

Utilización de diferentes modelos de ajuste para evaluar el *quenching* estático de fluorescencia: complejos nanopartículas proteicas-ligando

Oswaldo Sponton

Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, UNL

Palabras claves: fluorescencia, modelos, proteína, nanopartículas, ligando.

Área: Ciencias Exactas

Sub-Área: Química

INTRODUCCIÓN

En general, las interacciones proteína-ligando pueden ser caracterizadas a través de parámetros de unión (*binding*) como ser n y K , los cuales representan la estequiometría y la constante de asociación, respectivamente. La interacción proteína-ligando puede ser estudiada por medio de diferentes técnicas siendo la técnica de fluorescencia intrínseca el método más común (Joye, Davidov-Pardo, Ludescher, y McClements, 2015; Sponton, Perez, Carrara, y Santiago, 2015a). La fluorescencia intrínseca de una proteína se debe a la presencia de ciertos aminoácidos en la estructura proteica, siendo el más importante el triptófano (Trp). En presencia de un ligando, la intensidad de *fluorescencia* del Trp puede disminuir lo cual puede deberse a la formación de complejos proteína-ligando no fluorescentes. Este fenómeno se denomina *quenching* estático o *binding* (Lakowicz, 2006; van de Weert, y Stella, 2011).

Últimamente se han desarrollado nanopartículas proteicas, las cuales presentan habilidad de ligar moléculas. (Le Maux, Bouhallab, Giblin, Brodkorb, y Croguennec, 2013; Perez, Andermatten, Rubiolo, Santiago, 2014; Sponton y col., 2015). El estudio de la capacidad de *binding* de estas nanoestructuras por medio de fluorescencia intrínseca presupone una revisión de los modelos de ajuste habitualmente usados para la caracterización de proteínas nativas a fin de evaluar su aptitud. En este contexto, el presente trabajo se propone evaluar tres de los modelos más usados en estudios de *binding*: el modelo de Stern-Volmer, el doble logarítmico y el de Scatchard modificado. Para ello se trabajó con nanopartículas de ovoalbúmina (OVAn) y ácido linoleico como ligando (AL).

MATERIALES Y METODOS

Materiales

La ovoalbúmina y el AL fueron adquiridos en Sigma (USA). El fluoróforo extrínseco, 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid (ANS), fue comprado en Fluka Chemie AG (Switzerland).

Obtención de OVAn

Las OVAn fueron obtenidas por tratamiento térmico (85°C, 5 min) de soluciones de ovoalbúmina 10 g/L, pH 7,5, NaCl 50 mM. Estas condiciones permitieron obtener OVAn de 79 nm de diámetro hidrodinámico (Sponton y col., 2015).

Estudio de *binding* por fluorescencia

Las medidas de fluorescencia intrínseca (Trp) de las OVAn (0,043 g/L en buffer fosfato 50 mM pH 7) en presencia de concentraciones crecientes de AL (0-75 μ M) fueron realizadas en un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS55 (Reino

Unido). Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia intrínseca en un rango de longitud de onda de 310 a 360 nm con excitación a 280 nm.

Se calculó la intensidad de fluorescencia relativa (IFR-Trp) como la intensidad máxima de fluorescencia a una dada concentración de ligando dividida por la intensidad máxima de fluorescencia del sistema sin ligando.

Para el ajuste de los datos de fluorescencia se emplearon los siguientes modelos:

$$\text{a) Stern-Volmer: } \frac{F_0}{F} = K_a \cdot [L]_{\text{free}} + 1 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{b) Doble logaritmo: } \log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \cdot \log [L]_{\text{free}} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\text{c) Scatchard modificado: } [P] \cdot (1 - f_i) = \frac{[L]}{n} \cdot \left(\frac{1}{f_i} - 1 \right) - \frac{1}{K_a \cdot n} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$f_i = \frac{F - F_0}{F_{\text{max}} - F_0} \quad (\text{Ec. 4})$$

En estas ecuaciones F y F_0 son la intensidad máxima de fluorescencia con y sin ligando, respectivamente; K_a es la constante de asociación; $[L]_{\text{free}}$ y $[L]$ son la concentración de ligando libre y total, respectivamente; n es el número de sitios de unión al ligando de la proteína (Le Maux y col., 2013; van de Weert, y Stella, 2011).

Medidas de turbidez

Se midió la turbidez (absorbancia, ABS, a 400 nm) de soluciones de OVA_n 0,5 g/L en buffer fosfato 50 mM pH 7, en presencia de concentraciones crecientes (0-1,2 mM) de AL (Sponton y col., 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se observa la intensidad de fluorescencia relativa del Trp en función de la concentración de AL.

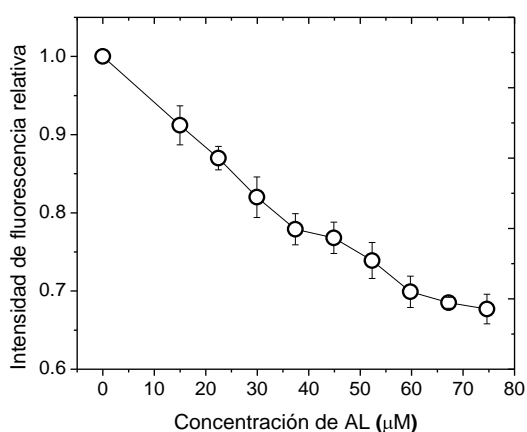


Figura 1. Curva de intensidad de fluorescencia intrínseca relativa del sistema OVA_n-AL.

Puede observarse que se registra una disminución de la fluorescencia conforme aumenta la concentración de AL, verificándose el fenómeno de *quenching*. A partir de los datos de la curva de la Figura 1 se realizaron ajustes con diferentes modelos a fin de obtener los parámetros de *binding*. Dicha información es presentada en la Tabla 1.

Es importante mencionar que, tal como se observa en las Ec. 1 y 2, tanto el modelo de Stern-Volmer como el doble logarítmico requieren de la concentración de ligando (AL) libre para el ajuste de los datos. Dicho valor suele ser difícil de determinar y por lo general puede tomarse igual al valor de la

concentración total de ligando $[L]$ cuando $[L]_{\text{libre}} \approx [L]$.

De acuerdo a Van der Weert y Stella (2011), esta condición se logra cuando la concentración de ligando es al menos 10 veces mayor que la concentración de proteína ($[L]/[P] > 10$). Solo bajo esta condición sería posible usar $[L]$ en lugar de $[L]_{\text{libre}}$ en las Ec. 1 y 2. En el presente trabajo se trabajó con una concentración de OVA_n de 1 μ M (tomando la concentración de OVA_n en base a la unidad monomérica de ovoalbúmina, teniendo en cuenta que las OVA_n se producen por la agregación de moléculas de OVA) y una concentración de AL en el rango de 15-75 μ M. Es decir, $[L]/[P] = 15-75$ mol AL/mol OVA_n, por ello se utilizaron los modelos de Stern-Volmer y doble logarítmico.

Tabla 1. Parámetros de binding (K_a y n) del sistema OVA_n-AL obtenidos por diferentes modelos. CV%: coeficiente de variación = desvío estándar/promedio*100 (3 réplicas). Para cada columna, letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Modelo	K_a [M^{-1}]	CV%	n	R^2
Stern-Volmer	$6,56 \pm 0,22 \times 10^3$ a	3,4%	-	$0,98 \pm 0,01$
Doble logarítmico	$8,99 \pm 6,97 \times 10^3$ a	77,5%	$1,0 \pm 0,1$ a	$0,97 \pm 0,02$
Scatchard Modificado	$2,17 \pm 1,40 \times 10^5$ b	64,8%	82 ± 31 b	$0,89 \pm 0,05$

En la Tabla 1 puede observarse que el modelo de Stern-Volmer y el doble logarítmico produjeron valores similares de K_a . Sin embargo, el modelo doble logarítmico presentó una gran dispersión (CV% = 77,5%), por lo que el modelo de Stern-Volmer sería más apropiado para hallar K_a . Por otro lado, con el modelo de Scatchard modificado se obtuvo un valor de K_a 2 órdenes de magnitud más grande que con los modelos antes mencionados, aunque con una alta dispersión. En la Tabla 1 también se observa el valor de n o número de sitios de unión al ligando sobre la proteína. El modelo doble logarítmico arrojó un $n = 1$. Considerando este valor surge una pregunta: ¿Cómo interpretar este valor de n para el sistema analizado en este trabajo? Para poder responder es necesario tener en cuenta que las OVA_n tendrían diferentes pesos moleculares contrariamente a lo que sucede con las proteínas nativas con un único peso molecular. Sin embargo, de acuerdo a la estequiometría del modelo doble logarítmico, parece que las OVA_n tendrían solo un sitio de unión. Por otro lado, el valor de n puede expresarse en base a la unidad monomérica de OVA (Le Maux y col., 2013). Este supondría que, por ejemplo, una nanopartícula de OVA compuesta de 5 moléculas de OVA tendría 5 sitios de unión. Por lo tanto, la otra pregunta que surge es la siguiente ¿cuántos sitios de unión tienen en realidad las OVA_n? Esta incertidumbre surgiría debido a que el modelo doble logarítmico no utiliza la concentración proteica como dato, sino solo los datos de fluorescencia, los cuales son más representativos de la concentración de fluoróforo que de la proteína. Es evidente, entonces, que dicho modelo no sería apropiado para obtener la estequiometría de *binding*. Además, de acuerdo a Van der Weert y Stella (2011), el modelo doble logarítmico no sería otra cosa que una linealización de la Ecuación de Hill, siendo n el coeficiente de Hill.

Para determinar la estequiometría también se realizó un ensayo de turbidez. En la Figura 2 se observa la turbidez de soluciones de AL con y sin OVA_n. El AL en solución acuosa forma autoensamblados supramoleculares (micelas/vesículas) que confieren turbidez a la solución (Sponton y col., 2015). Se observa que en presencia de OVA_n no se registra un aumento de turbidez hasta una dada concentración de AL. A partir de las ecuaciones lineales de ambos tramos de dicha curva se determinó una estequiometría AL:OVA_n = 56:1 (OVA_n en base monomérica). Este valor estaría en el mismo orden de magnitud que el valor n obtenido por medio del modelo de Scatchard.

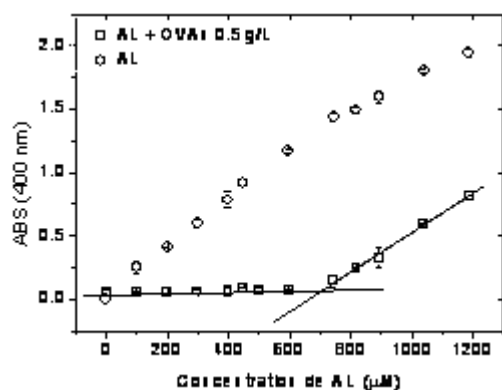


Figura 2. Turbidez (ABS a 400 nm) de soluciones de AL con y sin OVA.

En las mediciones de fluorescencia se usó una concentración

de OVA de 1 μM , por lo que teniendo en cuenta una estequiometría de binding AL:OVA = 56:1, la concentración de AL para alcanzar la saturación sería 56 μM (asumiendo que todas las moléculas de AL en solución se unen a la OVA). Esto significaría que para $[L]/[P] = 56$, $[L]_{\text{libre}}$ sería cero, por lo que el supuesto de que $[L]_{\text{libre}} \approx [L]$ para $[L]/[P] > 10$ no sería correcto. Esto descartaría el uso de los modelos que presentan $[L]_{\text{libre}}$ como variable. Sin embargo, el modelo de Stern-Volmer podría ser útil para cuantificar el *quenching* a través de K_a (Sponton y col., 2015).

CONCLUSIÓN

En este trabajo quedó en evidencia que el modelo doble logarítmico no es apropiado para estudios de *binding* a partir de fluorescencia. Por otro lado, se demostró que la condición $[L]/[P] > 10$ para poder aplicar las ecuaciones que requieren $[L]_{\text{libre}}$ no sería una hipótesis correcta. El modelo de Scatchard pareció ser el más adecuado aunque presentó parámetros con mucha dispersión.

REFERENCIAS

- Joye, I. J., Davidov-Pardo, G., Ludescher, R. D., McClements, D. J., 2015. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins. *Food Chemistry*, 185, 261–267.
- Lakowicz, J. R., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, Singapore/USA.
- Le Maux, S., Bouhallab, S., Giblin, L., Brodkorb, A., Croguennec, T., 2013. Complexes between linoleate and native or aggregated β -lactoglobulin: interaction parameters and in vitro cytotoxic effect. *Food Chemistry*, 141, 2305–2313.
- Perez, A. A., Andermatten, R. B., Rubiolo, A. C., Santiago, L. G., 2014. β -Lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 158, 66–72.
- Sponton, O. E., Perez, A. A., Carrara, C. R., Santiago, L. G., 2015. Linoleic acid binding properties of ovalbumin nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 219–226.
- van de Weert, M., & Stella, L., 2011. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure*, 998, 144–150.