publisher, en prensa.
- Gratton, E. & Limkeman, M. (1983) *Biophys. J.* 44: 315.
- Grau, U., Trommer, W. & Rossmann, M. (1981) *J. Mol. Biol.* 151: 289.
- Harris, J. & Waters, M. (1976) en "*The Enzymes*", P. Boyer ed. 13: 28.
- Heremans, K. (1982) *Annu Rev. Biophys. Bioeng.* 11: 1.
- Hudson, E.N. (1970) *tesis doctoral*. University of Illinois, pp. 68-71.
- Jaenicke, R., Schmid, D. & Knof, S. (1968) *Biochemistry* 7: 919.
- King, L. & Weber, G. (1986a) *Biochemistry* 25: 3632.
- King, L. & Weber, G. (1986b) *Biochemistry* 25: 3637.
- Kirschner, K. & Voigt, B. (1968) *Z. Physiol. Chem.* 349: 632.
- Klug, H. (1979) *Harvey Lectures* 74: 141.
- Kosow, D. & Rose, I (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 2618.
- Lakowicz, J. (1984) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Publishing Corp. New York.

Bibliografía

- Lakowicz, J., Laczko, G., Cherek, H., Gratton, E. & Alcala, J. (1984) *Biophysical J.* 46: 463.
- Lehrer, S., Qian, Y. & Hvidt, S. (1989) *Science* 246: 926.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Lyles, D., Varela, V. & Parce, J.W. (1990) *Biochemistry.* 29: 2442.
- MacGregor, R. & Weber, G. (1986) *Nature* 319: 70.
- McNeirney, J. & Slavin, W. (1962) *Appl. Optics* 1: 365.
- Meighen, E., Pigiet, V. & Schachman, H (1970) *Proc. Natl. Acad. USA* 65: 234.
- Miller, J. (1981) en *Techniques in Visible and Ultraviolet Spectrometry* vol 2: Standards in Fluorescence Spectrometry, cap. 2: Monochromator Wavelength Calibration, Chapman & Hall, New York.
- Mielenz, K. (eds.) (1983) en *Optical Radiation Measurements*, vol 3: Measurements of Photoluminescence, Academic Press, New York.
- Muller, K., Ludeman, H. & Jaenicke, R. (1981a) *Biochemistry* 20: 5411.
- Muller, K., Ludeman, H. & Jaenicke, R. (1981b) *Bioph. Chem.* 14: 101.
- Nomura, M. (1973) *Science* 179: 864.
- Paladini, A.A. (1981) *tesis doctoral*. University of Illinois, pp. 35.
- Paladini, A.A. (1986) *Meth. Enzymol.* 130: 493.
- Paladini, A. A. & Erijman, L. (1988) *J. Biochem. Biophys. Methods* 17: 61.
- Paladini, A.A. & Weber, G. (1981a) *Rev. Sci. Instr.* 52: 419.
- Paladini, A.A. & Weber, G. (1981b) *Biochemistry* 20: 2587.

Bibliografía

- Royer, C., Weber, G., Daly, T. & Matthews, K. (1986) *Biochemistry* 25: 8308.
- Ruan, K. & Weber, G. (1988) *Biochemistry* 27: 3295.
- Ruan, K. & Weber, G. (1989) *Biochemistry* 28: 2144.
- Shifrin, S. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 81: 205.
- Shinitzky, M., Katchalski, E., Grisaro, V. & Sharon, N. (1966) *Arch. Biochem. Biophys* 116: 332.
- Silva, J. & Weber, G. (1987) *J. Mol. Biol.* 199: 149.
- Silva, J., Miles, E. & Weber, G. (1986) *Biochemistry* 25: 5730.
- Silva, J., Villas-Boas, M., Bonafé, C. & Meirelles, N. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 15863.
- Stryer, L. (1978) *Annu Rev. Biochem.* 47: 819.
- Torgerson, P., Drickamer, H. & Weber, G. (1979) *Biochemistry* 18: 3079.
- van den Oetealaar, P., van Someren, P., Thomson, J., Siesen, R. & Hoenders, H. (1990) *Biochemistry* 29: 3448.
- Velick, S. (1974) *Meth. Enzymol.* Vol XXIV: 401.
- Verjoski-Almeida, S., Kurtenbach, E., Amarin, A. & Weber, G. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 9872.
- Weber, G. & Drickamer, H. (1983) *Q. Rev. Biophys.* 16: 89.
- Weber, G. & Shinitzky, M. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65: 823.
- Weber, G. (1952) *Biochem. J.* 51: 155.
- Weber, G. (1953) *Advances Prot. Chem.* 8: 415.
- Weber, G. (1954) *J. Opt. Soc. Am.* 46: 962.

Bibliografia

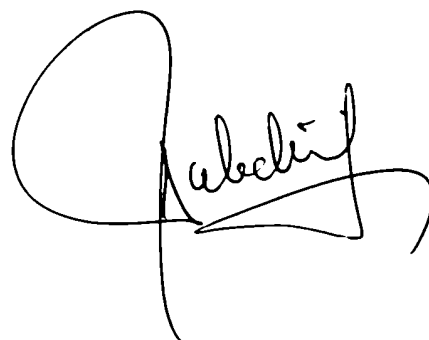
Weber, G. (1966) en *Fluorescence and Phosphorescence Analysis* (D. Hercules, eds.) New York, N.Y. Interscience.

Weber, G. (1986) *Biochemistry* 25: 3626.

Weber, G. (1987) *NATO ASI Ser. Ser. C N° 197* (R. Eldyk & J. Jonas eds.), pp 401-420.

Weber, G. (1989) *J. Mol. Liq.* 42: 255.

Xu, G. & Weber, G. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5268.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'G. Weber', with a long horizontal flourish extending to the left.A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'G. Xu', with a large loop at the top and a long horizontal flourish extending to the right.