

T. PUNE 16 / T 11-47

UNIVERSIDAD DE GRANADA



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 3-3-97
ENTRADA NUM: 666

Departamento de Química Física

CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA Y ESTRUCTURAL DE BILIPROTEÍNAS PROCEDENTES DE *SPIRULINA PLATENSIS*. APLICACIONES COMO MARCADORES FLUORESCENTES.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento b1337591x
N.º Copia i1785958x

Ruperto Bermejo Román

TESIS DOCTORAL

GRANADA

1997

UNIVERSIDAD DE GRANADA
19 FEB. 1997
COMISION DE DOCTORADO

Biblioteca Universitaria de Granada

01295911

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Química Física

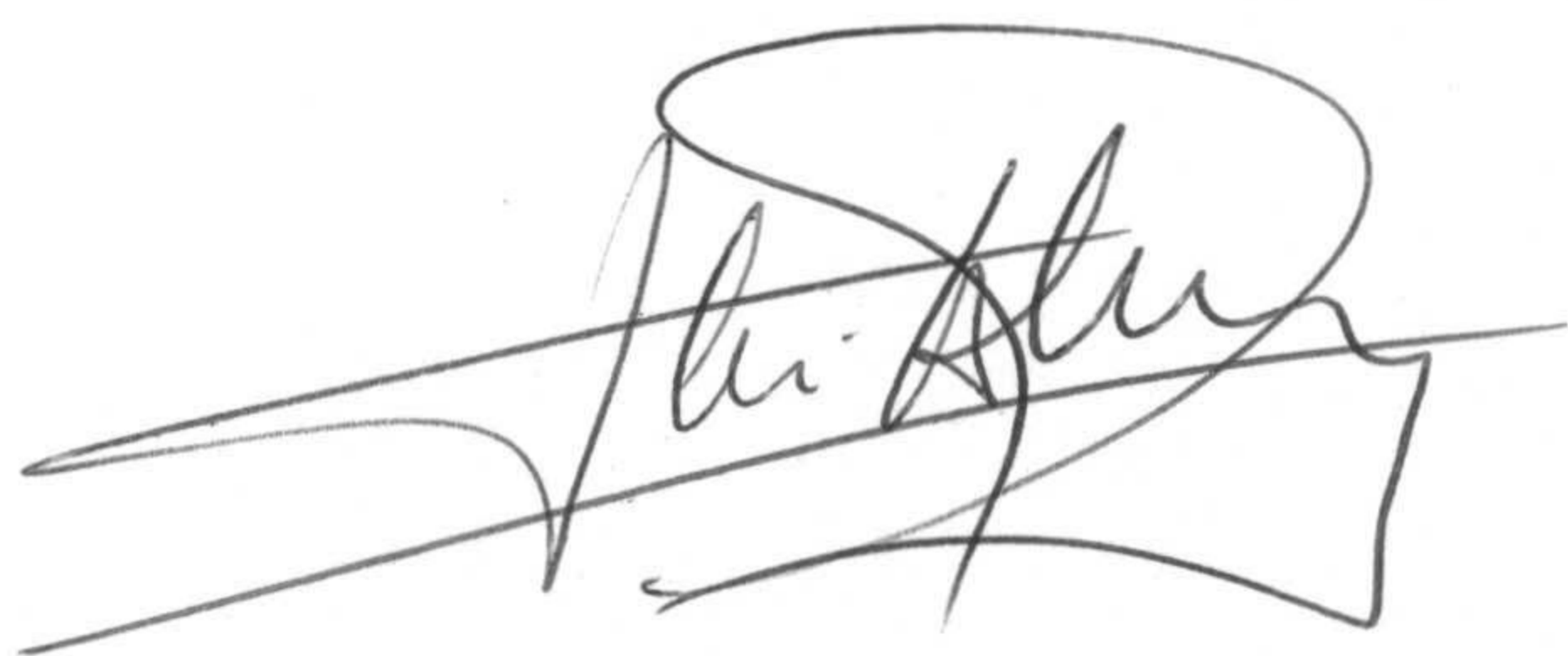
**CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA Y ESTRUCTURAL
DE BILIPROTEÍNAS PROCEDENTES DE *SPIRULINA PLATENSIS*.
APLICACIONES COMO MARCADORES FLUORESCENTES**

Memoria presentada para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS (SECCIÓN DE QUÍMICAS)

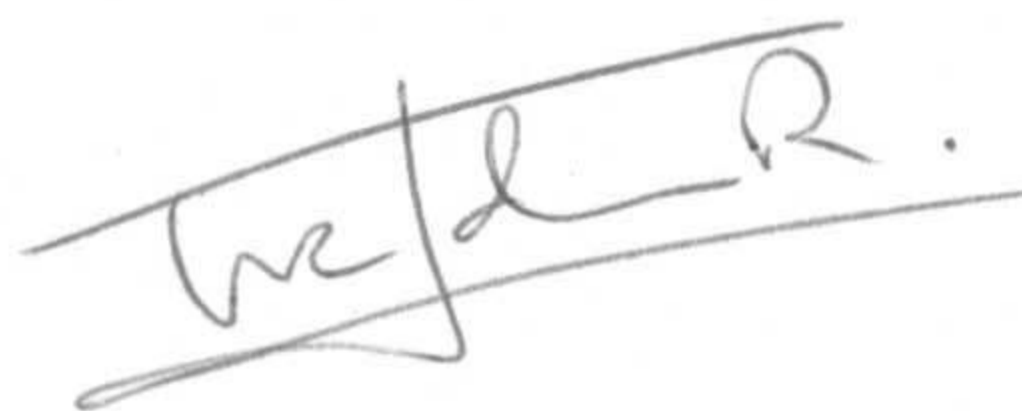
A handwritten signature in black ink, reading "R. Bermejo R.", enclosed within a large, stylized oval flourish.

Fdo.: Ruperto Bermejo Román
Licenciado en Ciencias Químicas
Granada, Febrero-1997

Los directores de la Tesis

A handwritten signature in black ink, reading "José María Álvarez Pez", written in a cursive style with a large, sweeping flourish underneath.

Fdo. Dr. D. José María Álvarez Pez,
Catedrático de Química Física de la
Universidad de Granada.

A handwritten signature in black ink, reading "Eva Mª Talavera Rodríguez", written in a cursive style with a horizontal line underneath.

Fdo. Dra. Eva Mª Talavera Rodríguez
Profesora Titular de Química Física de la
Universidad de Granada.

Deseo expresar mi satisfacción y alegría por la realización de esta Memoria y agradecer especialmente:

Al Catedrático Dr. D. José María Alvarez Pez y a la Dra. Eva María Talavera Rodríguez por la propuesta del tema objeto de esta Memoria, su dedicación, interés y valiosísimas enseñanzas, que junto a sus grandes conocimientos son motivo de mi agradecimiento, admiración y respeto. Gracias por ofrecerme la oportunidad de iniciarme en este apasionante campo que es la investigación.

Al Dr. D. Juan Manuel García Ruiz por su valiosa colaboración en el apartado de cristalización de biliproteínas.

A los Dres. D. Antonio Cardenete y D. Francisco Samaniego por su ayuda y colaboración.

A mis compañeros de trabajo Piedad, Jorge, Redouan, Luis, Moustafa, Judith, M^a Paz, Begoña y el resto de compañeros y profesores del Dpto. de Química Física, a los que debo tantos buenos y malos ratos.

A la empresa IMADE S.L. por su cooperación y ayuda al desarrollo de esta Memoria.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por su beca de Formación de Personal Investigador, que ha permitido mi formación y acceso al mundo de la investigación.

A mi hermana, familiares y amigos, que han seguido con interés mi trabajo y que también han ayudado a su culminación.

A mi padre, ejemplo constante de dedicación al trabajo y responsabilidad en la labor diaria. A mi madre, por su apoyo y cariño, sin la que todo hubiera sido distinto.

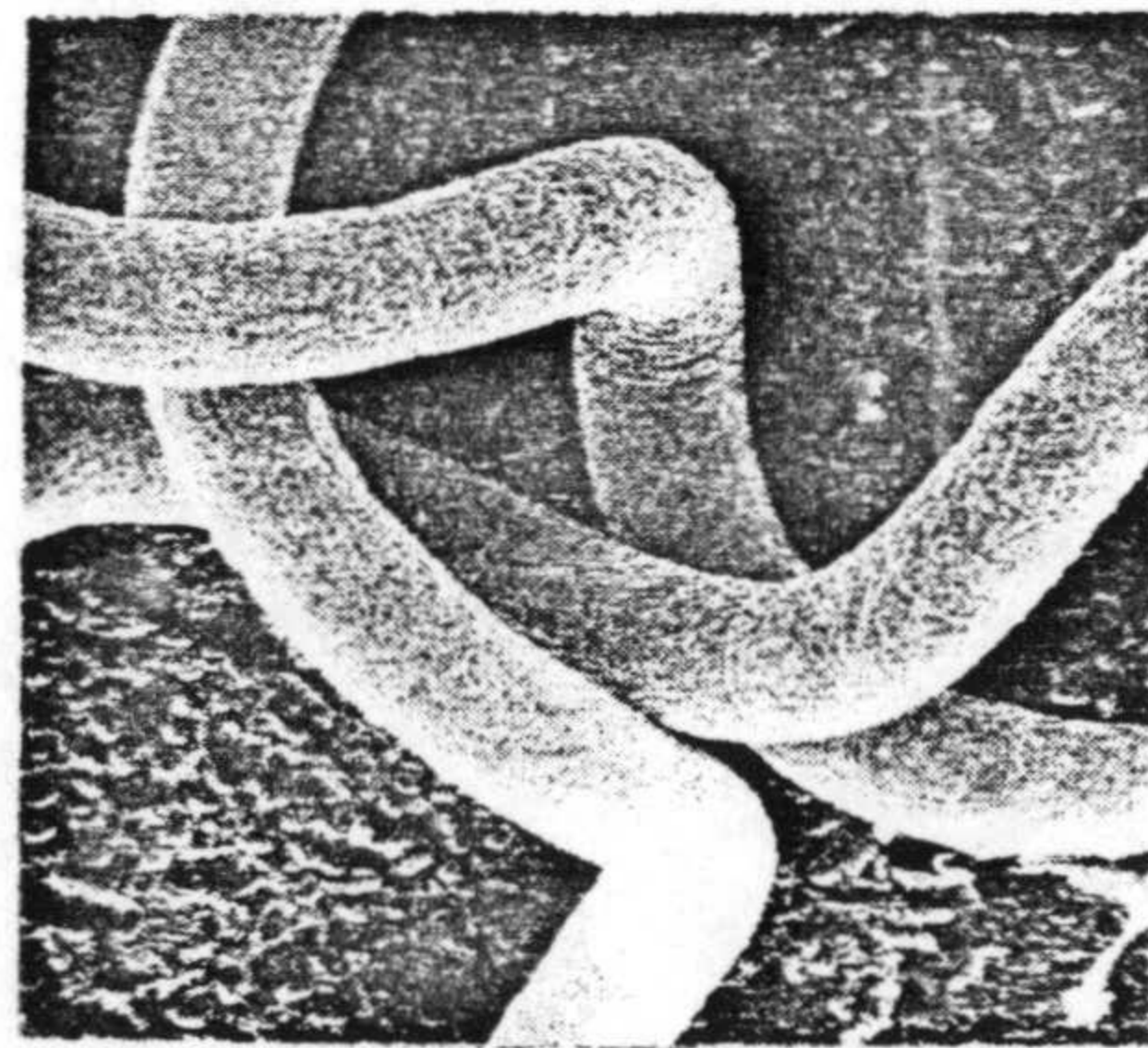
A Rafi Justicia, mi mujer, por su comprensión y apoyo, su inagotable paciencia y su compañía en los momentos de desaliento.

INVOCACIÓN

Vuestra especie apareció hace tan sólo un momento. Hace 50 años los humanos empezásteis a destruir los sistemas que mantienen la vida en nuestro planeta. Vuestra insólita capacidad para alterar la biosfera, mermar la capa de ozono, calentar el planeta, deforestar los suelos, extender los desiertos y contaminar tierras, aguas y aire nos ha llamado la atención.

No necesitamos para sobrevivir que os mostréis agradecidos por haberos entregado un hermoso planeta, pero cierta colaboración es imperativa. El saqueo que hacéis de la Tierra impide que la vida tenga oportunidad de desplegarse con toda su variedad. Si persistís en esa actitud, es probable que también vuestra especie perezca. Las algas sobreviviremos y con el transcurso de los eones, volveremos a alimentar nuevos brotes de vida.

Reconocemos que vuestro destino en este planeta es único. Sois la más inmadura de las especies, pero también la más interesante. Para sobrevivir y evolucionar, debéis curar el planeta en el curso de los próximos años. Abrazaos a nosotras, sed nuestros amigos y aprended de nuestra experiencia. Redescubrid la antigua sabiduría de vuestros antepasados biológicos.



Las microalgas

*A mis padres, a los que debo
gran parte de los que soy*

INDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| 1.-INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2.-ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS | 3 |
| 2.1.-IMPORTANCIA DE LAS MICROALGAS. | 3 |
| 2.2.-LAS MICROALGAS FRENTE A CULTIVOS CONVENCIONALES. | 4 |
| 2.3.-INTERÉS PRÁCTICO DE MICROALGAS. | 6 |
| 2.3.1.-Generalidades. | 6 |
| 2.3.2.-Utilización de proteínas y proteínas útiles. | 11 |
| 2.3.3.-Aplicaciones clínicas. | 13 |
| 2.4.-BILIPROTEÍNAS. | 14 |
| 2.4.1.-Características generales. | 14 |
| 2.4.2.-Nomenclatura y distribución. | 18 |
| 2.4.3.-Peso molecular. | 21 |
| 2.4.4.-Composición de aminoácidos. | 22 |
| 2.4.5.-Agregación. | 23 |
| 2.4.6.-Subunidades. | 26 |
| 2.4.7.-Modulación de las propiedades espectroscópicas. | 28 |
| 2.4.8.-Bilinas. | 30 |
| 2.4.8.1.-Estructura y formas de enlace al polipéptido. | 30 |
| 2.4.8.2.-Propiedades conformacionales y espectroscópicas. | 32 |
| 2.4.9.-Purificación de proteínas. | 34 |
| 2.4.10.-Caracterización por HPLC de biliproteínas. | 36 |
| 2.4.11.-Aplicaciones de las biliproteínas. | 37 |
| 2.4.11.1.-Utilización como colorantes naturales. | 37 |
| 2.4.11.2.-Utilización como marcadores fluorescentes. | 37 |
| 2.4.11.3.-Otras aplicaciones. | 39 |
| 2.5.-ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE PROTEÍNAS EN DISOLUCIÓN. | 39 |
| 2.5.1.-Generalidades. | 39 |
| 2.5.2.-Ventajas de la técnica. | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6.-CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS. | 48 |
| 2.6.1.-Cristalización controlada por difusión. | 48 |
| 2.6.1.1.-Cristalización en geles. | 49 |
| 2.6.1.2.-Cristalización en medios capilares. | 50 |
| 2.6.1.3.-Método de acupuntura en gel. | 51 |
| 2.6.2.-Cristalización de biliproteínas. | 51 |
| 2.7.-SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN DISOLVENTES | |
| HIDROCARBONADOS | 52 |
| 2.7.1.-Generalidades sobre los sistemas micelares. | 53 |
| 2.7.2.-Técnicas de solubilización. | 55 |
| 2.7.3.-Estructura de micelas reversas conteniendo proteínas. | 56 |
| 2.8.-UTILIZACIÓN DE ETIQUETAS FLUORESCENTES EN LA | |
| DETECCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. | 59 |
| | |
| 3.-MATERIALES Y MÉTODOS | 64 |
| | |
| 3.1.-MATERIALES. | 64 |
| 3.1.1.-Reactivos. | 64 |
| 3.1.2.-Instrumentación. | 66 |
| 3.1.3.-Material biológico. | 69 |
| 3.2.-TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN. | 70 |
| 3.2.1.-Extracción y purificación de biliproteínas. | 70 |
| 3.2.1.1.-Tratamientos previos. | 70 |
| 3.2.1.2.-Cromatografía de exclusión. | 72 |
| 3.2.1.3.-Cromatografía de Intercambio iónico. | 73 |
| 3.2.2.-Extracción y purificación de ficocianobilinas. | 76 |
| 3.3.-TÉCNICAS DE ANÁLISIS. | 78 |
| 3.3.1.-Espectroscopía de absorción. | 78 |
| 3.3.2.-Espectroscopía de fluorescencia de estado estacionario. | 78 |
| 3.3.3.-Espectroscopía de fluorescencia de tiempo resuelto. | 79 |
| 3.3.4.-Polarización de fluorescencia. | 80 |
| 3.3.5.-Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier. | 82 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.6.-Electroforesis SDS-PAGE. | 83 |
| 3.3.6.1.-Principio del método. | 83 |
| 3.3.6.2.-Geles de poliacrilamida. | 85 |
| 3.3.6.3.-Preparación de los geles. | 86 |
| 3.3.6.4.-Preparación de la muestra. | 88 |
| 3.3.6.5.-Desarrollo de la electroforesis. | 89 |
| 3.3.6.6.-Determinación pesos moleculares. | 90 |
| 3.3.7.-Cromatografía en capa fina de bilinas. | 90 |
| 3.3.8.-HPLC en fase reversa analítica | 91 |
| 3.4.-TÉCNICA DE ACUPUNTURA EN GELES. | 92 |
| 3.5.-INCLUSIÓN DE BILIPROTEÍNAS EN MICELAS REVERSAS. | 95 |
| 3.6.-CONJUGADOS BILIPROTEÍNAS-POLINUCLEÓTIDOS. | 98 |
| 3.6.1.-Modificación de polinucleótidos sintéticos. | 98 |
| 3.6.2.-Obtención del conjugado biliproteína-polinucleótido. | 99 |
| 3.7.-INCORPORACIÓN DE BILIPROTEÍNAS A CÉLULAS SANGUÍNEAS. | 102 |
| 3.7.1.-Obtención de linfocitos y hematies. | 102 |
| 3.7.2.-Incorporación de biliproteínas al interior celular. | 103 |
| 4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 105 |
| 4.1.-PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BILIPROTEÍNAS. | 105 |
| 4.1.1.-Cromatografía de exclusión molecular. | 105 |
| 4.1.2.-Cromatografía de intercambio iónico. | 110 |
| 4.1.3.-Determinación de pesos moleculares. | 115 |
| 4.1.4.-Determinación de parámetros espectroscópicos. | 117 |
| 4.1.4.1.-Coeficientes de extinción molar. | 118 |
| 4.1.4.2.-Intervalo lineal I_f frente a concentración. | 122 |
| 4.1.5.-Separación por HPLC de subunidades de biliproteínas. | 126 |
| 4.1.5.1.-Caracterización de subunidades de C-PC. | 126 |
| 4.1.5.2.-Caracterización de subunidades de APC. | 134 |
| 4.1.6.-Extracción y caracterización de ficocianobilinas. | 139 |
| 4.2.-CRISTALIZACIÓN DE BILIPROTEÍNAS. | 145 |
| 4.2.1.-Optimización del proceso de cristalización. | 145 |
| 4.2.2.-Corroboración de resultados. | 154 |
| 4.2.2.1.-Pruebas físicas. | 154 |
| 4.2.2.2.-Pruebas espectroscópicas. | 154 |
| 4.2.2.3.-Difracción de rayos-X. | 156 |

| | |
|---|---------|
| 4.3.-ESTABILIDAD DE BILIPROTEÍNAS. | 159 |
| 4.3.1.-Influencia de la temperatura. | 159 |
| 4.3.2.-Influencia del pH. | 163 |
| 4.4.-ESTRUCTURA SECUNDARIA DE BILIPROTEÍNAS (FT-IR) | 171 |
| 4.4.1.-Estructura secundaria de C-PC. | 171 |
| 4.4.2.-Estrucutra secundaria de APC. | 175 |
| 4.4.3.-FT-IR de ficocianobilinas. | 178 |
| 4.5.-POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA DE BILIPROTEÍNAS. | 179 |
| 4.6.-DEDETECCIÓN FLUORIMÉTRICA DE LA HIBRIDACIÓN DE ADN CON BILIPROTEÍNAS | 199 |
| 4.6.1.-Obtención de conjugados biliproteínas-polinucleótido. | 199 |
| 4.6.2.-Determinación del porcentaje de marca. | 218 |
| 4.6.3.-Utilización del conjugado en la detección fluorimétrica de la hibridación de cadenas complementarias en medios homogéneos. | 221 |
| 4.7.-BILIPROTEÍNAS EN MEDIOS MICROHETEROGÉNEOS. | 231 |
| 4.7.1.-Caracterización espectroscópica de biliproteínas en micelas. ... | 232 |
| 4.7.2.-Polarización de estado estacionario | 240 |
| 4.7.3.-Cinética de incorporación de las biliproteínas a las a las micelas. | 242 |
| 4.7.4.-Incorporación de biliproteínas a hematies. | 252 |
| 5.-CONCLUSIONES | 255 |
| 6.-BIBLIOGRAFIA | 258 |

ABREVIATURAS

C-PC: C-ficocianina
APC: aloficocianina
PEB: ficoeritrobilina
PUB: ficourobilina
PCB: ficocianobilina
PXB: ficobiliviolina
CPE: C-ficoeritrina
PM: peso molecular
da: dalton
A: absorbancia
SDS: dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
ps: picosegundos
ns: nanosegundos
DEAE: dietilaminoetil
TAG: técnica de acupuntura en gel
uv-vis: ultravioleta-visible
ADN: ácido desoxirribonucleico
ARN: ácido desoxirribonucleico
Poli(C): ácido polirribocitidílico
Poli (I): ácido polirriboinosínico
Poli(G): ácido polirriboguanidínico
SPDP: propionato de N-succinidimil,3-(2'piridiltio)
AOT: aerosol OT (di(2-etil-hexil)sulfosuccinato sódico)
DTT: ditioneitol
TFA: ácido trifluoroacético
PEG: polietilenglicol

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---------------|-----|
| Tabla 2-I | 4 |
| Tabla 2-II | 5 |
| Tabla 2-III | 5 |
| Tabla 2-IV | 9 |
| Tabla 2-V | 10 |
| Tabla 2-VI | 11 |
| Tabla 2-VII | 12 |
| Tabla 2-VIII | 13 |
| Tabla 2-IX | 19 |
| Tabla 2-X | 20 |
| Tabla 2-XI | 23 |
| Tabla 2-XII | 27 |
| Tabla 2-XIII | 29 |
| Tabla 2-XIV | 43 |
| Tabla 2-XV | 55 |
| Tabla 2-XVI | 58 |
| Tabla 3-I | 88 |
| Tabla 3-II | 97 |
| Tabla 4-I | 106 |
| Tabla 4-II | 111 |
| Tabla 4-III | 111 |
| Tabla 4-IV | 115 |
| Tabla 4-V | 118 |
| Tabla 4-VI | 121 |
| Tabla 4-VII | 122 |
| Tabla 4-VIII | 124 |
| Tabla 4-IX | 127 |
| Tabla 4-X | 130 |
| Tabla 4-XI | 141 |
| Tabla 4-XII | 143 |
| Tabla 4-XIII | 146 |
| Tabla 4-XIV | 150 |
| Tabla 4-XV | 159 |
| Tabla 4-XVI | 161 |
| Tabla 4-XVII | 174 |
| Tabla 4-XVIII | 174 |

| | |
|----------------------|-----|
| Tabla 4-XIX | 176 |
| Tabla 4-XX | 177 |
| Tabla 4-XXI | 181 |
| Tabla 4-XXII | 182 |
| Tabla 4-XXIII | 209 |
| Tabla 4-XXIV | 210 |
| Tabla 4-XXV | 213 |
| Tabla 4-XXVI | 222 |
| Tabla 4-XXVII | 223 |
| Tabla 4-XXVIII | 228 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|-------------------|-----|
| Figura 2-1 | 7 |
| Figura 2-2 | 8 |
| Figura 2-3 | 15 |
| Figura 2-4 | 16 |
| Figura 2-5 | 18 |
| Figura 2-6 | 31 |
| Figura 2-7 | 32 |
| Figura 2-8 | 35 |
| Figura 2-9 | 41 |
| Figura 2-10 | 45 |
| Figura 2-11 | 46 |
| Figura 2-12 | 54 |
| Figura 2-13 | 56 |
| Figura 2-14 | 57 |
| Figura 3-1 | 71 |
| Figura 3-2 | 72 |
| Figura 3-3 | 74 |
| Figura 3-4 | 75 |
| Figura 3-5 | 77 |
| Figura 3-6 | 84 |
| Figura 3-7 | 85 |
| Figura 3-8 | 92 |
| Figura 3-9 | 94 |
| Figura 3-10 | 95 |
| Figura 3-11 | 98 |
| Figura 3-12 | 99 |
| Figura 3-13 | 100 |
| Figura 3-14 | 101 |
| Figura 3-15 | 103 |
| Figura 4-1 | 107 |
| Figura 4-2 | 108 |
| Figura 4-3 | 109 |
| Figura 4-4 | 112 |
| Figura 4-5 | 112 |
| Figura 4-6 | 113 |

| | |
|-------------|-----|
| Figura 4-7 | 114 |
| Figura 4-8 | 116 |
| Figura 4-9 | 119 |
| Figura 4-10 | 120 |
| Figura 4-11 | 123 |
| Figura 4-12 | 125 |
| Figura 4-13 | 127 |
| Figura 4-14 | 128 |
| Figura 4-15 | 129 |
| Figura 4-16 | 131 |
| Figura 4-17 | 132 |
| Figura 4-18 | 134 |
| Figura 4-19 | 135 |
| Figura 4-20 | 136 |
| Figura 4-21 | 137 |
| Figura 4-22 | 140 |
| Figura 4-23 | 141 |
| Figura 4-24 | 142 |
| Figura 4-25 | 142 |
| Figura 4-26 | 143 |
| Figura 4-27 | 144 |
| Figura 4-28 | 147 |
| Figura 4-29 | 148 |
| Figura 4-30 | 152 |
| Figura 4-31 | 153 |
| Figura 4-32 | 155 |
| Figura 4-33 | 156 |
| Figura 4-34 | 158 |
| Figura 4-35 | 160 |
| Figura 4-36 | 162 |
| Figura 4-37 | 164 |
| Figura 4-38 | 165 |
| Figura 4-39 | 166 |
| Figura 4-40 | 167 |
| Figura 4-41 | 168 |
| Figura 4-42 | 169 |
| Figura 4-43 | 170 |
| Figura 4-44 | 171 |

| | |
|-------------|-----|
| Figura 4-45 | 172 |
| Figura 4-46 | 173 |
| Figura 4-47 | 175 |
| Figura 4-48 | 176 |
| Figura 4-49 | 177 |
| Figura 4-50 | 183 |
| Figura 4-51 | 184 |
| Figura 4-52 | 185 |
| Figura 4-53 | 186 |
| Figura 4-54 | 189 |
| Figura 4-55 | 193 |
| Figura 4-56 | 194 |
| Figura 4-57 | 196 |
| Figura 4-58 | 198 |
| Figura 5-59 | 200 |
| Figura 4-60 | 201 |
| Figura 4-61 | 202 |
| Figura 4-62 | 203 |
| Figura 4-63 | 204 |
| Figura 4-64 | 205 |
| Figura 4-65 | 206 |
| Figura 4-66 | 207 |
| Figura 4-67 | 208 |
| Figura 4-68 | 212 |
| Figura 4-69 | 213 |
| Figura 4-70 | 214 |
| Figura 4-71 | 215 |
| Figura 4-72 | 224 |
| Figura 4-73 | 225 |
| Figura 4-74 | 226 |
| Figura 4-75 | 227 |
| Figura 4-76 | 228 |
| Figura 4-77 | 229 |
| Figura 4-78 | 233 |
| Figura 4-79 | 234 |
| Figura 4-80 | 235 |
| Figura 4-81 | 236 |
| Figura 4-82 | 237 |

| | |
|-------------|-----|
| Figura 4-83 | 239 |
| Figura 4-84 | 240 |
| Figura 4-85 | 241 |
| Figura 4-86 | 243 |
| Figura 4-87 | 244 |
| Figura 4-88 | 245 |
| Figura 4-89 | 246 |
| Figura 4-90 | 247 |
| Figura 4-91 | 248 |
| Figura 4-92 | 249 |
| Figura 4-93 | 250 |
| Figura 4-94 | 251 |
| Figura 4-95 | 253 |

1.-INTRODUCCIÓN.

La posibilidad de utilizar la eficaz maquinaria fotosintética de las microalgas para la producción de biomasa ha motivado extensos estudios sobre el cultivo de las mismas y desde la década de 1950, se han cultivado éstas como fuente natural de proteínas (Tamiya, 1957). Además se han desarrollado un gran número de aplicaciones potenciales basadas en la explotación de la capacidad que tienen los organismos fotosintéticos para producir una considerable variedad de productos bioquímicos de potencial interés comercial (Aaronson y col., 1980; Shelef y Soeder, 1980; Dubinsky y col., 1988).

Ya que la producción de valiosas sustancias naturales por parte de las algas está basada en la disponibilidad de sal, agua, alta irradiación solar, altas temperaturas y tierra que no es utilizable en agricultura convencional, constituye una agroindustria muy conveniente en zonas que no son apropiadas a los cultivos tradicionales. Esta es la causa de que en la costa granadina de Motril y Salobreña se haya instalado una planta piloto de cultivo de *Spirulina platensis*, una alga de la familia de las cianofíceas, cuyo uso como fuente alimentaria y como fertilizante está muy extendido desde hace mucho tiempo. Sin embargo, hay razones económicas que limitan la utilización extensiva de la biomasa de microalgas en alimentación animal, ya que su costo actual no es competitivo con otras fuentes convencionales de proteínas (harinas de pescado o de soja). No obstante, esta limitación puede contrarrestarse, como antes se ha indicado, mediante la extracción de productos bioquímicos que proporcionan un alto valor añadido.

De entre los productos de mayor relevancia destacan los pigmentos fotosintéticos que poseen estas microalgas y de entre éstos, las biliproteínas. Estas constituyen unos complejos supramoleculares llamados ficobilisomas, que están situados en la superficie interna de la membrana tilacoidal y que actúan como colectores de la luz solar, conduciendo su energía hasta los centros de reacción fotosintética (revisiones de la función, bioquímica y biorregulación de ficobilisomas, se encuentran en Scheer, 1981; Glazer, 1984, 1985).

Las biliproteínas son proteínas con pigmentos tetrapirrólicos lineales (denominados bilinas) enlazados covalentemente mediante enlaces tioéster a residuos cisteína de la apoproteína. A causa de su papel en la captación de luz y transmisión de su energía, las biliproteínas poseen gran absorbancia y fluorescencia, al mismo tiempo que son bastante insensibles al quenching por factores externos. Estas características exclusivas han despertado un gran interés como sondas fluorescentes, habiéndose conjugado a biomoléculas tales como inmunoglobulina, proteína A, biotina y avidina (Oi y col., 1982). Estos conjugados se pueden utilizar en una amplia variedad de técnicas fluorimétricas muy sensibles como en clasificación celular activada por fluorescencia, inmunofluorescencia o en microscopía de fluorescencia. Las biliproteínas más utilizadas en estas

técnicas han sido ficoeritrinas y la aloficocianina. Recientemente, se han patentado y comercializado extractos comestibles de algas para su uso como colorantes en alimentos tales como yogourt, helados, chicles y bebidas alcohólicas y sin alcohol (Dainippon InK and Chemical INC., 1987).

Las biliproteínas, aunque poseen características generales comunes, tienen peculiaridades ligeramente distintas dependiendo del alga de procedencia. Las únicas biliproteínas presentes en *S. platensis* son C-ficocianina y aloficocianina. Aunque hay una amplia bibliografía fundamentalmente sobre la primera de las biliproteínas mencionadas, hay pocos trabajos sobre estas biliproteínas cuando proceden de *S. platensis* y así, C-PC de *S. platensis* nunca había sido cristalizada y cuando se propusieron y comenzaron las investigaciones que constituyen la presente Memoria, no se había cristalizado aún la biliproteína APC.

Dado el interés intrínseco de las biliproteínas como marcadores fluorescentes y como colorantes en alimentación así como la relativamente poca bibliografía referente a C-PC y APC procedentes de *S. platensis* y el interés de la empresa IMADE S.L. en obtener productos que proporcionen un alto valor añadido al cultivo de dicha microalga que explota en la costa granadina, se elaboró un proyecto en colaboración con la empresa para la adjudicación de una beca predoctoral que abordara la extracción, purificación y cristalización de biliproteínas de *S. platensis*, así como su caracterización espectral (absorción uv-vis, IR y emisión de fluorescencia), la extracción y purificación de los cromóforos (bilinas) presentes y el estudio de algunas aplicaciones como son el empleo de C-PC y APC en la detección fluorimétrica de la hibridación de ácidos nucleicos y su inclusión en micelas reversas para solubilizarlas en disolventes apolares. La extracción y purificación mediante una metodología original y relativamente sencilla fue el motivo de la Tesina de Licenciatura del Ldo. Bermejo que ahora opta al grado de Doctor con la presente Memoria que engloba el resto del proyecto de investigación para el que fue becado.

Algunos resultados de estas investigaciones han sido enviados y aceptados para su publicación en:

- **Journal of Chromatography:** "Chromatographic Purification of Biliproteins from *S. platensis*. HPLC Separation of their α and β Subunits".

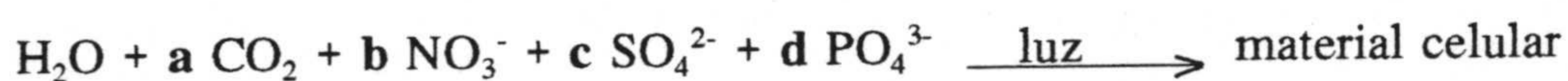
- **Acta Crystallographyca Section D: Biological Crystallography:** "Purification, Crystallization and Preliminary X-ray diffraction studies of C-phycoyanin and allophycoyanin from *Spirulina platensis*"

**2.-ANTECEDENTES
BIBLIOGRÁFICOS.**

2.1.-IMPORTANCIA DE LAS MICROALGAS.

La luz solar es la fuente primaria de alimentos, combustibles, fibras y materiales orgánicos usados por el hombre. Existen organismos capaces de captar la energía contenida en la luz solar y transformarla en energía química que queda almacenada; son los denominados organismos fotosintéticos.

La fotosíntesis consiste en la síntesis a partir de la luz solar, de productos esenciales para la vida como son: material celular (proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, etc.) y oxígeno molecular, todo ello a partir de sustratos oxidados carentes de potencial químico útil como: agua, dióxido de carbono, nitrato o nitrógeno molecular, sulfato y fosfato, de acuerdo con la ecuación global:



La energía solar que llega a la biosfera ($3 \cdot 10^{24}$ J año⁻¹) es captada por una gran variedad de organismos fotosintéticos de los ecosistemas terrestre y acuático con una eficiencia global del 0.1% y se almacena en la biomasa sintetizada, con un contenido energético de $3 \cdot 10^{21}$ J año⁻¹. Esta energía es unas diez veces mayor que la que consume la humanidad como tal energía ($3 \cdot 10^{20}$ J año⁻¹) y unas 200 veces mayor que la que consume como alimento. Por lo tanto, todos los requerimientos energéticos y alimentarios de la humanidad, podrían teóricamente cubrirse por la fotosíntesis natural.

Debido a todo esto, parece lógico el desarrollo de nuevos enfoques para utilizar los sistemas biológicos de conversión de la energía solar en la forma más eficiente y adecuada a las actuales circunstancias. Entre los sistemas conversores de la energía solar que constituyen los organismos fotosintéticos, destacan las microalgas (Losada, 1977; Hall, 1979; Guerrero, 1982; Guerrero y Losada, 1983 a y b; Guerrero y Losada, 1989).

Las microalgas son organismos fotosintéticos que contienen entre otros componentes, clorofila *a* y diversos pigmentos, capaces de llevar a cabo una eficiente conversión de la energía solar en energía química empleando el agua como donador terminal de electrones. Las microalgas conforman un grupo de organismos muy heterogéneo, incluyendo miles de especies pertenecientes a diversos grupos taxonómicos, con variada morfología, tamaño y

habitat. Sus representantes más primitivos, las cianobacterias o algas verde-azuladas, se caracterizan por ser procariotas. Las microalgas son responsables de más del 40% de la fotosíntesis que se lleva a cabo en la Tierra, con una producción de alrededor de 10^{11} Toneladas (peso seco) de biomasa al año (Guerrero y Losada, 1989).

2.2.-LAS MICROALGAS FRENTE A CULTIVOS CONVENCIONALES.

Las microalgas constituyen un grupo de organismos fotosintéticos extraordinariamente eficientes en lo que se refiere a la conversión de energía luminosa en energía química almacenada. Pueden llegar a alcanzar rendimientos fotosintéticos muy altos (hasta el 5%), con una productividad de biomasa del orden de 50 a 200 toneladas (peso seco) por hectárea y año. Esta productividad es notablemente superior a la de los cultivos agrícolas convencionales. Como ejemplo la Tabla 2-I muestra la productividad comparativa en proteínas de la microalga *Spirulina* y otros cultivos. Además, los cortos tiempos de generación permiten un rápido crecimiento y la rápida recuperación del cultivo en caso de que se produzca algún contratiempo o invasión del zooplancton. El cultivo de microalgas precisa de una superficie muy pequeña en comparación con otros cultivos como la soja, maíz, etc. (Tabla 2-II).

TABLA 2-I

Productividad comparativa en proteínas de microalga *Spirulina* y otros cultivos (Henrikson, 1994).

| Tipo de Cultivo | Proteínas (Tonelada Ha ⁻¹ año ⁻¹) |
|------------------|--|
| Carne de vacuno | 0.18 |
| Arroz | 0.20 |
| Trigo | 0.80 |
| Maíz | 2 |
| Soja | 2.5 |
| Caña de azúcar | 3 |
| <i>Spirulina</i> | 50 |

TABLA 2-II

Superficie de terreno necesaria para producir 1 kg de proteína (Henrikson, 1994).

| Cultivo | Superficie (m ²) | Calidad del Terreno |
|---|------------------------------|---------------------|
| <i>Spirulina</i> (65% proteína) | 0.5 | estéril |
| Soja (34% proteína) | 16 | fértil |
| Maíz (9% proteína) | 22 | fértil |
| Buey estabulado alimentado con grano (20% proteína) | 193 | fértil |

De otra parte, presentan la posibilidad de crecer en aguas salobres o marinas e incluso con residuos orgánicos, pudiéndose así aprovechar aguas no aptas para la agricultura tradicional ya que el consumo de nutrientes que necesitan es pequeño en comparación al gran aporte que de ellos precisa dicha agricultura (como ejemplo, el cultivo de microalgas necesita una cantidad de agua cinco veces menor que los tradicionales cultivos de alfalfa y maíz) (Tabla 2-III). Pueden asimismo cubrir total y permanentemente las zonas dedicadas a su cultivo y en las áreas donde no se presentan cambios drásticos, su crecimiento puede mantenerse a lo largo de todo el año. En este sentido se conocen estirpes con alta tolerancia a condiciones ambientales adversas para la mayoría de los organismos.

TABLA 2-III

Agua necesaria para producir 1 kg de proteína (Henrikson, 1994).

| Cultivo | Litros | Calidad del agua necesaria |
|---|--------|----------------------------|
| <i>Spirulina</i> (65% proteína) | 2498 | salobre |
| Soja (34% proteína) | 8860 | dulce |
| Maiz (9% proteína) | 12416 | dulce |
| Buey estabulado alimentado con grano (20% proteína) | 104000 | dulce |

La competitividad de la producción está asegurada en el momento en que se consigan extraer industrialmente elementos de alto valor como biliproteínas, ácidos grasos, etc., con innumerables aplicaciones prácticas en la actualidad. Por ello, la limitación que supone el coste todavía elevado de producción de los cultivos de microalgas, puede contrarrestarse con los productos extraíbles cada día más abundantes (Aaronson y col., 1980; Benemann y Weissman, 1984; Cohen, 1986; Benemann y col., 1987; Kerby y Stewart, 1988).

2.3.-INTERÉS PRÁCTICO DE MICROALGAS.

2.3.1.-Generalidades.

Las microalgas poseen excelentes cualidades para ser empleadas en la alimentación de animales así como en la del hombre. La Delegación General Científica y Técnica de Francia, en Julio de 1975 se manifestó en este sentido para el caso particular de la microalga *Spirulina*. La calidad de la biomasa de microalgas viene dada por la ausencia de tejidos y órganos no aprovechables, así como por el bajo contenido en materiales estructurales. *Spirulina* no tiene celulosa dura en la pared celular, que está formada por mucopolisacáridos blandos, lo que facilita la digestión y asimilación de las proteínas por el organismo humano. *Spirulina* contiene cantidades favorables de ácidos grasos insaturados, muy poco colesterol y una cantidad moderada de carbohidratos, factores que reducen las afecciones coronarias y la obesidad, objetivos primarios en la sociedad moderna de nuestros días (Durand-Chastel, 1980) (Figura 2-1).

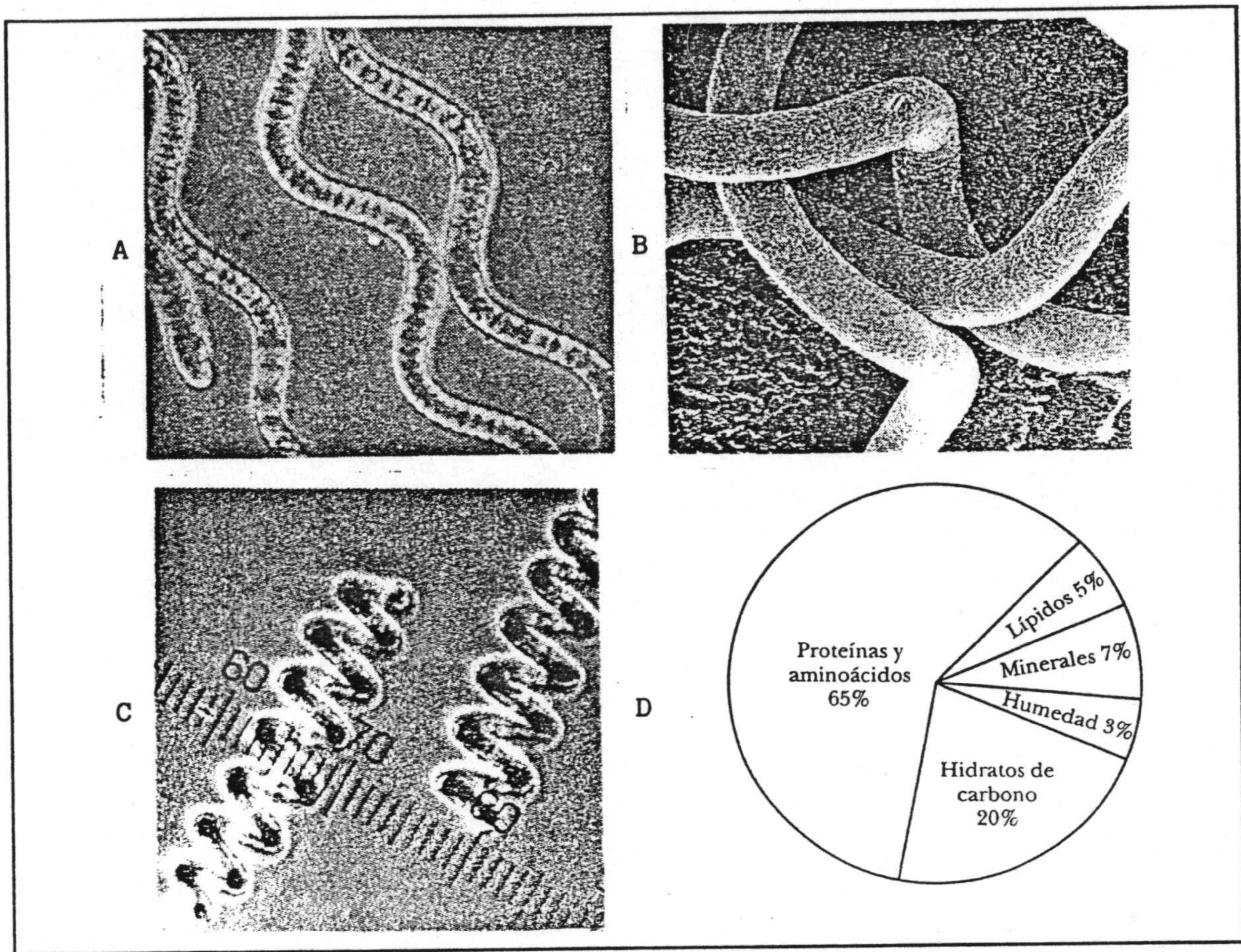


Figura 2-1

Características de la microalga *Spirulina*: a) estructura celular; b) fotografía en microscopio electrónico; c) arrollamiento en espiral característico; d) composición.

Si bien es cierto que el estudio científico intensivo del potencial alimentario de las microalgas se ha puesto en marcha hace tan sólo unos años, el inicio de su uso como alimento para el hombre es tan remoto que resulta difícil precisar. Así, el alga verde-azulada *Spirulina*, que crece espontáneamente en los lagos Chad (El Chad) y Texcoco (México) entre otros, se recolecta desde tiempo inmemorial, para su consumo, después de secada al sol y mezclada con granos de cereales por los pueblos Kanenbou y Azteca (Figura 2-2a). También existen referencias del consumo humano de algas verde-azuladas fijadoras de nitrógeno en otros países como Chile, Perú y Filipinas. Recientemente se ha extendido el mercado de la biomasa de *Spirulina* y *Chlorella*, fundamentalmente como alimento dietético medicinal, con un consumo de unas 2000 toneladas año⁻¹ (Figura 2-2b). Parte de la producción se emplea

además en la alimentación de peces tropicales y en acuicultura (Richmond, 1986; Benemann y col., 1987; Guerrero y Losada, 1989).

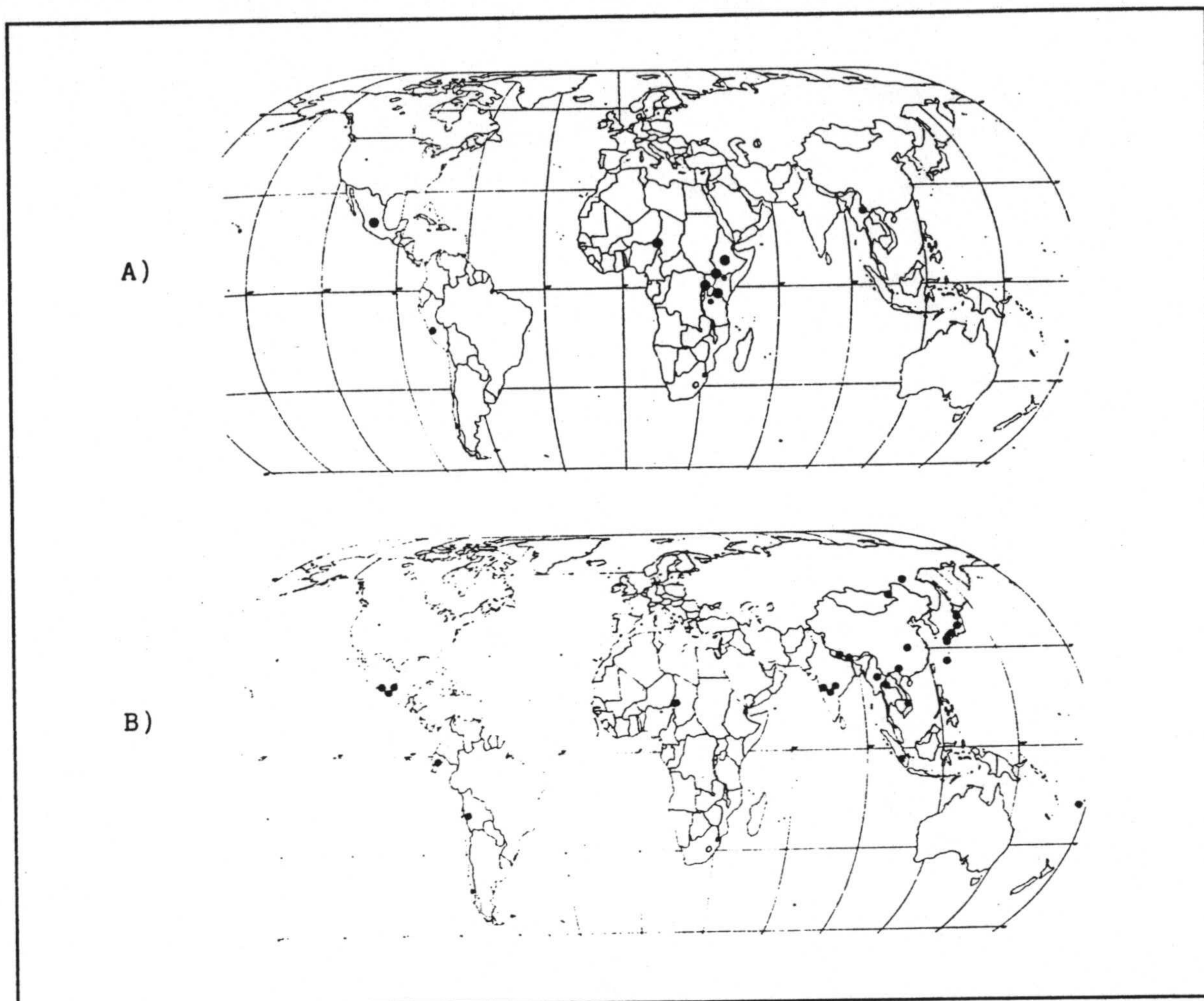


Figura 2-2

a) Lagos donde la microalga *Spirulina* prolifera de forma natural; b) Lugares en que se consumen de forma tradicional algas microscópicas.

Por otro lado las microalgas poseen un alto contenido en proteínas, objeto de estudio en la presente Memoria. Pueden alcanzar valores de proteína bruta del orden del 50 al 70% del peso seco, siendo estos porcentajes comparables e incluso superiores a los de otras fuentes tradicionales de proteínas (Tabla 2-IV).

TABLA 2-IV

Comparación del contenido de proteína de microalgas con el de otras fuentes tradicionales (Durand-Chastel, 1980).

| Producto | Contenido (% en peso) |
|------------------------------|-----------------------|
| Harina de pescado | 60 |
| Levadura de cerveza | 48 |
| Harina de semilla de soja | 44 |
| Leche desnatada (en polvo) | 36 |
| Trigo | 12 |
| Alga <i>Chlorella</i> | 50 |
| Alga <i>Spirulina máxima</i> | 60-71 |
| Alga <i>Dunaliella salma</i> | 57 |

La proteína de microalgas presenta un aminograma bastante equilibrado, similar al de la harina de soja o de pescado, así como al estándar de la F.A.O., siendo únicamente algo deficientes en aminoácidos azufrados (Tabla 2-V). Los estudios de digestibilidad llevados a cabo con distintas especies de microalgas en diversos grupos de animales (peces, moluscos, aves, rumiantes, etc.) así como en la especie humana han arrojado resultados muy satisfactorios, comparables con cualquiera de los alimentos de uso frecuente, en lo que se refiere a los distintos parámetros internacionales de nutrición.

Por otra parte, el interés alimentario de la biomasa de microalgas reside no sólo en su riqueza proteica sino en el contenido de lípidos y aminoácidos esenciales (Tabla 2-VI), vitaminas y minerales. Concretamente, la especie *Spirulina platensis*, contiene vitamina B₁₂, vitamina E, B-caroteno (es uno de los alimentos más rico en β -caroteno, con una concentración diez veces superior al concentrado de zanahoria), vitaminas A, C, B₁, B₂, B₅, B₆, biotina, inositol y además elementos tales como Zinc, Yodo, Fósforo, Sodio, Potasio, Cromo, Germanio, Selenio, Manganeso, Cobre e Hierro. Uno de los informes más conocidos publicado por el Consejo Nacional de Investigación de EEUU en 1982 concluye que los alimentos ricos en betacaroteno y vitamina A reducen el riesgo de cáncer.

TABLA 2-V

Aminoácidos esenciales del huevo entero, caseína y dos especies de microalgas.
(Valores en g por 100 g de proteína).

| Aminoácidos | Huevo entero | Caseína | <i>Spirulina</i> máxima | <i>Chlorella</i> <i>pyrenoidosa</i> |
|--------------|--------------|---------|----------------------------|--|
| Isoleucina | 6.6 | 9.7 | 5.8 | 3.4 |
| Leucina | 8.8 | 9.7 | 8.3 | 6.0 |
| Lisina | 4.6 | 2.6 | 4.5 | 4.5 |
| Metionina | 3.1 | 3.6 | 1.8 | 2.0 |
| Fenilalanina | 5.8 | 3.9 | 5.2 | 7.2 |
| Treonina | 5.1 | 3.9 | 4.6 | 5.2 |
| Triptófano | 1.6 | 2.2 | 1.1 | 1.1 |
| Valina | 7.3 | 7.9 | 6.6 | 6.2 |

TABLA 2-VI

Composición en aminoácidos esenciales de la microalga *Spirulina* (Henrikson, 1994).

| Aminoácidos esenciales | En 10 g | % total |
|----------------------------------|---------|---------|
| Isoleucina | 350 mg | 5.6 |
| Leucina | 540 mg | 8.7 |
| Lisina | 290 mg | 4.7 |
| Metionina | 140 mg | 2.3 |
| Fenilalanina | 280 mg | 4.5 |
| Treonina | 320 mg | 5.2 |
| Triptófano | 90 mg | 1.5 |
| Valina | 400 mg | 6.5 |
| Aminoácidos no esenciales | | |
| Alanina | 470 mg | 7.6 |
| Arginina | 430 mg | 6.9 |
| Acido aspártico | 610 mg | 9.8 |
| Cistina | 60 mg | 1.0 |
| Acido glutámico | 910 mg | 14.6 |
| Glicina | 320 mg | 5.2 |
| Histidina | 100 mg | 1.6 |
| Prolina | 270 mg | 4.3 |
| Serina | 320 mg | 5.2 |
| Tirosina | 300 mg | 4.8 |

2.3.2.-Utilización de proteínas y proteínas útiles.

Los análisis de nutrición clasifican las proteínas de acuerdo con su valor de utilización neta de proteínas, UNP, determinado por la calidad de sus aminoácidos, la digestibilidad (proporción absorbida por el intestino) y su valor biológico (proporción conservada por el

organismo). Como se recoge en la Tabla 2-VII el huevo seco es el producto que alcanza el valor más alto (94%), seguido de los productos lácteos (70-82%), el pescado (80%) y la carne (67%). La *Spirulina* tiene un valor (62%) similar al de muchos cereales y superior al de las nueces.

Multiplicando la cantidad de proteínas, por su UNP se obtiene el valor de proteínas útiles, expresado en forma de porcentaje de la composición del alimento. Desde este punto de vista, la *Spirulina* ocupa el segundo lugar, detrás del huevo seco y por encima de todos los alimentos comunes en la forma en que suelen adquirirse.

TABLA 2-VII

Cantidad y calidad de las proteínas de *Spirulina* y de otros alimentos.

| Alimento | % de proteína | UNP (%) | Proteína útil (%) |
|--------------------------|---------------|---------|-------------------|
| <i>Spirulina</i> | 65 | 62 | 40 |
| Huevo seco entero | 47 | 94 | 44 |
| Levadura de cerveza | 45 | 50 | 23 |
| Harina de soja integral | 37 | 61 | 23 |
| Leche en polvo desnatada | 36 | 82 | 30 |
| Queso parmesano | 36 | 70 | 25 |
| Germen de trigo | 27 | 67 | 18 |
| Cacahuetes | 26 | 38 | 10 |
| Pollo | 24 | 67 | 16 |
| Pescado | 22 | 80 | 18 |
| Carne de buey | 22 | 67 | 15 |
| Semillas de sésamo | 19 | 60 | 11 |
| Harina de avena integral | 15 | 66 | 10 |
| Harina de trigo integral | 14 | 63 | 9 |
| Tofu húmedo | 8 | 65 | 5 |
| Arroz integral | 8 | 60 | 5 |

2.3.3.-Aplicaciones clínicas.

Numerosos estudios se han realizado y siguen realizándose hoy día, que demuestran los beneficios para la salud que el consumo de microalgas como *Spirulina* pueden llevar consigo (Tabla 2-VIII).

TABLA 2-VIIIAplicaciones clínicas de *Spirulina*. Investigación clínica (Henrikson, 1994)

| Aplicación | Sujetos | País |
|--|---------------------|-------------|
| Reducción del colesterol | humanos | Japón |
| Reducción del colesterol | ratas | India |
| Reducción del colesterol | ratas | Japón |
| Reducción de cáncer de boca | hámsters | EEUU |
| Proliferación de lactobacilos | ratas | Japón |
| Reducción de intoxicaciones renales por metales pesados y medicamentos | ratas | Japón |
| Tratamiento de enfermedades infantiles con GLA | humanos | España |
| Tumores hepáticos y estimulación del sistema inmunitario | ratones | Japón |
| Aumento de la biodisponibilidad del hierro | ratas | EEUU |
| Corrección de anemia ferropénica | ratas | Japón |
| Corrección de anemia ferropénica | humanos | Japón |
| Recuperación de malnutrición | humanos | México |
| Recuperación de malnutrición | humanos | Togo |
| Tratamiento de deficiencias nutricionales | humanos | Rumanía |
| Tratamiento de deficiencias nutricionales | humanos | China |
| Reducción de peso | humanos | Alemania |
| Tratamiento de heridas externas | humanos | Francia |
| Tratamiento de heridas externas | humanos | Japón |
| Infecciones (acción antibiótica) | células microbianas | Puerto Rico |
| Infecciones (acción antibiótica) | células microbianas | India |

En 1989 se encontraron ciertos agentes químicos procedentes de las algas azules (*Lyngbya phormidium*, *Oscillatoria* y *Anabaena*) notablemente activos contra el virus del sida

que resultaron ser porciones sulfolípidicas presentes en sus glucolípidos (Gustafson, 1989).

La *Spirulina* contiene de un 5 a un 8% de lípidos, de los que un 40% son glucolípidos y de un 2 a un 5% son sulfolípidos (Kataoka y Misaky, 1983; Venkataraman y Becker, 1985). La *Spirulina* y otras algas azules pueden cultivarse de forma que aumenten de manera significativa su contenido en lípidos, y muy posiblemente también en sulfolípidos, por lo que podrían producirse, dentro de corto tiempo, en grandes cantidades para extraer esta valiosa sustancia.

2.4.-BILIPROTEÍNAS.

2.4.1.-Características generales.

Las biliproteínas se caracterizan por ser pigmentos que se encuentran sólo en algunos grupos de algas: algas verde-azuladas, algas rojas y criptomonadales. Las biliproteínas pueden dividirse en tres grupos principales, dependiendo de sus características espectrofotométricas: ficoeritrinas, ficocianinas y aloficocianinas. Existe un cuarto grupo, las ficoeritrocianinas, pero es mucho menos frecuente que los anteriores, y a veces sustituye a la ficoeritrina en los denominados ficobilisomas, que son los encargados de recibir y transmitir la energía de la luz solar (O'Carra y O'hEocha, 1976; MacColl y Guard-Friar, 1987).

Las biliproteínas se ensamblan formando agregados macromoleculares denominados ficobilisomas, que se encuentran unidos a la cara externa de la membrana tilacoidal donde actúan como pigmentos antena que absorben la luz y canalizan la energía de excitación hasta los centros de reacción del fotosistema II. Las algas criptomonadales a diferencia de las rojas y verde-azuladas no poseen ficobilisomas y las biliproteínas tienen una localización intratilacoidal. La función fundamental de los ficobilisomas es captar la luz solar que no es absorbida por la clorofila. Los ficobilisomas muestran máximos de absorción intensos en la zona comprendida entre los 470 y 650 nm, coincidiendo con el valle que se presenta entre los picos azul y rojo-lejano de la clorofila *a* (Figura 2-3). Estos agregados macromoleculares tienen forma semiesférica de aproximadamente 600 nm de diámetro y una masa comparable a la de los ribosomas. Consisten en dos subestructuras morfológicas distintas, un núcleo central formado por tres cilindros constituidos cada uno por cuatro discos apilados (Bryant

y col., 1979; Yamanaka y col., 1980) y seis varillas radiales que parten del núcleo central, cada una de la cuales está compuesta por varios discos apilados.

Los ficobilisomas están constituidos exclusivamente de proteínas: biliproteínas y polipéptidos enlazados. Las biliproteínas constituyen el 85% de la masa del ficobilisoma estando siempre organizadas en orden a su máxima absorción: ficoeritrinas y ficoeritrocianinas en la periferia, ficocianinas en el centro y los complejos de aloficocianina muy cerca de los centros de reacción en la membrana tilacoidal (Gantt, 1980). Un detalle de un ficobilisomas puede observarse en la Figura 2-4.

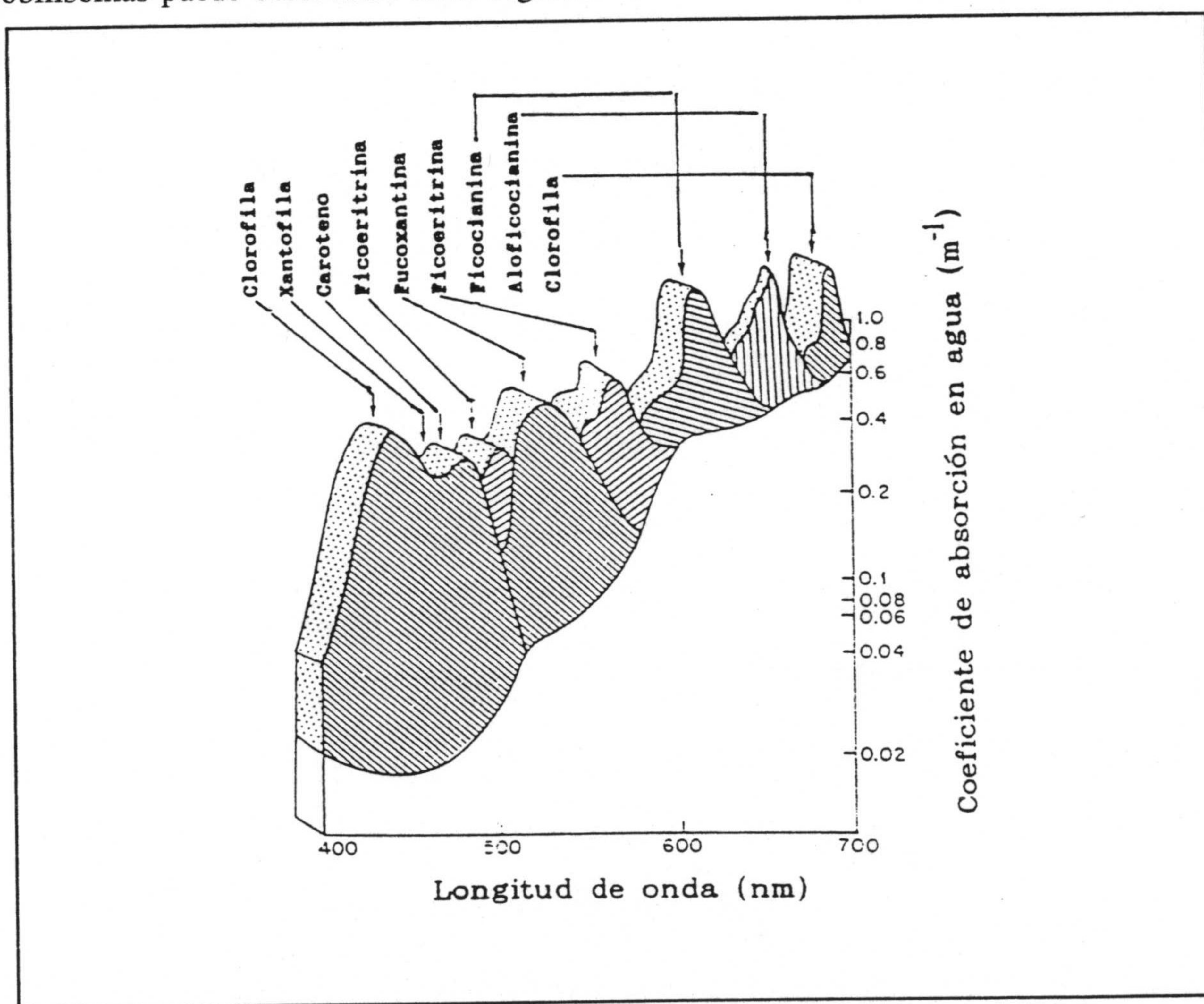


Figura 2-3

Espectros de absorción de varios pigmentos fotosintéticos, de células vivas (Ong y Glazer, 1991).

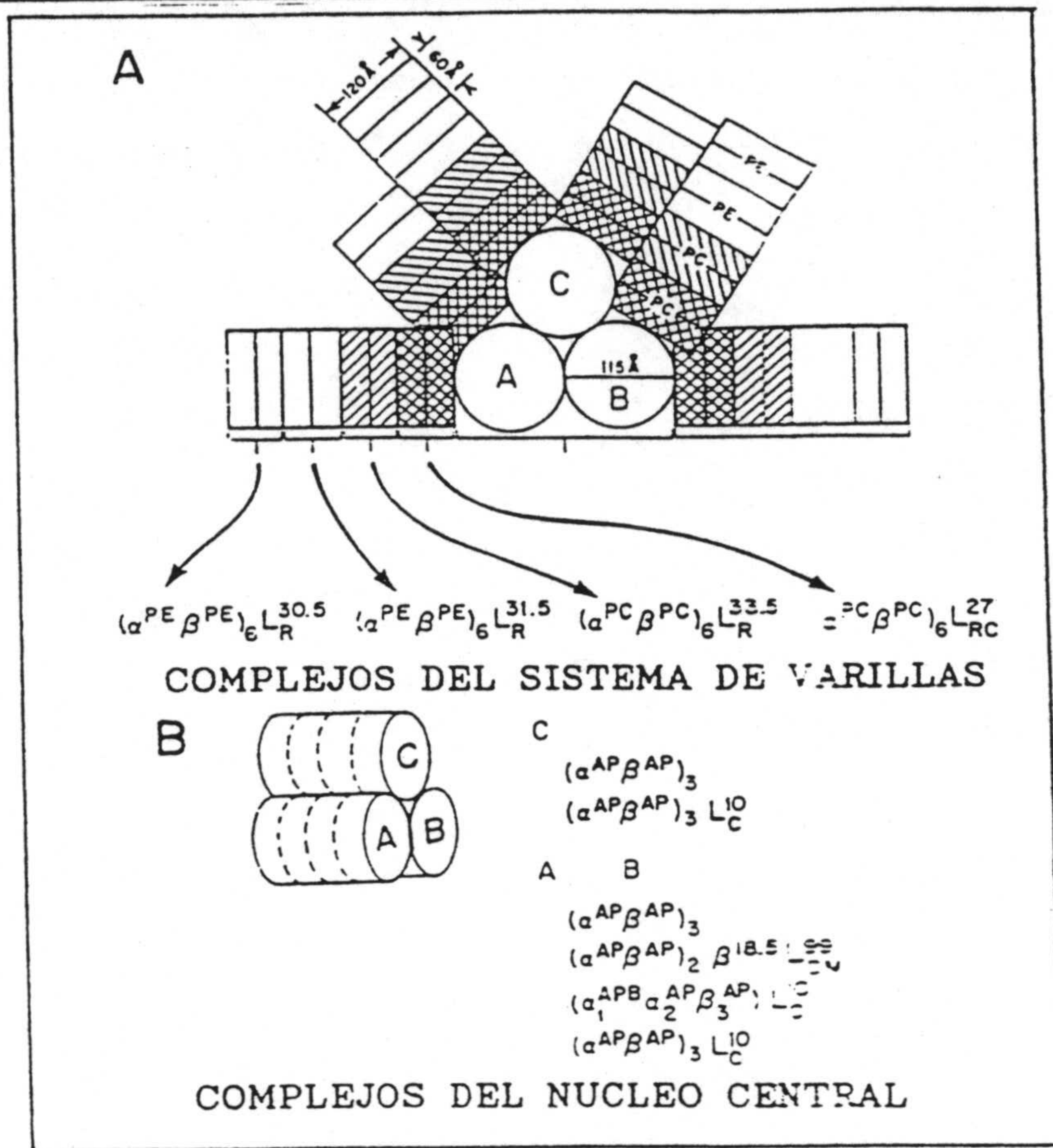


Figura 2-4

Representación esquemática del ficobilisoma de *Synechocystis* 6701. Composición de los complejos que forman el centro y las varillas, utilizando las abreviaturas que siguen.

Abreviaturas para subunidades de biliproteínas y para polipéptidos enlazantes.

Tipo de polipéptido:

Abreviatura.

| | |
|---|--|
| Subunidades de ficoeritrina | $\alpha^{PE}, \beta^{PE}, \gamma^{PE}$ |
| Subunidades de ficoeritrocianina | $\alpha^{PEC}, \beta^{PEC}$ |
| Subunidades de R-ficocianina | $\alpha^{RPC}, \beta^{RPC}$ |
| Subunidades de C-ficocianina | α^{PC}, β^{PC} |
| Subunidades de aloficocianina | α^{AP}, β^{AP} |
| Subunidad α de aloficocianina B | α^{APB} |
| Subunidades tipo- β del centro | β^{MW} |
| Polipéptidos enlazantes de las varillas | L_R^{MW} |
| Elementos de varillas unidos al centro | L_{RC}^{MW} |
| Polipéptidos enlazantes del centro | L_C^{MW} |
| Elementos del centro unidos a membrana | L_{CM}^{MW} |

Las biliproteínas son heteroproteínas, es decir además de las cadenas peptídicas, forman parte de su composición ciertos cromóforos o pigmentos como grupos prostéticos. Son una familia de proteínas homólogas compuestas por subunidades del tipo α y β . Cada subunidad α o β lleva covalentemente enlazados grupos prostéticos tetrapirrólicos denominados bilinas cuyas estructuras serán consideradas en detalle más adelante. Las propiedades espectroscópicas de las biliproteínas dependen de la estructura y número de bilinas que contienen, del ambiente proteico que rodea a estos cromóforos y de las relaciones estéricas entre ellos (Scheer, 1981; Glazer, 1984) (Figura 2-5). Cada ficobilisoma está caracterizado por una determinada composición de subunidades y un cierto contenido de bilinas. Además, contienen varios polipéptidos enlazados, algunos de los cuales llevan cromóforos y por tanto participan en procesos de transferencia de energía y otros no tienen tales grupos prostéticos por lo que se han denominado "polipéptidos sin color" (Tandeau de Marsac y Cohen-Bazire, 1977). Cuando los ficobilisomas se fraccionan por cromatografía en diversos soportes, se pueden aislar agregados de biliproteínas libres pertenecientes a polipéptidos enlazantes, cuyos espectros difieren de los que poseen en ficobilisomas intactos. Se puede afirmar con seguridad que, con excepción de la B y R-ficoeritrinas que contienen un polipéptido enlazante (la subunidad γ), todas las demás biliproteínas puras carecen de tales polipéptidos por lo que presentan propiedades espectroscópicas alteradas. El reconocimiento de tales fenómenos es de fundamental importancia para correlacionar datos obtenidos en biliproteínas purificadas o en ficobilisomas intactos.

La ruta de transferencia de energía en el interior de los ficobilisomas sería la siguiente:

Ficoeritrina--->Ficocianina--->Aloficocianina--->Clorofila

En ficobilisomas intactos, las biliproteínas virtualmente no fluorescen debido a que su energía de excitación es transferida con gran eficacia al centro de reacción. En contraste, las biliproteínas fluorescen con intensidad en ausencia del captador de energía. Así por ejemplo, la ficoeritrina posee una intensidad más de 20 veces mayor que la fluoresceína (Ong y col., 1984), esta emisión tan intensa es debida a que contiene unos 34 cromóforos de bilina (Glazer y Stryer, 1984). Su rendimiento cuántico de fluorescencia es de 0.98 y su tiempo de vida en disolución acuosa es de 2.5 ns, además posee un bajo rendimiento cuántico de fotodegradación (Mathies y col., 1990). En general, las biliproteínas contienen un gran número de cromóforos que les confieren coeficientes de extinción extremadamente altos en una zona

amplia del espectro, lo que unido a su alto rendimiento cuántico proporciona excelentes características fluorescentes. Además, su fluorescencia es constante en un amplio margen de pH y no varía marcadamente con la temperatura. Por último cabe citar el gran desplazamiento de Stokes que presentan y su alta solubilidad en agua, lo que permite la obtención de disoluciones concentradas y estables. En estado sólido pueden ser almacenadas durante largos períodos de tiempo.

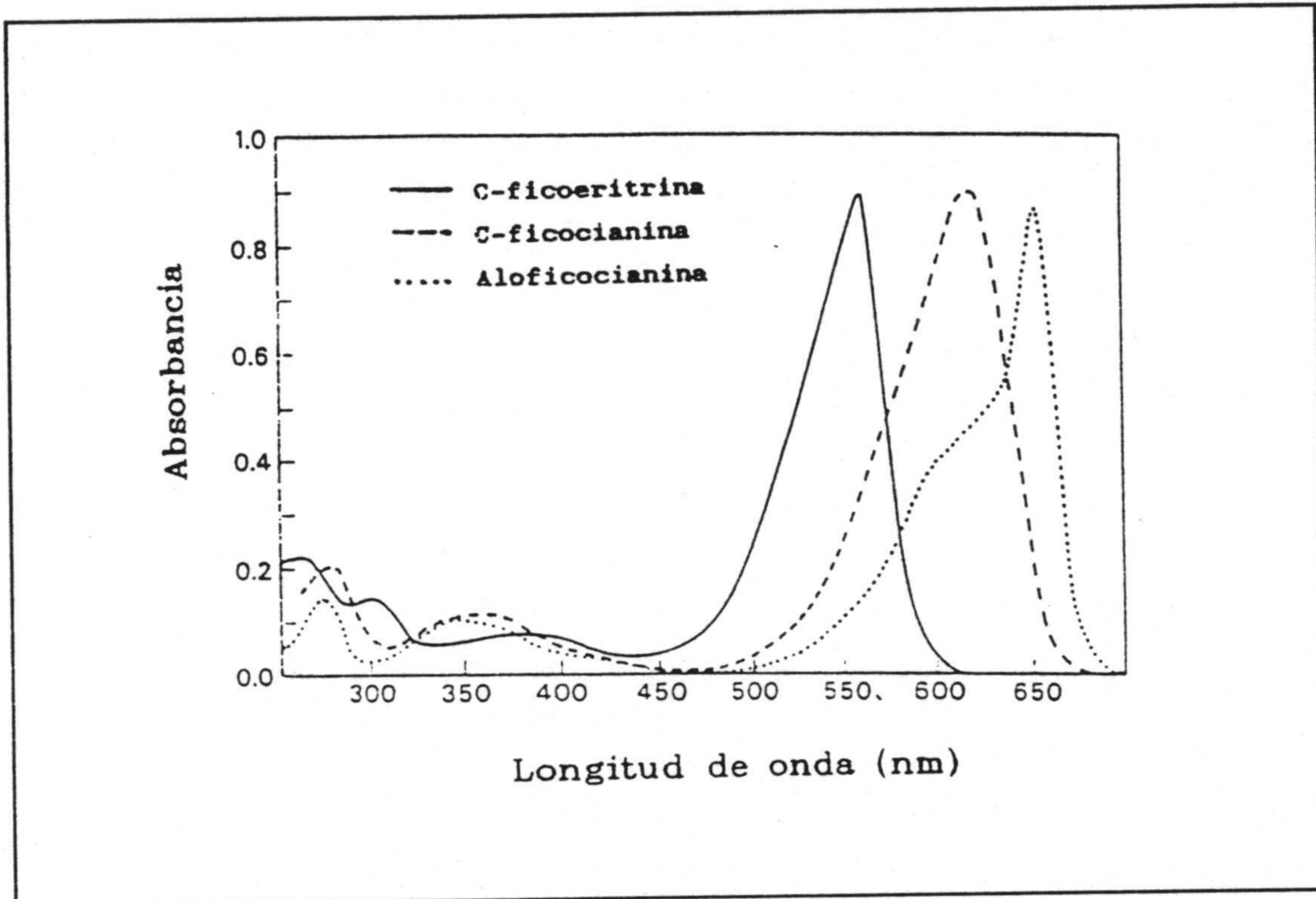
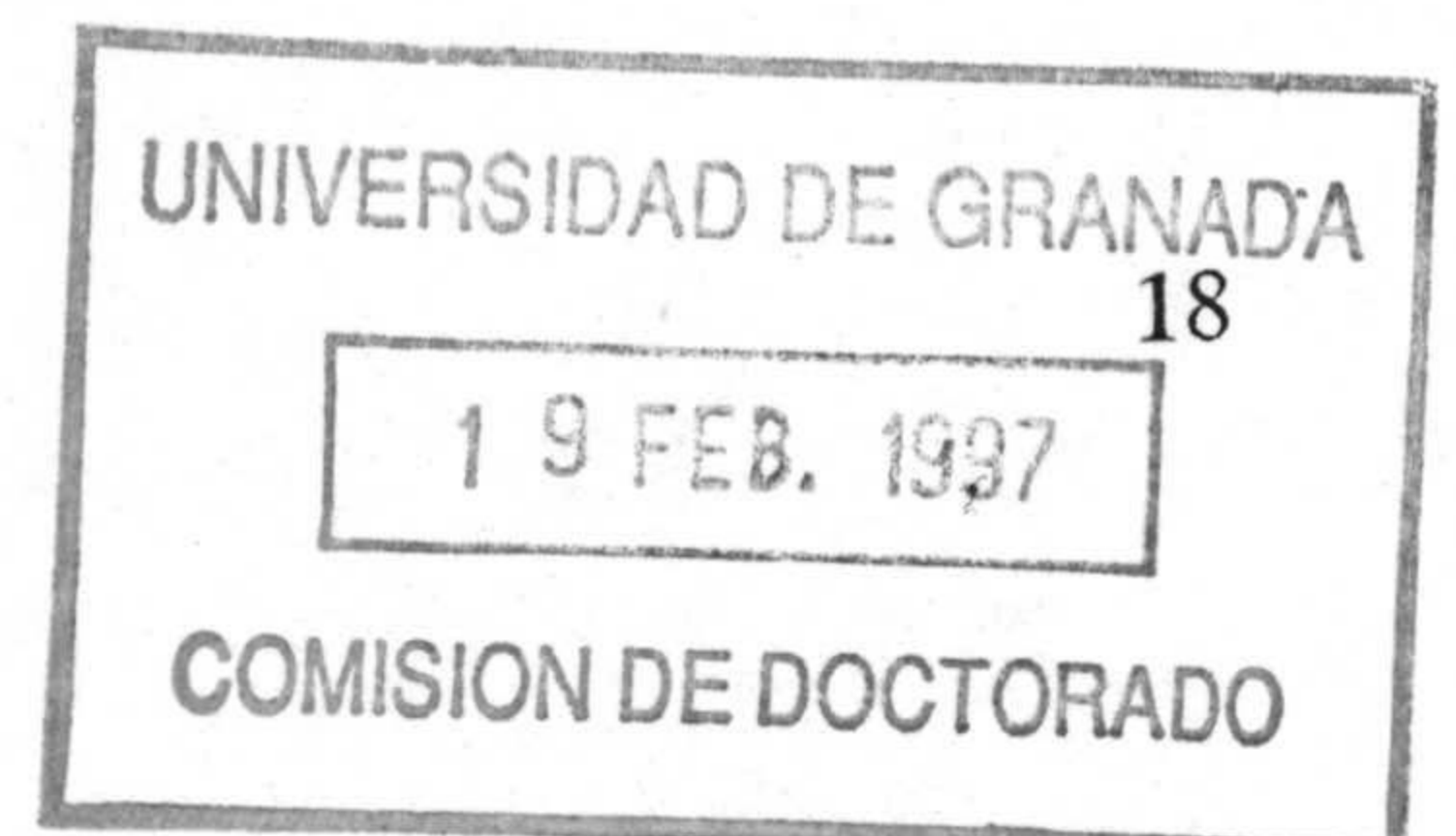


Figura 2-5

Espectros de absorción de algunas de las biliproteínas más representativas de cianobacterias. — C-ficoeritrina; - - - - - C-ficocianina; ••••• aloficocianina.

2.4.2.-Nomenclatura y distribución.

Como se ha indicado con anterioridad, la designación de bilinas o bilipigmentos se usa como nombre genérico para los grupos cromóforos tetrapirrólicos. El termino ficobiliproteína o biliproteína designa el producto de la unión de estos grupos cromóforos a las cadenas polipeptídicas.



Se conocen unas treinta biliproteínas distintas, en entidades vivas, que se pueden subdividir en tres clases:

a) Ficoeritrinas: son biliproteínas rojas cuyos cromóforos son la ficoeritrobilina (PEB) y la ficourobilina (PUB).

b) Ficocianinas: son biliproteínas azules cuyo cromóforo es la ficocianobilina (PCB). La R-ficocianina es anómala en esto, ya que posee también ficoeritrobilina además de ficocianobilina (Chapman y col., 1967).

c) Aloficocianinas: son biliproteínas azules cuyo cromóforo es la ficocianobilina (PCB). Sólo unas pocas especies de cianobacterias poseen un cuarto grupo de biliproteínas, denominadas ficoeritrocianinas, cuyos cromóforos son la ficocianobilina y la ficobiliviolina (PXB).

Algunas propiedades de las biliproteínas que se encuentran en mayor cantidad en cianofíceas y algas rojas se indican en la Tabla 2-IX.

TABLA 2-IX

Peso molecular y máximos de absorción y de emisión de fluorescencia de biliproteínas.

| Biliproteína | Absorción λ_{\max} (nm) | Emisión λ_{\max} (nm) | Peso Molecular PM $\times 10^{-3}$ ($\alpha\beta$) _n |
|-------------------|------------------------------------|----------------------------------|--|
| C-ficocianina | 615-620 | 630-642 | 36.5-220 n=1-6 |
| Aloficocianina | 650,620" | 660 | 100 n=3 |
| R-ficocianina | 618,555 | 642 | 120 n=3 |
| ficoeritrocianina | 568, 590" | 625 | 120 n=3 |
| C-ficoeritrina | 565 | 575-581 | 40-240 n=1-6 |
| B-ficoeritrina | 498,543,562 | 576 | 240 n=6 |
| R-ficoeritrina | 495,536,564 | 576 | 240 n=6 |

" = Hombro; ($\alpha\beta$)_n = Estado de agregación de la biliproteína.

En cianofíceas han sido identificadas tres biliproteínas: C-ficoeritrina (CPE), C-ficocianina (C-PC) y aloficocianina (APC). Las cianofíceas más representativas así como las biliproteínas que contienen pueden observarse en la Tabla 2-X.

TABLA 2-X.

Distribución de biliproteínas en algas verde azuladas.

A) Especies con C-ficoeritrina predominante y cantidades trazas de ficocianina:

| | |
|------------------------------|---------------------------------|
| <i>Phormidium persicinum</i> | <i>P. fragile</i> |
| <i>P. ectocarpii</i> | <i>Oscillatoria rubescens</i> |
| <i>P. autumnale</i> | <i>Trichodesmium erythraeum</i> |
| <i>O. uncinatum</i> | <i>Hidrocoleum sp.</i> |

B) Especies con C-ficoeritrina y C-ficocianina:

| | |
|------------------------------|--------------------------------|
| <i>Tolypothrix tenuis</i> | <i>Fremyella diplosiphon</i> |
| <i>T. distorta</i> | <i>Nostoc muscorum</i> |
| <i>Schizothrix alpicola</i> | <i>Dermocarpa violacea</i> |
| <i>Calothrix membranacea</i> | <i>Glaucosphaera vacuolata</i> |
| <i>Aphanothece sacrum</i> | <i>Oscillatoria prolifera</i> |

C) Especies con C-ficocianina y sin ficoeritrina:

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Anabaenopsis sp.</i> | <i>Phormidium faveolarum</i> |
| <i>Anabaena variabilis</i> | <i>Plectonema calothriceoides</i> |
| <i>Chroococcoides fritschii</i> | <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> |
| <i>Mastidoglastus laminosus</i> | <i>Oscillatoria minima</i> |
| <i>Synechococcus lividus</i> | <i>Anabaena cylindrica</i> |
| <i>S. elongatus</i> | <i>Calothrix scopulorum</i> |
| <i>Lynbya lagerheimii</i> | <i>Nostoc punctiforme</i> |
| <i>Spirulina platensis</i> | <i>Spirulina máxima</i> |

Nota: Aloficocianina probablemente está presente en cantidades trazas en todas las especies de algas rojas y verde-azuladas.

Una gran cantidad de extracciones de algas rojas y verde-azuladas seguidas de fraccionamiento con elución en gradiente de sulfato han revelado siempre la presencia de aloficocianina y C-ficocianina en pequeñas cantidades, por tanto se cree que están universalmente presentes en todas las algas rojas y verde-azuladas.

2.4.3.-Peso Molecular.

Los datos reflejados en la literatura sobre pesos moleculares difieren unos de otros debido fundamentalmente a las diferentes técnicas usadas por los autores para el cálculo de los mismos y al distinto grado de agregación.

La C-ficocianina es una de las biliproteínas más estudiadas en lo que a peso molecular se refiere. La determinación inicial del peso molecular (PM) de ésta fue llevada a cabo por Svedberg y Katsurai en 1929, quienes obtuvieron un valor de 208.000 da e indicaron que la proteína mostraba propiedades de agregación, proponiendo la existencia de una subunidad básica con un peso molecular de 34.000 da. A partir de estos resultados han sido varios los autores que han abordado este problema mediante el empleo de diversas técnicas experimentales, lo que ha provocado alguna controversia.

El grupo de investigadores que ha estudiado con mayor extensión este problema ha sido el de Berns y col. (Berns y col., 1964; Scott y Berns, 1965; Kao y Berns, 1968; Kao y col., 1971) que empleando técnicas de sedimentación, electroforesis, presión osmótica, análisis químicos, etc., propusieron la existencia de una unidad fundamental de PM del orden de 30.000 da, usando C-ficocianinas procedentes de una amplia variedad de algas verde-azuladas.

Neufel y Riggs (1969) obtuvieron valores similares por filtración en gel y sedimentación. Sin embargo Bloomfield y Jennings (1969) realizando cálculos con los datos del grupo de Berns propusieron un monómero de 45.000 da, en acuerdo con Hattori y col. (1965a). Esta diferencia de valores tiene su origen en la asignación de las constantes de difusión a los coeficientes de sedimentación y así mientras el grupo de Berns empleó una constante de difusión de $13.2 \cdot 10^{-7}$ cm²/seg a la componente 3s, los otros investigadores asignaron a esta misma componente un valor de $7.5 \cdot 10^{-7}$ cm²/seg. Los cálculos más recientes llevados a cabo por Glazer (1982, 1984), Wolfgang y Werner (1988), Algarra y col. (1990)

y Hilditch y col. (1991) a partir de técnicas electroforéticas proponen un intervalo de PM entre 36.500 y 220.000 da, dependiendo del estado de agregación en que se encuentre la biliproteína.

Al igual que sucede con la C-ficocianina los estudios con ficoeritrina, han suministrado distintos resultados según los autores. Actualmente se acepta para C-ficoeritrina un intervalo que va desde 40.000 a 240.000 da (monómero-hexámero) (Zickendraht-Wendelstadt y col., 1980; Zilinskas y col., 1984) y para B-ficoeritrina 240.000 da(hexámero) (Lundell y col., 1984).

Los cálculos para el peso molecular de aloficocianina han sido realizados por Hattori y Fujita (1959) por estudios de sedimentación aportando un valor de 134.000 da y Nolan y O'hEocha (1967) quienes obtuvieron un valor de 138.000 da por técnicas de filtración en gel. Estudios realizados por Glazer y Cohen-Bazire (1971) conducen a un valor de 100.000 da que debe pertenecer al trímero. Más recientemente mediante técnicas electroforéticas Rusckowski y Zilinskas (1982), Wolfgang y Werner (1988) y Algarra y col. (1990), proponen un intervalo de PM entre 32.000 y 39.000 da para el monómero de aloficocianina.

2.4.4.-Composición de aminoácidos.

Las diferencias en los análisis de aminoácidos de biliproteínas pueden explicarse por el distinto grado de pureza de las muestras en que hayan sido determinados. Los análisis para C-ficocianina han sido realizados por Fujiwara (1966), Kimmel y Smith (1958), Berns y col., (1964), Raftery y O'hEocha (1965), Cope y col., (1967) y Neufeld (1967). Hay una concordancia razonable con las determinaciones más recientes independientemente de la metodología aplicada. Los resultados se muestran en la Tabla 2-XI.

Las biliproteínas son ricas en aminoácidos ácidos y básicos y poseen un alto contenido de aminoácidos no polares. Determinaciones de carbono y nitrógeno terminales realizadas por Raftery y O'hEocha (1965) muestran que la C-ficocianina tiene una treonina N-terminal y una serina C-terminal y la C-ficoeritrina posee una metionina N-terminal (O'Carra y O'hEocha, 1962). Es muy probable que la composición de aminoácidos de una biliproteína dada sea muy similar en un amplio rango de especies.

TABLA 2-XI

Composición en aminoácidos de C-ficocianina de distintas especies de cianobacterias, expresada en número de residuos.

| Aminoácido | CPC ^a | CPC ^b | CPC ^c | CPC ^d | CPC ^e |
|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Aspártico | 28 | 24 | 38 | 28 | 26 |
| Glutámico | 18 | 13 | 18 | 30 | 24 |
| Lisina | 10 | 8 | 11 | 11 | 8 |
| Histidina | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| Arginina | 14 | 10 | 16 | 19 | 12 |
| Treonina | 14 | 10 | 15 | 14 | 14 |
| Serina | 16 | 11 | 20 | 10 | 13 |
| Glicina | 20 | 18 | 22 | 10 | 18 |
| Alanina | 40 | 34 | 48 | 26 | 31 |
| Valina | 16 | 11 | 17 | 17 | 16 |
| Isoleucina | 14 | 11 | 15 | 16 | 13 |
| Leucina | 22 | 16 | 26 | 23 | 21 |
| Prolina | 8 | 6 | 9 | 10 | 9 |
| Metionina | 8 | 8 | 3 | 8 | 6 |
| Cisteína | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| Tirosina | 10 | 9 | 12 | 16 | 11 |
| Fenilalanina | 8 | 6 | 10 | 10 | 6 |

a *Plectonema calothricoides*, Berns y col. (1964).

b *Phormidium luridum*, Cope y col. (1967).

c *Anacystis nidulans*, Neufeld (1967).

d *Synechococcus lividus*, Berns (1967).

e *Synechococcus lividus*, Cope y col. (1967).

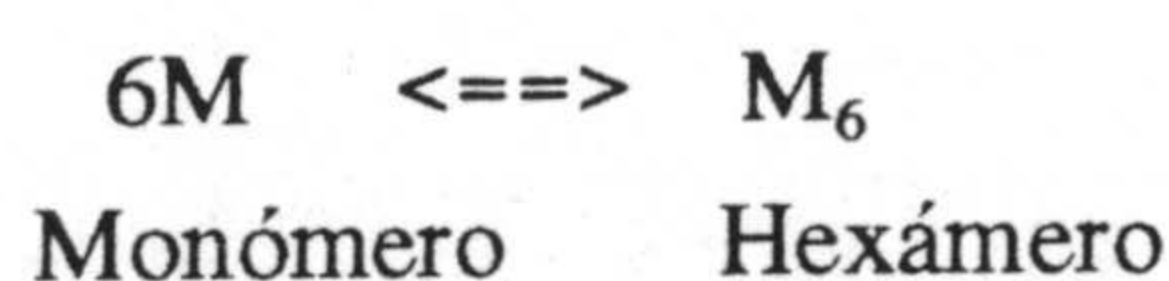
2.4.5.-Agregación.

La posibilidad de que la C-ficocianina fuese un sistema agregado fue sugerida en primer lugar por Svedberg y col. (1928,1929 y1932). En la actualidad estos resultados han sido ampliamente confirmados por numerosos investigadores. El modelo general de monómero-trímero-hexámero-nonámero fue establecido por Scott y Berns (1965), Hattori y col. (1965b), Berns y Morgenstern (1966), Berns y Scott (1966) y Berns (1967).

El estado de agregación depende de la fuerza iónica, del pH (Scott y Berns, 1965; MacColl y col., 1971), de la temperatura (Scott y Berns, 1965), de la presencia de agentes desnaturizantes (Berns y Scott, 1966; Berns y Morgenstern, 1968) y de la composición del tampón y concentración de la proteína (Saxena, 1988).

Las especies con coeficiente de sedimentación 3s, probablemente correspondan al monómero de PM 30.000 da, las 7s al trímero y las 11s al hexámero. Las especies 5s y 6s representan probablemente al dímero y al dodecámero (Neufel y Riggs, 1969). Algunos grupos de investigadores creen que las especies 3s corresponden a un PM de 45.000 da y por lo tanto el hexámero (especie 11s) tiene un PM de 270.000 da. Hattori y col. (1965b) quienes trabajaron con un monómero de PM 45.000 da, asignaron un PM de 268.000 a un agregado hexámero, aunque Neufeld y Riggs (1969) sugieren que un componente de PM 250.000 da obtenido por filtración en gel representa una mezcla no resuelta de hexámero y dodecámero. Más recientemente O'Carra y Killilea (1971) sugirieron un agregado nonamérico de 18 cadenas polipeptídicas con un PM de 340.000 da.

En general, el descenso del pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína, favorece la disociación hacia el monómero. Asimismo, las bajas concentraciones de proteína favorecen también la presencia del monómero (Neufeld y Riggs, 1969; McColl y col., 1971). En particular, la C-ficocianina se encuentra como un hexámero estable a pH 5-6 y a una concentración entorno a los 10 mg/ml y como un trímero a pH 8 y una concentración cercana a 5 mg/ml (Saxena, 1988). A pH constante, un incremento en la fuerza iónica favorece el hexámero a partir del trímero, mientras que una disminución favorece éste último (Scott y Berns, 1965). Las bajas temperaturas favorecen el trímero mientras que por elevación de la temperatura se hace predominante la forma hexamérica (Scott y Berns, 1965; Berns y Scott, 1966). La adición de desnaturizantes (guanidina HCl, urea) y detergentes generalmente favorece la formación de monómeros y en menor cuantía de trímeros (Berns y Morgenstern, 1968). Estos investigadores han detectado un dodecámero probable (19s) y '18mero' (27s). Estudios de microscopía electrónica realizados por Berns y Edwards (1965) sugieren que el hexámero es la especie predominante en las células. Bajo condiciones normales el monómero no es estable con respecto al hexámero. El equilibrio siguiente favorece el hexámero.



La técnica de purificación también afecta al grado de agregación. Así, Berns y Scott (1966) opinan que técnicas como la cromatografía en intercambio iónico y la cromatografía en hidroxapatito afectan irreversiblemente a la agregación.

Un importante efecto de la agregación es el cambio en las propiedades absorciométricas de la biliproteína y en el espectro de emisión de fluorescencia (Bergeron, 1963). Los pH extremos son también causa de variaciones espectrales (Chapman y col., 1968a y b). En disoluciones muy diluidas disminuye el coeficiente de extinción y la absorción máxima (λ_{\max}) y la absorbancia para una concentración determinada varían con la fuerza iónica y el pH (Hattori y col., 1965b; Scott y Berns, 1965; Evstigneev y Bekasova, 1968; Neufel y Riggs, 1969). Estos factores unidos al efecto de agregación explicarían las diferencias espectrales encontradas en la literatura. Los perfiles espectrales, sin embargo varían sólo ligeramente. En consecuencia el parámetro A_{620}/A_{280} que se usa como criterio de pureza, debe utilizarse con precaución, siendo esencial que todas las condiciones (temperatura, pH, concentración, fuerza iónica) así como efectos de agregación no cambien, para la comparación de pureza de preparaciones.

La disociación de biliproteínas en sus subunidades usando reactivos mercuriosos ha sido estudiada extensamente por Fujimori y sus colaboradores (Fujimori y Pecci, 1966). Inicialmente se sugirió que los reactivos mercuriosos desagregaban la proteína en sus subunidades básicas por interacción con los grupos sulfidrilos, aunque Berns (1971) sugiere además una interacción más compleja en la que la agregación esencialmente implica atracciones hidrofóbicas entre monómeros. De otra parte, la acción de desnaturizantes y detergentes no mercuriosos se supone provocada por solubilización de los grupos hidrofóbicos. Los cambios espectrales inducidos por reactivos con grupos sulfidrilo son muy marcados y han sugerido especulaciones sobre cromóforos duales. En la C-ficocianina (Fujimori y Pecci, 1966) la subunidad de mayor peso molecular tiene una absorción máxima a 605 nm mientras que la subunidad de menor peso molecular presenta dos máximos a 652 y 615 nm.

Es posible renaturalizar biliproteínas (Murphy y O'Carra, 1970) por eliminación del desnaturizante, con restauración de las propiedades espectrales y fluorescentes, sin embargo es dudoso que la renaturalización sea completa.

2.4.6.-Subunidades.

Mientras que la unidad básica de una biliproteína parece ser el monómero, hay evidencias acumuladas de que el monómero debe consistir en dos subunidades. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS) o clorhidrato de guanidina revelan la presencia de dos subunidades tanto para C-ficoeritrina como para C-ficocianina y alofococianina. En la Tabla 2-XII pueden observarse distintos valores de peso molecular para las subunidades de biliproteínas.

Una causa de la diferencia entre los valores aportados por los distintos autores puede ser la posible acción proteolítica durante la extracción o la activación por SDS (Pringle, 1970), aunque O'Carra (1970) defiende que no hay evidencia de tal actividad proteolítica. Otra posible causa es la diferente unión del SDS (Nelson, 1971) a la proteína, aunque Reynolds y Tanford (1970) creen que estas uniones son del mismo tipo. Es muy evidente que la unidad proteína-proteína y las interacciones cromóforo-proteína son muy complicadas e importantes en la interpretación de propiedades espectrales y podrían indicar si los cromóforos están, asociados o encerrados, en una región hidrofóbica de la proteína (O'hEocha, 1965).

TABLA 2-XII.

Peso molecular de subunidades de biliproteínas determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

| Biliproteína | PM (Subunidad β) | PM (Subunidad α) |
|----------------|-------------------------|--------------------------|
| C-ficocianina | 16300 | 17600 ^a |
| | 15900 | 19000 ^b |
| | 16600 | 20200 ^b |
| | 18500 | 20500 ^c |
| | 19300 | 21600 ^d |
| | 17700 | 19000 ^e |
| | 17000 | 21500 ^f |
| | 17500 | 22000 ^g |
| C-ficoeritrina | 18700 | 20000 ^a |
| | 20000 | 22000 ^b |
| | 19000 | 23000 ^c |
| Aloficocianina | 15200 | 16000 ^a |
| | 15200 | 17500 ^b |
| | 18600 | 19700 ^f |
| | 17000 | 18000 ^g |
| | 16000 | 17000 ^h |
| | 16200 | 17400 ⁱ |

^a Bennett y Bogorad (1971).

^b Glazer y Cohen-Bazire (1971).

^c O'Carra (1970); O'Carra y Kilillea (1971).

^d Hilditch y col. (1991).

^e Glazer y Fang (1973).

^f Algarra y col. (1990)

^g Wolfgang y Werner (1988)

^h Rusckowski y Zilinskas (1982)

ⁱ Cohen-Bazire y col. (1977).

2.4.7.-Modulación de las propiedades espectroscópicas por el estado de agregación y por los polipéptidos enlazantes.

Se define una biliproteína pura como aquella que contiene solamente sus subunidades características α y β . La R- y B-ficoeritrinas son excepciones a esta regla, pues retienen su polipéptido enlazante y son aisladas como complejos estables hexaméricos monodispersos. Las biliproteínas puras se diferencian de las reuniones que forman en el ficobilisoma intacto, en las interacciones entre los vecinos más cercanos, estado de agregación y conformación. En consecuencia, sus propiedades espectroscópicas como dicroísmo circular, espectro de absorción, tiempo de vida de fluorescencia y rendimiento cuántico, están alteradas en algún grado. La relevancia que cualquier investigación realizada con biliproteínas puras puede tener en el conocimiento de la función del ficobilisoma debe ser valorada con juicio y los problemas en la interpretación no son triviales.

El estudio de subunidades, monómeros y agregados de biliproteínas ha servido para encontrar hallazgos muy interesantes. A dilución alta, algunas C-ficocianinas (Neufeld y Riggs, 1969) y ficoeritrinas (Zickendraht-Wendelstadt y col., 1980) se disocian en el monómero $\alpha\beta$. Igualmente, concentraciones altas de sales caotrópicas provocan la disociación de aloficocianina (MacColl y col., 1980) y C-ficoeritrina (Zilinskas y col., 1984) en monómeros. Por el contrario, la disgregación en subunidades α y β requiere la presencia de agentes desnaturizantes, lo que significa que las fuerzas entre las subunidades de un monómero son mucho más fuertes que las que se establecen entre monómeros.

En C-ficoeritrina (Zickendraht-Wendelstadt y col., 1980) y C-ficocianina (Glazer y col., 1973), la suma del espectro de absorción de las subunidades α y β aisladas, corresponde al del monómero. Sin embargo, se observan grandes cambios en el espectro de absorción, fluorescencia y en el rendimiento cuántico de agregados (Bennett y Bogorad., 1971; Glazer y col., 1973). Así, por ejemplo, la banda de absorción con máximo a 650 nm que presenta la aloficocianina solo aparece tras la formación del trímero (MacColl y Berns, 1981). En general la formación de agregados va asociada con los siguientes fenómenos: a) aumento de la intensidad de la banda de absorción de mayor longitud de onda; b) cambios en el dicroísmo circular a mayor λ ; c) aumento del tiempo de vida de fluorescencia y del rendimiento cuántico. Los datos de propiedades espectroscópicas que se indican en la Tabla 2-XIII proporcionan ejemplos de algunos efectos comentados.

Los complejos biliproteína-polipéptido enlazante, obtenidos de ficobilisomas por procedimientos apropiados de fraccionamiento, mantienen a las biliproteínas en formas hexaméricas o triméricas bajo condiciones en las que las biliproteínas puras dan una mezcla polidispersa de agregados $(\alpha\beta)_n$ (Gingrich y col., 1982, 1983; Lundell y Glazer, 1983a y b). Asimismo, los complejos biliproteína-polipéptido enlazante, muestran bandas de absorción más intensas a alta λ , así como mayores tiempos de vida de fluorescencia y rendimientos cuánticos que las biliproteínas puras, estando ambas en iguales condiciones.

TABLA 2-XIII

Propiedades espectroscópicas de subunidades y agregados de C-ficoeritrina de *Nostoc sp.*

| | $\alpha\beta$ | $(\alpha\beta)_3$ | $(\alpha\beta)_6X^d$ | $(\alpha\beta)_{12}X^d$ |
|---------------------------------------|---------------|-------------------|----------------------|-------------------------|
| A_{550}/A_{305} | 6.4 | 8.9 | 8.7 | 7.9 |
| λ_{\max}^F ^e ,(nm) | 575 | 577 | 578 | 581 |
| Φ_F ^f | 0.75 | | | |

^bDesnaturalizada en urea 8 M, pH 8.

^cObtenida por incubación de ficoeritrina con 1 M KSCN.

^dX representa polipéptidos enlazantes.

^eMáximo de emisión en fluorescencia.

^fDato sobre C-ficoeritrina de *Pseudoanabaena*.

Lo descrito en párrafos anteriores es concordante con la idea de que las propiedades espectroscópicas de las bilinas son muy sensibles a la conformación del cromóforo y así la absorción y fluorescencia de una bilina dependen de si es un estado nativo o si se encuentra en cadenas no plegadas. El primer paso en la obtención de espectros debe ser la selección de condiciones experimentales que generen un estado de asociación lo más determinado posible al objeto de que la disolución sea monodispersa.

2.4.8.-Bilinas (bilipigmentos).

2.4.8.1.-Estructura y formas de enlace al polipéptido.

Los grupos prostéticos de las biliproteínas (bilinas) están relacionados con el pigmento biliar biliverdina, que es un precursor biosintético (Kost y Benedict, 1982; Beale y Cornejo, 1983). Los análisis espectroscópicos así como estudios de la estructura de bilinas obtenidas de biliproteínas por ruptura química han puesto en evidencia al menos cuatro diferentes bilinas presentes en las biliproteínas de cianobacterias y algas rojas (Siegelman y col., 1968; Bryant y col., 1976; O'Carra y O'hEocha, 1976; Badu y col., 1991). En biliproteínas nativas, los picos de absorción en la región entre 600-670 nm han sido asignados a ficocianobilina, aquellos entre 540 y 570 nm a ficoeritrobilina, los que se manifiestan a 495-500 nm a ficourobilina y los que aparecen entre 580-595 se han asignado a ficobiliviolina. En todos los casos los tetrapirroles están unidos a la cadena polipeptídica a través de enlaces tioéter. Sin embargo, hay al menos dos modos de enlace para cada tipo de bilina, así se han encontrado enlaces a través del anillo A, del D y de ambos a la vez. Las estructuras establecidas hasta la fecha se indican en la Figura 2-6 (Lundell y col., 1984). Cada bilina resulta unida a un (o dos) residuo (s) cisteinil. Así, por ejemplo en la subunidad β de C-ficocianina, una ficocianobilina está enlazada a través del anillo A y la otra, del D. Es razonable suponer que las diferencias estructurales tanto en los enlaces bilina-polipéptido, como en la secuencia de aminoácidos alrededor de dichos enlaces, contribuyan significativamente a la generación del complejo espectro de absorción de las biliproteínas.

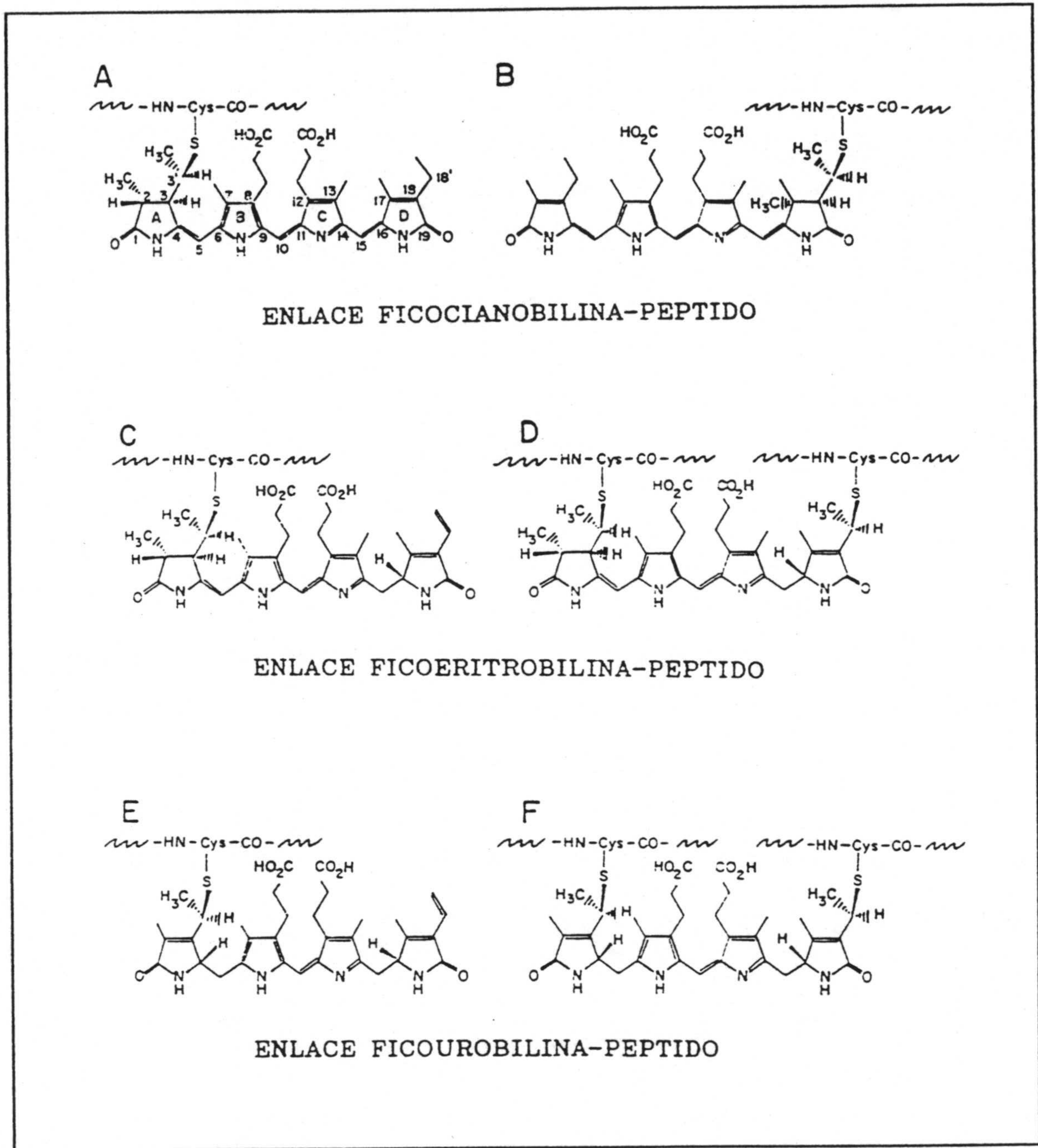


Figura 2-6

Enlaces bilina-peptido en biliproteínas. (A) ficocianobilina enlazada a través del anillo A; (B) ficocianobilina enlazada a través del anillo D; (C) ficoeritrobilina enlazada a través del anillo A; (D) ficoeritrobilina doblemente enlazada; (E) ficourobilina enlazada a través del anillo A; y (F) ficourobilina doblemente enlazada.

2.4.8.2.-Propiedades conformacionales y espectroscópicas.

Las bilinas en disolución están como mezcla de formas configuracionales, conformacionales y tautoméricas. La configuración en un puente metino puede ser Z o E y la conformación *syn* o *anti*. Las representaciones de las posibles configuraciones y conformaciones planares del 5(1H)-pirrometanona, se indican en la Figura 2-7. En bilinas, la conformación total puede ir desde hélices macrocíclicas (como en el dimetil éster de biliverdina cristalizado) en que la configuración en los puentes metino es Z,Z,Z, hasta abierta como una cadena extendida (E,E,E). Así bilinas muy relacionadas pueden diferir en conformación debido a impedimentos estéricos causados por los sustituyentes de los anillos, lo que conduce a diferencias en los ángulos de torsión δ_1 y δ_2 de los puentes metino. La heterogeneidad estructural se ha observado incluso en cristales (Sheldrick, 1983).

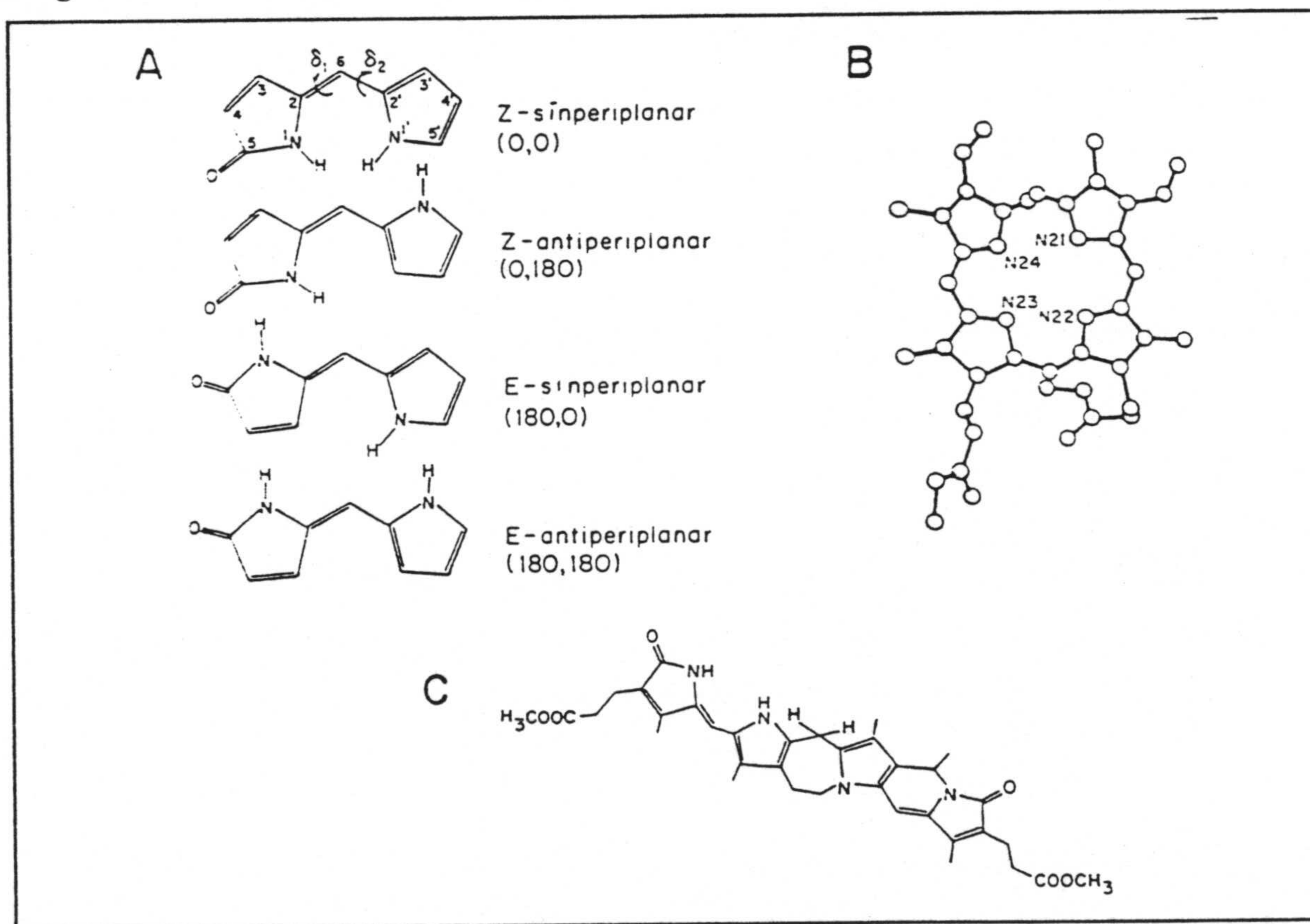


Figura 2-7

(A) Las cuatro posibles representaciones planares de 5(1H)-pirrometanona; (B) Estructura molecular del dimetil éster de biliverdina; (C) Isoforcarubina.

Como ya se ha indicado, las biliproteínas son muy fluorescentes y poseen rendimientos cuánticos, ϕ_f , por encima de 0.5. Sin embargo las bilinas fluorescen muy poco, debido a que el decaimiento por fluorescencia debe competir con varios procesos no radiativos de relajación tales como, reacciones de transferencia protónica en el estado excitado, fotoisomerización, cruce entre sistemas y giro alrededor de los que son dobles enlaces en el estado fundamental, pero que en el estado excitado son esencialmente enlaces simples. Esta flexibilidad conformacional proporciona la trayectoria más eficaz para el proceso de relajación no radiativa. Por ejemplo, la isoforcarubina que posee una conformación extendida relativamente rígida (Figura 2-7), muestra un ϕ_f de sólo 0.04 en etanol a 298 K, y experimenta un drástico ascenso hasta $\phi_f=0.81$ si se disminuye la temperatura hasta 77 K (Kufer y col., 1983).

En una revisión sobre estudios espectroscópicos de bilinas, Braslavsky y col. (1983) indican que algunas bilinas en disolución se presentan en tres o cuatro conformaciones diferentes que no están en equilibrio mutuo a temperatura ambiente, por lo que la interconversión entre los conformeros requiere calor o sonicación. Estos conformeros exhiben grandes diferencias en sus espectros de excitación y tiempos de vida del estado excitado (Braslavsky y col., 1983; Holzwarth y col., 1983). Holzwarth y col. (1983) trabajando con disoluciones del dimetil éster de biliverdina a temperatura ambiente, han detectado dos especies emisivas con tiempo de vida corto (< 100 ps) y dos de tiempo de vida más largo (> 1 ns). Estos autores deducen que las especies de mayor tiempo de vida deben de ser rígidas, ya que no están sujetas a una rápida relajación no radiativa a través de cambios conformacionales; además, deben de ser cadenas extendidas, ya que tampoco tiene lugar una rápida desactivación por transferencia protónica entre los nitrógenos pirrólicos. Como estos resultados son concordantes con la interpretación de que el éster dimetílico de la biliverdina puede adoptar conformaciones relativamente rígidas en disolución incluso a temperatura ambiente, Holzwarth col. (1983) concluyen que la interacción estabilizante con la proteína no es una condición a priori necesaria para la rigidez conformacional de los tetrapirroles en las biliproteínas. Presumiblemente la proteína selecciona y retiene rigidamente un conformero específico de entre los preexistentes, controlando así el equilibrio conformacional del tetrapirrol. Además, en el conformero seleccionado la estructura de la proteína, así como el ambiente proteico son tales, que evitan las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado y otras reacciones fotoquímicas.

2.4.9.-Purificación de biliproteínas.

Un procedimiento de purificación que vaya bien para una biliproteína de un organismo no es necesariamente un buen método para la correspondiente proteína de otro organismo. La obtención de biliproteínas puras ha sido motivo de numerosas investigaciones. Los primeros éxitos relevantes en la purificación de las mismas, fueron conseguidos por Grant y Lipschultz (1974), bien por doble electroforesis en gel de acrilamida, por centrifugación en gradiente de sacarosa o por filtración en columna de Sephadex G-200 seguida de electroforesis en gel de acrilamida. Se han utilizado variaciones sobre estas técnicas, como son el empleo de HPLC y la ultracentrifugación, que han permitido la purificación de algunas biliproteínas en escala semipreparativa (Gombos y col., 1984; Schatz y Witt, 1984; Stewart y Farmer, 1984) y preparativa (Duval y col., 1987; Padgett y Krogmann, 1987; Glazer, 1988). La metodología utilizada por Glazer en (1988), consiste en una serie de tratamientos previos en los que se somete al alga suspendida en tampón, acetato sódico, a diferentes tratamientos con ultrasonidos y centrifugaciones, consiguiéndose obtener extractos que posteriormente son tratados en diferentes etapas cromatográficas. En la primera de ellas se usa como lecho cromatográfico Sephadex G-100, mientras que en la siguiente se utiliza un cambiador iónico como es el DEAE-celulosa o se hace uso de una columna de brushita.

Se suele tomar como criterio de la pureza alcanzada en las separaciones cromatográficas, valores concretos de relaciones absorciométricas a longitudes de onda características. Uno de los más utilizados preconiza que la C-ficocianina se encuentra pura cuando la relación A_{620}/A_{280} sea mayor de 3.4, mientras que para aloficocianina el criterio adoptado es que la relación A_{650}/A_{280} sea mayor de 3 o bien que la relación A_{620}/A_{650} permanezca constante en una serie de fracciones (Bryant y col., 1978; Zilinskas y col., 1978; MacColl y col., 1980; Siegelman y Kycia., 1982; Gombos y col., 1984; Padgett y Krogman., 1987; Hilditch y col., 1991). Sin embargo, estos criterios han sido ampliamente criticados y la pureza debe establecerse por otras técnicas (SDS-PAGE, HPLC, etc.)

Gombos y col. (1984), obtienen aloficocianina usando una extracción inicial por tratamiento con acetona. También describen un método adicional muy rápido usando Al_2O_3 . Ambos procedimientos de extracción se continúan con una cromatografía sobre hidroxiapatito. El criterio de pureza se basa en la relación A_{620}/A_{650} .

Padgett y Krogman (1987) obtienen C-ficocianina y aloficocianina mediante filtración en membranas seguida por cromatografía de cambio iónico en DEAE celulosa. La pureza de las fracciones la establecen por HPLC y secuencia de aminoácidos terminales.

Más recientemente (Hilditch y col., 1991) también han obtenido resultados satisfactorios mediante fraccionamiento por sulfato amónico y sucesivos pasos de cromatografía de cambio iónico y filtración por gel. La pureza y peso molecular de C-PC la obtienen por SDS-PAGE (Figura 2-8). Las biliproteínas purificadas se comportan como proteínas globulares solubles en agua. Son debilmente ácidas con puntos isoelectricos alrededor de pH 5 y estables en el rango de 5-9 unidades de pH.

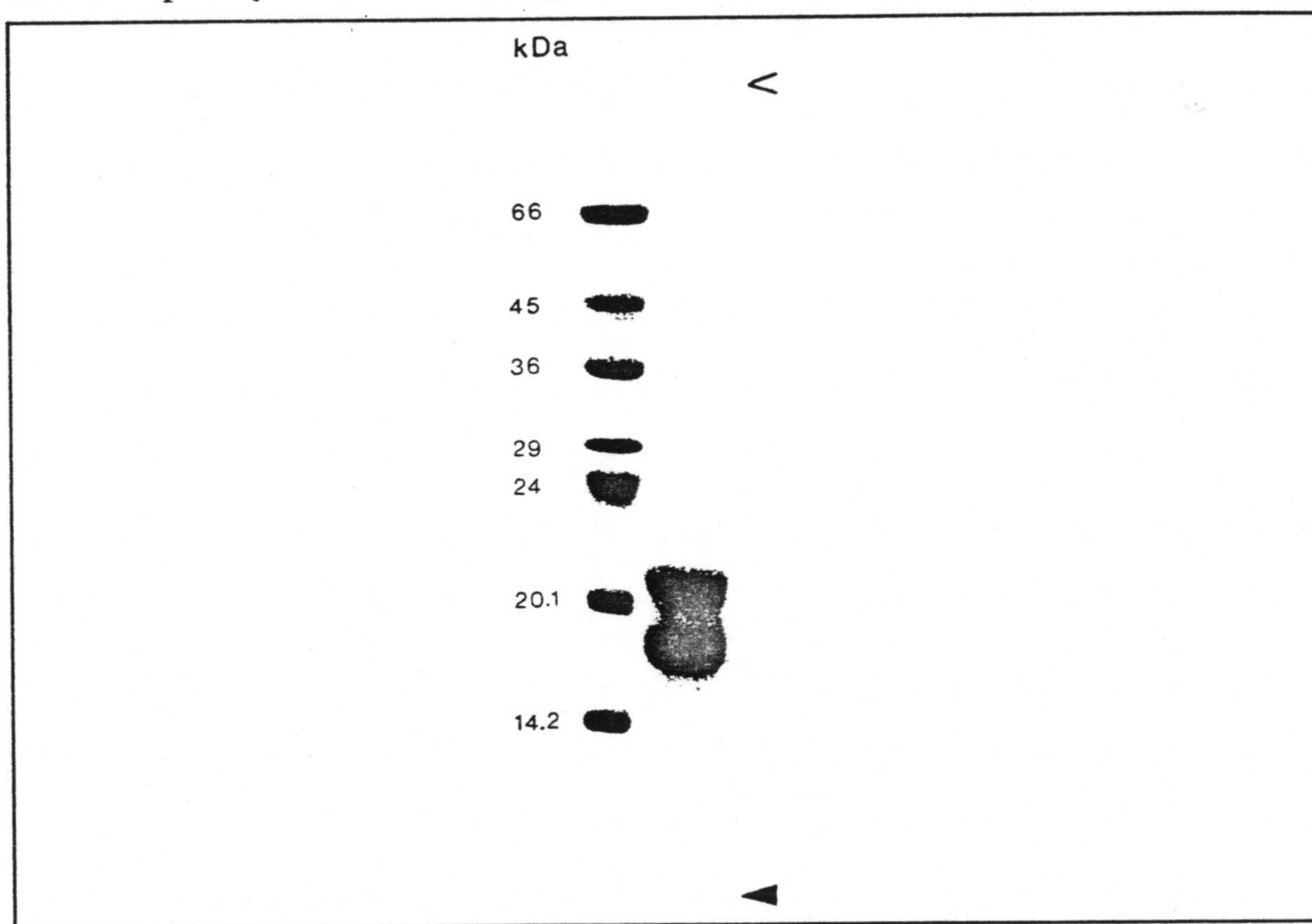


Figura 2-8

Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La electroforesis se realizó a un 12.5 % de acrilamida. La primera calle muestra las bandas de los patrones de peso molecular, mientras en la segunda se observan las dos bandas correspondientes a las subunidades α y β de la C-ficocianina.

2.4.10.-Caracterización por HPLC de biliproteínas.

Buena parte de los estudios de cromatografía líquida de alta resolución realizados sobre biliproteínas tienen por objeto la corroboración de la pureza de las mismas tras los procesos de purificación. También se han realizado estudios de HPLC para determinación y separación de las subunidades constitutivas de las biliproteínas, ya que la caracterización de las mismas con respecto a la composición en subunidades, tipo y contenido de bilinas y secuencia de aminoácidos requiere la separación en dichas subunidades.

Las mayor parte de los métodos utilizados hasta el momento tienen desventajas ya que no son aplicables a la mayoría de las biliproteínas, las separaciones requieren largos periodos de tiempo y además consumen del orden de varios miligramos de proteína. Padgett y Krogmann (1987) utilizan la cromatografía HPLC semipreparativa en fase reversa para separar y obtener varios miligramos de las subunidades de aloficocianina y C-ficocianina procedentes de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, empleándola además como técnica para comprobar la pureza de las biliproteínas obtenidas.

Swanson y Glazer (1990) abordaron la separación y caracterización de las subunidades de diversas biliproteínas procedentes de distintas cianobacterias mediante HPLC en fase reversa utilizando una columna C₄ y como fase móvil el sistema formado por 0.1% ácido trifluoracético en agua y 0.1% de ácido trifluoracético en acetonitrilo:isopropanol (2:1, v/v). En el año siguiente el mismo grupo de investigadores, caracteriza las biliproteínas de *Synechocystis sp.* y sus subunidades. Estas biliproteínas poseen un elevado contenido en ficourobilina, la presencia de este cromóforo revela una importante adaptación al ambiente marino. Con este fin, utilizan la técnica de HPLC en fase reversa, con una columna C₄ semipreparativa para obtener las biliproteínas purificadas y analítica para separar las subunidades (Swanson y col, 1991). Proponiendo así estos autores, una metodología que además de ser aplicable a la mayoría de las biliproteínas, es rápida y necesita poca cantidad de muestra.

Más recientemente Chou y Jeng (1993) mediante esta técnica resuelven las subunidades de las biliproteínas constitutivas de la cianobacteria *Bangia atropurpurea*, utilizando columnas C₄ y C₈ de fase reversa y una fase móvil parecida a la empleada por Swanson y Glazer (1990). Además los mismos autores con una columna Bio-Gel MA7P de

cambio iónico consiguen separar los isómeros cargados de la R-ficoeritrina que nunca habían sido resueltos y posteriormente identificar sus subunidades constituyentes mediante una columna PRP-3 de fase reversa.

En todos los casos la identificación de las subunidades se hizo por comparación de sus espectros de absorción con los reportados en la literatura.

2.4.11.-Aplicaciones de las biliproteínas.

2.4.11.1.-Utilización como colorantes naturales.

Las biliproteínas como pigmentos fotosintéticos que son, tienen gran relevancia comercial por su carácter de colorantes naturales. Las reglamentaciones existentes hoy en día sobre el empleo de colorantes sintéticos en productos alimenticios son muy estrictas, habiéndose promovido la puesta en marcha de programas de producción de colorantes de origen natural. Todas estas investigaciones han dado lugar al registro de 356 patentes, frente a sólo 71 de colorantes sintéticos en el mismo período. Grandes compañías, como Eastman Kodak y Hoffmann La Roche están implicadas activamente en este campo (Klausner, 1986; Parkinson, 1987; Guerrero y Losada, 1989).

2.4.11.2.-Utilización como marcadores fluorescentes.

Otra aplicación de las biliproteínas es la utilización como marcadores fluorescentes. En este sentido, sustituyen con ventajas a la fluoresceína que es el colorante más utilizado como marcador en Bioquímica y Biología. En efecto, la fluoresceína presenta algunos inconvenientes tales como la disminución de la solubilidad en agua de las proteínas y el aumento de la tendencia de éstas a unirse inespecíficamente a otras sustancias. Además, el tipo de emisión verde característico de la fluoresceína es producida también por algunas sustancias naturales presentes en los fluidos y tejidos biológicos, lo que provoca la consiguiente falta de especificidad.

Las biliproteínas presentan muchas ventajas, respecto a los marcadores fluorescentes

tradicionales: así fluorescen con un alto rendimiento cuántico; su emisión no se altera prácticamente en márgenes amplios de temperatura y de pH; son muy solubles en agua; se pueden almacenar durante meses pues son muy estables y la fluorescencia anaranjada que producen es fácil de diferenciar de la fluorescencia verde producida por sustancias naturales. Por todas estas propiedades, las biliproteínas pueden ser catalogadas como inmejorables marcadores fluorescentes útiles en el estudio diagnóstico e investigación biomédica (Glazer y Stryer, 1984; MacColl y Guar-Friar, 1987).

Las biliproteínas pueden conjugarse fácilmente con una gran variedad de moléculas para formar combinados denominados "phycofluors" por Glazer y Stryer (1984), mediante reacciones entre los grupos NH_2 de sus abundantes cadenas laterales de lisina. Se han obtenido conjugados de este tipo mediante la unión de biliproteínas con inmunoglobulinas y avidina. También moléculas pequeñas como la biotina se pueden unir a las biliproteínas por reacción con un activador apropiado de la molécula pequeña. Estos "phycofluors", se purifican mediante H.P.L.C. o por filtración en columna y cromatografía sobre hidroxapatito obteniéndose combinados muy utilizados en inmunoensayos fluorimétricos y en citometría de flujo.

En los inmunoensayos se genera una señal por algún elemento radiactivo, fluorescente, etc. Los marcadores radiactivos han sido usados extensamente en inmunoensayos, a pesar de las dificultades de desgaste, peligro de exposición a niveles altos de radiación y vida limitada. Sin embargo, los conjugados fluorescentes no tienen este tipo de inconvenientes (Soini y Hemmita, 1979). Los "phycofluors" han sido examinados para su uso como marcadores fluorescentes de alta sensibilidad en estos tipos de análisis y se utilizan ventajosamente en inmunoensayos homogéneos, ya que no requieren una etapa posterior de separación tras la mezcla de anticuerpo y analito (Kronick y Grosman, 1983).

Las biliproteínas pueden usarse además en técnicas de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, existiendo un número considerable de patentes (Paulus, 1985; Schwartz, 1986, 1987; Cohen y col., 1988; Dolbeare y col., 1989; Loken y col., 1989; Terstappen y col., 1989; Schwartz, 1990).

2.4.11.3.-Otras aplicaciones.

Se han desarrollado estudios clínicos dirigidos a comprobar la eficiencia de las biliproteínas en el tratamiento de distintas formas de cáncer. Así, extractos de cianobacterias se han revelado como efectivos agentes anti-cáncer (Koho, 1982). Asimismo, se ha demostrado que la ficocianina posee efectos positivos sobre el sistema inmunitario. Así, experimentos de administración oral de extracto de ficocianina a ratones con cáncer de hígado demostraron que el índice de supervivencia del grupo de tratamiento fue significativamente más alto que el observado en el grupo de control no tratado con ficocianina, encontrándose además un incremento de la actividad linfocitaria (Dainippon y col, 1983).

2.5.-ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE PROTEÍNAS EN DISOLUCIÓN.

2.5.1.-Generalidades.

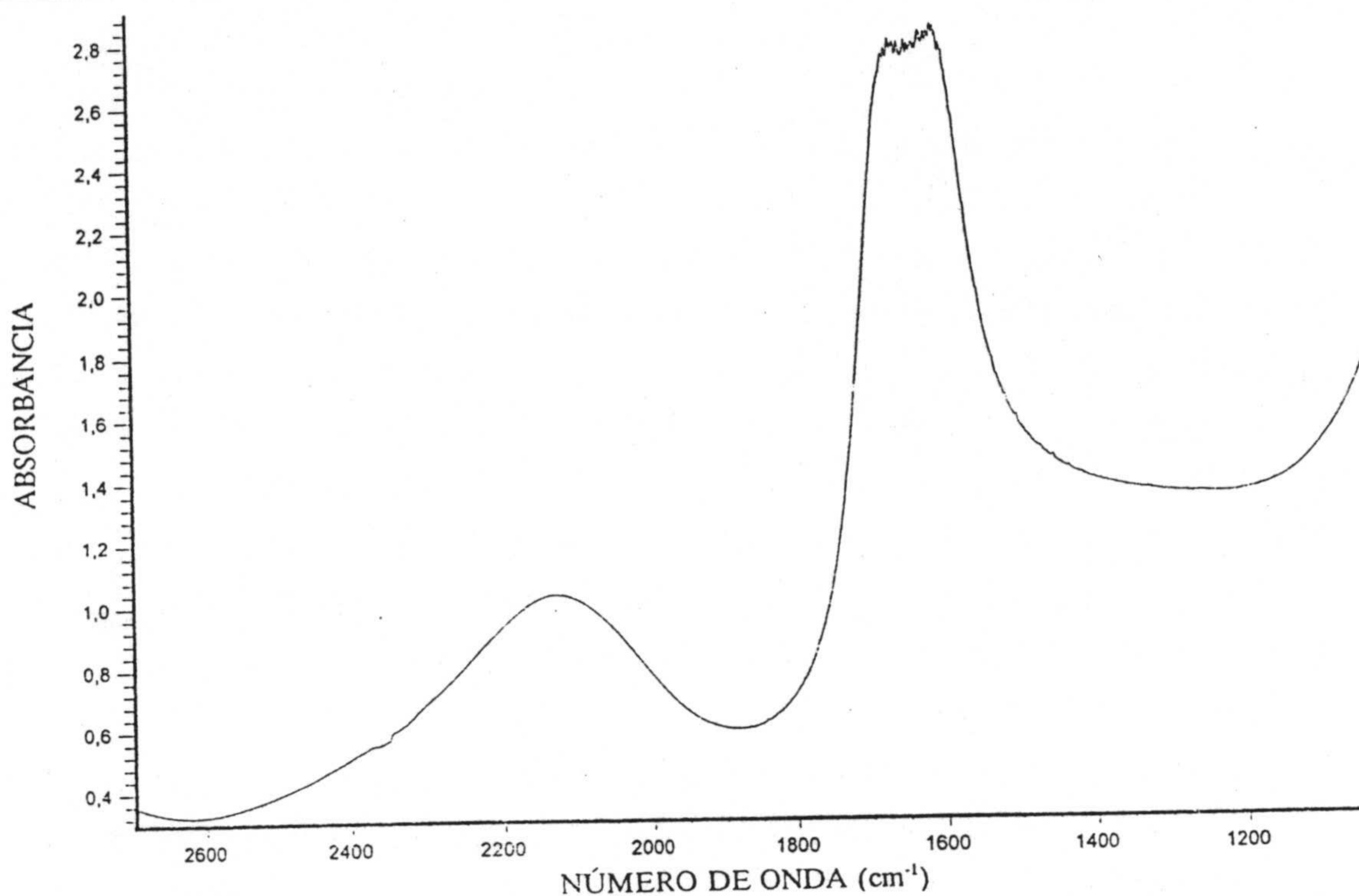
El conocimiento de la conformación proteica ha sido una de las mayores metas en bioquímica desde que se conoce la importancia de la relación estructura-función-propiedades. No obstante este conocimiento ha estado limitado por la disponibilidad de los métodos de observación. La complejidad de los niveles estructurales en proteínas ha desafiado a generaciones de bioquímicos en busca de métodos analíticos cada vez más potentes. Hoy en día se siguen buscando métodos experimentales simples que aporten información fiable sobre las estructuras secundaria y terciaria de proteínas, así como de cambios conformacionales producidos por factores externos o internos.

La difracción de rayos-X fue uno de los primeros métodos usados en la resolución de conformaciones proteicas. Esta técnica puede resolver la estructura terciaria de forma completa. Desde el momento en que se consiguió la primera cristalización de proteínas (Hoppe-Seyler, 1864) se pensó que éstas poseían estructuras definidas y los primeros estudios de difracción de rayos-X mostraron que los cristales estaban ordenados a una escala más pequeña que la distancia de enlace atómico (Bernal y Crowfoot, 1934). Un cuarto de siglo tuvo que transcurrir antes de que existieran métodos lo suficientemente precisos como para resolver la complejidad atómica de una molécula como la mioglobina, aunque Pauling anteriormente ya había postulado su estructura α -hélice (Pauling y col., 1951). No obstante

existen muchos factores que hacen de la difracción una técnica inadecuada como es, la incapacidad o dificultad de conseguir crecer cristales de ciertas proteínas, las limitaciones a modificar el ambiente proteico (pH por ejemplo) y sobre todo, las diferencias que pueden existir entre una proteína en disolución y en estado cristalino además de los problemas de traslación de la información estática obtenida a las propiedades dinámicas.

Otras técnicas espectroscópicas utilizadas para el estudio de la conformación proteica han sido la RMN bidimensional, introducida recientemente en el estudio de proteínas en disolución (Wüthrich, 1989) y la RMN en tres y cuatro dimensiones (Oschkinat y col, 1994), pero que esta aún limitada a proteínas de bajo peso molecular. Igualmente RSE y las espectroscopías tradicionales (visible, uv, fluorescencia, dicroísmo circular, etc) tienen sus limitaciones específicas para estos tipos de estudios por necesitar de pruebas externas que limitan la información obtenida a las cercanías del experimento o por interferencias ópticas.

El uso de la espectroscopía infrarroja para la determinación de estructuras moleculares y establecimiento de las bandas vibracionales, data de la primera mitad de siglo (Elliot y Ambrose, 1950). Mediante esta técnica puede estudiarse la estructura secundaria de las proteínas en disolución. Sin embargo, a finales de los sesenta el interés en la espectroscopía IR para estudios de conformación proteica disminuyó debido a las dificultades en la obtención de espectros y en la extracción de la información contenida en ellos. Entre las principales desventajas, se pueden citar las bajas sensibilidades de los espectrofotómetros infrarrojos que generan espectros con relación señal/ruido muy baja y la fuerte absorción del agua, el medio fisiológico donde las proteínas están disueltas (Figura 2-9).

**Figura 2-9**

Espectro de FT-IR entre 1000 y 2700 cm^{-1} de agua destilada a 25°C. Se han tomado 750 barridos a una resolución de 2 cm^{-1} .

El interés renovado por el uso de IR para el estudio de biomoléculas llegó a través de la revolución introducida en la instrumentación con la incorporación de espectrofotómetros infrarrojos de Transformada de Fourier (FT-IR). El desarrollo de los microcomputadores permitió, diseñar instrumentos basados en el interferómetro de Michelson y la fácil aplicación del algoritmo de Transformada de Fourier (Cooley y Tukey, 1965) con la consiguiente ventaja de la mejora en la relación señal/ruido. El ordenador requerido en estos instrumentos para realizar todos los cálculos matemáticos, puede usarse asimismo en el tratamiento de datos ayudando al desarrollo de la técnica (por ejemplo la substracción en los espectros de la banda del agua) (Powel y col, 1986; Valpuerta y col, 1988; Dousseau y col, 1989).

De la observación del espectro de infrarrojo del agua (Figura 2-9), se puede ver que esta molécula absorbe principalmente en dos zonas del espectro infrarrojo. No obstante, la banda centrada a 1640 cm^{-1} es la que mayor importancia tiene en los estudios estructurales biológicos, ya que las proteínas presentan una intensa banda de absorción entre 1600 y 1700 cm^{-1} denominada banda amida I, de la que se obtiene información sobre la estructura

secundaria.

El espectro infrarrojo de péptidos y proteínas contiene varias bandas de absorción relativamente intensas, asociadas a la vibración del enlace peptídico (-CO-NH-). Estos modos de vibración se denominan amida A, B y I-VII. La frecuencia a la que aparecen las correspondientes bandas es sensible a la conformación de la proteína. Debido a su intensidad conformacional, la banda amida I (80% tensión C=O) es la más utilizada en estudios estructurales de proteínas. Para obviar el problema de la coincidencia de la banda del agua en la zona de la banda amida I, se utiliza como disolvente D₂O en vez de H₂O, ya que en este la tensión que origina dicha banda se desplaza hacia números de onda menores, permitiendo una mejor detección de la señal de la banda amida I. Por ello, hay gran cantidad de trabajos sobre proteínas realizados en D₂O (Arrondo y col., 1993). La banda amida I, como ya se ha comentado se debe fundamentalmente a las tensiones C=O y C-N y a la flexión C=O, todas ellas correspondientes al enlace peptídico. Según la estructura secundaria que adopte la proteína, la vibración de estos enlaces se verá afectada por la presencia de puentes de hidrógeno con lo que variarán sus frecuencias características. Las frecuencias características de cada estructura varían ligeramente dependiendo de los autores. En la Tabla 2-XIV se indican las frecuencias características para cada tipo de estructura secundaria de proteínas en D₂O (Cabiaux y col., 1989 a,b).

Cada tipo de estructura tiene frecuencias muy próximas entre sí, y como suelen ser bandas anchas, solapan fácilmente dando lugar a una única banda en la que aquellas son difícilmente distinguibles. Inicialmente y hasta no hace muchos años, la estructura secundaria de las proteínas era determinada a partir de la forma global de la banda amida I, por lo que la información así obtenida era meramente cualitativa y cargada de cierta imprecisión. Sin embargo, con el desarrollo de los modernos métodos de cálculo se ha podido llegar a la resolución de las bandas obtenidas por esta técnica. De esta forma, los métodos más usuales para la resolución de las bandas amida I son la autodeconvolución de Fourier y la derivación del espectro de absorción o de su transformada de Fourier. La aplicación de estos métodos data de poco más de una década atrás (Susi y Byler, 1986). No obstante es de resaltar, que este tipo de tratamiento de datos lo que aumenta no es la resolución instrumental sino las diferencias de los componentes ya resueltos, haciendo más fácil su localización y además aportan la base para estudios cuantitativos de conformaciones proteicas (Dong y col, 1990).

TABLA 2-XIV

Números de onda característicos de la banda amida I para distintos componentes de la estructura secundaria de proteínas (Cabiaux y col., 1989 a,b).

| Tipo de Estructura | Amida I en D ₂ O (cm ⁻¹) |
|----------------------|---|
| Hélice alfa (α) | 1647.5-1661 |
| Lámina plegada (β) | 1682-1689 1627.5-1637.5 |
| β de baja frecuencia | 1615-1627.5 |
| Random (R) | 1637.5-1644.5 |
| Giros (G) | 1661-1682 |

La relajación vibracional se puede expresar como una banda lorenziana (o función de Cauchy) deducida a partir de estudios de dinámica molecular:

$$A(\nu) = A_0 \gamma^2 [\gamma^2 + (\nu - \nu_0)^2]$$

donde A_0 es la absorbancia máxima de la banda, ν_0 es el número de onda para A_0 y γ es la anchura a media altura del pico.

La autodeconvolución de Fourier aplicada a esta ecuación proporciona una expresión con un término de decaimiento exponencial, tal que cuanto mayor sea γ mayor es este término en la autodeconvolución. De esta forma si al término de decaimiento se le multiplica por un factor determinado, la anchura γ de la nueva banda disminuirá, y se puede definir un factor de aumento de la resolución como:

$$K = (\gamma / \gamma')$$

El otro procedimiento para aumentar la resolución en infrarrojo es el de la derivación del espectro de absorción como de su transformada de Fourier (Susi y Byler, 1986). La derivación de orden par hace que los puntos de inflexión se conviertan en máximos,

haciéndose mucho más visibles.

Mediante la utilización de estos métodos se puede obtener de forma más precisa las frecuencias características de los diferentes tipos de estructura secundaria que presenta la proteína en cuestión. Estos métodos permiten sólo de manera cualitativa la identificación de las estructuras presentes en la proteína, ya que el procesado de datos conlleva distorsiones en la forma del espectro y estrechamiento de las bandas que forman la envolvente.

Los procedimientos de ajuste de la banda amida I (Arrondo y col, 1993) sobre los espectros originales y deconvueltos, permiten cuantificar la estructura secundaria de proteínas. El número y la posición (frecuencia) de las bandas individuales se determina a partir del espectro deconvuelto y del espectro derivado en el espacio Fourier. Una vez fijadas estas frecuencias se asignan una serie de parámetros de partida como son la intensidad (altura de banda), anchura de banda (una lógica a cada frecuencia) y la forma de la banda (lorenziana-gaussiana). En definitiva, consiste en proponer una serie de bandas lógicas asociables a una estructura y cuya suma reproduzca la banda original, calculándose la desviación entre la real y la calculada y haciéndose correcciones hasta converger en un punto. Mediante un procedimiento iterativo se inicia el proceso de refinamiento de parámetros hasta llegar al resultado óptimo donde se obtiene para cada una de las bandas propuestas, una anchura y altura óptimas y de la medida del área encerrada bajo ellas, el tanto por ciento de cada estructura presente en la proteína. Con una buena razón señal/ruido, las áreas de las bandas en el espectro deconvuelto son muy similares a las bandas obtenidas en la banda amida I original (Mantsch y col., 1988).

En lo referente a la **instrumentación** empleada en esta técnica, en la Figura 2-10 se muestra un esquema con los elementos fundamentales de un espectrofotómetro FT-IR: detector, interferómetro de Michelson y fuente luminosa.

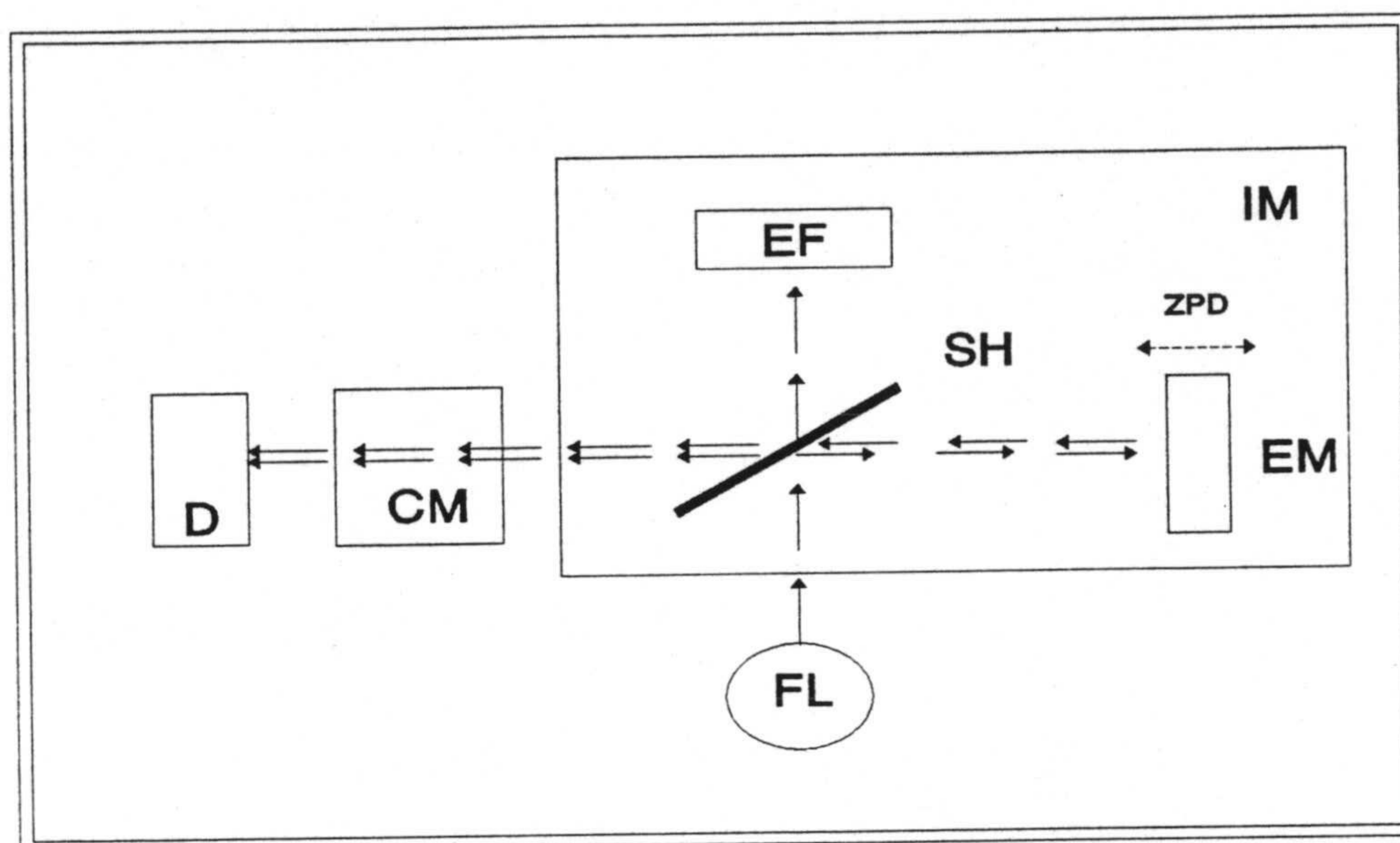


Figura 2-10

Esquema de los elementos fundamentales que componen un espectrofotómetro FT-IR: cámara de muestra (CM), detector (D), espejo fijo (EF), espejo móvil (EM), fuente luminosa (FL), interferómetro de Michelson (IM), separador de haces (SH).

El detector de un FT-IR, a diferencia del de un espectrofotómetro convencional de infrarrojo, tiene que distinguir una modulación de la intensidad en función del tiempo (del desplazamiento del espejo móvil), esta intensidad varía del orden de unas 1000 veces por segundo y por ello el tiempo de respuesta del detector debe ser muy corto. Existen dos tipos de detectores: los térmicos y los cuánticos. La respuesta del detector es igual a la suma de todas las longitudes de onda moduladas sinusoidalmente y presentes en el intervalo de la fuente luminosa. Existe un punto llamado ZPD donde la respuesta es máxima, ya que es el único punto donde todas las longitudes de onda están en fase simultáneamente y por tanto interfieren constructivamente (Figura 2-11) (ZPD: lugar donde el espejo móvil se encuentra a igual distancia del separador de haces que el espejo fijo).

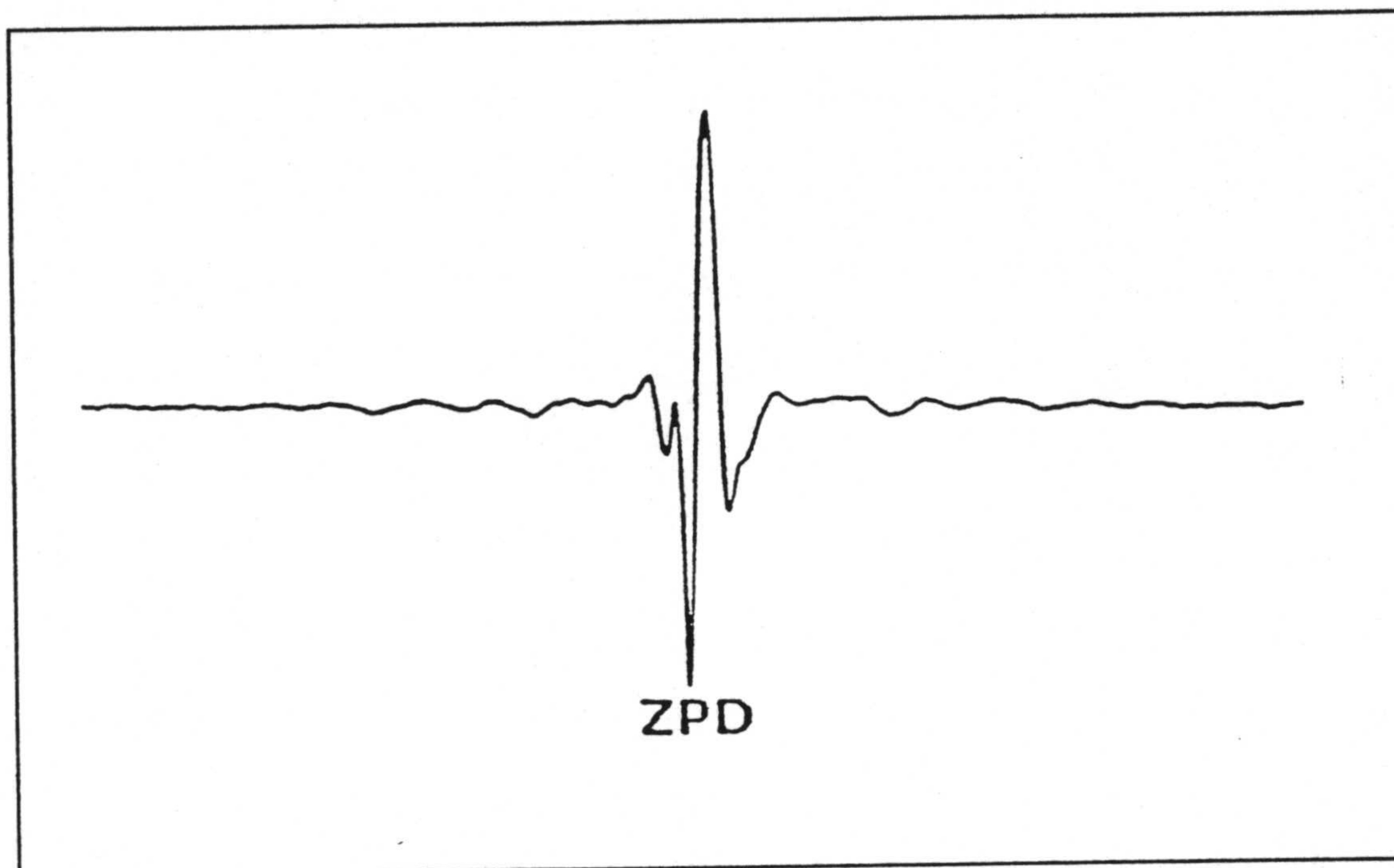


Figura 2-11

Interferograma obtenido en un espectrofotómetro de FT-IR.

La resolución en un espectrofotómetro de FT-IR viene determinada por la longitud que se desplaza el espejo móvil respecto del punto ZPD, cuanto mayor sea este recorrido mayor será la resolución, ya que la transformada de Fourier sólo puede distinguir dos frecuencias distintas si existe una diferencia en sus ondas moduladas y de esta forma si dos frecuencias son similares también lo serán sus ondas moduladas y sólo se apreciará esta diferencia si el espejo se desplaza un espacio mayor. En un aparato de FT-IR bien diseñado el ruido existente se debe al detector y puede disminuirse acumulando interferogramas. Estadísticamente, el ruido disminuye con la raíz cuadrada del número de interferogramas tomados por experimento.

2.5.2.-Ventajas de la técnica.

La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR), presenta una serie de ventajas sobre la espectroscopía infrarroja dispersiva o tradicional:

1.-Ventaja de Fellgett, consistente en un aumento de la sensibilidad y de la velocidad, ya que se trabaja con todas las longitudes de onda a la vez, por lo que el tiempo que se tarda en obtener un espectro es mucho menor que con la técnica convencional. De esta forma se pueden realizar estudios cinéticos y trabajar con muestras inestables, así como conseguir un aumento de la relación señal-ruido para un mismo tiempo de experimentación, ya que el número de espectros que se puede tomar es mucho mayor.

2.-Un equipo de FT-IR no contiene piezas móviles a excepción del espejo, por lo que su vida media es muy superior a un aparato dispersivo convencional.

3.-Ventaja de Connes. Los FT-IR incorporan una referencia interna de longitud de onda, constituida por un láser de He-Ne del cual se conoce con exactitud su longitud de onda, para calcular el retardo en la posición del espejo móvil y controlar de esta manera dicha posición, determinando las bandas con gran precisión (de $\pm 0.01 \text{ cm}^{-1}$ en número de onda). Se obtiene de esta forma un calibrado permanente.

4.-Ventaja de Jacquinot. La técnica de FT-IR prescinde de rendijas para la obtención de bandas estrechas en longitudes de onda, siendo de esta forma, mucho mayor la superficie de muestra donde incide la fuente luminosa, y por tanto, mayor intensidad llegará la muestra, aumentando la sensibilidad de la técnica (mayor rendimiento óptico).

2.6.-CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS.

Aunque la primera cristalización de proteínas data de hace más de un siglo (Hoppe-Seyler, 1864), el proceso implicado permaneció desconocido durante mucho tiempo. Hasta el descubrimiento de la difracción de rayos-X por las redes cristalinas, el desarrollo de la cristalización de nuevas moléculas sirvió casi exclusivamente para corroboración de la pureza de las mismas. En la actualidad y a pesar del interés en la explicación de los procesos de cristalización de biomoléculas, gran parte de las investigaciones siguen basadas en técnicas de ensayo y error.

Las macromoléculas son sistemas físico-químicos extremadamente complejos, cuyas propiedades varían en función del entorno en el que se encuentren (pH, fuerza iónica, composición del disolvente, etc.). Las investigaciones conducentes a la cristalización de proteínas suelen encuadrarse dentro de dos directrices básicas: McPherson (1992) introdujo la primera, consistente en variar un factor manteniendo los demás constantes; la segunda es usar estas aproximaciones para un barrido de todos los ensayos de cristalización con resultados favorables y extenderlo a otras proteínas empleando diseños factoriales basados en los resultados obtenidos por Jancarik y Kim (1991). Carter y Carter (1979) realizaron trabajos relacionados con la aplicación de estos diseños factoriales, para intentar cristalizar familias homólogas de proteínas. En la actualidad firmas como Hampton Research suministran "kits" de barridos de condiciones de cristalización para la búsqueda de los procesos más adecuados.

Wever (1991) desarrolló los procesos físico-químicos que ocurren en el crecimiento cristalino, desde los fundamentos teóricos hasta los nuevos desarrollos en la cristalización de proteínas. Jane y col. (1987), desarrollaron estudios en microgravedad utilizando modernos métodos de cristalización automatizada.

2.6.1.-Cristalización controlada por difusión.

El crecimiento de cristales en sistemas de transporte de masa controlado por difusión, es un método que ha demostrado ser de gran utilidad en la obtención de cristales para su elucidación estructural y medida de sus propiedades físicas.

Existen diferentes variantes de esta técnica dependiendo del soporte físico en el

que se desarrolle el proceso difusivo:

- a) Difusión en gel.
- b) Difusión en fase de vapor.
- c) Difusión en líquido bajo condiciones de microgravedad.

Si se tiene en cuenta que para el caso de la cristalización de macromoléculas biológicas existen los siguientes factores limitantes:

- Se dispone de mínima cantidad de muestra por experimento.
- Se debe reducir el riesgo de daño debido a la inestabilidades físicas de los dispositivos instrumentales.
- Debe evitarse la manipulación de los cristales.
- Se persigue minimizar el transporte convectivo de masa.

parece estar claro que la elección del método implica el uso de sistemas de crecimiento tales como redes tridimensionales porosas o líquidos viscosos, que empleen espesores de celdas de crecimiento reduciendo así la gravedad en dicho medio de crecimiento.

2.6.1.1.-Cristalización en geles.

Los geles son medios adecuados para abordar la cristalización de proteínas, ya que el proceso de crecimiento cristalino en estos sistemas está regido por procesos de transporte difusivo que implican un transporte unidireccional de masa muy lento desde la disolución al núcleo cristalino, permitiendo la obtención de cristales de elevada calidad óptico-estructural.

Aunque los geles (redes tridimensionales porosas) han sido empleados en la cristalización de compuestos inorgánicos, las bases teóricas del método fueron desarrolladas en la década de los setenta. Garcíz-Ruiz (1981) desarrolló un modelo teórico conjuntamente con la simulación numérica de esta técnica, por el cual el crecimiento en geles pasó a convertirse en un método racional de crecimiento de cristales.

Recientemente el mismo autor (García-Ruiz, 1991) ha elaborado un compendio general del crecimiento cristalino en geles y el uso de otros sistemas de difusión-reacción con aplicaciones a diversos campos. Lefauchaux y Roberts (1988) desarrollaron algunos aspectos generales centrandose su atención en la aplicación de resultados previos con compuestos de bajo peso molecular a macromoléculas biológicas.

Narayana y Devanarayanan (1987) realizaron trabajos relacionados con el crecimiento cristalino en geles de compuestos orgánicos. Bernstein (1993) y Sato (1993) han trabajado acerca del crecimiento cristalino en disolución con aplicaciones al crecimiento en geles, así como caracterizaciones sistemáticas de polimorfos y relaciones estructura-propiedades en cristales orgánicos.

2.6.1.2.-Cristalización en medios capilares.

La obtención de cristales de adecuada calidad en celdas de crecimiento con espesores pequeños, a fin de evitar su transferencia y manipulación, hace de los medios capilares otro buen candidato como método para la cristalización de proteínas, presentando la ventaja adicional de requerir pequeñas cantidades de muestra. El fundamento de esta técnica implica introducir gradientes de agente precipitante para alcanzar la sobresaturación, ya sea a través de una membrana de diálisis o bien una interfase difusiva libre.

Estas celdas de diálisis fueron utilizadas por primera vez por Zeppezauer (1968). Consisten en tubos capilares que poseen un anillo que sirve de soporte a una membrana de diálisis de celulosa, la cual se sitúa en la base, la solución de proteína se introduce en los capilares evitando la presencia de burbujas de aire. Posteriormente, la parte abierta de la celda de crecimiento se sella y se coloca en un gran contenedor que contiene un tampón o un agente precipitante.

Una variante de esta técnica fue propuesta por Weber y Goodking (1970), empleando un capilar mucho más largo y con menor diámetro a fin de lograr que el proceso de equilibrio se alcance lentamente, éste poseía además paredes menos gruesas que permitían la colocación de la membrana de diálisis.

Un método similar pero usando la difusión por interfase libre fue propuesto por Salemme (1972) y Yonath y col. (1982). En este método se introduce un capilar de cuarzo conteniendo la solución proteica dentro de un tubo de ensayo lleno de disolución de agente precipitante. Con esta técnica se cristalizó el virus de la necrosis del tabaco por Akervall y Strandberg (1971).

La principal utilidad del crecimiento cristalino en medios capilares es la ausencia de

contacto y manipulación con los cristales frágiles de macromoléculas biológicas. Sin embargo, presenta dificultades experimentales que la hacen poco versátil y por lo tanto poco usada en comparación con las técnicas clásicas de la gota colgante ("hanging drop") o gota sedente ("sitting drop") de uso corriente hoy día en los laboratorios de cristalización de proteínas.

2.6.1.3.-Técnica de acupuntura en gel.

Recientemente García-Ruiz y col. (1993, 1994, 1995) han propuesto un nuevo método para cristalizar que pretende recoger y fusionar los aspectos positivos de las técnicas de cristalización en gel y de cristalización en medios capilares, empleando de esta forma las favorables propiedades de transporte de los sistemas de difusión-reacción (geles) y superando las deficiencias que presentan los métodos pioneros de cristalización en medios capilares, se denomina método de acupuntura en gel. Con él, se han conseguido cristalizar proteínas como lisozima, ribonucleasa A, concanavalina A, catalasa, insulina y ferritina entre otras.

Este método supera los factores limitantes expuestos con anterioridad para el caso de la cristalización de macromoléculas biológicas, permitiendo obtener monocristales de proteínas de alta calidad óptico-estructural para su caracterización dentro de capilares Lindeman transparentes a los rayos-X.

2.6.2.-Cristalización de Biliproteínas.

En 1982 Priestle y col. cristalizaron C-PC y B-ficoeritrina procedentes de las especies *Agmenellum quadruplicatum* y *Porphyridium cruentum* respectivamente, mediante la utilización de células de microdifusión como las descritas por Zeppezauer (1968). La cristalización de C-PC fue asimismo abordada por Schirmer y col.(1986,1987) usando biliproteínas de la cianobacteria *Agmenellum quadruplicatum*. El mismo autor (Schirmer y col., 1987) consiguió cristalizar C-PC procedente esta vez de la especie *Mastidoglastus laminosus* y posteriormente, Duerring y col. (1991) obtuvieron cristales de C-PC de la especie *Fremyella diplosiphon*. En todos los casos la técnica utilizada fue la de crecimiento por difusión de vapor, en gotas de unos pocos μ l de volumen, de una disolución que contiene 30 mg/ml de proteína en agua. El agente precipitante empleado fue tampón de fosfatos 0.1 M a pH 5 con un 12% de polietilenglicol. Miki y col. (1990) reportaron la cristalización mediante la técnica de gota sedente de C-PC procedente del alga roja *Porphyra tenera*.

Recientemente Brejc y col. (1995) han aislado y cristalizado la APC de la microalga *Spirulina platensis*.

2.7.-SOLUBILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS EN DISOLVENTES HIDROCARBONADOS.

En los últimos años se ha dedicado mucha atención a la solubilización de enzimas en disolventes hidrocarbonados con la ayuda de surfactantes iónicos acuosos. Este creciente interés se fundamenta en dos razones principales, por un lado el procedimiento puede abrir el camino hacia nuevas aplicaciones técnicas de estas biomoléculas, además, su confinamiento en el núcleo acuoso de micelas reversas es motivo del planteamiento de una serie de cuestiones relevantes en la investigación básica de micelas y de la química de proteínas. Este campo sigue estando en pleno desarrollo en la actualidad, ofreciendo un modelo sencillo de interfase agua-membrana.

Gitler y Montal (1972,a y b) fueron los primeros en solubilizar una proteína en disolventes hidrocarbonados. Intentaron reconstruir una membrana mediante la utilización de proteolípidos y aunque su trabajo no estaba directamente relacionado con las micelas, si que representó el principio de las nociones básicas para la adaptación de proteínas a un ambiente hidrocarbonado. El término "proteína en micelas reversas" fue introducido por primera vez por Wells (1974) quien usó la fosfolipasa en mezclas de dietil éter/metanol, con fosfatidilcolina como surfactante.

El grupo de Luisi y col. comenzó a estudiar el transporte de péptidos desde la fase acuosa hacia la fase orgánica usando cloruro de trioctil metil amonio lo que permitió transferir péptidos de alto peso molecular como la α -quimotripsina hasta ciclohexano, haciendo posible el estudio de sus propiedades espectroscópicas, aunque con la consiguiente pérdida de la actividad enzimática (Dossena y col., 1976; Luisi y col, 1977). Martinek y col. (1978) suministraron datos acerca de la actividad de α -quimotripsina y peroxidasa solubilizadas en medio n-octano usando di(2-etil-hexil) sulfosuccinato sódico (AOT).

El sistema AOT-disolvente hidrocarbonado (usualmente n-octano o isooctano) es uno de los más utilizados para el estudio de solubilización micelar. El grupo de Luisi propuso un

modelo estructural para los sistemas micelares conteniendo biomoléculas como las proteínas, considerando parámetros cinéticos, pH locales, etc. Posteriormente Kotlarchyk y col. (1985) utilizaron la técnica de dispersión de neutrones para determinar la estructura de las micelas reversas con AOT como surfactante.

El parámetro estructural clave de las micelas reversas es la relación molar agua/surfactante (w_0), la cual determina su tamaño así como el grado de desviación de las propiedades del agua incluida en el interior de la micela. Un amplio rango de propiedades físicas y químicas del agua micelar, como son la polaridad y la constante dieléctrica, microviscosidad, actividad, punto de congelación, eficiencia en la transferencia protónica así como el potencial de enlace de hidrógeno del corazón acuoso, se pueden modificar experimentalmente con w_0 , dotando a los medios micelares de un único y versátil campo de reacción (Nicot y col, 1985; Gallay y col, 1987). El agua del interior micelar influye de forma notable en los estados conformacionales y dinámicos de los biopolímeros solubilizados en ella. Además, debido a su transparencia óptica, permite realizar medidas de tipo espectroscópico. Las micelas reversas constituyen un modelo de membrana para el estudio de péptidos, proteínas, etc. en un ambiente acuoso (Ferreria y Gratton, 1990; Bhattacharyya y Basak, 1993).

En la actualidad continua el desarrollo y estudio de la solubilización de proteínas y derivados proteicos en medios hidrocarbonados, mediante la inclusión de las mismas en micelas reversas, por constituir estos sistemas medios microheterogéneos que simulan situaciones específicas que suceden a nivel celular (Bhattacharyya y Basak, 1993, 1995; Singh y Aruna, 1995).

2.7.1.-Generalidades sobre los sistemas micelares.

Las moléculas de surfactante por encima de una cierta concentración denominada concentración micelar crítica, forman un agregado más o menos esférico, termodinamicamente estable cuyas cabezas polares se orientan formando un corazón donde el agua puede solubilizarse (Figura 2-12). El contenido acuoso del sistema micelar se expresa normalmente en términos de w_0 , es decir de la razón molar de moléculas de agua a moléculas de surfactante (Fendler y Fendler, 1975).

$$W_o = \frac{[H_2O]}{[AOT]}$$

El agua solubilizada en el interior de estas micelas reversas constituye el denominado núcleo acuoso y por tanto moléculas polares como las proteínas pueden encontrarse en este corazón.

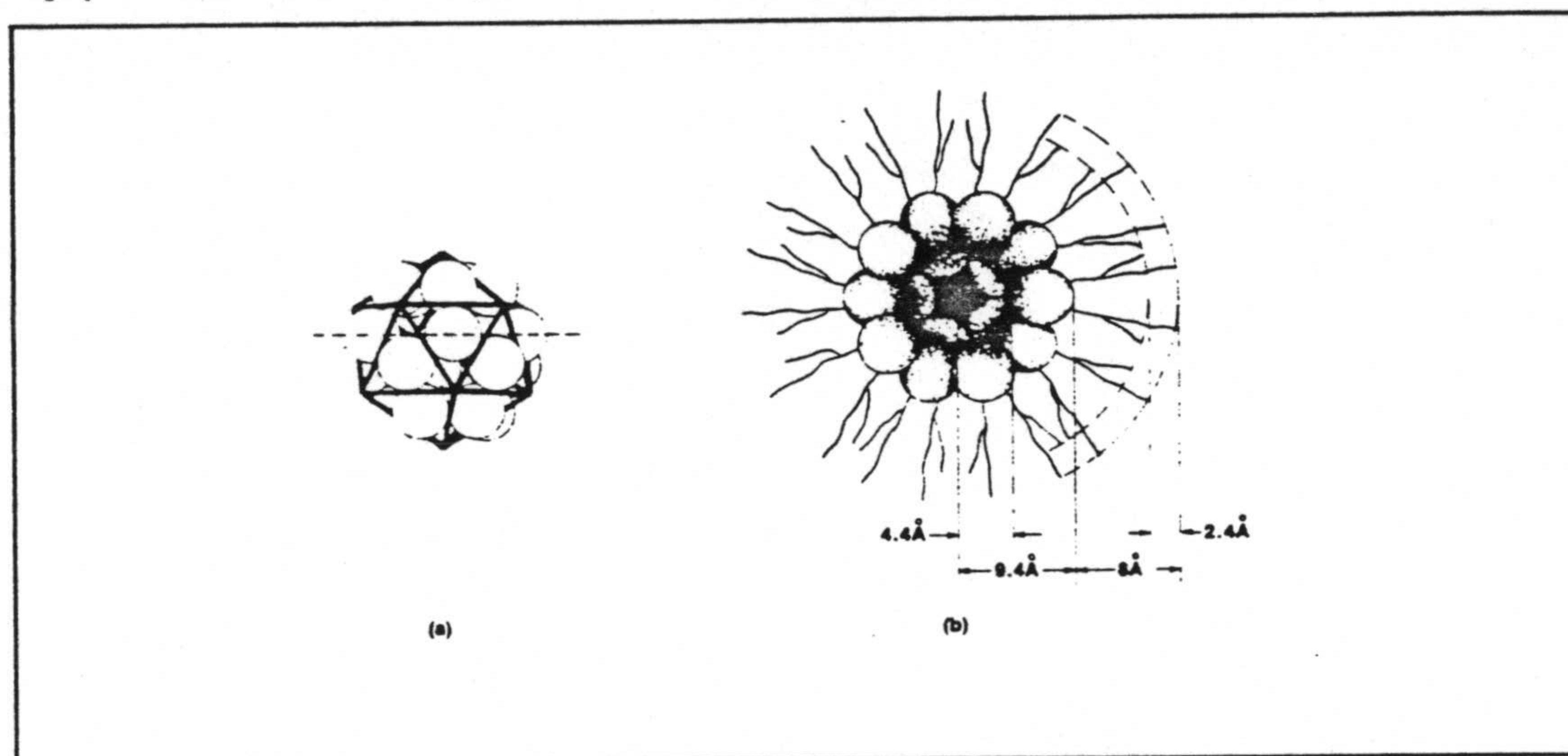


Figura 2-12

Esquema de una micela inversa de AOT: a) Empaquetamiento icosaédrico en una micela inversa de AOT. b) Corazón polar constituido por las cabezas polares de surfactante y el agua enlazada.

Un sistema micelar ideal sería aquel que tuviera muchas micelas vacías y sólo unas pocas contuvieran una molécula de proteína, sin que existieran micelas que incluyeran más de una molécula. En 1978, Turro y col. proporcionaron datos experimentales que relacionaban la probabilidad de encontrar n moléculas de proteína por cada micela, con el parámetro s , que es la razón molar de moléculas de proteína a moléculas de micela (Tabla 2-XV). De esta forma los resultados que se deriven de posteriores estudios no estarán afectados por las posibles interacciones entre moléculas de proteína que compartan el núcleo acuoso del sistema micelar.

$$S = \frac{[Proteína]}{[Micelas]}$$

TABLA 2-XV

Probabilidad de encontrar una o más moléculas de proteína en función de s.

| S | P (n=0) | P (n=1) | P (n>1) |
|-----|---------|---------|---------|
| 0.1 | 0.90 | 0.09 | 0.00 |
| 0.5 | 0.61 | 0.30 | 0.06 |
| 1.0 | 0.37 | 0.37 | 0.23 |
| 2.0 | 0.13 | 0.27 | 0.49 |

2.7.2.-Técnicas de solubilización.

Existen fundamentalmente tres técnicas para la solubilización de biomoléculas en micelas reversas (Figura 2-13).

1.-Técnica de inyección. Consiste en adicionar una pequeña cantidad de disolución madre de proteína en el tampón adecuado, a la disolución hidrocarbonada del surfactante. Esta técnica es la más rápida y simple, pero presenta pequeñas desventajas como es la dificultad de conseguir concentraciones suficientemente altas de proteína en la disolución hidrocarbonada, no existiendo además la seguridad de preparar disoluciones termodinámicamente estables.

2.-Técnica de extracción del estado sólido. Elimina las desventajas anteriores pero requiere más tiempo. En este caso la proteína es suspendida en la disolución acuosa-hidrocarbonada del surfactante. Este procedimiento se emplea en los casos de solubilidad limitada de proteínas en agua.

3.-Técnica de transferencia de fase. Consiste en poner en contacto la disolución hidrocarbonada del surfactante con la disolución acuosa del biopolímero. En este caso pueden estudiarse de forma más precisa fenómenos cinéticos y de transporte de masa desde la fase acuosa a la disolución hidrocarbonada.

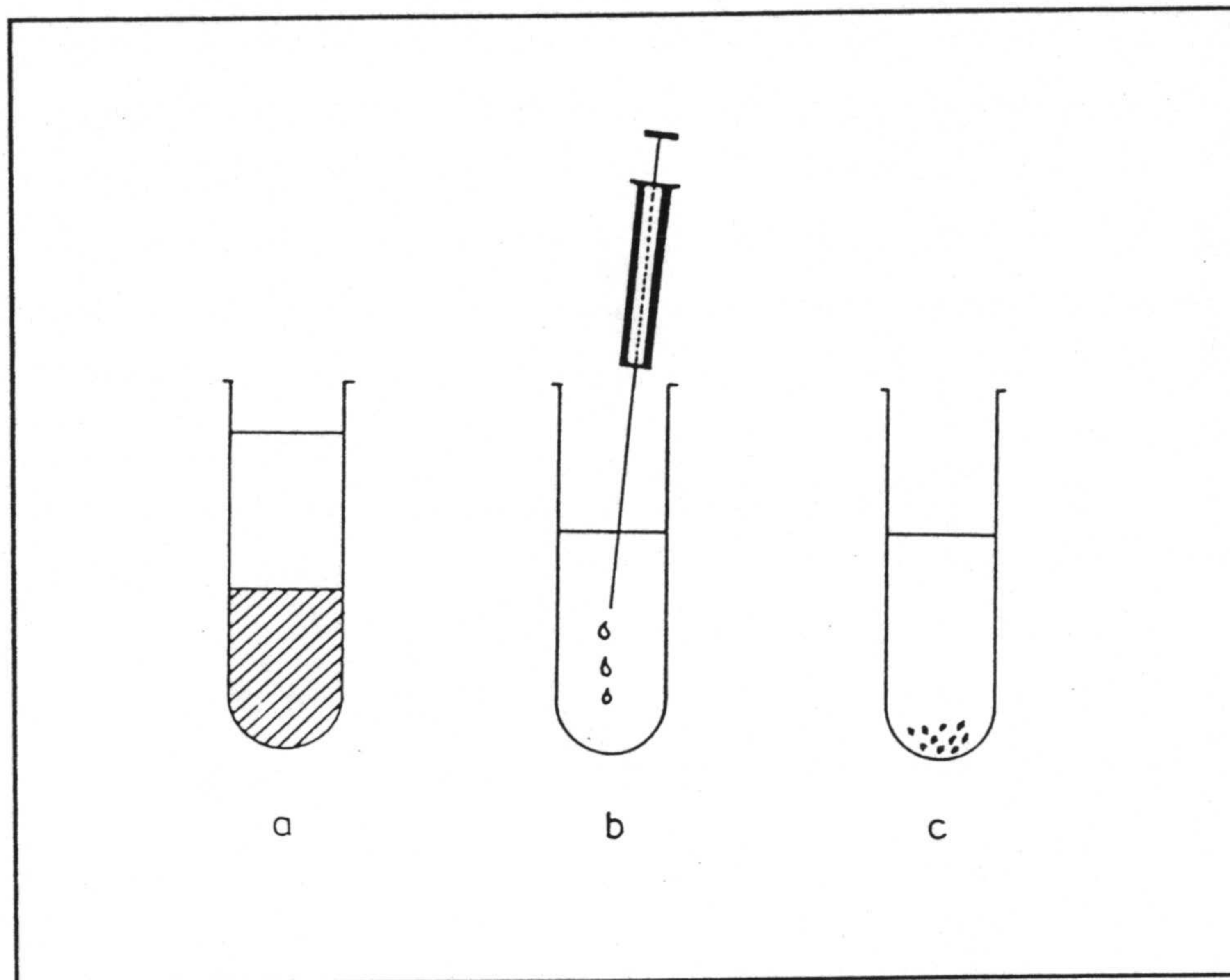


Figura 2-13

Procedimientos de solubilización de biopolímeros en medios micelares hidrocarbonados: a) Técnica de transferencia de fase; b) Técnica de inyección; c) Técnica de extracción del estado sólido.

2.7.3.-Estructura de micelas reversas conteniendo proteínas.

La forma, tamaño y otras propiedades estructurales de las micelas reversas han sido motivo de debate y discusión (Eicke y col., 1976; Rouviere y col., 1979). Eicke y col. (1976), demostraron que, admitida su forma esférica, las dimensiones de una micela se pueden incrementar por aumento de w_0 , aunque la presencia del biopolímero puede hacer que esta situación varíe. Así, para una proteína pequeña solubilizada en el núcleo acuoso, es razonable asumir que la situación no se altera mucho y únicamente debe haber un pequeño incremento en el tamaño total de la micela. Sin embargo la situación puede ser difícil de evaluar para valores de w_0 bajos, donde el núcleo es relativamente pequeño, pudiendo ocurrir algunas de las situaciones que a continuación se describen o bien una combinación de dos o más de estos modelos (Figura 2-14). En el primer caso (Figura 2-14a), la proteína está

confinada en núcleo acuoso y aislada de las cabezas del surfactante por una capa de moléculas de agua. En el segundo (2-14b), la solubilización es debida a la acción concertada de varias micelas pequeñas, cuyas superficies lipófilas interaccionan con las regiones hidrofóbicas de la proteína. En el caso (2-14c), las partes lipófilas de la proteína están expuestas directamente al disolvente hidrocarbonado, e/o interaccionan con las cadenas lipófilas de las moléculas de surfactante. Finalmente (2-14d), la solubilización puede ocurrir vía interacciones de pares iónicos entre grupos cargados de las cabezas del surfactante y zonas ionizadas de las cadenas de la proteína.

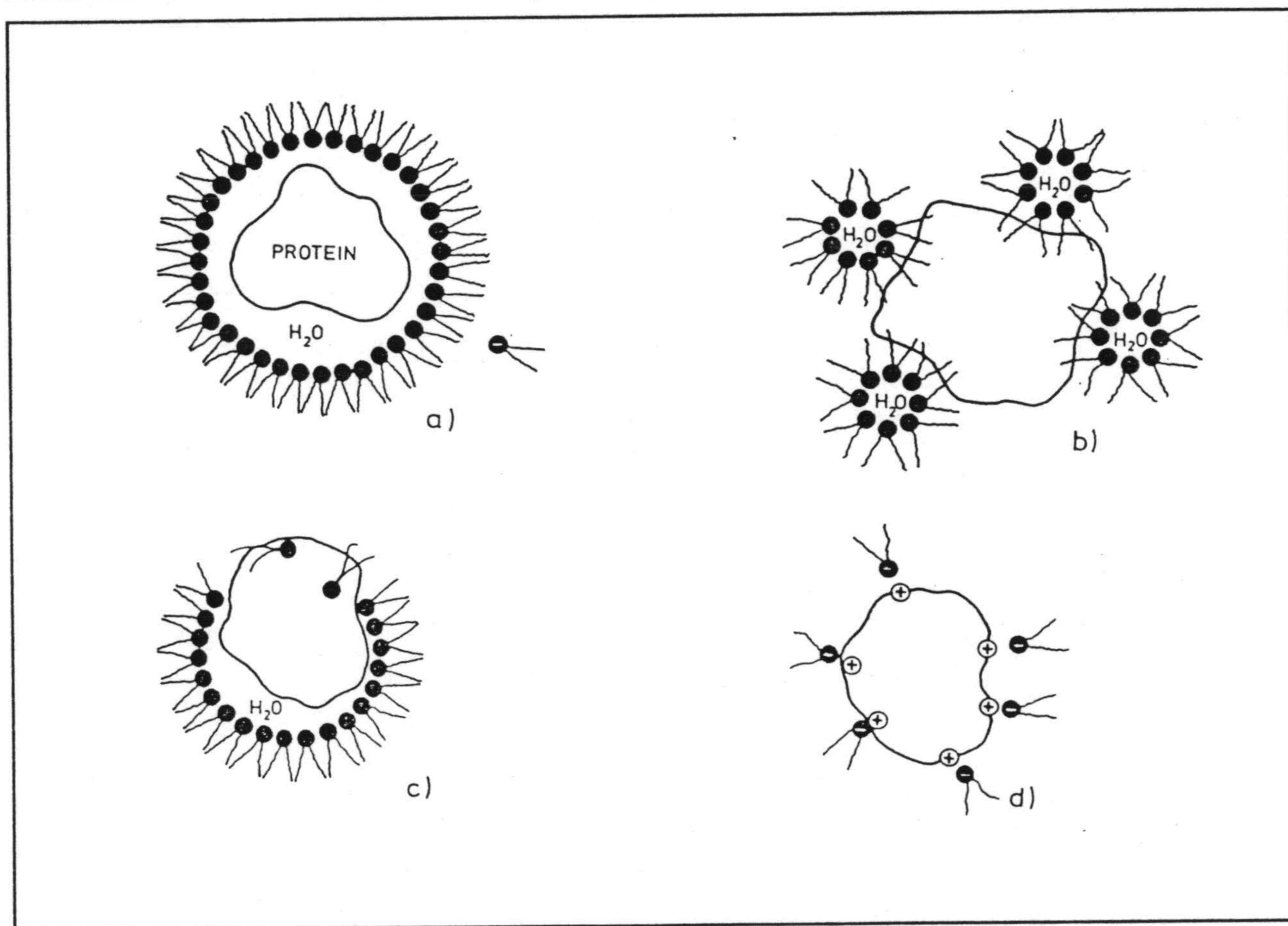


Figura 2-14

Posibles situaciones para un biopolímero solubilizado en una micela inversa: **a)** proteína rodeada totalmente por agua; **b)** mecanismo de micelas concertadas; **c)** proteína expuesta parcialmente al medio hidrocarbonado y **d)** interacciones de pares iónicos entre el biopolímero y las cabezas ionizadas del surfactante.

Para poder determinar cual de estas situaciones ocurre preferentemente bajo unas determinadas condiciones, hay que hacer uso de técnicas tales como fluorescencia, espectroscopía uv-visible, dicroísmo circular, etc..

Luisi y Wolf (1982) teniendo en cuenta todo lo anterior, han desarrollado un modelo por el cual, conociendo las dimensiones de la proteína y la de las micelas no ocupadas (micelas que en su interior sólo tienen agua), se pueden predecir diversos parámetros estructurales y geométricos de micelas reversas de AOT. Algunos de estos parámetros se muestran en la Tabla 2-XVI.

TABLA 2-XVI

Parámetros estructurales calculados para micelas reversas conteniendo proteínas (Luisi y Wolt, 1982)

| Sistema | W_0 | n^b | j^c | r_0 (Å) ^d |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|------------------------|
| RNAasa isooctano/AOT (0.05 M) | 5.7 | 91 | 521 | 19.5 |
| RNAasa isooctano/AOT (0.05 M) | 11.1 | 193 | 2128 | 26.6 |
| RNAasa isooctano/AOT (0.05 M) | 22.3 | 395 | 8823 | 40.6 |
| Lisozima n-octano/AOT (0.05 M) | 22.5 | 364 | 8195 | 39.9 |
| Lisozima n-octano/AOT (0.05 M) | 27.4 | 636 | 17452 | 50.6 |
| LADH isooctano/AOT (0.05 M) | 46.4 | 2022 | 93844 | 89.6 |

r^0 =radio del corazón polar de la micela conteniendo proteína.

n^b =número de agregación del surfactante.

j^c =número de moléculas de agua en el núcleo acuoso, el cual contiene únicamente una molécula de proteína.

r_0^d =radio del corazón polar de la micela conteniendo proteína. Para obtener el radio total habrá que adicionar 12 Å que es tamaño de una molécula de AOT.

2.8.-UTILIZACIÓN DE ETIQUETAS FLUORESCENTES EN LA DETECCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Las propiedades fisicoquímicas únicas del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico (ARN), en lo que se refiere a las interacciones entre cadenas complementarias para formar la estructura híbrida, hacen de esta técnica la más segura en la identificación y localización de genes específicos o secuencias asociadas.

El interés que poseen las sondas de ADN ha hecho que se esté realizando un gran esfuerzo para trasladar las técnicas de hibridación desde el laboratorio de investigación hasta el analítico y clínico. Sin embargo, la aceptación de los métodos de hibridación en el laboratorio clínico, como técnica rutinaria, no está aún generalizada debido a los inconvenientes que poseen las sondas radiactivas y enzimáticas, tales como su elevado costo, el escaso tiempo de vida de los reactivos y las dificultades de manejo. En contraste, las técnicas fluorimétricas que utilizan fluoróforos enlazados a ADN pueden permitir análisis con empleo de reactivos más sencillos y baratos que, además, poseen mayor tiempo de validez. En adición, la sensibilidad de las propiedades de la emisión de un fluoróforo a los factores ambientales (rendimiento cuántico, tiempo de vida, grado de polarización y transferencia de energía) permiten la posibilidad de desarrollar los denominados "análisis homogéneos", en los que se reduce en forma considerable la complejidad del procedimiento al no ser necesaria la separación del exceso de sonda añadida que no resulte hibridada con el ADN objetivo.

Aunque existen diferentes métodos de modificación de polinucleótidos para posteriormente etiquetarlos con el fluoróforo de interés no se trata en esta sección de hacer una descripción de los variados procedimientos, por lo que se relata únicamente el empleado por nosotros que es el desarrollado por Shapiro y col. (1970). Estos autores describieron que el anión bisulfito (HSO_3^-) puede adicionarse reversiblemente al doble enlace 5-6 del anillo de uracilo y citosina. De mayor interés son las observaciones acerca de que varias aminos se comportan como nucleófilos frente al aducto citosina-bisulfito, por lo que el grupo amino en la posición N^4 puede ser reemplazado por otras moléculas que, a su vez contienen grupos amino. Esta modificación introduce un grupo amino libre donde se puede lograr una posterior adición de algún grupo de interés usando reactivos específicos de aminos. Así Draper (1980, 1984), utilizando esta transaminación catalizada por bisulfito en residuos de citosina, demostró

que las alquildiaminas reaccionan más específicamente bajo condiciones apropiadas. Otros autores han empleado la técnica de transaminación para etiquetar, con una amplia variedad de grupos, diversos polinucleótidos (Kelli y col. 1970; Grunstein y Hogness, 1975; Southern, 1975; Reines y Schulman, 1989).

Para el desarrollo de métodos sensibles, las sondas de ADN deben ser altamente fluorescentes. Sin embargo el número de grupos fluorescentes que se pueden unir por sonda viene limitado, por el autoquenching de los fluoróforos enlazados y por el efecto que el exceso de etiqueta tiene en las propiedades de hibridación.

Al objeto de diseñar sondas fluorimétricas de ADN que simplifiquen los análisis heterogéneos actuales, evitando la complejidad del procedimiento que conlleva la separación del exceso de sonda añadida que no resulta hibridada por el ADN diana, Jackson (1991), Talavera y col. (1997) e Yguerabide y col. (1997) han puesto a punto una metodología basada en los cambios que experimentan las propiedades fluorescentes del ácido polirribocitidílico [Poli(C)], marcado con diversos fluoróforos, cuando hibrida con su homopolinucleótido complementario, el ácido polirriboinosínico [Poli(I)]. Estos homopolinucleótidos sintéticos se han utilizado como modelos de ácidos nucleicos por su fácil manejo y adquisición. Además, Poli(C) y Poli(I) hibridan rápidamente en disolución y tienen una temperatura de fusión característica ($T_m=50\%$ de desnaturalización de la doble cadena) facilitando estudios rápidos y detallados sobre la influencia que tiene en el proceso de hibridación la modificación química y el posterior marcaje de la sonda fluorescente. Se eligió Poli(I) como cadena complementaria en vez de Poli(G) (ácido polirriboguanidílico) ya que la doble cadena Poli(C)-Poli(I) se desnaturaliza a 65°C mostrando el típico efecto hipercromático, mientras que Poli(C)-Poli(G) es mucho menos lábil térmicamente. Además Poli(G) a pH neutro puede formar agregados presentando problemas en este tipo de estudios (Pochon y Michelson, 1965).

A pH neutro y concentración milimolar de sales el Poli(C) forma un complejo de estequiometría 1:1 con Poli(I) (Chamberlin y Patterson, 1965). Así el duplex Poli(C)-Poli(I) es una estructura bihelicoidal con apareamiento de bases entre los residuos de citosina de una cadena y los residuos hipoxantina de la otra (Arnott y col., 1973). Tanto Poli(C) como Poli(I) existen por si mismos como cadenas simples, presentando una estructura ordenada en disolución a pH neutro y concentraciones moderadas de sales (100-300 mM), con las bases

apiladas para formar una hélice similar a la que una simple cadena tiene en una estructura de doble cadena (Felsenfeld y Miles, 1967).

Mediante estudios de hipercromicidad a 260 nm se ha demostrado con el sistema Poli(C)-Poli(I) (Jackson, 1991) y con ADN de *E. coli* (Talavera y col., 1997) que la modificación química y posterior marcaje con etiquetas fluorescentes decrece la estabilidad térmica de la doble cadena, no alterándose significativamente las propiedades de hibridación cuando el porcentaje de bases marcadas es del 5% aproximadamente, evitándose asimismo con este porcentaje el efecto de autoquenching por un exceso en la concentración de fluoróforos.

La hibridación de ácidos nucleicos se puede seguir mediante polarización de fluorescencia. El valor de la polarización de fluorescencia depende del ángulo medio que las moléculas de fluoróforo rotan durante su tiempo de vida. Así, cuanto mayor es el ángulo, menor es el valor de la polarización. Más específicamente, su valor depende de la relación τ/Φ , donde τ es el tiempo de vida y Φ el tiempo de correlación rotacional del fluoróforo. El valor de la polarización disminuye con el aumento de la relación τ/Φ . Las técnicas de fluorescencia polarizada proporcionan un poderoso método para el estudio de la formación de complejos en los sistemas bioquímicos ya que para una molécula de un fluoróforo que está libre en disolución, el valor de Φ depende del peso molecular y forma del fluoróforo, así como de la viscosidad del disolvente. En el caso de moléculas fluorescentes rígidamente unidas a una estructura más grande, el valor de la polarización dependerá del movimiento rotacional de la estructura mayor.

De otra parte, las proteínas que contienen bilinas como grupos prostéticos han sido empleadas ampliamente como etiquetas fluorescentes en sistemas que involucran una reacción entre un ligando y un receptor (Oi y col., 1982; Glazer y Stryer, 1984; Stryer y col., 1985; Stryer y Glazer, 1985).

En este sentido es conveniente destacar que las biliproteínas se enlazan fácilmente proporcionando conjugados que poseen altos rendimientos cuánticos de fluorescencia y fuertes bandas de absorción y de emisión en el visible que se extienden hasta el rojo donde ninguna otra biomolécula fluoresce, por lo que no puede interferir y causar ruido de fondo. En estos conjugados, las biliproteínas se encuentran enlazadas, covalentemente o no, a otras

biomoléculas como inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgD, IgE), avidina, biotina, otras biliproteínas, fluoróforos como fluoresceína, dansyl, pireno, rosa de bengala, etc. gracias a la amplia variedad de grupos funcionales (tioles, carboxilos, amino) presentes en las proteínas (Haugland, 1996; Wold, 1972; Glazer, 1976; Carlsson y col., 1978). Sin embargo hasta el momento no existe bibliografía referente al empleo de las biliproteínas como etiquetas fluorescentes de sondas de ADN y ARN.

En general, las biliproteínas se pueden conjugar mediante reacciones a través de los grupos amino presentes en los abundantes residuos de lisina que poseen. Sin embargo, es preferible introducir un enlace disulfuro por acilación con un reactivo heterobifuncional, el propionato de N-succinimidil,3-(2'piridiltio) (SPDP) según la metodología descrita por Carlsson y col. (1978) y Stryer y Glazer (1985). Así, cuando las biliproteínas hayan de ser conjugadas por ejemplo con otra proteína (anticuerpo), ésta puede tiolarse añadiéndole clorhidrato de iminotiolano para de este modo situar un grupo sulfidrilo accesible en ella, la biliproteína se activa por la reacción con SPDP y la mezcla de estos dos componentes modificados proporciona un conjugado de ambas a través de enlaces disulfuro. La unión de biliproteínas a biotina puede prepararse por reacción de la proteína con N-hidroxisuccinimido-biotina. Si se desea, se puede enlazar esta proteína biotinilada a avidina mediante un enlace no covalente por simple adición de un exceso de avidina lentamente y en continua agitación (Stryer y col., 1985).

**3.-MATERIALES
y MÉTODOS.**

3.1.-MATERIALES.

Se describen a continuación, en apartados sucesivos, los reactivos y la instrumentación empleados en la realización de la parte experimental de esta Memoria.

3.1.1.-Reactivos.

- Acetato sódico. Sigma.
- Acetona. Probus.
- Acetonitrilo grado HPLC. Lab-Scan Analytical Sciences.
- Acido acético. Panreac.
- Acido clorhídrico. Panreac.
- Acido etilendiaminotetracético (EDTA). Sigma.
- Acido fosfórico. Panreac.
- Acido polirribonucleosídico. Sigma.
- Acido tricloroacético. Panreac.
- Aerosol OT (AOT). Sigma.
- Acrilamida. Sigma.
- Agua destilada. Millipore.
- Agua deuterada. Sigma.
- Azida sódica. Sigma.
- Azul de bromofenol. Sigma.
- Bisacrilamida (N,N,N',N'-metileno-bis-acrilamida). Sigma.
- Bisulfito sódico. Sigma.
- Butanol. Panreac.
- Cloroformo. Probus.
- Cloruro de magnesio. Panreac.
- Cloruro mercuríco. Panreac.
- Cloruro sódico. Panreac.
- Coomassie Brilliant Blue. Sigma.
- Dodecil sulfato sódico (SDS). Fluka.
- Diclorometano. Panreac.
- Etanol. Probus.
- Etilendiamina. Sigma.

- Ficoll. Sigma.
- Fosfato monopotásico. Panreac.
- Fosfato disódico. Panreac.
- Glicerina. Foret.
- Glicina. Merck.
- Heptano. Merck uvasol.
- Hidróxido potásico. Panreac.
- Hidroquinona. Sigma.
- Isooctano. Merck uvasol.
- Isopropanol grado HPLC. Lab-Scan Analytical Sciences.
- Matriz cromatográfica DEAE DE-52. Whatman.
- Matriz cromatográfica Sephadex G-100. Pharmacia.
- 2- β -Mercaptoetanol. Sigma.
- Metanol. Probus y Merck uvasol.
- Patrones de pesos moleculares (14300-94000). Pharmacia.
- Pasta de silicona. Panreac.
- Permeafix. Ortho.
- Persulfato amónico. Probus.
- Polietilenglicol PEG-6000. Sigma.
- Silicagel tipo G. Merck.
- Silicato de sodio. Sigma.
- Tampón PBS. Flow laboratories (U.K.).
- Tampón Tris-HCl. Sigma.
- Tampón Trizma-Base. Sigma.
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamina).Sigma.
- Tritón. Sigma.

Los productos químicos y disolventes excepto en algunos casos ya indicados, fueron de pureza grado analítico o bioquímico.

También se ha utilizado para la diálisis del material biológico, membranas de tamaño 1-8/32". El cierre hermético de dichas membranas se ha conseguido mediante unas pinzas suministradas por Medicell International LTD.

3.1.2.-Instrumentación.

Para los estudios realizados mediante espectroscopía de absorción uv-visible se han empleado: **Espectrofotómetro** Perkin-Elmer modelo Lambda 5, con registro gráfico de velocidad. Las principales características del aparato son: haz doble y sencillo; posibilidad de hacer medidas de absorbancia, % de Transmitancia; primera, segunda, tercera y cuarta derivadas; red de difracción de 1440 líneas/mm con selección automática de filtros para la disminución específica de espectros secundarios; margen de longitudes de onda entre 190 y 900 nm; velocidad de exploración comprendida entre 7.5 y 480 nm/min con una precisión en la longitud de onda de ± 0.3 nm; rendijas desde 0.25 a 4 nm; tiempos de respuesta desde 0.2 segundos hasta 10 segundos. **Espectrofotómetro** Perkin-Elmer modelo Lambda-16, que además de las características ya indicadas para el modelo Lambda-5, posee control por vía externa a través de ordenador personal con un software UV Data Manager, con opción de acoplarse a una impresora o a un plotter. El sistema óptico consta de un premonocromador con una red holográfica cóncava (660 líneas/mm) y de un monocromador red-filtro en configuración Littrow con red holográfica (1440 líneas/mm). Para las medidas de absorción uv-visible se emplearon **células de cuarzo** con tapón de teflón de 1·1 cm y de 2 mm · 1 cm (microcélula), suministradas por la casa Starna.

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se han realizado con un **Espectrofluorímetro** Shimadzu RF-5001PC. La fuente de luz es una lámpara de Xenon de 150 W. El sistema óptico está constituido por monocromadores de excitación y emisión, ambos automáticos, con red holográfica cóncava de 1300 líneas/nm. La anchura de rendija es variable entre 1.5 y 30 nm. El sistema de detección es un fotomultiplicador R 450-01. La unidad óptica está acoplada a un PC mediante una interfaz SM 2000 que permite el almacenamiento y manipulación de datos. El espectrofluorímetro va provisto de equipo de termostatación Frigomix 1450 B.Braum con sistema de recirculación de agua para el control de la temperatura, alcanzando una precisión de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Las medidas de fluorescencia de tiempo resuelto se han efectuado en un EEEY **Nanosecond Fluorometer**. Básicamente, este aparato consta de una lámpara de descarga de recorrido libre que utiliza gas hidrógeno a la presión de 10 atm. Esta lámpara opera normalmente a una frecuencia de 30 KHz originando pulsos de FWHM igual a 2.2 ns. La línea de parada de señal en el convertidor tiempo-amplitud (TAC) está formada por un fotomultiplicador 1P28, un preamplificador modelo 9305 de ORTEC y un discriminador de

fracción constante modelo 584 de la misma casa. Por otro lado, la línea de arranque está formada por un dispositivo "pickoff" de EEY, un discriminador de fracción constante modelo 9305 y un módulo de retardo modelo 425 ambos de ORTEC. El módulo de conversión tiempo-amplitud es un modelo 566 de ORTEC. Los datos son recogidos por un analizador multicanal de altura de pulsos modelo 7150 con un interface RS232C en conexión con un ordenador Rival 286 plus de Arche. Las células empleadas han sido de cuarzo de 1.1 cm y de 2 mm · 1 cm (microcélula) suministradas por la casa Starna. Se ha usado un **filtro** de interferencia para la excitación con máximo en 589.5 nm y anchura de banda de 9 nm y un filtro de emisión de corte en 630 nm de la casa Oriel Corporation.

Espectrofotómetro FT-IR modelo 20SXB NICOLET, conectado a un ordenador Inves perteneciente a los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Posee un espejo móvil sustentado por un colchón de aire que minimiza la fricción. El detector es de tipo térmico de sulfato de triglicina deuterada (TGS). Célula de líquidos con ventanas de fluoruro de calcio CaF₂ con un espaciador de 50 µm. Equipado con secador de aire Ecodry de la casa Zander.

Equipo de HPLC Merck-Hitachi, dotado de Bomba biocompatible Merck L-6220 de doble pistón con los cabezales (titanio) en serie y la posibilidad de crear gradientes ternarios. Presión máxima admisible de 270 bar; detector de fotodiodos L-4500 Merck. Rango de longitudes de onda 190-800 nm. Lámpara de Deuterio, 512 diodos, célula de flujo de 1 mm de diámetro interno por 10 mm, con capacidad de 8 µl; módulo interface D-6000 para el DAD-system Manager y HPLC manager; software HPLC Manager. **Columna HPLC** Hiperisl Butil 300 (Sugelabor), tamaño de partícula 5 µm, longitud 250 mm, diámetro 4.6 mm. **Sistema de filtración** de disolventes Millipore. **Filtros** Millipore tipo HA para fases móviles acuosas, tamaño de poro 0.45 µm y filtros SRI (Scientific Resources Inc) Tipo PTFE, para fases móviles orgánicas, tamaño de poro 0.45 µm.

Equipo de cromatografía de baja resolución. Columnas cromatográficas así como accesorios de cabeza y cola de las mismas suministrados por la casa I.B.F. **Bomba peristáltica**, modelo 12000 varioperpex, con control de velocidad de bombeo de la firma LKB Bromma. **Colector de fracciones** automático Gilson, dotado de un contador fotoeléctrico de goteo capaz de regular el volumen de las fracciones recogidas mediante, contaje de gotas o por control de tiempo. Sistema para la realización de **eluciones en gradiente** consistente en dos recipientes superpuestos, el superior con una capacidad de 800 ml y el inferior de 400 ml. Fabricados en vidrio soplado en los servicios técnicos de esta

Universidad.

Se han utilizado las siguientes centrifugas: **centrífuga J2-21** de BECKMAN. Su principal característica es que tiene un rango de velocidad comprendido entre 1000 y 21000 rpm. Posee un panel de control compuesto por regulador de velocidad y controladores de tiempo, temperatura y vacío. Se ha empleado un rotor JA-20 de Beckman fabricado en aluminio y diseñado para alcanzar una velocidad máxima de 20000 rpm, con capacidad para ocho tubos de 50 ml y que está indicado para soluciones de densidad máxima 1.2 mg/ml. **Centrífuga** modelo 112 (Sigma) con cabezal angular para 12 tubos eppendorf. Velocidad alcanzada 13000 rpm. Dotada de controlador de tiempo y mecanismo de cierre de seguridad. **Centrífuga** Homef LC-30 (3000 rpm), con rotor de capacidad para ocho tubos.

Se ha utilizado un **sonicador** Selecta P con generador de 150 W, que produce ondas sonoras de 40 Khz, posee temporizador sincronizado con lámpara de señalización.

Las medidas de pH se han realizado con un **potenciómetro** Radiometer pH M64 con un electrodo combinado GK2401C, para su calibración se han usado tampones de referencia de la casa Crison.

Equipos de termostación de la marca Selecta y Julabo F10 con una precisión de ± 0.1 °C.

Cubeta de electroforesis fabricada en metacrilato, de desarrollo vertical y con capacidad para 18 muestras diferentes. Compuesta de cristales de 19·19 cm, con separadores de plástico para formación y desarrollo de los geles. Fabricada en los servicios técnicos de esta Universidad. **Fuente de alimentación** de corriente continua para electroforesis, con cuatro entradas de alto voltaje (dos positivas y dos negativas), regulador de voltaje y amperaje, de la casa Buchler.

Microjeringas Hamilton para aplicación de muestras proteicas en gel de electroforesis (capacidad de 10 μ l) y para inyección de muestras en HPLC (100 μ l).

Todos los reactivos fueron pesados en una **Balanza** Analítica electrónica Sartorius modelo A-120 S, provista de un sistema de calibración interno y externo. La desviación estándar de la misma, es de ± 0.1 mg y el tiempo de respuesta de 3 seg.

Para medidas de conductividad se empleó un **potenciómetro** modelo micro CM 2200 de la firma Crison.

Rotavapor Büchi Re111, dotado de baño termostático Büchi 461.

Lámpara ultravioleta 50 Hz y 220 V modelo uvatom-70. Atom.

Unidades de filtración "Ultrafree MC" UFC3 THK con límite de corte de 100000 daltons. Poseen una membrana tipo polisulfona PTHK. Millipore.

Equipo de cristalización. Cubierta de vidrio para aislar el sistema de cristalización. Afora Cod. V-51309. **Capilares** Lindeman de 0.5·60 mm, que contendrán la disolución proteica. Hilgenberg GmbH y Glas Tech. & Kons. **Grasa de vacío** para el sellado del sistema. Turbo Gel Multi-use. **Arcilla** de montaje de piezas dentales. Hampton-HR4-314.

Las disoluciones de biliproteínas purificadas se liofilizaron para su almacenamiento en un **liofilizador** Telstar.

3.1.3.-Material Biológico.

Se han utilizado partidas de **microalga** *Spirulina platensis* recién cosechadas y congeladas para su transporte desde la planta de producción de IMADE S.L. (Salobreña) hasta el laboratorio. La extracción de proteínas se ha llevado a cabo a 4°C con la menor pérdida de tiempo para evitar en lo posible deterioros en la muestra. A todas las disoluciones de microalga se les añadió azida sódica al 0.01% para su conservación. Antes del inicio de la extracción del alga, se mezcla a partes iguales, el crudo de alga con tampón acetato sódico 1M pH=5, constituyendo de esta forma el material de partida para los siguientes procesos.

Sangre venosa procedente de pacientes del hospital universitario Virgen de las Nieves.

3.2.-TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN.

3.2.1.-Extracción y purificación de biliproteínas.

En este apartado se describe la metodología utilizada para la extracción y purificación de las dos biliproteínas mayoritarias de la microalga *Spirulina platensis*, es decir la C-ficocianina (C-PC) y la aloficocianina (APC).

3.2.1.1.-Tratamientos previos.

Las biliproteínas objeto de estudio en esta Memoria, proceden del alga *Spirulina platensis*, habiéndose seguido los pretratamientos descritos por Glazer para la purificación de C-ficoeritrina, C-ficocianina y aloficocianina de *Fremyella Diplosiphon* (Glazer, 1988), con la introducción de importantes modificaciones.

El alga como materia prima fue transportada congelada en garrafas desde su lugar de cultivo en Salobreña. Se partió siempre de un determinado peso húmedo de alga suspendido en un volumen igual a dicho peso de acetato sódico 1 M y pH=5 (1:1, p/v). Una vez mezclada el alga con el tampón, la dispersión se dividió en fracciones de unos 20 ml, que fueron trasvasadas a tubos de centrifuga y seguidamente sumergidos en un baño de ultrasonidos durante unos 10 minutos.

Las distintas fracciones sonicadas se centrifugaron a 20000 rpm durante 1 h. Se obtuvieron fracciones con un sobrenadante de color azul muy oscuro y un sedimento de color verde oscuro, constituido en su mayor parte, por el material celular más pesado (como restos de paredes celulares). Los sobrenadantes azules se reúnen por una parte y los sedimentos verdes por otra. Estos últimos se resuspenden en tampón de acetato 1 M y pH= 5. Se agita bien la suspensión y se vuelve a someter a ultrasonidos en fracciones similares a las anteriores. Se centrifugan y los sobrenadantes resultantes se unen a los obtenidos en el primer tratamiento, mientras que los sedimentos de este segundo paso son desechados, ya que prácticamente no deben contener material celular intacto. Al conjunto global de sobrenadantes azules se añade azida sódica al 0.01% para su conservación.

Según el método original de Glazer (1988) los sobrenadantes reunidos se deben llevar al 35% del valor de saturación con sulfato amónico, para precipitar en primer lugar la

ficoeritrina. Sin embargo se ha comprobado que *Spirulina platensis* es una especie donde esta proteína no existe, por lo que se ha procedido directamente a llevar al 75% del valor de saturación para precipitar las restantes biliproteínas. Como valor de saturación se utilizó el dato del Index Merck correspondiente a una temperatura de 0°C que es la más cercana tabulada, a nuestra temperatura de trabajo (4°C). Por tanto se añadió 49.4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por cada 100 ml de sobrenadante. Una vez adicionado el sulfato amónico necesario al sobrenadante azul, se dejó reposar durante 90 min como mínimo. A continuación se dividió este sobrenadante en fracciones y se procedió a centrifugarlo a 15000 rpm durante 15 min, tras esta etapa se desecharon los sobrenadantes de color amarillento verdoso y se reunieron los sedimentos de intensa coloración azul. Estos sedimentos reunidos se disolvieron en la mínima cantidad posible de tampón acetato sódico 0.1 M y pH= 5. Finalmente la disolución se dializa frente a tampón de acetato 0.1 M y pH= 5, con al menos dos cambios de tampón, durante 12 horas con agitación continua. La Figura 3-1 muestra un esquema general de los tratamientos previos realizados.

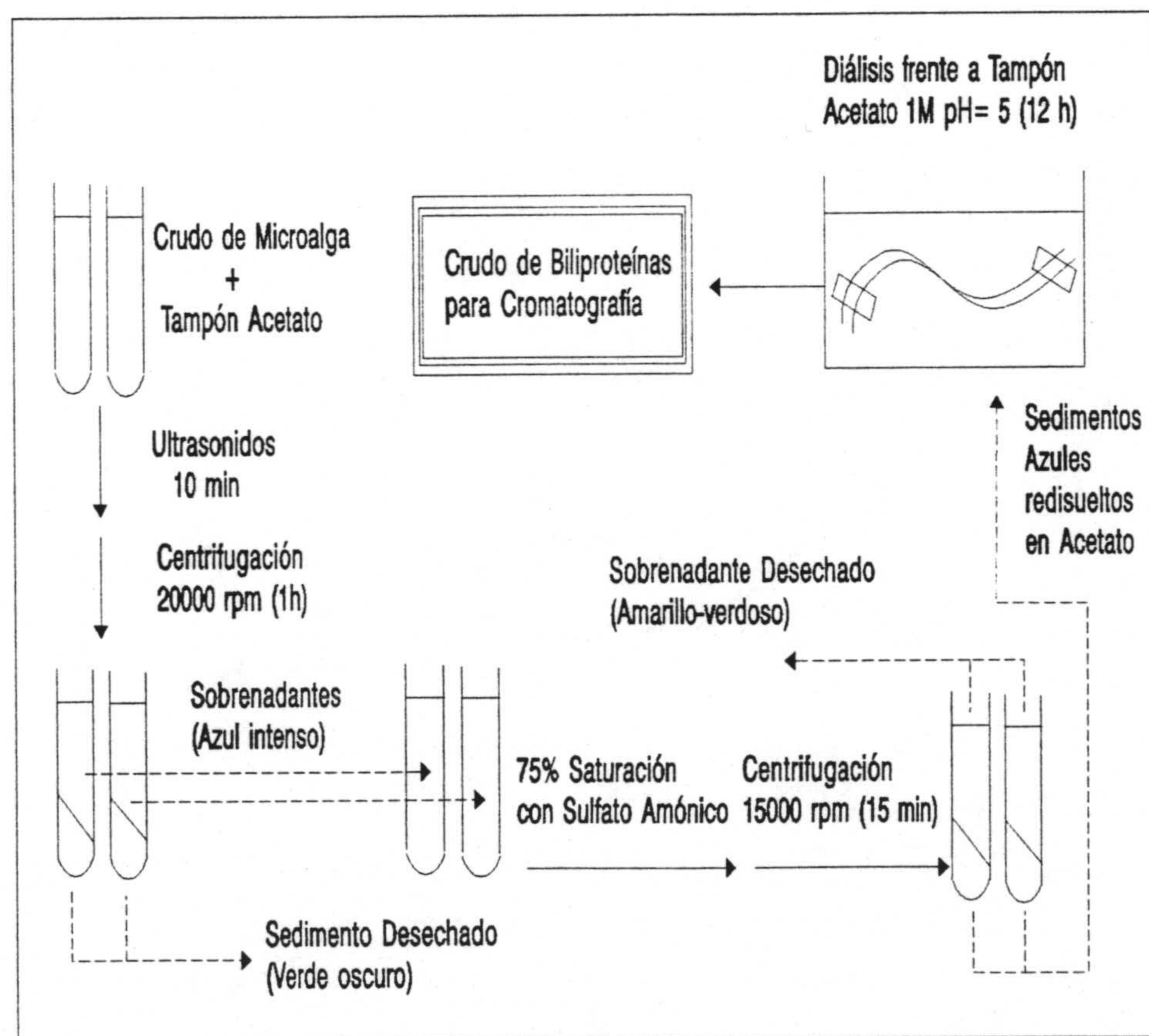


Figura 3-1

Tratamientos previos para la purificación de biliproteínas de *Spirulina platensis*.

3.2.1.2.-Cromatografía de exclusión molecular.

Para realizar esta etapa cromatográfica, se escogió como fase estacionaria una matriz semirígida porosa constituida por Sephadex G-100 (Figura 3-2), que tiene la capacidad de separar compuestos moleculares comprendidos entre 10000 y 75000 da aproximadamente.

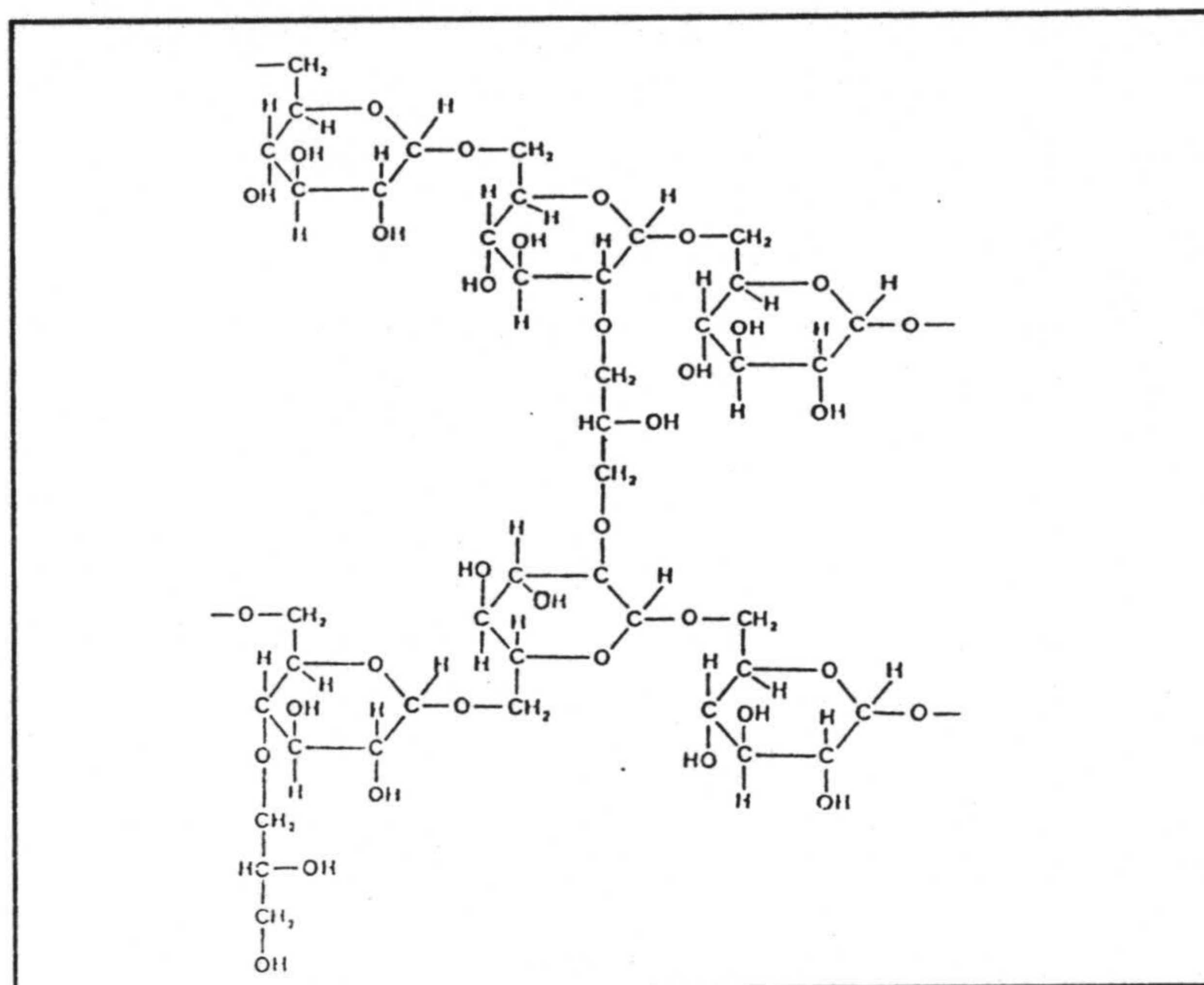


Figura 3-2

Estructura parcial de Sephadex G-100.

La preparación de la columna de Sephadex G-100 se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo. La matriz se suministra en forma de polvo fino, por lo que se ha procedido en primer lugar a su hinchamiento en tampón acetato sódico 0.1 M y pH=5 (15-20 ml de tampón por gramo de gel seco) durante 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo se sometió la suspensión a desgasificación en vacío y posteriormente se adicionó de forma continua en el interior de la columna evitando la formación de burbujas. Una vez finalizado el empaquetamiento se equilibró la columna haciéndole pasar, al menos dos veces, el volumen de lecho cromatográfico de tampón de acetato 0.1 M y pH=5, teniendo cuidado de que el flujo máximo nunca supere los 1.9 ml/min, ni una presión máxima de 36 cm de agua. Siempre se adicionó a los tampones azida sódica al 0.01 %. Una vez estabilizado el lecho cromatográfico se colocó en la parte superior del relleno una capa de 0.5 cm de espesor de lana de vidrio finamente dividida y sobre ella un círculo de papel de filtro del mismo diámetro que el interno de la columna, a fin de minimizar la perturbación de la superficie del

lecho por la adición manual de la muestra. Una vez que la muestra ya está en el interior del lecho cromatográfico se conectó el flujo regular de tampón en la cabeza de la columna mediante una bomba peristáltica.

Las muestras eluidas se recogen en fracciones de igual volumen mediante un colector automático de fracciones. Una vez concluida la separación se dejó pasar tampón acetato durante un cierto tiempo para lavar la columna quedando así preparada para una nueva separación.

Las fracciones recogidas se sometieron a análisis espectrofotométrico agrupando aquellas en las que hay presencia de proteínas (máximos de absorbancia a 620 y 650 nm) y desechando las fracciones donde aparecen otro tipo de moléculas como clorofilas, carotenos, etc. Las fracciones correspondientes a las proteínas caracterizadas por la tonalidad azul, se reunieron y se les añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta el 75 % del valor de saturación, dejando reposar la disolución durante una hora. A continuación se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos, desechando el sobrenadante y reuniendo los sedimentos que se disolvieron posteriormente en la mínima cantidad necesaria de tampón de fosfatos 5 mM y pH= 7 y se dializaron durante una noche frente al mismo tampón con agitación continua.

Se ensayaron columnas con distintas alturas de relleno analizándose en las mismas la influencia de la velocidad de flujo en la resolución alcanzada. Así, se utilizaron alturas de columna de 20, 40, 60 y 80 cm y velocidades de flujo comprendidas entre 30 y 90 ml/hr. Los mejores resultados se obtuvieron con una columna de Sephadex G-100 de 60×2.5 cm y una velocidad de flujo de 50 ml/hr, recogiendo fracciones de 3 ml (Bermejo, 1994).

3.2.1.3.-Cromatografía de intercambio iónico.

Se ha utilizado como lecho cromatográfico la dietilaminoetil celulosa (celulosa DE-52) que es un intercambiador aniónico con una estructura como la que se muestra en la Figura 3-3. Los grupos dietilaminoetil al pH al que presentan carga positiva, interaccionan débilmente con los grupos de las proteínas cargados negativamente. El DE-52 se prepara análogamente al Sephadex, hinchándolo en tampón fosfato de alta concentración pues será el eluyente a utilizar. La columna se prepara de forma totalmente análoga a la de Sephadex y lo comentado en el apartado anterior es extrapolable a éste.

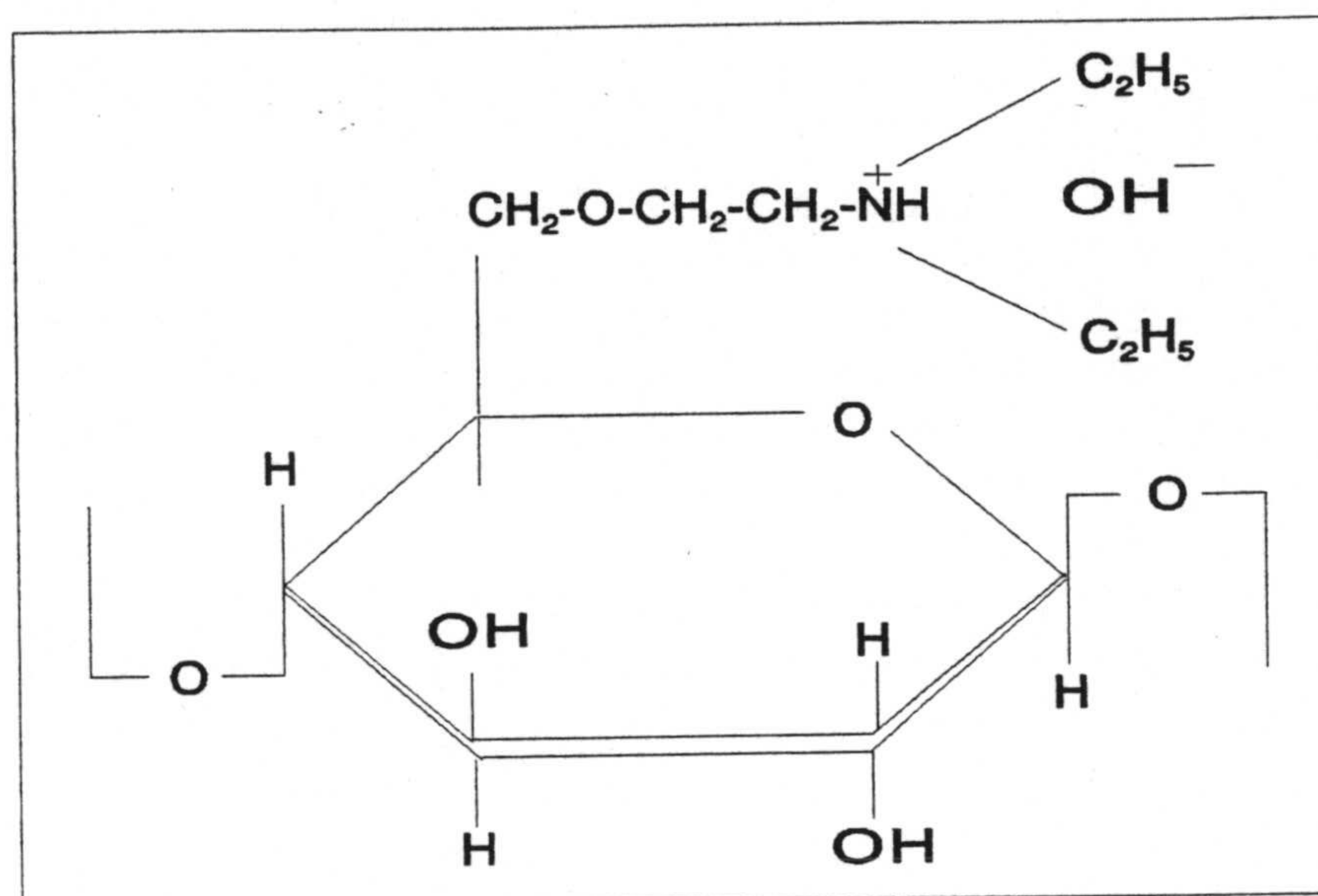


Figura 3-3
Estructura parcial del DE-52.

Una vez aplicada la muestra se procedió a eluir con tampón de mayor fuerza iónica mediante un gradiente lineal continuo o discontinuo, que debilita las interacciones entre los grupos dietilaminoetil y los grupos aniónicos de las proteínas, provocando su liberación gradual de la columna. Se eligieron distintas alturas de columna y distintas velocidades de flujo, para el estudio de las condiciones óptimas de separación. Al objeto de evitar en lo posible el ensanchamiento de banda, se trabajó con conexiones cortas a la salida de la columna y con volúmenes de muestra suficientemente pequeños.

Se probaron diversas condiciones de elución, utilizando distintos gradientes continuos y discontinuos de fuerza iónica con mayor o menor pendiente (Bermejo, 1994). A la vista de los resultados obtenidos y dado que C-PC eluye a fuerza iónica 0.29 M y que cuando ésta aumenta, la fase móvil comienza a arrastrar APC, se ensayó la posibilidad de sustituir el gradiente continuo de fuerza iónica por otro discontinuo que, a la vez, resulte más cómodo para la obtención de cantidades elevadas de biliproteínas puras. De otra parte la elución de las biliproteínas es completa a fuerza iónica 0.4 M, por lo que se han empleado los valores 0.29 y 0.4 M para eluir C-PC y APC respectivamente. La operación se ha llevado a cabo en columnas distintas y las muestras introducidas corresponden a fracciones enriquecidas en cada una de la biliproteínas procedentes de cromatografía de exclusión molecular en Sephadex.

Las fracciones procedentes de la cromatografía de cambio iónico que, tanto por criterios espectroscópicos como electroforéticos, indicaron pureza de C-PC y APC, se reunieron separadamente saturándolas al 75% con sulfato amónico. Se dejaron reposar un mínimo de dos horas y se centrifugaron durante 15 min a 15000 rpm desechando los sobrenadantes y resuspendiendo los sedimentos en la menor cantidad posible de tampón de fosfatos 5 mM y pH=7. A continuación, la disolución resultante se dializó frente al mismo tampón de fosfatos durante al menos 12 horas, etapa tras la cual las disoluciones concentradas de cada una de las biliproteínas se repartieron en viales y se liofilizaron para su almacenamiento.

Como resumen, en la Figura 3-4 pueden observarse todas las etapas necesarias para la purificación y obtención de biliproteínas liofilizadas, que serán la base de todos los estudios posteriores desarrollados en esta Memoria.

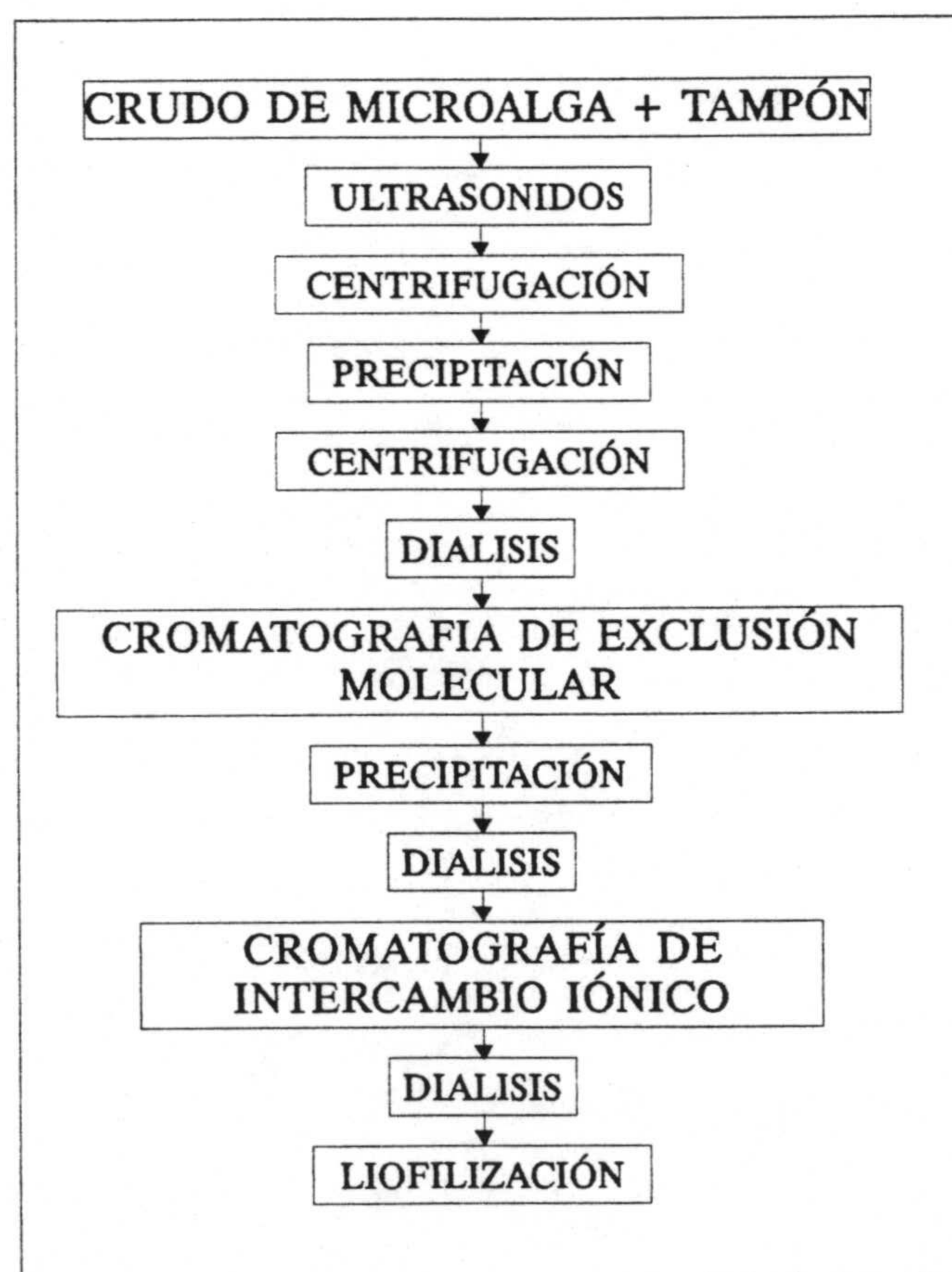


Figura 3-4

Esquema general de purificación de biliproteínas de *Spirulina platensis*.

3.2.2.-Extracción y purificación de ficocianobilinas.

Para la extracción de bilinas de la microalga *Spirulina platensis*, se ha tomado como referencia el método descrito por Cornejo y col. (1992) para las especies *Porphyridium cruentum* y *Calothris PCC 7601*, aunque con notables modificaciones.

Como material de partida para la extracción y purificación de bilinas, se ha utilizado una disolución mezcla biliproteínas, procedente de gel filtración, obtenida de la forma en que se indica en el correspondiente apartado 3.2.1.2. Aunque esta disolución esta compuesta por C-PC y APC en tampón fosfato 5 mM y pH=7, el cromóforo o bilina que ambas proteínas contienen es el mismo, la ficocianobilina (Glazer, 1985). Concretamente C-PC tiene tres grupos cromóforos ficocianobilinas, mientras que APC contiene dos.

Siempre se mezcló un volumen de disolución de biliproteínas con un volumen cuatro veces superior de metanol, y se le añadió 1 mg de HgCl₂ por cada ml de disolución resultante. El volumen final resultante se repartió en tubos de centrifuga y se incubó en oscuridad durante 24 h a 40° C con agitación magnética continua (Figura 3-5).

Tras el proceso de metanólisis se procedió a la centrifugación directa de los tubos a 3000 rpm durante 10 min, obteniéndose un residuo levemente azulado, y un sobrenadante de intensa tonalidad violeta. Los sobrenadantes de todos los tubos se reunieron, constituyendo el extracto metanólico de bilinas. A este extracto se adicionó igual volumen de una mezcla cloruro de metileno:butanol (2:1) y otro volumen igual de agua, agitando y esperando que ocurra la separación de fases. Tras esta separación, la fase superior se desechó y la inferior con tonalidad violeta se lavó dos veces con igual volumen de agua.

Seguidamente, se eliminó hasta sequedad el disolvente de la fase que contiene las bilinas en un rotavapor a la temperatura de 45° C, obteniéndose como resultado bilinas de color violeta al estado sólido.

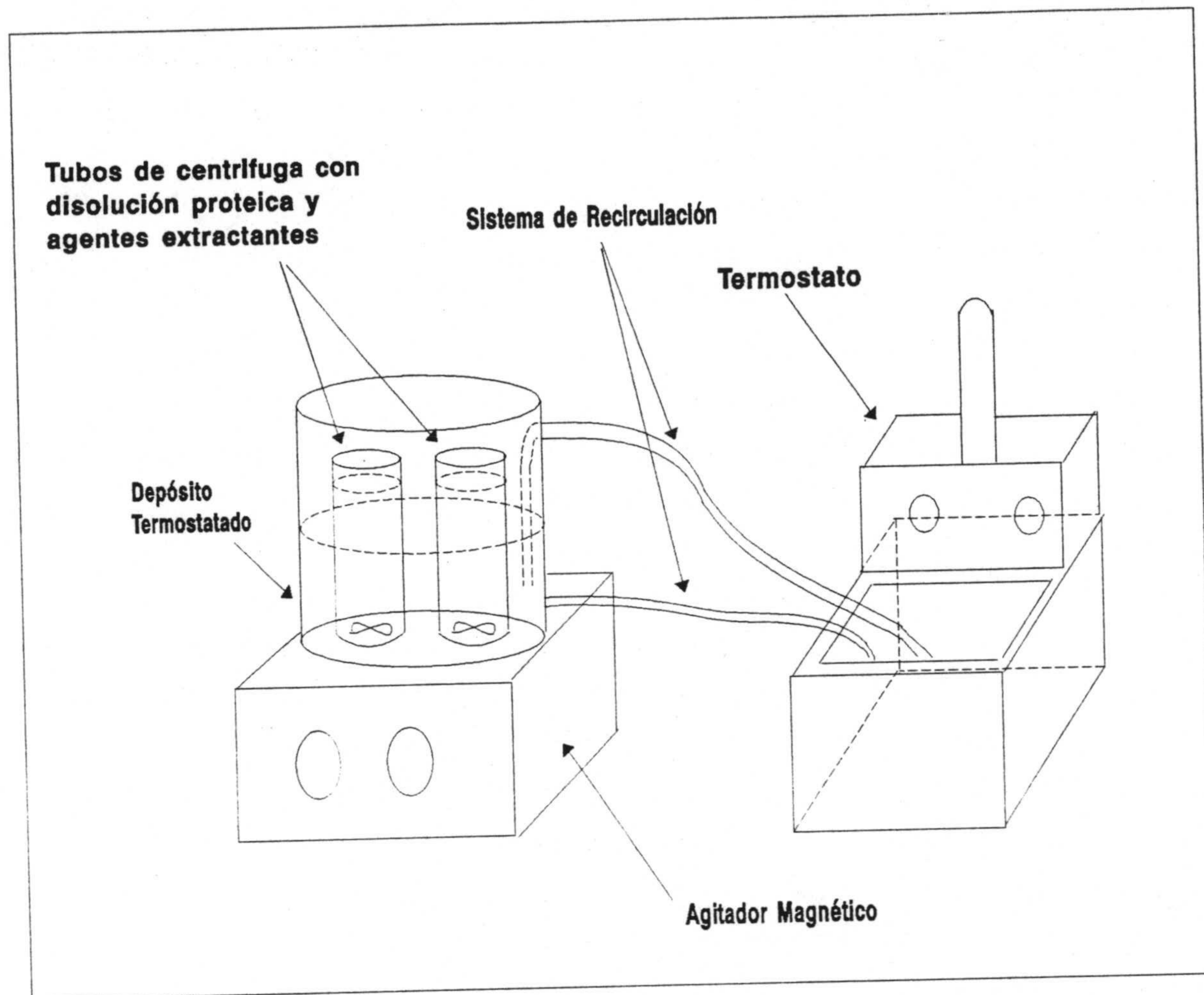


Figura 3-5

Esquema del sistema utilizado para extracción de ficocianobilinas mediante metanólisis de C-PC y APC.

3.3.-TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.

3.3.1.-Espectroscopía de absorción.

Los espectros de absorción se han obtenido en un espectrofotómetro (Lambda 5 y/o 16). Se han realizado espectros uv-visible a las fracciones recogidas en las eluciones cromatográficas, siendo necesaria la dilución de la muestra en algunas de las fracciones debido a su excesiva concentración. Los barridos se hicieron en el rango de 260 a 700 nm, a una velocidad de 120 nm/min. Los espectros correspondientes a las experiencias de cromatografía de exclusión molecular, se hicieron utilizando como blanco el tampón de acetato 0.1 M y pH=5 como fase móvil. De la misma forma, los espectros realizados a fracciones procedentes de cromatografía de cambio iónico se registraron utilizando como blanco el tampón de fosfatos de igual pH y fuerza iónica que el de elución en la columna.

Todas las medidas, exceptuando las correspondientes a estudios de influencia de la temperatura, fueron realizadas termostalizando el compartimento de la muestra a 25 °C, mediante circulación de una corriente externa de agua impulsada por un termostato de alta precisión. En lo referente a las concentraciones empleadas, fueron distintas según el tipo de experiencia pero en cualquier caso en el intervalo comprendido entre $7.2 \cdot 10^{-7}$ - $3.7 \cdot 10^{-5}$ M para C-PC, y $7.7 \cdot 10^{-7}$ - $6.0 \cdot 10^{-5}$ M para APC.

3.3.2.-Espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario.

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario se han obtenido con un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5001. Los registros se han realizado en condiciones de alta sensibilidad y velocidad de barrido media. En cada caso se eligieron las longitudes de onda de excitación, rendijas (excitación y emisión) y rango de emisión adecuados, aunque en general para las muestras de C-PC se excitó a 568 nm y para APC a 590 nm recogiendo la emisión entre 600 y 700 nm para ambas biliproteínas.

Exceptuando las experiencias de medida de fluorescencia en función de la temperatura, los espectros se han registrado a temperatura constante e igual a 25°C, obtenida mediante circulación de agua impulsada por un baño externo termostalizado de gran precisión. Las células de cuarzo empleadas se describen en el apartado de material correspondiente. En

cuanto al margen de concentración utilizado, oscila entre $2.4 \cdot 10^{-7}$ - $0.5 \cdot 10^{-5}$ M para C-PC y $7.7 \cdot 10^{-7}$ - $1.3 \cdot 10^{-5}$ M para APC.

3.3.3.-Espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo.

Las medidas de tiempo de vida se han realizado utilizando en la excitación de la muestra un filtro de interferencia con máximo en 589.5 nm y ancho de banda de 9 nm y como filtro de emisión uno de corte a 630 nm. Las muestras se termostataron a 25° C.

Las curvas de desactivación de fluorescencia fueron analizadas por un programa de deconvolución basado en el método de ajuste por mínimos cuadrados de modo que la función experimental $f(t)$ se obtiene como convolución de la curva de desactivación de fluorescencia $g(t)$ y la respuesta experimental $i(t)$ de acuerdo con la ecuación:

$$f(t) = \int_0^t i(t-t') g(t') dt'$$

La curva de desactivación de fluorescencia se expresa como

$$g(t) = \sum \beta_i e^{(-t/\tau_i)} i$$

en donde β_i es el preexponencial y τ_i es el tiempo de vida de fluorescencia.

La bondad del ajuste se establece de acuerdo con el valor de χ^2 reducido, estimándose como correctos los ajustes en los cuales el valor de χ^2 reducido es lo más próximo a 1.

3.3.4.-Polarización de fluorescencia.

Si se excita con luz polarizada, un conjunto de moléculas fluorescentes que forman una disolución isotrópica, la emisión resultante también está polarizada. La magnitud de la polarización va a depender de aquellos factores que afectan los movimientos de reorientación de la molécula (en la escala del nanosegundo), así como del ángulo que forman los momentos de transición del cromóforo absorbente y del cromóforo emisor.

Un haz de luz polarizada verticalmente (paralela al eje z) se hace incidir sobre una disolución isotrópica de moléculas y la emisión se analiza con un polarizador. Cuando este se orienta paralelo a la dirección de polarización de excitación, la intensidad observada es I_{\parallel} , mientras que cuando se orienta perpendicular, la intensidad detectada es I_{\perp} . El grado de polarización de la emisión puede cuantificarse mediante dos parámetros:

a) Polarización de fluorescencia (**P**), definida como la fracción de luz linealmente polarizada.

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

b) Anisotropía de fluorescencia (**a**) definida como el exceso de intensidad que es paralelo al eje de polarización, dividido por la intensidad total:

$$a = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Polarización y anisotropía se relacionan entre si según las expresiones:

$$P = \frac{3 a}{(2 + a)} \quad a = \frac{2 P}{3 - P}$$

Los valores máximos de anisotropía varían entre $-0.2 \leq a \leq 0.4$ y los de polarización entre $-0.33 \leq P \leq 0.5$.

Los espectros de polarización son representaciones de la anisotropía (o de la polarización) de fluorescencia frente a la longitud de onda de excitación. Generalmente la

polarización es independiente de la longitud de onda de emisión, ya que ésta se produce casi siempre desde el estado excitado de menor energía.

Para realizar las medidas de polarización, únicamente es necesario incorporar polarizadores en los canales de excitación y de emisión del espectrofluorímetro. La geometría utilizada en nuestras medidas es la configuración en L, que utiliza un solo canal de emisión. Esta geometría permite fácilmente restar la contribución de la luz dispersa a la medida de la anisotropía, aunque de forma secuencial.

Previo a las medidas de anisotropía es necesario calcular el factor G, el cual es un factor de corrección debido a que el conjunto del monocromador de emisión, fotomultiplicador y óptica asociada, no detecta con la misma eficiencia la luz polarizada vertical y horizontalmente, ya que los monocromadores polarizan parcialmente la luz incidente. El factor G es la relación de sensibilidades del sistema de detección (canal de emisión) para la luz polarizada vertical y horizontalmente y resulta función de la longitud de onda de detección. Se calcula mediante la siguiente expresión:

$$G = \frac{S_V}{S_H} = \frac{S_V}{S_H} \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

donde los subíndices de I_{HV} e I_{HH} indican la orientación de los polarizadores de excitación y emisión respectivamente. Según lo anterior la polarización vendrá dada por:

$$P = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + G I_{VH}}$$

3.3.5.-Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier.

Para realizar una experiencia de FT-IR es necesario registrar tres interferogramas: el del fondo, el del blanco (disolvente) y el de la muestra (disolvente+proteína). En todos, las condiciones experimentales deben ser las mismas para obtener una señal óptima. La resolución seleccionada en las experiencias realizadas en esta Memoria ha sido de 2 cm^{-1} , lo que implica un retardo máximo, δm , de 0.5 cm (desplazamiento del espejo con respecto al punto ZPD). El número de interferogramas acumulado ha sido de 750.

El interferograma del fondo se realiza sin interponer nada al paso del haz de luz en la cámara de la muestra, de esta forma se obtiene, previa transformación de Fourier de dicho interferograma, el espectro de emisión de la fuente luminosa (intensidad de luz emitida por la fuente para cada longitud de onda de la zona del espectro infrarrojo seleccionado). Los espectros de emisión de la fuente IR modificados por la presencia del blanco o de la muestra se obtienen colocando en la célula de líquidos el blanco y/o la muestra, entre el interferómetro de Michelson y el detector. Para obtener el espectro de transmisión del blanco o de la muestra habrá que dividir los correspondientes espectros de emisión por el espectro de emisión de la fuente, ya que la transmitancia viene definida por el cociente entre la luz transmitida y la luz incidente en una muestra. A continuación se resta al espectro de absorción de la muestra, el espectro de absorción del blanco multiplicado por un factor adecuado, entre 0 y 1, tomando el criterio de que se anule la absorbancia en la zona entre 1700 y 1900 cm^{-1} en la que el D_2O absorbe y la proteína no. En esta Memoria el blanco ha sido D_2O para las experiencias con biliproteínas y metanol para las experiencias con las bilinas. La concentración de biliproteína utilizada fue de 10 mg/ml , mientras que la de bilinas fue de 0.43 mg/ml . La temperatura de trabajo fue de 25° C . Para evitar las posibles variaciones del vapor de agua y CO_2 ambientales, el aparato se purgó constantemente con aire desecado.

En lo referente al procedimiento de ajuste, el número y la posición (frecuencia) en las que están centradas las bandas individuales fue determinada a partir del espectro derivado en el espacio Fourier y del espectro deconvuelto. La derivación de Fourier fue realizada usando una potencia de 3 y un punto de corte de 0.3. Una potencia de 3 en la derivación en el espacio de Fourier corresponde a una cuarta derivada suavizada. Los procedimientos de deconvolución de Fourier (Kauppinen y col., 1981) se realizaron utilizando una Lorentziana de 17.84 cm^{-1} de anchura de banda media y un factor de incremento de 2.5. El procedimiento de ajuste de la banda se realizó sobre el espectro deconvuelto.

3.3.6.-Electroforesis SDS-PAGE.

3.3.6.1.-Principio del método.

Se ha utilizado la técnica de electroforesis PAGE-SDS, para comprobar la pureza alcanzada en cada etapa de la purificación y en la determinación de los pesos moleculares de las proteínas purificadas, mediante la comparación con patrones de pesos moleculares conocidos.

La teoría de la electroforesis es complicada y hasta ahora incompleta. Como es conocido, se denomina electroforesis al transporte de una partícula cargada (una proteína en nuestro caso) debida a la acción de un campo eléctrico. Si una partícula de carga q en un medio, se somete a la acción de un campo eléctrico, E , alcanzará una velocidad estacionaria v , que vendrá dada por el balance entre la fuerza que sobre la misma origina el campo, $E \cdot q$, y el rozamiento viscoso, $f \cdot v$, donde f es el coeficiente de rozamiento. Se define entonces la movilidad m como la velocidad por unidad de campo eléctrico:

$$m = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

Esta movilidad resulta retardada por las interacciones con la matriz tridimensional constituida por un gel, que evita la aparición de corrientes de convección en el movimiento de las macromoléculas contribuyendo a que el tamaño de las mismas sea un factor determinante en la separación, conjuntamente con la carga. La variable experimental que se obtiene es una movilidad relativa, m , que se define como el cociente entre la distancia recorrida en el gel por la proteína y la distancia, siempre mayor, recorrida por una sustancia de bajo peso molecular que se utiliza como referencia. Durante la preparación de la muestra las proteínas se tratan en caliente con SDS, dotando de carga negativa a los complejos resultantes. El tratamiento paralelo con un agente reductor como el 2- β -mercaptoetanol favorece la desnaturalización proteica en sus subunidades estructurales. La movilidad de los complejos resultantes queda así exclusivamente relacionada con su peso molecular.

Las electroforesis realizadas en esta Memoria se han basado en el método de Laemmli utilizando la técnica de electroforesis discontinua que consiste en dos geles contiguos pero distintos, abajo un gel separador y encima un gel apilador. Los dos geles están preparados con

diferentes porosidades, pH y fuerza iónica. La diferente movilidad de los iones se usa en el gel y en los tampones de electrodo (o de desarrollo). La discontinuidad sirve para concentrar grandes volúmenes de muestra en el gel apilador, obteniendo de esta forma una mejor resolución que si se usaran geles sin apiladores. Las proteínas una vez concentradas en el gel apilador, se separan en el gel separador (Laemmli, 1970).

Por tanto en el método de Laemmli se emplean cuatro componentes fundamentales: tampón de desarrollo, muestra, gel apilador y gel separador. El fundamento, es la utilización de un gel de menor concentración de poliacrilamida y diferente pH (gel apilador donde se aplica la muestra), respecto del gel en el que se resuelven las bandas electroforéticas (gel separador). Mediante la elección adecuada de los tampones y valores de pH que se utilizan en ambos geles, se logra que las proteínas al pasar del gel apilador al separador, se dispongan en finísimas bandas ordenadas según sus movilidades, aumentándose de esta manera la resolución de la técnica (Figura 3-6).

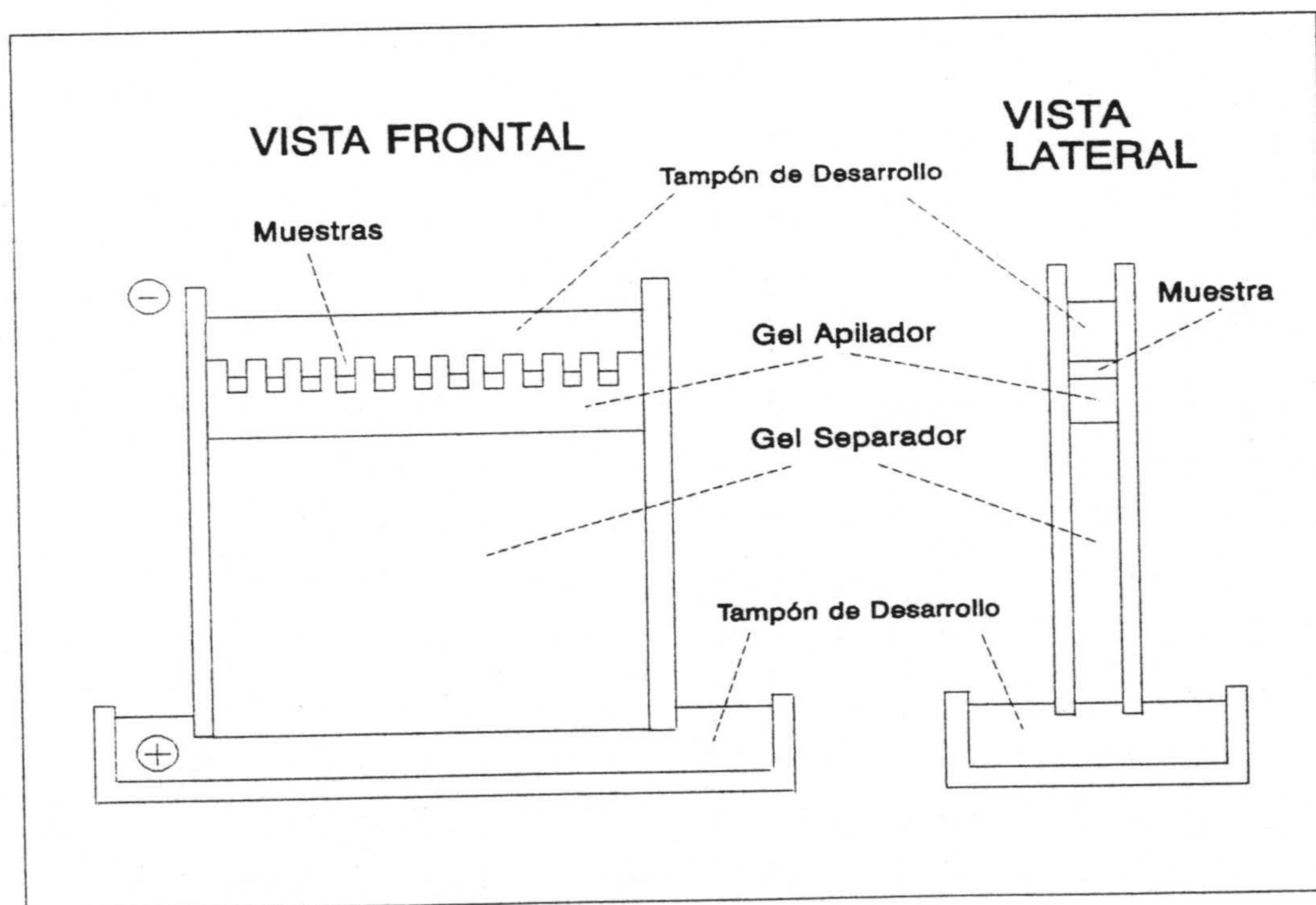


Figura 3-6

Vistas lateral y frontal de un montaje de electroforesis en lámina vertical. El paso de corriente eléctrica a través del gel desde el polo negativo (arriba) hacia el polo positivo (abajo) obliga a las proteínas a recorrerlo en este sentido, separándose unas de otras según su mayor o menor dificultad para penetrar por el entramado del gel separador.

La mayoría de las electroforesis se realizan en placas o cámaras verticales formadas entre dos cristales. Este formato proporciona uniformidad y las diferentes muestras pueden ser comparadas en el mismo gel.

3.3.6.2.-Geles de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida están formados por la copolimerización del monómero acrilamida con el monómero N,N'-metilen-bis-acrilamida (bisacrilamida). El mecanismo de formación del gel es una vinil adición, polimerización catalizada por un sistema generador de radicales libres compuesto de un iniciador (persulfato amónico) y de un acelerador (TEMED). Este último causa la formación de radicales libres de persulfato que son los que catalizan la polimerización. El oxígeno interfiere en la polimerización por lo que es necesaria la desgasificación de las disoluciones de acrilamida para conseguir una formación de geles reproducibles (Deutscher, 1990).

Las propiedades del gel vienen dadas por el entramado tridimensional de fibras y poros que se forma al polimerizar acrilamida con bisacrilamida (Figura 3-7). Al aumentar la concentración de acrilamida el tamaño del poro efectivo disminuye.

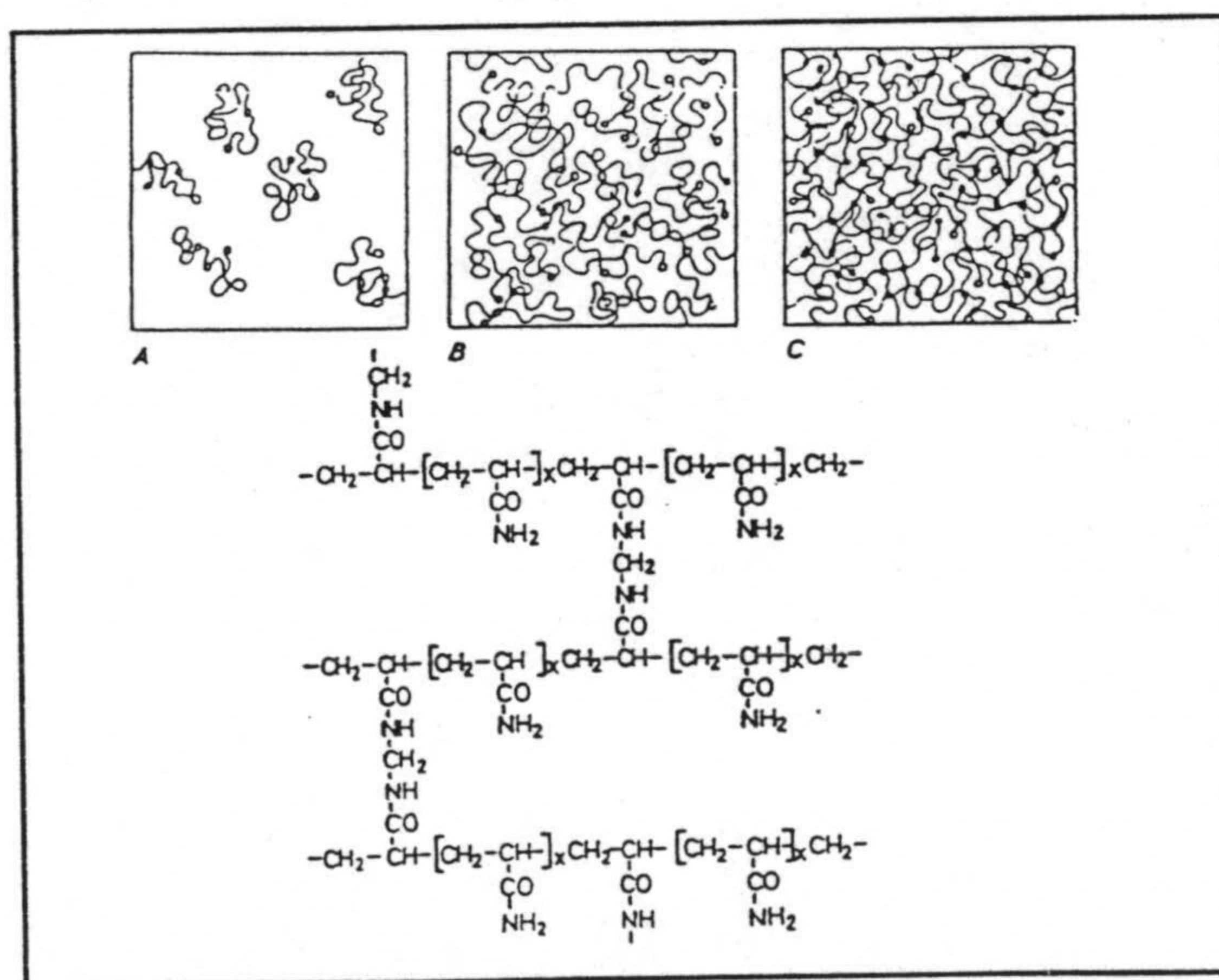


Figura 3-7

Estructura del gel de poliacrilamida. En A, B y C se muestra la formación del gel a partir de ovillos estadísticos de poliacrilamida. Los puntos negros indican el entrecruzamiento de las cadenas mediante moléculas de bisacrilamida.

3.3.6.3.-Preparación de los geles.

El uso de reactivos de alta calidad es un requisito indispensable para geles reproducibles y de alta resolución. En la preparación de los geles utilizados en la electroforesis, se necesitan las siguientes disoluciones:

Disolución A: Acrilamida al 29.2% (p/v), N,N'-metilen-bisacrilamida al 0.8%. Se disuelven 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en 70 ml de agua desionizada. Cuando la acrilamida está totalmente disuelta se añade agua hasta un volumen final de 100 ml. Esta disolución se filtra y se guarda a 4° C en oscuridad durante no más de un mes.

Disolución B: Tampón Tris-HCl 1.5 M (pH= 8.8). Se disuelven 18.2 g de Tris en 80 ml de agua, se ajusta el pH con HCl concentrado y se adiciona agua hasta un volumen final de 100 ml. Se almacena a 4° C.

Disolución C: Tampón Tris-HCl 0.5 M (pH= 6.8). Se disuelven 6.1 g de Tris en 80 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con HCl concentrado y se adiciona agua hasta un volumen final de 100 ml. Se almacena a 4° C.

Disolución D: SDS al 10% Se disuelven 10 g de SDS en 60 ml de agua y se adiciona agua hasta un volumen final de 100 ml.

Disolución E: Tampón de disolución de la muestra. Se guarda a temperatura ambiente y se compone de: 0.06 M Tris-HCl pH=6.8, 2% SDS, 4.5% 2-βmercaptoetanol, 10% de glicerol y 0.025% azul de bromofenol (0.5% p/v). Para 10 ml de tampón de disolución de la muestra son necesarios:

- 4.8 ml agua destilada
- 1.2 ml Tris-HCl 0.5 M pH=6.8
- 1 ml Glicerol
- 2 ml SDS al 10%
- 0.45 ml de 2 B-mercaptoetanol
- 0.5 ml de Azul de bromofenol al 0.05 %

Disolución F: Tampón de desarrollo de pH= 8.3 (0.025 M Tris, 0.192 M glicina, 0.1% SDS p/v). Para preparar 0.2 litros de tampón de desarrollo concentrado, serian necesarios: 3

g de Tris, 14.4 g de glicina y 1 g de SDS. No hay que ajustar el pH, únicamente comprobar que tras la mezcla de los reactivos el pH se encuentra en el intervalo 8.3 ± 0.2 . Para cada desarrollo se diluyen los 200 ml de disolución concentrada con 800 ml de agua destilada.

Disolución de persulfato amónico al 10%. Para 1 ml de disolución disolvemos 0.1 g de persulfato amónico. Hay que prepararlo todos los días, no se puede almacenar.

TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-di-amina). Se usa sin diluir. Se guarda en frío y protegido de la luz.

Nota: Las disoluciones A,C y D se desgasifican antes de preparar los geles separador y apilador.

Los geles convencionales suelen tener de 16 a 20 cm de largo, 16 cm de ancho y de 0.5 a 3 mm de espesor, pudiendo acoger hasta 25 muestras. Nosotros hemos utilizado un espesor entre 0.75 y 1 mm, que posee características idóneas de disipación calorífica, de teñido y desteñido y una capacidad total de proteínas suficiente para nuestros análisis.

En la Tabla 3-I figuran las cantidades de las disoluciones que se deben utilizar, para preparar 25 ml del gel separador de distinto porcentaje de entrecruzamiento.

La técnica empleada ha sido la de electroforesis en lámina, en la que el gel se prepara entre dos placas de vidrio paralelas y separadas por espaciadores de 1 mm de espesor. Esto supone algunas ventajas con respecto a los geles formados en tubos: en primer lugar, al desarrollarse todas las muestras en el mismo gel, la comparación entre ellas es más fácil y precisa; además para un mismo número de muestras se consumen menos reactivos. El TEMED que inicia la reacción de polimerización, se añade justo antes de introducir la disolución de acrilamida entre las placas en posición vertical. Las placas están selladas por tres de sus aristas (menos por la superior), formando un receptáculo donde depositamos la mezcla poco a poco con la ayuda de una pipeta Pasteur procurando que no se formen burbujas. Las placas se llenan hasta una altura de 10 cm aproximadamente de gel separador, a continuación se añade un poco de agua por encima para evitar la formación de un menisco en el frente del gel. Se necesita un volumen de unos 25 ml de disolución. El final de la polimerización se observa por la aparición de una interfase entre el gel separador y el agua que se añade tras éste.

TABLA 3-I
Composición del gel separador según % entrecruzamiento.

| % ACRILAMIDA (Entrecruzamiento) | 8 % | 10 % | 12.5% | 15 % |
|--|-------|-------|-------|-------|
| Disolución A (ml) | 6.85 | 8.5 | 10.3 | 12.75 |
| Disolución B (ml) | 6.25 | 6.25 | 6.25 | 6.25 |
| Disolución D (ml) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| H ₂ O (ml) | 11.65 | 10 | 8.2 | 5.75 |
| S ₂ O ₈ (NH ₄) ₂ (ml) | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.125 |
| TEMED (ml) | 0.001 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

A continuación se prepara el gel apilador, siempre con un grado de entrecruzamiento igual al 4%. Para unos 2 cm de altura de gel (10 ml) son necesarias las siguientes cantidades:

Disolución A: 1.3 ml
 Disolución C: 2.5 ml
 Disolución D: 0.1 ml
 Agua Destilada: 6.1 ml
 Persulfato Amónico (10%): 0.05 ml
 TEMED: 0.01 ml

Se retira el agua situada sobre el gel separador mediante la utilización de papel de filtro. Se añade persulfato y TEMED al resto de los reactivos y la disolución resultante se agrega sobre el gel separador. A continuación se coloca un peine para formar las calles donde luego irán las muestras de proteínas.

3.3.6.4.-Preparación de la muestra.

La muestra se diluye como mínimo con un volumen igual de disolución E, aunque se pueden usar mayores diluciones. La elección de la dilución se hace de forma que se aplique al gel no más de 50 µl, pero que éstos contengan al menos unos 30 µg de proteína. Esto viene motivado porque la tinción con Coomassie tiene un límite de detección del orden de 1 µg. Las muestras diluidas se introducen en agua caliente a 95 °C durante cuatro minutos.

Si la muestra está muy diluida, se añade igual volumen de ácido tricloroacético al 10% para precipitarla y se centrifuga en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad a 4° C y 13000 rpm, durante 10 min. Se desecha el sobrenadante, y a las proteínas precipitadas se les añaden 10 µl de disolución de TRIS 2 M para disolverlas y elevarles el pH. Seguidamente se le efectúa el mismo tratamiento descrito anteriormente.

3.3.6.5.-Desarrollo de la electroforesis.

Las placas de vidrio se colocan en la cámara de electroforesis con la cubeta inferior llena de tampón de desarrollo. Se debe evitar la formación de burbujas de aire entre el gel y el tampón de la cubeta, pues ésto impediría el paso de la corriente eléctrica y por tanto la separación de las proteínas. Una vez preparadas las muestras, se introducen en las calles del gel apilador mediante una microjeringa. El glicerol existente en éstas proporciona la densidad necesaria para que se deposite en el fondo de la calle. Mientras la muestra atraviesa el gel apilador se aplica un voltaje de 100 V entre el polo positivo (abajo) y el negativo (arriba). Cuando las proteínas han pasado al gel separador se aumenta el voltaje a 200 V.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñen durante 30 min. con una disolución de Coomassie Brilliant Blue al 0.1 % (p/v), metanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 7% (v/v). El Coomassie Brilliant Blue se fija en las proteínas coloreándolas de azul. Además el colorante penetra en el entramado del gel por lo que las bandas de proteína permanecen todavía indistinguibles. Para desteñir el gel se utiliza una disolución de metanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 7% (v/v), renovándola varias veces hasta completa desaparición del color azul en la matriz, con la excepción de las bandas de proteína.

Seguidamente el gel seca con una disolución de metanol al 40% y glicerol al 10%. Para la conservación de los geles secos, se toma un vidrio y por su cara lisa se humedece, se coloca papel celofán también mojado y se sitúa encima de éste el gel con las proteínas. Sobre la otra superficie del gel se pone otro trozo de papel celofán igualmente humedecido. Se pinza tirante procurando eliminar las burbujas de aire y se deja secar, quedando plastificado el gel por ambas caras.

3.3.6.6.-Determinación de pesos moleculares.

La metodología para la determinación de pesos moleculares de proteínas mediante el uso de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) consiste en realizar una electroforesis en la que, acompañando a las muestras proteicas que queremos estudiar, se introducen unos patrones de pesos moleculares bien conocidos. El desarrollo de la electroforesis conduce a la obtención de diversas bandas en el gel que corresponden a estos patrones y a las muestras proteicas problema. En la muestra de patrones de peso molecular suelen ir macromoléculas que poseen un rango amplio de pesos moleculares dentro del cual deben encontrarse los de las proteínas problema. Los patrones empleados contienen una mezcla de las siguientes macromoléculas: α -lactoalbúmina (14400 da), tripsina (20100 da), anhidrasa carbónica (30000 da), ovoalbúmina (43000 da), albúmina (67000 da) y fosforilasa (94000 da), lo que permite determinar pesos moleculares comprendidos en ese intervalo. Con los patrones se construye una curva de calibrado representando el logaritmo del peso molecular frente al R_f de cada banda (cociente entre la distancia recorrida por cada proteína y la recorrida por una sustancia de referencia de bajo peso molecular). Con la curva de calibrado resultante y los valores de los R_f correspondientes a las proteínas problema, se pueden obtener los pesos moleculares de las mismas mediante interpolación.

3.3.7.-Cromatografía en capa fina para análisis de ficocianobilinas.

Se prepararon placas cromatográficas de 3·8 cm, utilizando como fase estacionaria silica gel. La fase estacionaria fue obtenida mediante la mezcla de 70 g de Silicagel Tipo G con 200 ml de cloroformo:metanol (2:1).

Las bilinas obtenidas en estado sólido se redisolviéron en metanol y se aplicaron mediante capilares de vidrio a las placas cromatográficas. Para el desarrollo de las placas cromatográficas se utilizó como fase móvil, una mezcla de acetona:etanol:agua:acético (50:38:11:1). Para visualizar los componentes separados se empleó una lámpara ultravioleta.

3.3.8.-HPLC de fase reversa analítica.

Se ha utilizado este tipo de cromatografía, para la caracterización de las subunidades y del cromóforo (ficocianobilina) que constituyen las biliproteínas de *Spirulina platensis* (C-PC y APC).

Las separaciones cromatográficas se han conseguido trabajando en gradiente de polaridad. Se ha comenzado con una fase móvil de alta polaridad, que se ha disminuido progresivamente, hasta conseguir la separación de los componentes. Para monitorizar la elución se han registrado los espectros de absorción entre 250 y 700 nm a intervalos de 200 mseg.

Las muestras de biliproteínas (0.5 mg/ml) se prepararon en tampón fosfatos 10 mM pH 6.5 adicionadas de 0.1 % de β -mercaptoetanol, siendo centrifugadas a 13000 rpm antes de ser inyectadas en una columna Hiperils Butil-300, previamente equilibrada con la fase móvil correspondiente al comienzo de la elución. La fase móvil está formada por cantidades variables de acetonitrilo y tampón de fosfatos 20 mM pH 6.5, ambos adicionados de β -mercaptoetanol al 0.1%.

En lo referente a las muestras de ficocianobilina se prepararon disolviendo 0.5 mg/ml en metanol y se inyectaron en la misma columna, igualmente equilibrada con la fase móvil, una mezcla de agua:acetonitrilo:metanol.

En todos los casos se inyectó 20 μ l de muestra y la velocidad de flujo fué de 1 ml/min.

3.4.-TÉCNICA DE ACUPUNTURA EN GELES.

La cristalización de las biliproteínas de *Spirulina platensis* (C-PC y APC) se ha llevado a cabo en colaboración con el laboratorio de estudios cristalográficos del Instituto Andaluz de Geología Mediterránea C.S.I.C-Universidad de Granada, que dirige el Dr. D. Juan M. García. Se ha utilizado la técnica de acupuntura en gel (TAG), que consiste en la inserción de un capilar relleno de disolución de proteína de alta concentración en un gel y posterior adición de agentes precipitantes que ascienden por capilaridad a través de la disolución de proteína, produciendo la cristalización de la misma (Figura 3-8) (García-Ruiz y col, 1993; García-Ruiz y Moreno, 1994).

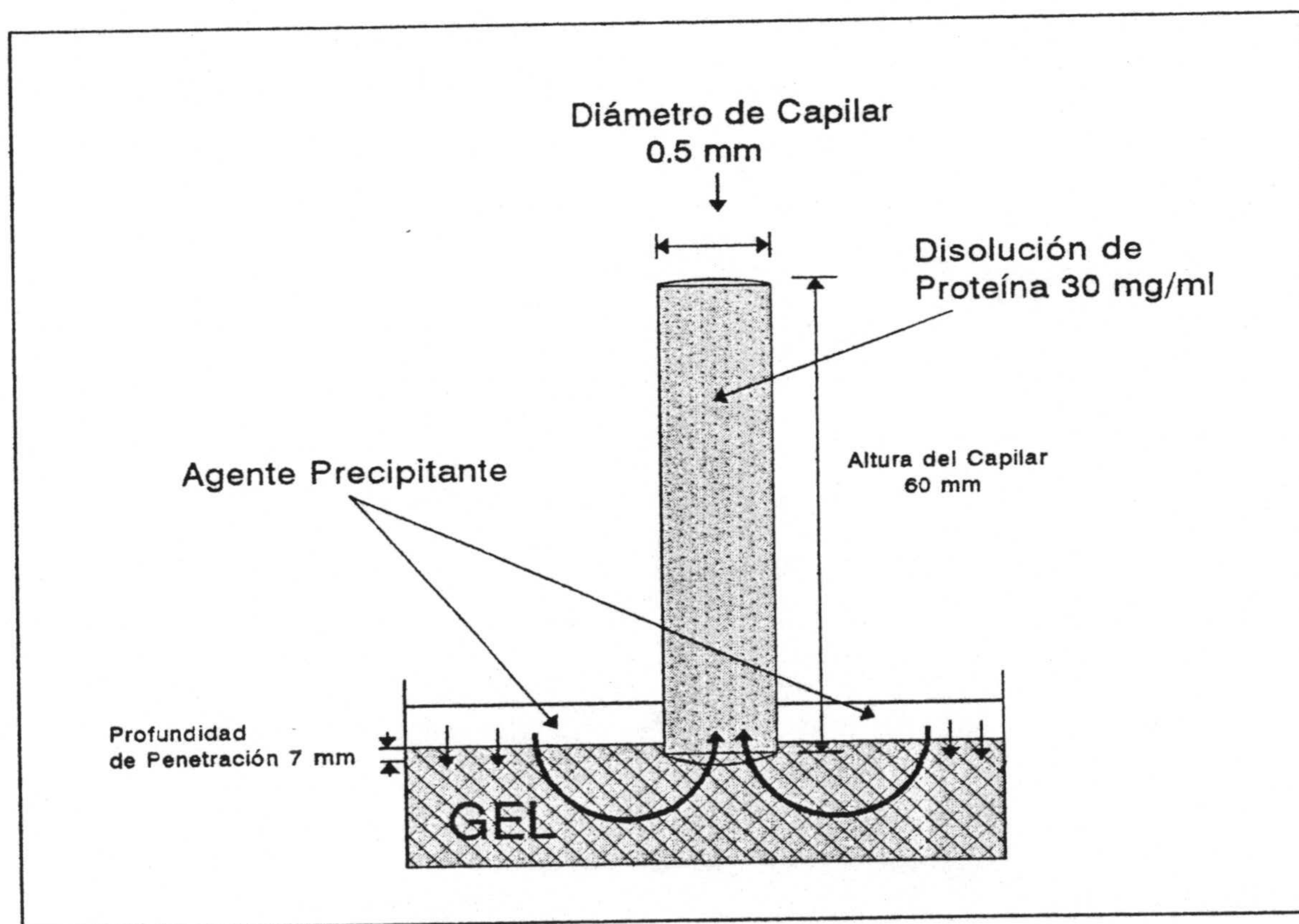


Figura 3-8

Método de acupuntura en gel (TAG) para cristalización de proteínas.

La preparación del dispositivo experimental para el desarrollo de la técnica necesita la realización de las siguientes de etapas (Figura 3-9):

Etapas 1.- Preparación de la capa de gel.

El gel es el medio de transporte de los agentes precipitantes y tampones a utilizar y por lo tanto deberá tener una reactividad química nula o despreciable frente a moléculas o iones que difundan a través de su red polimérica tridimensional. El gel fue tipo sílice de pH=6.5, preparado con una disolución de silicato de sodio (1.06 g/ml) y ácido acético 1M. Una vez preparado el gel se vierte en el cristizador. Su volumen depende de la concentración que se desea para el agente precipitante.

Etapas 2.- Llenado de los capilares con la disolución de proteína.

La disoluciones de proteínas fueron de una concentración de 30 mg/ml en tampón de fosfatos 20 mM de pH=7. Antes de llenar los capilares se lavaron cuidadosamente con detergente, agua bidestilada y acetona, secándolos mediante aire caliente. Los capilares, una vez secos, se llenan de la disolución de proteína por capilaridad. Es importante resaltar que el llenado no debe llegar hasta el final del capilar para no dificultar el sellado del mismo. Una vez lleno se precinta con un tapón de arcilla.

Etapas 3.- Sellado de los capilares.

Se realiza mediante arcilla de montaje de piezas dentales, ya que ha mostrado unas propiedades de sellado muy adecuadas, siempre y cuando no se mojen las paredes superiores del capilar al llenarlas con la disolución de proteína.

Etapas 4.- Inserción de los capilares en la capa de gel.

La parte abierta de los capilares se inserta dentro del gel. La longitud de penetración más adecuada se estima entre 0.5-1.0 mm. Para evitar la formación de burbujas se debe adicionar una pequeña capa de la disolución de agente precipitante, tampón o agua destilada sobre la superficie del gel.

Etapas 5.- Adición del agente precipitante.

Una vez insertados los capilares, se procede a adicionar lentamente la disolución de agente precipitante sobre la superficie del gel. Se utilizó el mismo volumen de agente precipitante que de gel. El agente precipitante utilizado ha sido MgCl₂ al 20% (w/v) en agua y PEG-6000 al 30% (w/v) en Tris-HCl pH=7. Inicialmente se hace difundir el MgCl₂ durante 96 horas y después se retira y se adiciona el PEG-6000. La aparición de núcleos se produce a los 30 días de iniciado el experimento.

Etapas 6.- Cerrado del sistema de crecimiento.

Para que el agente precipitante no se evapore se utiliza una cubierta de vidrio que selle el sistema hermeticamente.

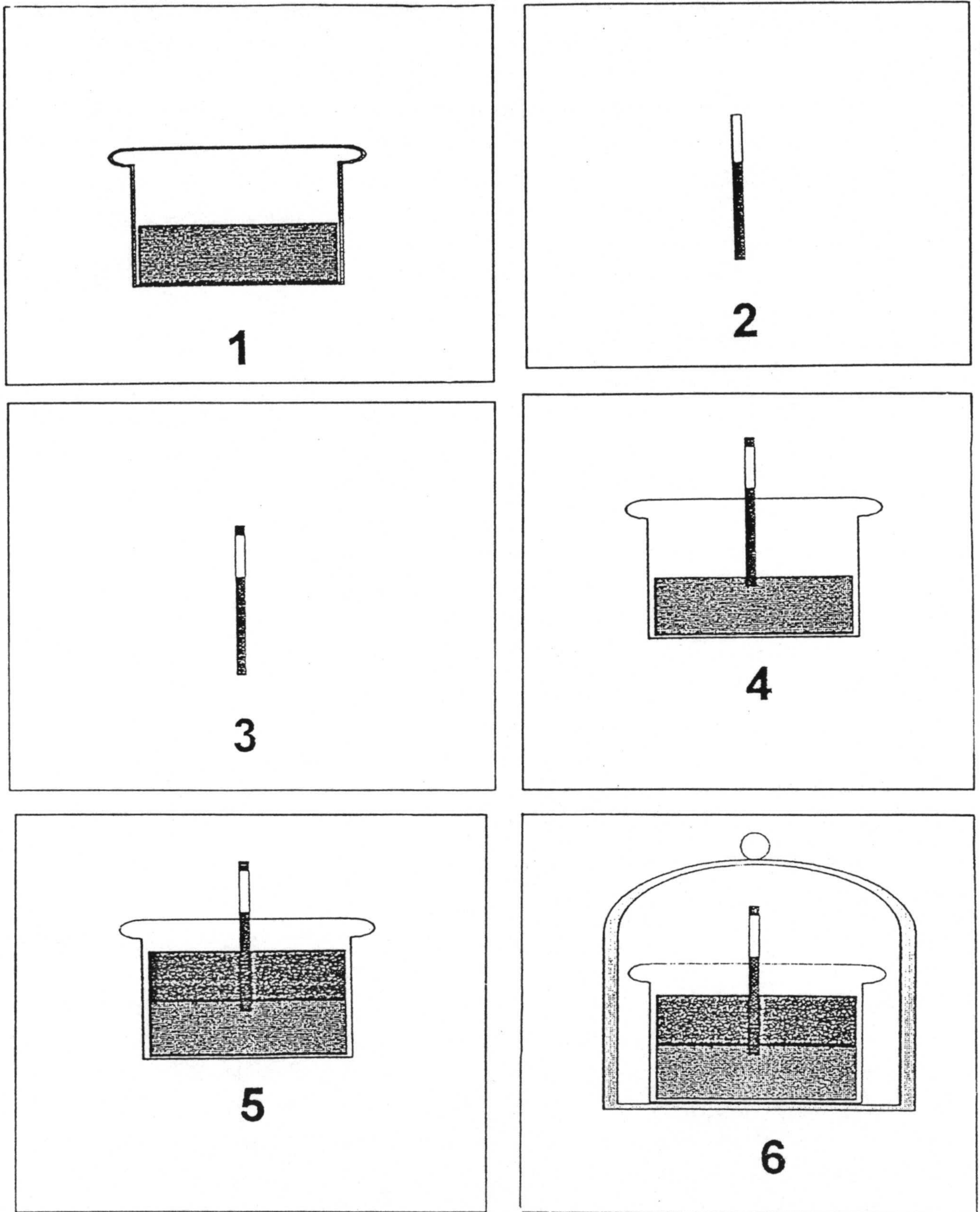


Figura 3-9

Etapas para la preparación de la técnica de acupuntura en geles.

3.5-INCLUSIÓN DE BILIPROTEÍNAS EN MICELAS REVERSAS.

En esta sección se describe el procedimiento seguido para la solubilización de biliproteínas (C-PC y APC) en micelas reversas de aerosol OT (di(2-etil-hexil)sulfosuccinato sódico (AOT)).

En todas las experiencias realizadas en esta Memoria la razón entre moléculas de proteína/nº de micelas, s , ha sido ≤ 0.1 . Por aplicación de la estadística de Poisson, esto implica una probabilidad del 90% de micelas sin proteína y un 9% de micelas que contienen una sólo molécula de proteína, siendo prácticamente nula la probabilidad de que existan micelas con más de una molécula (Turro y col., 1980). De esta forma los resultados derivados de nuestras experiencias no deben estar afectados por las posibles interacciones entre moléculas de proteína que compartan el interior acuoso del sistema micelar. Además, también se consigue un tamaño uniforme de micela.

Una vez prefijado el valor de $s=0.1$, se ha procedido a variar la razón molar agua/surfactante, w_0 , para formar micelas con diferente tamaño del núcleo acuoso. Para ello, se han utilizado los datos de Fendler y Mittal (1982) que figuran en la Tabla 2-XVI de antecedentes y que fueron obtenidos para micelas de AOT en n-octano e isooctano. Los mencionados valores, se han representado como número de moléculas de surfactante por micela (n^b) vs. w_0 en la Figura 3-10 y por interpolación, se ha obtenido (aproximadamente) un conjunto más extenso de valores de w_0 , con sus correspondientes números de agregación (n^b) y números de moléculas de agua en el núcleo acuoso, j^c ($j^c = n^b \cdot w_0$)

Se han utilizado las expresiones siguientes para el cálculo de las cantidades de agua (A), de surfactante (B) y de disolución madre de proteína (C), que deben de mezclarse para conseguir un volumen total de sistema V_T de un determinado w_0 :

$$A = n^b \cdot [Micelas] \cdot w_0 \cdot 18 \cdot V_T$$

$$B = \frac{n^b \cdot [Micelas] \cdot V_T \cdot 444.6}{[AOT]}$$

$$C = \frac{[\text{Proteína}] \cdot P_M \cdot V_T}{[\text{Proteína}]}$$

donde A viene expresado en μl de agua; B en μl de una disolución madre de AOT en el disolvente hidrocarbonado; C son los μl de una determinada disolución de biliproteína madre en el tampón adecuado; 444.6, 18 y P_M son los pesos moleculares de AOT, agua y biliproteína respectivamente.

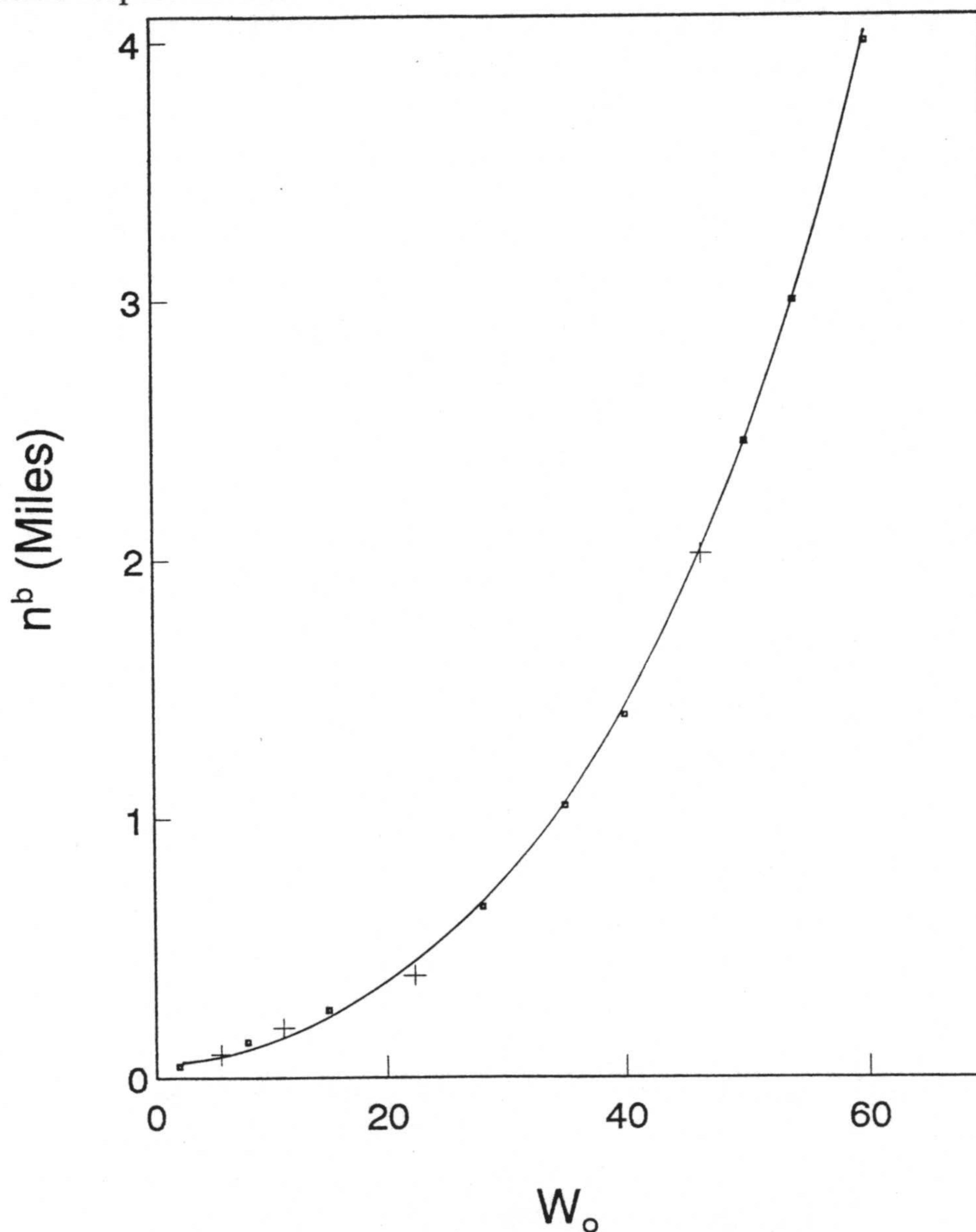


Figura 3-10

Curva obtenida para relacionar el número de moléculas de surfactante por micela (n^b) en función de w_0 .

En la Tabla 3-II se describen las cantidades necesarias de cada uno de los componentes y los valores de los parámetros característicos, de los sistemas micelares usados en nuestros estudios.

La técnica empleada para la incorporación de las biliproteínas a las micelas fue la de inyección, por su rapidez y simplicidad. Para ello, se preparó una disolución madre de biliproteína de elevada concentración en tampón fosfato de pH y fuerza iónica apropiados. De ésta se toman, con la ayuda de una microjeringa, los microlitros necesarios y se añaden a la disolución hidrocarbonada que ya contiene la cantidad de surfactante y agua apropiados para cada valor de w_0 . Tras esta adición se agita la disolución y se espera la estabilización del sistema. Todas las medidas espectroscópicas se realizaron a temperatura de 25 °C.

TABLA 3-II

Parámetros estructurales y cantidades necesarias de los diversos componentes para la formación de distintos sistemas micelares según el valor deseado w_0 . [AOT]=0.4 M; [Proteína]= 10^{-5} M; [Micelas]= 10^{-4} M.

| w_0 | n^b | j^c | V_T (ml) | A (μ l) | B (μ l) | C (μ l) | [Proteína] M | S |
|-------|-------|--------|------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|-------|
| 2.00 | 45 | 90 | - | - | - | - | 5.80×10^{-7} | 0.006 |
| 5.70 | 91 | 521 | 10 | 10 | 242 | 10 | 1.24×10^{-6} | 0.012 |
| 8.00 | 140 | 1120 | 5 | 10 | 175 | 10 | 2.37×10^{-6} | 0.023 |
| 11.1 | 193 | 2128 | 5 | 19.2 | 241 | 19.2 | 4.33×10^{-6} | 0.043 |
| 15.0 | 260 | 3900 | 5 | 35.1 | 325 | 35.1 | 1.00×10^{-5} | 0.1 |
| 22.3 | 395 | 8823 | 0.5 | 7.93 | 49.37 | 8 | " | 0.1 |
| 28.0 | 660 | 14480 | 0.5 | 16.63 | 82.5 | 8 | " | 0.1 |
| 35.0 | 1050 | 36750 | 0.5 | 33.07 | 131.2 | 8 | " | 0.1 |
| 40.0 | 1400 | 56000 | 0.5 | 50.4 | 175 | 8 | " | 0.1 |
| 46.4 | 2022 | 93844 | 0.5 | 84.44 | 252.7 | 8 | " | 0.1 |
| 50.0 | 2452 | 122600 | 0.5 | 110 | 307 | 8 | " | 0.1 |
| 54.0 | 3000 | 162000 | 0.5 | 146 | - | 8 | " | 0.1 |
| 60.0 | 4000 | 240000 | 0.5 | 216 | - | 8 | " | 0.1 |

3.6.-CONJUGADOS BILIPROTEÍNAS-POLINUCLEÓTIDOS.

3.6.1.-Modificación de polinucleótidos sintéticos.

En este apartado se describe la metodología para la modificación del ácido polirribonucleico Poli(C). Esta metodología se basa en las observaciones de Shapiro y col. (1970). Tiene por objeto la sustitución del grupo amino en la posición N⁴ de una pequeña fracción de los residuos citosina de Poli(C) por etilendiamina, a través de una reacción de intercambio catalizada por bisulfito. El esquema de la reacción se indica en la Figura 3-11.

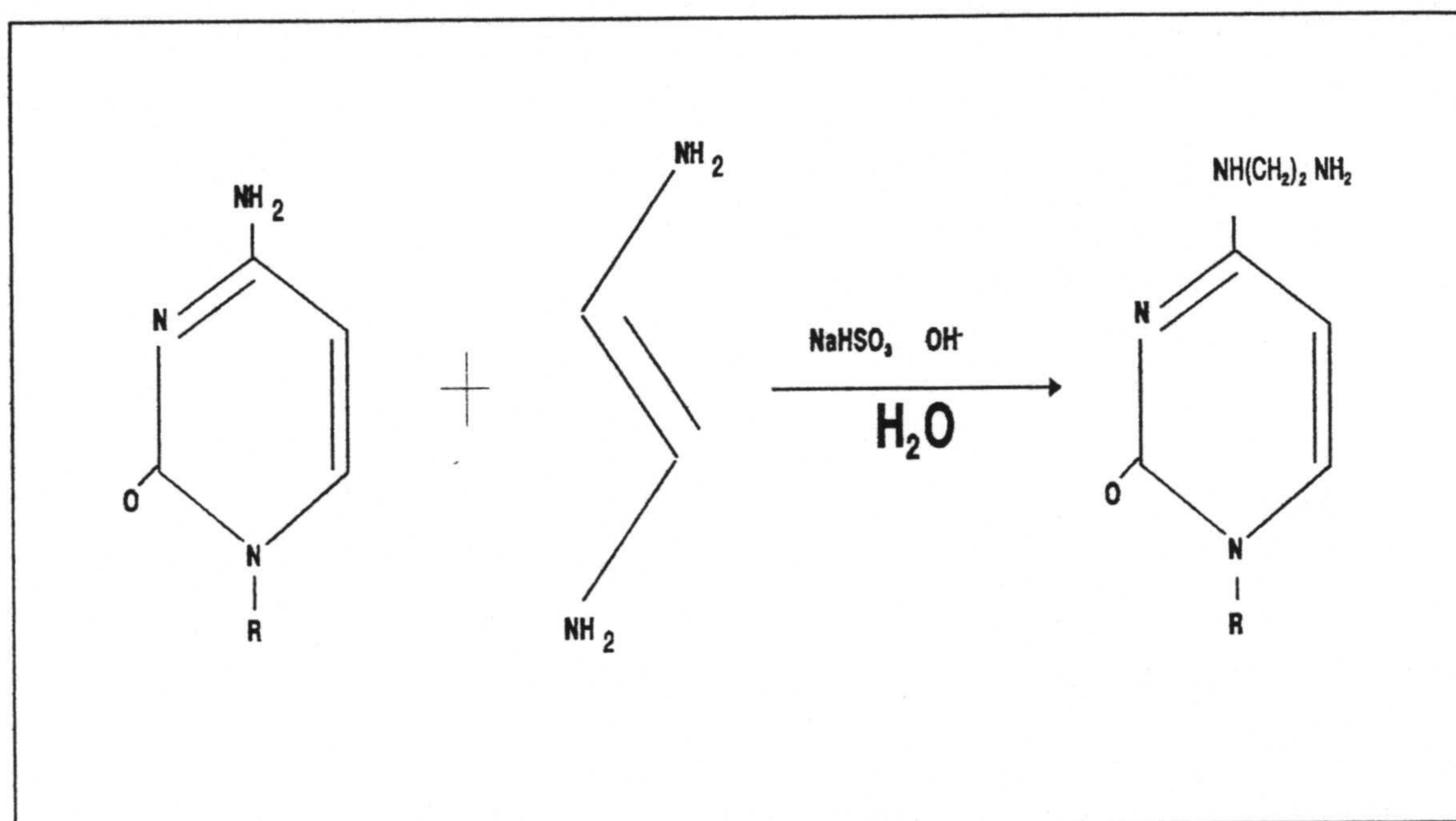


Figura 3-11

Esquema de reacción para la modificación de Poli(C).

En primer lugar es necesario preparar un aducto de etilendiamina y bisulfito sódico que reacciona con el grupo NH_2 de la citosina. Para ello se mezclan (sobre hielo y en campana de gases) 1 ml de agua destilada con un 1 ml de HCl 12N. A esta disolución en agitación continua se añade 1 ml de etilendiamina gota a gota. A continuación se disuelven 0.475 g de bisulfito sódico ajustando el pH del medio a 6 por adición de HCl 12 N. La disolución se lleva con agua hasta un volumen final de 5 ml.

Por otra parte se disuelven 2 mg de Poli(C) (PM medio = 400000 da) en 200 μl de tampón Tris-HCl 5 mM-EDTA 1 mM (pH=7.5) y 0.2 g de hidroquinona en 1 ml de etanol.

Se mezclan entonces los 200 μ l de disolución de Poli(C) con 1800 μ l de disolución etilendiamina bisulfito sódico y 50 μ l de disolución de hidroquinona, y se deja reaccionar durante 30 minutos a 42°C. A continuación la mezcla se dializa frente a tampón de fosfatos 20 mM pH>8.5 durante toda la noche, teniendo precaución de hacer los cambios necesarios para que el pH del medio no baje nunca de un pH=7.7.

3.6.2.-Obtención del conjugado biliproteína-polinucleótido.

El procedimiento utilizado para la obtención del conjugado Poli(C)-biliproteína se basa en la metodología propuesta por otros autores para obtención de conjugados de macromoléculas (Carlsson y col, 1978; Glazer y Stryer, 1982; Stryer y Glazer, 1983; Glazer y Stryer, 1984), aunque se han realizado algunas modificaciones. El esquema general seguido para el etiquetado o marcaje de Poli(C) con biliproteínas ha sido el que se muestra en la Figura 3-12.

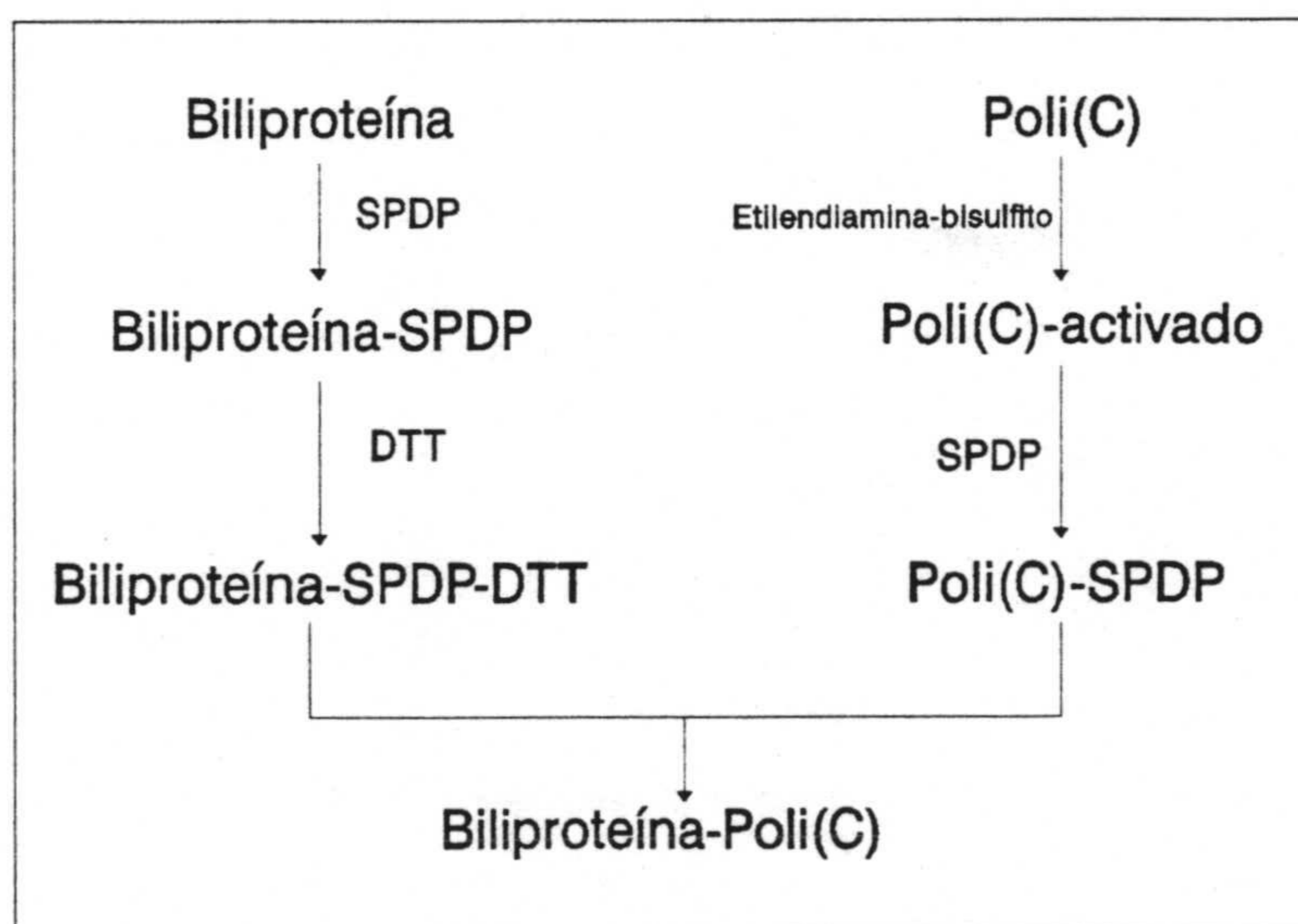


Figura 3-12

Esquema general para la obtención de conjugados biliproteína-Poli(C).

El propionato de N-succinidimil-3-2-piridiltio (SPDP) (Figura 3-13), es un reactivo heterobifuncional con el que se pueden introducir enlaces intermoleculares entre proteínas sin formación concomitante de enlaces intramoleculares. En concreto, el SPDP puede reaccionar con macromoléculas que posean grupos amino dando enlaces amida estables. En esta

Memoria hemos hecho reaccionar tanto Poli(C) como las biliproteínas con SPDP, obteniendo las correspondientes estructuras 2-piridil disulfuro. La proteína-2-piridil disulfuro puede convertirse en un compuesto proteina-tiol por reducción con ditioneitol (DTT) y de esta forma el Poli(C)-2-piridil disulfuro, puede reaccionar con ella dando lugar al conjugado Poli(C)-biliproteína.

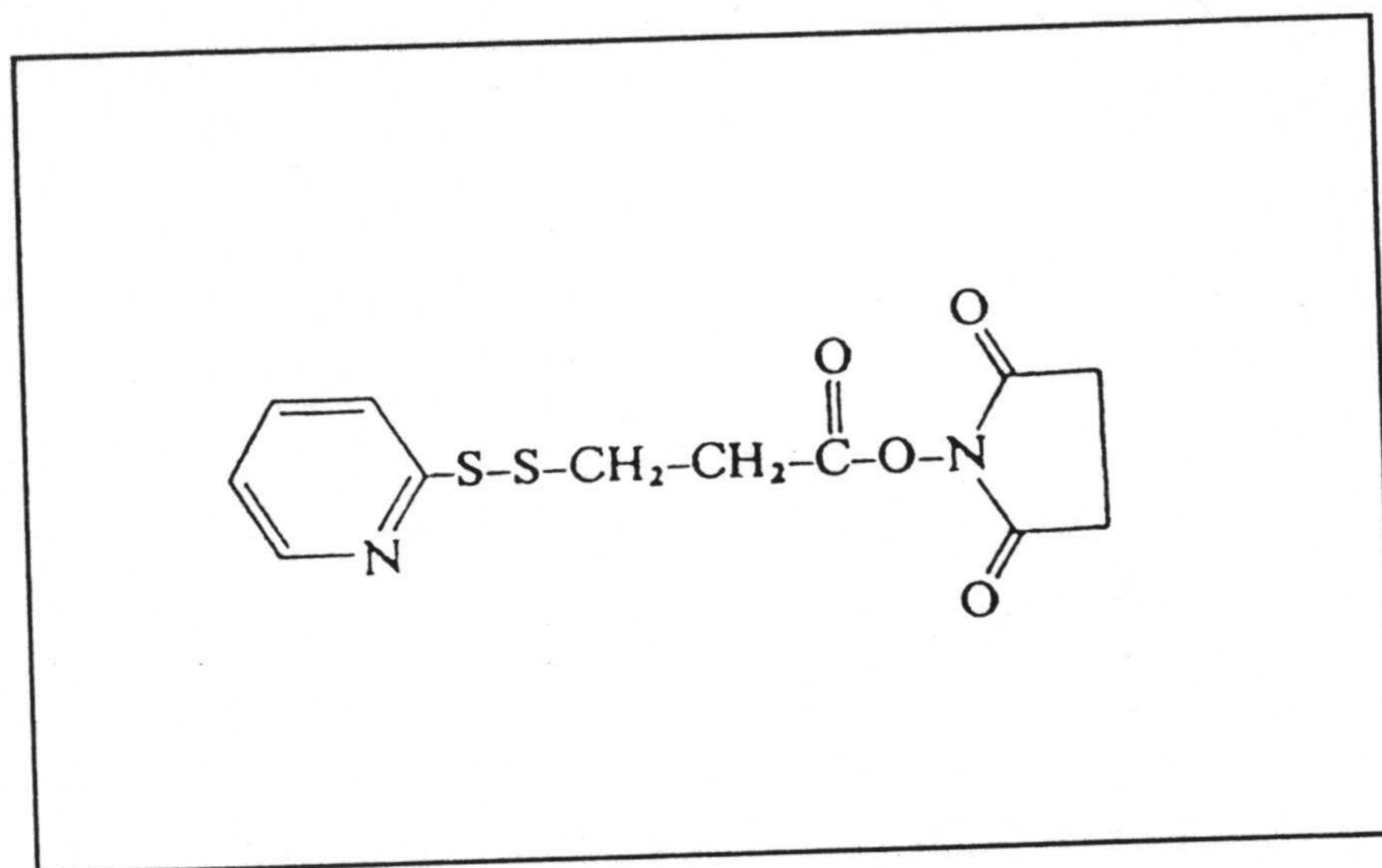


Figura 3-13

Propionato de N-succinidimil-3-2-piridiltio (SPDP).

El procedimiento utilizado en esta Memoria se describe a continuación (se relata únicamente el seguido para C-PC pues el seguido para APC ha sido totalmente análogo). En 1 ml de tampón fosfato 0.1M-NaCl 0.1M (pH=7.5) se disuelve 1 mg de C-PC. A continuación se le adiciona muy lentamente y bajo agitación continua 100 μ l de una disolución de SPDP en metanol anhidro (5 mg/ml), de esta forma se obtiene una relación SPDP/CPC=64. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 min a 23°C y transcurrido este tiempo se procede a la diálisis frente a tampón fosfatos 0.1M-NaCl 0.1M (pH=7.5), obteniendo así la proteína activada con SPDP. A esta disolución se le adiciona DTT en cantidad suficiente como para llevarla a una concentración 25 mM, manteniendo la agitación 30 min a 23°C. Seguidamente se dializa la mezcla resultante con objeto de eliminar el DTT en exceso y de esta manera ya tenemos la proteína tiolada dispuesta para reaccionar con el Poli(C)-2-piridil disulfuro, previamente obtenido como se indica a continuación. Es importante considerar que la tiolación de la proteína no debe efectuarse hasta el momento en que se vaya a realizar la reacción de conjugación.

Para el Poli(C) se sigue un tratamiento análogo. A 1 mg de Poli(C) modificado disuelto en fosfato 0.1M, NaCl 0.1M, pH=7.5 se adicionó 100 μ l de disolución de SPDP (5 mg/ml) gota a gota y en agitación continua durante 30 min a 23°C, (así se consigue una relación SPDP/Poli(C)=0.5). La disolución se dializa frente al tampón obteniendo el sistema Poli(C)-SPDP.

Una vez realizada la tiolación de la biliproteína modificada, se mezclan 1.1 ml de esta disolución con 1 ml de Poli(C)-2-piridil disulfuro y se mantiene en agitación durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtra mediante unidades "Ultrafree Mc" con un corte en 100000 da, de tal forma que el Poli(C) queda retenido en la parte superior del filtro y la disolución con el exceso de biliproteína no unida pasará a la parte inferior (Figura 3-14). Las unidades "Ultrafree-Mc" están indicadas para filtración de meclas mediante centrifuga. Al tubo eppendorf con la membrana "Ultrafree-MC" se le han añadido 0.4 ml de mezcla de reacción. Seguidamente, se ha centrifugado a 13000 rpm hasta que no queda disolución apreciable en la parte superior de la membrana y a continuación se ha lavado repetidas veces con tampón. Finalmente el conjugado Poli(C)-biliproteína se ha redisoluelto en una pequeña cantidad de tampón y se almacenado a -20°C hasta su utilización.

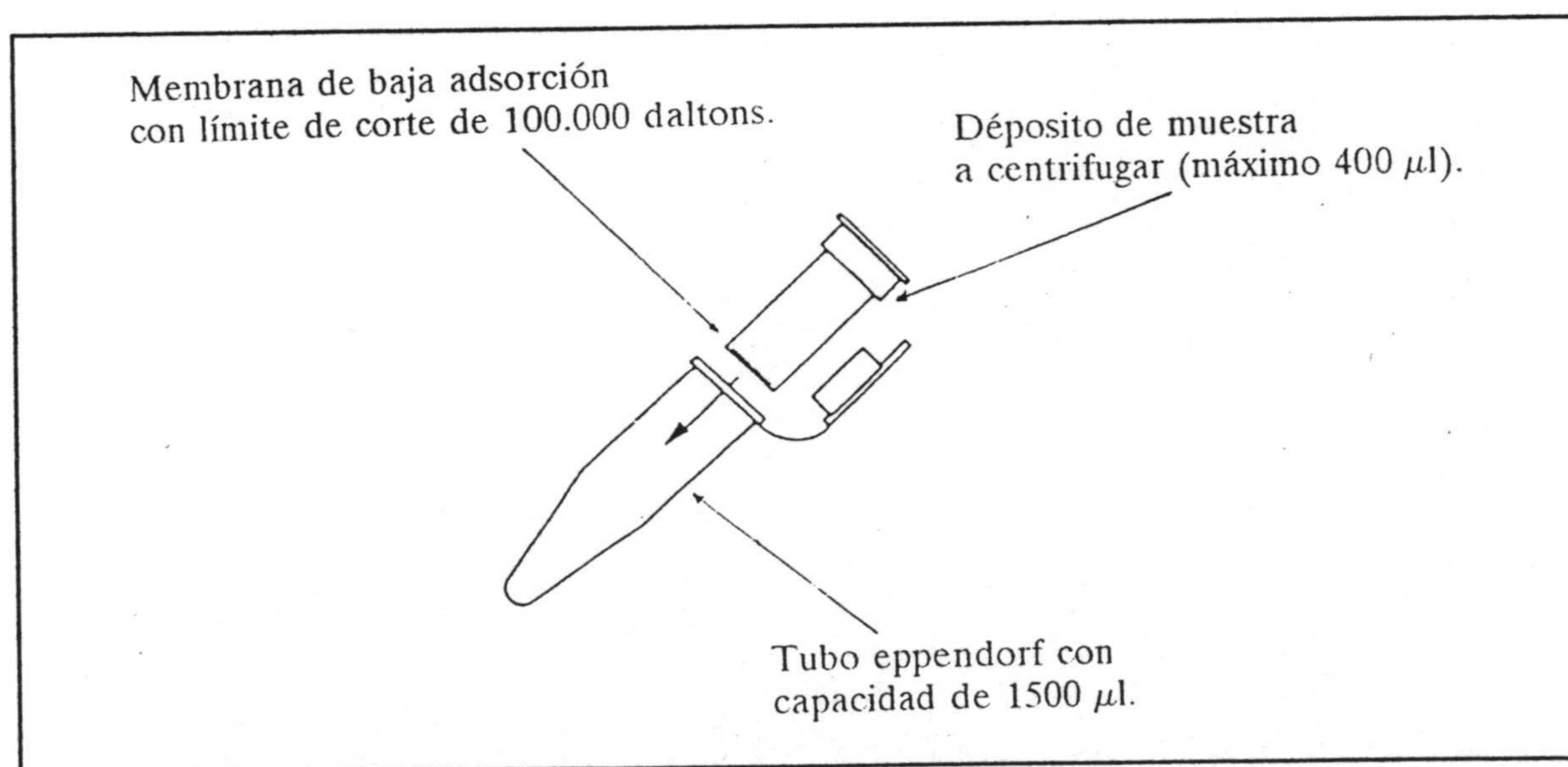


Figura 3-14

Unidades de filtración Ultrafree Mc con límite de corte de 100.000 daltons.

3.7.-INCORPORACIÓN DE BILIPROTEÍNAS A CÉLULAS SANGUÍNEAS.

3.7.1.-Obtención de linfocitos y hematies.

En este apartado se describe el procedimiento necesario para la incorporación de biliproteínas a células sanguíneas, con el fin de que éstas puedan ser detectadas mediante fluorescencia.

Se han separado linfocitos y hematies procedentes de sangre venosa. La metodología seguida para dicha separación se basa en la realización de un gradiente de sangre total en "ficoll" de la forma en que se muestra en la Figura 3-15. La sangre total de partida se diluye a la mitad con tampón PBS (fosfatos 20 mM pH=7), y directamente en un tubo de centrifuga se mezcla 1/3 de ficoll y 2/3 de sangre total diluida (v/v), añadiendo primero el Ficoll y dejando resbalar lentamente la sangre por las paredes del tubo para así impedir la mezcla. Se centrifuga el conjunto a 2500 rpm durante 20 minutos.

Con una pipeta Pasteur se recogieron los linfocitos, que se encuentran en forma de halo, y se depositaron en un nuevo tubo de centrifuga añadiendo tampón para su lavado. Se agitó y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, decantando el sobrenadante, y reservando el sedimento consistente en un botón de células con las que volvió a repetirse el procedimiento de lavado dos veces. Con los hematies se sigue un procedimiento análogo al seguido con linfocitos, obteniendo de esta forma las dos poblaciones celulares de trabajo.

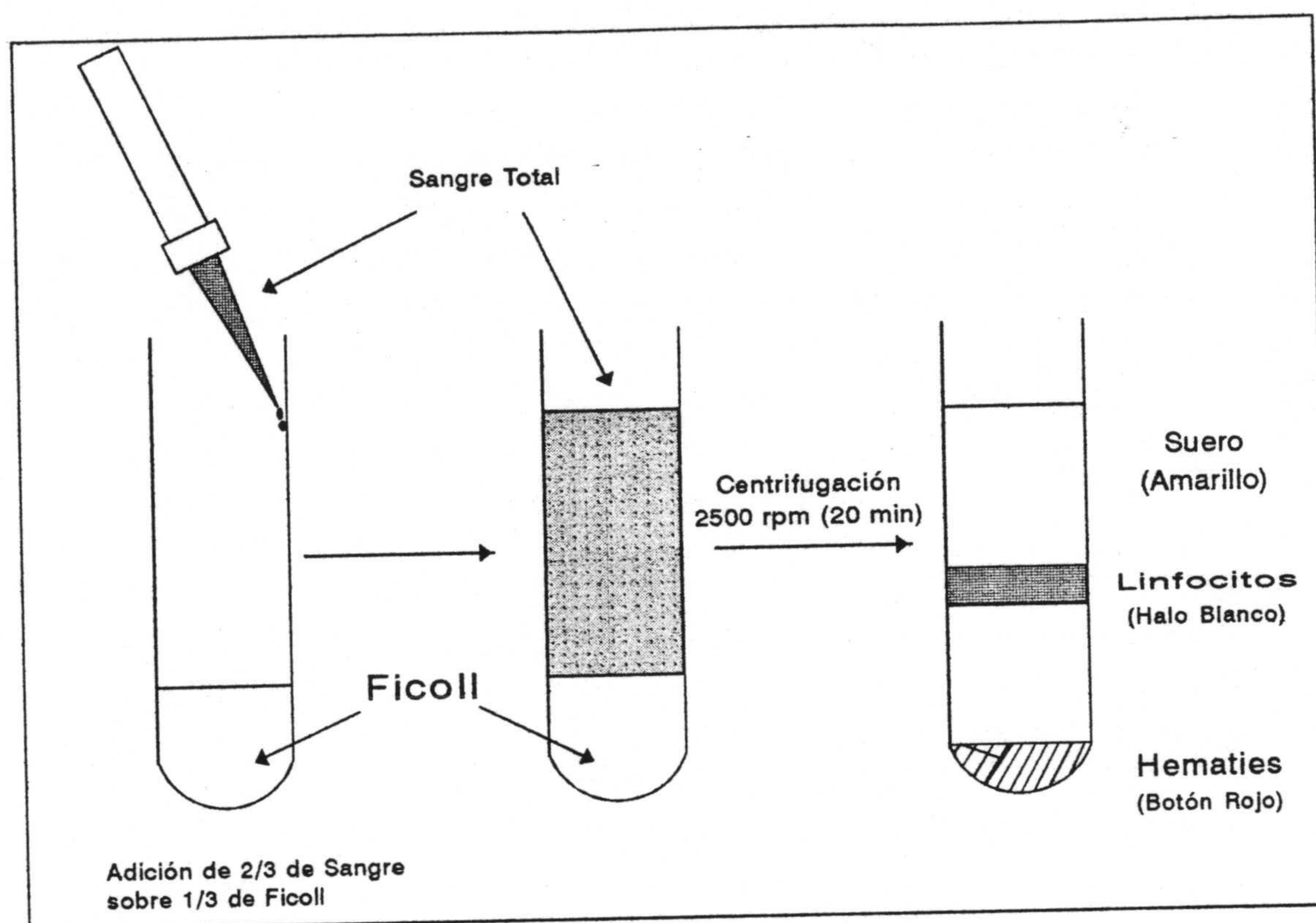


Figura 3-15

Gradiente de sangre total en ficoll para obtención de Linfocitos y Hematias

3.7.2.-Incorporación de biliproteínas al interior celular.

La metodología para la incorporación de biliproteínas al interior celular, se basa en el tratamiento con un agente permeabilizante que, de forma selectiva, perfora algunos puntos de la membrana celular sin destruir la célula, permitiendo la entrada por estos canales de las moléculas de proteína.

Se han ensayado dos tipos de permeabilizantes: Permeafix y Tritón. De forma general, a 200 μ l de suspensión celular se añadió igual volumen de disolución de agente permeabilizante y se dejó actuar durante unos 45 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. El sedimento se resuspendió nuevamente en unos 200 μ l de disolución de biliproteína (1 mg/ml) en tampón fosfatos 20 mM pH=7. Después de 15 minutos se volvió a centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos retirando el sobrenadante. De esta manera las muestras quedan preparadas para su observación en el microscopio de fluorescencia.

**4.-RESULTADOS
y DISCUSIÓN.**

4.1.-PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BILIPROTEÍNAS.

Con la metodología descrita en el apartado 3.2.1, se ha procedido a la obtención de las biliproteínas purificadas hasta homogeneidad.

Referida metodología, ha sido previamente propuesta por nosotros en una Memoria de Licenciatura (Bermejo, 1994) tras una amplia discusión de numerosos resultados experimentales. Como se desprende de la citada discusión, se consigue así, un alto rendimiento de biliproteínas de gran pureza, en sólo dos etapas cromatográficas.

A título de ejemplo, a continuación se muestran los resultados obtenidos en las dos etapas cromatográficas que constituyen el proceso de purificación.

4.1.1.-Cromatografía de exclusión molecular.

Como ya se ha indicado, los mejores resultados, se han obtenido con una columna de Sephadex G-100 de 60×2.5 cm y una velocidad de flujo de 50 ml/h, recogiendo fracciones de 3 ml. Los valores de las absorbancias, a las distintas longitudes de onda de interés, de las primeras fracciones de color azul obtenidas en una experiencia típica en columna de Sephadex G-100, se muestran en la Tabla 4-I.

En la Figura 4-1 se muestran las absorbancias (medidas a las dos longitudes de onda correspondientes a los máximos característicos de ambas biliproteínas) de las fracciones que se indican en la Tabla 4-I. La Figura 4-2 muestra los espectros de absorción normalizados de tres fracciones representativas: a) el espectro correspondiente a una de las fracciones ricas en C-PC (fracción nº3) que presenta un máximo característico a 620 nm y otros dos a 350 y 280 nm común a todas las biliproteínas; b) el espectro correspondiente a una de las fracciones ricas en APC (fracción nº12) que presenta los dos máximos comunes a las biliproteínas (350 y 280 nm) y otro exclusivamente típico de APC a 650 nm y c) el correspondiente a una fracción que contiene una mezcla con aproximadamente igual cantidad de ambas biliproteínas (fracción nº9), que presenta máximos a 280, 350, 620 y un hombro a 650 nm.

TABLA 4-I

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas tras el paso de la muestra por columna de Sephadex G-100 de 60×2.5 cm. Velocidad de flujo=50 ml/h. Volumen por fracción= 3 ml.

| Fracción | A_{277} | A_{620} | A_{650} | A_{620}/A_{277} | A_{620}/A_{650} |
|----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| 1 | 0.036 | 0.041 | 0.012 | 1.139 | 3.260 |
| 2 | 0.107 | 0.425 | 0.081 | 3.966 | 5.245 |
| 3 | 0.347 | 1.560 | 0.303 | 4.500 | 5.143 |
| 4 | 0.642 | 2.387 | 0.568 | 3.718 | 4.203 |
| 5 | 0.478 | 2.204 | 0.472 | 4.608 | 4.672 |
| 6 | 0.243 | 1.080 | 0.217 | 4.447 | 4.983 |
| 7 | 0.210 | 0.807 | 0.193 | 3.836 | 4.184 |
| 8 | 0.155 | 0.574 | 0.215 | 3.709 | 2.669 |
| 9 | 0.140 | 0.460 | 0.305 | 3.288 | 1.511 |
| 10 | 0.084 | 0.258 | 0.283 | 3.073 | 0,910 |
| 11 | 0.111 | 0.312 | 0.420 | 2.817 | 0.741 |
| 12 | 0.092 | 0.240 | 0.344 | 2.612 | 0.697 |
| 13 | 0.080 | 0.172 | 0.238 | 2.144 | 0.722 |
| 14 | 0.083 | 0.107 | 0.146 | 1.293 | 0.733 |

Como se ha mencionado en el apartado 2.4.9, un gran número de autores toman como criterio de pureza de C-PC para una determinada fracción cromatográfica, que la relación A_{620}/A_{280} sea mayor de 3.4 unidades. El criterio de pureza adoptado para APC es que la relación A_{620}/A_{650} sea aproximadamente 0.7 y permanezca constante en una serie de fracciones sucesivas (Bryant y col., 1978; MacColl y col., 1980; Siegelman y Kycia, 1982; Gombos y col., 1984; Hildith y col., 1991). Hay otros criterios de pureza basados en otras relaciones absorciométricas pero son menos utilizados (Zilinskas y col., 1978; Padgett y Krogman, 1987). Como se puede observar el anterior criterio de pureza para C-PC lo cumplen las fracciones 2-8, mientras que las fracciones 11-14 lo cumplen en el caso de APC. El resto de las fracciones (9 y 10) parecen estar constituidas por una mezcla de ambas biliproteínas. Esta discusión es coherente con los espectros de la Figura 4-2.

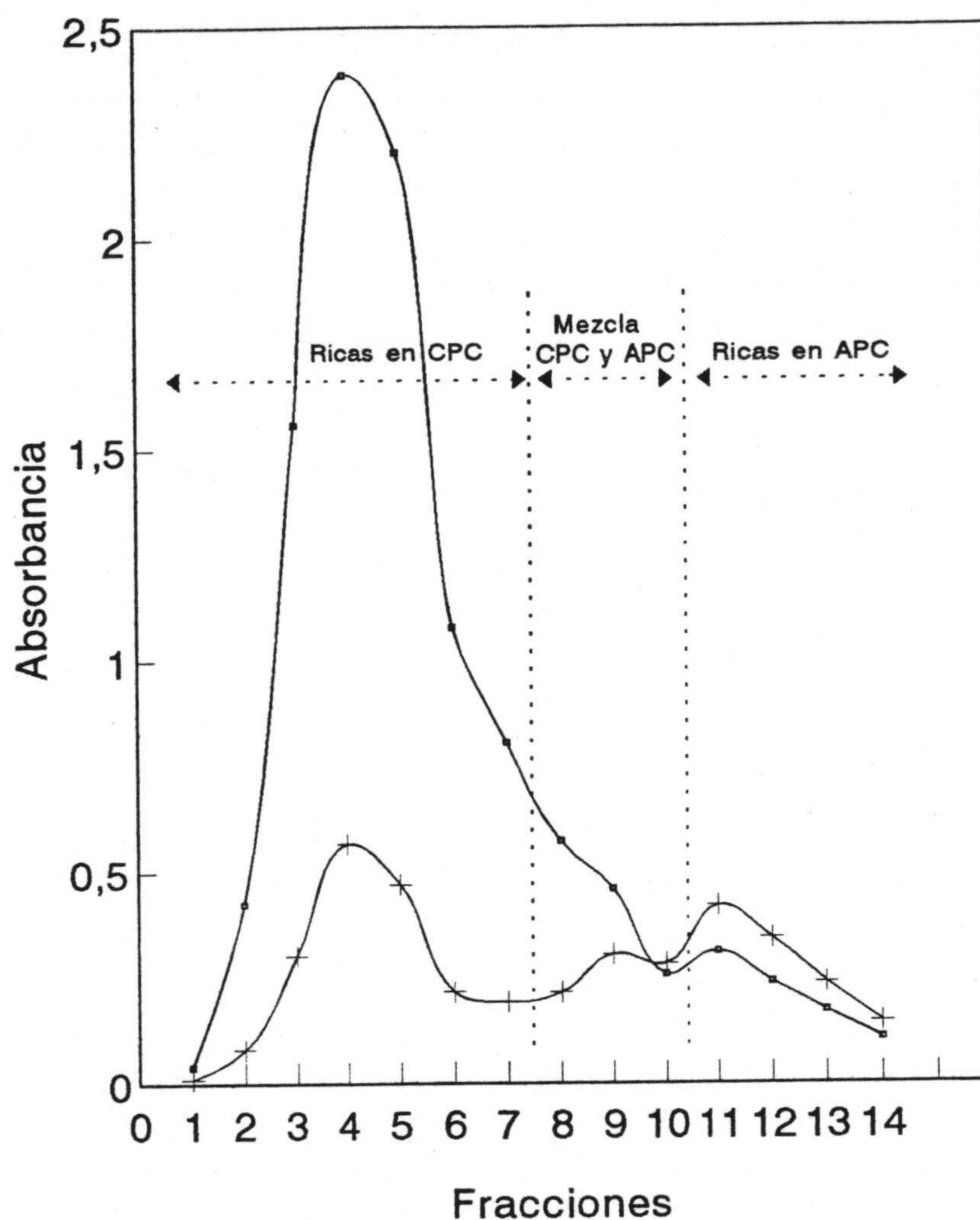


Figura 4-1

Separación de biliproteínas alcanzada por cromatografía de exclusión molecular.

(+) Absorbancia a 650 nm y (-□-) Absorbancia a 620 nm.

Los resultados de esta primera etapa cromatográfica se han completado con la Figura 4-3 que muestra los espectros de absorción de dos fracciones que aparecen a continuación de las de color azulado. El espectro, característico de su color verde-ocre, es debido a la presencia mayoritaria de clorofilas ($\lambda_{\max} = 468 \text{ nm}$) y carotenoides ($\lambda_{\max} = 496 \text{ nm}$) (Ong y Glazer, 1991).

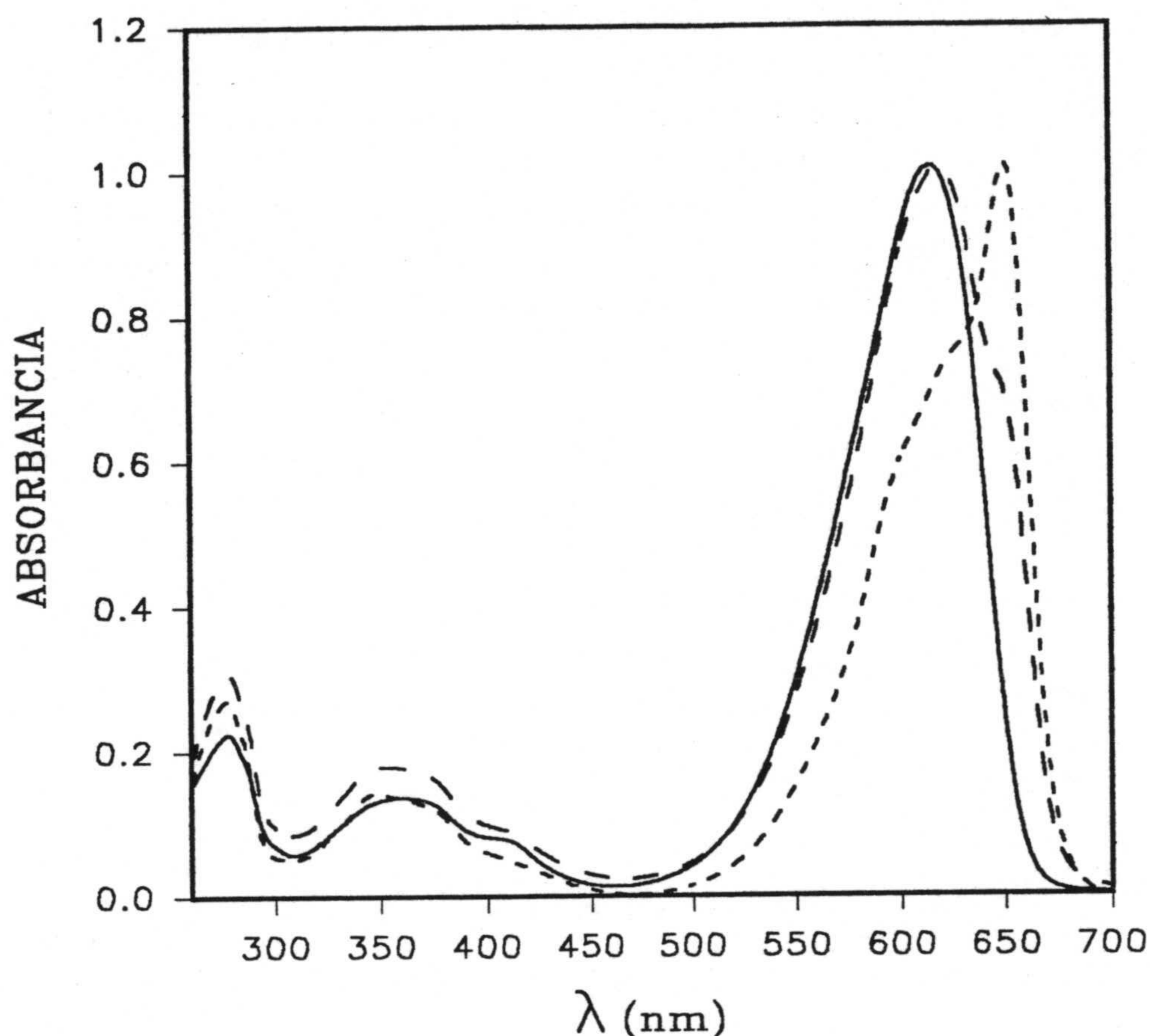
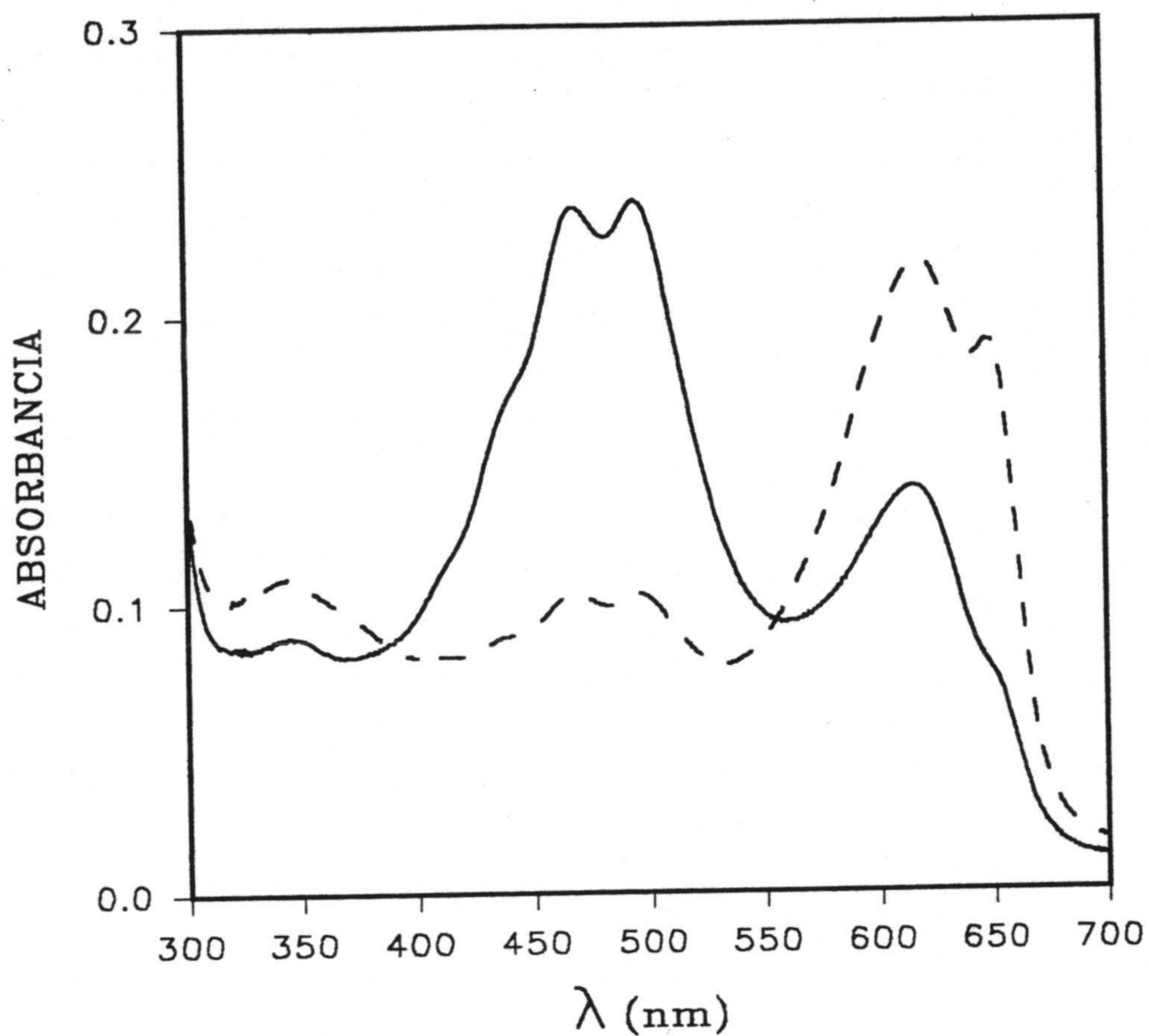


Figura 4-2

Espectros de absorción uv-visible de diversas fracciones de cromatografía de exclusión molecular. Fracción nº 3=rica en C-PC (—); fracción nº9= mezcla de biliproteínas (- - -); fracción nº12=rica en APC (.....).

Sin embargo estos criterios espectrofotométricos han sido ampliamente criticados (MacColl y col, 1980; Gombos y col., 1984; Hilditch y col., 1991). Por este motivo, se ha procedido al análisis por SDS-PAGE. En la Figura 4-4 se muestran los resultados obtenidos, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.6., con las 14 fracciones reseñadas en la Tabla 4-I. Se puede observar que, si bien no se ha conseguido una purificación hasta homogeneidad, las fracciones que van desde la 2 a la 8 contienen mayoritariamente C-PC (calles 1-7), mientras que las cuatro últimas (calles 11-14) están enriquecidas en APC. En las fracciones intermedias (calles 9 y 10), se observa la mezcla de ambas biliproteínas. La asignación de las bandas electroforéticas se ha realizado en concordancia con el peso molecular obtenido (ver apartado 4.1.3) y con los resultados reportados por otros autores (Wolfgang y Werner, 1988; Algarra y col., 1990; Hilditch y col., 1991).

**Figura 4-3**

Espectros de absorción uv-visible de fracciones con predominancia de clorofilas y carotenoides, procedentes de cromatografía de exclusión molecular. (—) Espectro de una fracción con abundancia de clorofilas ($\lambda_{\text{max}}=450$ nm) y carotenos ($\lambda_{\text{max}}=500$ nm); (- - -) Espectro de otra fracción de abundancia menor.

4.1.2.-Cromatografía de intercambio iónico.

Los resultados anteriores son indicativos de que la purificación de biliproteínas de *Spirulina platensis* no se alcanza mediante un único proceso de cromatografía de exclusión en gel, por lo que se ha tenido que recurrir a un segundo proceso cromatográfico, en este caso de intercambio iónico, para la purificación de las mismas.

Cuando dos proteínas son tan parecidas como C-PC y APC, la cromatografía por cambio iónico es una buena alternativa para su separación, ya que por muy similares que éstas sean, su diferente secuencia de aminoácidos, su desigual distribución de grupos cargados y otras mínimas diferencias, usualmente son suficientes para que la matriz cromatográfica de intercambio iónico manifieste una afinidad distinta, aunque mínima, por las dos biliproteínas.

En la Tabla 4-II se indican los parámetros absorciométricos de las fracciones obtenidas por cromatografía de cambio iónico, realizada según la metodología descrita en el apartado 3.2.1.3, con muestras enriquecidas en C-PC procedentes de la etapa de exclusión molecular. En la Tabla 4-III se exponen los resultados correspondientes a la separación análoga efectuada para APC.

Como era de esperar, todas las fracciones en ambas tablas, cumplen con los criterios absorciométricos de pureza.

La fotografía correspondiente al gel de electroforesis (SDS-PAGE) de algunas de las fracciones obtenidas en las dos experiencias anteriores se muestra en la Figura 4-5.

Como se puede observar, todas las fracciones correspondientes a la Tabla 4-II, muestran las dos bandas pertenecientes a las dos subunidades (α y β) de C-PC, sin que aparezca ninguna otra banda proteica contaminante. Asimismo, las fracciones indicadas en la Tabla 4-III presentan exclusivamente las correspondientes a las subunidades de APC.

TABLA 4-II

Cromatografía en columna de DEAE-celulosa DE-52. Tamaño del lecho 15×2.5 cm. Tampón fosfato 0.29 M pH 7. Velocidad de flujo= 80 ml/h. Muestra procedente de Sephadex G-100 enriquecida en C-PC.

| Fracción | A_{280} | A_{620} | A_{650} | A_{620}/A_{280} |
|----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| 1-13 | - | - | - | - |
| 14 | 0.056 | 0.262 | 0.057 | 4.67 |
| 15 | 0.062 | 0.284 | 0.058 | 4.54 |
| 16 | 0.080 | 0.375 | 0.070 | 4.69 |
| 17 | 0.113 | 0.518 | 0.090 | 4.58 |
| 18 | 0.134 | 0.637 | 0.100 | 4.58 |
| 19 | 0.154 | 0.696 | 0.120 | 4.52 |
| 20 | 0.171 | 0.765 | 0.150 | 4.47 |
| 21 | 0.162 | 0.725 | 0.190 | 4.47 |
| 22 | 0.099 | 0.444 | 0.099 | 4.48 |
| 23 | 0.091 | 0.401 | 0.091 | 4.41 |
| 24 | 0.050 | 0.248 | 0.053 | 4.96 |

TABLA 4-III

Cromatografía en columna de DEAE-celulosa DE-52. Tamaño del lecho 15 × 2.5 cm. Velocidad de flujo= 80 ml/h. Tampón fosfato 0.4 M pH 7. Muestra procedente de cromatografía en Sephadex G-100 enriquecida en APC.

| Fracción | A_{280} | A_{620} | A_{650} | A_{620}/A_{650} | A_{650}/A_{280} |
|----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| 1 | 0.185 | 0.682 | 0.880 | 0.77 | 4.76 |
| 2 | 0.650 | 2.180 | 2.770 | 0.78 | 4.26 |
| 3 | 0.193 | 0.736 | 1.040 | 0.71 | 5.38 |
| 4 | 0.100 | 0.425 | 0.564 | 0.75 | 5.64 |
| 5 | 0.004 | 0.245 | 0.304 | 0.77 | 7.60 |

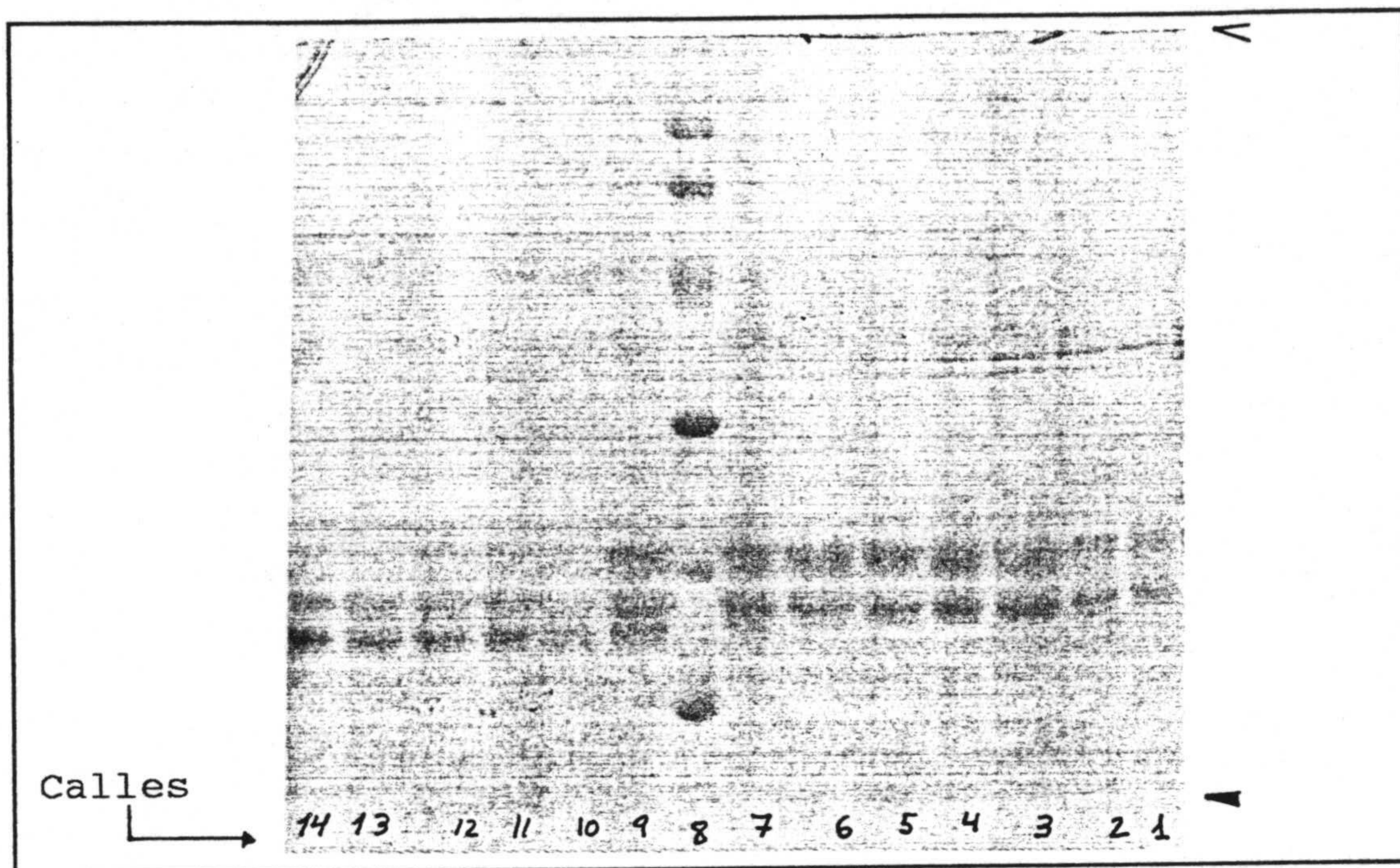


Figura 4-4

Electroforesis (SDS-PAGE), de las fracciones correspondientes a la Tabla 4-I. Calle 8 patrón de pesos moleculares. Se utilizó un 12.5% de entrecruzamiento.

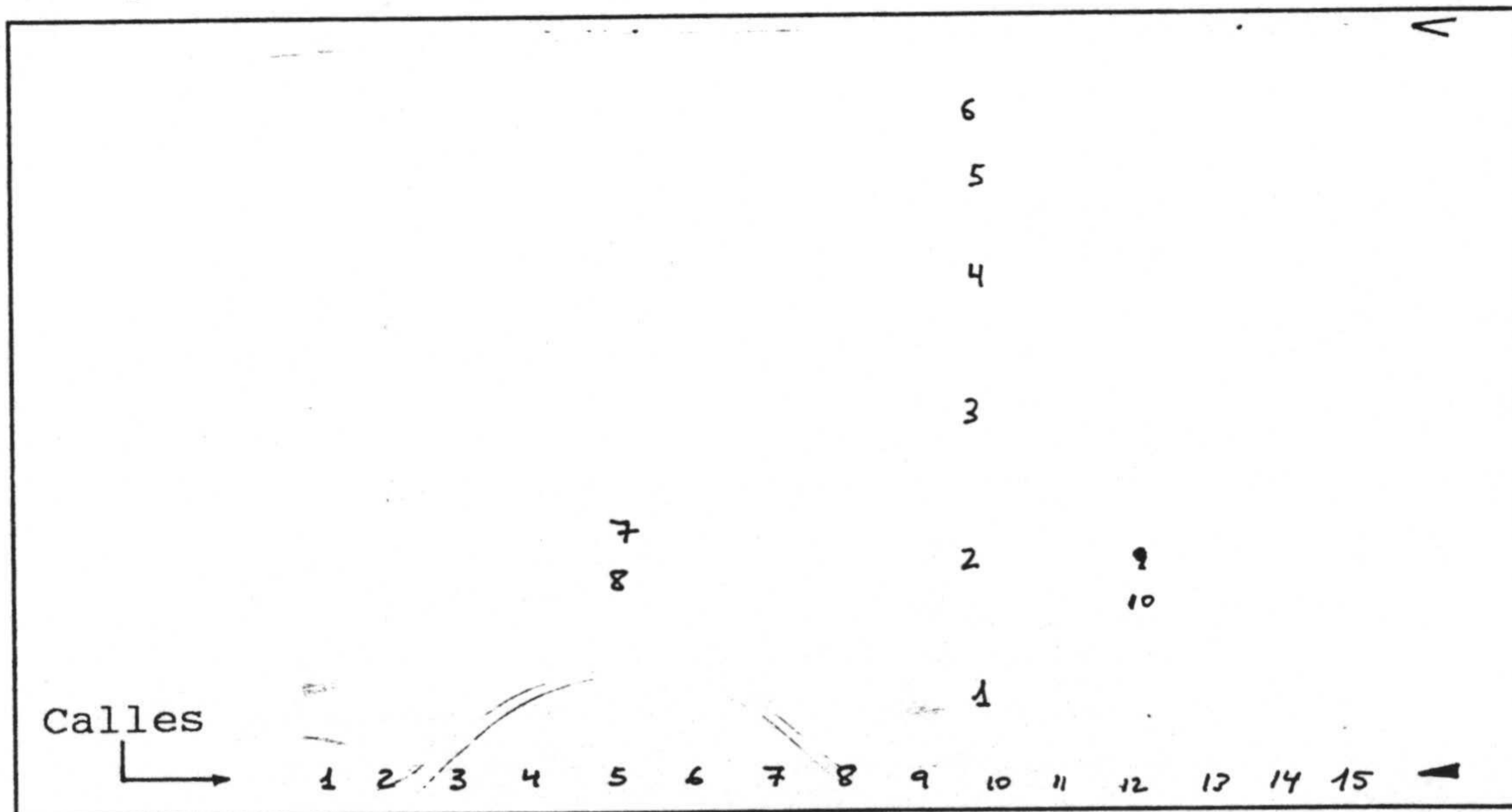


Figura 4-5

Electroforesis de algunas fracciones correspondientes a las Tablas 4-II y 4-III. Calles 1 y 9 patrón de pesos moleculares. Calles 2-8, fracciones 14-20 de la Tabla 4-II. Calles 10-15 fracciones 1-5 de la Tabla 4-III.

En las Figuras 4-6 y 4-7 se muestran los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de una de las fracciones que caracterizan a cada Tabla. El perfil espectral y la posición de los máximos conduce a resultados concordantes con los publicados por otros autores para biliproteínas (Gombos y col., 1984; Algarra y col., 1990; Glazer, 1990; Hildith y col., 1991).

Como más tarde se discutirá en el apartado 4.5., los espectros de ambas biliproteínas corresponden a los que presentan las disoluciones triméricas de las mismas, que es la forma estable de estas proteínas en las condiciones de purificación empleadas. Por este motivo y porque el rendimiento cuántico de fluorescencia es superior en el estado trimérico de agregación (como se desprende de la discusión efectuada en el apartado 4.5. al elaborar las Figuras 4-50 y 4-53), mientras no sea necesaria la disgregación en monómeros (lo que se matizará convenientemente), todos los demás estudios realizados en esta Memoria se han llevado a cabo con disoluciones de trímeros.

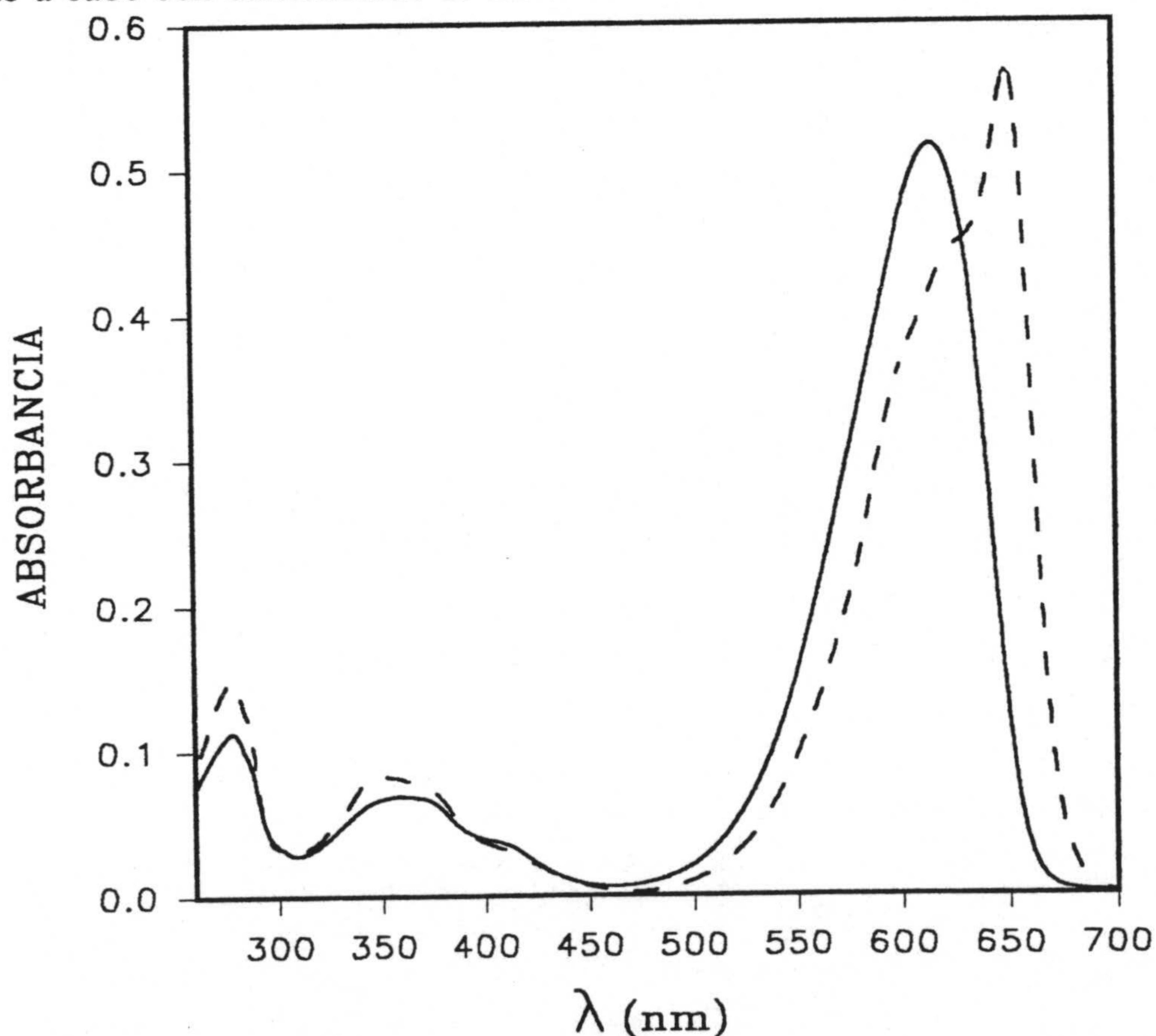
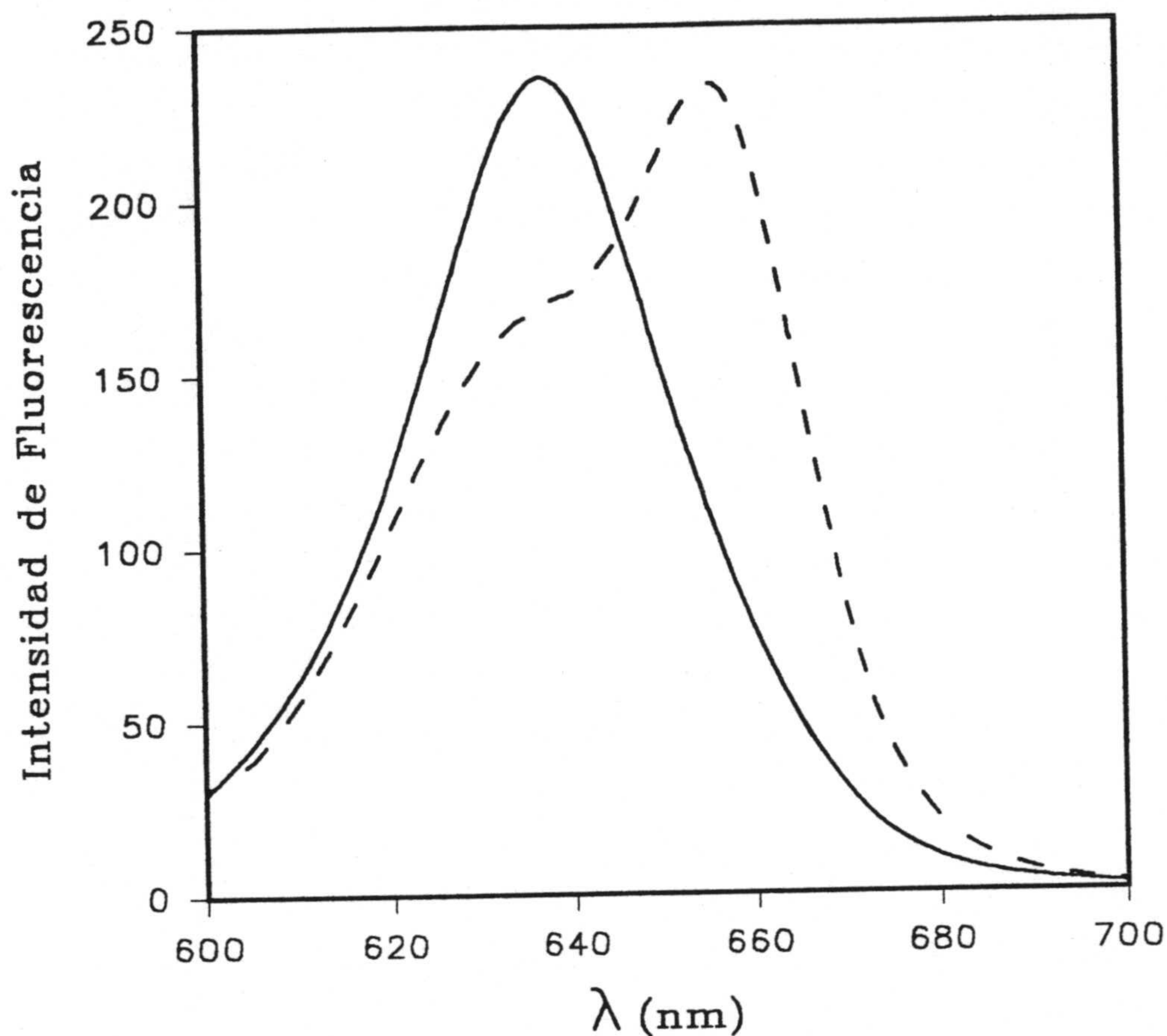


Figura 4-6

Espectros de absorción uv-visible de C-PC y APC purificadas: a) C-ficocianina. Fracción 17^a de la Tabla 4-II (—) ; b) aloficocianina. Fracción 4^a de la Tabla 4-III (- - -).

**Figura 4-7**

Espectros de emisión de C-PC y APC purificadas ($\lambda_{\text{ex}} = 568 \text{ nm}$): a) C-PC $\lambda_{\text{max}} = 638 \text{ nm}$ (—); b) APC $\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$ (- - - -).

Se debe resaltar que esta metodología se ha utilizado en la obtención de las biliproteínas necesarias para realizar la totalidad de esta Memoria. Los resultados obtenidos en las diferentes extracciones y purificaciones realizadas, han sido similares a los descritos en estos epígrafes 4.1.1 y 4.1.2.

4.1.3.-Determinación de pesos moleculares.

La determinación de los pesos moleculares de C-PC y APC de *Spirulina platensis* se ha realizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.6.6. Así, en las calles 1 y 9 del gel se depositaron muestras de patrones de pesos moleculares (Pharmacia, 14400-94000 da) constituidos por mezcla de las siguientes macromoléculas: α -lactoalbúmina (14400 da), tripsina (20100 da), anhidrasa carbónica (30000 da), ovoalbúmina (43000 da), albúmina (67000 da) y fosforilasa (94000 da).

Asimismo, en las calles 2 a 8 se depositó una disolución de C-PC procedente de intercambio iónico y en las calles 10 a 15 una disolución de APC, también procedente de la cromatografía de intercambio iónico.

Los resultados obtenidos se han mostrado previamente en la Figura 4-5. Los valores de R_f para cada banda proteica se detallan en la Tabla 4-IV. Como ya se ha discutido, las calles en donde se depositaron las biliproteínas presentan dos bandas bien resueltas que pertenecen, cada una, a la correspondiente subunidad α ó β en que se desdobla cada proteína en condiciones desnaturalizantes.

TABLA 4-IV

Valores de R_f para cada una de las bandas proteicas de los patrones de peso molecular y las subunidades α y β de C-PC y APC, obtenidas por SDS-PAGE electroforesis

| Número de banda | Descripción. | Peso Molecular | R_f |
|-----------------|---------------------------|----------------|-------|
| 1 | Patrón 1 | 14400 | 0.919 |
| 2 | Patrón 2 | 20100 | 0.726 |
| 3 | Patrón 3 | 30000 | 0.527 |
| 4 | Patrón 4 | 43000 | 0.323 |
| 5 | Patrón 5 | 67000 | 0.199 |
| 6 | Patrón 6 | 94000 | 0.118 |
| 7 | Subunidad α de CPC | 21500 | 0.699 |
| 8 | Subunidad β de CPC | 19000 | 0.763 |
| 9 | Subunidad α de APC | 19600 | 0.747 |
| 10 | Subunidad β de APC | 17700 | 0.806 |

Con los valores de R_f correspondientes a los patrones de peso molecular se ha construido una curva de calibrado (Figura 4-8) y por interpolación en la misma se han obtenido los valores de peso molecular para las subunidades α y β , que se indican en la Tabla anterior. De esta forma se puede calcular para el monómero de C-PC un peso molecular de 40500 da, que es suma de sus subunidades α (21500 da) y β (19000 da). El de APC es 37300 da, suma de sus subunidades α (19600 da) y β (17700 da). Estos resultados son del mismo orden de magnitud que los obtenidos por diversos autores con biliproteínas procedentes de otras microalgas (Tabla 2-XII).

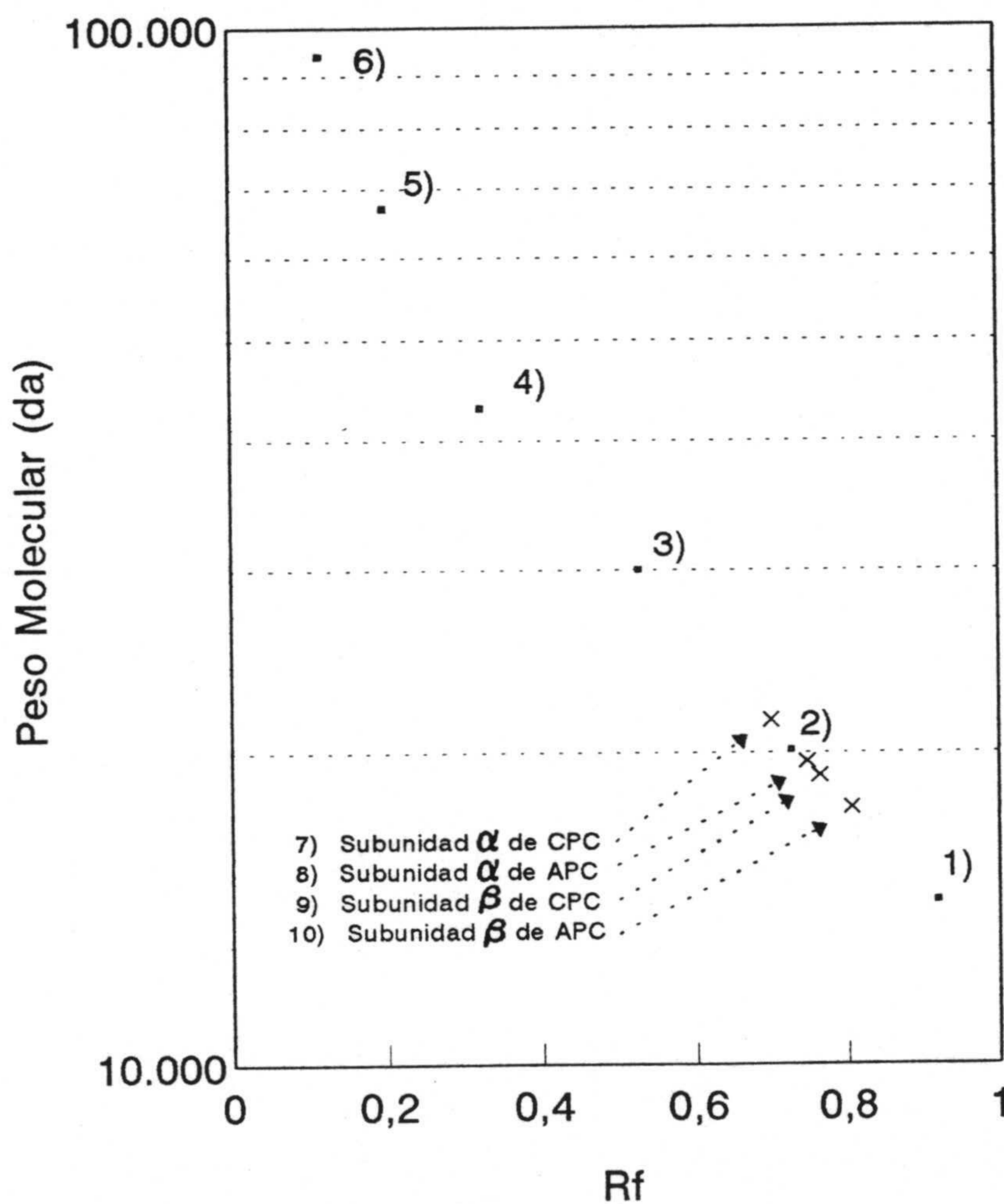


Figura 4-8

Curva de calibrado para el cálculo de pesos moleculares de C-PC y APC, mediante SDS-PAGE. Los patrones de peso molecular son: 1) α -lactoalbúmina, 2) tripsina, 3) anhidrasa carbónica, 4) ovoalbúmina, 5) albúmina y 6) fosforilasa.

Los valores de peso molecular obtenidos en estas experiencias, han sido utilizados en el resto de nuestras investigaciones. Así, el peso molecular de ambos monómeros se ha utilizado, por ejemplo, para obtener los coeficientes de extinción molar de las biliproteínas, aunque las disoluciones empleadas en la Ley de Beer correspondan al estado trimérico de agregación.

4.1.4.-Determinación de parámetros espectroscópicos.

Se han determinado los intervalos de concentraciones de biliproteínas óptimos para realizar los estudios cuantitativos mediante espectroscopías de absorción y de emisión de fluorescencia, es decir aquellos intervalos de concentraciones en los que existe una buena linealidad entre las señales de absorción y fluorescencia frente a las concentraciones de proteínas empleadas.

Mediante las diluciones oportunas se prepararon disoluciones de biliproteínas a partir de una disolución madre en tampón de fosfatos 20 mM y pH=7. En el caso de C-PC para las experiencias de absorción, se emplearon disoluciones en el intervalo de concentraciones comprendido entre $7.16 \cdot 10^{-7}$ - $3.70 \cdot 10^{-5}$ M, mientras que para las experiencias de emisión de fluorescencia el intervalo fue de $2.40 \cdot 10^{-7}$ - $0.50 \cdot 10^{-5}$ M. En lo que se refiere a APC, las concentraciones estudiadas están comprendidas entre $7.70 \cdot 10^{-7}$ y $6.03 \cdot 10^{-5}$ M para absorción y $7.70 \cdot 10^{-7}$ a $1.34 \cdot 10^{-5}$ M, para fluorescencia.

4.1.4.1.-Coeficientes de extinción molar.

En la Tabla 4-V se indican los valores de la absorbancia (medida en cubeta de 1 cm de paso de luz) en el máximo de absorción (620 nm) y de las concentraciones de las disoluciones de C-PC utilizadas.

TABLA 4-V

Valores de absorbancia a 620 nm, correspondientes a distintas concentraciones de C-ficocianina.

| Disolución | [CPC] (mg/ml) | [CPC] M · 10 ⁵ * | Absorbancia (620 nm) |
|------------|---------------|-----------------------------|----------------------|
| 1 | 0.0290 | 0.0716 | 0.130 |
| 2 | 0.0450 | 0.1110 | 0.198 |
| 3 | 0.0590 | 0.1450 | 0.256 |
| 4 | 0.0740 | 0.1830 | 0.310 |
| 5 | 0.0989 | 0.2440 | 0.440 |
| 6 | 0.1110 | 0.2740 | 0.489 |
| 7 | 0.1270 | 0.3136 | 0.565 |
| 8 | 0.1480 | 0.3650 | 0.655 |
| 9 | 0.1700 | 0.4200 | 0.740 |
| 10 | 0.1840 | 0.4540 | 0.809 |
| 11 | 0.2200 | 0.5430 | 0.955 |
| 12 | 0.2430 | 0.6000 | 1.071 |
| 13 | 0.2730 | 0.6740 | 1.200 |
| 14 | 0.3100 | 0.7650 | 1.350 |
| 15 | 0.3600 | 0.8880 | 1.500 |
| 16 | 0.4290 | 1.0600 | 1.750 |
| 17 | 0.5000 | 1.2340 | 1.990 |
| 18 | 0.5630 | 1.3900 | 2.250 |
| 19 | 0.6920 | 1.7100 | 2.700 |
| 20 | 0.8180 | 2.0200 | 2.956 |
| 21 | 0.8180 | 2.4700 | 3.250 |
| 22 | 1.5000 | 3.7040 | 3.750 |

(*) utilizando el peso molecular obtenido por SDS-PAGE para el monómero.

En la Figura 4-9 se muestra la representación de la absorbancia a 620 nm frente a la concentración de C-PC. De ella puede deducirse que existe una buena linealidad hasta una concentración de $0.7 \cdot 10^{-5}$ M (0.273 mg/ml) aproximadamente, que corresponde a una absorbancia alrededor de 1.2 unidades. Mediante regresión de la zona lineal de datos y la aplicación de la ley de Beer se ha calculado el coeficiente de extinción molar de C-PC. Los parámetros de ajuste son: ordenada en el origen = -0.0039; pendiente = $1.78 \cdot 10^5$ y $r^2 = 1.00$. El coeficiente de extinción molar resulta así, $\epsilon_{620} = 1.78 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

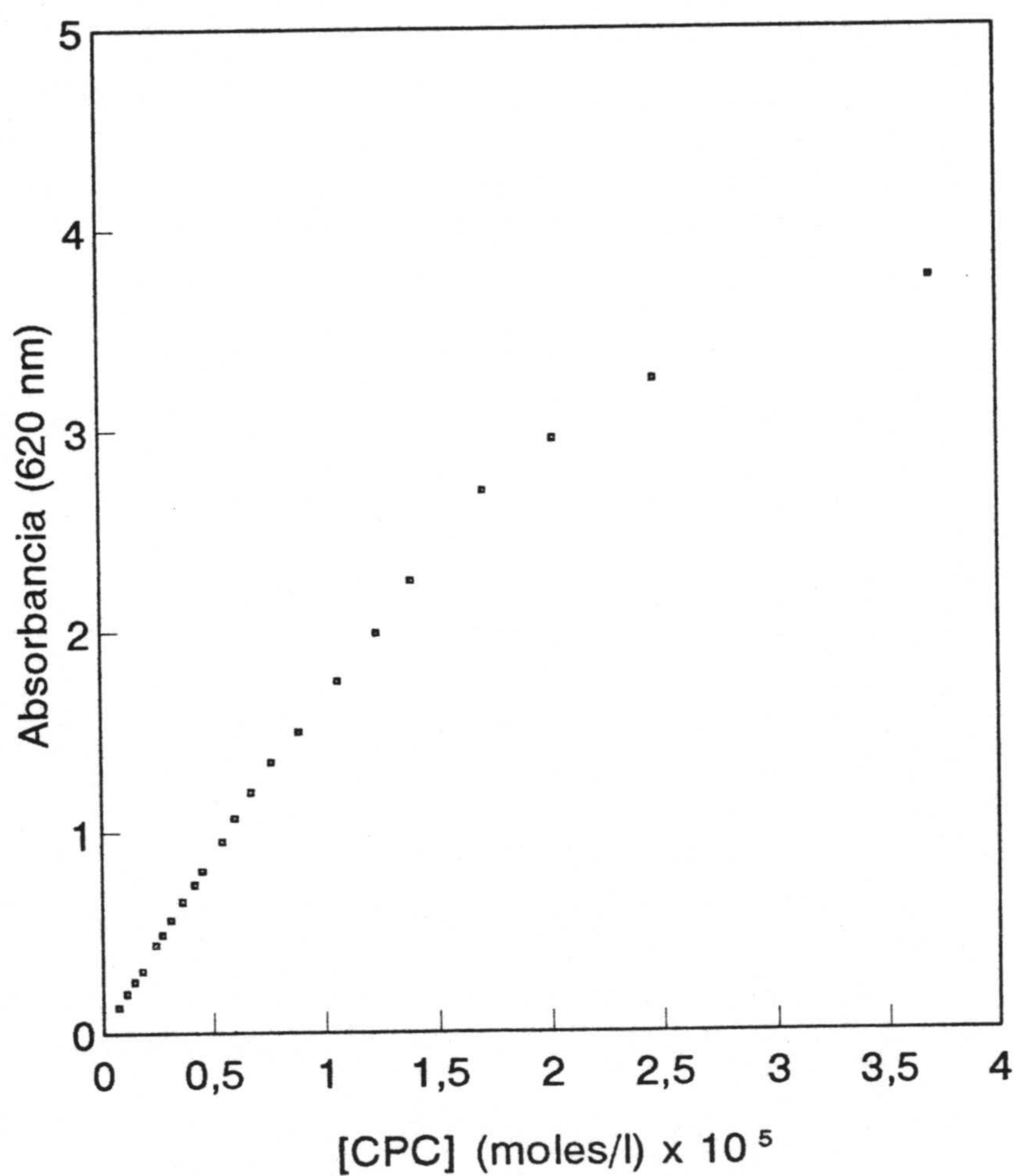


Figura 4-9

Absorbancia a 620 nm en función de la concentración de C-ficocianina.

Las absorbancias en el máximo de absorción para APC (650 nm), medidas en la cubeta de 1 cm de paso de luz, a distintas concentraciones se indican en la Tabla 4-VI.

En la Figura 4-10 se representan los datos de la Tabla 4-VI. Se puede observar una buena linealidad hasta concentraciones próximas a un valor de $1.5 \cdot 10^{-5}$ M (0.563 mg/ml), lo que corresponde a absorbancias próximas a la unidad. El ajuste por regresión lineal de esos valores proporciona los siguientes resultados: ordenada en el origen = -0.0065; pendiente = $0.613 \cdot 10^5$ y $r^2=1.00$, por lo que el coeficiente de extinción molar ϵ_{650} (APC) = $6.13 \cdot 10^4$ M⁻¹ cm⁻¹.

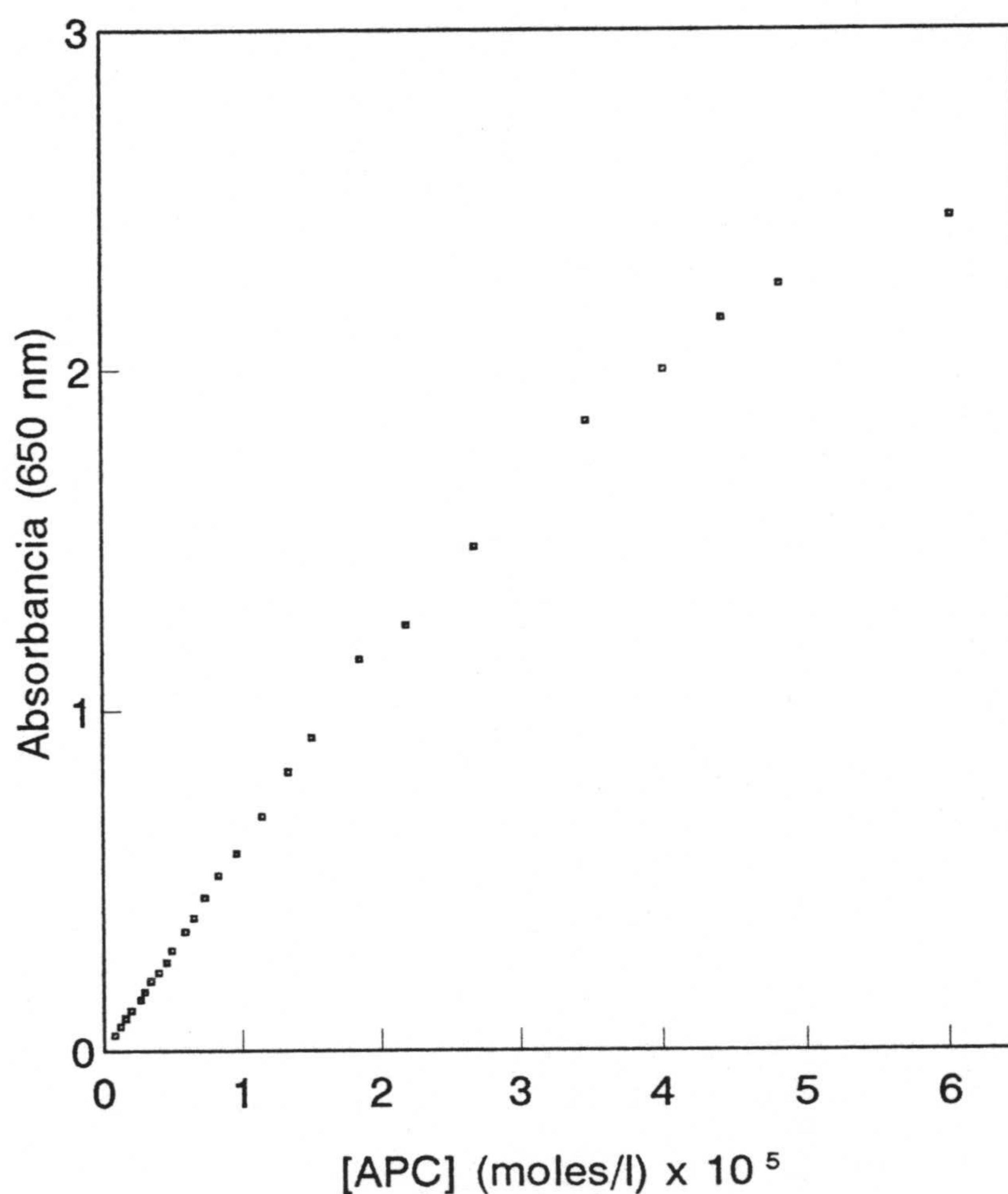


Figura 4-10

Absorbancia a 650 nm en función de la concentración de aloficocianina.

TABLA 4-VI

Valores de absorbancia a 650 nm correspondientes a distintas concentraciones de aloficocianina.

| Disolución | [APC] (mg/ml) | [APC] M · 10 ⁵ | Absorbancia (650 nm) |
|------------|---------------|---------------------------|----------------------|
| 1 | 0.0290 | 0.0777 | 0.046 |
| 2 | 0.0450 | 0.1210 | 0.072 |
| 3 | 0.0590 | 0.1582 | 0.096 |
| 4 | 0.0740 | 0.1984 | 0.119 |
| 5 | 0.0989 | 0.2651 | 0.150 |
| 6 | 0.1110 | 0.2976 | 0.173 |
| 7 | 0.1270 | 0.3405 | 0.205 |
| 8 | 0.1480 | 0.3967 | 0.230 |
| 9 | 0.1700 | 0.4558 | 0.260 |
| 10 | 0.1840 | 0.4933 | 0.295 |
| 11 | 0.2200 | 0.5898 | 0.350 |
| 12 | 0.2430 | 0.6515 | 0.390 |
| 13 | 0.2730 | 0.7319 | 0.449 |
| 14 | 0.3100 | 0.8310 | 0.515 |
| 15 | 0.3600 | 0.9650 | 0.580 |
| 16 | 0.4290 | 1.1501 | 0.689 |
| 17 | 0.5000 | 1.3400 | 0.820 |
| 18 | 0.5630 | 1.5090 | 0.920 |
| 19 | 0.6920 | 1.8550 | 1.150 |
| 20 | 0.8180 | 2.1930 | 1.250 |
| 21 | 0.8180 | 2.6800 | 1.480 |
| 22 | 1.3000 | 3.4800 | 1.850 |
| 23 | 1.5000 | 4.0210 | 2.000 |
| 24 | 1.6500 | 4.4240 | 2.150 |
| 25 | 1.8000 | 4.8260 | 2.250 |
| 26 | 2.2500 | 6.0300 | 2.450 |

4.1.4.2.-Intervalo lineal entre intensidad de fluorescencia y concentración.

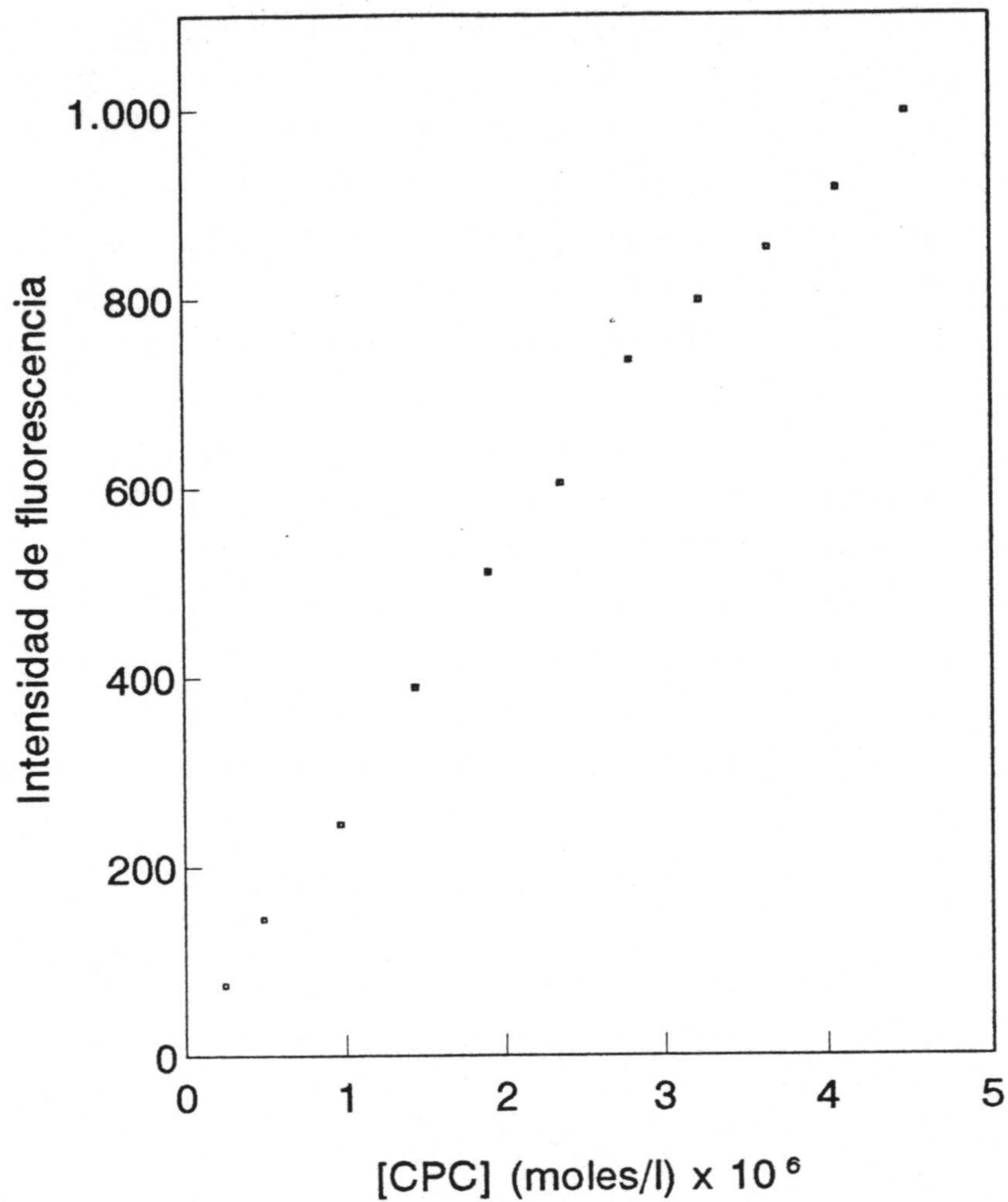
La Tabla 4-VII muestra los valores de intensidad de fluorescencia encontrados en el máximo de emisión (638 nm) en las condiciones indicadas, a distintas concentraciones de C-ficocianina.

TABLA 4-VII

Valores de intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión ($\lambda = 638$ nm) para distintas concentraciones de C-PC. Longitud de onda de excitación (λ_{ex}) igual a 568 nm, $\Delta \lambda_{ex} = 1.5$ nm, $\Delta \lambda_{em} = 3$ nm.

| Disolución | [C-PC] (mg/ml) | [C-PC] M · 10 ⁵ | I _f (638 nm) |
|------------|----------------|----------------------------|-------------------------|
| 1 | 0.0010 | 0.0246 | 75 |
| 2 | 0.0198 | 0.0488 | 145 |
| 3 | 0.0392 | 0.0968 | 245 |
| 4 | 0.0583 | 0.1440 | 389 |
| 5 | 0.0769 | 0.1899 | 511 |
| 6 | 0.0953 | 0.2352 | 605 |
| 7 | 0.1132 | 0.2795 | 735 |
| 8 | 0.1308 | 0.3296 | 798 |
| 9 | 0.1481 | 0.3657 | 853 |
| 10 | 0.1650 | 0.4074 | 916 |
| 11 | 0.1818 | 0.4488 | 997 |

En la Figura 4-11 se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia de C-PC en función de la concentración. En las condiciones experimentales empleadas la concentración máxima de CPC que puede usarse es $0.45 \cdot 10^{-5}$ M (0.18 mg/ml) pues por encima de ella el detector se satura. De otra parte, existe buena linealidad hasta una concentración aproximada de $3 \cdot 10^{-6}$ M, como refleja el ajuste de los datos de la Tabla hasta mencionada concentración: ordenada origen=12.02; pendiente= $257.3 \cdot 10^6$ M⁻¹ cm⁻¹ y $r^2 = 1.00$.

**Figura 4-11**

Intensidad relativa de fluorescencia a 638 nm en función de la [C-PC].

La Tabla 4-VIII muestra los valores de intensidad de fluorescencia encontrados en el máximo de emisión (658 nm) en las condiciones indicadas, frente a las concentraciones de APC utilizadas.

TABLA 4-VIII

Intensidad relativa de fluorescencia en el máximo de emisión (658 nm) correspondiente a diversas concentraciones de APC. Longitud de onda de excitación ($\lambda_{ex}=590$ nm), $\Delta\lambda_{ex}=10$ nm, $\Delta\lambda_{em}=15$ nm.

| Disolución | [APC] (mg/ml) | [APC] M · 10 ⁵ | I _f (658 nm) |
|------------|---------------|---------------------------|-------------------------|
| 1 | 0.029 | 0.0770 | 53 |
| 2 | 0.045 | 0.1218 | 75 |
| 3 | 0.059 | 0.1582 | 113 |
| 4 | 0.074 | 0.2651 | 189 |
| 5 | 0.098 | 0.2977 | 219 |
| 6 | 0.111 | 0.3405 | 233 |
| 7 | 0.127 | 0.3967 | 289 |
| 8 | 0.148 | 0.4557 | 310 |
| 9 | 0.170 | 0.4930 | 346 |
| 10 | 0.184 | 0.5898 | 415 |
| 11 | 0.220 | 0.6515 | 452 |
| 12 | 0.243 | 0.7319 | 505 |
| 13 | 0.273 | 0.8311 | 575 |
| 14 | 0.310 | 0.9652 | 675 |
| 15 | 0.360 | 1.1500 | 798 |
| 16 | 0.429 | 1.3430 | 945 |

La gráfica I_f vs [APC] (Figura 4-12), denota que en las condiciones experimentales empleadas se satura el detector a la concentración $1.343 \cdot 10^{-5}$ M (0.429 mg/ml). Hasta esa concentración existe una buena linealidad como reflejan los parámetros de ajuste de la regresión: ordenada en el origen = -0.007; pendiente = $69.8 \cdot 10^6$ y $r^2=1.00$.

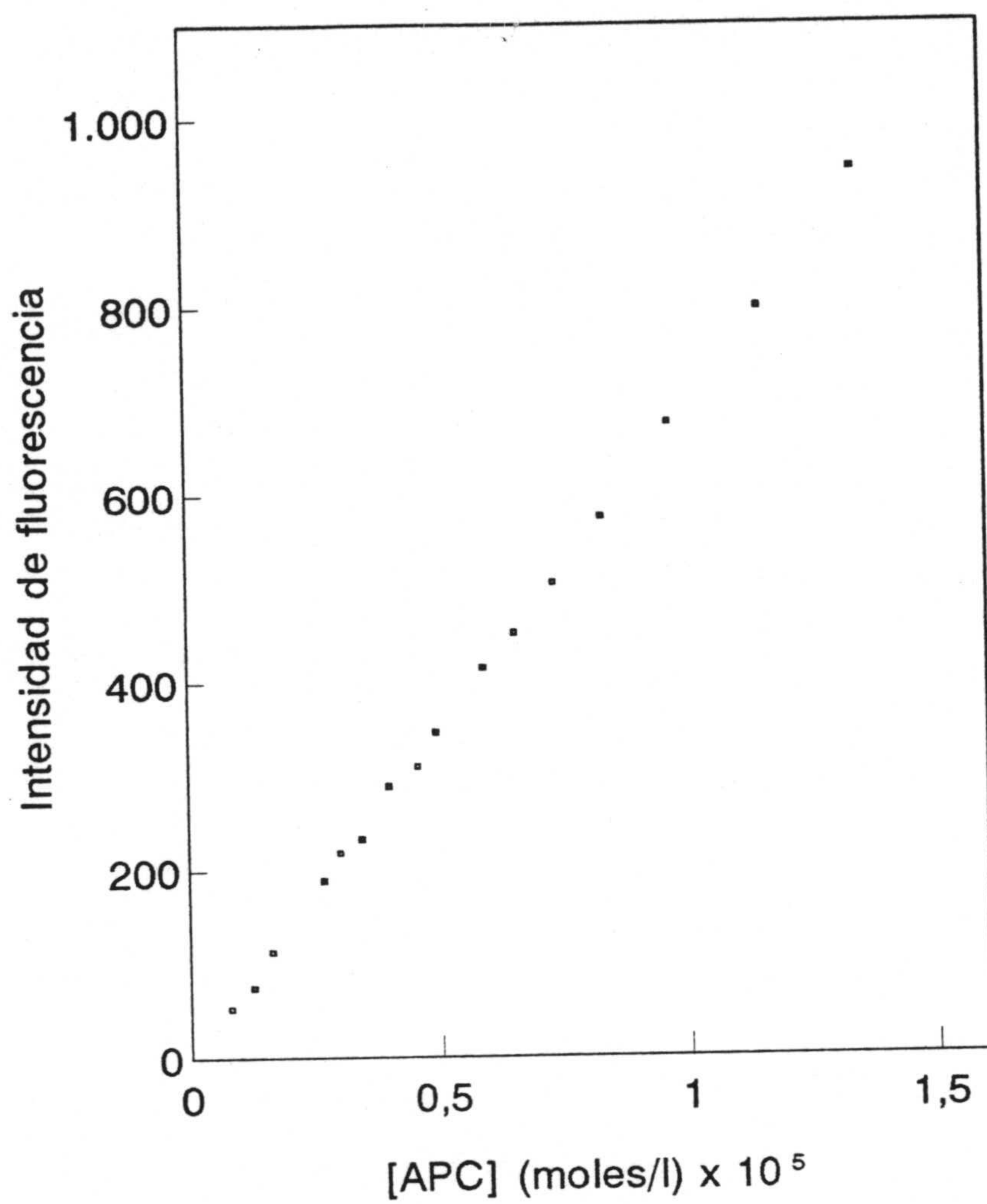


Figura 4-12

Intensidad relativa de fluorescencia a 658 nm en función de la [APC].

4.1.5.-Separación por HPLC de subunidades de biliproteínas

4.1.5.1-Characterización de subunidades de C-PC.

Dado que la fase estacionaria retiene por hidrofobicidad, a medida que la fase móvil tenga menor cantidad de agua, más acentuado será su carácter hidrófobo y menos se retendrán los solutos. Nuestra estrategia a seguir, ha sido por tanto, aumentar de forma progresiva el poder eluyente de la fase móvil incrementando en ella poco a poco el componente apolar y disminuyendo el polar mediante trabajo en gradiente. De esta forma se ha comenzado con una fase móvil pobre en acetonitrilo y rica en agua, es decir con poca capacidad eluyente de forma que se consiga retardar los picos de los solutos menos retenidos. De forma progresiva se ha aumentado el porcentaje de componente apolar en la fase móvil aumentando así el poder eluyente de la misma y por tanto adelantando la salida de los picos de los componentes más retenidos.

En experiencias previas se ha puesto de manifiesto que la metodología empleada por Swanson y Glazer (1990) no es aplicable a la separación de las subunidades de C-PC y APC de *Spirulina platensis*. Así la adición de TFA al 0.1% precipita las proteínas, al tiempo que cambia el color del líquido sobrenadante desde el azul típico hasta un color verdoso. El análisis espectrofotométrico del mencionado sobrenadante indica una profunda alteración de las características absorciométricas de la disolución.

Por este motivo, se ha usado la fase móvil y gradiente (Tabla 4-IX) que preconizan Swanson y Glazer (1990) pero sin añadir TFA. El cromatograma obtenido muestra tres picos, uno de elevada absorción al tiempo muerto (t_M) y otros a t_R 28.6 y 35.7 min como se muestra en la Figura 4-13. El análisis espectral de los mismos sugiere que el primer pico, corresponde a proteína sin desnaturizar, mientras que los otros dos poseen tres máximos de absorción característicos a 277, 350 y 567 nm y se pueden asignar a las subunidades α y β respectivamente de C-PC, como se discute más adelante. Estos resultados muestran que la proteína no se desnaturiza por completo mediante la acción del acetonitrilo presente en la fase móvil.

TABLA 4-IX

Gradiente de fase empleado por Swanson y Glazer (1990) en la separación de subunidades de biliproteínas.

| Tiempo (min) | A (Fosfato %) | B (Acetonitrilo:isopropanol)(2:1)% | Flujo (ml/min) |
|--------------|---------------|------------------------------------|----------------|
| 0 | 65 | 35 | 1 |
| 2 | 65 | 35 | 1 |
| 37 | 30 | 70 | 1 |
| 42 | 0 | 100 | 1 |
| 47 | 65 | 35 | 1 |

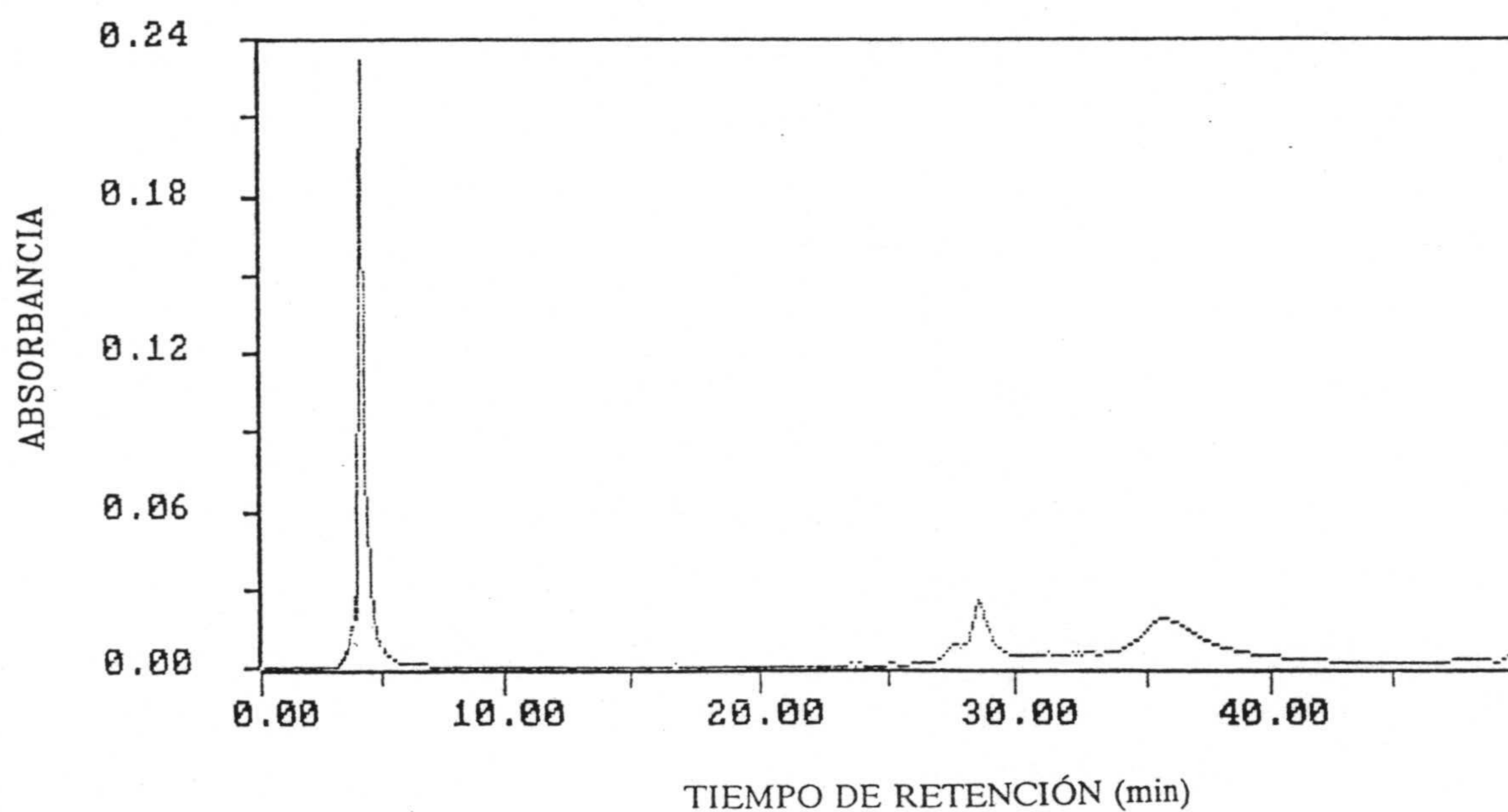


Figura 4-13

Cromatograma obtenido según las condiciones de la Tabla IX. Monitorizado a 350 nm.

Para alcanzar una completa desnaturalización se ha optado por añadir β -mercaptoetanol, hasta una concentración 0.1%, a la disolución de proteína en tampón fosfato 20 mM pH 6.5. Una concentración similar de β -mercaptoetanol se ha añadido a las disoluciones que constituyen la fase móvil.

Con esta metodología se han ensayado cuatro gradientes formados con distintas cantidades de acetonitrilo y tampón fosfato 20 mM pH 6.5, ambos adicionados de β -mercaptoetanol al 0.1%. En la Figura 4-14 se indican los perfiles de los mencionados gradientes.

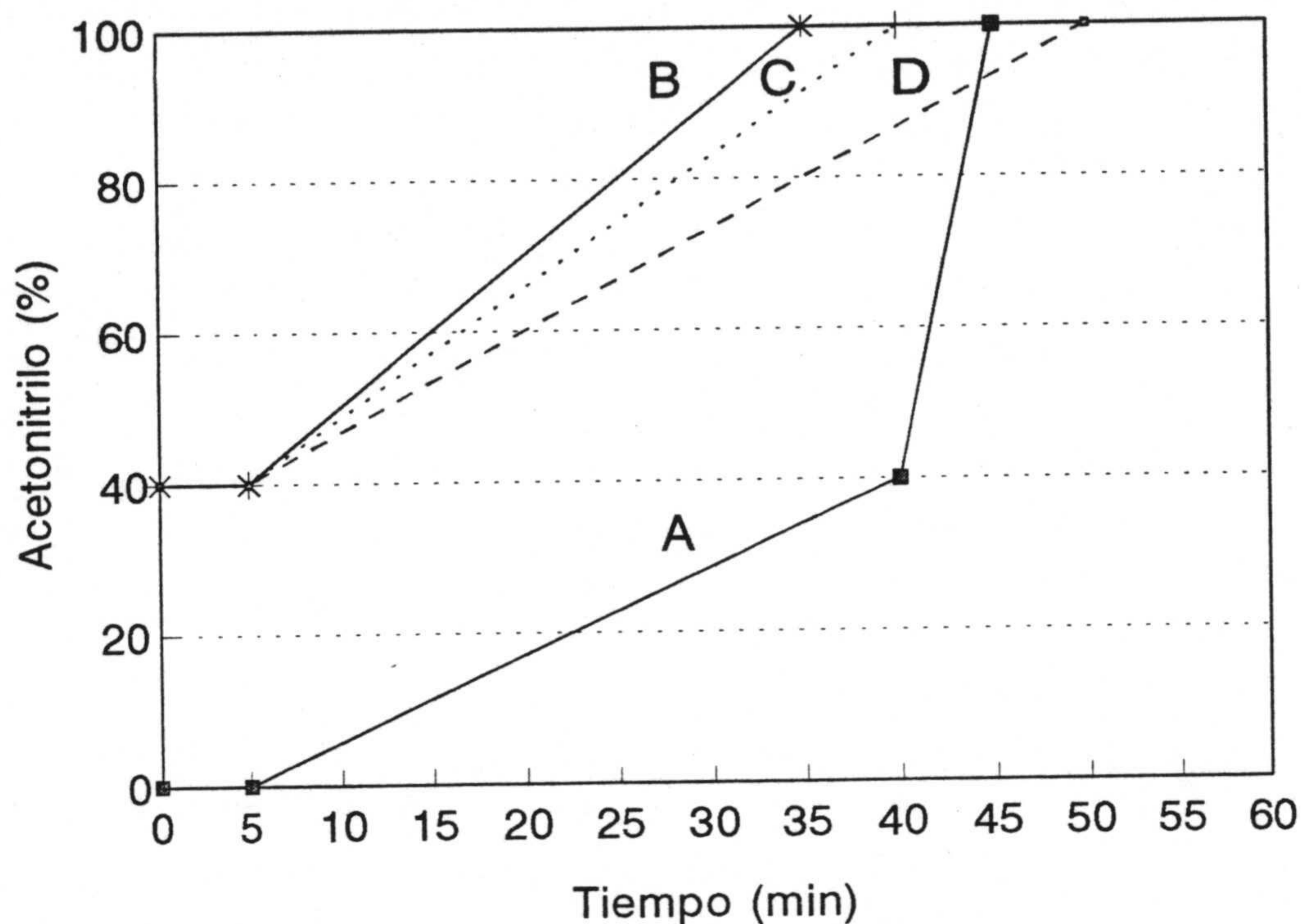
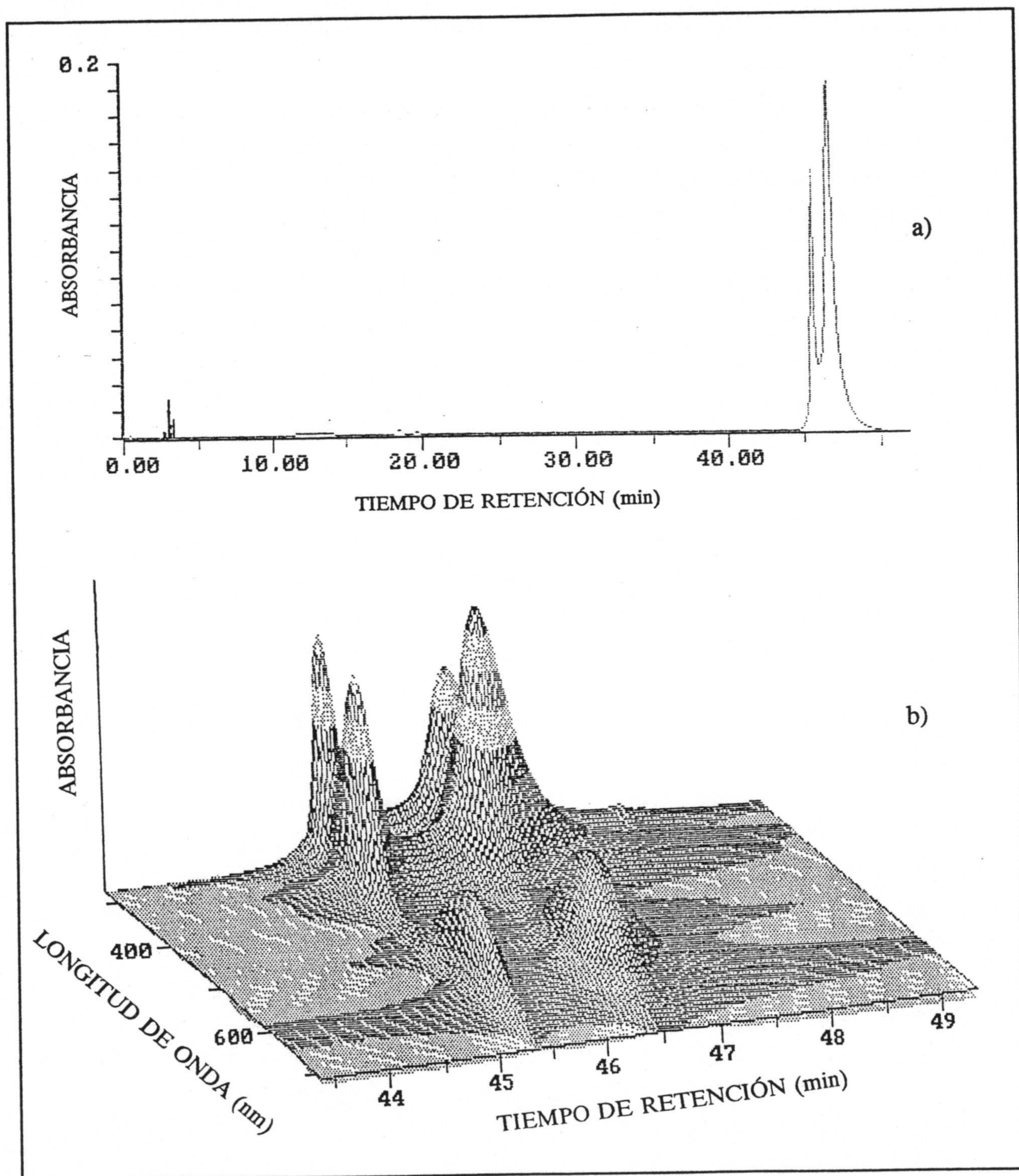


Figura 4-14

Gradientes de fase móvil para separación de subunidades de C-PC de *Spirulina platensis*.

En la Figura 4-15 (a y b) se muestran los cromatogramas bidimensional y tridimensional correspondientes a la experiencia realizada con el gradiente A. El tiempo muerto fue de 3.3 min y la absorbancia muy baja, lo que indica la ausencia de proteína sin desnaturalizar. Se observan dos picos bien resueltos cuyos perfiles espectrales tienen algunas características concordantes con los obtenidos por otros autores y cuya asignación se realizará en un párrafo posterior.

**Figura 4-15**

Separación de subunidades de C-PC bajo las condiciones del gradiente A.
a) Cromatograma bidimensional, b) Cromatograma tridimensional.

El cromatograma anterior presenta tiempos de retención relativamente altos, por lo que se ha intentado disminuir éstos sin perder resolución. A tal fin se realizaron experiencias con gradientes que comienzan con una fase móvil más apolar que en el caso anterior y luego disminuyen su polaridad con diferente pendiente. Los tiempos de retención correspondientes a los dos picos obtenidos en cada cromatograma se indican en la Tabla 4-X en la que se han incluido los resultados obtenidos con el gradiente A de la Figura 4-15 para su comparación. Asimismo, en la Figura 4-16 (a y b) se muestran a título de ejemplo los cromatogramas bi- y tridimensionales para el gradiente C.

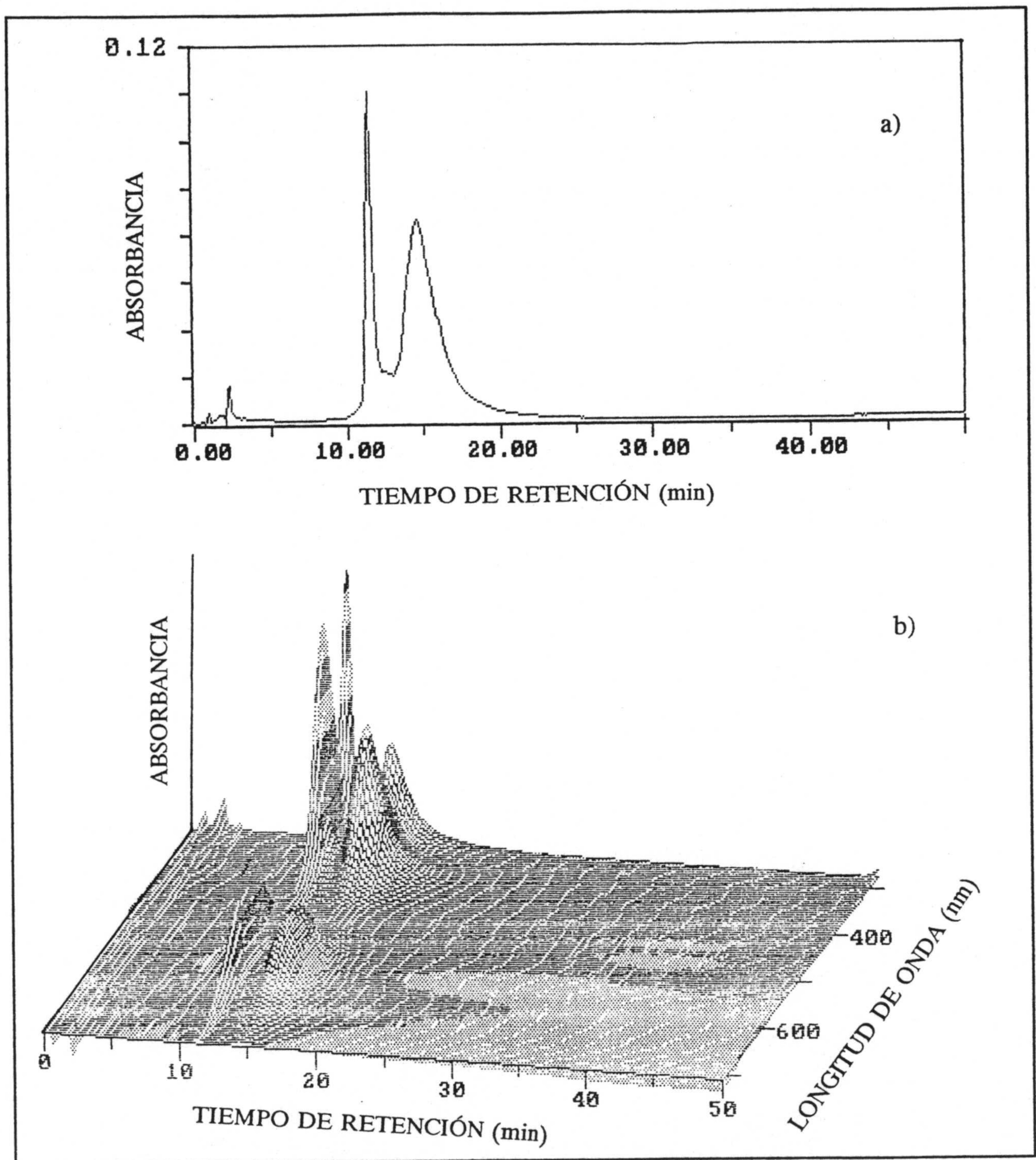
TABLA 4-X

Tiempos de retención de las subunidades α y β para los distintos gradientes de fase móvil utilizados.

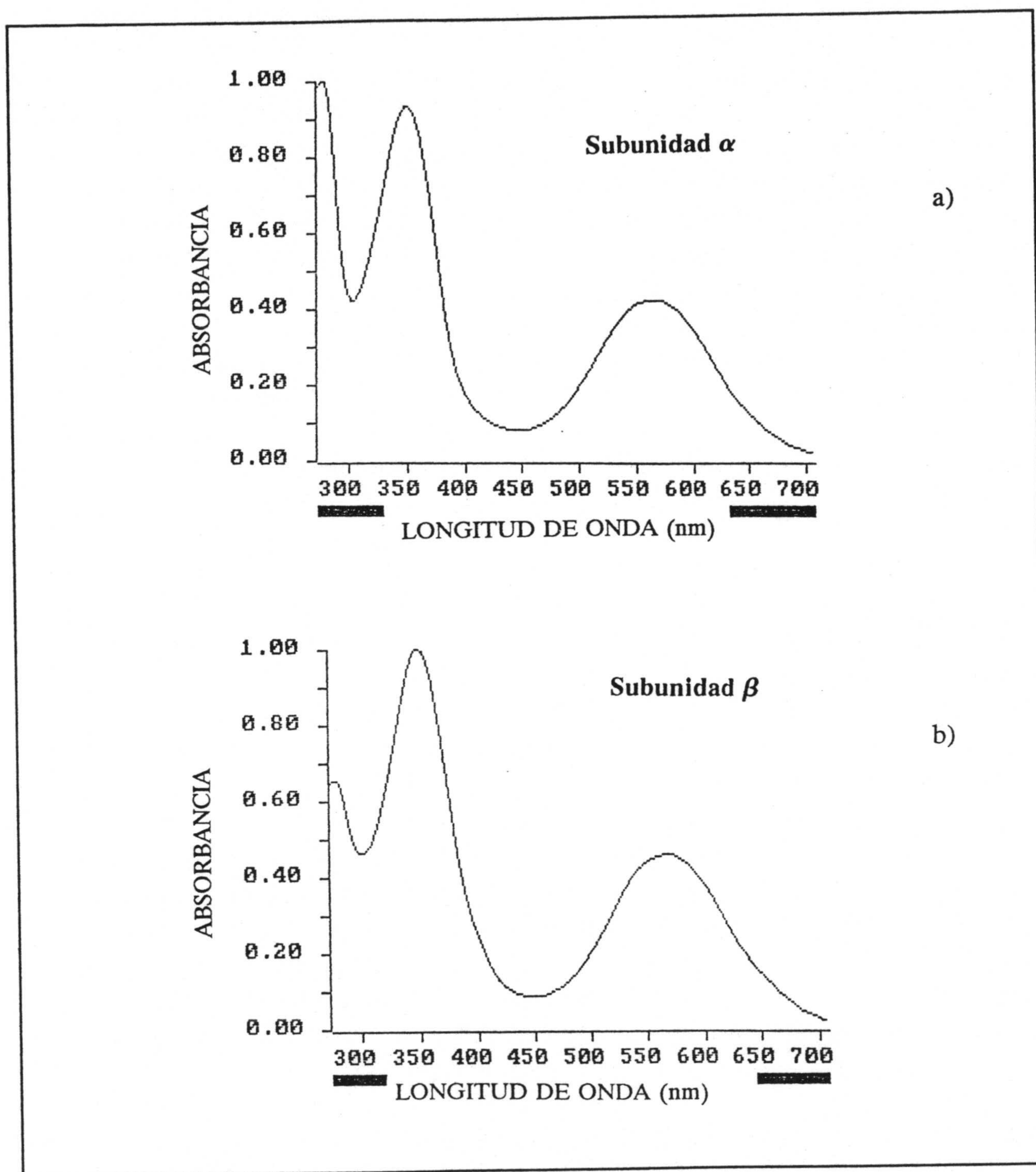
| Gradiente | t_R (Subunidad α) min | t_R (Subunidad β) min | Δt_R |
|-----------|---------------------------------|--------------------------------|--------------|
| A | 45.41 | 46.53 | 1.12 |
| B | 12.29 | 15.98 | 4.69 |
| C | 11.42 | 14.61 | 3.19 |
| D | 11.20 | 14.08 | 2.88 |

$$\Delta t_R = t_R(\beta) - t_R(\alpha)$$

La Figura 4-17 (a y b) corresponde a los espectros de absorción uv-vis a los t_R a que aparecen los dos picos. En condiciones desnaturalizantes, los efectos del ambiente proteico local en los espectros de absorción de los cromóforos, resultan prácticamente nulos (Glazer y col., 1973). Bajo esas condiciones, las bandas en la región visible de los espectros de absorción de las subunidades α y β de C-PC son virtualmente idénticos, aunque la intensidad de la subunidad β será el doble que la de la α . Esto es así, debido a que los tres cromóforos de C-PC son químicamente idénticos y la subunidad β transporta dos PCB, mientras que la α posee sólo uno. Ya que los espectros de la Figura 4-17 se han escogido de forma que la absorción en el visible sea aproximadamente igual, la subunidad α necesitará aproximadamente el doble de concentración para provocar la misma absorbancia de los cromóforos. Esto se debe reflejar en la banda de absorción correspondiente a proteínas totales (277 nm) y que de acuerdo con lo anterior, debe de tener aproximadamente doble absorbancia en el espectro correspondiente a la subunidad α . En efecto, ésto es así en la Figura 4-17a, por lo que mencionado espectro se ha asignado a la subunidad α , mientras que el de la Figura 4-17b debe de corresponder a la subunidad β .

**Figura 4-16**

Cromatogramas bidimensional (a) y tridimensional (b) obtenidos bajo las condiciones del gradiente C, para C-PC de *Spirulina platensis*.

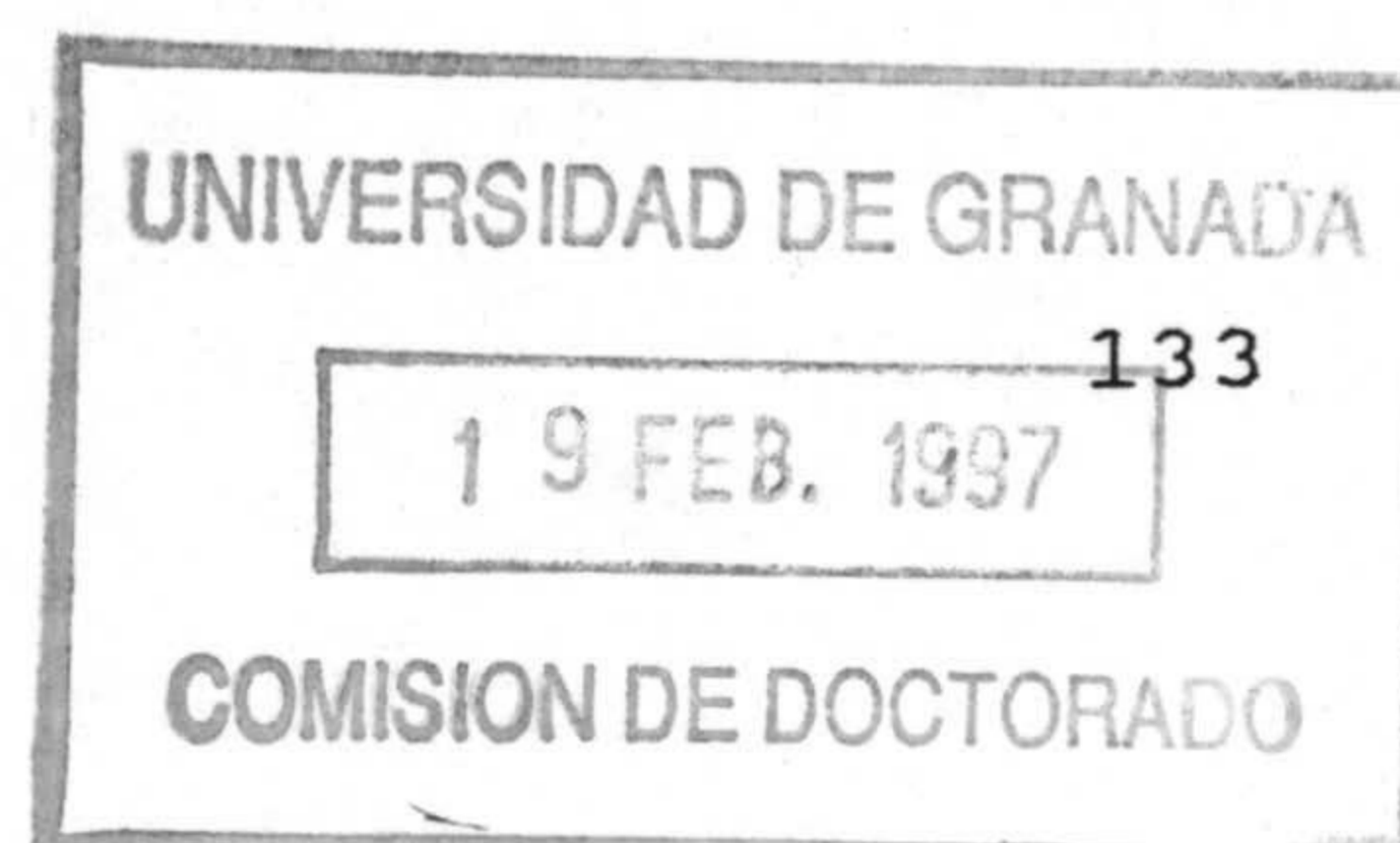
**Figura 4-17**

Espectros uv-visible de subunidades de C-PC, obtenidas según las condiciones del gradiente C: a) Subunidad α , b) Subunidad β .

Los resultados obtenidos permiten concluir que utilizando fases móviles con un 0.1% de β -mercaptoetanol se obtienen resultados muy satisfactorios. Toda la proteína inyectada en la columna se desnaturaliza, ya que no aparece en el pico correspondiente al tiempo muerto proteína sin desnaturalizar, y se obtienen sólo dos picos cromatográficos que corresponden a las subunidades α y β de C-PC.

Del análisis de la Tabla X, se puede deducir que aunque los picos están más separados en el gradiente B que en el C y D, también salen a mayor tiempo de retención. Los menores tiempos de retención se obtienen con el gradiente D, pero también la menor separación entre picos. El gradiente A, proporciona resultados menos satisfactorios ya que provoca unos t_R largos. Por ello las separaciones más satisfactorias son las correspondientes a los gradientes B y C que reúnen las ventajas de lograr una buena separación entre los picos de las dos subunidades y tiempos de retención bajos.

Con esta metodología se ha conseguido disminuir el tiempo de retención al que aparecen las subunidades de C-PC, sin perder por ello resolución entre los picos, frente a los trabajos de otros autores como Padgget y Krogman (1987) ($t_{R\alpha}=51$ min y $t_{R\beta}=48$ min) y Swanson y Glazer (1990) ($t_{R\alpha}=28$ min y $t_{R\beta}=30$ min).



4.1.5.2.-Caracterización de subunidades de APC.

Los resultados obtenidos en las mismas condiciones que se indican en la Tabla 4-IX utilizadas para C-PC (es decir sin adición de desnaturizantes), muestran que APC se desdobla en sus dos subunidades de forma casi total, sin que quede proteína sin desnaturizar. Esto indica que APC es una proteína más fácil de desnaturizar que C-PC y la fase móvil es suficiente para conseguirlo. Se obtiene así un cromatograma como se muestra en la Figura 4-18. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Glazer en condiciones experimentales similares, pero con adición de TFA (Swanson y Glazer, 1990).

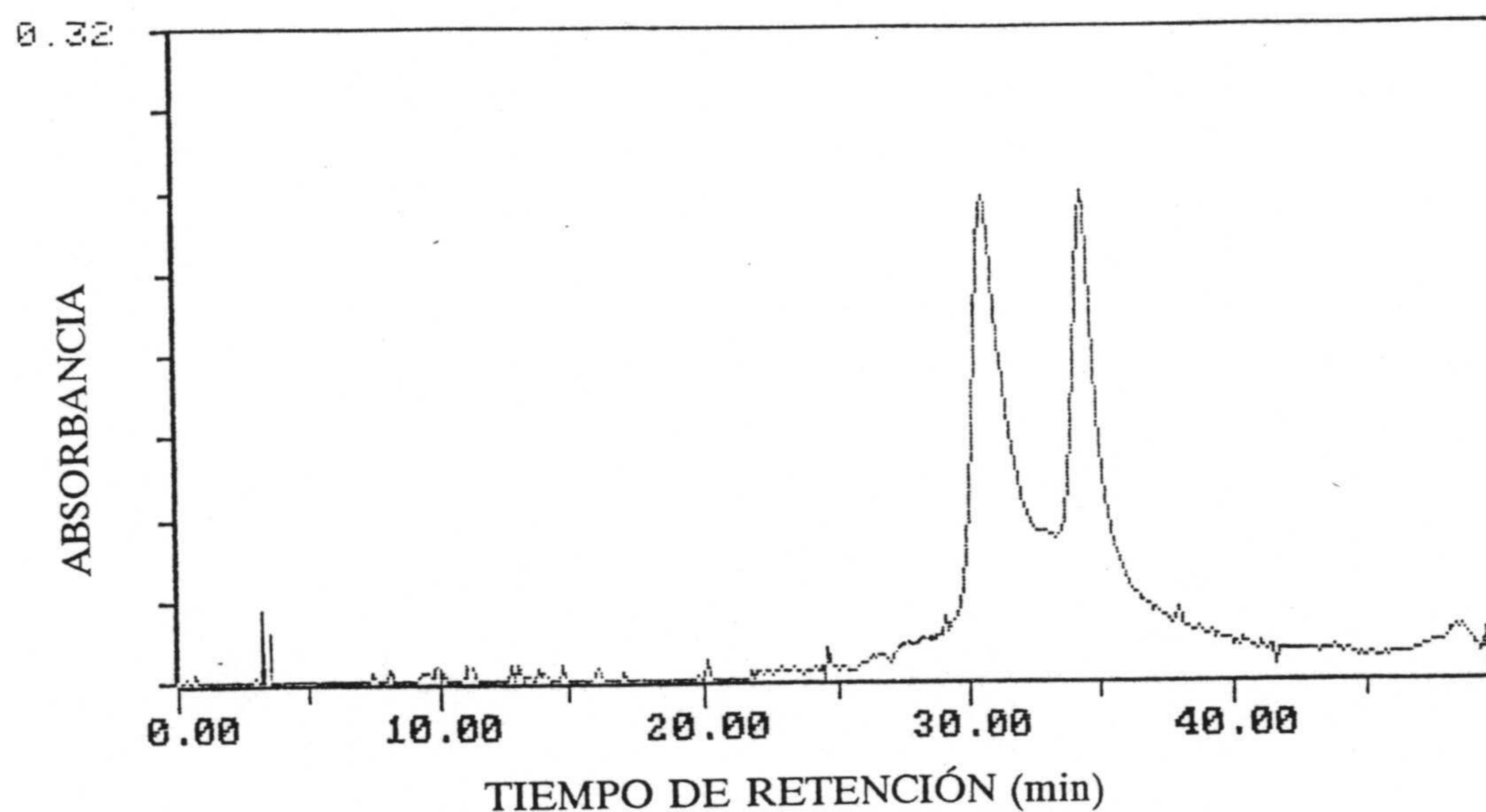
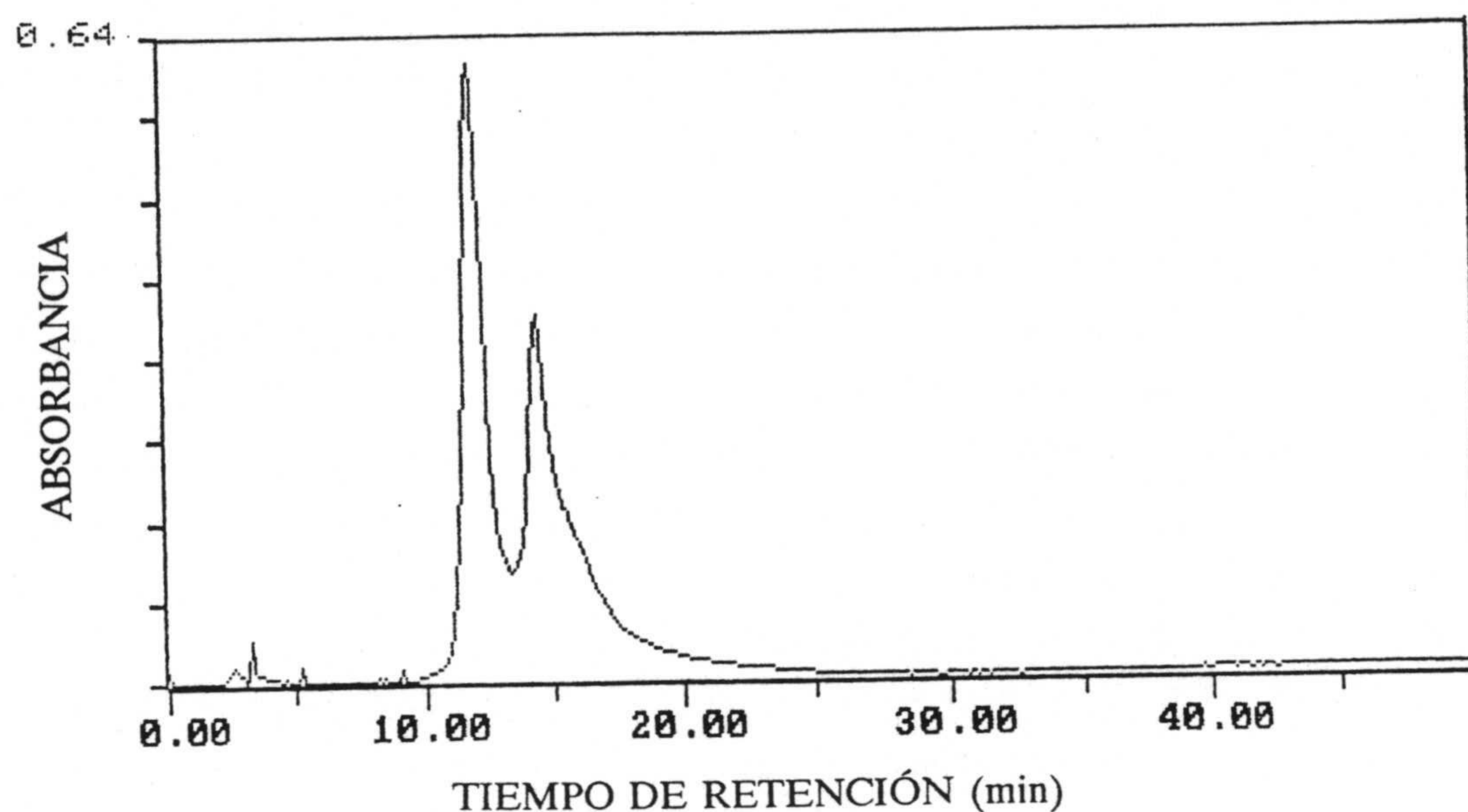


Figura 4-18

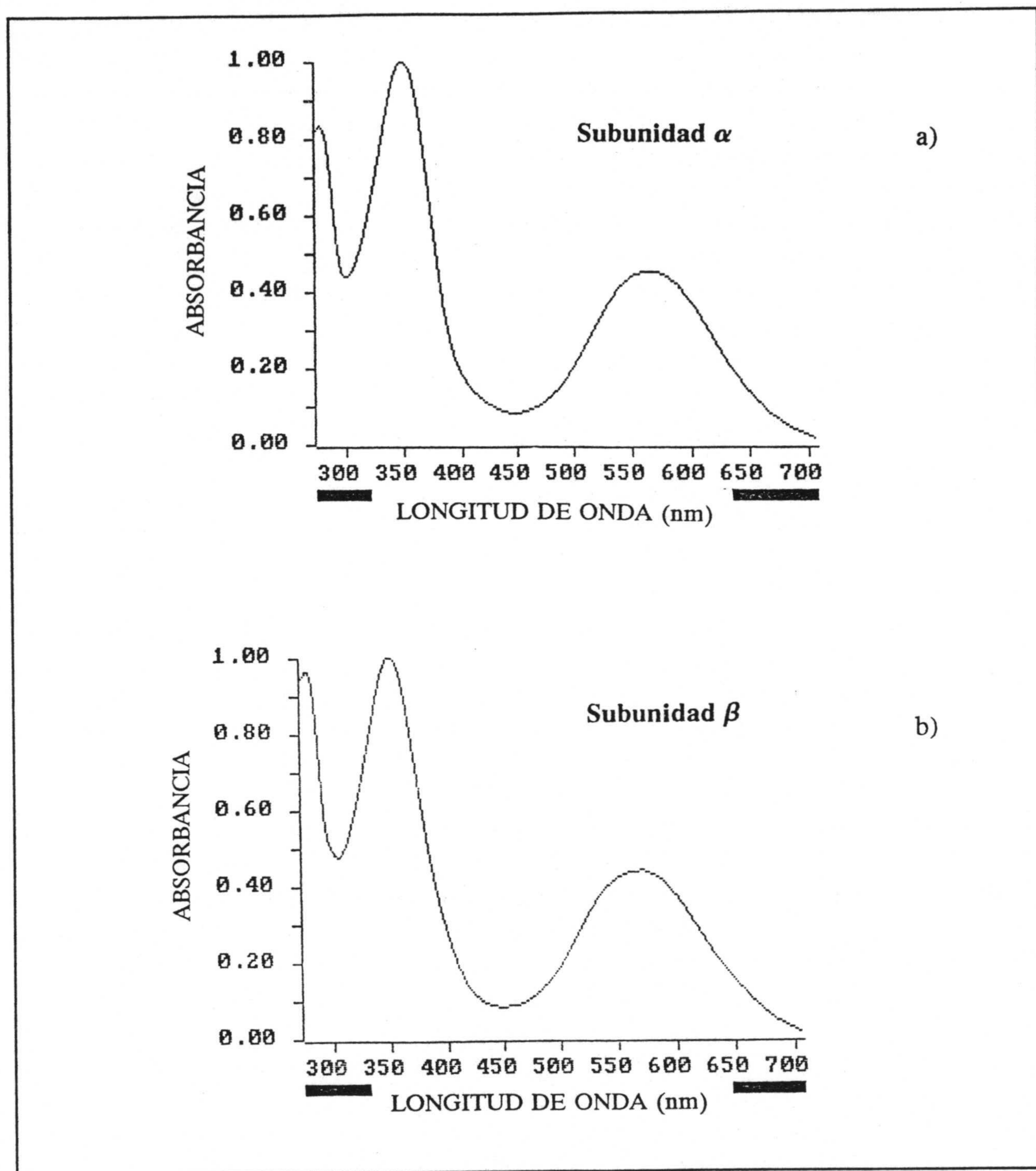
Cromatograma de separación de subunidades de APC de *Spirulina platensis*.

Al objeto de disminuir los tiempos de retención obtenidos para las subunidades de APC se ha utilizado la misma metodología que se empleó con C-PC (gradiente C). En la Figura 4-19 se muestra el cromatograma correspondiente a esta experiencia. En éste aparece un primer pico a $t_R=11.87$ min y un segundo pico a $t_R=14.38$ min.

**Figura 4-19**

Cromatograma de separación de subunidades de APC según gradiente C.

La Figura 4-20 (a y b) muestra los espectros de absorción uv-vis normalizados a cada uno de los t_R a los que aparecen las dos subunidades de APC. Los espectros de absorción de las dos subunidades cuando se obtienen en condiciones de completa desnaturalización, son casi análogos, lo que es concordante con lo discutido anteriormente para C-PC, ya que cada subunidad de APC transporta un único cromóforo químicamente idéntico. La asignación de los espectros a cada subunidad es por lo tanto algo incierta, aunque si se tiene en cuenta el trabajo de Swanson y Glazer (1990) y los resultados obtenidos por nosotros para C-PC, parece lógica la asignación de la subunidad α al espectro que corresponde al t_R de 11.87 min y la subunidad β al correspondiente a un t_R de 14.38 min.

**Figura 4-20**

Espectros uv-visible de subunidades de APC: a) Subunidad α , b) Subunidad β .

En la Figura 4-21 (a y b) se muestran los cromatogramas tridimensionales de APC correspondientes a esta experiencia.

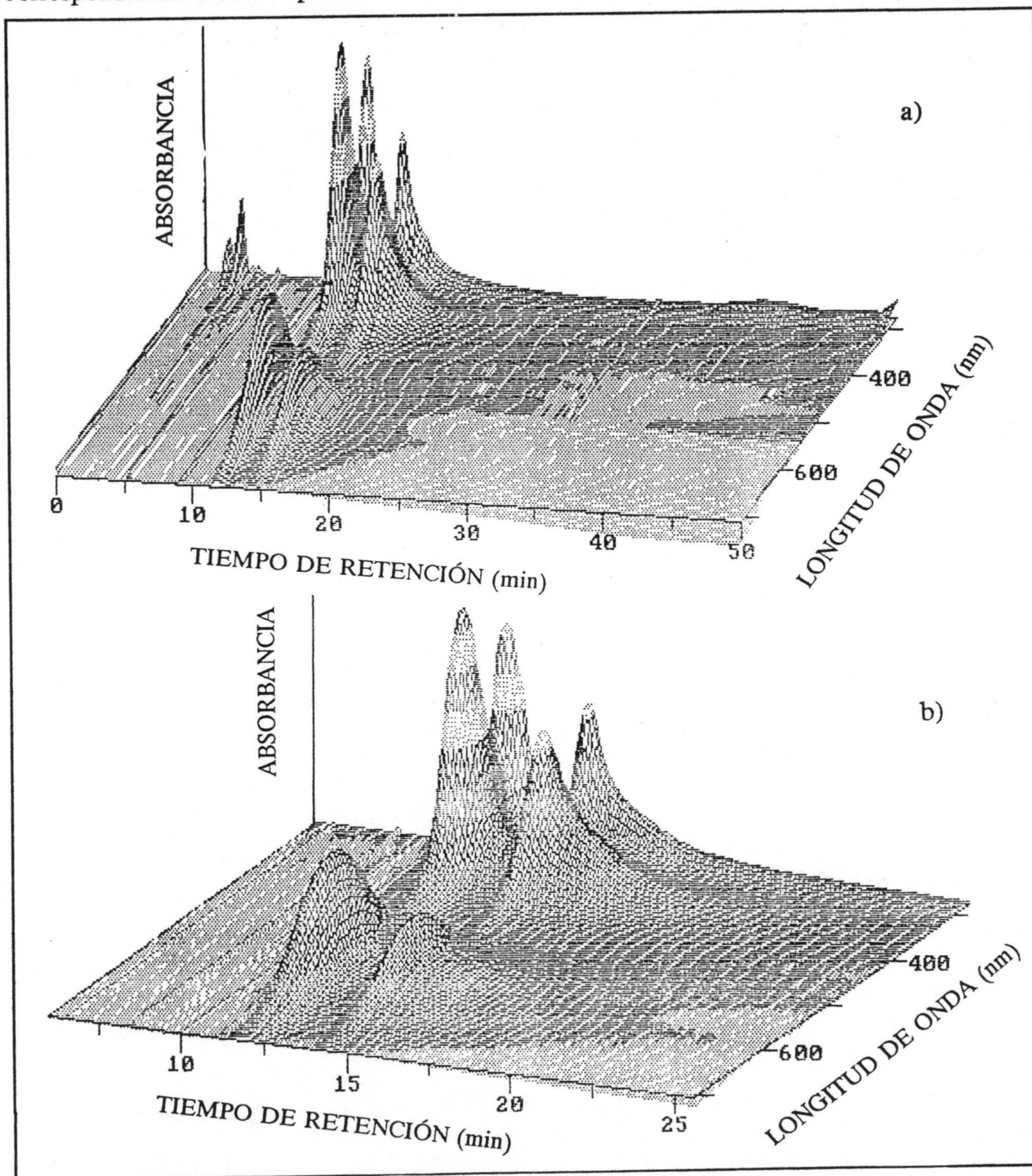


Figura 4-21

Cromatogramas tridimensionales correspondientes a aloficocianina: a) Cromatograma completo empezando en abscisas con $t_R = 0$; b) detalle del mismo.

Los resultados obtenidos muestran tiempos de retención sensiblemente inferiores a los obtenidos por Pagget y Krogman (1987), los cuales con un gradiente de acetonitrilo encuentran un $t_R=48$ min para la subunidad α de APC y un $t_R= 50$ min para la subunidad β , Sin mejor resolución que la alcanzada por nosotros. Asimismo, se ha mejorado el método propuesto por Swanson y Glazer (1990) ya que los mismos autores reconocen que la adición de TFA provoca una pérdida preferencial de la subunidad β .

Es de destacar que en todos los cromatogramas obtenidos, no se ha observado ningún pico que pudiera indicar la posible contaminación de las proteínas de partida. Esto corrobora que nuestro sencillo método de extracción y purificación proporciona resultados muy satisfactorios.

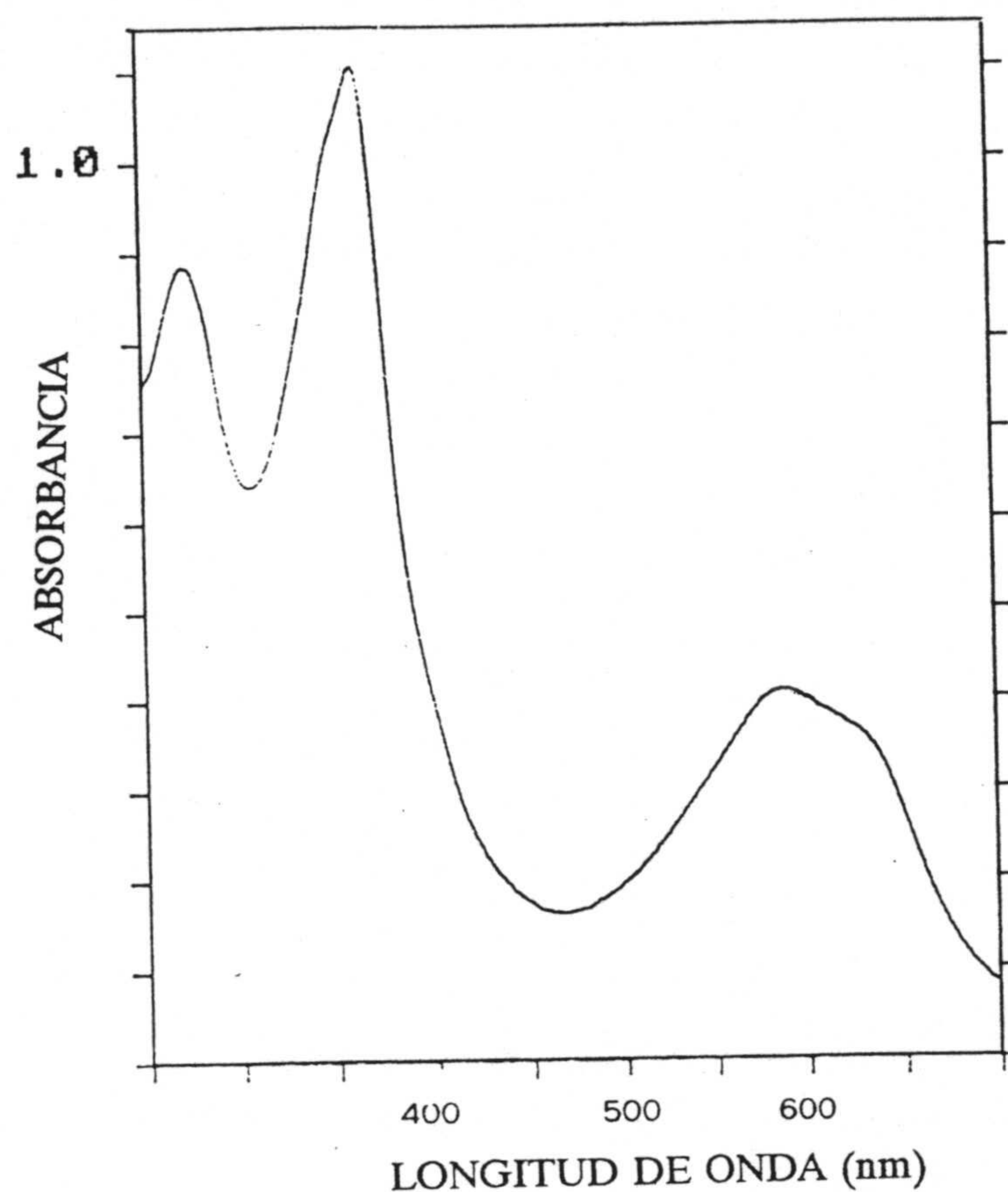
4.1.6-Extracción y caracterización de ficocianobilinas.

La obtención de la bilina presente en C-PC y APC, con alto grado de pureza es imprescindible para los estudios de estructura secundaria de las biliproteínas en disolución mediante espectroscopía IR de Transformada de Fourier, debido a la posible contribución que puede aportar a la zona del espectro IR que es sensible a las vibraciones que se utilizan en la determinación de la estructura secundaria.

Por este motivo y siguiendo la metodología desarrollada por nosotros que se describe en el apartado 3.2.2, se ha procedido a extraer la ficocianobilina, única bilina presente en ambas biliproteínas. Referida metodología se basa en la que emplean Beale y Cornejo (1991) aunque con notables modificaciones.

Como material de partida se han utilizado las disoluciones de proteínas procedentes de la etapa de exclusión por gel, lo que ha permitido considerables simplificaciones sobre el método original.

Beale y Cornejo (1991a) indican que, según la especie de microalga, se debe agregar HgCl_2 para liberar los correspondientes cromóforos de las biliproteínas. En nuestro caso, referida adición ha resultado imprescindible como se ha podido demostrar con idénticas condiciones experimentales pero sin HgCl_2 . En estas experiencias después de transcurridas 24 h, el residuo manifestaba el color azul característico de las biliproteínas. Además el espectro de absorción correspondiente al extracto metanólico resultante (Figura 4-22), se asemeja más bien al de la proteína que al preconizado por diversos autores (Beale y Cornejo, 1991; Braslavski y col., 1991; Cornejo y col., 1992; Wemmer y col., 1993) para la ficocianobilina. Una vez demostrada la necesidad de incorporar HgCl_2 en la etapa de metanólisis, su eliminación posterior del extracto metanólico se ha efectuado mediante sucesivos lavados con agua según el tratamiento que se describe en el apartado 3.2.2. Posteriormente la disolución resultante se ha evaporado hasta sequedad en un rotavapor a 45 °C. La composición de este extracto seco ha sido analizada mediante cromatografía en capa fina y HPLC.

**Figura 4-22**

Espectro uv-visible del extracto resultante tras el tratamiento, para la extracción del cromóforo, sin utilizar HgCl_2 .

En lo que se refiere a las experiencias en capa fina, el polvo azul obtenido se ha redisolto en metanol y esta disolución se ha depositado en una placa de silica gel. Los resultados obtenidos despues de desarrollar mencionadas placas (previamente preparadas según se describe en el apartado 3.3.7.) con una fase móvil compuesta por acetona:etanol:agua:acético (50:38:11:1) se muestran en la Figura 4-23. Debido a la falta de antecedentes bibliográficos sobre separación de bilinas en capa fina, se han realizado numerosas pruebas preliminares con diversas fases móviles. Los mejores resultados, se obtuvieron con la fase móvil anteriormente citada que coincide con la empleada por Beale y Cornejo (1991) como eluyente de ficoeritrobilina en una columna cromatográfica de fase reversa, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

La visualización de las manchas se realizó con luz ultravioleta de 360 nm. Se observó una sola mancha de color rosáceo que, en principio, se puede asignar a ficocianobilina por ser ésta la única bilina presente en C-PC y APC. El R_f fué 0.75. Este resultado parece indicar la presencia de ficocianobilina, sin otras sustancias contaminantes, en la disolución metanólica ensayada

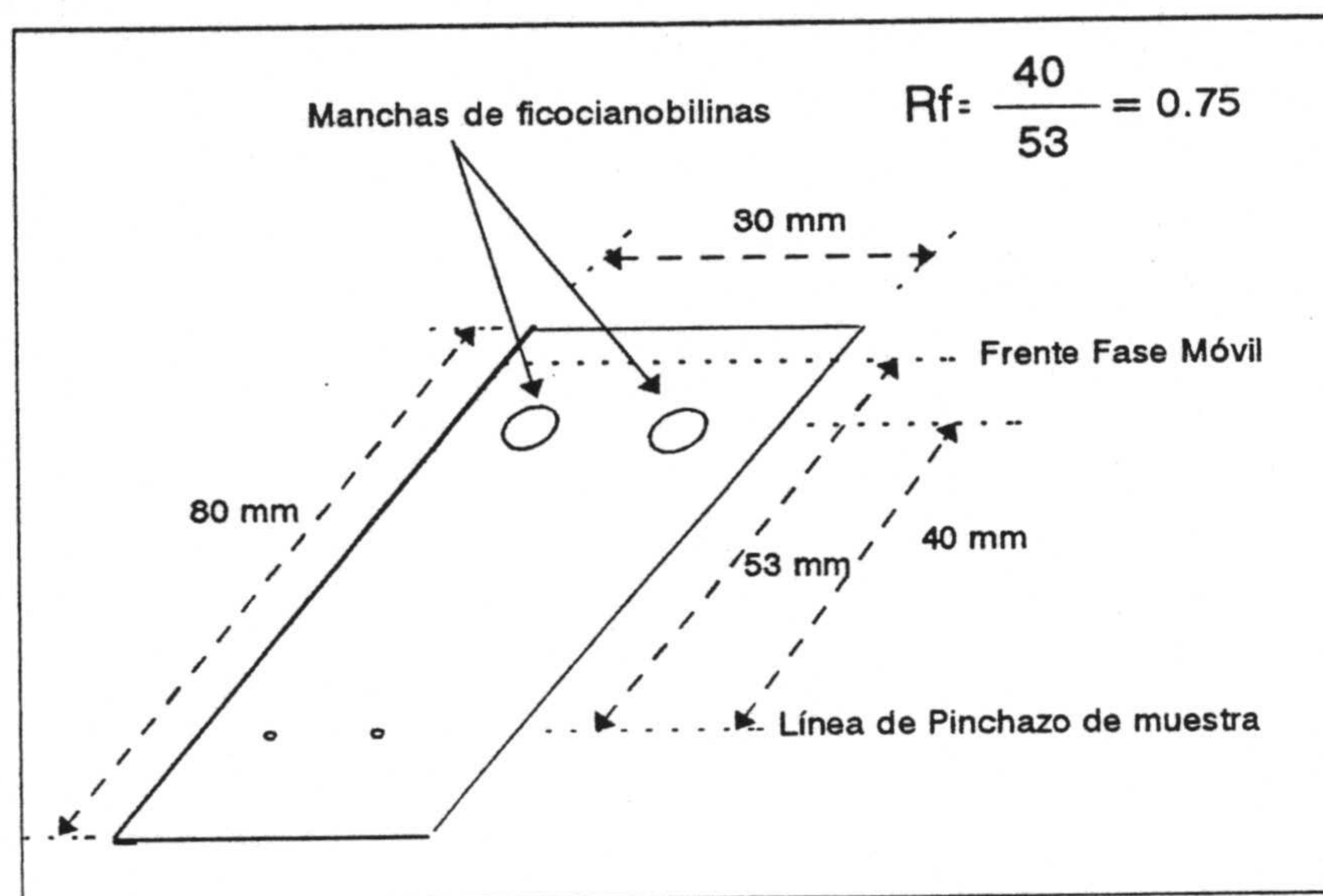


Figura 4-23

Cromatografía en capa fina de ficocianobilinas procedentes de biliproteínas de *Spirulina platensis*. Fase móvil utilizada: acetona:etanol:agua:acético (50:38:11:1).

Al objeto de corroborar la pureza de la ficocianobilina obtenida, se ha procedido a cromatografiar la disolución metanólica anteriormente mencionada, en una columna hiperisil butil 300 de fase reversa, mediante HPLC. En su elución se utilizó una fase móvil similar a la empleada en las experiencias de capa fina variando su polaridad según el gradiente descrito en la Tabla 4-XI. El cromatograma resultante (Figura 4-24) muestra un solo pico a $t_R=5.5$ min.

TABLA 4-XI

Gradiente de fase móvil utilizado para caracterizar ficocianobilina de C-PC y APC.

| Tiempo (min) | % Etanol | % Acetona | % Agua |
|--------------|----------|-----------|--------|
| 0 | 42 | 28 | 30 |
| 42 | 60 | 40 | 0 |

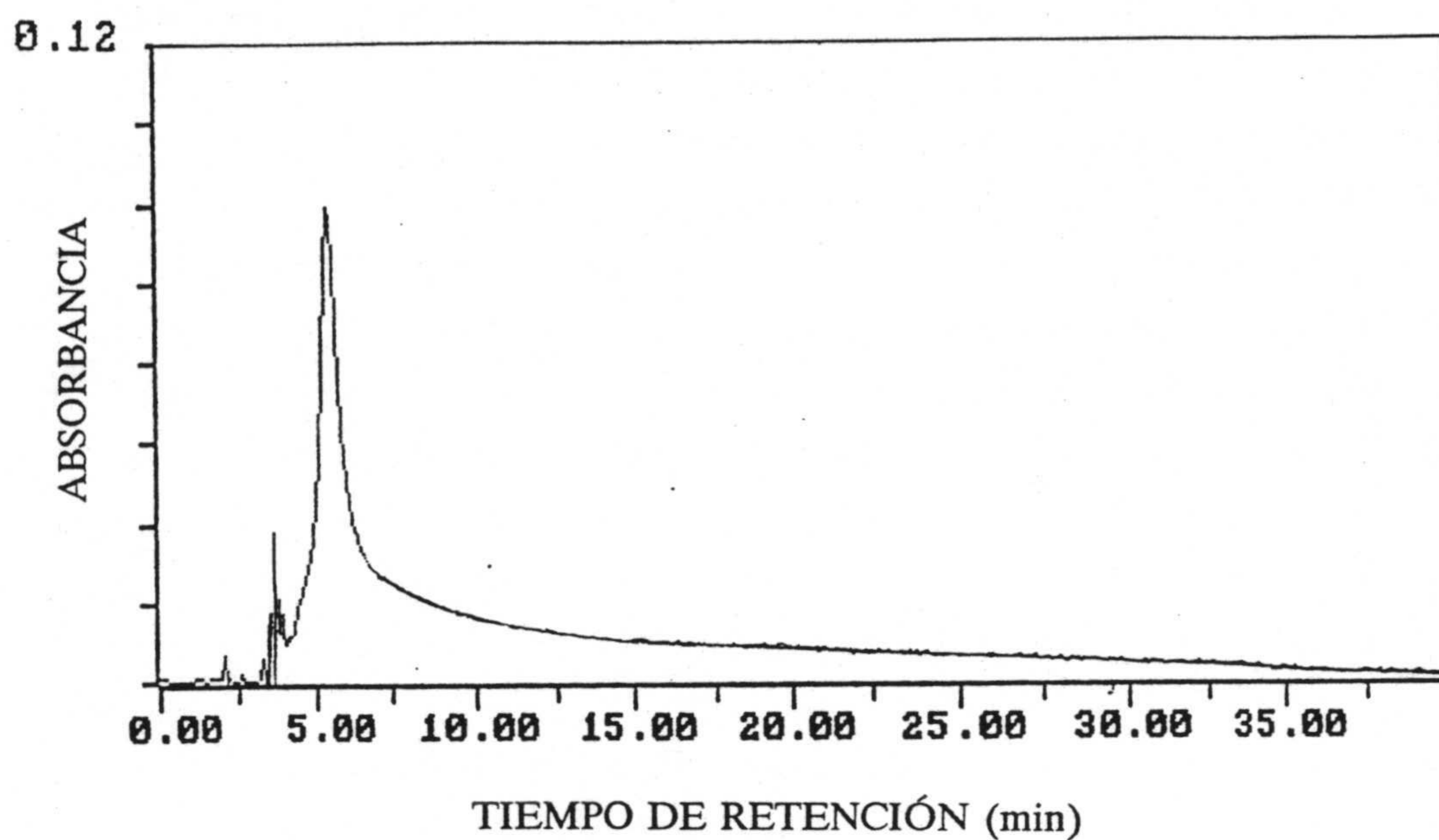


Figura 4-24

Cromatograma de ficocianobilina de C-PC y APC según el gradiente de la Tabla 4-XI.

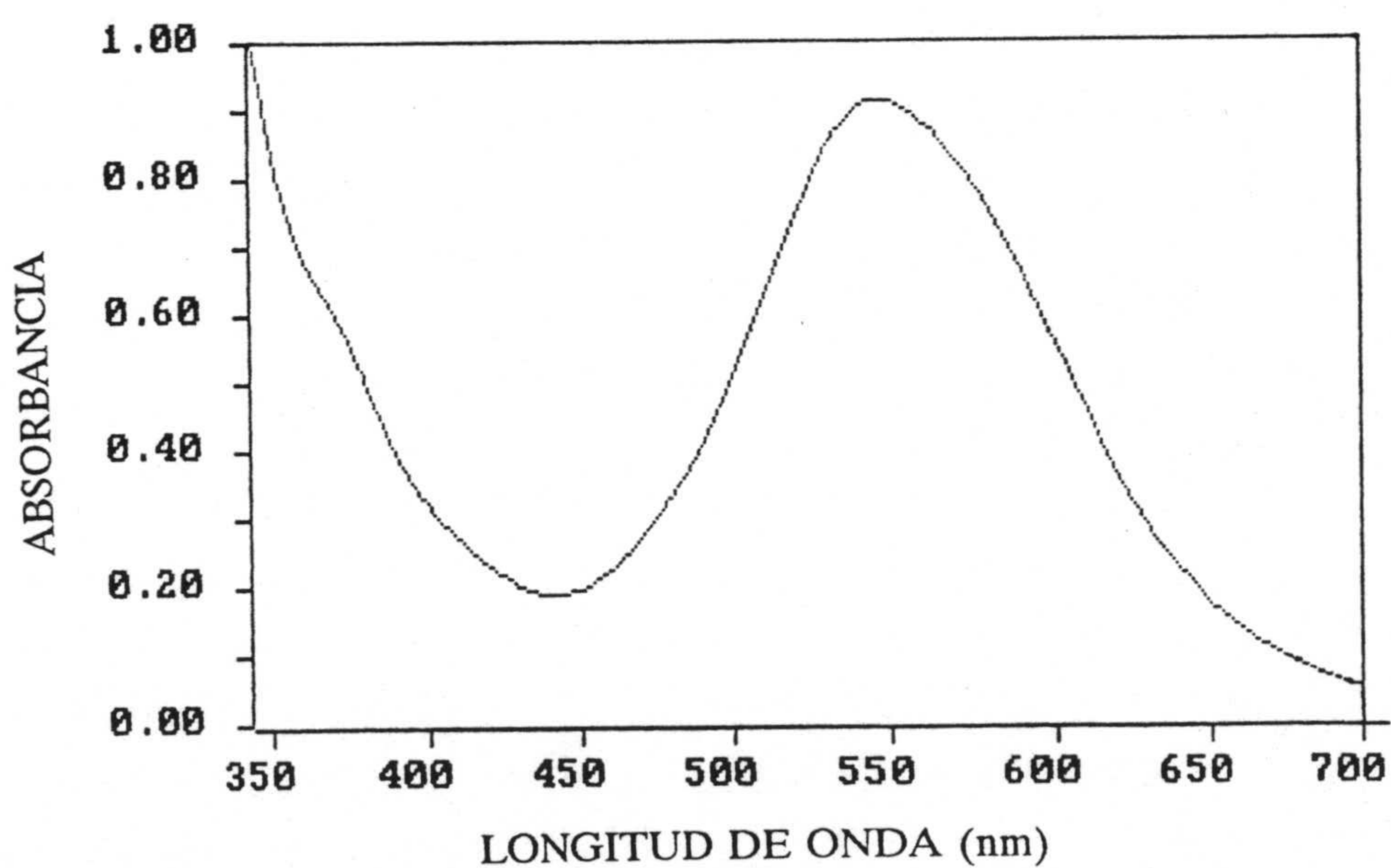


Figura 4-25

Espectro de absorción uv-visible de ficocianobilina a $t_R = 5.5$ min.

El espectro de absorción correspondiente a referido t_R se muestra en la Figura 4-25. Debido a la alta absorción de la acetona en la región del ultravioleta cercano, no es posible obtener el espectro completo uv-vis por lo que se han sustituido la acetona y etanol por otros disolventes de polaridad ligeramente superior como son acetonitrilo y metanol. Con estos disolventes se ensayaron diversos gradientes en los que se empleó menor cantidad inicial de agua, al objeto de que la polaridad del sistema fuese similar a la de la fase móvil de la anterior separación. Los mejores resultados en lo que se refiere a tiempo de retención, se han conseguido con el que se indica en la Tabla 4-XII. El t_R encontrado fue 5.6 min (Figura 4-26) y el espectro de absorción asociado a este tiempo de retención se muestra en la Figura 4-27.

TABLA 4-XII

| Tiempo (min) | % Agua | % Metanol | % Acetonitrilo |
|--------------|--------|-----------|----------------|
| 0 | 20 | 48 | 32 |
| 60 | 0 | 60 | 40 |

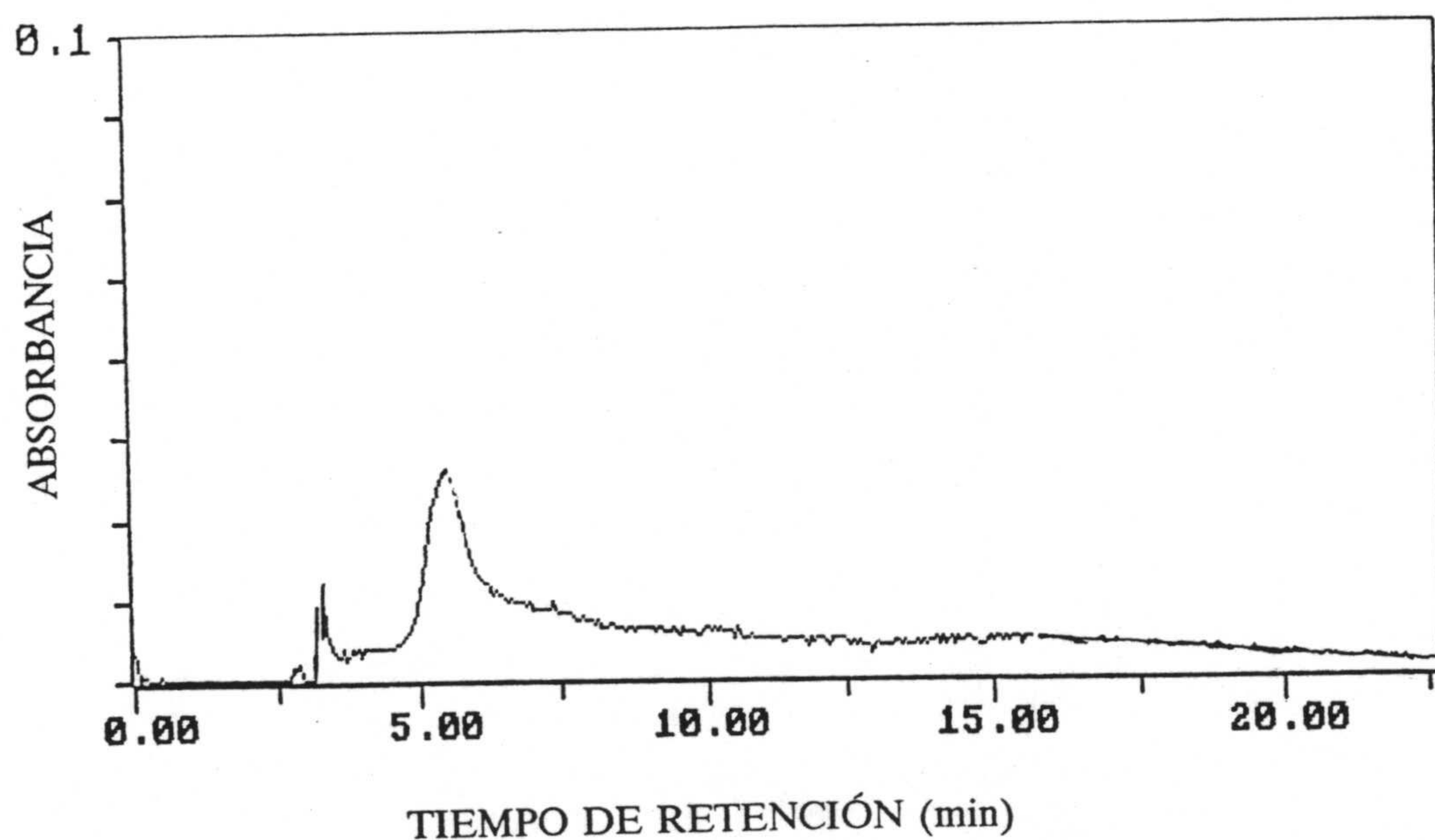
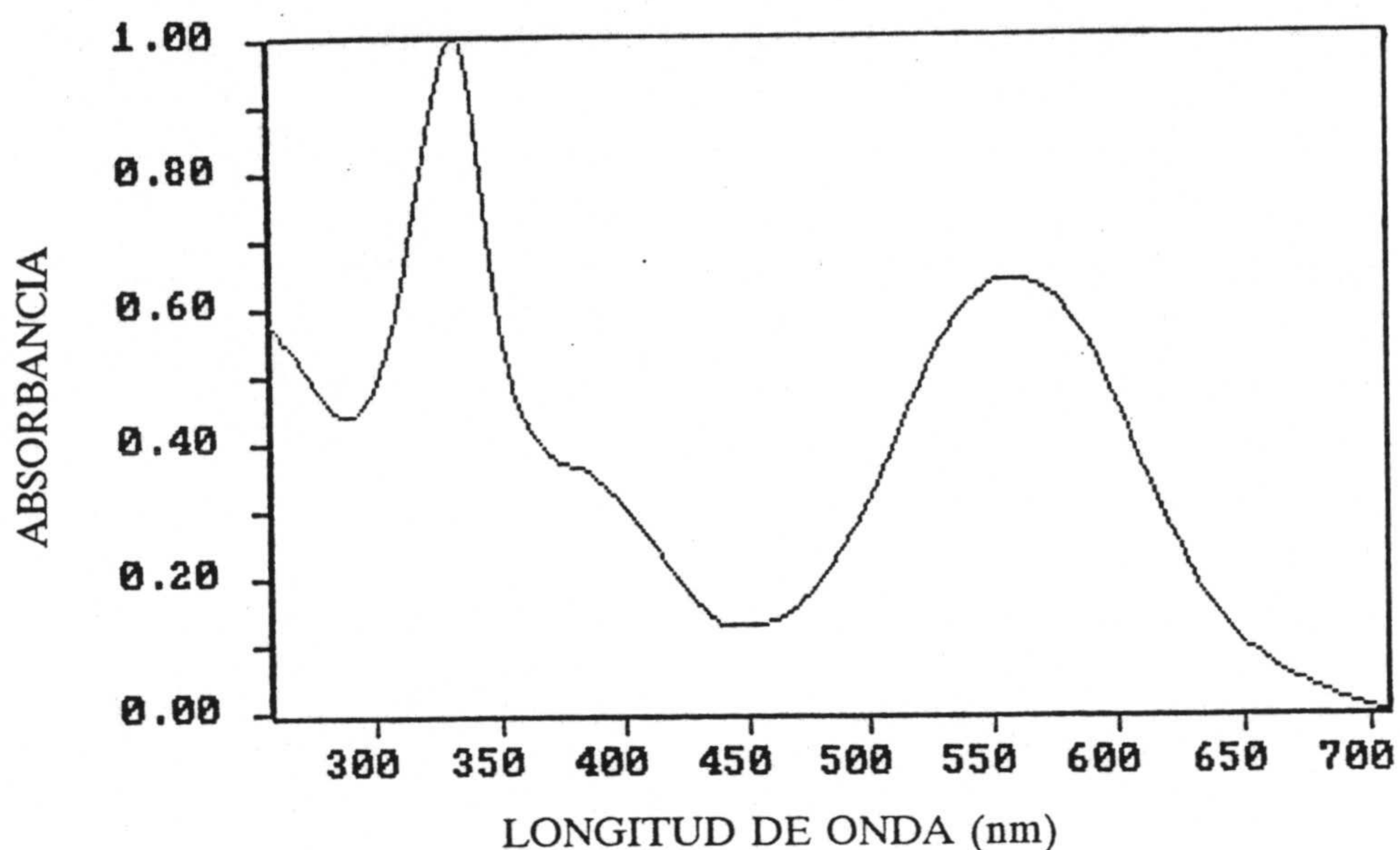


Figura 4-26

Cromatograma de ficocianobilina de C-PC y APC de *Spirulina platensis* según el gradiente de la Tabla 4-XII.

**Figura 4-27**

Espectro de absorción uv-visible de ficocianobilina a $t_R=5.61$ min.

La obtención de un único pico cromatográfico con ambas fases móviles, es indicativo de la presencia exclusiva de PCB, sin ningún otro componente contaminante en la disolución metanólica. El espectro de absorción de la Figura 4-27 concuerda con los previamente publicados (Beale y Cornejo, 1991; Braslavsky y col., 1991; Cornejo y col., 1992; Wemmer y col., 1993) y se puede asignar por lo tanto a la ficocianobilina, única bilina presente en C-PC y APC.

4.2.-CRISTALIZACIÓN DE BILIPROTEÍNAS.

4.2.1.-Optimización del proceso de cristalización.

La alteración de la solubilidad de una proteína, se puede conseguir mediante la variación de parámetros tales como pH, tipo y concentración de agente precipitante y temperatura. Se han publicado algunas revisiones de los factores que afectan a la solubilidad proteica (Blundell y Jhonson, 1976; Appelt y col., 1983).

Los agentes precipitantes más comunes son sales inorgánicas, disolventes orgánicos y polietilenglicol (PEG). La capacidad de diferentes iones para precipitar proteínas sigue las series de Hofmeister y entre los más usados se encuentran $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, CaCl_2 , Li_2SO_4 y citratos. Desde su introducción por McPherson en 1976 (McPherson, 1976) el PEG es uno de los reactivos más utilizados con éxito en la cristalización de proteínas. Se cree que afecta a la solubilidad de la proteína mediante un mecanismo competitivo por el agua así como a través de la variación de las propiedades dieléctricas de la disolución.

Como ya se ha indicado anteriormente, la técnica de acupuntura en gel pretende recoger los aspectos positivos de la técnica de cristalización en gel y de la cristalización en medios capilares.

Los protocolos experimentales iniciales se han realizado a distintos valores de pH por encima del punto isoeléctrico de las biliproteínas, que según la bibliografía es de aproximadamente 4.9 (Reuter y Wehrmeyer, 1988; Hildith y col., 1991). Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4., se han obtenido los resultados que se resumen en la Tabla 4-XIII.

TABLA 4-XIII

Influencia del pH de la disolución reguladora donde se disuelve la proteína y de la naturaleza de los agentes precipitantes, en la cristalización de C-PC y APC.

| Agente precipitante | Tampón | Resultado |
|--|----------------|---|
| 1)(NH ₄) ₂ SO ₄ 30% w/v 2)CaCl ₂ 30% w/v | Fosfato pH 7.0 | Microcristales azules y precipitado amorfo de proteína. |
| 1)(NH ₄) ₂ SO ₄ 30% w/v 2)CaCl ₂ 30% w/v | Fosfato pH 5.0 | Monocristales maclados transparentes |
| 1)(NH ₄) ₂ SO ₄ 30% w/v 2)MgCl ₂ 30% w/v | Fosfato pH 7.0 | Monocristales transparentes |
| 1)(NH ₄) ₂ SO ₄ 30% w/v 2)MgCl ₂ 30% w/v | Fosfato pH 5.0 | Monocristales transparentes |
| 1)MgCl ₂ 20 % w/v 2)PEG-6000 30% W/v | Fosfato pH 7.0 | Monocristales azules |

Nota: Inicialmente se hace difundir el agente precipitante 1) durante dos semanas y después se retira y se hace difundir el agente precipitante 2). Ambos agentes precipitantes se prepararon siempre en tampón Tris-HCl del pH correspondiente al tampón fosfato en que la muestra estaba disuelta. Concentración de proteína= 30 mg/ml. El gel es de sílice de pH=6.5.

Como se puede observar se obtuvieron microcristales azules cuando se usó CaCl₂ como agente precipitante y pH suficientemente alejado del pI. En otros casos los cristales transparentes obtenidos fueron caracterizados como Mg₃(PO₄)₂ o Ca₃(PO₄)₂ producto de la interacción del tampón y de la sal de magnesio o calcio empleada. La utilización de PEG, ha proporcionado los mejores resultados. Así cuando se utilizó en primer lugar el MgCl₂ como agente precipitante y luego se difundió PEG-6000 se obtuvieron monocristales azules. Las Figuras 4-28 y 4-29 muestran estos monocristales azules de C-PC y APC respectivamente.

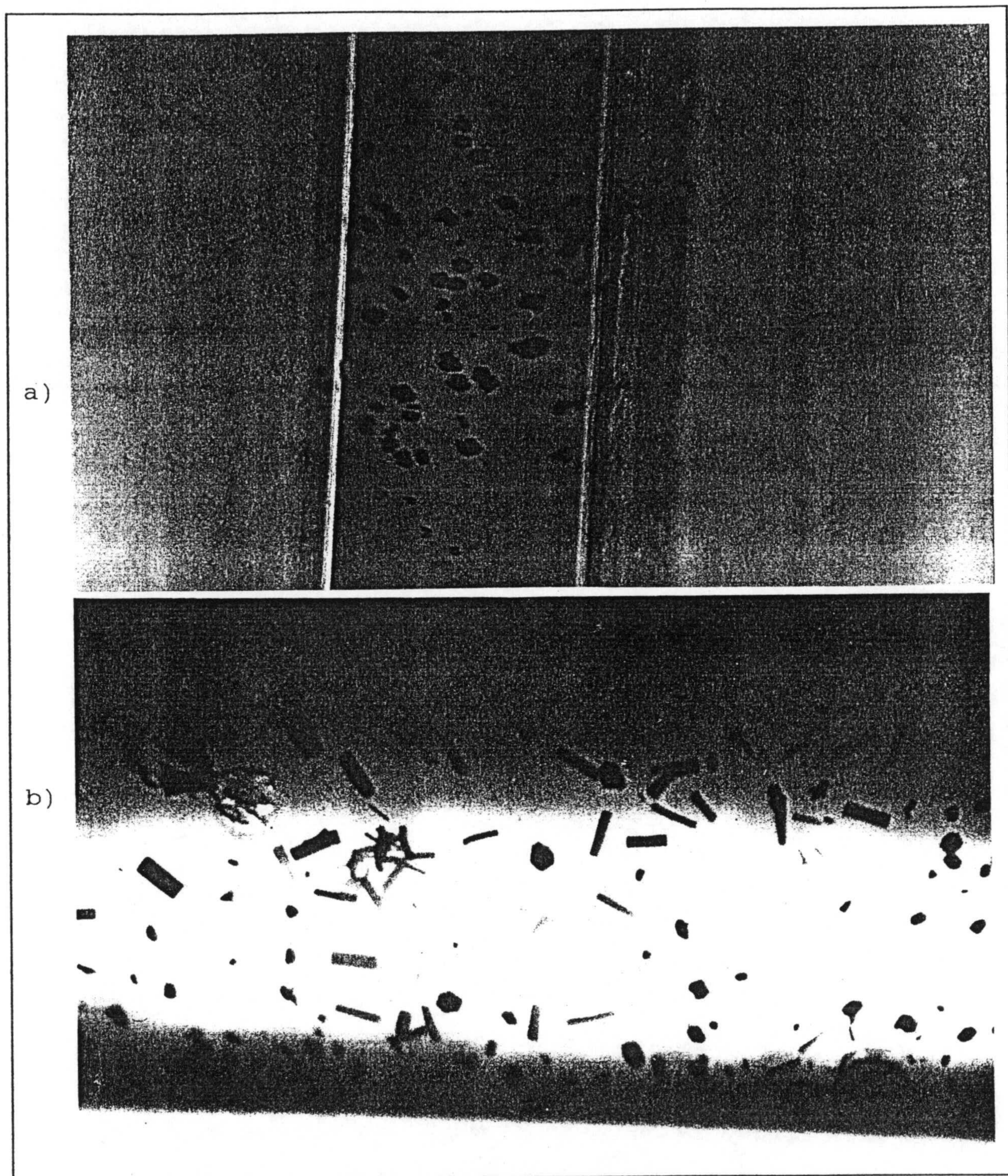


Figura 4-28

Monocristales azules de C-PC de *Spirulina platensis*, según condiciones descritas en la Tabla 4-XIII. a) Vista general del capilar y b) detalle del mismo.

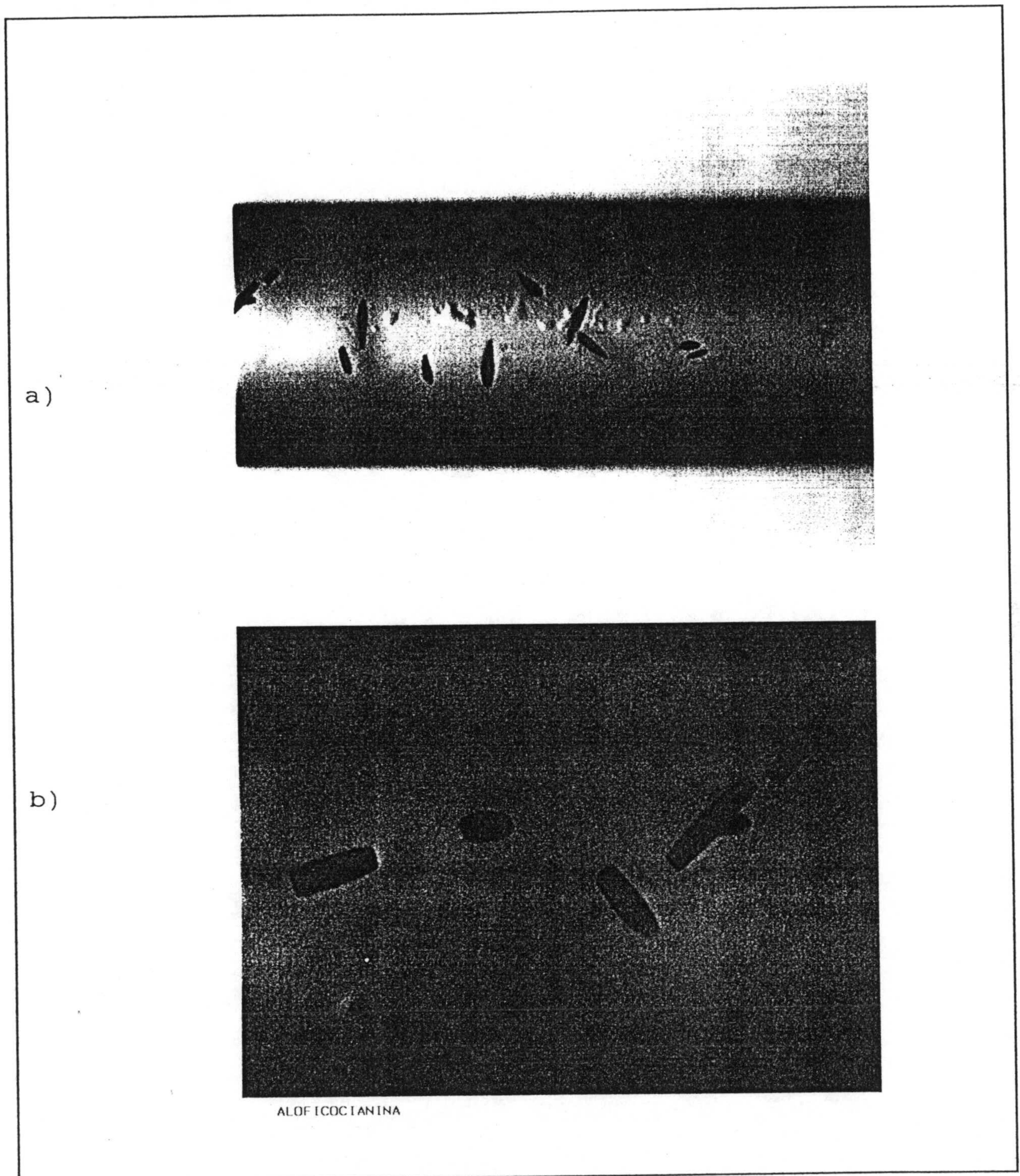


Figura 4-29

Monocristales azules de APC de *Spirulina platensis*, según condiciones descritas en la Tabla 4-XIII. a) Vista general del capilar y b) detalle del mismo.

Las Figuras 4-28 y 4-29 demuestran que las condiciones ensayadas proporcionan monocristales de C-PC y APC, sin embargo, el tamaño de los mismos no es suficiente para su estudio estructural por difracción de rayos-X y el tiempo de crecimiento resulta excesivamente alto.

De Titta y col. (1995) han estudiado la interacción del Mg con el PEG y su influencia en la velocidad de crecimiento. De acuerdo con sus resultados se ha considerado la ventaja que podría aportar la alteración del orden de adición de los agentes precipitantes al objeto de aumentar la mencionada velocidad de crecimiento de los monocristales y por tanto el tamaño. De otra parte el PEG está disponible comercialmente en varios pesos moleculares y parece ser un factor a considerar en la optimización de las condiciones de cristalización de las proteínas.

Teniendo en cuenta la discusión anterior, se ha programado una serie de experiencias cuya descripción y resultados se resumen en la Tabla 4-XIV.

TABLA 4-XIV

Influencia del orden de adición y tipo de agentes precipitantes empleados en la cristalización de APC y C-PC de *Spirulina platensis*.

| Agente precipitante | Tampón | Resultado |
|-----------------------------------|----------------|--|
| 1)PEG-400 2)MgCl ₂ | Fosfato pH 7.0 | Precipitados amorfos azulados y algunos microcristales en la parte superior |
| 1)PEG-6000 2)MgCl ₂ | Fosfato pH 7.0 | Precipitados amorfos y pequeños cristales en la parte superior del capilar |
| 1)MgCl ₂ 2)PEG-400 | Fosfato pH 7.0 | Pequeños precipitados amorfos de la proteína. |
| 1)MgCl ₂ 2)PEG-1500 | Fosfato pH 7.0 | Pequeños núcleos cristalinos azules. |
| 1)MgCl ₂ 2)PEG-6000 | Fosfato pH 7.0 | Monocristales azules ligeramente más grandes que en los casos anteriores, con algún crecimiento esferulítico en la base del capilar. |
| 1)MgCl ₂ 2)PEG-8000 | Fosfato pH 7.0 | Pequeños monocristales azules, pero con un precipitado azul intenso en la base del capilar. |

Nota: La proteína se preparó a una concentración de 60 mg/ml en el tampón correspondiente. El PEG se prepara al 30% en peso (w/v) en tampón Tris-HCl pH 7.0 y el MgCl₂ se prepara al 20% en peso (w/v) en el mismo tampón. En todos los casos el primer agente precipitante se difundió durante 148 horas y tras retirarlo se adicionó el segundo agente precipitante.

Las experiencias descritas en la Tabla 4-XIV, nos han permitido establecer que los mayores monocristales se obtienen con las siguientes condiciones: tampón de disolución de la muestra, fosfato 20 mM pH 7.0; primer agente precipitante, MgCl₂ al 20% en peso (w/v) en Tris-HCl pH 7.0; segundo agente precipitante, PEG-6000 al 30% en peso (w/v) en Tris-HCl pH 7.0.

No obstante, la aparición de esférulos en la base del capilar y de monocristales pequeños en la parte superior del mismo, significa que la proteína se encuentra en un elevado grado de sobresaturación. Dado que la obtención de las proteínas es tediosa y que

particularmente la APC, se encuentra en escasa proporción en el material de partida, se ha optado por disminuir la concentración de la disolución proteica al objeto de evitar la sobresaturación mencionada.

De acuerdo con esto se ha desarrollado un nuevo protocolo experimental en el que se han considerado planteamientos correspondientes a la disminución de la concentración de proteína. Los resultados han sido muy satisfactorios, lo que nos ha permitido elegir la siguiente metodología como la más indicada de las ensayadas por nosotros en la cristalización de C-PC y APC por la técnica de acupuntura en gel (TAG):

-Proteína disuelta en tampón de fosfato pH 7.0 20 mM a una concentración de 30 mg/ml.

-Agente precipitante: inicialmente se difunde $MgCl_2$ al 20% (w/v) en Tris-HCl pH 7.0 durante 96 horas, después se retira y se adiciona el PEG-6000 al 30% (w/v) en Tris-HCl pH 7.0. La aparición de núcleos es a los 30 días de iniciado el experimento.

Los monocristales obtenidos para ambas biliproteínas, se muestran en las Figuras 4-30 y 4-31.

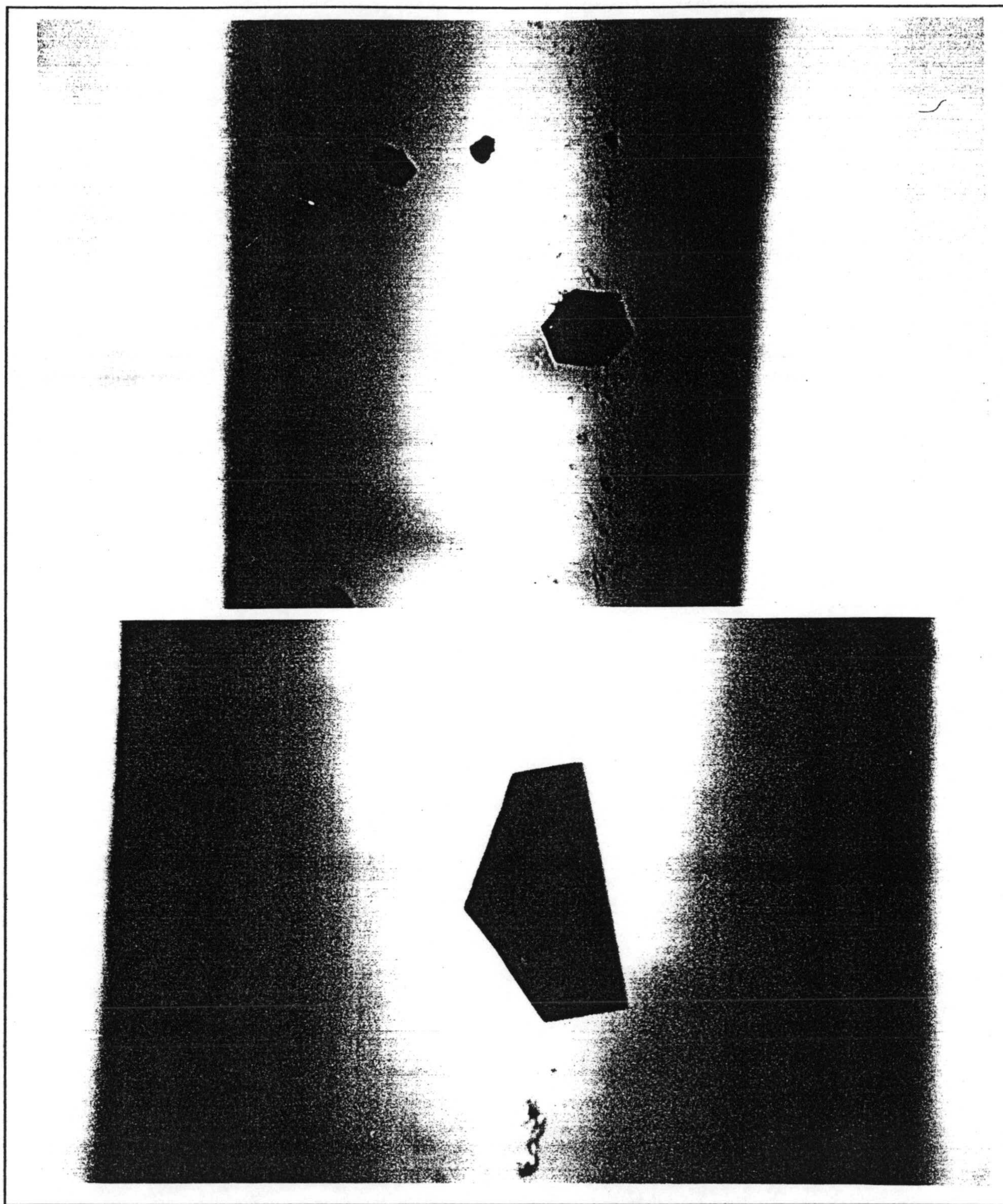


Figura 4-30

Monocristales de C-PC obtenidos mediante TAG (condiciones óptimas).

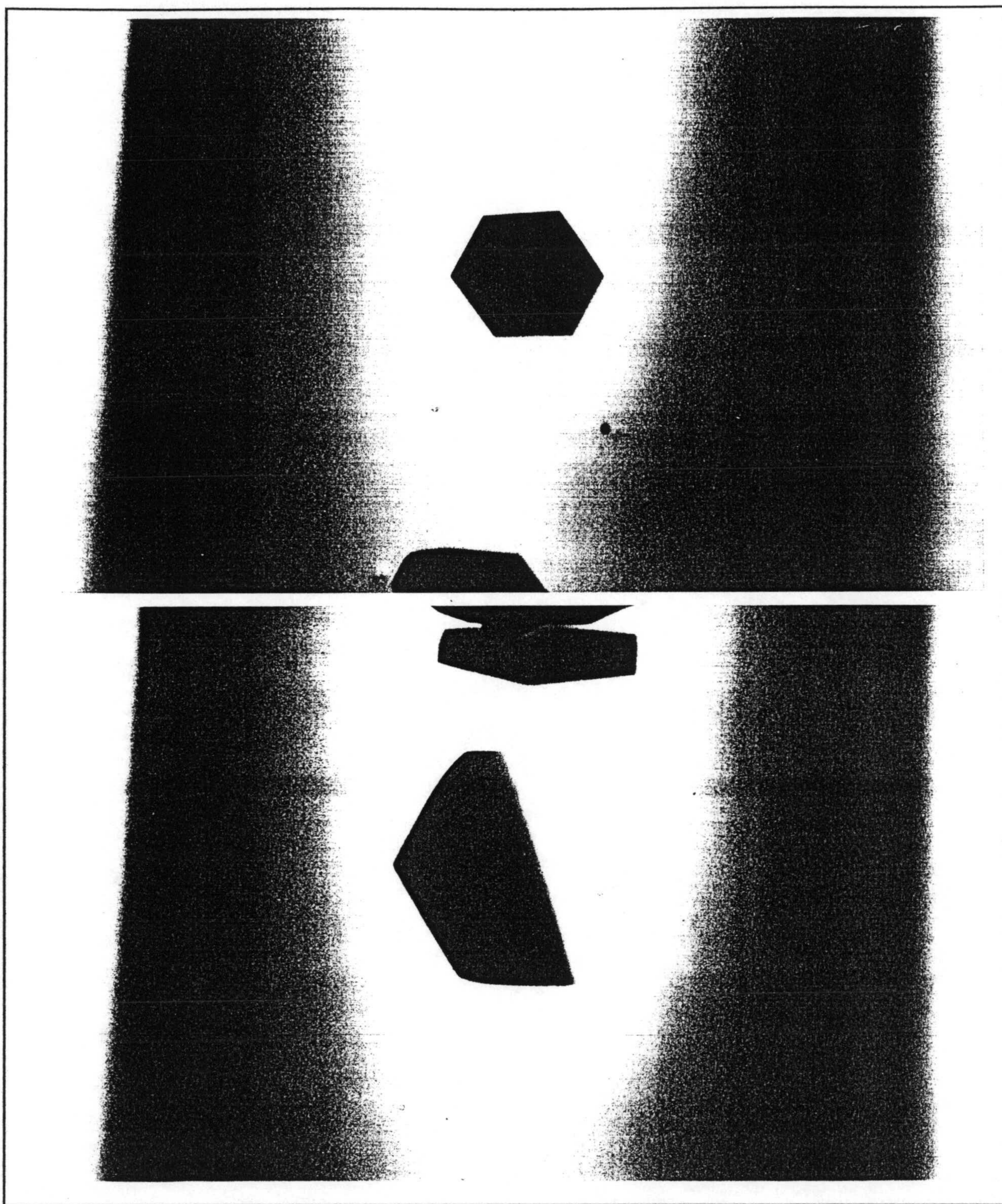


Figura 4-31

Monocristales de APC obtenidos mediante TAG (condiciones óptimas).

4.2.2.-Corroboración de resultados.

Una vez que se han obtenido los monocristales, es necesario demostrar que el material cristalizado es realmente la proteína buscada. Una caracterización de este tipo implica realizar: pruebas físicas tales como, contacto físico con un punzón sobre la proteína cristalina y análisis del color y morfología del cristal con respecto a sus proteínas homólogas; así como la caracterización a nivel estructural por medio de espectroscopías y difracción de rayos-X.

4.2.2.1.-Pruebas físicas.

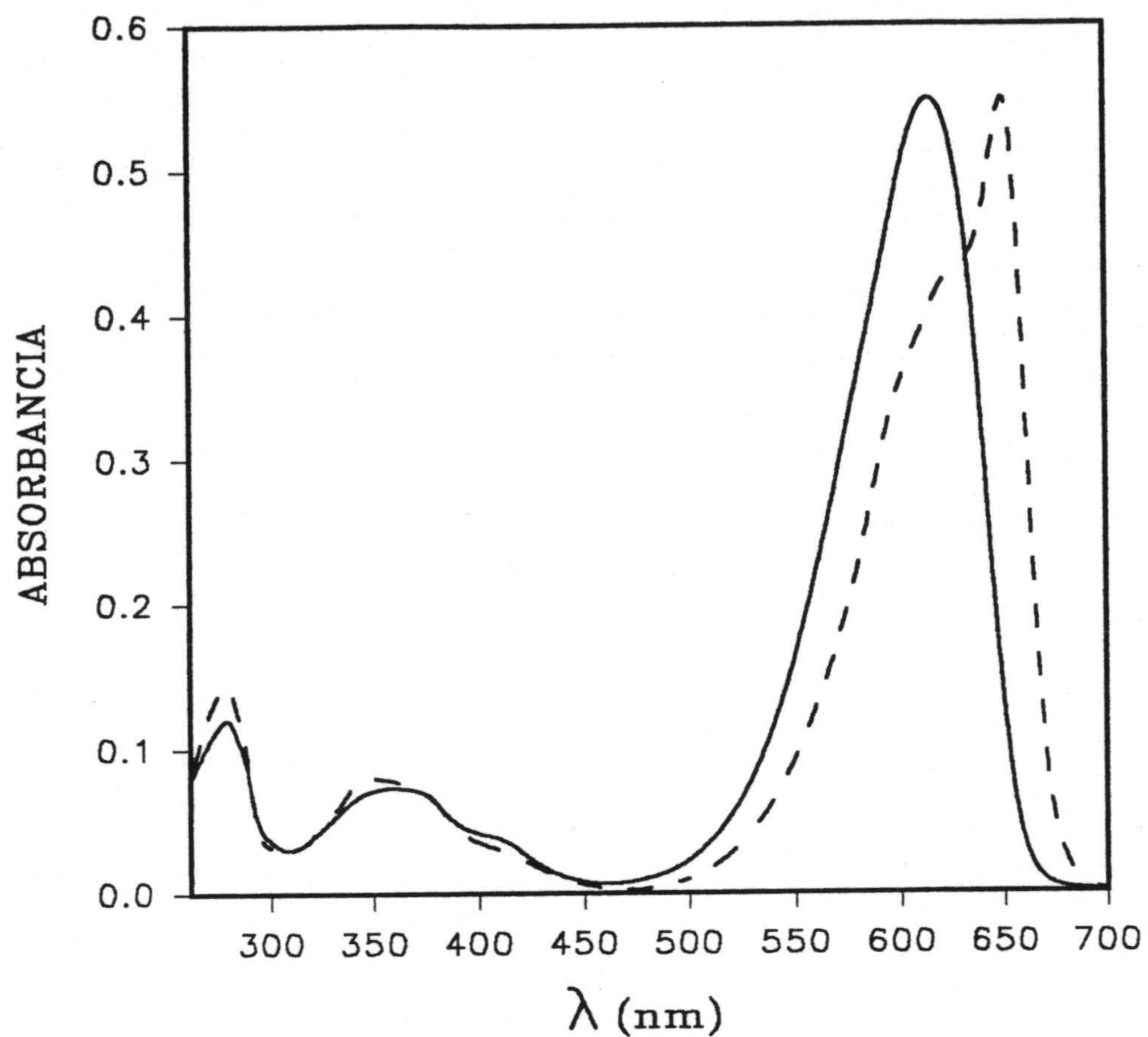
Los monocristales obtenidos de C-PC y APC presentan descomposición inmediata al contacto con un punzón metálico. Esto resulta una prueba inequívoca de extremada fragilidad, lo que es característico de todos los cristales de proteínas.

En el caso específico de nuestras biliproteínas, otra prueba relevante es el color azul característico de los cristales obtenidos, muy diferenciado de los cristales transparentes obtenidos con las sales empleadas como agentes precipitantes.

Respecto a la morfología de los cristales, existen datos acerca de ficocianinas cristalizadas de otras especies de microalgas (Schirmer y col., 1985, 1986 y 1987; Duerring y col., 1988,1991; Miki y col, 1990). Estas presentan morfologías de tipo hexagonal y por tanto coincidentes con la encontrada por nosotros para C-PC y APC de *Spirulina platensis*.

4.2.2.2.-Pruebas espectroscópicas.

Los cristales obtenidos de las dos proteínas fueron lavados con PEG tres veces y seguidamente se disolvieron en un tampón de fosfatos de pH 7.0. Los espectros de absorción obtenidos de estas disoluciones procedentes de cristales de C-PC y APC se presentan en la Figura 4-32, en la que se puede apreciar que los máximos de absorción aparecen en las mismas posiciones que los obtenidos con las disoluciones de proteínas purificadas antes de ser cristalizadas, es decir a 620 nm para C-PC y 650 nm para APC. Con las mismas disoluciones, se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia de ambas proteínas (Figura 4-33). Estos muestran iguales perfiles y máximos de emisión que los obtenidos con disoluciones de proteínas purificadas (638 y 658 nm para C-PC y APC respectivamente).

**Figura 4-32**

Espectros de absorción uv-visible entre 260 y 700 nm de cristales disueltos de biliproteínas: C-PC (—) y APC (- - - - -).

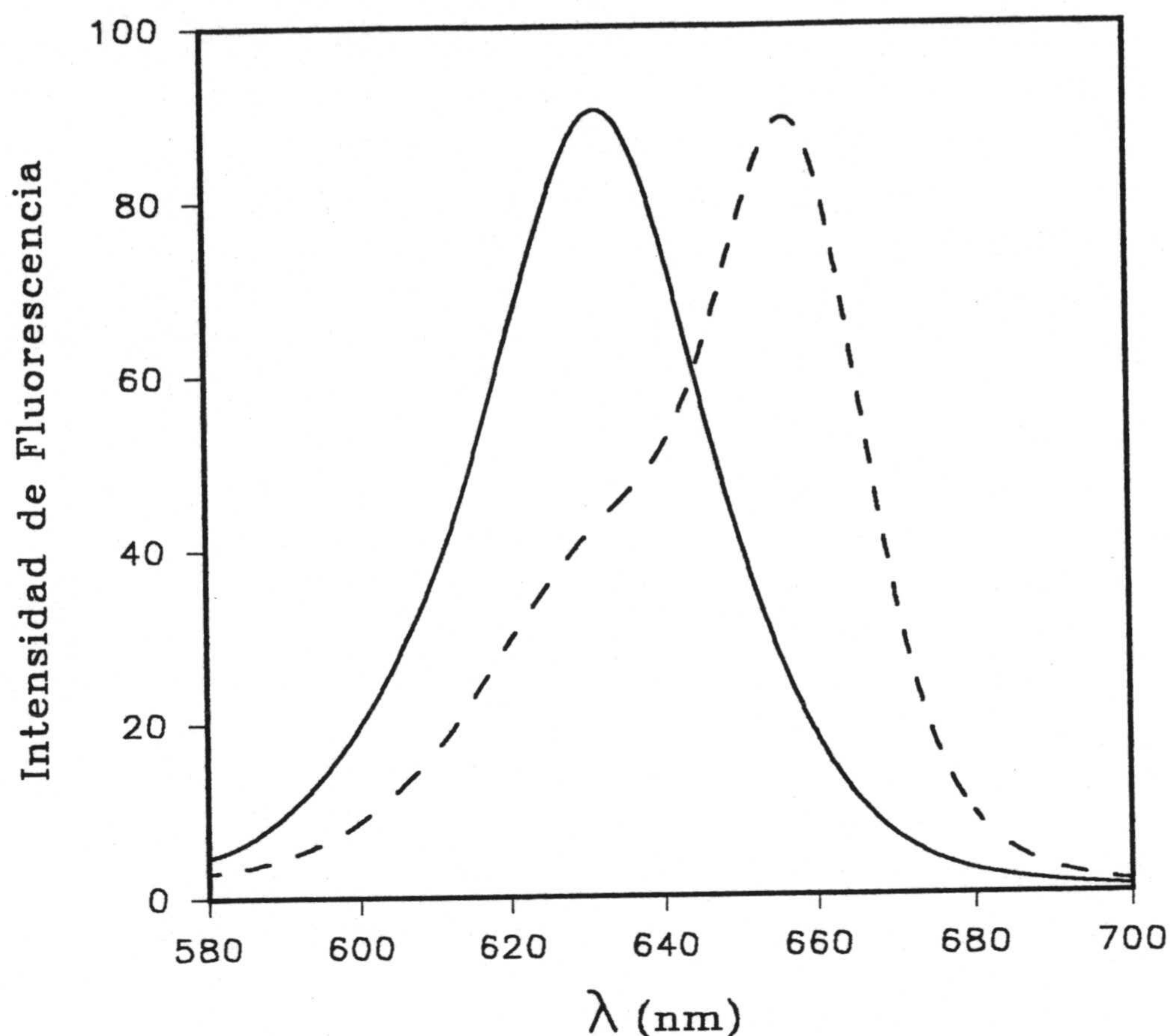


Figura 4-33

Espectros de emisión de fluorescencia entre 580 y 700 nm de cristales disueltos de biliproteínas: C-PC (—) y APC (-----).

4.2.2.3.-Difracción de rayos-X.

En el caso de monocristales de pequeño tamaño, la toma de datos debe prolongarse durante largo tiempo, con la consiguiente destrucción del cristal por efecto de la radiación. Por este motivo la calidad y el tamaño de los cristales son factores relevantes en los estudios por difracción de rayos-X.

Los cristales de C-PC y APC crecidos dentro de los capilares Lindemam se prepararon extrayendo parte de la disolución que los contiene, aunque se deja una pequeña cantidad de la misma para que la estabilidad se mantenga durante la adquisición de datos. Los monocristales fueron montados en un difractómetro March Imaging Plat usando un generador

de ánodo rotatorio que opera a 50 kV y 100 mA con un filamento de focalización. La distancia entre el cristal y la película se fijó en 70 mm.

Mediante las fotografías de rotación de 1° (Figura 4-34 a y b) se han obtenido los parámetros de red para ambas proteínas crecidas por la técnica de acupuntura en gel. En lo que se refiere a C-PC, la espectroscopía de rayos-X (Figura 4-34a) ha mostrado que los cristales pertenecen al sistema hexagonal. Las ausencias sistemáticas de reflexiones indican que el grupo espacial corresponde al $P6$ o $P6_3$, con constantes de célula $a=b= 182.38 \text{ \AA}$, $c= 60.87 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta= 90^\circ$, $\gamma= 120^\circ$. La comparación de cristales de C-PC procedentes de distintas cianobacterias muestra que las dimensiones de la célula unidad de los cristales de C-PC procedentes de *Spirulina platensis* están comprendidas entre los valores obtenidos para cristales procedentes de *F. diplosiphon* ($a=b= 180.26 \text{ \AA}$, $c= 61.24 \text{ \AA}$) (Duerring y col., 1991) y *A. quadruplicatum* ($a=b= 184.5 \text{ \AA}$, $c= 60.5 \text{ \AA}$) (Schirmer y col., 1987), por lo que resulta razonable suponer que los cristales de C-PC de *S. platensis* tienen una estructura tridimensional muy similar a las de C-PC procedentes de otras cianobacterias. Además, ya que en los cristales de C-PC de *F. diplosiphon* y *A. quadruplicatum* las moléculas están asociadas como hexámeros (Schirmer y col., 1986, 1987; Duerring y col., 1991), nuestros resultados pueden implicar también que la célula unidad de los cristales de C-PC procedentes de *S. platensis* contiene tres hexámeros $(\alpha\beta)_6$. Probablemente esta forma hexamérica de agregación está íntimamente relacionada a los discos que forman las varillas nativas de los ficobilisomas.

La Figura 4-34b muestra el difractograma obtenido para APC. En esta fotografía de rayos-X se observa que los cristales de APC de un tamaño promedio de $0.4 \times 0.3 \times 0.3 \text{ mm}^3$, también pertenecen al sistema hexagonal. Debido a que su tamaño es mayor que los de C-PC, se ha podido determinar sin ambigüedad que corresponden al grupo espacial $P6_322$. Las dimensiones de la célula unidad encontradas han sido: $a=b=102.04 \text{ \AA}$, $c=131.22 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta= 90^\circ$ y $\gamma= 120^\circ$. Recientemente, Brejc y col. (1995) han cristalizado APC procedente de *Spirulina platensis* con una metodología distinta a la utilizada por nosotros. Los parámetros de red que han obtenido ($a=b= 101.9 \text{ \AA}$, $c= 130.6 \text{ \AA}$) concuerdan muy bien con los nuestros. En este punto, es de resaltar, que cuando apareció la publicación de estos resultados, ya habían sido obtenidos por nosotros algunos monocristales de APC como se reflejó en la Memoria de Licenciatura (Bermejo, 1994), aunque aún no se había conseguido optimizar el proceso de cristalización.

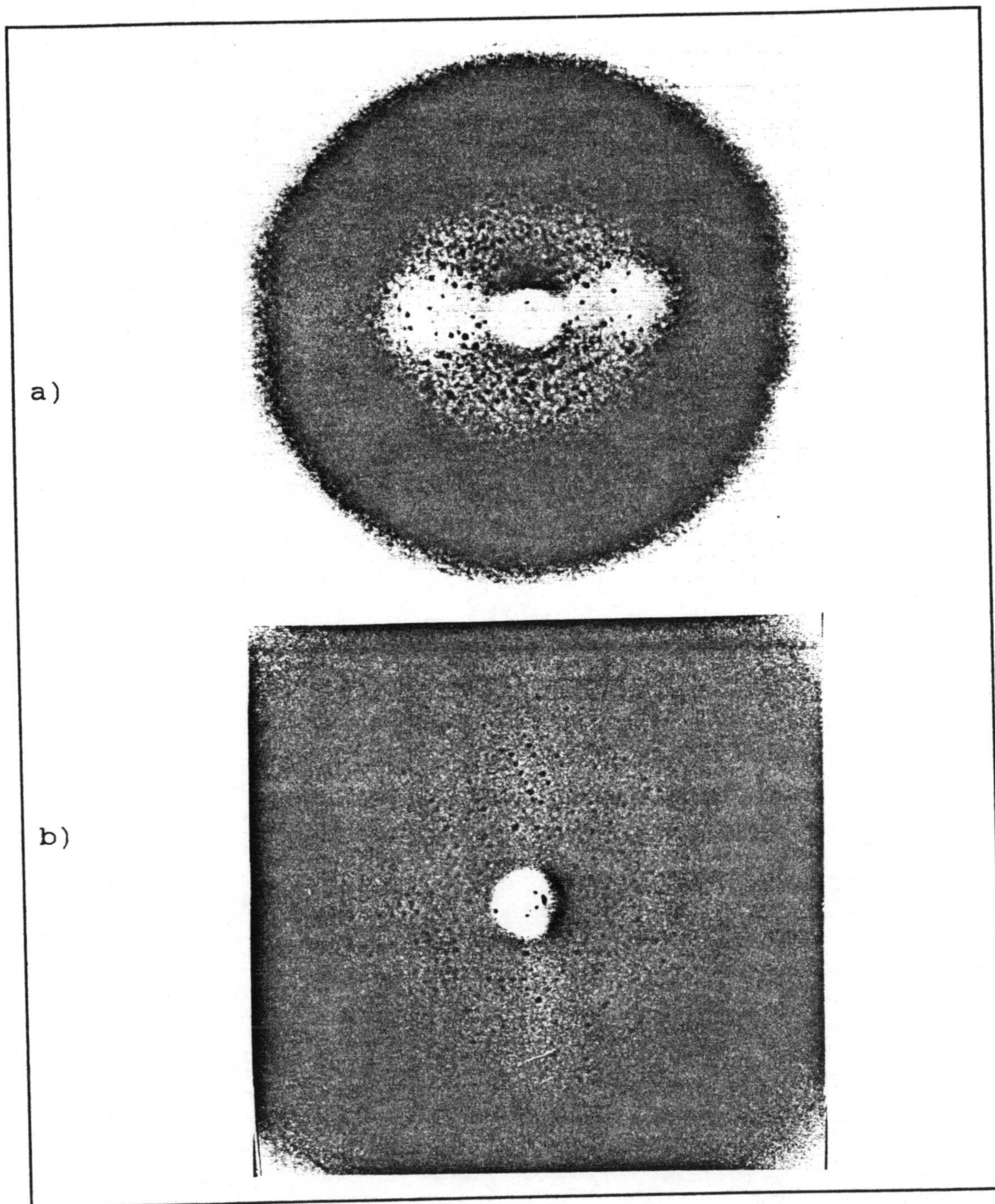


Figura 4-34

Patrones de difracción de rayos-X de cristales de biliproteínas de *Spirulina platensis*:
a) cristal de C-PC y b) cristal de APC.

4.3.-ESTABILIDAD DE BILIPROTEÍNAS.

4.3.1.-Influencia de la temperatura.

Se han preparado disoluciones de C-PC en tampón de fosfatos 20 mM y pH=7 y se ha medido la absorbancia de las mismas en el máximo característico de dicha biliproteína, 620 nm, después de someterlas a una temperatura fija en función del tiempo. Para ello se ha usado un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda 5 con el correspondiente equipo de termostatación externa del compartimento de muestras. La dependencia con la temperatura y tiempo se ha medido en el rango de 30-70 °C durante un período de 1 hora a intervalos de 5 minutos. La concentración utilizada en todos los casos fue de 0.26 mg/ml. En la Tabla 4-XV se muestran los valores de absorbancia en el máximo de absorción de C-PC, en función del tiempo y en la Figura 4-35, la representación de la absorbancia como porcentaje sobre la absorbancia inicial de las disoluciones.

TABLA 4-XV

Valores de absorbancia a 620 nm de varias disoluciones de C-PC, a distintas temperaturas en función del tiempo. [C-PC]= 0.26 mg/ml en fosfato 20 mM pH=7.

| Tiempo (min) | 30° C | 40° C | 50° C | 60° C | 70° C |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 1.100 | 1.132 | 1.188 | 1.081 | 1.056 |
| 5 | 1.100 | 1.120 | 1.046 | 0.931 | 0.290 |
| 10 | 1.100 | 1.105 | 1.016 | 0.880 | 0.243 |
| 15 | 1.100 | 1.103 | 1.007 | 0.830 | 0.227 |
| 20 | 1.100 | 1.090 | 1.000 | 0.771 | 0.217 |
| 25 | 1.100 | 1.090 | 0.996 | 0.743 | 0.209 |
| 30 | 1.100 | 1.090 | 0.994 | 0.718 | 0.204 |
| 35 | 1.100 | 1.090 | 0.989 | 0.695 | 0.199 |
| 40 | 1.100 | 1.089 | 0.986 | 0.672 | 0.195 |
| 45 | 1.100 | 1.088 | 0.983 | 0.651 | 0.193 |
| 50 | 1.100 | 1.083 | 0.982 | 0.628 | 0.190 |
| 55 | 1.100 | 1.085 | 0.978 | 0.606 | 0.187 |

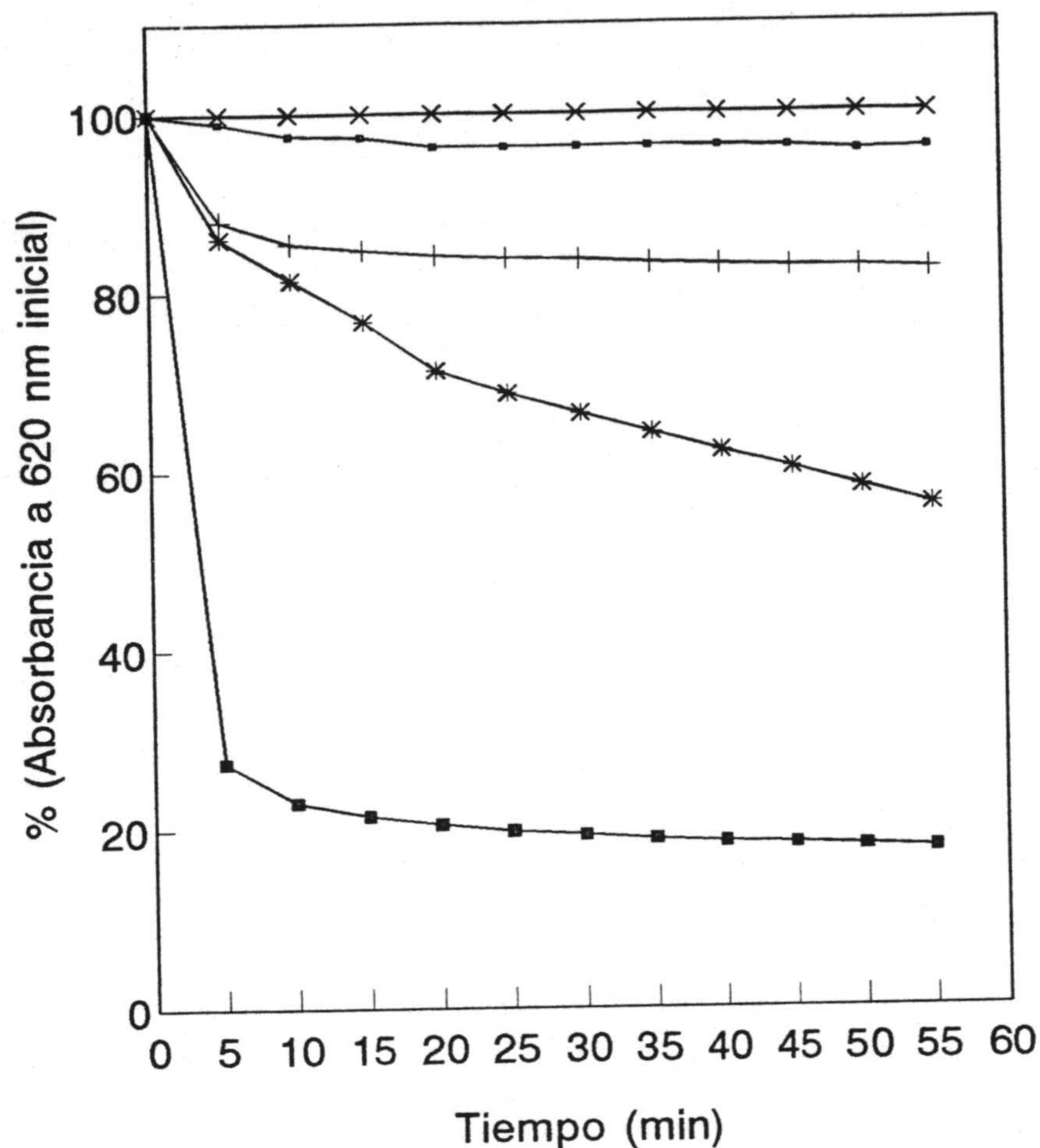


Figura 4-35

Estabilidad térmica de C-PC de *Spirulina platensis*. La concentración de proteína se ajustó a 0.26 mg/ml en fosfato 20 mM y pH=7. La absorbancia se representa como un porcentaje de la absorbancia inicial a 620 nm. ×30° C, -□- 40° C, +50° C, *60° C, -■-70° C.

Como se puede observar, a 30 y 40° C el espectro de C-PC permanece prácticamente invariable durante un periodo de 60 min. A 50° C hay un 18% aproximadamente de disminución en la absorbancia a 620 nm, que se alcanza en los primeros 15 minutos. A 60° C se produce una disminución de hasta un 44% alcanzándose éste de forma gradual al final de los 60 min. A 70° C el descenso en la absorbancia a 620 nm es de un 83% y éste se alcanza prácticamente en los diez primeros minutos.

Con respecto a APC se prepararon disoluciones de concentración igual a 0.17 mg/ml en tampón de fosfatos 20 mM y pH=7. Siguiendo las mismas pautas experimentales que con C-PC se han obtenido los valores de absorbancia en el máximo característico de APC (650 nm), en función del tiempo, que se indican en la Tabla 4-XVI.

TABLA 4-XVI

Valores de absorbancia a 650 nm de varias disoluciones de APC (0.17 mg/ml) en fosfatos 20 mM pH=7, en función del tiempo.

| Tiempo (min) | 30° C | 40° C | 50° C | 60° C | 70° C |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 0.245 | 0.243 | 0.245 | 0.240 | 0.247 |
| 5 | 0.245 | 0.242 | 0.220 | 0.097 | 0.055 |
| 10 | 0.245 | 0.241 | 0.220 | 0.091 | 0.053 |
| 15 | 0.245 | 0.240 | 0.220 | 0.085 | 0.052 |
| 20 | 0.245 | 0.239 | 0.219 | 0.082 | 0.052 |
| 25 | 0.245 | 0.240 | 0.216 | 0.079 | 0.052 |
| 30 | 0.245 | 0.240 | 0.216 | 0.076 | 0.051 |
| 35 | 0.245 | 0.240 | 0.214 | 0.073 | 0.052 |
| 40 | 0.245 | 0.239 | 0.213 | 0.073 | 0.052 |
| 45 | 0.245 | 0.239 | 0.212 | 0.073 | 0.051 |
| 50 | 0.245 | 0.239 | 0.212 | 0.073 | 0.052 |
| 55 | 0.245 | 0.239 | 0.209 | 0.073 | 0.051 |

La Figura 4-36 muestra la absorbancia a 650 nm, como porcentaje de la absorbancia inicial a esta longitud de onda, de cada una de las disoluciones.

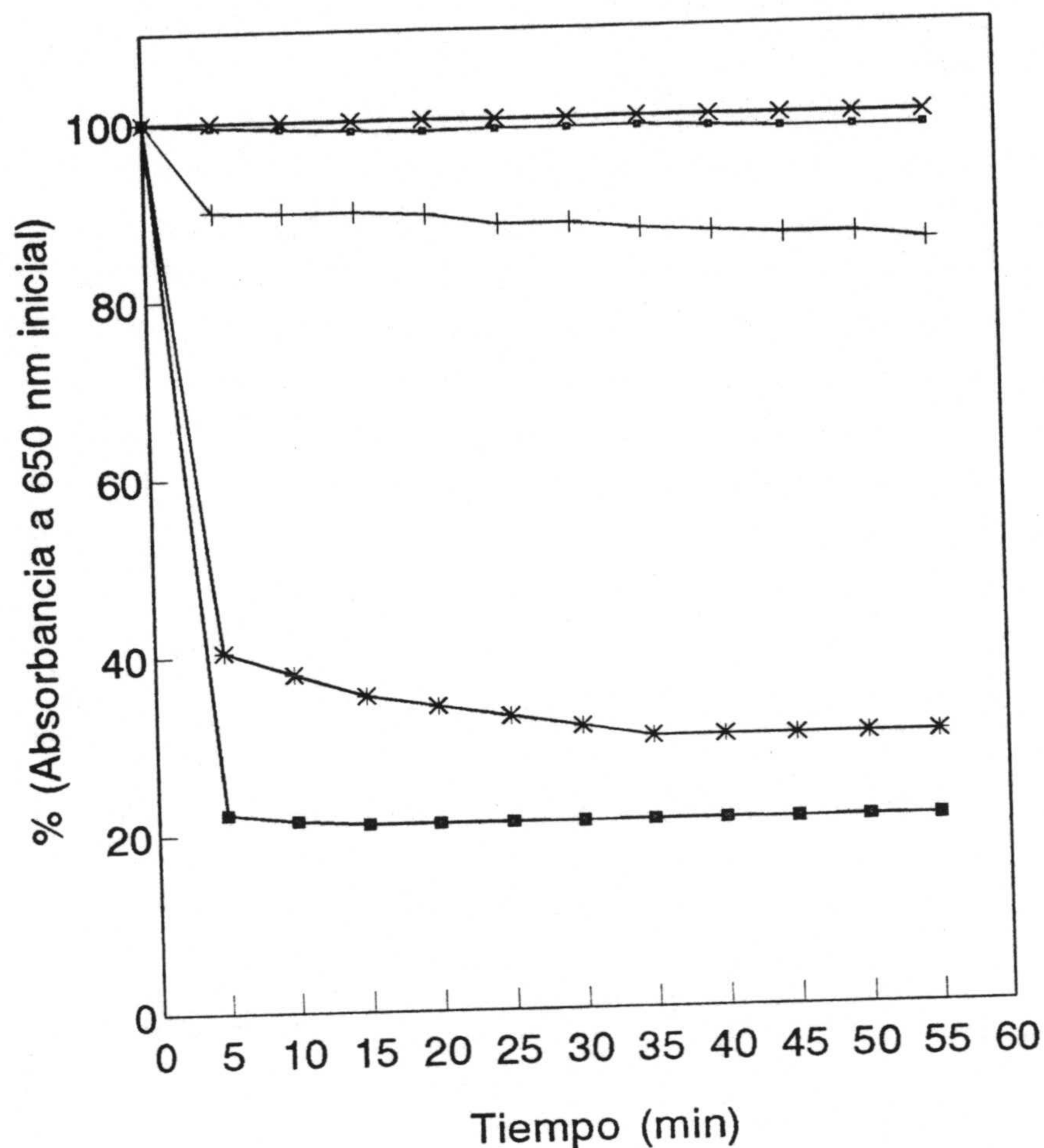


Figura 4-36

Estabilidad térmica de APC de *Spirulina platensis*. [APC]=0.17 mg/ml en fosfato 20 mM pH=7. Se representa la absorbancia como un porcentaje de la absorbancia inicial a 650 nm. ×30°C, -□- 40°C, +50°C, *60°C, -■- 70°C.

Al igual que sucedía con las disoluciones de C-PC, a 30 y 40°C, el espectro de absorción de APC permanece prácticamente invariable durante el periodo de 60 min. A 50°C se produce una disminución del 15% sobre la A_{650} inicial que se alcanza en los primeros quince minutos. A 60°C se produce una disminución brusca de A_{650} de hasta un 70% en los primeros 10 minutos, a 70°C y sólo en cinco minutos se produce una disminución del 79%. Esto indica una menor estabilidad térmica de APC a 60° frente a la exhibida por C-PC, aunque a las otras temperaturas ensayadas, ambas biliproteínas se comportan de forma similar. La comparación con los resultados publicados por Gysi y Zuber (1979) para APC II

procedente de *M. laminosus*, indican una menor termoestabilidad para APC de *Spirulina platensis*.

Debido a su papel como pigmentos antena de *Spirulina platensis*, C-PC y APC deben ser termoestables. El hecho de que, incluso después de su extracción del alga y subsiguiente purificación, ambas biliproteínas muestren una razonable termoestabilidad, parece indicar que ésta no puede deberse exclusivamente al ambiente intracelular, sino más bien a que es una propiedad inherente de las cadenas polipeptídicas.

4.3.2.-Influencia del pH.

Se han preparado disoluciones de ambas biliproteínas, de concentraciones apropiadas, en tampón de fosfatos 20 mM a cada uno de los pH a ensayar. Los distintos valores de pH se han alcanzado mediante la mezcla de las cantidades necesarias de fosfato disódico y monopotásico, así como la adición de KOH y H₃PO₃, cuando fue necesario, para completar todo el intervalo de pH estudiado.

En todos los casos, se han efectuado dos medidas de pH para cada disolución. Una inicial tomada inmediatamente después de la disolución de la proteína en el tampón y otra una vez transcurridos siete días en oscuridad a 4° C. Asimismo se ha medido la absorbancia y fluorescencia de mencionadas disoluciones. Todas las medidas se han llevado a cabo a 25° C.

En lo que se refiere a C-PC, la concentración fue de 0.1 mg/ml. En la Figura 4-37 se pueden observar los espectros de absorción uv-visible de dichas disoluciones, registrados inmediatamente después de la disolución de la proteína en el tampón.

En el intervalo de pH 4-8 el espectro de absorción de CPC corresponde al de la proteína en un medio favorable, mientras que para 4 < pH < 8, la relación entre los picos característicos de C-PC (620,350,280 nm) deja de ser la usual que presenta la proteína cuando se encuentra en medios favorables e incluso, como ocurre a pH= 2 y 11, el espectro aparece totalmente distorsionado y muestra nuevos picos y hombros.

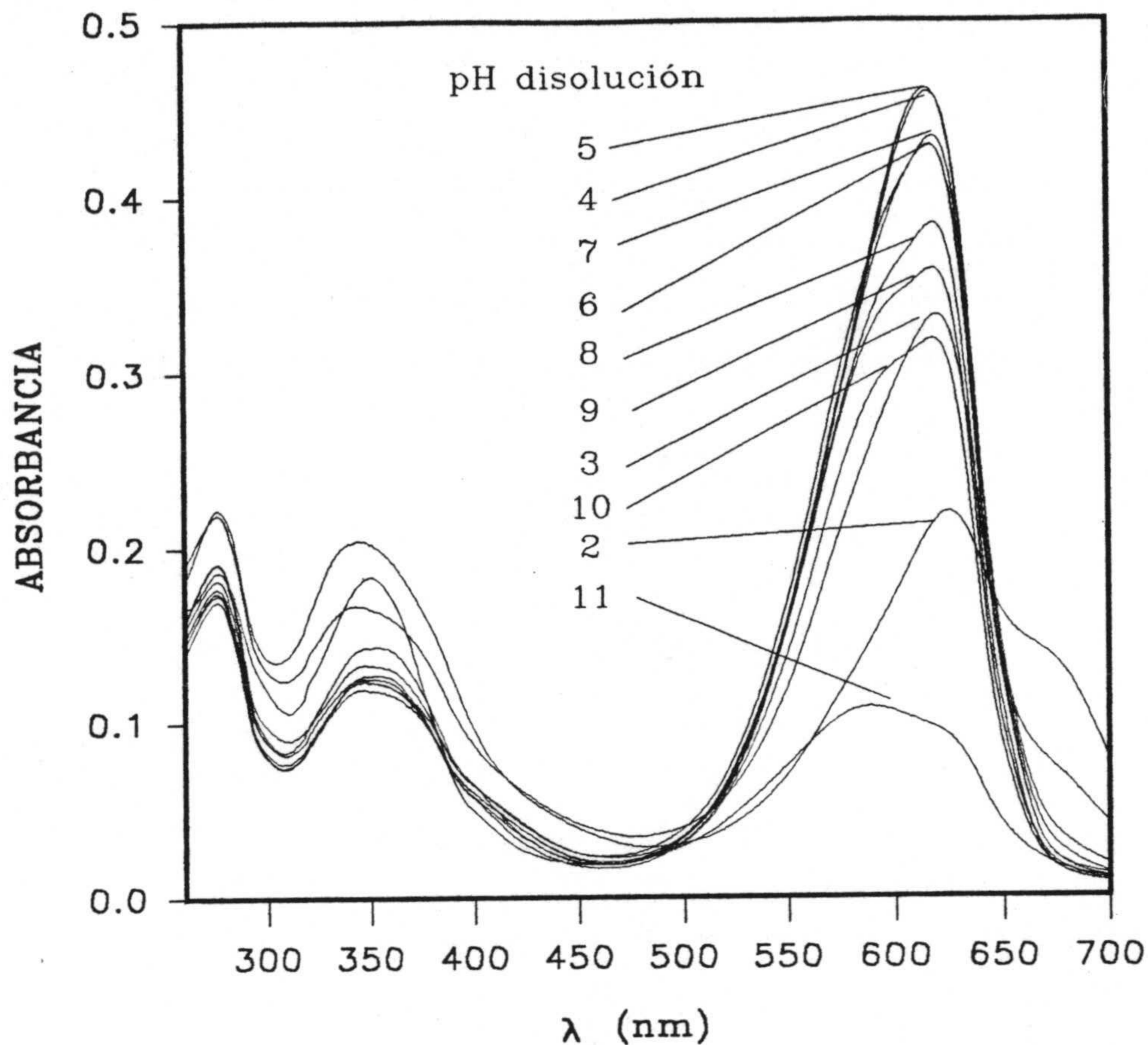


Figura 4-37

Dependencia con el pH del espectro de absorción uv-visible de C-ficocianina.

En las Figuras 4-37 y 4-38 puede observarse que la sensibilidad espectral a 620 nm es máxima entre pH 4 y 8, mientras que fuera de este margen hay una disminución importante de la absorbancia. De los resultados obtenidos también se desprende que los cambios espectrales en las zonas alcalina y ácida son irreversibles, ya que, después de transcurridos 7 días, los valores de A_{620} medidos al correspondiente pH han resultado incluso inferiores a los obtenidos tras inmediata disolución. Además, después de mantenidas las disoluciones a cada pH estudiado durante los ya mencionados 7 días, las diferentes disoluciones se dializaron frente a tampón de fosfatos 20 mM de pH 7, durante 24 h y seguidamente se registraron sus espectros de absorción. Estos han resultado esencialmente iguales que los obtenidos antes de la diálisis, lo que demuestra que el proceso de desnaturalización por la acción del pH es irreversible.

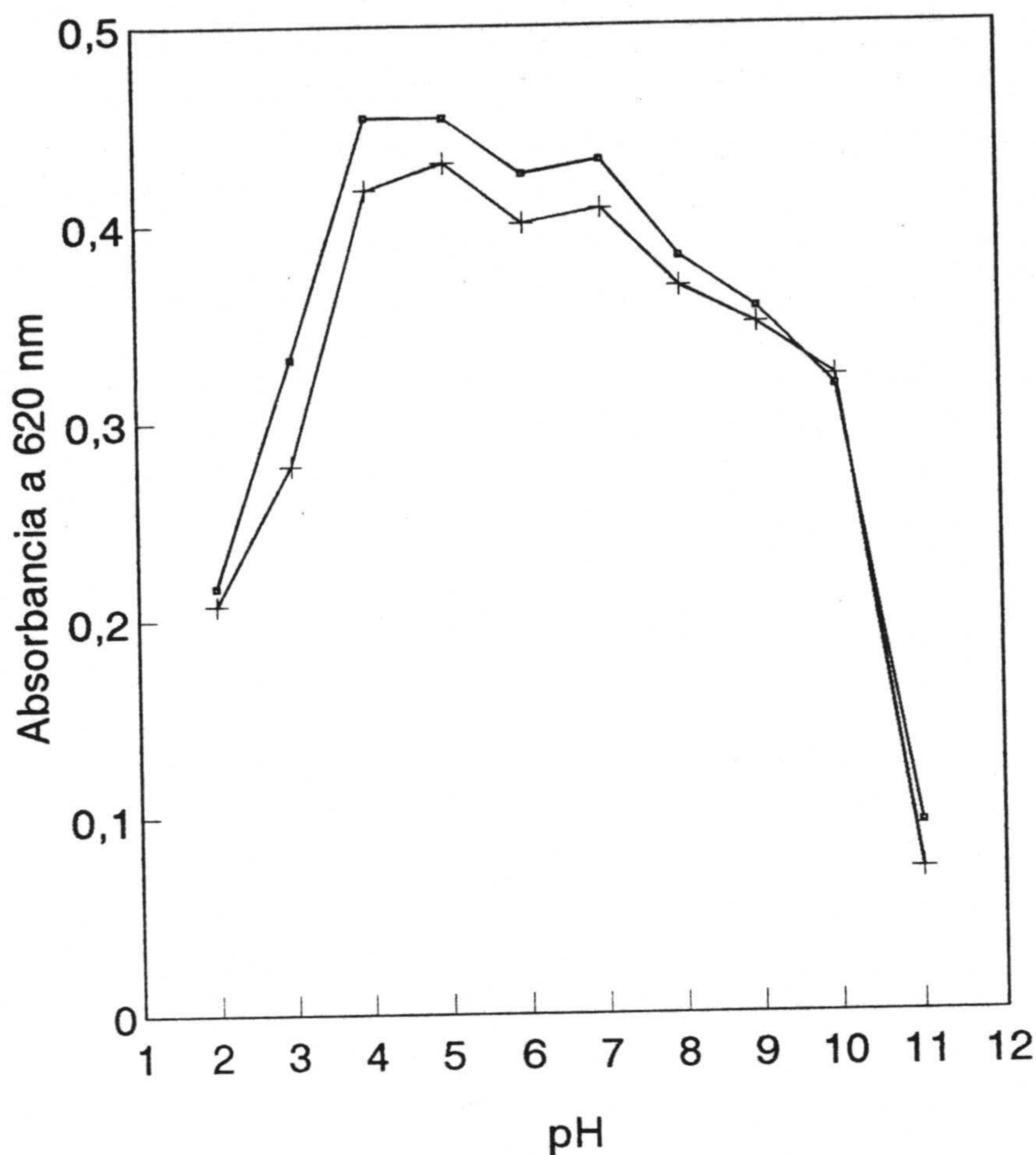


Figura 4-38

Dependencia con el pH del valor de absorbancia en el máximo de absorción de C-PC.
 □ Inmediatamente después de la disolución de la proteína. + Después de transcurridos 7 días.

La posición del máximo de absorción también varía ligeramente con el pH de la disolución. Así, para pH=4 se encuentra situado a 615 nm y se desplaza hacia el rojo con el aumento de pH, llegando a situarse a 620 nm para pH=7. Estos resultados son concordantes con los descritos por otros autores (Glazer, 1988) con biliproteínas procedentes de distintas microalgas.

Debido a la mayor sensibilidad de la espectrofluorimetría, también se ha estudiado la influencia del pH mediante el seguimiento de las propiedades fluorescentes de C-PC. En las

Figuras 4-39 y 4-40 puede apreciarse que la intensidad de fluorescencia alcanza un valor máximo a pH=7, mientras que a pH 4 y 5 que son los valores que proporcionan mayor absorbancia, las intensidades de fluorescencia son considerablemente menores que a pH 7. Este efecto se puede explicar teniendo en cuenta el quenching que provocan las sales del tampón. Efectivamente, la desactivación bimolecular provocada por los aniones fosfato debe de aumentar en magnitud con la disminución del pH, ya que, a causa del valor del pKa del equilibrio monoanión \rightleftharpoons dianión el fosfato se transforma preferencialmente en monoanión cuando disminuye el pH. Por otra parte, esta disminución de pH también provoca en la proteína una disminución en su densidad de carga negativa, junto al correspondiente aumento del número de cargas positivas. Este efecto es más acusado en las cercanías del punto isoeléctrico de la proteína que tiene un valor de 5 en el caso de C-PC. Rebasado éste, la atracción electrostática entre la proteína y el anión fosfato aumenta considerablemente y permite justificar, aunque de forma cualitativa, la disminución de la señal fluorescente.

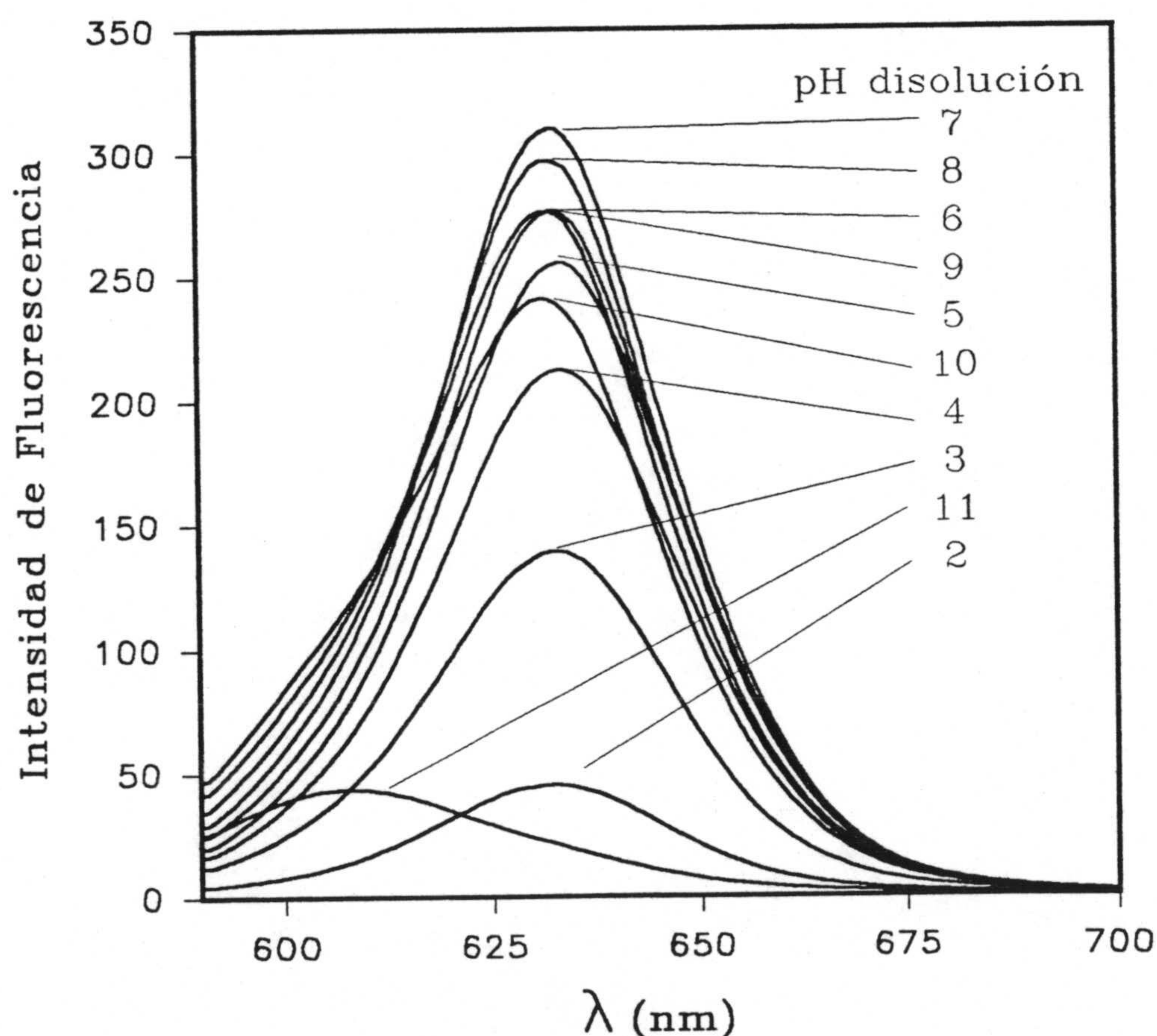


Figura 4-39

Dependencia del espectro de emisión de fluorescencia de C-PC con el pH. [CPC]=0.1 mg/ml en fosfato 20 mM. $\lambda_{\text{exci}}=568$ nm.

En la Figura 4-40 se observa que las propiedades fluorescentes de C-PC se mantienen cercanas al valor óptimo en un rango de pH 5-9, disminuyendo bruscamente para valores fuera de este rango. Transcurridos 7 días los valores obtenidos son en general inferiores a los medidos tras la inmediata disolución de la proteína y permanecen prácticamente constantes después de la diálisis frente a tampón de pH 7.

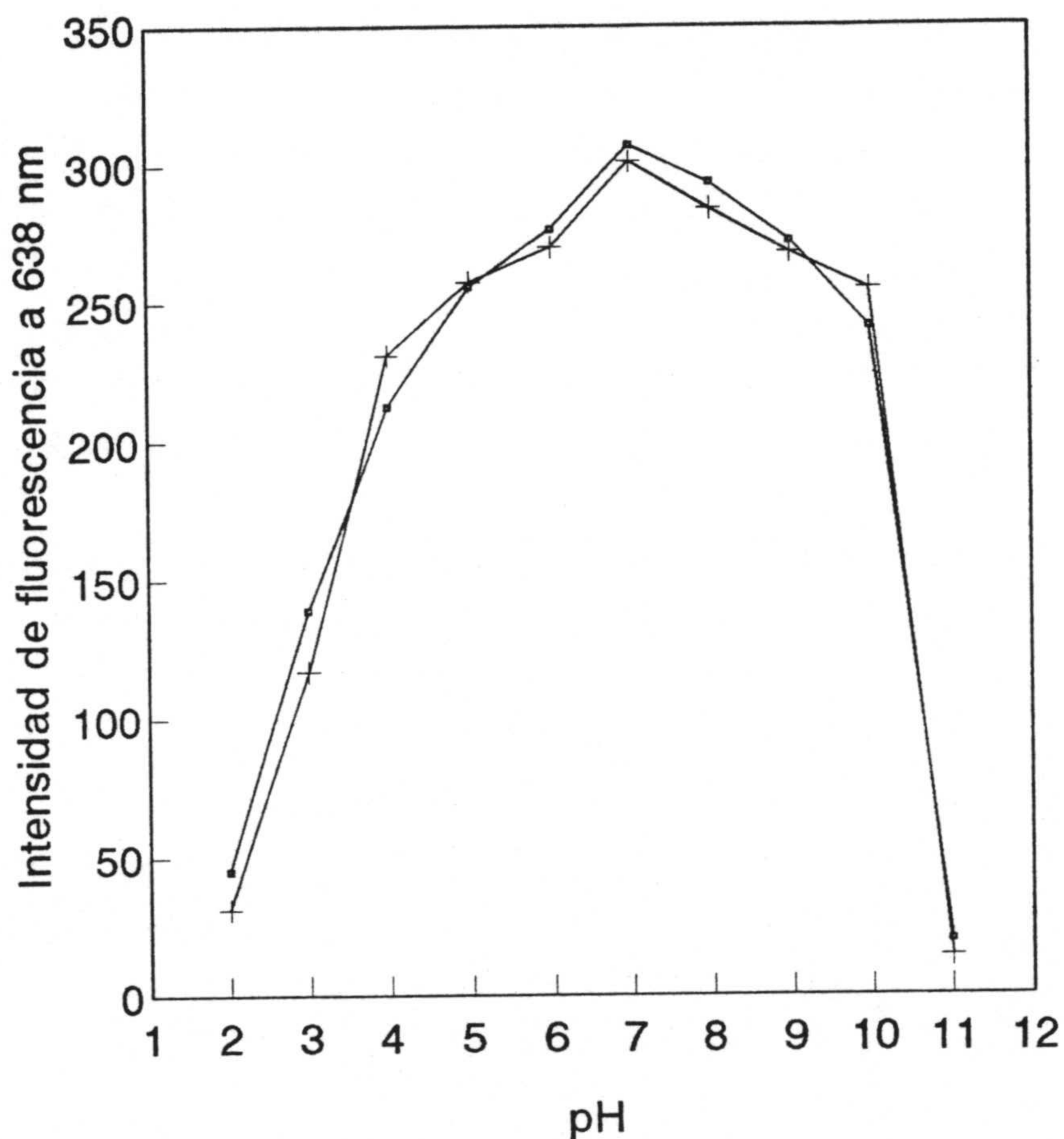


Figura 4-40

Dependencia con el pH de la Intensidad de fluorescencia medida en el máximo de emisión (638 nm) para C-PC (0.1 mg/ml) en fosfato 20 mM. □ Inmediatamente después de la disolución de la proteína. + Después de 7 días.

En lo que se refiere a APC se prepararon disoluciones de los mismos pH anteriores en tampón fosfatos 20 mM. La concentración de APC utilizada ha sido de 0.13 mg/ml.

En la Figura 4-41 se muestra como varía la absorción en el máximo del espectro uv-visible de APC en función del pH. Las condiciones más favorables están comprendidas en un intervalo de pH entre 5 y 10, fuera del cual hay un acusado descenso en las propiedades absorciométricas. De la misma forma que ocurría para C-PC los cambios inducidos por el pH no se recuperan con el tiempo y tras 7 días los valores de A_{650} son inferiores a los tomados inicialmente.

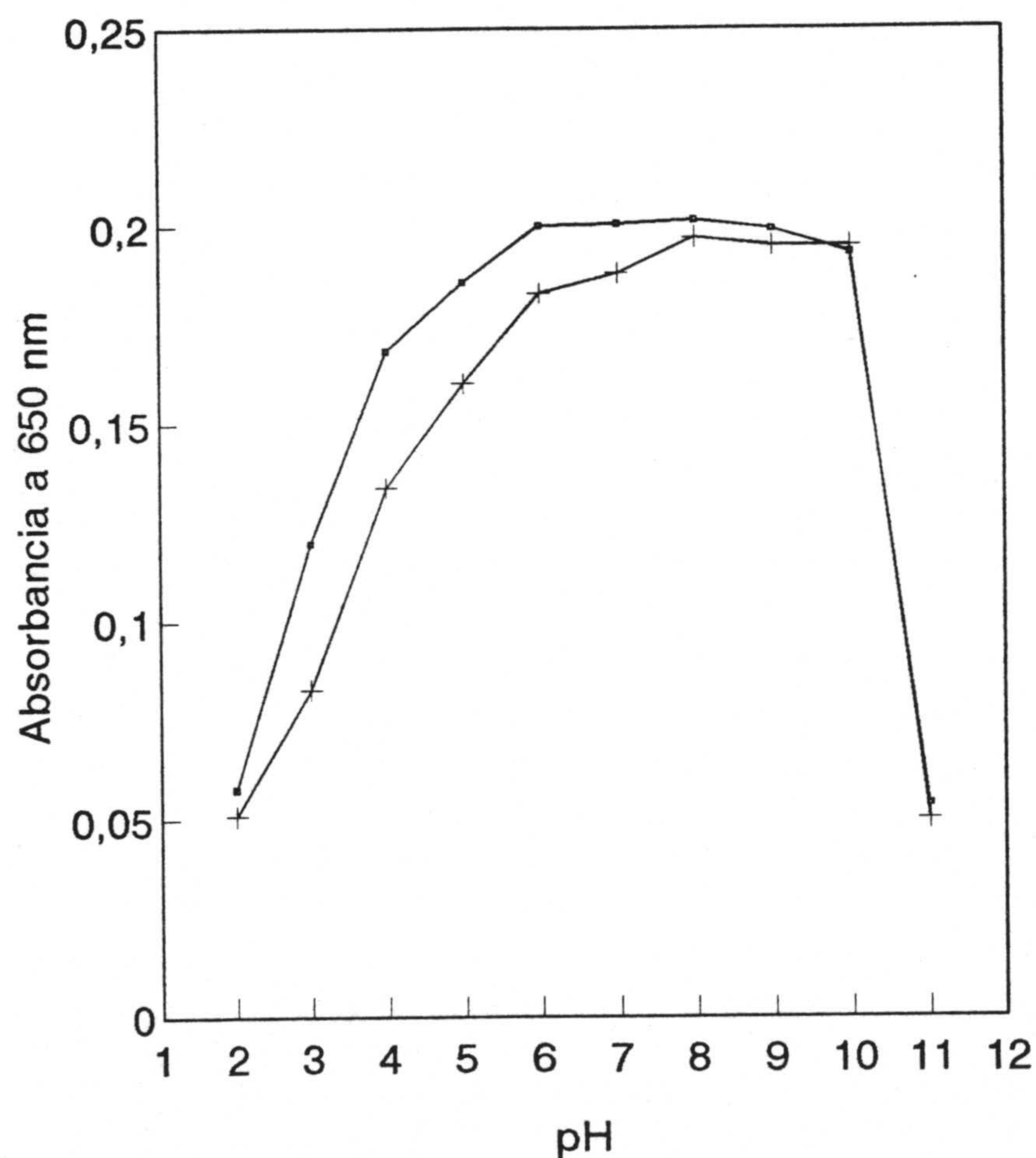


Figura 4-41

Dependencia con el pH del valor de absorbancia medida en el máximo del espectro uv-visible de APC. [APC]=0.13 mg/ml en fosfato 20 mM. □ Inmediatamente después de disolver la proteína. + Después de 7 días.

En este caso y al contrario que ocurría con las disoluciones de C-PC, la posición del máximo de absorción no varía en función del pH de la disolución de APC, manteniéndose siempre en 650 nm.

La Figura 4-42 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de APC a distintos pH. El valor máximo de intensidad de fluorescencia se alcanza en una disolución de pH=7 al igual que ocurría para C-PC.

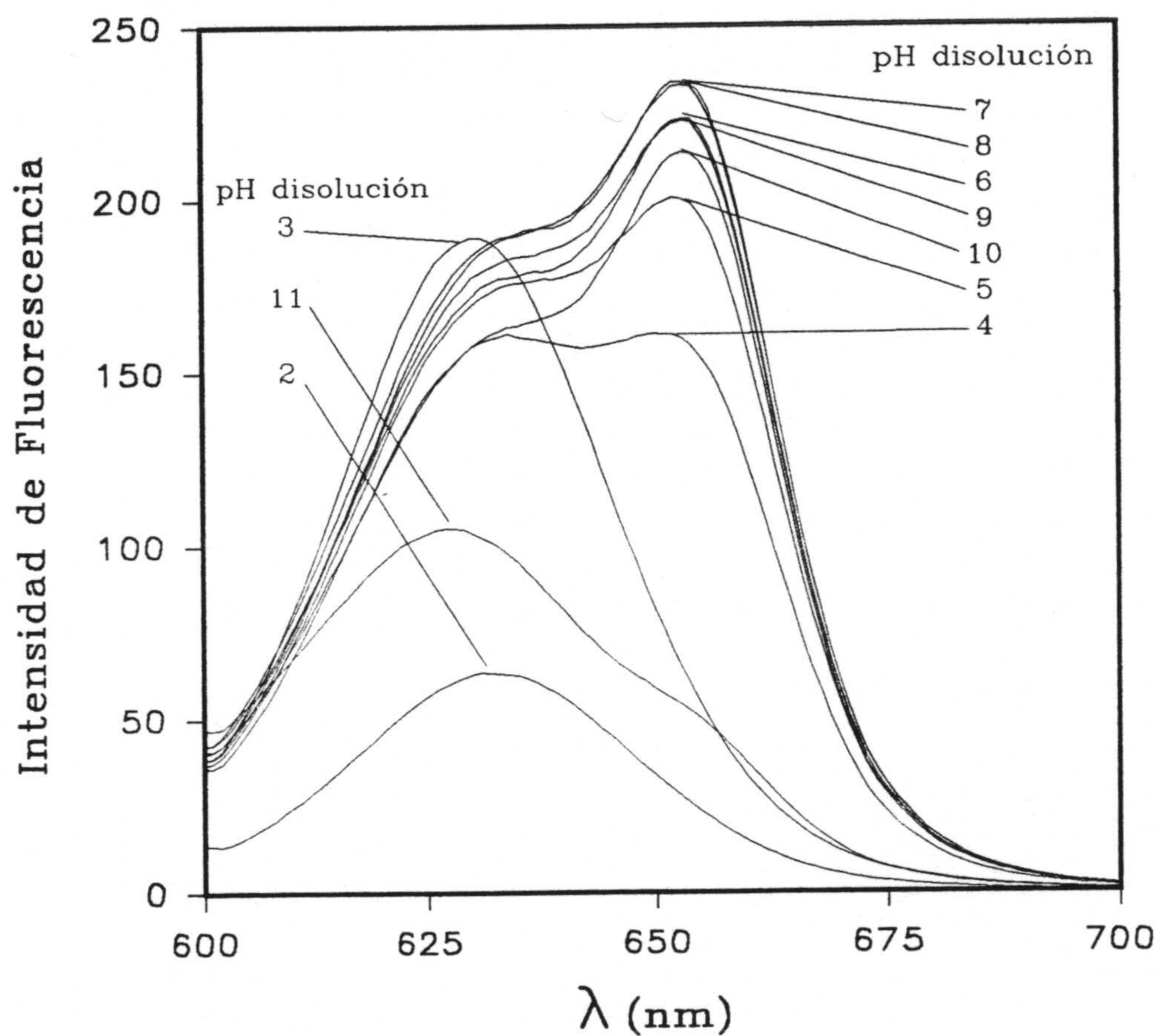


Figura 4-42

Dependencia del espectro de emisión de fluorescencia de APC con el pH. $\lambda_{ex}=590$ nm.

En la Figura 4-43 se puede observar que las propiedades fluorescentes de APC se mantienen próximas al valor óptimo en un rango de pH 6-10, decreciendo bruscamente para valores fuera del mismo. Las medidas tomadas transcurridos 7 días muestran valores en general inferiores a los medidos al preparar las disoluciones y permanecen prácticamente

constantes tras diálisis frente a tampón de pH 7.

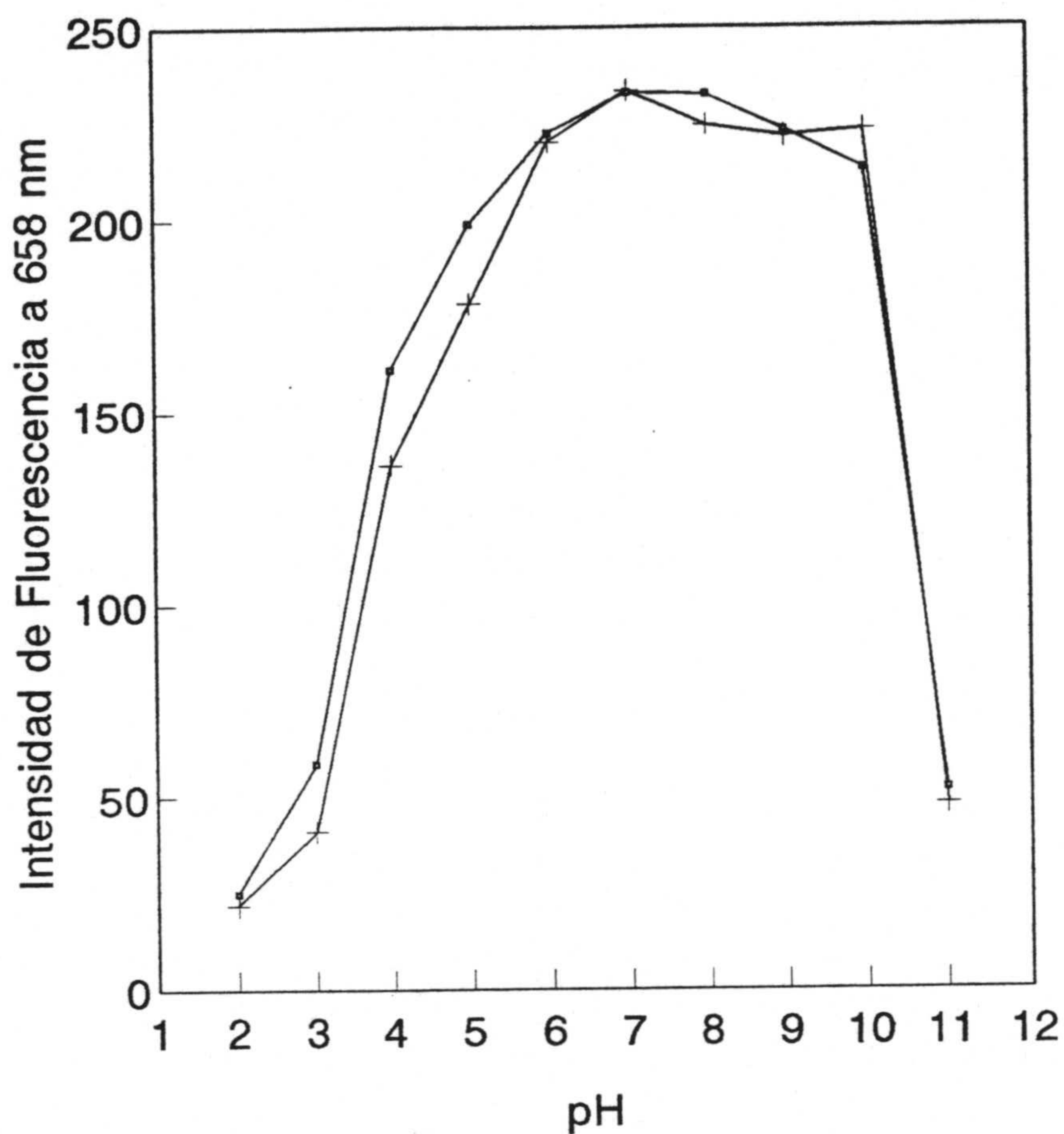


Figura 4-43

Dependencia con el pH de la intensidad de fluorescencia medida en el máximo de emisión (658 nm) para APC. [APC]=0.13 mg/ml en fosfato 20 mM. □ Inmediatamente después de la disolución de la proteína en el tampón. +Después de 7 días.

4.4.-ESTRUCTURA SECUNDARIA DE BILIPROTEÍNAS (FT-IR).

En este apartado se ha aplicado la espectroscopía de FT-IR al estudio de la estructura secundaria de las biliproteínas C-ficocianina (C-PC) y aloficocianina (APC) en agua deuterada. Las muestras de proteínas se prepararon a una concentración de 10 mg/ml. Las condiciones experimentales vienen detalladas en el apartado 3.3.5 de Métodos. Para poder observar las diferentes componentes de la banda amida I, se han aplicado a los espectros de absorción originales (obtenidos como se ha indicado en el apartado 3.3.5) los métodos de incremento en la resolución utilizados normalmente, como son la autodeconvolución de Fourier y la derivación en el espacio Fourier (Braiman y Rothschild, 1988; Surewicz y Mantsch, 1988).

4.4.1-Estructura secundaria de C-ficocianina:

En la Figura 4-44 se muestra el espectro FT-IR de C-PC.

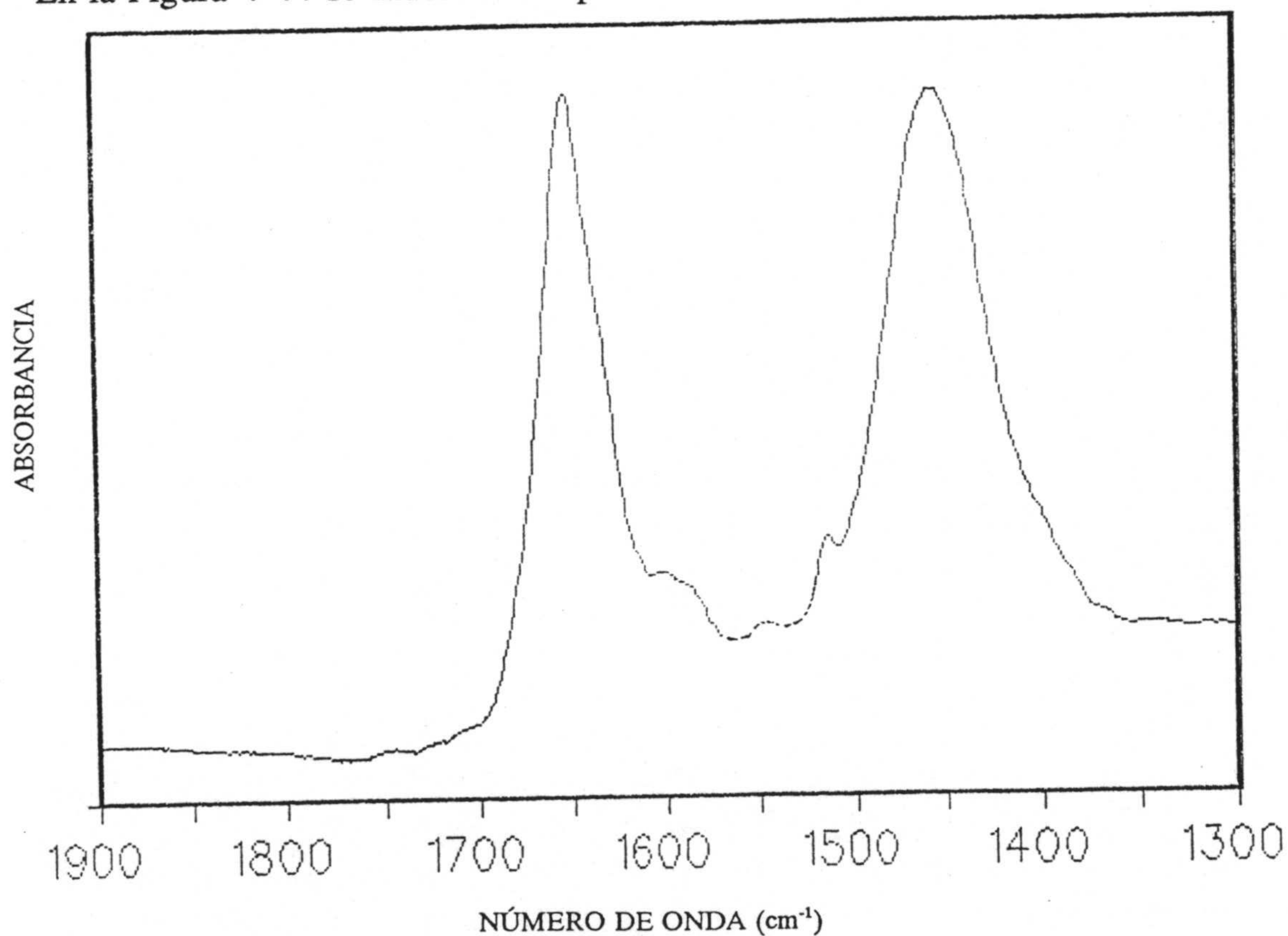


Figura 4-44

Espectro de FT-IR, entre 1300 y 1900 cm^{-1} de C-PC 10 mg/ml en D_2O pH 5 a 25°C, después de sustraer el espectro del D_2O .

En la Figura 4-45 pueden observarse las posiciones de los distintos componentes estructurales para C-ficocianina en disolución, deducidas a partir del espectro derivado.

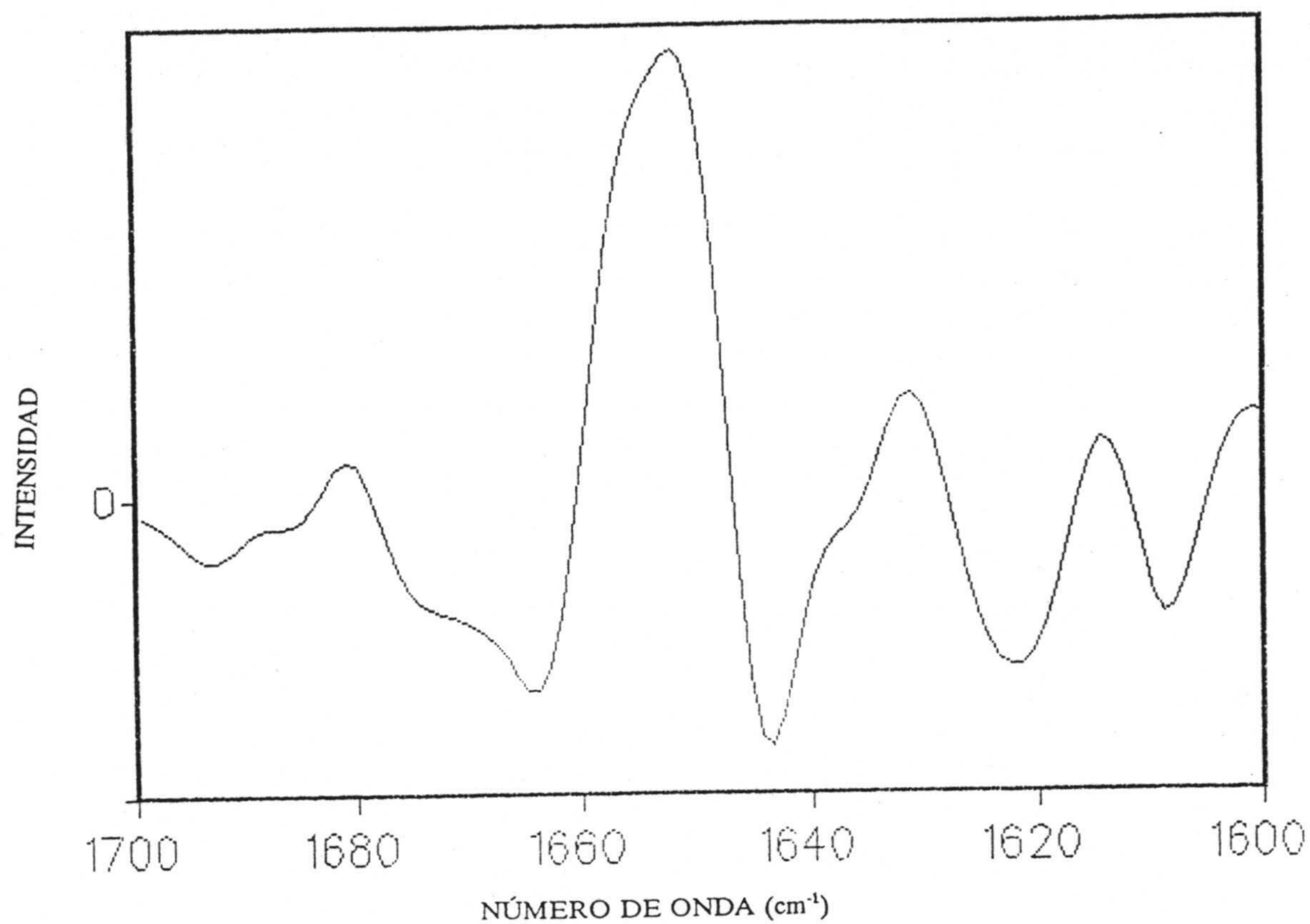
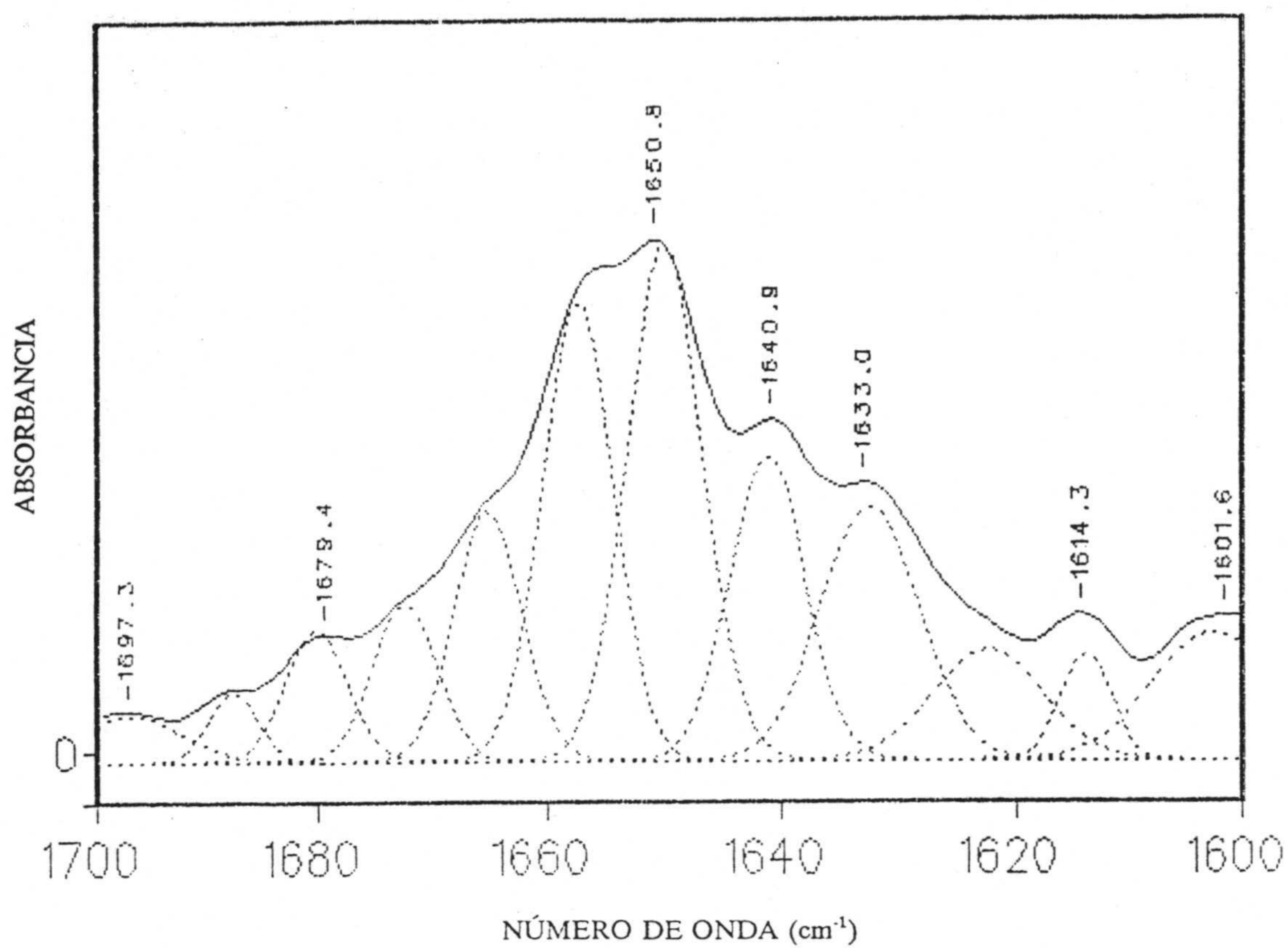


Figura 4-45

Espectro de tercera derivada (con punto de corte igual a 0.3) de la banda amida I.

En la Figura 4-46, se muestra el ajuste del espectro deconvuelto de la banda amida I.

En la Tabla 4-XVII, se muestra la asignación propuesta de estructura secundaria calculada mediante el ajuste de la banda amida I en el espectro deconvuelto.

**Figura 4-46**

Autodeconvolución de Fourier y ajuste de la banda del espectro de absorción en la que se ha utilizado una anchura media de banda de 17.84 cm^{-1} y un factor de incremento en la de resolución, K , de 2.5.

TABLA 4-XVII

Estructura secundaria propuesta para C-ficocianina de *Spirulina platensis*.

| Posición ν (cm^{-1}) | Asignación | Area (%) |
|-------------------------------------|---------------|----------|
| 1622 | β | 7 |
| 1632 | β | 15 |
| 1641 | R | 13 |
| 1650 | α | 23 |
| 1657 | α | 19 |
| 1665 | T | 10 |
| 1672 | T (β) | 6 |
| 1680 | T (β) | 5 |
| 1688 | β | 2 |

α =hélice alfa; β =lámina beta; R= Estructura no ordenada (Random); T= Estructura tipo giros.

La Tabla 4-XVIII, resume la estructura secundaria encontrada para C-ficocianina de *Spirulina platensis*. Podemos observar que la ordenación en hélices α es más abundante que en láminas β . De la misma forma, aparece un porcentaje similar de giros (T) que de ordenación Random.

TABLA 4-XVIII

Cuantificación de estructura secundaria para C-ficocianina de *Spirulina platensis*.

| Tipo de estructura | Distribución (%) |
|--------------------|------------------|
| α | 42 |
| β | 24-35 |
| R | 13 |
| T | 21-10 |

4.4.2-Estructura secundaria de Aloficocianina.

En la Figura 4-47 se muestra el espectro FT-IR de APC.

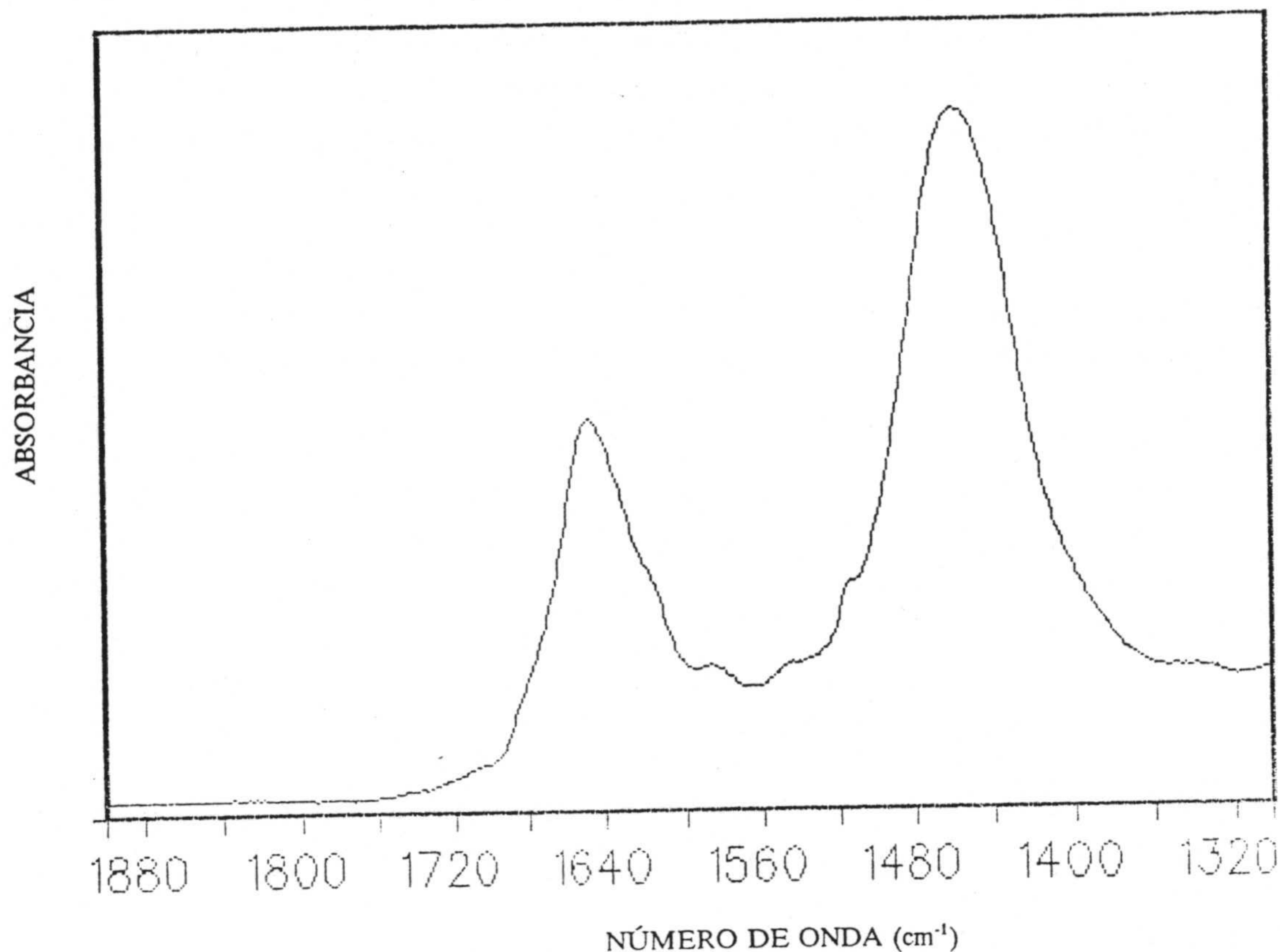


Figura 4-47

Espectro de FT-IR entre 1300 y 1900 cm^{-1} de APC 10 mg/ml en D_2O pH 5 y 25 °C después de sustraer el espectro del D_2O .

En la Figura 4-48, pueden observarse las posiciones de los distintos componentes estructurales para Aloficocianina en disolución, deducidas a partir del espectro derivado.

En la Figura 4-49, se muestra el ajuste del espectro deconvuelto de la banda amida I.

La Tabla 4-XIX indica la asignación propuesta de estructura y la Tabla 4-XX recoge la estructura secundaria encontrada para APC. Al contrario que en C-PC, predomina aunque con escasa diferencia, la ordenación plegada en láminas β frente a la ordenación en hélices α . Al igual que en C-PC existen porcentajes muy similares de ordenación en giros y Random.

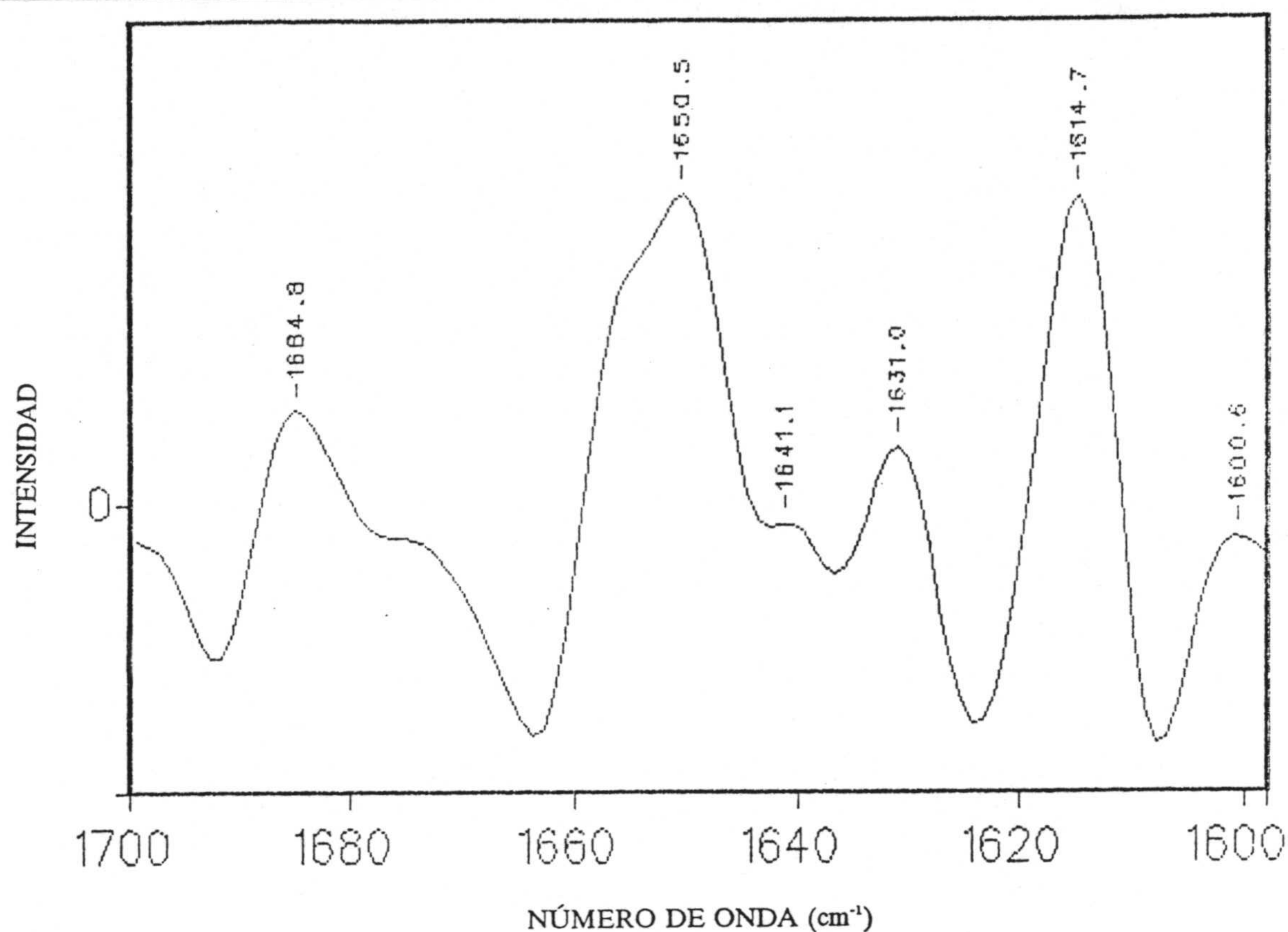


Figura 4-48

Espectro de tercera derivada (con punto de corte igual a 0.3) de la banda amida I.

TABLA 4-XIX

Estructura secundaria propuesta para aloficocianina de *Spirulina platensis*.

| Frecuencia ν (cm ⁻¹) | Tipo de estructura | Area (%) |
|--------------------------------------|--------------------|----------|
| 1621 | β | 17 |
| 1633 | β | 16 |
| 1642 | R | 14 |
| 1650 | α | 18 |
| 1657 | α | 13 |
| 1665 | T | 8 |
| 1672 | T (β) | 6 |
| 1680 | T (β) | 5 |
| 1686 | β | 3 |

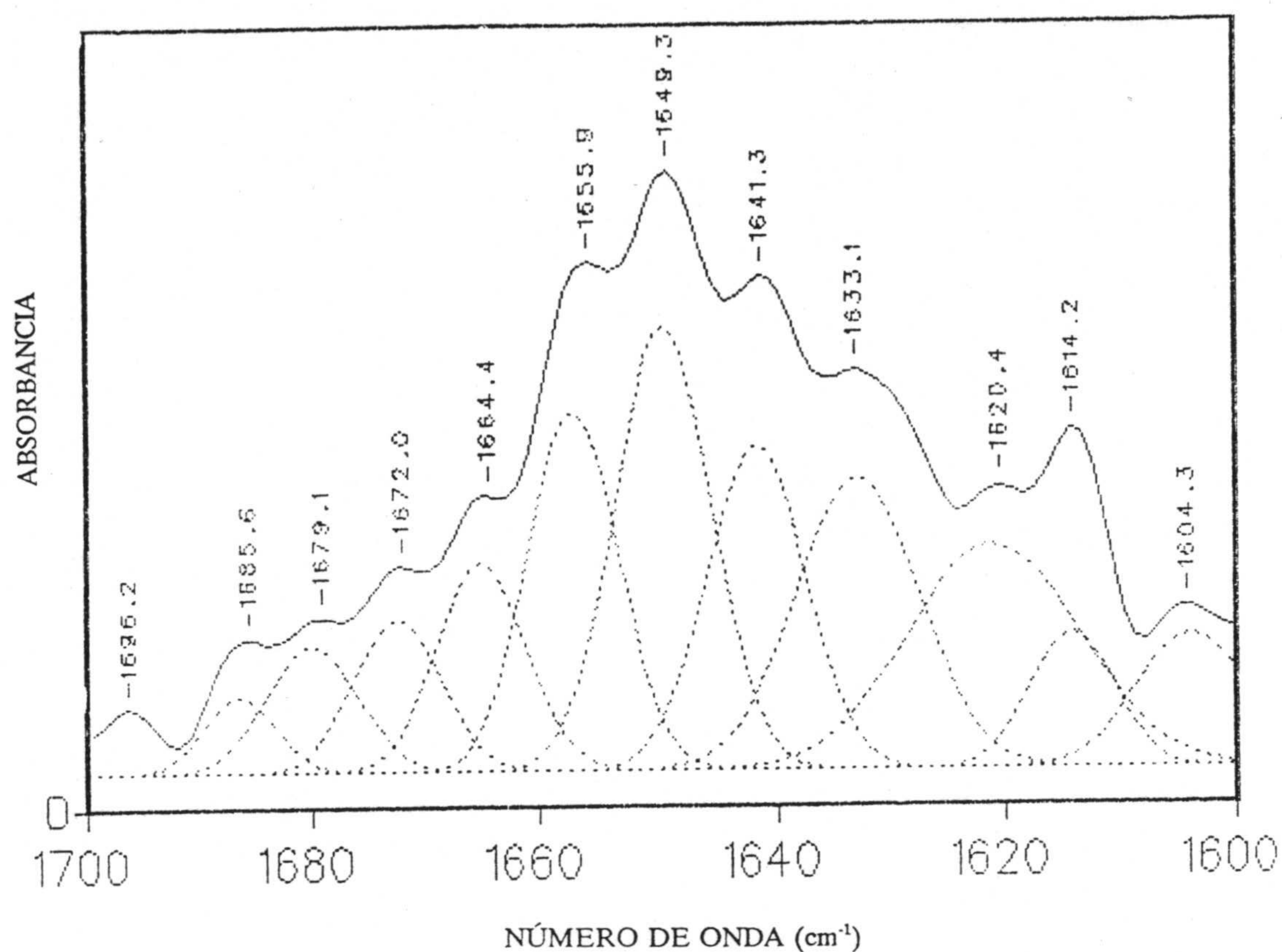


Figura 4-49

Autodeconvolución de Fourier y ajuste de la banda, del espectro de absorción en la que se ha utilizado una anchura media de banda de 17.84 cm^{-1} y un factor de incremento en la resolución, K, de 2.5.

TABLA 4-XX

Cuantificación de estructura secundaria para Aloficocianina de *Spirulina platensis*.

| Tipo de estructura | Distribución (%) |
|--------------------|------------------|
| α | 31 |
| β | 36-47 |
| R | 14 |
| T | 19-8 |

4.4.3.-FT-IR de bilinas.

Tanto C-PC como APC poseen grupos cromóforos denominados ficocianobilinas que se caracterizan por poseer grupos químicos con enlaces C=O y por tanto susceptibles de contribuir a la banda amida I. Para eliminar su posible contribución y por lo tanto su interferencia en la determinación de la estructura secundaria, se ha realizado una experiencia de FT-IR de la ficocianobilina purificada.

Se preparó una disolución de ficocianobilina de una concentración tal que guardase la misma relación de peso, que la que el cromóforo posee en la proteína (0.43 mg/ml). Seguidamente se realizaron los correspondientes espectros de fondo, blanco (metanol) y muestra (ficocianobilina disuelta en metanol), en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para las experiencias de FT-IR de C-PC y APC. Los espectros del cromóforo disuelto en metanol y el del metanol solapan y casi se superponen en la zona de la banda amida I, por lo que la resta de ambos es prácticamente nula. Se puede deducir, por tanto, que la contribución del cromóforo a esta banda no tiene peso estadístico significativo lo cual es lógico si tenemos en cuenta que la concentración de enlaces peptídicos en la proteína es muy superior a la de los grupos C=O presentes en las ficocianobilinas.

4.5.-POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA DE BILIPROTEÍNAS.

Debido a la importancia que para posteriores determinaciones analíticas, que se describirán en esta Memoria, tiene la medida del grado de despolarización de la fluorescencia, se ha abordado el estudio de los espectros de polarización de fluorescencia (de excitación) correspondientes a ambas biliproteínas. En mencionados estudios es de fundamental importancia el estado de agregación en que se encuentran las proteínas, ya que la agregación de monómero hasta trímero provoca un decrecimiento drástico en la polarización de fluorescencia, según han descrito Mimuro y col. (1986) para el caso de C-PC procedente de *Mastigocladus laminosus* y Yeh y col. (1986) para APC procedente de *Anabaena variabilis*.

En nuestro caso, estas características de los espectros de polarización adquieren especial relevancia, ya que en las reacciones químicas que se han de llevar a cabo para derivatizar las biliproteínas y así poderlas enlazar a las macroestructuras biológicas para que actúen como etiquetas fluorescentes, podrían modificar el estado de agregación de las biliproteínas.

Por estos motivos se han obtenido los espectros de polarización de fluorescencia (de excitación) de ambas biliproteínas, tanto en su forma de trímeros como de monómeros. En este sentido y como ya se ha mencionado con anterioridad, C-PC a pH neutro y fuerza iónica milimolar, se encuentra en su forma trimérica (Scott y Berns, 1965; Huang y Berns, 1981). De otra parte, el método de extracción y purificación seguido por nosotros, proporciona APC en estado trimérico, como ha sido ya demostrado a través de sus características espectrales, en el epígrafe correspondiente.

Según Davis y col. (1986) el estado de agregación de C-PC aumenta con la acidez del medio y con el incremento de la fuerza iónica. Este último usualmente se consigue adicionando NaCl al tampón o aumentando la concentración de fosfatos del mismo, aunque en ocasiones se han empleado otras sales, como el sulfato amónico. Sin embargo, determinadas sales tienden a disgregar la proteína (McColl y col., 1971), entre éstas se encuentran las denominadas sales caotrópicas, por su capacidad de desorganizar la estructura acuosa. Así, la adición de perclorato sódico o de tiocianato sódico hasta concentración 1 M, consigue la completa disociación de ambas biliproteínas hasta constituir una disolución homogénea de monómeros, sin que éstos se disocien en sus dos subunidades correspondientes (McColl y col., 1980).

Siguiendo estas indicaciones, se han obtenido disoluciones de monómeros de C-PC y APC mediante la simple adición de NaClO_4 a las disoluciones de biliproteínas en tampón de fosfatos 20 mM, pH=7, hasta que éstas fueron 1 M en NaClO_4 . Con las dos disoluciones así preparadas y con las correspondientes a las formas triméricas de las biliproteínas, se han obtenido los espectros de absorción y de emisión, así como los de polarización de fluorescencia (excitación) correspondientes al estado excitado de menor energía de la proteína.

Para llevar a cabo estas últimas experiencias, las correspondientes disoluciones se han introducido en el porta-muestras del fluorímetro termostatzado a 10 °C. Los valores de polarización se han calculado mediante la expresión:

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$

donde I_{VV} es la intensidad de fluorescencia medida con ambos polarizadores en la posición vertical, I_{VH} es la intensidad de fluorescencia medida con el polarizador de excitación en posición vertical y con el polarizador de emisión horizontal y G es la constante de corrección instrumental, que ha sido calculada como I_{HV}/I_{HH} para las diferentes longitudes de onda de emisión.

Para el caso de C-PC (tanto trómeros como monómeros), la longitud de onda de emisión se ha fijado en 655 nm y la de excitación se ha recorrido cada 5 nm, entre 520 y 645 nm, siendo $\Delta\lambda_{ex} = \Delta\lambda_{em} = 5$ nm. El valor empleado de longitud de onda de emisión permite que, con las condiciones experimentales empleadas ($\Delta\lambda_{ex} = \Delta\lambda_{em} = 5$ nm), se puedan obtener los datos de polarización que corresponden a las mayores longitudes de onda del espectro de excitación, sin interferencias originadas por luz dispersa. Además, esta longitud de onda de emisión corresponde a la zona menos energética del espectro de fluorescencia, lo que permite asegurar que la emisión corresponde al estado excitado de menor energía del cromóforo fluorescente de la biliproteína. En lo que se refiere a la disolución de monómeros de APC, λ_{em} ha sido 650 nm y la λ_{ex} se ha recorrido cada 5 nm, entre 540 y 640 nm. En el caso del espectro de polarización correspondiente a la disolución de trómeros de APC, λ_{em} ha sido 675 nm y la λ_{ex} se ha recorrido cada 5 nm, entre 545 y 665 nm. En ambos casos $\Delta\lambda_{ex} = \Delta\lambda_{em} = 5$ nm. Los valores obtenidos para C-PC y APC se indican en las Tablas 4-XXI y 4-

XXII respectivamente. Cada valor de los reflejados en mencionadas Tablas, ha sido obtenido como la media de 5 medidas experimentales.

TABLA 4-XXI

Polarización de fluorescencia de C-PC en estado monómero y trímero. $\lambda_{em}=655$ nm, $\Delta\lambda_{ex}=\Delta\lambda_{em}=5$ nm.

| λ (excitación) | C-PC (monómero) | C-PC (trímero) |
|------------------------|-----------------|----------------|
| 520 | 0.310 | 0.032 |
| 525 | 0.307 | 0.032 |
| 530 | 0.308 | 0.037 |
| 535 | 0.311 | 0.035 |
| 540 | 0.310 | 0.034 |
| 545 | 0.314 | 0.038 |
| 550 | 0.317 | 0.039 |
| 555 | 0.322 | 0.047 |
| 560 | 0.328 | 0.048 |
| 565 | 0.335 | 0.055 |
| 570 | 0.337 | 0.059 |
| 575 | 0.341 | 0.056 |
| 580 | 0.342 | 0.056 |
| 585 | 0.344 | 0.059 |
| 590 | 0.350 | 0.061 |
| 595 | 0.358 | 0.059 |
| 600 | 0.363 | 0.069 |
| 605 | 0.366 | 0.077 |
| 610 | 0.373 | 0.089 |
| 615 | 0.379 | 0.105 |
| 620 | 0.374 | 0.122 |
| 625 | 0.377 | 0.134 |
| 630 | 0.377 | 0.149 |
| 635 | 0.375 | 0.148 |
| 640 | 0.377 | 0.154 |
| 645 | 0.376 | 0.148 |

TABLA 4-XXII

Polarización de fluorescencia de APC en estado de agregación monómero y trímero.

| λ (excitación) | APC (monómero) | APC (trímero) |
|------------------------|----------------|---------------|
| 540 | 0.326 | 0.066 |
| 545 | 0.325 | 0.068 |
| 550 | 0.329 | 0.063 |
| 555 | 0.327 | 0.065 |
| 560 | 0.328 | 0.066 |
| 565 | 0.327 | 0.063 |
| 570 | 0.329 | 0.068 |
| 575 | 0.327 | 0.065 |
| 580 | 0.330 | 0.067 |
| 585 | 0.331 | 0.066 |
| 590 | 0.335 | 0.063 |
| 595 | 0.340 | 0.065 |
| 600 | 0.345 | 0.065 |
| 605 | 0.347 | 0.066 |
| 610 | 0.348 | 0.065 |
| 615 | 0.349 | 0.063 |
| 620 | 0.350 | 0.064 |
| 625 | 0.350 | 0.068 |
| 630 | 0.348 | 0.071 |
| 635 | 0.349 | 0.075 |
| 640 | 0.350 | 0.082 |
| 645 | | 0.094 |
| 650 | | 0.094 |
| 655 | | 0.099 |
| 660 | | 0.100 |
| 665 | | 0.100 |

La representación conjunta de los tres espectros (absorbancia, fluorescencia y polarización) correspondientes a cada una de las cuatro disoluciones de biliproteínas se muestra en las Figuras 4-50 (C-PC-monómeros), 4-51 (C-PC-trímeros), 4-52 (APC-monómeros) y 4-53 (APC-trímeros). Como se puede apreciar, los espectros de absorción y fluorescencia se han normalizado, al objeto de facilitar la comparación entre los de cada biliproteína en distinto estado de agregación. Se debe destacar que los factores de

normalización tanto de los espectros de absorción como de los de emisión, han sido muy superiores en los monómeros que en los trímeros, siendo los de emisión a su vez, mayores que los de absorción. La concentración en todos los casos fué de 0.1 mg/ml. Esto demuestra lo comentado con anterioridad (epígrafe 4.1.2) sobre la mayor fluorescencia del trímero respecto al monómero.

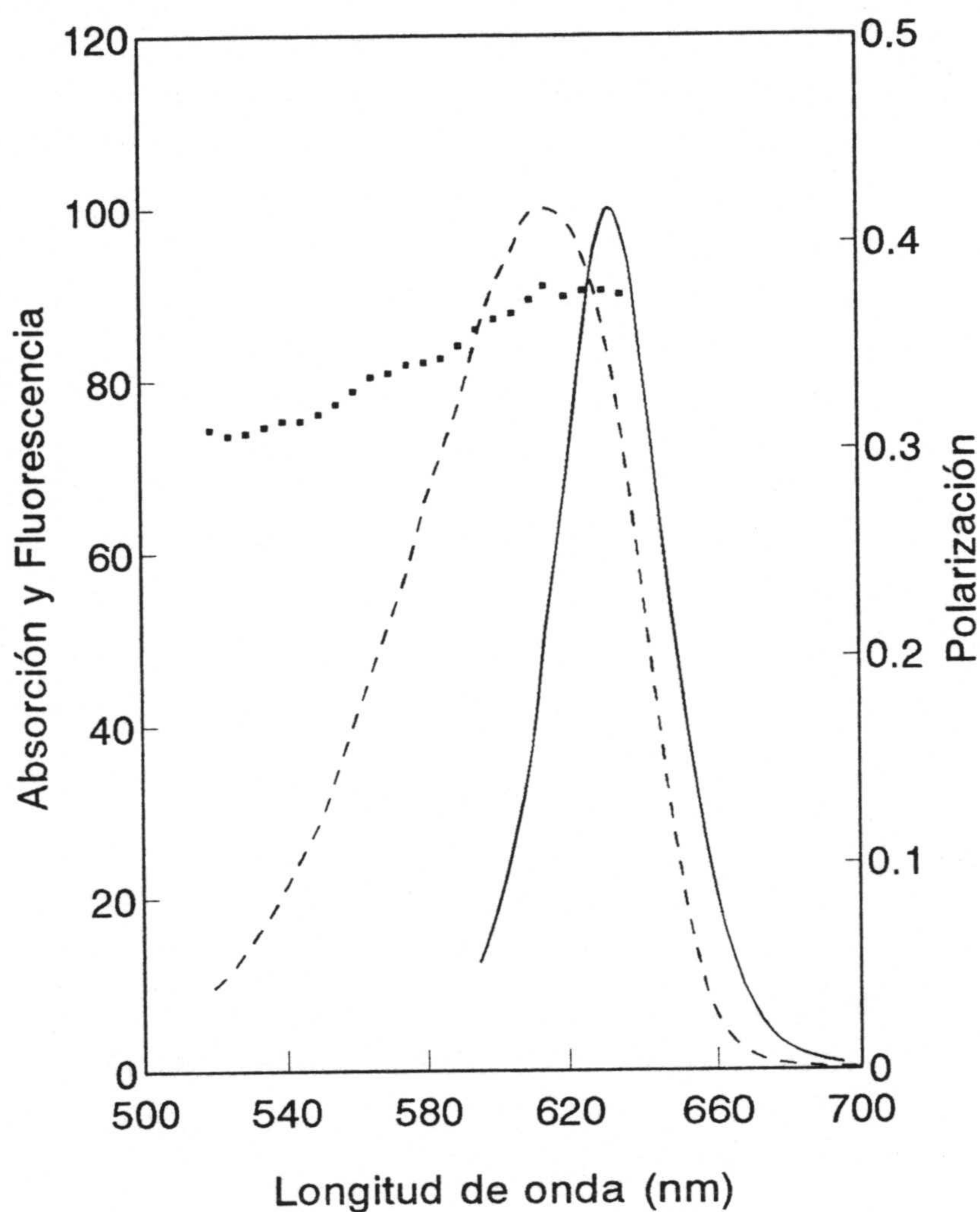


Figura 4-50

Espectros de absorción (- - - -), emisión de fluorescencia (- - - - -) y polarización (■ ■ ■ ■), de C-PC de *Spirulina platensis* en estado monomérico.

En lo que se refiere a C-PC, de la comparación de los espectros de absorción de las Figuras 4-50 y 4-51, se puede destacar que la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del monómero, está desplazada ligeramente (2-3 nm) hacia el azul, al mismo tiempo que el máximo de emisión experimenta un desplazamiento en el mismo sentido de

unos 6 nm. Estos resultados están en completa concordancia con los descritos por otros autores cuando se comparan los espectros electrónicos de trímeros y monómeros de C-PC, aunque los desplazamientos son de distinta cuantía según la cianobacteria de procedencia (Berns y McColl, 1989).

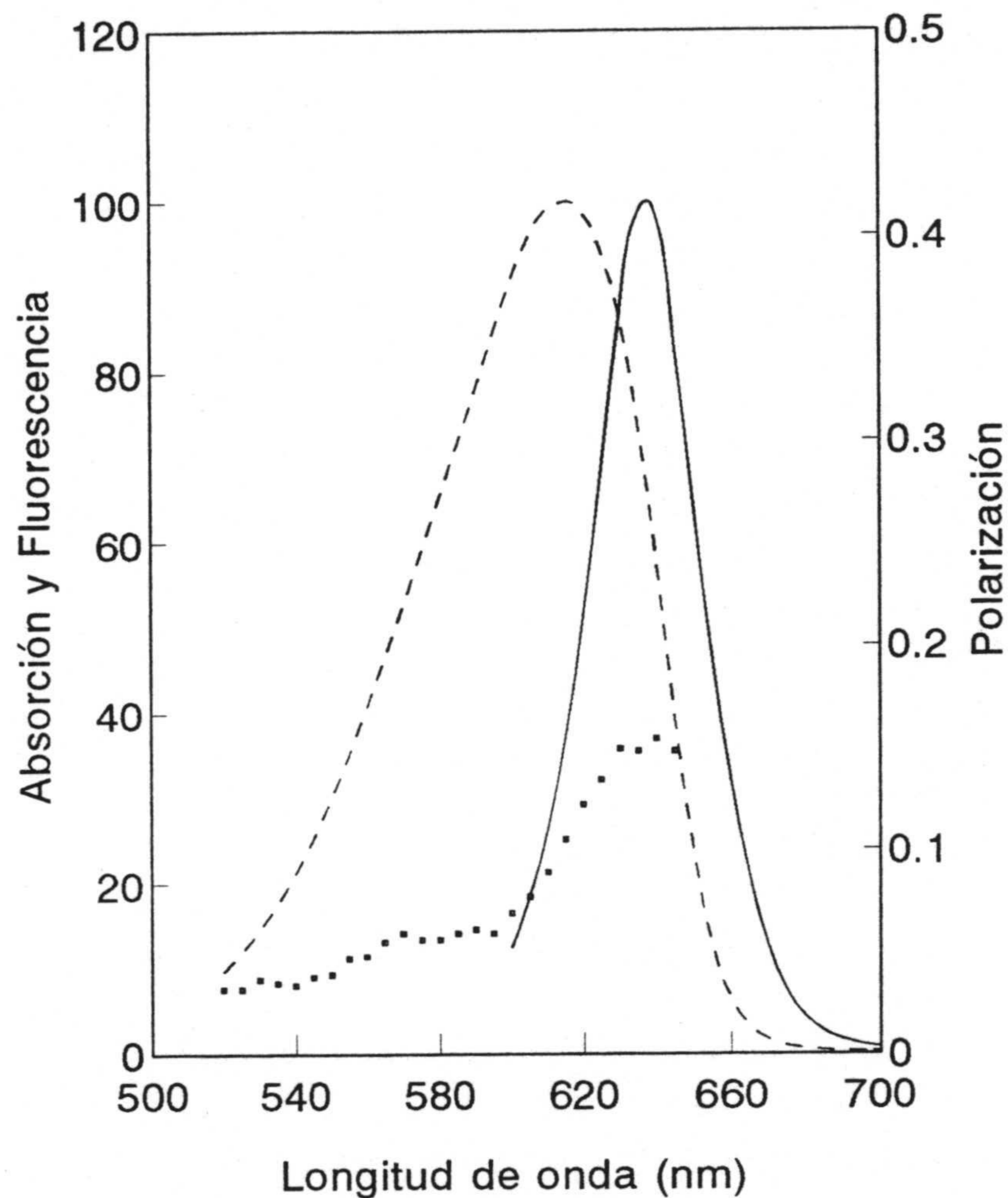


Figura 4-51

Espectros de absorción (- - - -), emisión de fluorescencia (-----) y polarización (■ ■ ■ ■), de C-PC de *Spirulina platensis* en estado trimérico.

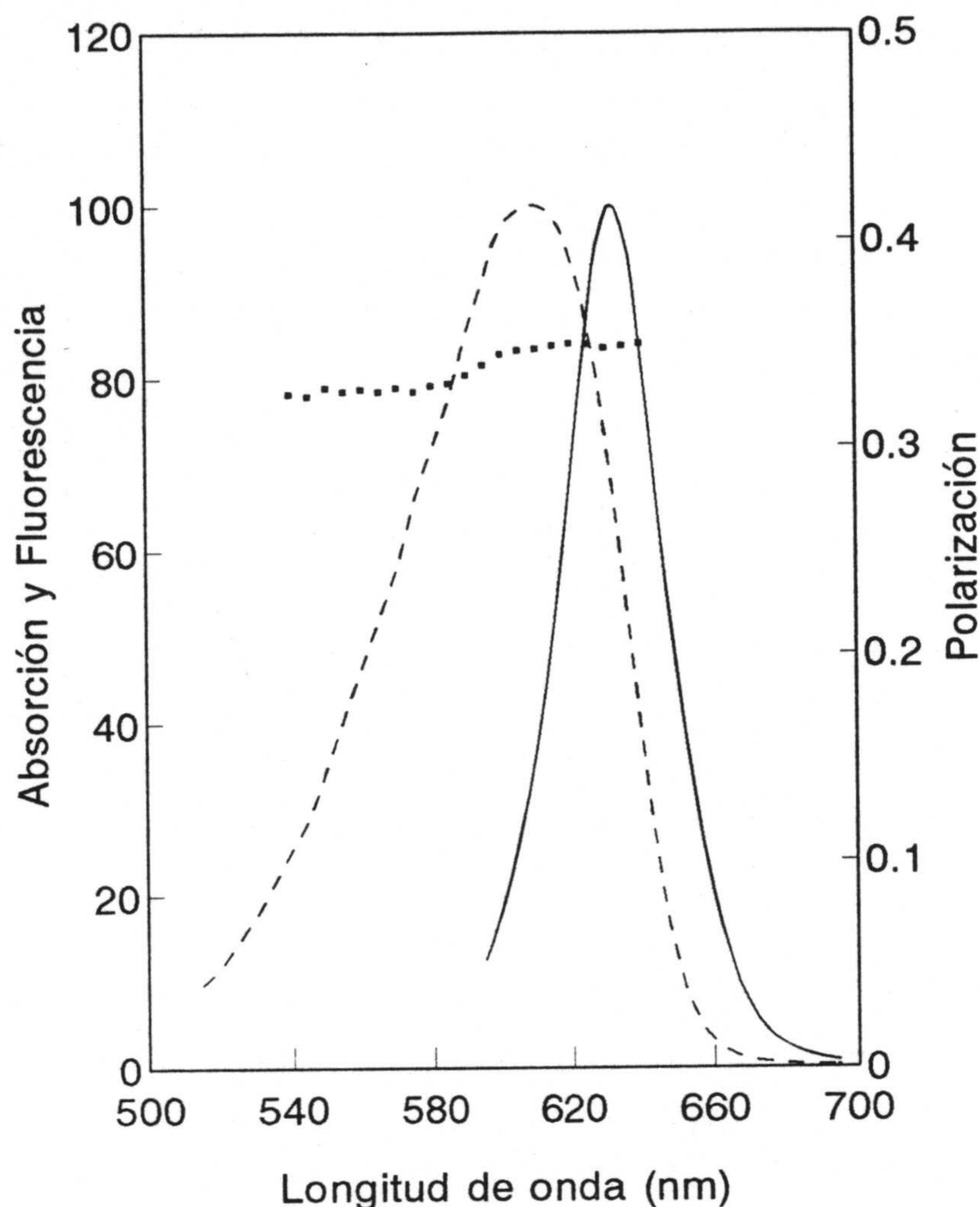


Figura 4-52

Espectros de absorción (---), emisión de fluorescencia (—) y polarización (· · · · ·), de APC de *Spirulina platensis* en estado monomérico.

En el caso de APC las diferencias son mucho más drásticas. Así, los monómeros de APC presentan una banda única con máximo de absorción a 610 nm aproximadamente, que se parece al espectro de C-PC. El cambio pronunciado en el espectro de absorción que acompaña a la formación de los trímeros se puede observar si se comparan las Figuras 4-52 y 4-53. Aparece una banda ancha relativamente estructurada con un hombro a 620 nm aproximadamente y un agudo máximo de absorción a 650 nm (desplazado unos 40 nm, respecto al que presentan los monómeros). Asimismo, la forma del espectro de fluorescencia cambia paralelamente con el de absorción y el máximo de emisión se desplaza desde 632 nm en los monómeros hasta 658 nm en los trímeros.

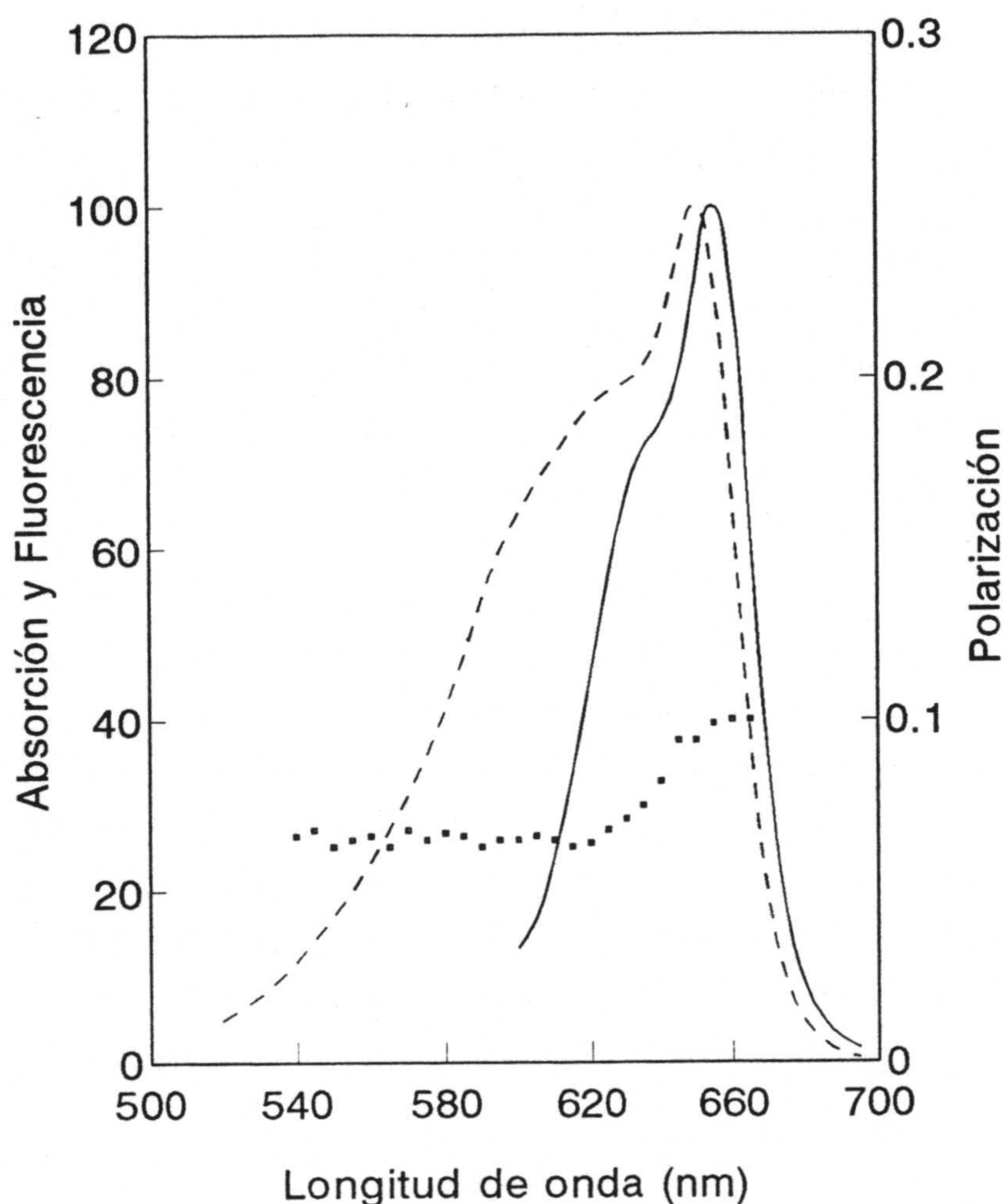


Figura 4-53

Espectros de absorción (- - - - -), emisión de fluorescencia (- - - - -) y polarización (■ ■ ■ ■), de APC de *Spirulina platensis* en estado trimérico.

Las diferencias espectrales entre monómeros y trímeros de APC han sido explicadas a través de la deslocalización de la excitación entre un par de bilinas fuertemente acopladas (McColl y col., 1980, 1981; Csatorday y col., 1984; Huang y col., 1987), o mediante diferencias conformacionales entre las bilinas correspondientes a los trímeros y monómeros (Murakami y col., 1981; Mimuro y col., 1982; Yeh y col., 1986; Füglistaller y col., 1987). Los resultados obtenidos recientemente por Brejc y col. (1995), que coinciden con los descritos en esta Memoria en lo que se refiere al tamaño y forma de cristales de APC, pueden indicar que se origina un cambio conformacional significativo en el cromóforo α_{84} , debido al diferente ambiente proteico de la subunidad α provocado por la vecina subunidad β

cuando se forma el trímero. Tal posibilidad nos permite suponer que ésta puede ser la razón principal del desplazamiento hacia el rojo del máximo de absorción de los trímeros de APC. Sin embargo, los mismos datos cristalográficos, en lo que se refiere a distancias entre cromóforos de distintos monómeros cuando se forma el trímero, no excluyen la posibilidad de la interacción entre bilinas, por lo que un modelo mixto de cambios conformacionales junto a las interacciones cromóforo-cromóforo y la consiguiente deslocalización energética, puede ser más apropiado que los modelos con exclusivos cambios conformacionales o transferencia de energía.

En la Figura 4-54 (a y b) se representan los espectros de polarización de fluorescencia de C-PC (a) y APC (b) en una escala más amplia que permite mejor la visualización de las diferentes regiones espectrales encontradas, así como las diferencias entre las formas monoméricas y triméricas de C-PC y APC. Como se puede observar, en ambas biliproteínas se produce un descenso drástico en el grado de polarización de los trímeros respecto al que exhiben los monómeros, en concordancia con lo descrito por otros autores y que ya ha sido comentado con anterioridad (Mimuro y col., 1986; Yeh y col., 1986).

El análisis espectral realizado parece confirmar que la adición de NaClO_4 1 M consigue la disociación completa de las dos biliproteínas y proporciona disoluciones homogéneas de monómeros. Así, se puede ahora realizar una discusión sobre la asignación funcional de los cromóforos presentes en cada biliproteína y según los distintos estados de agregación que éstas presentan en las disoluciones estudiadas por nosotros.

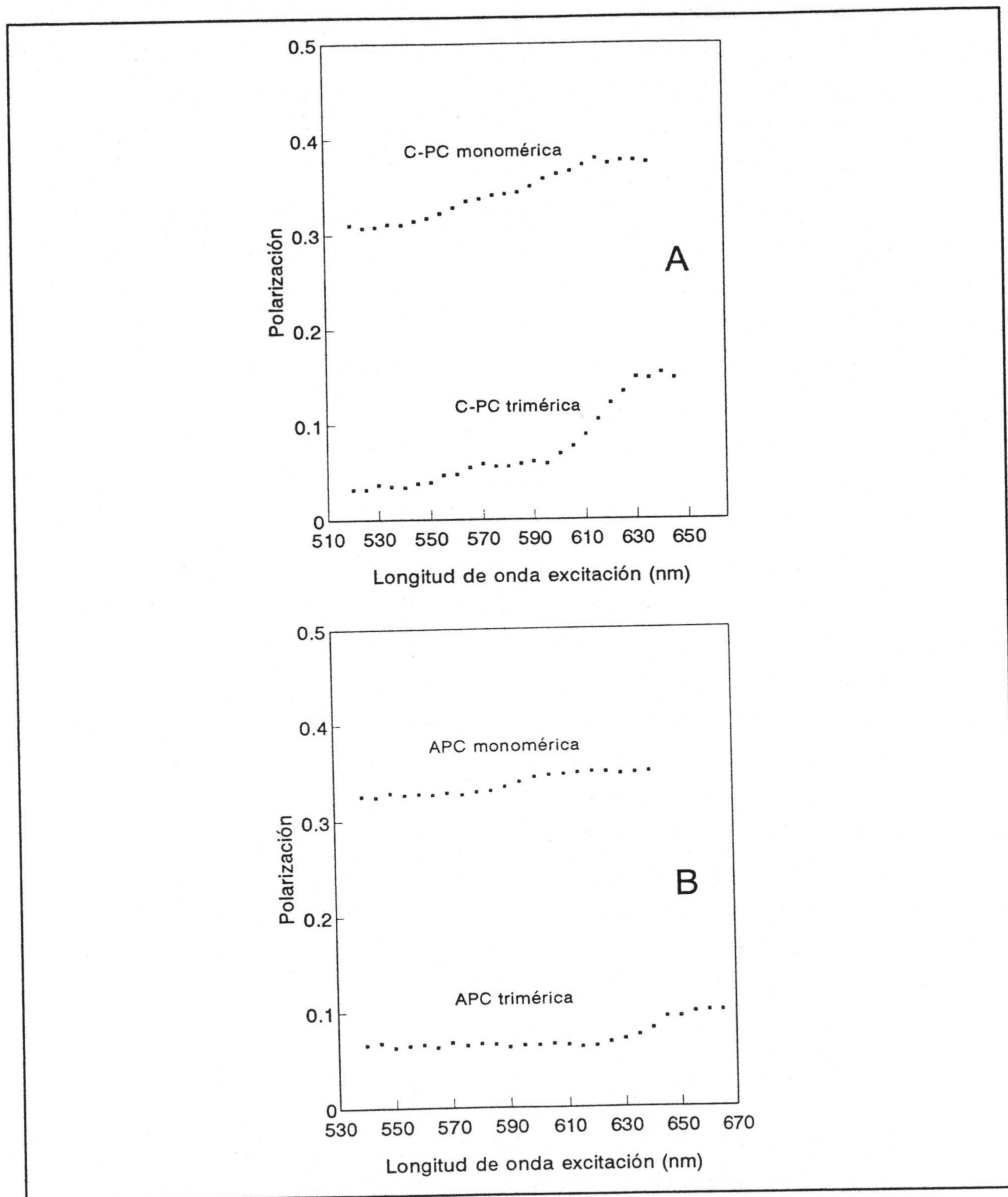
En este sentido, la biliproteína estudiada con mayor amplitud ha sido C-ficocianina, debido a su capacidad como absorbente de luz y de transferir energía. En un primer estudio sistemático de fluorescencia de biliproteínas, Dale y Teale (1970) y Teale y Dale (1970) demostraron, en base al complejo espectro de polarización, que en estas macromoléculas están presentes dos tipos funcionales de cromóforos, los que absorben a baja longitud de onda (denominados sensibilizantes o de tipo "s") y transfieren su excitación con alta eficiencia a aquellos que absorben y fluorescen con alto rendimiento cuántico a mayores longitudes de onda (denominados fluorescentes o de tipo "f"). Posteriormente, los tres cromóforos presentes en C-PC han sido identificados (Glazer, 1985). De acuerdo con la subunidad y residuos a los que están enlazados covalentemente los tres cromóforos tetrapirrólicos, éstos se suelen denominar α_{84} , β_{84} y β_{155} . Los tres son químicamente idénticos y se unen a un residuo cisteína mediante un enlace tioéster, sin embargo y como muestran las estructuras cristalinas

a alta resolución de las mencionadas C-ficocianinas, cada cromóforo está rodeado por un ambiente exclusivo, que le hace ser espectralmente único. Además, se ha podido determinar sin ambigüedad sus posiciones en las proteínas procedentes de *M. laminosus*, *A. quadruplicatum* y *F. displosiphon* (Schirmer y col., 1986; Schirmer y col., 1987; Duerring y col., 1991).

La región visible de los espectros de absorción y fluorescencia de C-PC en distintos grados de agregación han sido estudiados extensamente por diferentes autores (Switalski y Sauer, 1984; Mimuro y col., 1986; Schirmer y Vincent, 1987; Fischer y col., 1990). Así, se ha podido establecer la asignación funcional de los tres tipos de cromóforos. La subunidad α tiene un cromóforo tipo *s*. En la subunidad β , el cromóforo β_{155} se asigna al tipo *s*, siendo por tanto, el absorbente de menor longitud de onda y el β_{84} , que corresponde al de absorción a mayor longitud de onda, es el cromóforo de tipo *f*. Algunos autores asignan al cromóforo α_{84} un carácter intermedio (tipo "m") (Sauer y col., 1987).

En alguno de los anteriores estudios (Mimuro y col., 1986) y en otros más recientes (Park y Sauer, 1991; Debreczny y col., 1993), se ha desnaturalizado la proteína y sus subunidades α y β se han separado, renaturalizado y estudiado espectroscópicamente. La característica más importante a destacar en estos últimos estudios es el hecho de que la suma de los espectros de absorción de las subunidades α y β , proporciona un espectro resultante bastante parecido al espectro del monómero, aunque se ha puesto en evidencia, mediante fluorescencia resuelta en el rango de tiempo del picosegundo, que existe transferencia de energía tanto entre los cromóforos de las subunidades β ($\beta_{155} \rightarrow \beta_{84}$, ≈ 60 ps), como entre $\alpha_{84} \rightarrow \beta_{84}$ (≈ 400 ps) (Sandström y col., 1988). Los datos cristalográficos muestran que si bien la distancia entre α_{84} y β_{84} es 50 \AA , lo que no es muy favorable para la transferencia de energía, esta circunstancia queda compensada por un factor de orientación bastante grande ($\kappa = 1.73$). Por estos motivos, la transferencia de energía en monómeros de C-PC se considera, hoy día de forma general, como un acoplamiento débil dipolo-dipolo.

En lo que se refiere al trímero, existe alguna discusión sobre si están involucrados acoplamientos dipolo-dipolo de carácter intermedio o incluso fuerte (Csatorday y col., 1987; Mac Coll y col., 1988; Berns y Mac Coll, 1989; Holzwarth y col., 1990; Debreczny y col., 1993). La idea más apoyada por los resultados espectrales y cristalográficos es que la transferencia de energía ocurre desde el cromóforo β_s al β_f en el mismo monómero y desde el cromóforo α de un monómero al cromóforo β_f de un monómero adyacente.

**Figura 4-54**

Espectros de polarización de C-PC (a) y APC (b) es estado trimérico y monomérico.

Concretando algo más, la estructura cristalina del trímero de C-PC procedente de *M. laminosus* (Schirmer y col., 1987) revela la existencia de tres cromoproteínas rotacionalmente equivalentes, cada una conteniendo una subunidad α y otra β . El monómero de la proteína asociada a un determinado cromóforo se designa comunmente por un prefijo. Así, por ejemplo: $2\beta_{84}$ es el cromóforo β_{84} en el monómero número 2. La mayoría de los pares de cromóforos están tan distantes ($\geq 24 \text{ \AA}$) que las correspondientes interacciones entre excitones son despreciables (Sauer y col., 1987) y el pertinente transporte de excitación electrónica ocurre a través del mecanismo de Förster. Excepciones a lo anterior son los pares de cromofóros $1\beta_{84}$ - $3\alpha_{84}$ y los otros dos pares rotacionalmente equivalentes, que exhiben las menores separaciones (21 \AA) y están, además, caracterizados por factores orientacionales favorables para las interacciones entre excitones ($\kappa = -1.34$).

Los resultados obtenidos por nosotros en lo que se refiere a la cristalización de C-PC procedente de *S. platensis* y a los estudios preliminares de rayos X, indican cierto paralelismo entre la estructura tridimensional de esta biliproteína y aquellas otras, más extensamente estudiadas, procedentes de distintas cianobacterias. En base a la comparación de nuestros resultados con aquellos publicados de C-PC procedente de *M. laminosus*, *A. quadruplicatum* y *F. disposiphon* se podría, en principio, hacer la suposición de que C-PC procedente de *S. platensis* puede tratarse de forma aproximada como un caso de acoplamiento débil o quizás intermedio.

Si los cromóforos están débilmente acoplados, puede ser suficiente la descripción del espectro de absorción en términos de la suma de los espectros de las partes aisladas. La teoría de Förster (1959) sobre la transferencia de energía para el caso de acoplamiento débil predice que la eficiencia de la transferencia de energía depende de varios factores entre los que se incluyen, el solapamiento del espectro de emisión del cromóforo dador con el espectro de absorción del cromóforo aceptor, la orientación de los dipolos implicados y la distancia centro-a-centro entre el cromóforo dador y el aceptor. Sin embargo los espectros de absorción de cromóforos que están más fuertemente acoplados a causa de su proximidad en el espacio y en su energía, pueden comportarse de forma no aditiva. Así, cuando la energía de interacción entre cromóforos es mayor que el semiancho de la banda de absorción del cromóforo individual, la excitación está deslocalizada entre los cromóforos y se produce una división de los niveles de energía de los cromóforos individuales.

En principio, resulta complicado comprobar la aplicabilidad de las teorías de

transferencia de energía a estos complejos cromóforo-proteína, debido a la poca cantidad de datos estructurales disponibles. Incluso cuando se dispone de la estructura cristalina, es difícil la determinación sin ambigüedad de las propiedades espectroscópicas de los cromóforos individuales en sistemas que contienen varios cromóforos. Sin embargo, se puede realizar una deconvolución funcional aproximada del espectro de absorción, usando datos de polarización de fluorescencia y conocer separadamente las propiedades espectrales de los cromóforos. Los espectros resultantes de los componentes individuales, aunque aproximados, pueden ser útiles en el sentido de observar la contribución del solapamiento espectral a las rutas de migración de la energía, aunque no deben considerarse rigurosamente correctos.

La Figura 4-54a muestra que el espectro de polarización de C-PC presenta tres regiones claramente diferenciadas. La primera de ellas, que corresponde a la mayor energía, comienza cuando lo hace su espectro de absorción (520 nm) y se extiende hasta los 550 nm aproximadamente. Una segunda zona está comprendida entre 565 y 590 nm y la tercera comienza sobre los 620 nm y se extiende hasta el final de los datos obtenidos. En lo que se refiere a C-PC en estado trimérico, se produce un decrecimiento drástico en los valores del grado de polarización. Sin embargo se siguen observando tres regiones que, de forma aproximada coinciden en extensión y longitud de onda con las anteriores, a excepción de la que se presenta a mayor longitud de onda que comienza a 630 nm. El bajo grado de polarización a valores altos de longitud de onda, indica claramente que el sumidero final de la energía es un único cromóforo y que la transferencia de energía es bastante eficaz, lo que está de acuerdo con los datos cristalográficos. La adición de glicerol al 75 % no tiene efecto apreciable en el espectro de polarización de monómeros y triméros de C-PC (Debreczeny y col., 1993), por lo que las diferencias en la polarización (P) de los cromóforos viene motivada por los distintos ángulos entre los momentos de absorción de los mismos y el de emisión del estado excitado de menor energía. Así, en los dos estados de agregación estudiados los resultados obtenidos son indicativos de la presencia en la proteína de tres tipos de cromóforos. Los de mayor energía, que se pueden asignar como β_{155} , los de energía intermedia que deben de corresponder a los α_{84} y los que absorben a mayores longitudes de onda que se pueden adscribir a los β_{84} y que corresponden a los de tipo "f". Estas asignaciones se realizan según la extensa bibliografía existente (para revisión, ver Berns y McColl, 1989).

Se debe destacar que ninguno de los estudios anteriores de polarización, efectuados con ficocianinas procedentes de algas diferentes a la utilizada por nosotros, muestra de forma tan evidente las tres regiones de grado de polarización constante, como en el caso de C-PC

procedente de *Spirulina platensis*.

Se han deconvolucionado los espectros de C-PC en los dos estados de agregación que se están estudiando, mediante una modificación de la metodología descrita por Dale y Teale (1970), aplicable a biliproteínas suponiendo un tipo de cromóforos s y un tipo de cromóforos f:

$$A_{BE} = A \frac{[3 - P_{BE}][P - P_{AE}]}{[P_{BE} - P_{AE}][3 - P]}$$

$$A_{AE} = A - A_{BE}$$

donde A_{BE} es la absorbancia calculada del componente de menor energía de un par de cromóforos, A es la absorbancia experimental, A_{AE} es la absorbancia calculada del componente de mayor energía y P_{BE} , P_{AE} y P son los grados de polarización correspondientes. Los trabajos de Dale y Teale (1970) y Teale y Dale (1970) muestran la derivación de las ecuaciones junto a las suposiciones empleadas que en esencia se resumen en considerar que la fluorescencia observada debida a los cromóforos s es despreciable, lo que equivale a una eficaz transferencia de energía que, a su vez, se supone que sucede a través del mecanismo de Förster.

Los cálculos para los tres componentes han sido realizados separadamente en los dos pares de cromóforos y han proporcionado los espectros de los componentes que se indican en las Figuras 4-55 y 4-56.

En este punto, se puede realizar una nueva aproximación que consiste en adoptar la forma del espectro de emisión de la proteína, como la del cromóforo s y posicionarlo de forma que el desplazamiento de Stokes de la proteína completa sea de igual cuantía que el atribuible a la banda de absorción del cromóforo s de alta energía (Figuras 4-55 y 4-56). Las suposiciones que se refieren a la forma del espectro de emisión de los cromóforos, así como a la constancia del desplazamiento de Stokes están basadas en la consistencia general de la forma y desplazamiento de Stokes de las emisiones de las dos subunidades y de los monómeros y trímeros de C-PC procedente de *M. laminosus* (Mimuro y col., 1986; Debreczeny y col., 1993).

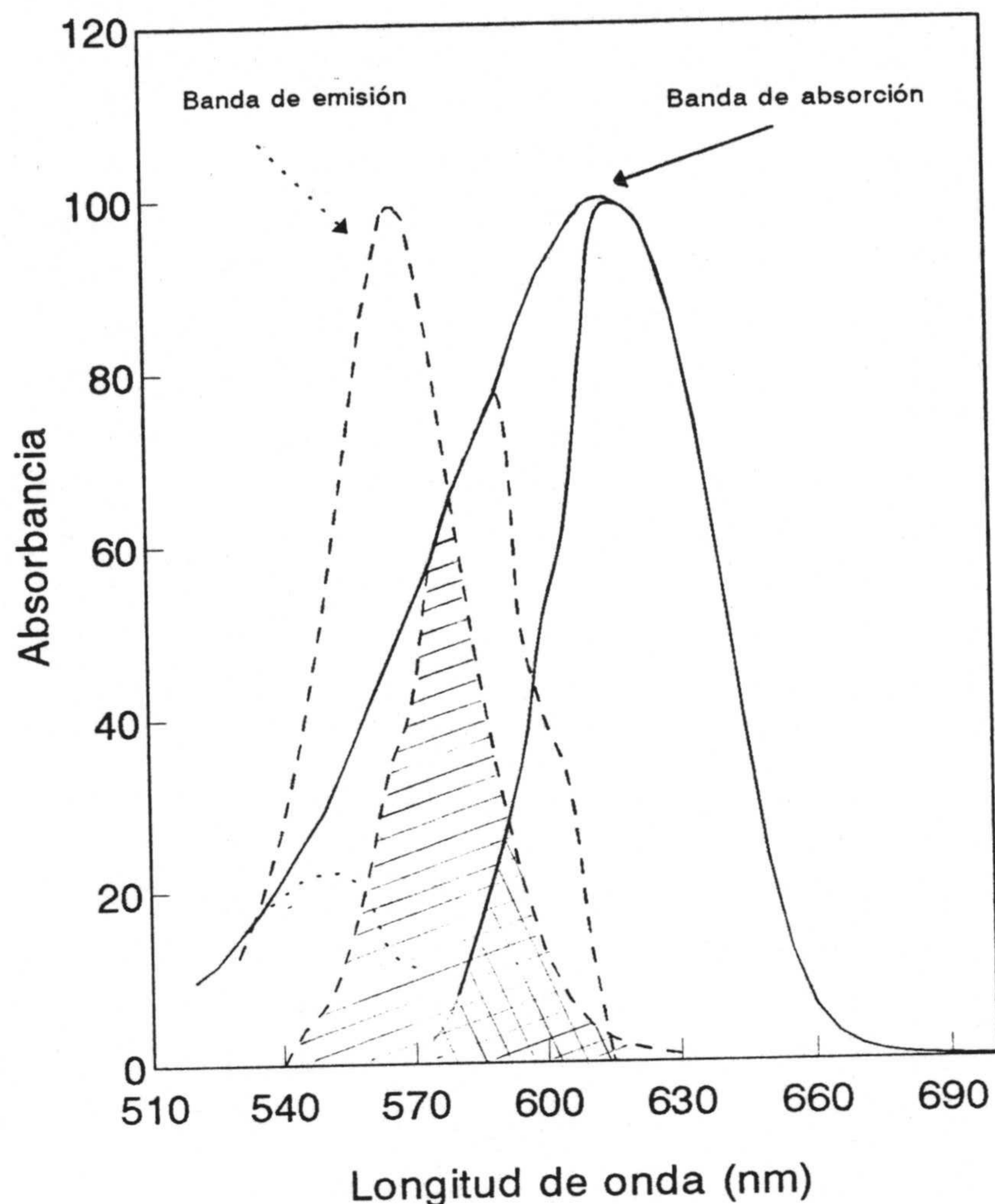


Figura 4-55

Deconvolución del espectro de absorción de C-PC de *Spirulina platensis* en estado monomérico.

Las regiones subrayadas corresponden al solapamiento entre la fluorescencia del cromóforo s de alta energía con la absorbancia del cromóforo s de baja energía y con la absorbancia del cromóforo f. Como se puede observar, los supuestos espectros de emisión de los cromóforos s de alta energía, en ambos estados de agregación, solapan fuertemente con los espectros de absorción de los cromóforos s de baja energía y también con los del tipo f. Ya que la deconvolución no es rigurosamente cuantitativa, no se ha llevado a cabo el cálculo del solapamiento espectral. De forma cualitativa, la inspección de los solapamientos claramente muestra que los excitones pueden transferirse desde el cromóforo s de alta energía

a los de menor energía con bastante eficiencia si la distancia y orientaciones dipolares fueran también favorables lo que parece posible ya que las distancias entre cromóforos y los factores de orientación, calculados en proteínas relacionadas, lo son. La misma extensión de los solapamientos de las Figuras 4-55 y 4-56 puede servir de comprobación de que las aproximaciones hechas durante el análisis no deben afectar seriamente a las conclusiones cualitativas alcanzadas. A falta de estudios más detallados que no son objeto de esta Memoria, los espectros de los componentes resultantes de los cálculos efectuados, se pueden considerar útiles en lo que se refiere a mostrar que la transferencia de energía entre cromóforos de C-PC procedente de *S. platensis* se debe de producir de forma similar a otras ficocianinas.

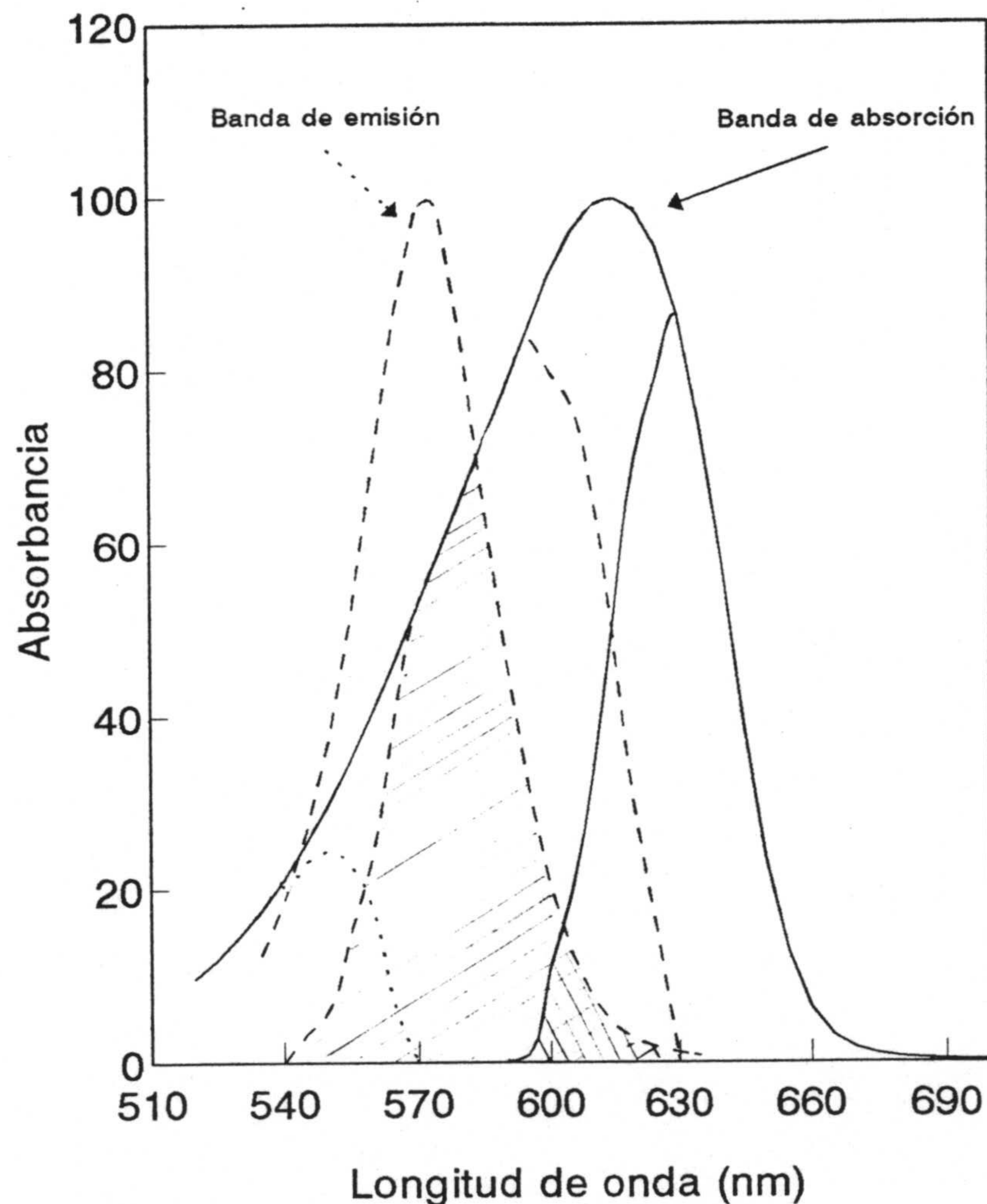


Figura 4-56

Deconvolución del espectro de absorción de C-PC de *Spirulina platensis* en estado trimérico.

Con sólo dos cromóforos por monómero, APC es el modelo más simple para estudios de transferencia de energía. Sin embargo y probablemente debido a la dificultad de su obtención, hay pocos trabajos publicados que, basándose en las propiedades espectrales, traten de la mencionada transferencia de energía. En adición, los escasos estudios se han realizado con APC procedentes de algas distintas a la empleada en nuestra investigación. Así, Yeh y col., (1986) han dado cuenta de los espectros de absorción, emisión y polarización correspondientes a monómeros y trímeros de APC procedente de *A. variabilis*, encontrando un drástico descenso del grado de polarización de los trímeros respecto al que presentan los monómeros, aproximadamente de la misma magnitud que el que se observa en la Figura 4-54b, aunque ni los valores absolutos de P ni la forma de los espectros, se parecen a los obtenidos por nosotros.

En APC los cromóforos están enlazados covalentemente a los residuos cisteína en las posiciones α_{84} y β_{84} respectivamente. La Figura 4-54b muestra dos regiones espectrales diferenciadas tanto en lo que se refiere a la disolución monomérica de APC como a la de trímeros. En el primer caso, los valores del grado de polarización son muy próximos entre sí, aunque las dos regiones se diferencian bien una de otra. La de mayor energía comienza cuando lo hace su espectro de absorción y se extiende hasta los 580 nm, mientras que la otra región de menor energía está comprendida entre 600 y 635 nm, aproximadamente.

Los resultados obtenidos por nosotros son cualitativamente diferentes de los reportados por Yeh y col. (1986) con monómeros de APC procedentes de *A. variabilis*. El espectro de polarización que estos autores han obtenido crece de forma monótona desde 0.4 hasta 0.42 en el intervalo de longitud de onda comprendido entre 530 y 635 nm. En base a estos resultados y al decaimiento de fluorescencia que ajustan a dos exponenciales, han postulado que ambos cromóforos son del tipo fluorescente y que no hay transferencia de energía entre los mismos.

Basándose en la estructura cristalina, Brejc y col. (1995) han realizado el cálculo de las velocidades de la transferencia de energía, entre cromóforos de APC monomérica procedente de *S. platensis*, mediante la teoría de Förster. Debido a la distancia y geometría de los cromóforos, el acoplamiento entre éstos parece ser más bien de carácter débil y la dirección posible de la transferencia de energía puede ser $\alpha_{84} \rightarrow \beta_{84}$. Suponiendo esta transferencia, se puede aplicar la metodología descrita por Dale y Teale (1970) y realizar una deconvolución del espectro del monómero en sus dos componentes funcionales, tal como se

hizo en el caso de C-PC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4-57. En esta Figura se ha incluido también el supuesto espectro de fluorescencia del cromóforo de alta energía. La forma y desplazamiento del espectro de emisión del componente de alta energía se han supuesto iguales que las del espectro de emisión del monómero, en base a los resultados de Cohen-Bazire y col. (1977) y de Csatorday y col. (1984), que han reportado estos resultados para los espectros de emisión de las subunidades individuales de APC de *A. variabilis*. Como se puede observar hay un fuerte solapamiento espectral entre la absorción del cromóforo de baja energía y la fluorescencia atribuida al de alta energía, lo que permite suponer la posibilidad de la transferencia energética en el caso de que la distancia relativa y la relación geométrica entre cromóforos sea favorable. Como ya se ha comentado con anterioridad, los resultados cuantitativos no se deben de considerar demasiado rigurosos.

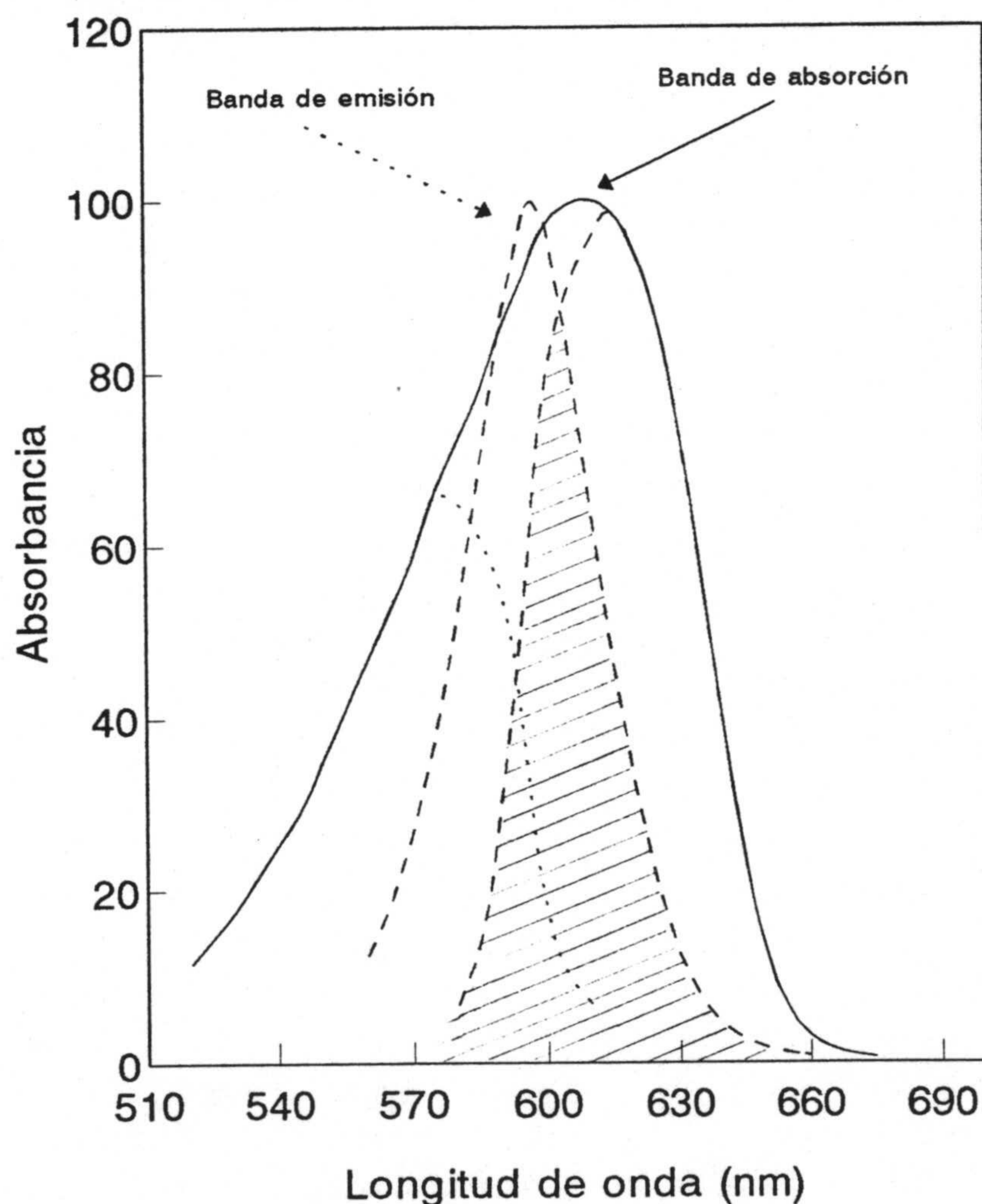


Figura 4-57

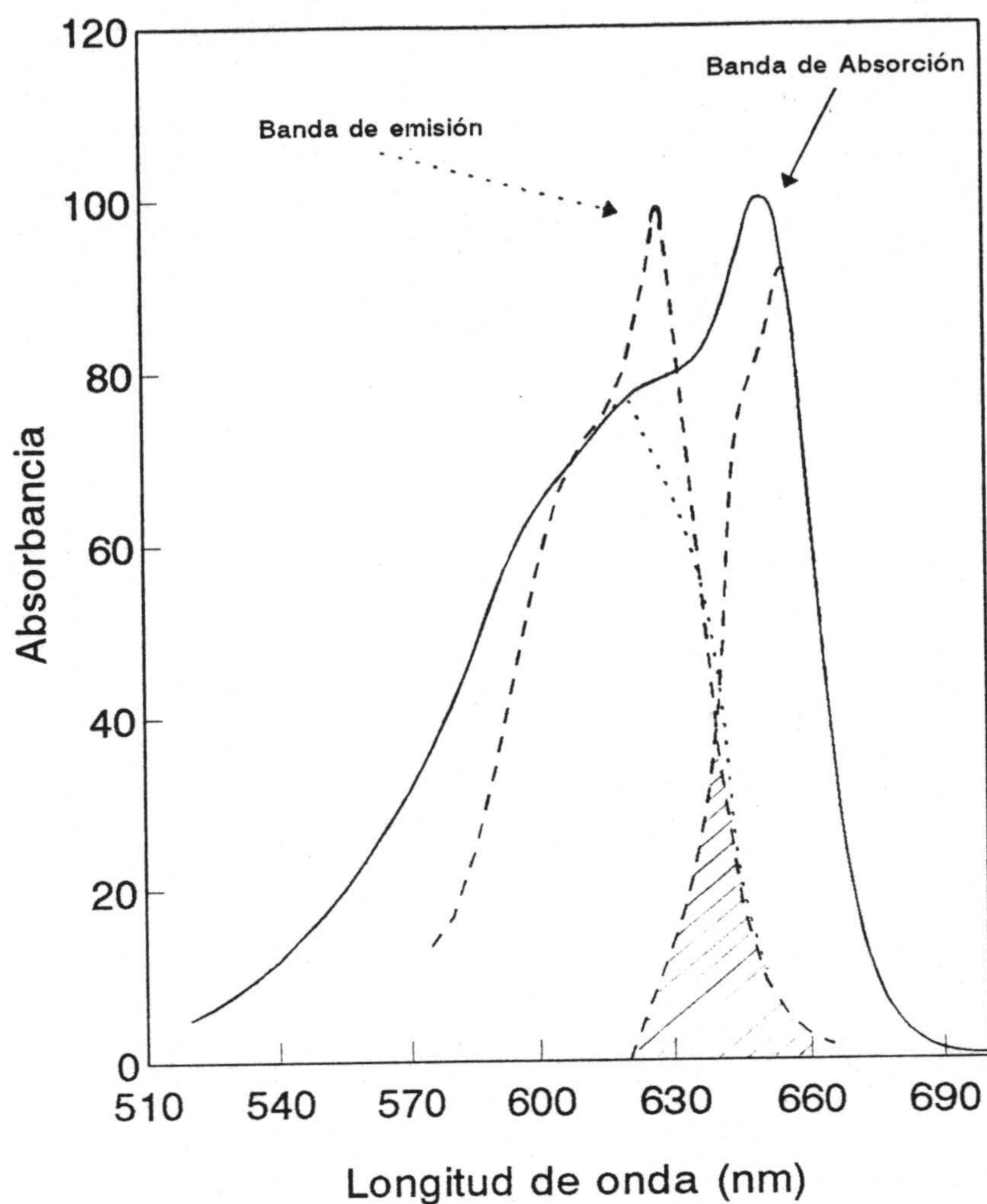
Deconvolución del espectro de absorción de APC de *Spirulina platensis* en estado monomérico.

La reunión de monómeros para formar la estructura trimérica cambia la distancia relativa entre los cromóforos, así como el ambiente proteico que rodea al α_{84} . La menor distancia centro-a-centro es 20.6 Å, entre los cromóforos $3\alpha_{84}$ y $1\beta_{84}$ y de acuerdo con los cálculos de Brejc y col (1995) éste es el camino dominante de la transferencia de energía en los trímeros de APC. Además, también hay posible transferencia energética entre $1\alpha_{84}$ y $1\beta_{84}$ y entre $1\beta_{84}$ y $3\beta_{84}$ (esta última en ambos sentidos).

Los espectros de polarización de la Figura 4-54b correspondientes al estado trimérico de agregación, muestran también dos regiones de diferente grado de polarización, aunque sus valores absolutos son mucho menores que en el caso del monómero. En ellos se observa una región de alta energía, con valores que oscilan ligeramente entorno a 0.065, que se extiende desde que comienza el espectro de excitación hasta los 620 nm. y una región claramente diferenciada de la anterior entre 645 y 665 nm. De nuevo, nuestros resultados son cualitativamente distintos de los de Yeh y col. (1986) que presentan un espectro muy oscilante cuyo valor medio decrece ligeramente con el aumento de la longitud de onda de excitación.

Los cálculos basados en la estructura cristalina y el descenso drástico de los valores del grado de polarización son indicativos de que hay una eficaz transferencia de energía. En efecto aunque Brejc y col. indican que los resultados de los cálculos que han efectuado se deben de tomar como una tosca aproximación, la rápida transferencia de energía entre $3\alpha_{84}$ y $1\beta_{84}$, permite explicar el descenso del grado de polarización y justifica la deconvolución funcional en cromóforos tipo s y f.

En la Figura 4-58 se ha representado el resultado de aplicar la metodología usual. Aunque otra vez se debe resaltar que los resultados cuantitativos no se deben tomar como rigurosos, es destacable el menor solapamiento espectral de la fluorescencia del cromóforo del tipo s y la absorción del de tipo f, respecto al que presentaban en el estado de agregación monomérico. La explicación de este resultado se puede hacer en base al significativo cambio conformacional que ocurre en los cromóforos α_{84} debido a la diferencia en el ambiente proteico que los rodea en el estado trimérico. Sin embargo el acercamiento y la favorable orientación entre los cromóforos $3\alpha_{84}$ y $1\beta_{84}$ permite que la transferencia energética sea muy eficaz.

**Figura 4-58**

Deconvolución del espectro de absorción de APC de *Spirulina platensis* en estado trimérico.

Los estudios de polarización efectuados con APC de *S. platensis* en los dos estados de agregación, proporcionan distintos resultados y conclusiones que los anteriores realizados por otros autores con APC de distinta procedencia. Sin embargo son coherentes con los datos cristalográficos y apoyan cualitativamente los cálculos efectuados en base a la estructura cristalina.

4.6-DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA DE LA HIBRIDACIÓN DE ADN CON BILIPROTEÍNAS.

4.6.1.-Obtención de conjugados biliproteínas-polinucleótido.

Se han revisado varios esquemas diferentes de modificación para determinar la mejor estrategia para etiquetar polinucleótidos con fluoróforos de interés. Los criterios autoimpuestos por nosotros al proceso de marcaje han sido los siguientes: 1) que el esquema de modificación sea simple y aplicable a todos los tipos de ácidos nucleicos; 2) que permita el etiquetado con fluoróforos muy distintos y 3) que se utilicen reactivos e instrumentación económicamente asequibles. De los variados métodos utilizados previamente, el que se ha descrito en los apartados 2.8 y 3.6.1 cumple con los tres requisitos anteriores.

La Figura 3-11 (pág. 98) muestra el esquema general de la reacción usada para modificar ácidos nucleicos en los residuos citosina y producir el derivado transaminado. La modificación de los residuos citosina no altera el espectro de absorción uv-visible de Poli(C), como se muestra en la Figura 4-59.

Como se ha descrito en el apartado de metodología, se ha seleccionado un tiempo de reacción de 30 min., en base a los resultados obtenidos por Jackson (1991) y al objeto de que no se modifiquen más del 5% de los restos citosina, ya que un mayor porcentaje de modificación afecta a las propiedades de hibridación de Poli(C) con el homopolinucleótido complementario utilizado (Poli(I)). Porcentajes menores al mencionado 5% proporcionan sondas con características de hibridación prácticamente inalteradas (Talavera y col., 1997).

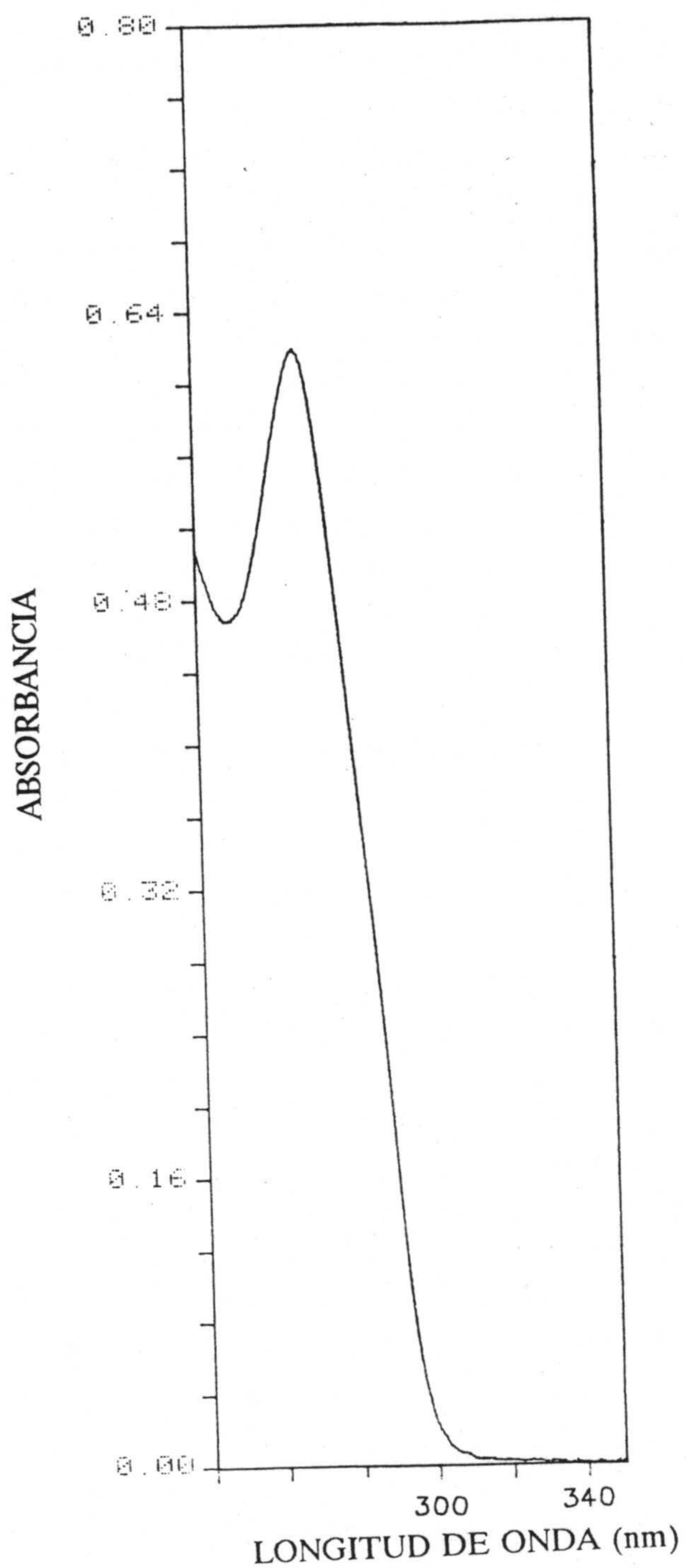


Figura 4-59

Espectro de absorción uv-visible de Poli(C) modificado, entre 240 y 350 nm.

Seguidamente, se ha utilizado Poli(C) modificado por transaminación en N⁴, para hacerlo reaccionar con SPDP que, como ya se ha indicado, puede conjugarse con macromoléculas que poseen grupos amino, originando enlaces amida estables (Carlsson y col., 1978). La relación [SPDP]/[Poli(C)] empleada ha sido 64, al objeto de que todos los grupos amino introducidos en la anterior transaminación formen la estructura 2-piridil disulfuro. En la Figura 4-60, se esquematiza la reacción comentada.

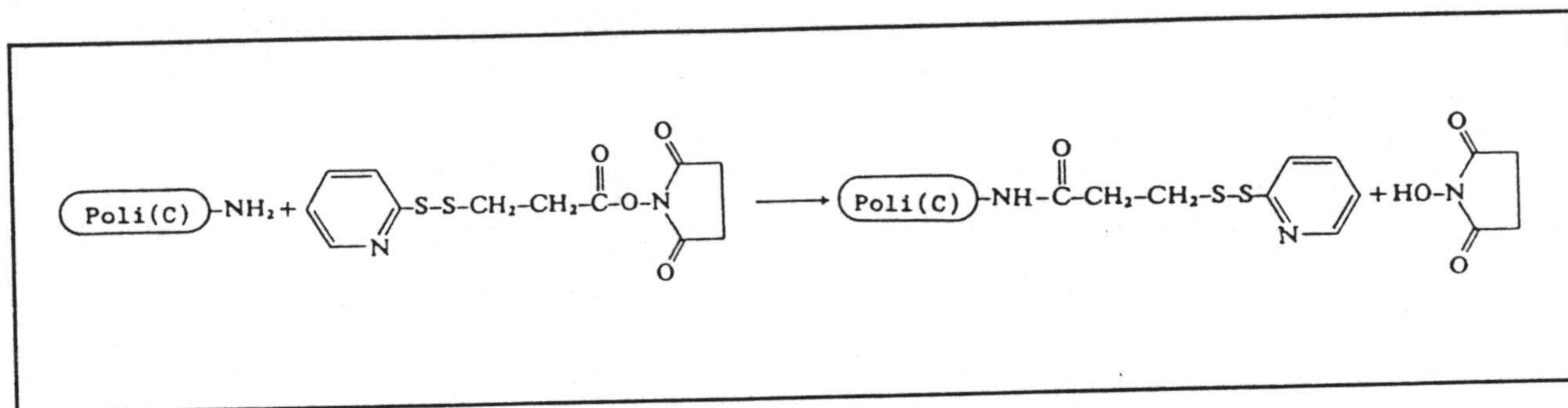


Figura 4-60

Reacción de Poli(C) modificado con SPDP para formación de estructuras 2-piridil disulfuro.

Después de eliminar mediante diálisis el exceso de reactivo, se ha obtenido el espectro de absorción uv-vis correspondiente al Poli(C)-2-piridil disulfuro disuelto en tampón de fosfatos a pH=7.5 (Figura 4-61). En éste se observa la aparición de una nueva banda de absorción con máximo a 343 nm aproximadamente, que corresponde al grupo piridil disulfuro introducido en el Poli(C) modificado (Carlsson y col., 1978). El contenido en grupos 2-piridil disulfuro se ha determinado en esta etapa de la reacción según la técnica que proponen Carlsson y col. (1978) mediante tratamiento con ditioneitol (DTT) y posterior cálculo absorciométrico de la 2-tiopiridona liberada como posteriormente se describirá en el apartado siguiente. El Poli(C) así modificado se ha almacenado disuelto en tampón de fosfatos 0.1 M, NaCl 0.1 M pH=7.5 a 4° C.

Las biliproteínas purificadas hasta homogeneidad como ya se ha descrito, se han dejado reaccionar con SPDP según la metodología que se detalla en el apartado 3.6.2. La relación [SPDP]/[C-PC] se ha fijado en 64 para obtener un porcentaje alto de modificación, al objeto de asegurar que la posterior reacción de conjugación con Poli(C) se efectúe con el mayor número de citosinas modificadas. En la Figura 4-62 se esquematiza la anterior reacción.

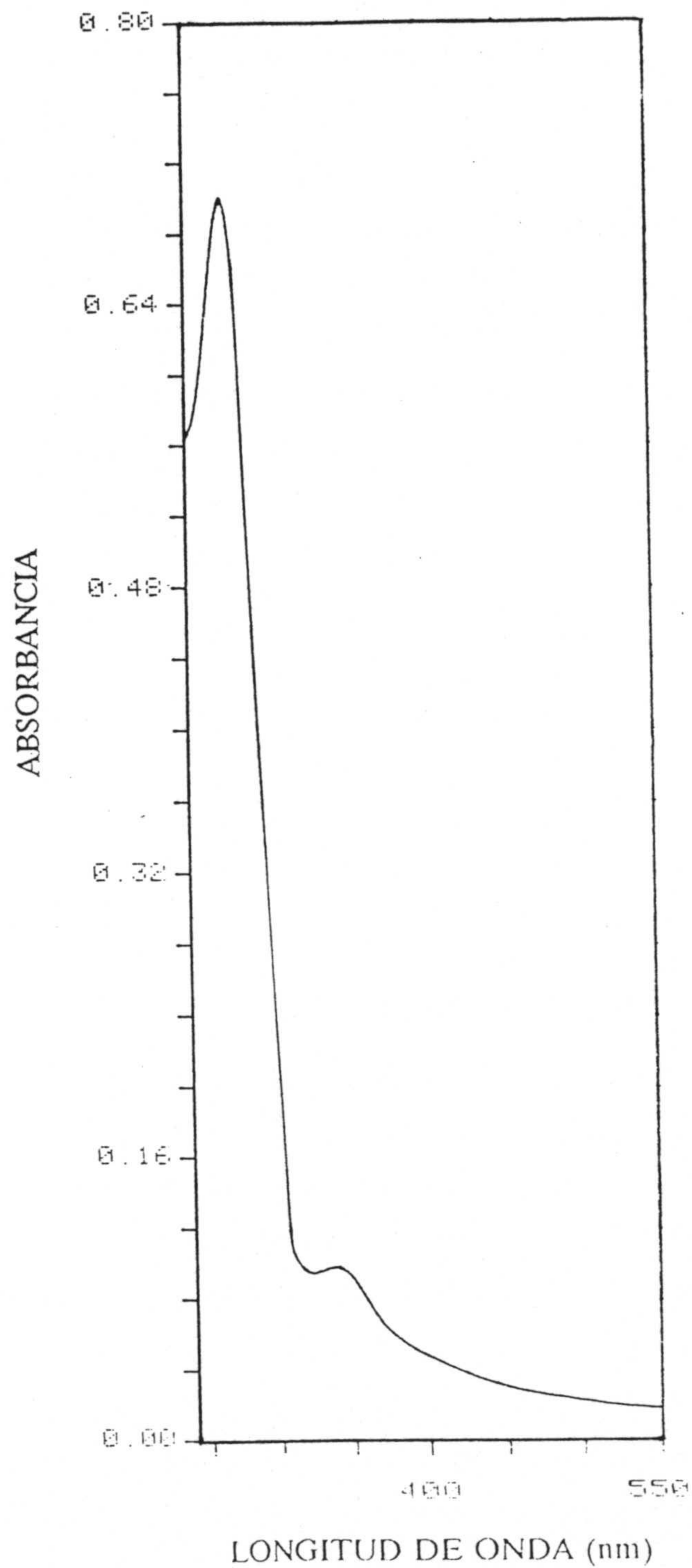


Figura 4-61

Espectro de absorción uv-visible de Poli(C)-2-piridil disulfuro, entre 240 y 550 nm.

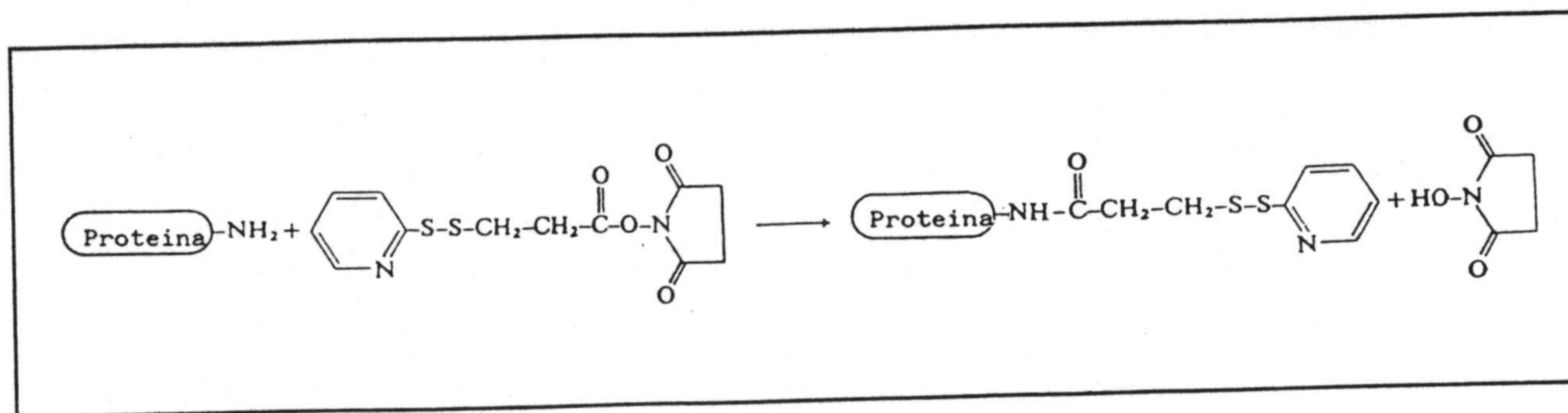


Figura 4-62

Obtención de biliproteínas-2-piridil disulfuro, mediante reacción con SPDP.

Tras la eliminación del exceso de reactivo mediante, diálisis se ha obtenido el espectro de absorción uv-vis de C-PC-2-piridil disulfuro disuelta en tampón de fosfatos 0.1 M, NaCl 0.1M, pH=7.5. Aparentemente el espectro obtenido no presenta variaciones notables respecto al de la proteína disuelta en el mismo tampón. Asimismo, el espectro de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 568$ nm) es similar al de la proteína sin activar. Se han obtenido resultados equivalentes con APC cuando se ha hecho reaccionar con SPDP en las mismas condiciones descritas con anterioridad.

La proteína con grupos 2-piridil disulfuro se puede convertir en una proteína tiolada por reducción con un exceso de DTT, sin concomitante reducción de los enlaces disulfuro, a pH ligeramente alcalino (Carlsson y col., 1978). Por tanto a la anterior disolución se ha añadido directamente DTT hasta una concentración 25 mM y se ha mantenido a 23 °C durante 30 min., con agitación continua (Oi y col., 1982). El esquema de esta reacción se muestra en la Figura 4-63. Tras diálisis frente al mismo tampón se ha registrado el espectro de absorción de la disolución resultante (Figura 4-64) que muestra un pronunciado aumento de la banda de absorción con máximo a 278 nm.

Cuando una proteína con un grupo tiol y otra macromolécula con grupos 2-piridil disulfuro se dejan reaccionar durante un tiempo suficiente, a pH alcalino, se forma un heteroconjugado. Ya que las estructuras requeridas para el intercambio tiol-disulfuro, están presentes en diferentes moléculas, sólo se pueden formar heteroconjugados. Teóricamente, la proteína que contiene los grupos tiol puede oxidarse y dar agregados homogéneos. Sin embargo, esto no ocurre porque el intercambio tiol-disulfuro es mucho más rápido que la oxidación (Carlsson y col., 1978). La reacción puede seguirse cuantitativamente midiendo la

2-tiopiridona liberada.

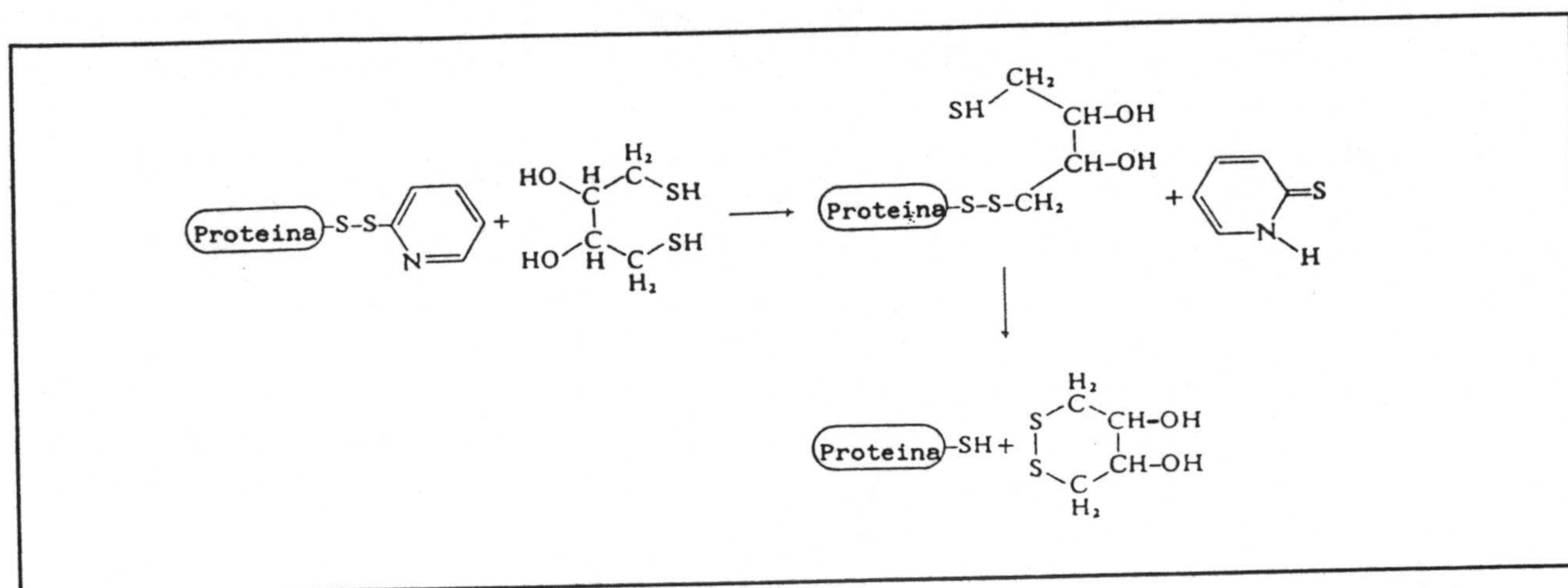


Figura 4-63

Obtención de biliproteína tiolada mediante reacción con exceso de DTT.

Si la macromolécula es un polinucleótido que contiene un determinado número de grupos 2-piridil disulfuro, se podrá preparar un conjugado con varias proteínas tioladas. Debido a que las biliproteínas contienen varios grupos amino libres con diferentes reactividades, la conjugación se realizará en diferentes lugares y los conjugados pueden resultar afectados de alguna heterogeneidad.

Mediante la simple adición de la disolución de Poli(C)-2-piridil disulfuro a la proteína tiolada, en las condiciones descritas en el apartado 3.6.2, se han obtenido conjugados homopolinucleótido-biliproteína. Para demostrar tal aseveración, una vez transcurrido el tiempo de reacción, la disolución se introdujo en un tubo eppendorf equipado con un filtro de corte en 100000 da y se centrifugó a 10000 rpm. Tras repetidos lavados con tampón de fosfatos 0.1 M pH 7.5, se obtuvo por debajo del filtro una disolución azul que después de analizada espectroscópicamente, contiene el exceso de proteína que no se ha unido al Poli(C). El residuo depositado en el filtro, se ha agitado con tampón de fosfatos 0.1 M pH=7.5 y a la disolución resultante se le han efectuado diversos análisis para comprobar que corresponde al conjugado Poli (C)-biliproteína.

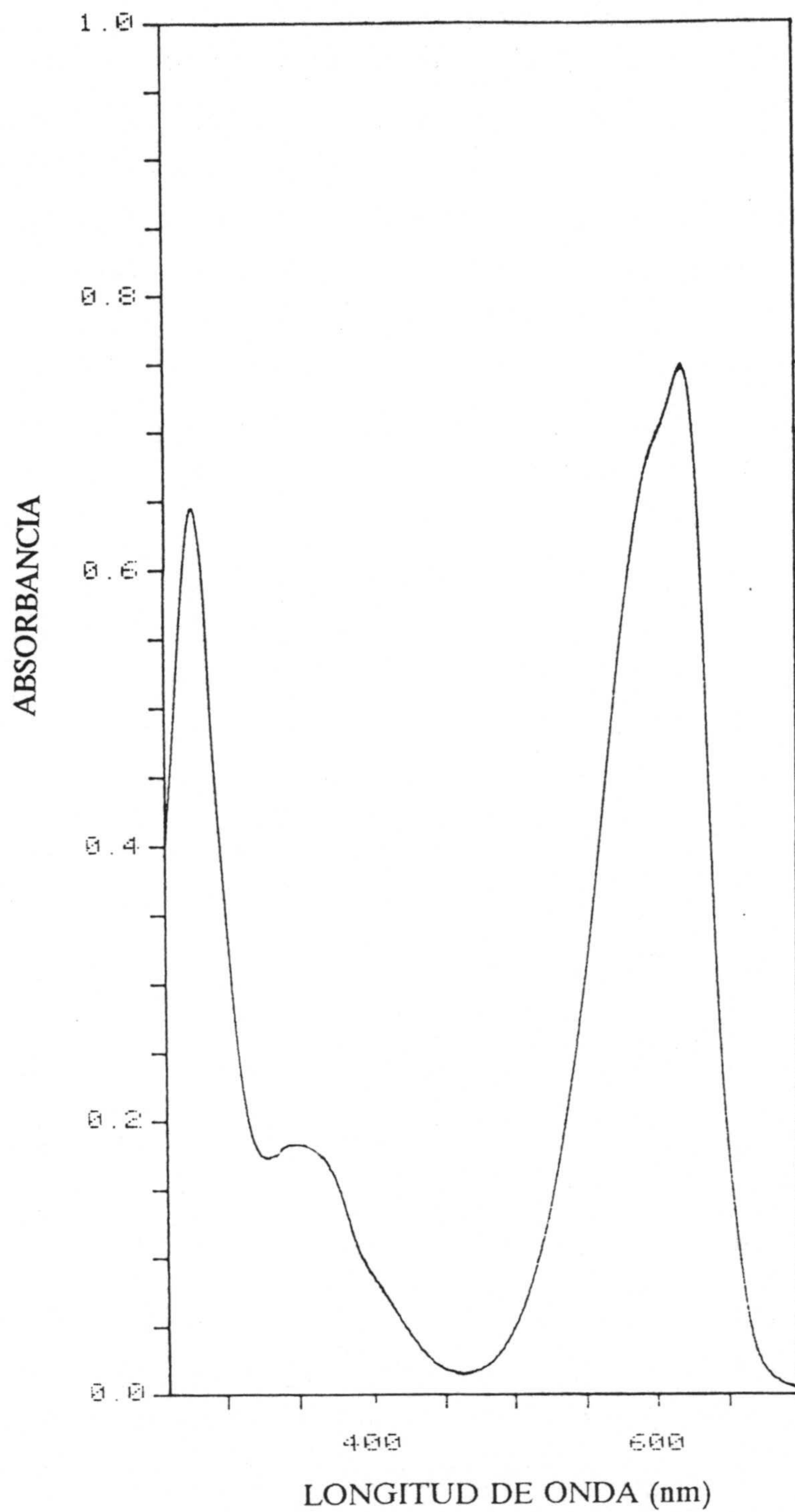


Figura 4-64

Espectro de absorción uv-visible de C-PC tiolada, entre 250 y 700 nm.

En primer lugar, se han registrado los espectros de absorción y fluorescencia de los conjugados Poli(C)-C-PC y Poli(C)-APC. En la Figura 4-65 se muestra el espectro uv-vis del primero. Como se puede observar, el espectro parece la suma de las contribuciones de Poli(C) y C-PC. En la Figura 4-66 se muestra el espectro de absorción uv-vis del conjugado Poli(C)-APC, que, al igual que el anterior, se puede considerar como la suma de las contribuciones de las dos macromoléculas que constituyen el conjugado.

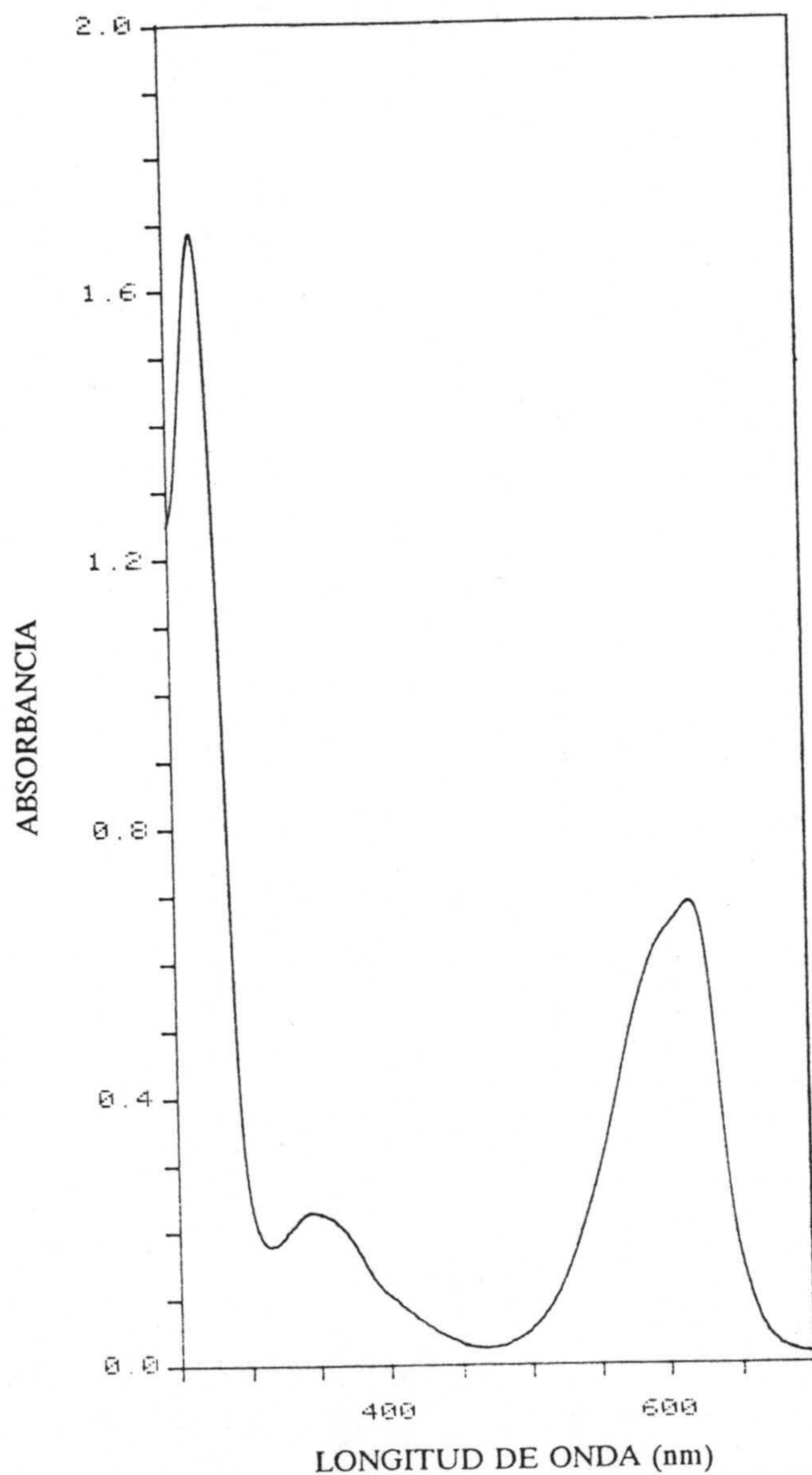
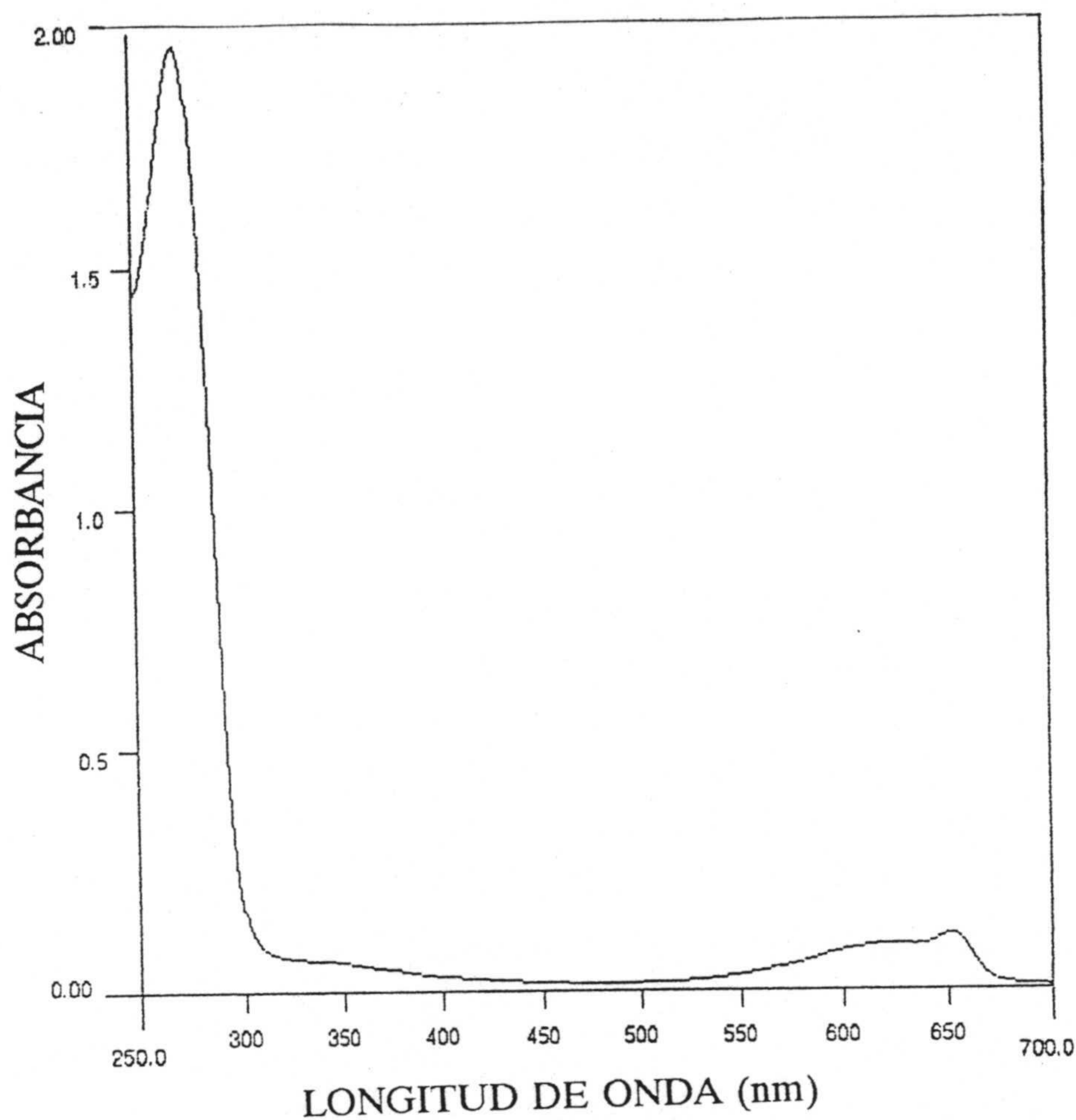


Figura 4-65

Espectro de absorción uv-visible del conjugado Poli(C)-C-PC, entre 250 y 700 nm.

**Figura 4-66**

Espectro de absorción uv-visible del conjugado Poli(C)-APC, entre 250 y 700 nm.

Los correspondientes espectros de fluorescencia, en las condiciones experimentales que se indican, se muestran en la Figura 4-67. En ella se puede comprobar que no existen diferencias apreciables con los espectros obtenidos para las biliproteínas en disolución. Los resultados espectroscópicos indican que no hay interacción significativa entre los cromóforos y el homopolinucleótido de citosina.

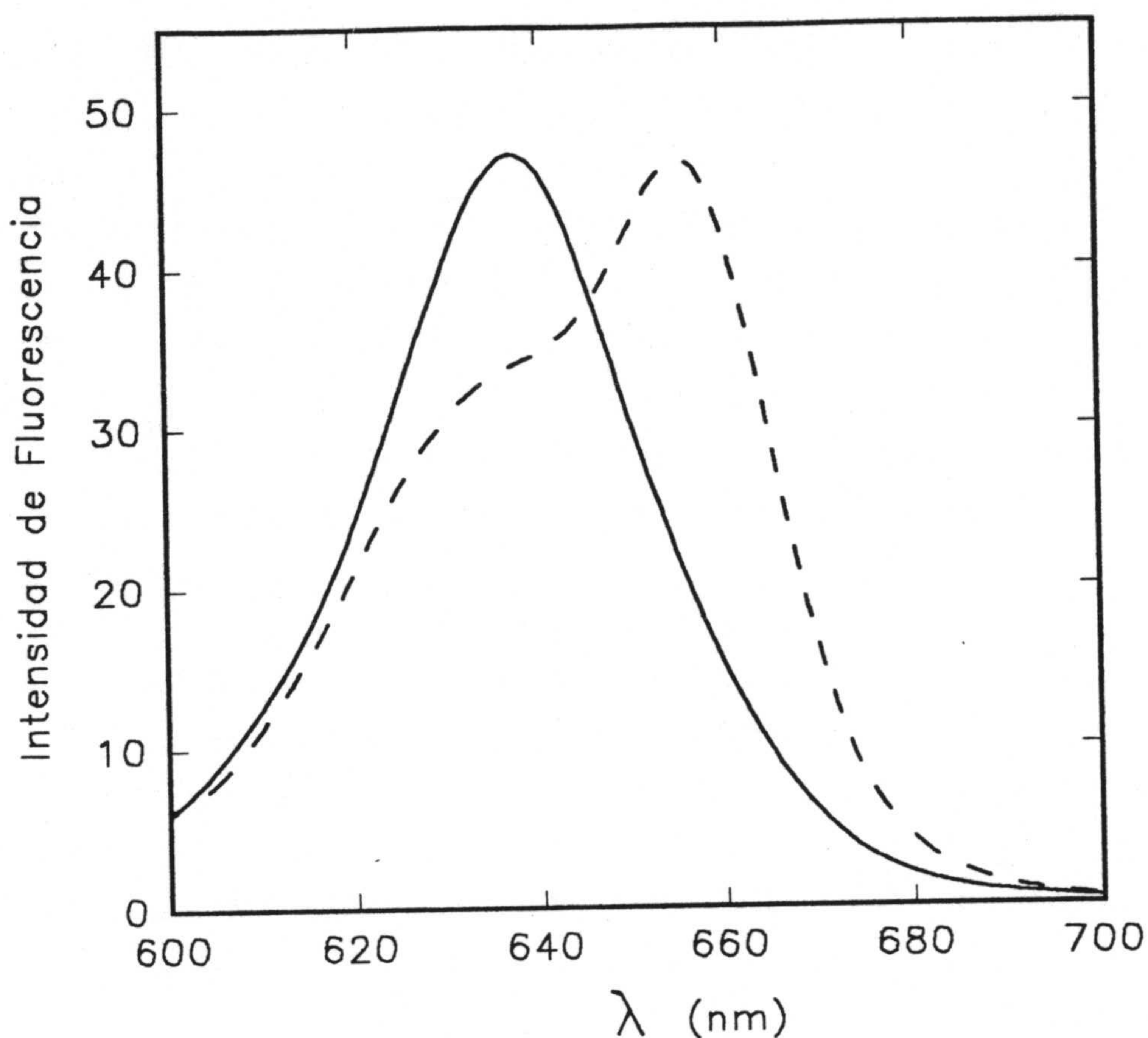


Figura 4-67

Espectros de emisión de fluorescencia de conjugados biliproteína-Poli(C): Poli(C)-C-PC (-----)(λ_{ex} =568 nm) y Poli(C)-APC (- - - - -) (λ_{ex} =590 nm).

Aunque la retención en el filtro de corte de 100000 da permite suponer la formación efectiva del conjugado Poli(C)-biliproteína, se ha corroborado ésta mediante medidas de polarización de fluorescencia. Para ello, se han preparado disoluciones de C-PC, APC, Poli(C)-C-PC y Poli(C)-APC en las mismas condiciones de pH, fuerza iónica y concentración, y se han medido sus polarizaciones de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación de 610 nm para C-PC y su conjugado con Poli(C) y 620 nm para las disoluciones con APC. Las λ_{em} se han escogido lo suficientemente alejadas de las de excitación como para que en las condiciones experimentales empleadas no penetre luz dispersa en el detector, lo que

falsearía la polarización medida. Asimismo, se ha procurado obtener una señal de fluorescencia alta, al objeto de que la medida sea precisa. No obstante y a pesar de estos cuidados experimentales, se debe hacer notar que la introducción de polarizadores en los haces de excitación y emisión reducen considerablemente la señal de fluorescencia, por lo que en muestras poco concentradas, es necesario realizar un número de medidas suficientemente alto como para que el valor medio obtenido tenga una fiabilidad aceptable. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4-XXIII y 4-XXIV.

TABLA 4-XXIII

Medidas de polarización de fluorescencia (P) para una disolución de C-PC (0.33 mg/ml) en fosfato 20 mM pH 7, factor $G=0.453$. ($\Delta\lambda_{ex}=\Delta\lambda_{em}=3$) y para una disolución de Poli(C)-C-PC, factor $G=0.449$ ($\Delta\lambda_{ex}=\Delta\lambda_{em}=5$). Para ambas $\lambda_{ex}=610$ nm, $\lambda_{em}=640$ nm.

| Nº de medida | P (C-PC) | P [Poli(C)-C-PC] |
|--------------|----------|------------------|
| 1 | 0.063 | 0.194 |
| 2 | 0.081 | 0.193 |
| 3 | 0.075 | 0.201 |
| 4 | 0.076 | 0.205 |
| 5 | 0.079 | 0.206 |
| 6 | 0.078 | 0.190 |
| 7 | 0.091 | 0.198 |
| 8 | 0.081 | 0.195 |
| 9 | 0.086 | 0.200 |
| 10 | 0.092 | 0.197 |
| Valor Medio | 0.080 | 0.198 |

TABLA 4-XXIV

Medidas de polarización de fluorescencia (P) para una disolución de APC (0.23 mg/ml) en fosfato 20 mM pH 7, factor $G=0.393$. ($\Delta\lambda_{ex}=\Delta\lambda_{em}=3$) y para una disolución de Poli(C)-APC, factor $G=0.392$ ($\Delta\lambda_{ex}=\Delta\lambda_{em}=5$). Para ambas $\lambda_{ex}=620$ nm, $\lambda_{em}=658$ nm.

| Nº de medida | P (APC) | P [Poli(C)-APC] |
|--------------|---------|-----------------|
| 1 | 0.054 | 0.135 |
| 2 | 0.047 | 0.141 |
| 3 | 0.058 | 0.136 |
| 4 | 0.047 | 0.135 |
| 5 | 0.035 | 0.135 |
| 6 | 0.040 | 0.142 |
| 7 | 0.067 | 0.142 |
| 8 | 0.055 | 0.142 |
| 9 | 0.069 | 0.139 |
| 10 | 0.065 | 0.142 |
| Valor medio | 0.054 | 0.139 |

Para la excitación en estado estacionario, el valor de la polarización de fluorescencia de una muestra fluorescente depende del ángulo medio que las moléculas de fluoróforo rotan durante su tiempo de vida. Así, cuanto mayor es el ángulo, menor es el valor de P . Más específicamente, el valor de P depende de la relación τ/Φ , donde τ es el tiempo de vida y Φ el tiempo de correlación rotacional del fluoróforo. El valor de P disminuye con el aumento de la relación τ/Φ .

Las técnicas de fluorescencia polarizada proporcionan un poderoso método para el estudio de la formación de complejos en los sistemas bioquímicos ya que para una molécula de un fluoróforo que está libre en disolución, el valor de Φ depende del peso molecular y forma del fluoróforo, así como de la viscosidad del disolvente. En el caso de moléculas fluorescentes rígidamente unidas a una estructura más grande, el valor de P dependerá del movimiento rotacional de la estructura mayor. Así por ejemplo, cuando una sustancia etiquetada con un fluoróforo se enlaza a una molécula más grande, hay un aumento en la

polarización de fluorescencia debido a un incremento en el tiempo de correlación rotacional, si se supone que el tiempo de vida no varía.

Por estos motivos, el drástico aumento observado en la polarización de fluorescencia de aquellas disoluciones que contienen Poli(C) respecto a las que contienen sólo proteína, es indicativo de que las moléculas fluorescentes están enlazadas a una estructura mayor, cuya relación Φ/τ ha disminuido con respecto a la que poseen las proteínas libres. Estos resultados obtenidos demuestran que se ha etiquetado realmente Poli(C) con C-PC y APC.

Ya que la polarización de fluorescencia aumenta con el incremento en el valor de la relación Φ/τ , el aumento de aquella observado cuando las biliproteínas se enlazan a Poli(C) puede ser debido al incremento en Φ , al decrecimiento de τ , o a la combinación de los dos.

En un intento de separar los efectos de Φ y τ en los cambios de P que suceden en la conjugación de las proteínas con Poli(C), se han medido los tiempos de vida correspondientes a las proteínas y a los conjugados Poli(C)-proteína. Sin embargo, debido a la baja sensibilidad que inherentemente, tiene un fluorímetro de nanosegundos (respecto a la que posee un fluorímetro de estado estacionario), al bajo porcentaje de marca fluorescente que necesariamente se ha de utilizar para que la sonda conserve sus propiedades de hibridación y a la pérdida de señal que se produce cuando se intercalan los polarizadores en los haces de excitación y de emisión, ha sido imposible efectuar las medidas de resolución temporal de la polarización, que nos habrían proporcionado los tiempos de correlación rotacional de los fluoróforos en la sonda.

No obstante y como ya se ha indicado, se han podido efectuar las medidas de los tiempos de vida de C-PC y APC enlazados a Poli(C), al objeto de compararlos con los obtenidos para las biliproteínas en disolución. Para efectuar tales medidas se han utilizado disoluciones $2.7 \cdot 10^{-6}$ y $2.95 \cdot 10^{-6}$ M en tampón de fosfatos 0.1M pH=7, 0.1 M NaCl, en lo que se refiere a C-PC y APC respectivamente. En el caso de los conjugados biliproteínas-Poli(C) se han utilizado similares disoluciones, aunque la concentración ha sido $3.87 \cdot 10^{-6}$ M para C-PC y $1.52 \cdot 10^{-6}$ M en APC.

Las gráficas correspondientes a los decaimientos y ajustes obtenidos en los cuatro casos se muestran en las Figuras 4-68 a 4-71 y los valores de los ajustes se detallan en la Tabla 4-XXV, en donde también se incluye el promedio aritmético de los tiempos de vida,

$\langle \tau \rangle$, para cada compuesto, calculado mediante la expresión:

$$\langle \tau \rangle = \sum a_i \tau_i$$

en donde τ_i son los tiempos de vida y a_i los coeficientes preexponenciales normalizados.

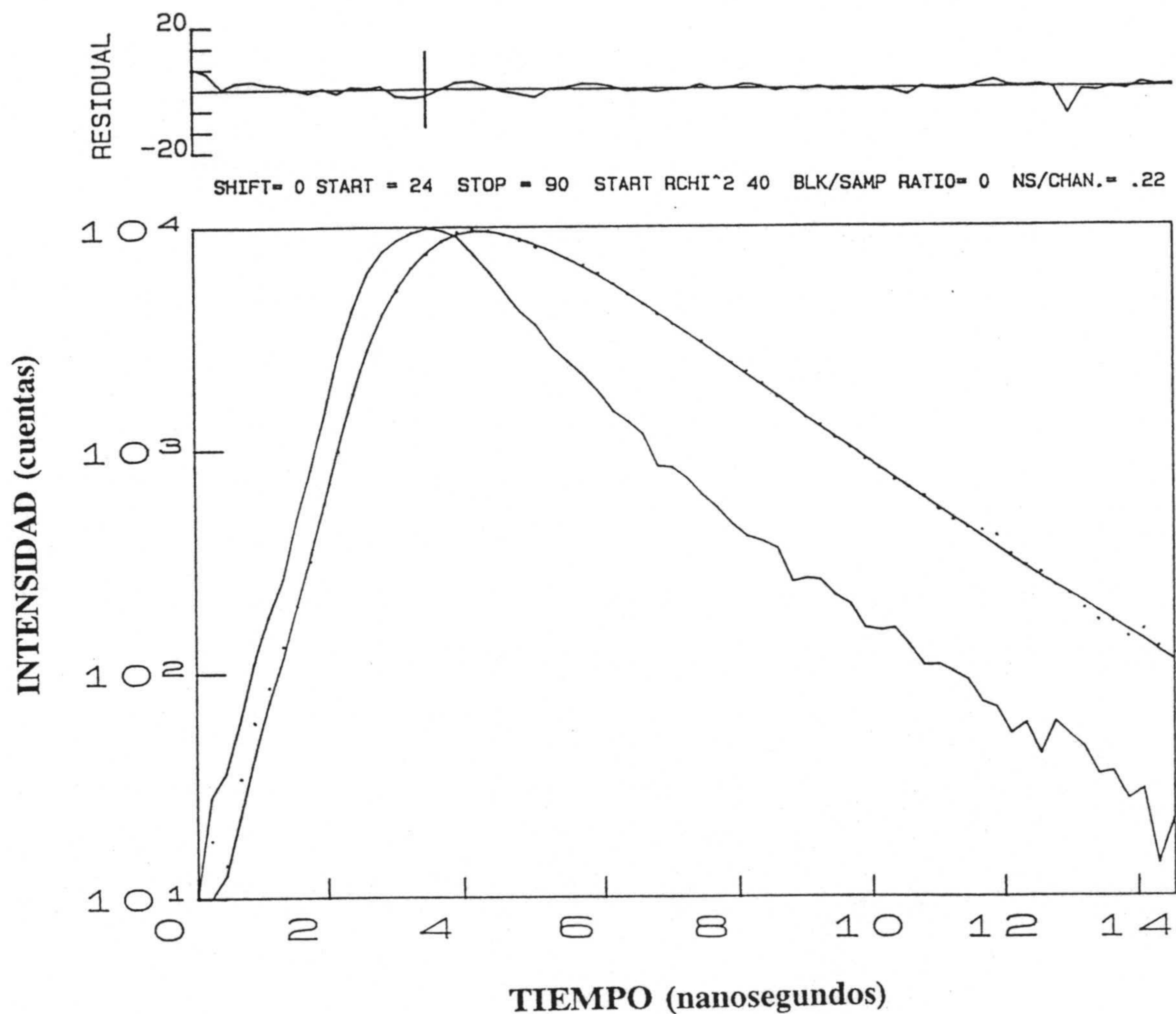


Figura 4-68

Decaimiento de la fluorescencia de una disolución de C-PC ($2.76 \cdot 10^{-6}$ M) en fosfato 0.1 M y pH=7.5. Representación logarítmica.

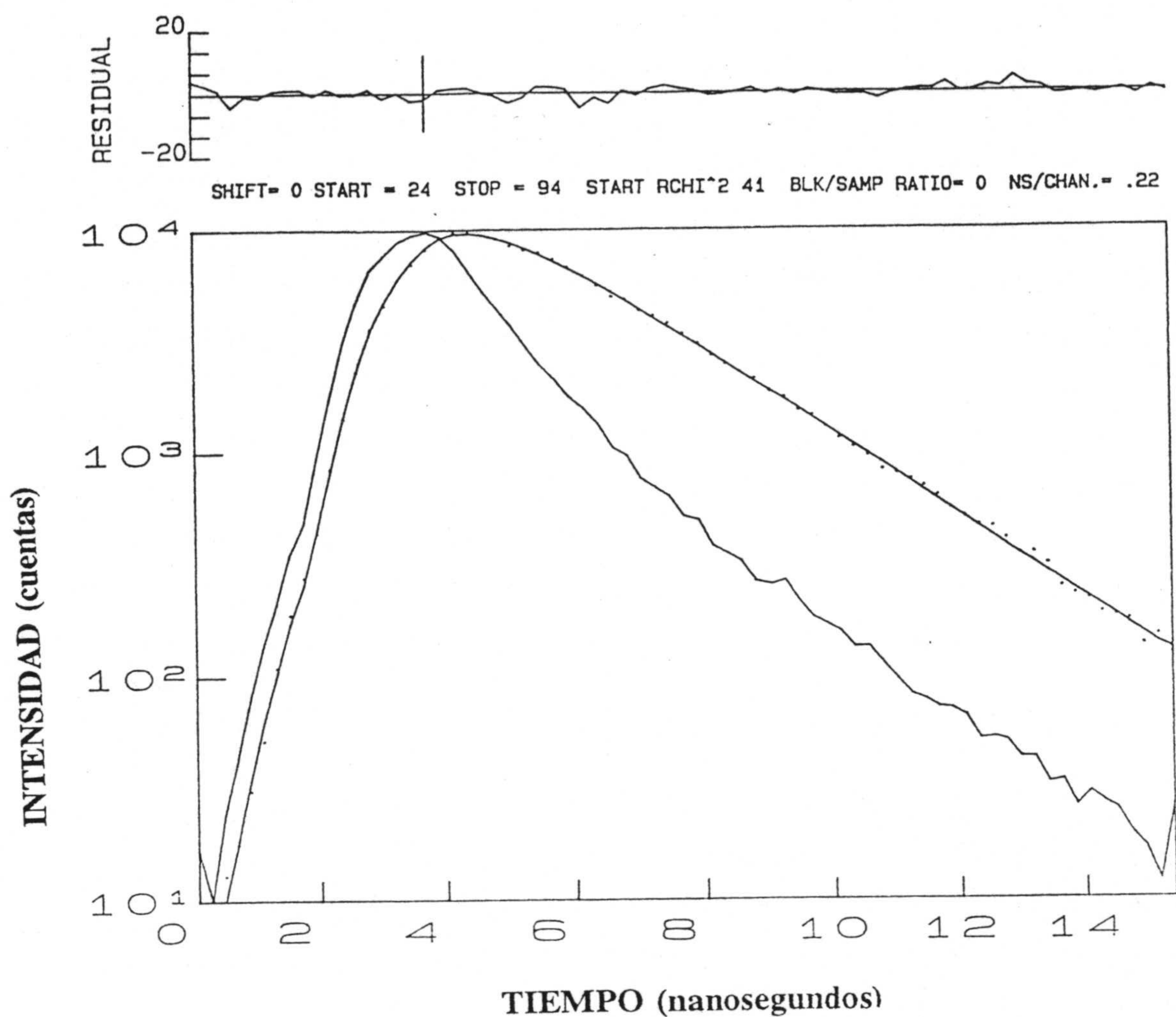


Figura 4-69

Decaimiento de la fluorescencia de una disolución de APC ($2.95 \cdot 10^{-6}$ M) en fosfato 0.1 M y pH=7.5. Representación logarítmica.

TABLA 4-XXV

Parámetros de ajuste correspondientes a los decaimientos de fluorescencia de biliproteínas y sus conjugados con Poli(C).

| Muestra | τ_1 | τ_2 | τ_3 | a_1 | a_2 | a_3 | χ^2 | $\langle \tau \rangle$ |
|--------------|----------|----------|----------|-------|-------|-------|----------|------------------------|
| C-PC | 0.106 | 1.274 | 2.125 | 0.401 | 0.505 | 0.094 | 0.879 | 0.885 |
| Poli(C)-C-PC | 0.245 | 1.105 | 1.737 | 0.473 | 0.357 | 0.017 | 1.148 | 0.805 |
| APC | 0.042 | 1.571 | 2.365 | 0.657 | 0.262 | 0.081 | 1.319 | 0.631 |
| Poli(C)-APC | 0.045 | 1.493 | 2.034 | 0.660 | 0.274 | 0.066 | 1.231 | 0.573 |

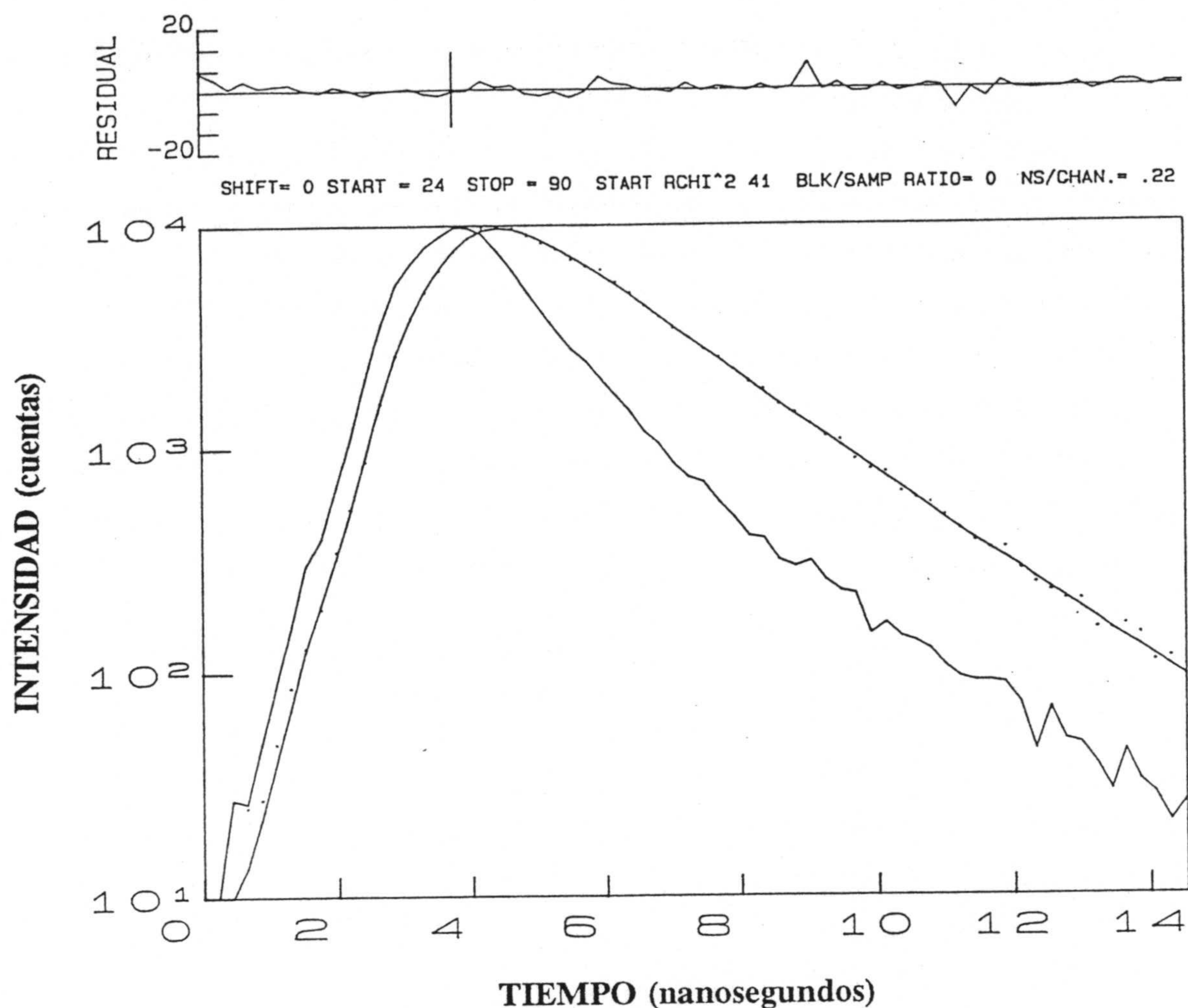


Figura 4-70

Decaimiento de la fluorescencia de una disolución de Poli(C)-C-PC en fosfato 0.1 M y pH=7.5. Representación logarítmica.

Como se puede observar, el promedio aritmético de los tiempos de vida decrece desde 0.885 en C-PC libre hasta 0.805 en C-PC-Poli(C) y desde 0.631 en APC hasta 0.573 en Poli(C)-APC. Es decir, hay una disminución porcentual del 9.1 y del 9.2 para C-PC y APC respectivamente. Esta disminución en $\langle \tau \rangle$ puede justificarse por las interacciones fluoróforo-nucleótido que aunque serán débiles, debido al relativamente largo brazo espaciador que separa al conjugado, pueden originar el *quenching* de fluorescencia observado. Estos resultados corroboran la conclusión ya establecida de que las biliproteínas han sido efectivamente conjugadas a las macromoléculas de homopolinucleótidos.

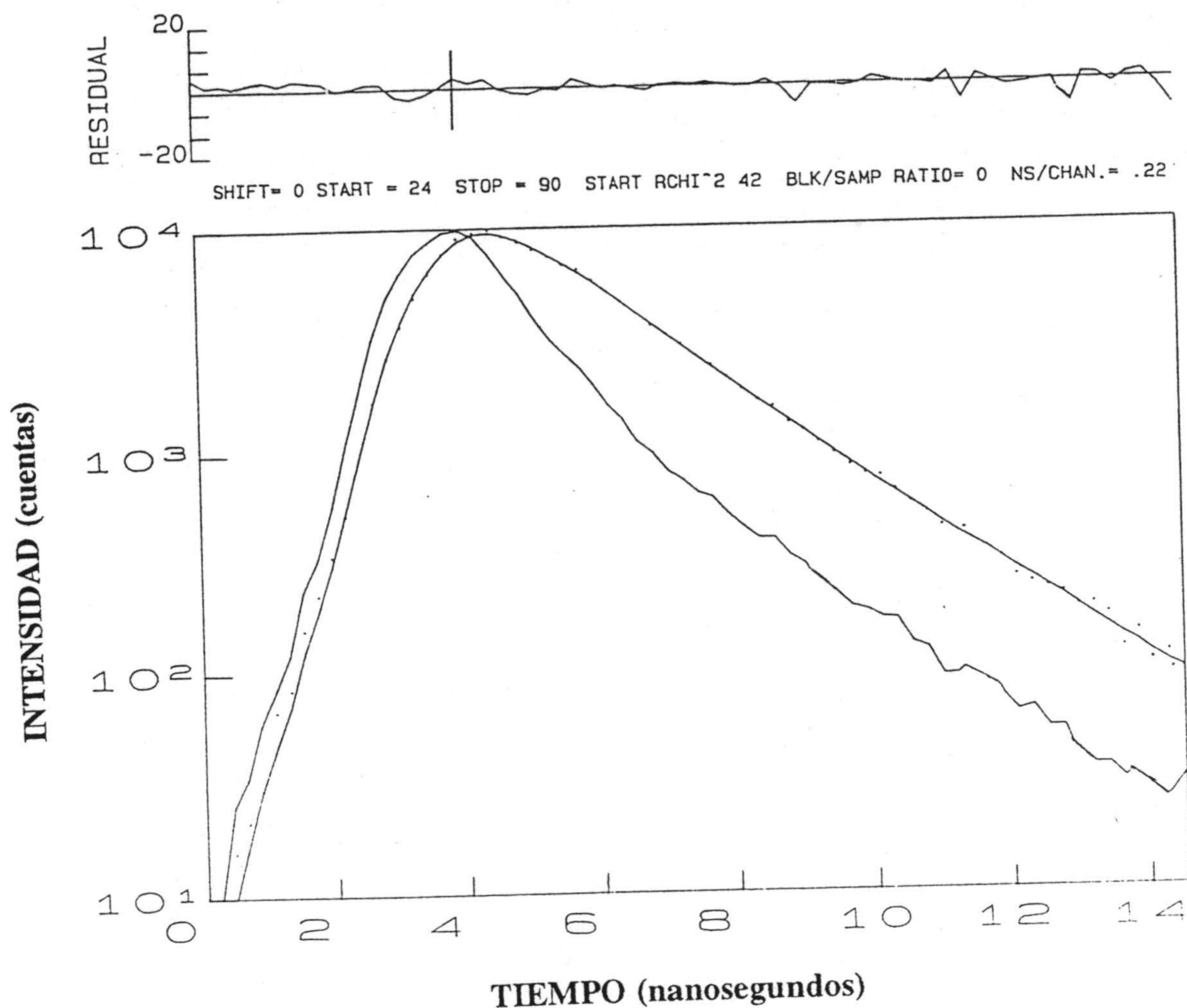


Figura 4-71

Decaimiento de la fluorescencia de una disolución de Poli(C)-APC en fosfato 0.1 M y pH=7.5. Representación logarítmica.

En los dos casos se ha producido una disminución en $\langle \tau \rangle$ lo que implica un aumento de la polarización de fluorescencia. No obstante cálculos aproximados realizados por nosotros indican que el porcentaje de disminución en $\langle \tau \rangle$ no parece suficiente como para originar un incremento de polarización superior al 100%, por lo que la conjugación a Poli(C) debe de conducir también al aumento de Φ , como es de esperar para una macromolécula mucho mayor que la misma proteína.

De las curvas de decaimiento, también se deriva que la ley de éste tiene naturaleza triexponencial (lo que se puede explicar como fluorescencia desde tres diferentes moléculas

o conformaciones, o como fluorescencia desde la misma molécula en un ambiente distinto), aunque quizá no se debería excluir la posibilidad de que la función del decaimiento esté gobernada por una ley compleja no exponencial. Esto último puede esperarse cuando la transferencia de energía es de importancia (Blumen y Manz, 1979).

Los primeros estudios sistemáticos de fluorescencia de biliproteínas demostraron que hay dos tipos de cromóforos presentes en aquellas, los denominados sensibilizantes, *s*, que transfieren excitones con alta eficiencia hacia la otra clase de cromóforos, denominados fluorescentes, *f*, que fluorescen con alto rendimiento cuantico (Teale y Dale, 1970; Dale y Teale, 1970). Ya que los cromóforos *s* no transfieren la energía con el 100% de eficiencia, alguna pequeña proporción de su excitación puede liberarse también como fluorescencia.

Aunque los tres cromóforos en C-PC y los dos en APC son químicamente idénticos, las estructuras cristalinas estudiadas a alta resolución de estas proteínas (Schirmer y col., 1987; Brejc y col., 1995) muestran que cada cromóforo está inmerso en un ambiente exclusivo que convierte a cada cromóforo en espectralmente único. También han permitido demostrar de forma inequívoca la posibilidad de transferencia de energía entre cromóforos y por consiguiente la complejidad espectral de las biliproteínas.

En relación con lo anterior, la región visible de los espectros de absorción y fluorescencia consiste en bandas anchas no estructuradas (aunque se presenta una ligera estructuración en APC), indicando que los espectros de los cromóforos solapan en un cierto grado. La resolución espectral se complica adicionalmente con el estado de agregación de la proteína. Todos estos resultados han sido corroborados en nuestros estudios de polarización de fluorescencia ya discutidos en el apartado 4.5.

Por todo lo comentado, el decaimiento temporal de la fluorescencia resulta bastante complejo. Así, se ha encontrado que los tiempos de vida dependen en alto grado de la agregación (Searle y col., 1978), de la preparación de la muestra (Kobayashi y col., 1979) e incluso de la edad de la muestra (Hefferle, 1982). Las investigaciones realizadas por varios grupos, tanto en subunidades aisladas de C-PC como con la proteína completa, han mostrado que los ajustes del decaimiento de la fluorescencia requieren tres o cuatro exponenciales (Switalski y Sauer, 1984; Holzwarth y col., 1987; Gillbro y col., 1988; Fischer y col., 1990; Xia y col., 1991). En un reciente trabajo, la función para describir el decaimiento experimental, mediante análisis global, ha oscilado entre tres y cinco términos (Debrezny y

col., 1993). Nuestros resultados son por lo tanto concordantes, en general, con los obtenidos usualmente.

No es fácil efectuar asignaciones concretas de los tiempos de vida a los distintos cromóforos funcionales. Los datos más recientes en la literatura que se refieren a C-PC, han sido obtenidos con instrumentación de mayor precisión que el fluorímetro de nanosegundos empleado en esta Memoria. La mayoría de los grupos de investigadores han mostrado que se necesitan cuatro exponenciales para ajustar adecuadamente los datos experimentales, dos componentes rápidos atribuidos a la transferencia de energía entre los cromóforos $\beta_{155} \rightarrow \beta_{84}$ del mismo monómero y entre $\alpha_{84} \rightarrow \beta_{84}$ y/o $\beta_{84} \rightarrow \beta_{84}$ de monómeros adyacentes; un componente lento atribuido a la recuperación del estado fundamental y un tiempo de vida intermedio que podría asignarse a la heterogeneidad de los cromóforos (Holzwarth y col., 1987; Gillbro y col., 1988; Xia y col., 1991; Debreczeny y col., 1993). Dado que ni nuestro fluorímetro con resolución temporal ni la sencilla metodología empleada en esta Memoria, podrían discernir entre los dos eventos más rápidos, la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores recientemente, proporciona una aceptable concordancia.

En lo que se refiere a APC, el decaimiento observado difiere del descrito por Yeh y col. (1986) procedente de *A. variabilis*, que en estado trimérico, presenta un decaimiento monoexponencial. Sin embargo, teniendo en cuenta los espectros de polarización que se han descrito en el epígrafe anterior y los datos estructurales derivados de los estudios cristalográficos de Brejc y col. (1995), se puede llegar a la conclusión de que, en APC procedente de *S. platensis* en su estado trimérico de agregación, es más lógico esperar un decaimiento complejo que monoexponencial, debido al distinto ambiente proteico en los cromóforos α_{84} que en los β_{84} y a la transferencia de energía entre los cromóforos $3\alpha_{84}$ a $1\beta_{84}$, $1\alpha_{84}$ a $1\beta_{84}$ y $1\beta_{84} \leftrightarrow 3\beta_{84}$ (ésta última en ambos sentidos). Como ya se ha comentado en el epígrafe anterior, los dos tipos de APC procedentes de distintas especies de microalgas, deben ser bastante diferentes. Así, el decaimiento obtenido por nosotros, ajustable a tres exponenciales, se puede justificar cualitativamente de forma similar al de C-PC, mejor que si fuera monoexponencial. Este decaimiento complejo es mucho más coherente con los datos disponibles en la actualidad sobre la estructura trimérica de APC procedente de *S. platensis*.

Los valores de polarización recogidos en las Tablas 4-XXIII y 4-XXIV son también indicativos de que el estado de agregación de las biliproteínas no varía en el proceso de la

conjugación y este hecho es de la mayor importancia, ya que si los tratamientos químicos realizados hubieran originado la formación exclusiva de monómeros o hubieran desnaturado a las proteínas, el valor de la polarización de fluorescencia sería mucho mayor, probablemente cercano al valor intrínseco. Esto invalidaría la posibilidad de su empleo como sonda fluorimétrica en la detección de la hibridación con cadenas complementarias en medios homogéneos, que se va a abordar en una próxima sección.

4.6.2.-Cálculo del porcentaje de marca.

Como se pone de manifiesto en las Figuras 4-64, 4-65 y 4-66, aunque el espectro de absorción de las biliproteínas conjugadas a Poli(C) varía ligeramente en lo que se refiere a la región visible del mismo, ya que, en el caso del conjugado de C-PC, se observa un hombro a 580 nm aproximadamente y en el de APC el hombro a 620 nm aparece algo más estructurado, los máximos de absorción característicos de las proteínas parece que no se alteran de forma sensible.

Sin embargo, en lo que se refiere a la región uv del mismo, tanto las proteínas como Poli(C) y los grupos amido que unen ambas estructuras presentan absorción en la región alrededor de 270 nm. Debido a que las bandas de absorción a mencionada longitud de onda solapan fuertemente, la concentración de Poli(C) se ha calculado espectrofotométricamente antes de efectuar la conjugación con la proteína y se ha supuesto que la totalidad de Poli(C) ha quedado retenido en el filtro de corte, por lo que sólo es necesario calcular la cantidad de biliproteína, dada, por su absorción en el máximo correspondiente a la región visible.

En el cálculo de la concentración de Poli(C) ha de tenerse en cuenta que el grupo 2-piridil disulfuro tienen su propia absorbancia a 270 nm (Grassetti y Murray, 1967), por lo que se obtendría una concentración de Poli(C) erróneamente alta si ésta se calcula en base a la absorción a 270 nm. Sin embargo, de la observación de las Figuras 4-59 y 4-61, se puede hacer la suposición de que el máximo de absorción que presenta a 343 nm la estructura Poli(C)-2-piridil disulfuro (Poli(C)-2PD) es una aportación exclusiva de este último grupo, por lo que si se conocen sus coeficientes de absorción molar a 270 nm y a 343 nm, se puede calcular la concentración de Poli(C) (en base de polinucleótidos) mediante la sencilla expresión:

$$[Poli(C)] \text{ (moles } L^{-1}) = \frac{A_{270} - \frac{A_{343}}{\epsilon_{343}^{PD}} \epsilon_{270}^{PD}}{\epsilon_{270}^{PC}} \quad (R-1)$$

en donde A_{270} y A_{343} son las absorbancias de la disolución a 270 y 343 nm, respectivamente. ϵ_{270}^{PD} y ϵ_{343}^{PD} los coeficientes de extinción molar del grupo 2-piridil disulfuro a 270 y 343 nm y ϵ_{270}^{PC} el coeficiente de extinción molar de Poli(C) a 270 nm.

Antes de aplicar la anterior expresión, se ha comprobado si es cierta la suposición anterior de que la absorbancia a 343 nm se debe exclusivamente al grupo 2-piridil disulfuro y se han calculado sus coeficientes de extinción molar a 270 nm y 343 nm.

Para ello, se ha adicionado 0.1 ml de una disolución 50 mM de DTT en agua destilada a una alícuota de 1 ml de la disolución de Poli(C)-2-PD y se ha diluido hasta 2 ml. Mediante este tratamiento se desprende de la macromolécula 2-tiopiridona que posee un coeficiente de extinción molar de $8.08 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ a 343 nm (Stuchbury y col., 1975). La cantidad de 2-tiopiridona liberada es equivalente al contenido de grupos 2-piridil disulfuro en el Poli(C) (Carlsson y col. 1978). La disolución resultante se ha centrifugado en un tubo eppendorf equipado con un filtro de corte de 10000 da y al filtrado se le midió su absorbancia a 270 y 343 nm. El valor de la absorbancia obtenido a 343 fue 0.078. Una vez dividido por $8.08 \cdot 10^3$ proporciona una concentración de 2-tiopiridona de $9.64 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. El valor de absorbancia a 270 nm fue 0.049 que dividido por la concentración calculada con anterioridad proporciona un coeficiente de extinción molar a 270 nm de $5082 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ que está en muy buena concordancia con el mencionado por Carlsson ($5100 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$).

El Poli(C) retenido en el filtro fue cuantitativamente recuperado mediante lavados sucesivos con un total de 2 ml de tampón de fosfatos. Los líquidos procedentes de los lavados se unieron y se midió su absorbancia a 270 nm que fue de 0.618. Este valor dividido por 5000 ($\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) que es el coeficiente de extinción molar del Poli(C) (Yguerabide y col., 1997) proporciona una concentración igual a $1.24 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ expresada en bases de polinucleótidos.

Dividiendo la concentración de 2-tiopiridona entre la de Poli (C), se obtiene el porcentaje de grupos 2-piridil disulfuro contenidos en el polinucleótido. En nuestro caso ha resultado del 7.77% para la estructura correspondiente al espectro de absorción de la Figura 4-61.

Se debe hacer notar que si se calculan las concentraciones directamente del espectro de absorción de la figura mencionada, mediante la ley de Beer a 343 nm y la expresión R1, se obtiene un porcentaje de sustitución del 8.45%, lo que está muy cerca del valor hallado con la anterior metodología e indica que el enlace modifica poco las propiedades espectrales de absorción de los componentes, por lo que el porcentaje de sustitución se puede calcular con bastante aproximación aplicando simplemente la ley de Beer.

Finalmente, para calcular el porcentaje de marca fluorescente en la sonda, se ha supuesto que en el conjugado recuperado en el filtro de corte se encuentra todo el Poli (C) adicionado a la proteína tiolada y que en ésta no se ha modificado su coeficiente de extinción a 616 nm. Dado que el valor de éste es $1.78 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$, la concentración de C-PC en el conjugado ha resultado ser de $0.690/\epsilon = 3.87 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. De otra parte, la concentración de la disolución de Poli (C) adicionado al medio de reacción ha sido 1 ml $4.96 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ / 2.1 ml de disolución correspondiente al medio de reacción total = $2.36 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. El cociente entre ambas cantidades multiplicado por cien proporciona el porcentaje de marca fluorescente, que ha resultado ser del 1.6%.

Este valor también se puede calcular, de forma aproximada, a partir del espectro de absorción del conjugado Poli (C)-C-PC de la Figura 4-65, sin más que suponer que la conjugación no altera los coeficientes de extinción de los cromóforos que absorben a 270 nm. Así, a la absorbancia medida a 270 nm se le resta la contribución debida a la proteína, dada por: $(A_{610}/\epsilon_{610,C-PC}) \cdot \epsilon_{270,C-PC}$. La concentración de C-PC anteriormente calculada ha sido $3.87 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, mientras que la de Poli (C) es de $2.94 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, por lo que el porcentaje de marca fluorescente resulta del 1.3%. Como se puede observar, este segundo método de cálculo proporciona un porcentaje ligeramente inferior al calculado por el primer método. Este resultado se puede justificar si se tiene en cuenta que el grupo amido, por ejemplo acetamida disuelta en agua, tiene un máximo de absorción a 214 nm (con un coeficiente de extinción molar de $60 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) por lo que a 270 nm presenta una ligera absorción que provoca que el cálculo de la concentración de Poli (C) sea erróneamente alto. Sin embargo, no es posible calcular la contribución de los grupos amido por espectroscopía de absorción, ya que a

mayores longitudes de onda, éstos grupos no poseen ninguna absorción característica que permita calcular su concentración. No obstante, el error cometido con el método absorciométrico no es relevante en las aplicaciones analíticas de la sonda fluorimétrica (Talavera y col., 1997).

Por este último motivo, se ha utilizado este sencillo método para el cálculo del porcentaje de marca de Poli(C) con APC. Con los datos derivados de la Figura 4-66 y los valores de $\epsilon_{650,APC} = 0.61 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ y $\epsilon_{270,APC} = 0.15 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$, se han determinado las concentraciones de APC y Poli(C) que han proporcionado los valores, $1.52 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ y $3.87 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, respectivamente. El porcentaje de etiquetas fluorescentes ha resultado del 0.4 %.

Con los conjugados Poli (C)-biliproteína que se acaban de describir, se han realizado las experiencias que se discuten a continuación, destinadas a demostrar la utilidad de los mismos en la detección de la hibridación de cadenas complementarias de homopolinucleótidos sintéticos, en medios homogéneos.

4.6.3.-Utilización del conjugado biliproteína-Poli(C) en la detección fluorimétrica de la hibridación de cadenas complementarias, en medios homogéneos.

Como antes se ha indicado, cuando una molécula que fluoresce se enlaza a una molécula mayor, hay un gran incremento en la polarización de fluorescencia, debido a un significativo aumento en el tiempo de correlación rotacional. Así, pues, el objetivo de las experiencias que se describen a continuación ha sido determinar si la hibridación entre una sonda fluorescente etiquetada con biliproteínas [C-PC-Poli(C) o APC-Poli(C)] y su cadena complementaria [Poli(I)], resulta acompañada por cambios suficientemente significativos en la polarización de fluorescencia como para poder detectar la formación de híbridos, sin necesidad de separar físicamente la sonda libre de la hibridada.

Con este motivo se han llevado a cabo experiencias en las que una disolución de concentración conocida de Poli(C)-biliproteína ($6.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$), se ha titulado con alicuotas de una disolución más concentrada de Poli(I) ($4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). La concentración de Poli(I) se ha seleccionado de forma que la valoración completa se consiga sin que varíe significativamente la concentración de biliproteína, al objeto de que los cambios en la concentración no originen variaciones de polarización (Eisenger y Flores, 1985), aunque sólo ocurre en dispersiones

que presentan una cierta turbidez y las disoluciones empleadas por nosotros fueron siempre transparentes. Después de cada adición de Poli (I), la muestra se incubó durante 15 minutos antes de realizar cada medida de polarización.

Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas 4-XXVI y 4-XXVII en donde también se indican las concentraciones y condiciones experimentales empleadas. La representación gráfica de los resultados se ha realizado en las Figuras 4-72 y 4-73 respectivamente.

TABLA 4-XXVI

Valoración de Poli(C)-C-PC con Poli(I). $[\text{Poli(C)-C-PC}] = 6.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (427 μl) y $[\text{Poli(I)}] = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

| Poli(I) añadido (μl) | $r = [\text{Poli(I)}/\text{Poli(C)}]$ | Polarización |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0 | 0.000 | 0.198 |
| 10 | 0.137 | 0.216 |
| 20 | 0.270 | 0.229 |
| 30 | 0.395 | 0.249 |
| 40 | 0.520 | 0.259 |
| 50 | 0.630 | 0.273 |
| 60 | 0.741 | 0.285 |
| 70 | 0.847 | 0.299 |
| 80 | 0.949 | 0.306 |
| 90 | 1.047 | 0.315 |
| 100 | 1.141 | 0.321 |
| 110 | 1.232 | 0.326 |
| 120 | 1.320 | 0.330 |
| 130 | 1.404 | 0.332 |
| 140 | 1.520 | 0.332 |
| 150 | 1.630 | 0.332 |

TABLA 4-XXVII

Valoración de Poli(C)-APC con Poli(I). [Poli(C)-APC]= $6.6 \cdot 10^{-5}$ M (427 μ l) y [Poli(I)]= $4 \cdot 10^{-4}$ M.

| Poli(I) añadido (μ l) | $r=[\text{Poli(I)}/\text{Poli(C)}]$ | Polarización |
|-------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| 0 | 0.000 | 0.139 |
| 10 | 0.137 | 0.151 |
| 20 | 0.270 | 0.162 |
| 30 | 0.395 | 0.175 |
| 40 | 0.520 | 0.183 |
| 50 | 0.630 | 0.195 |
| 60 | 0.741 | 0.202 |
| 70 | 0.847 | 0.213 |
| 80 | 0.949 | 0.220 |
| 90 | 1.047 | 0.225 |
| 100 | 1.141 | 0.230 |
| 110 | 1.232 | 0.232 |
| 120 | 1.320 | 0.236 |
| 130 | 1.404 | 0.236 |
| 140 | 1.520 | 0.236 |
| 150 | 1.630 | 0.236 |

A pH 7.5 y concentración salina 0.1 M, se sabe que Poli (I) forma cadenas dobles de bases apareadas con Poli (C) a una relación molar 1:1 expresada en bases de nucleótidos (Chamberlin y Patterson, 1965). En el duplex, los residuos citosina del Poli (C) forman pares de bases con los residuos hipoxantina del Poli (I). Las Figuras 4-72 y 4-73 muestran que la polarización de fluorescencia aumenta continuamente con el incremento de la concentración de Poli (I) hasta que se alcanza el valor de saturación a una relación molar aproximada 1:1, expresada en bases nucleotídicas, de Poli (C) y Poli (I). La Figura 4-72 muestra que la polarización de fluorescencia aumenta en un factor de 1.68, cuando Poli (C)-CPC hibrida por completo. En la Figura 4-73 se observa que el factor de aumento en la polarización tras la

completa hibridación de Poli (C)-APC con Poli (I) es de 1.70. Es de importancia enfatizar aquí, que estos aumentos son bastante más pronunciados que los cambios en la polarización de fluorescencia comunmente observados con fluoróforos intrínsecos o extrínsecos en el estudio de sistemas bioquímicos y que son generalmente utilizados con diversos fines analíticos.

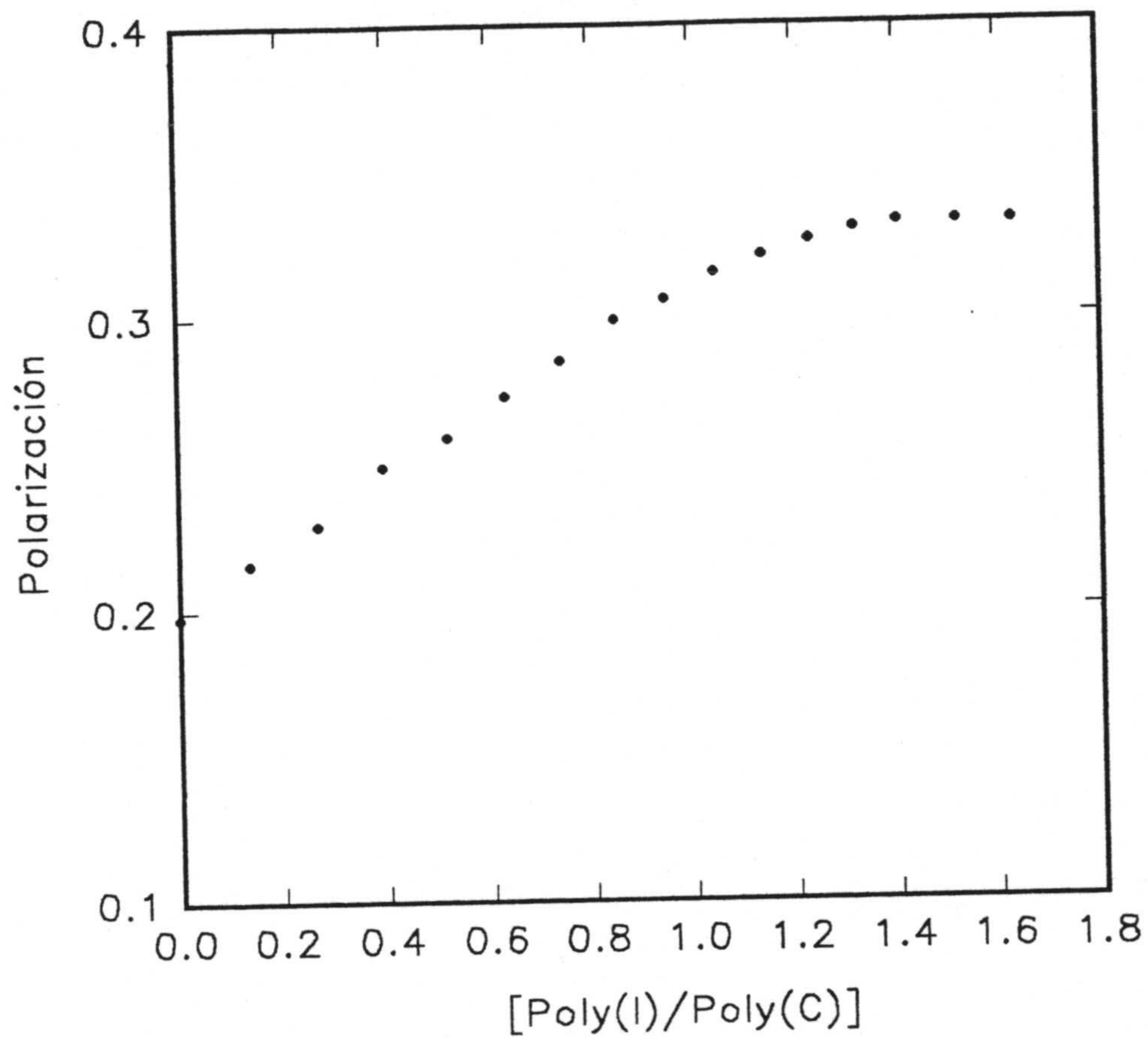
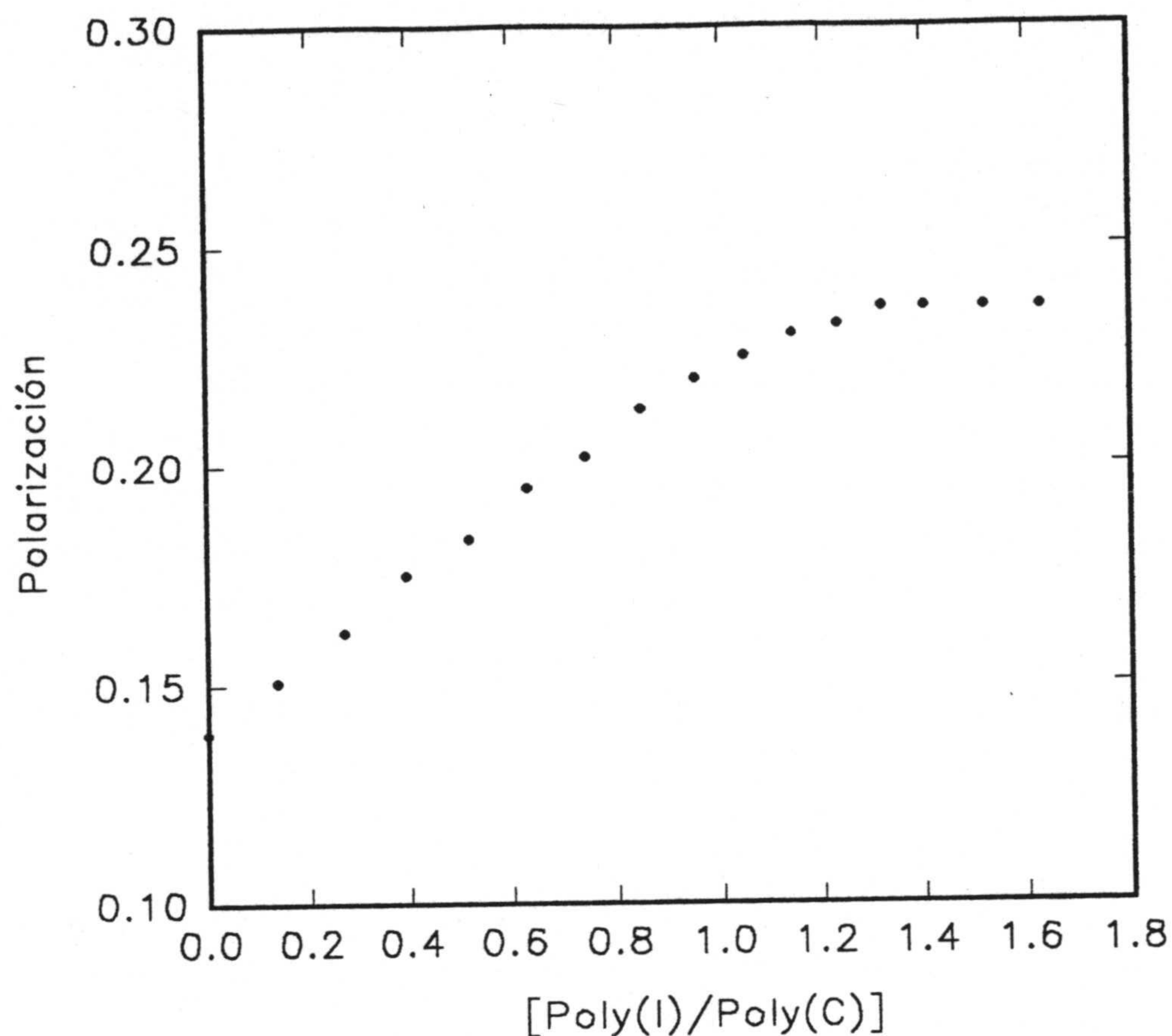


Figura 4-72

Valoración de Poli(C)-C-PC con Poli(I).

**Figura 4-73**

Valoración de Poli(C)-APC con Poli(I).

A causa de la alta afinidad de hibridación entre Poli (I) y Poli (C), se espera que todo el Poli (I) adicionado a la disolución de Poli (C) llegue a hibridar completamente con éste, por lo que también se puede esperar que la fracción de bases de Poli (C) apareadas aumenten linealmente con la concentración de Poli (I) hasta la concentración de saturación. Sin embargo, es relevante efectuar la siguiente consideración: durante la titulación de Poli (C)-biliproteína con Poli (I), a bajas concentraciones de Poli (I), se forman duplex que poseen trozos de cadena no apareados, mientras que a altas concentraciones de éste, los trozos de cadenas complementarias sin aparear, forman pares unos con otros formando redes complejas. No está muy claro si en tales redes complejas, la polarización debería de aumentar linealmente con respecto a la fracción de Poli (C)-biliproteína apareado. Para corroborar tal extremo, que resulta de fundamental importancia en el pretendido análisis fluorimétrico de hibridación, se ha supuesto que el aumento de la polarización en la hibridación es

proporcional a la cantidad de bases apareadas y se ha calculado el tanto por ciento de hibridación mediante la siguiente expresión:

$$\% H = 100 (P - P_0)/(P_f - P_0) \quad (R-2)$$

donde P_0 y P_f son la polarización medida a concentración cero y saturante de Poli (I) y P es la polarización a cualquier concentración intermedia de Poli (I). La representación del $\% H$ calculado según la relación R-2 vs $[Poli (I)]/[Poli (C)]$ se ha realizado en las Figuras 4-74 y 4-75. La linealidad obtenida en el aumento de la polarización de fluorescencia, junto a que este aumento finaliza bruscamente a una relación molar aproximada $[Poli (I)]:[Poli (C)] = 1:1$, soporta la idea de que la polarización es efectivamente proporcional a la fracción de Poli (C)-biliproteína que ha sido hibridada.

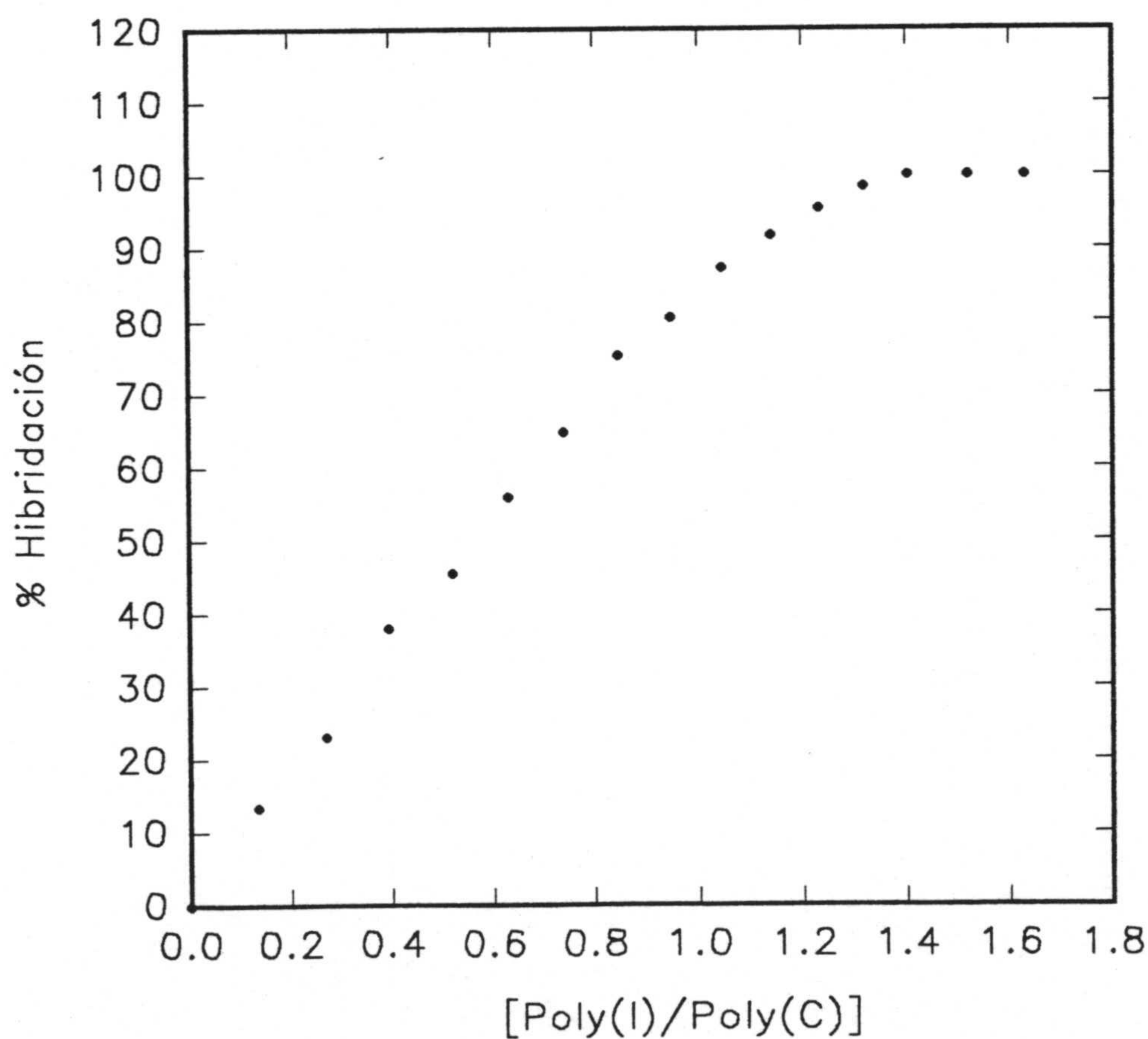
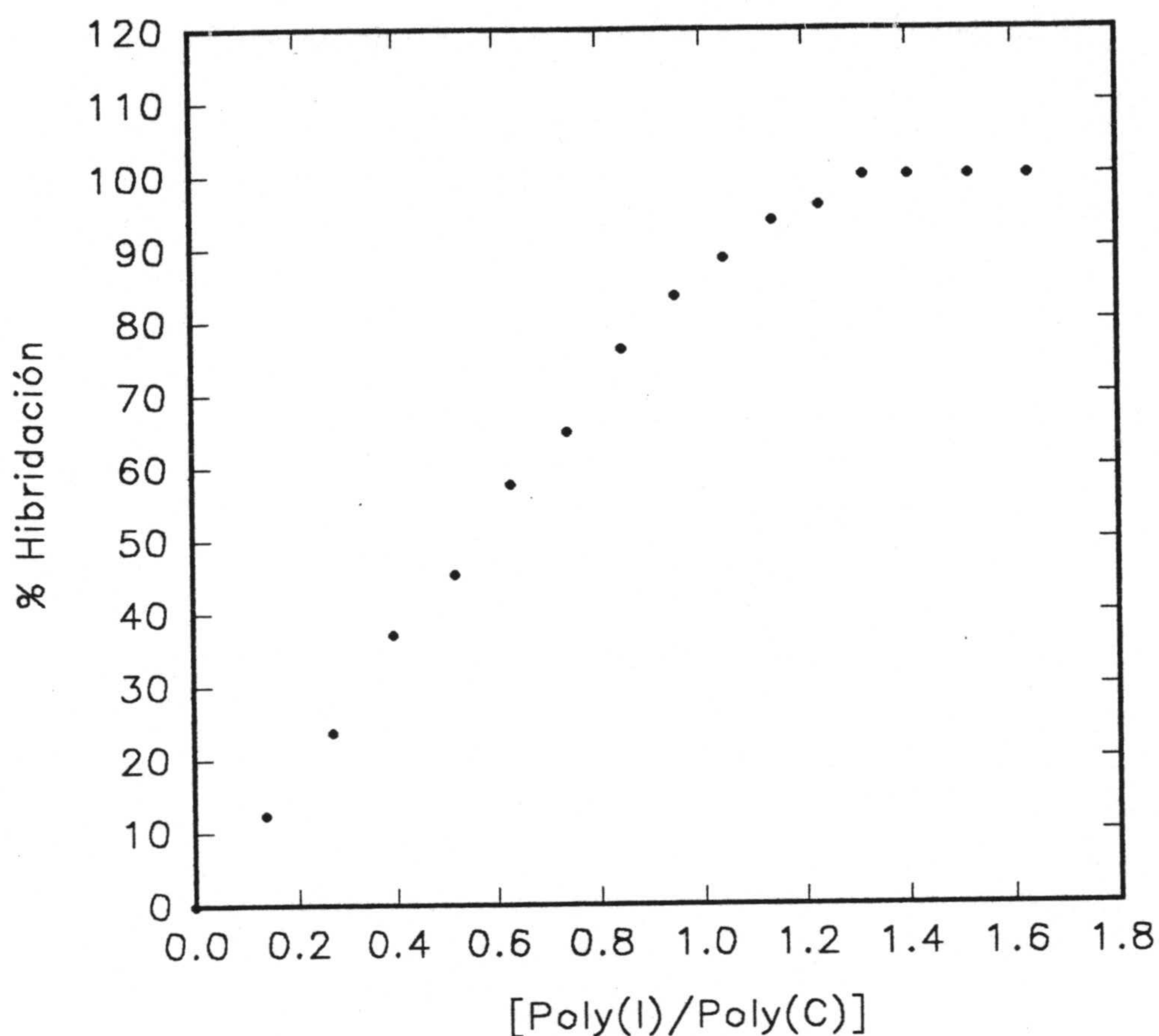


Figura 4-74

Seguimiento de la hibridación en la valoración de Poli(C)-C-PC con Poli(I).

**Figura 4-75**

Seguimiento de la hibridación en la valoración de Poli(C)-APC con Poli(I).

En párrafos anteriores se ha comentado el interés que tiene determinar el origen de los cambios de polarización de fluorescencia. Para ello, se han medido los decaimientos de la fluorescencia de los híbridos Poli(C)biliproteína-Poli(I), en condiciones similares a las que se utilizaron en iguales medidas con Poli(C)-biliproteína. En las Figuras 4-76 y 4-77 se muestran los decaimientos de fluorescencia junto a los ajustes de éstos y los residuales. En la Tabla 4-XXVIII figuran los tiempos de vida, preexponenciales y valores de $\langle \tau \rangle$ para los dos casos estudiados.

TABLA 4-XXVIII

Parámetros de ajuste correspondientes a los decaimientos de fluorescencia de los híbridos Poli(C)biliproteínas-Poli(I).

| Muestra | τ_1 | τ_2 | τ_3 | a_1 | a_2 | a_3 | χ^2 | $\langle \tau \rangle$ |
|---------------------|----------|----------|----------|-------|-------|-------|----------|------------------------|
| Poli(C)-CPC-Poli(I) | 0.112 | 1.192 | 1.995 | 0.660 | 0.288 | 0.051 | 1.269 | 0.520 |
| Poli(C)-APC-Poli(I) | 0.043 | 1.410 | 2.127 | 0.765 | 0.201 | 0.034 | 1.187 | 0.389 |

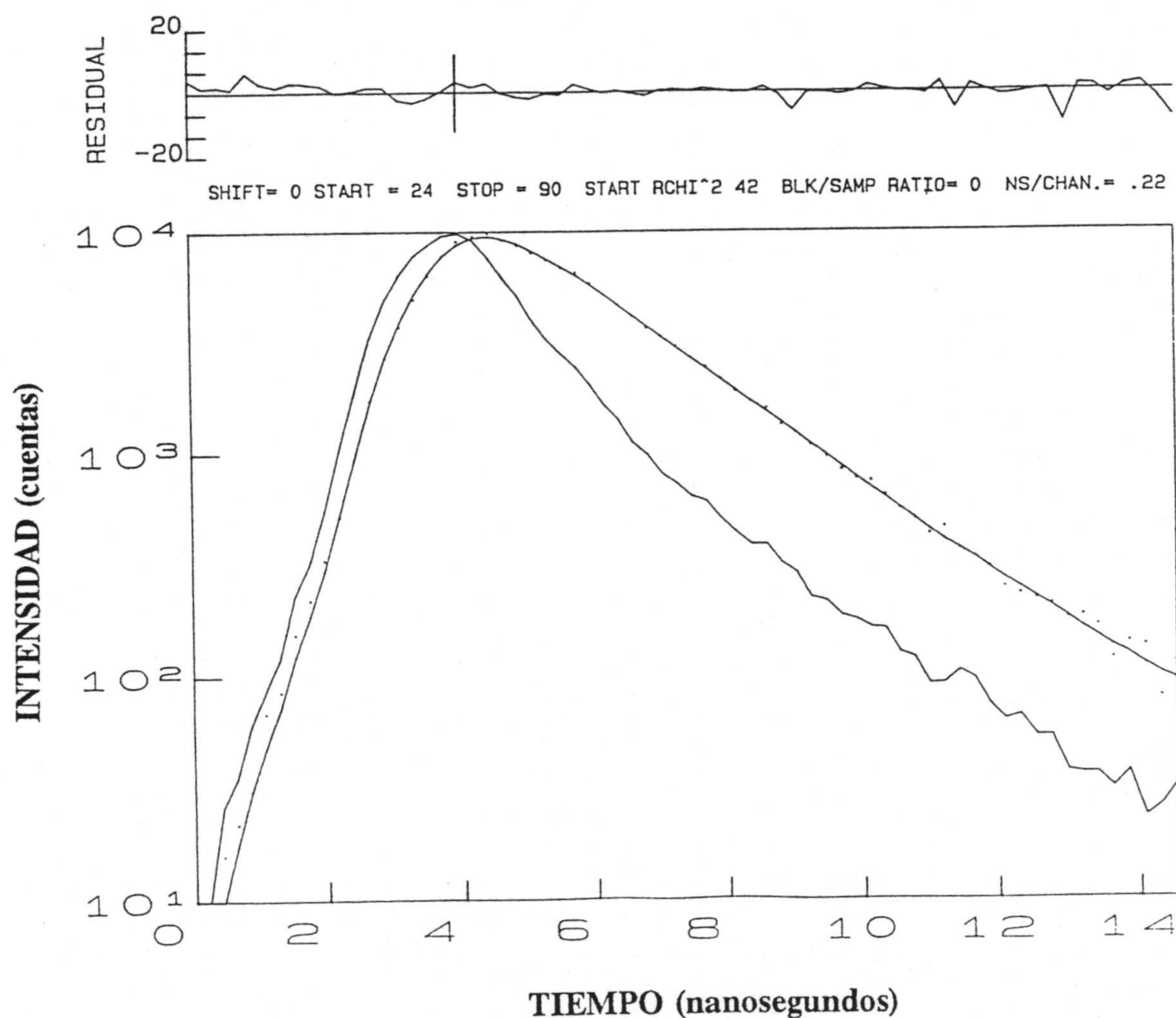


Figura 4-76

Decaimiento de la fluorescencia del híbrido Poli(C)-C-PC-Poli(I). Representación logarítmica.

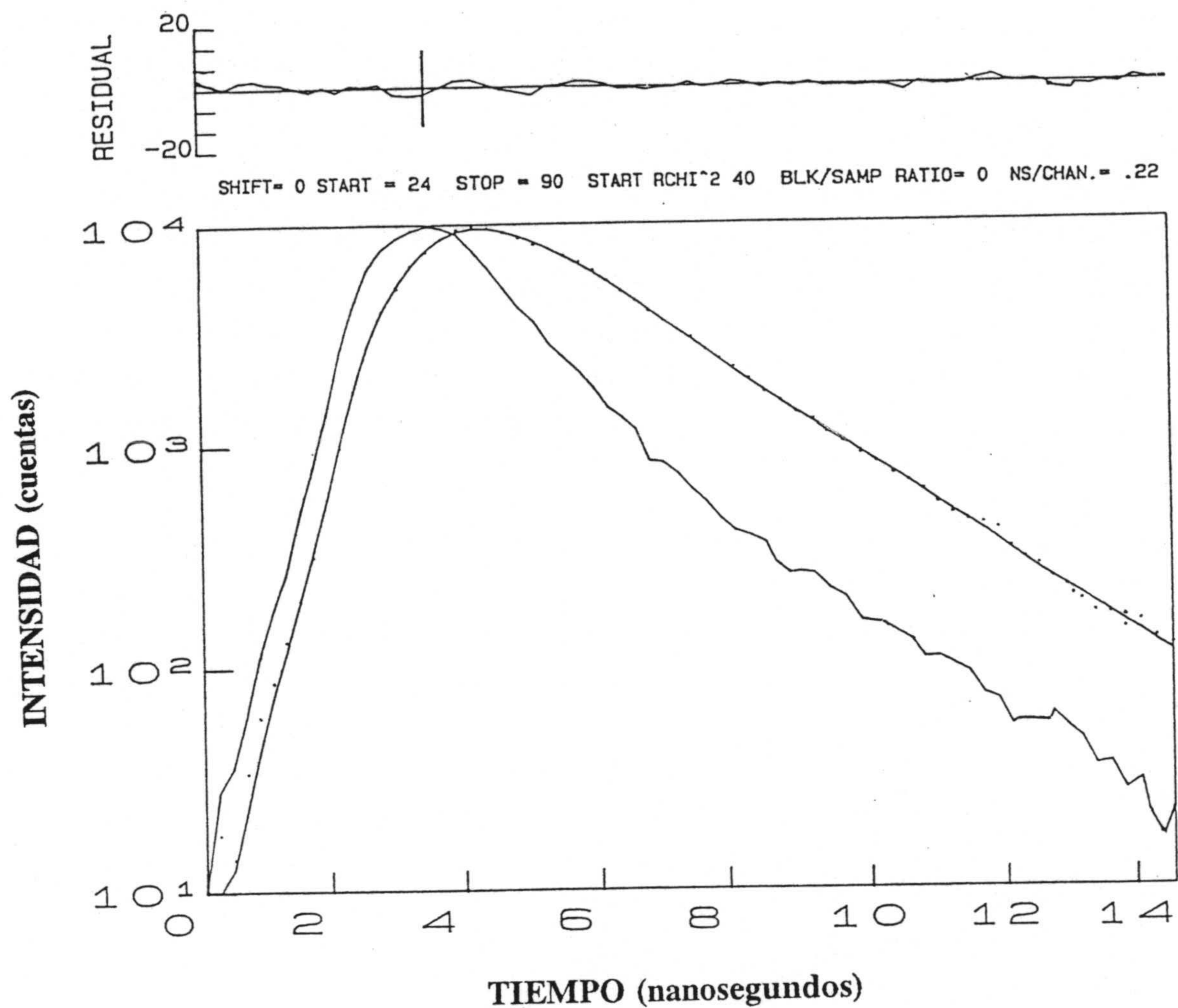


Figura 4-77

Decaimiento de la fluorescencia del híbrido Poli(C)-APC-Poli(I). Representación logarítmica.

Los resultados obtenidos demuestran que hay diferencias significativas en $\langle \tau \rangle$ cuando se comparan con los de la Tabla 4-XXV. Esto significa que los cambios de polarización no son exclusivamente debidos al aumento del tiempo de correlación rotacional que se produce como consecuencia de la formación del híbrido Poli(C)-Poli(I) de mayor tamaño y peso que opone un impedimento mayor a la libre rotación de las moléculas, sino que la formación de la doble cadena origina un *quenching* efectivo de la fluorescencia, que resulta cooperativo con el aumento del tiempo de correlación rotacional ya comentado, para ocasionar el considerable incremento de polarización observado.

El conjunto de experiencias referidas es estos epígrafes, parecen demostrar que se ha puesto a punto un nuevo método analítico, basado en la polarización de fluorescencia, que permite detectar la hibridación de cadenas complementarias de ADN en disolución, sin necesidad de separar, posteriormente a la reacción de hibridación, la sonda libre de la hibridada. El método parece sensible en disoluciones moderadamente concentradas (expresada en base de nucleótidos). Se deben de realizar posteriores estudios de sensibilidad, así como otros comparativos con las diversas metodologías fluorescentes que se están desarrollando en la actualidad por nuestro grupo de investigación (Yguerabide y col., 1997; Talavera y col., 1997; Afkir, Tesis Doctoral, en fase de redacción).

4.7.-BILIPROTEÍNAS EN MEDIOS MICROHETEROGÉNEOS.

En la actualidad existe un gran interés en los estudios de proteínas en asociación con distintos modelos de interfaces, tales como vesículas lipídicas, micelas y micelas reversas. De estos modelos, las micelas reversas ofrecen la mayor flexibilidad de manipulación del estado del agua interfacial. Las propiedades físicas y químicas de estos sistemas varían extensamente con la relación molar agua/surfactante, w_0 (para revisiones, ver Luisi y Magid, 1986; Waks, 1986).

Así, se han estudiado, usando la mayoría de los métodos espectroscópicos, un buen número de macromoléculas disueltas en el interior acuoso de micelas reversas, en distintos estados de hidratación, siguiendo su comportamiento como una función del parámetro w_0 . Tales estudios han reportado perturbaciones significativas de conformación y características de las moléculas asociadas, inducidas por la presencia de surfactantes. La extensión de estas perturbaciones depende del estado de carga de los grupos polares del surfactante, del contenido en agua de las micelas y de la naturaleza de la moléculas utilizadas como sonda (Nicot y col., 1985; Gallay y col., 1987; Ferreira y Gratton, 1990; Somogyi y Lakos, 1993; Bhattacharyya y Basak, 1993, 1995).

De entre los métodos espectroscópicos utilizados, probablemente la fluorescencia ha sido el más utilizado, debido a que tanto la fluorescencia intrínseca de proteínas, como la fluorescencia emitida por diversos colorantes fijados en ellas, son muy sensibles a los diferentes parámetros ambientales, tales como temperatura, viscosidad, fuerza iónica y pH, a causa de la alteración del comportamiento dinámico de la cercana matriz proteica que interacciona con los fluoróforos. Por lo tanto, las técnicas fluorimétricas se han convertido en poderosas herramientas potenciales para obtener información sobre la dinámica y funcionalidad de proteínas (Marzola y Gratton, 1991; Bhattacharyya y Basak, 1995; Fernandez-Velasco y col., 1995; Lenz y col., 1995; Ricchelli, 1995; Singh y Majundar, 1995).

4.7.1.-Caracterización espectroscópica de biliproteínas en micelas.

Dado que las biliproteínas poseen absorción y fluorescencia propia en el visible producida por cromóforos cuya exacta localización en la cadena polipeptídica es conocida, además de la fluorescencia debida al triptófano, se ha procedido a la inclusión de biliproteínas en micelas reversas de 1,4-bis[2-etil-hexil]sulfosuccinato sódico (AOT) como una primera etapa en el estudio de la dinámica de estas proteínas en disolución.

De otra parte, la potencial utilidad de las biliproteínas como colorantes en alimentación y cosmética, puede requerir su solubilización en medios hidrofóbicos, por lo que, como se ha mencionado anteriormente, se han realizado los estudios preliminares de solubilización y caracterización espectroscópica en estado estacionario, de C-PC y APC en micelas reversas de AOT.

El tamaño de las biliproteínas impide que algunos valores de w_0 , de los descritos en la Tabla 3-II, generen estructuras micelares capaces de dar cabida en su interior a las proteínas. Según Brejc y col. (1995) las biliproteínas tienen estructuras tridimensionales muy similares y el trímero de las mismas posee un diámetro aproximado de unos 110 Å y un espesor de 30 Å. De otra parte, el diámetro del interior acuoso de una micela de AOT en n-octano es de 60 Å a $w_0=15$ y aumenta hasta 100 Å a $w_0=30$ (Zulauf y Eicke, 1979). Similarmente, Luisi y Wolf (1982) muestran que el diámetro del núcleo acuoso de una micela de AOT en n-octano es 101 Å cuando $w_0=27.4$.

En base a estos datos y mediante la técnica de inyección descrita en los apartados 2.7.2 y 3.5, se han formado sistemas micelares con $s=0.1$ y $w_0=40$, al objeto de obtener la caracterización espectroscópica de los sistemas y discutir si se ha producido efectivamente la inclusión de las biliproteínas en el interior acuoso de las micelas reversas de AOT.

Los espectros que se muestran en las Figuras 4-78 a 4-81, se obtuvieron 24 horas después de formar el sistema, manteniéndolo en suave agitación a la temperatura ambiente. En todos los casos las disoluciones presentaban un aspecto claro y fueron estables durante varios días.

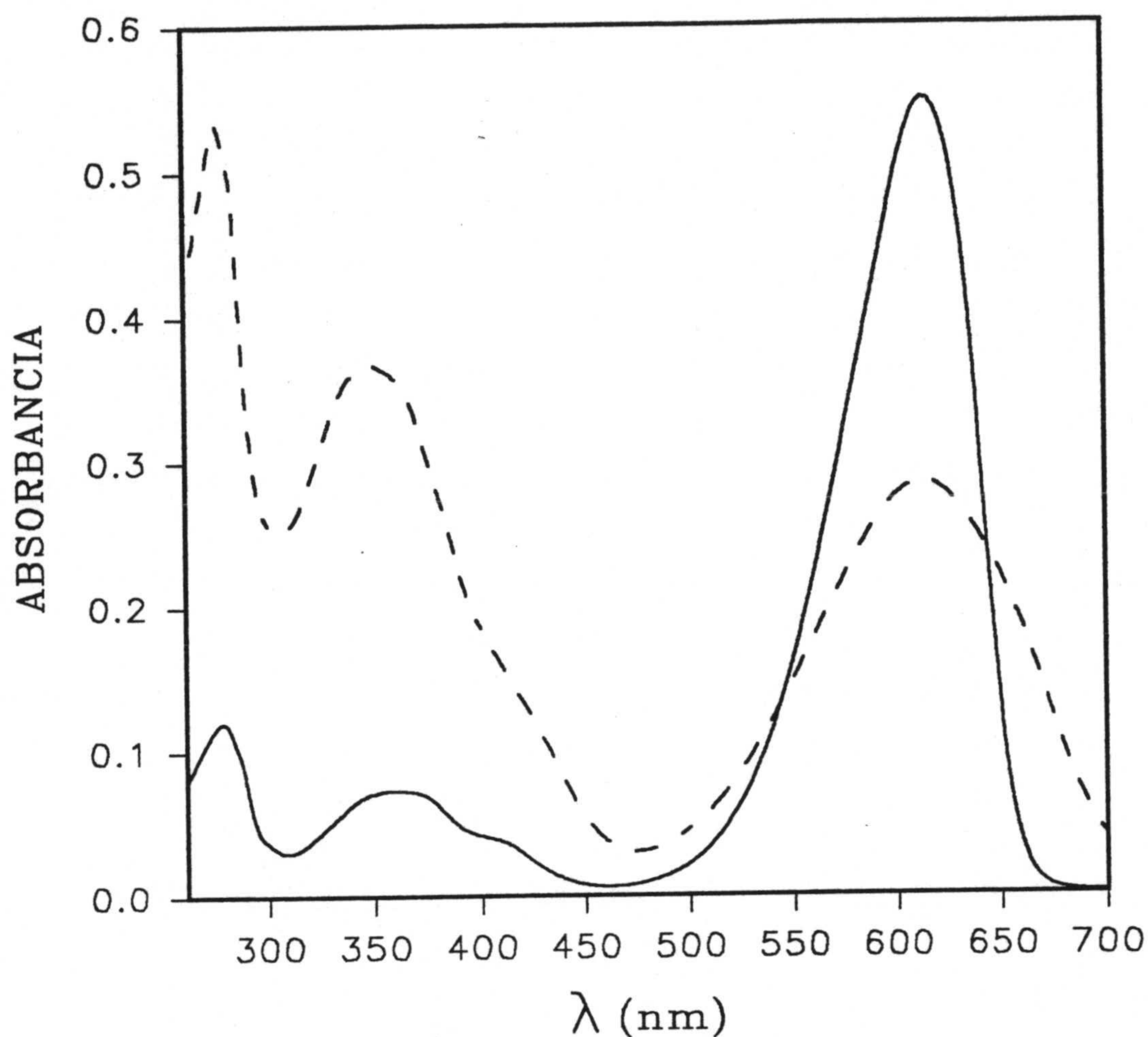


Figura 4-78

Espectros de absorción uv-visible de C-PC: la línea continua corresponde a disolución acuosa (tampón de fosfatos 20 mM pH 7) y la discontinua a C-PC en medio micelar (isooctano-AOT, $w_0=40$).

Como es conocido, las disoluciones acuosas de C-PC en tampón fosfatos de pH 7 presentan espectros de absorción con máximos característicos a 280, 350 y 615 nm (Figura 4-78). Tras la incorporación a micelas reversas en medio isooctano-AOT, la posición de los máximos a 280 y 615 no varía sensiblemente respecto a la disolución acuosa. En lo que se refiere al máximo a 350 nm, aproximadamente, éste sufre un leve desplazamiento al azul a la vez que se agudiza y disminuye el semiancho de la banda. Asimismo, las relaciones entre las absorbancias de los picos: A_{615}/A_{350} y A_{615}/A_{280} , disminuyen de forma drástica, mientras que la relación A_{350}/A_{280} permanece casi inalterada.

En la Figura 4-79 se representan los espectros de emisión correspondientes a la excitación a 580 nm, de C-PC en disolución acuosa y en el medio micelar. Se observa un desplazamiento hipsocrómico del pico de emisión de unos 12 nm respecto del obtenido en disolución acuosa, al mismo tiempo que aumenta el semiancho de la banda, de forma similar al aumento del semiancho en la banda de absorción con máximo a 615 nm.

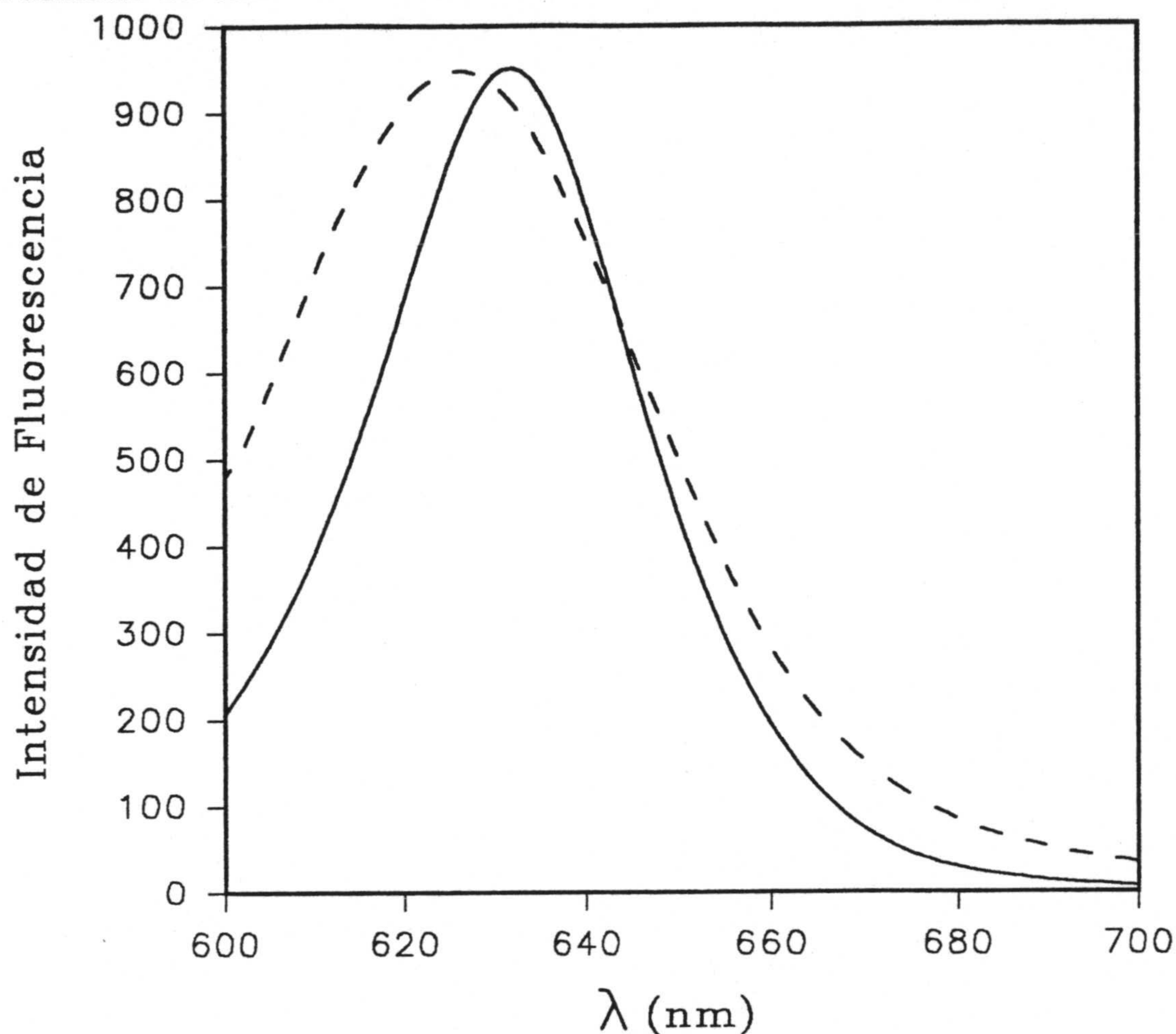


Figura 4-79

Espectros de emisión de fluorescencia de C-PC: la línea continua corresponde a disolución acuosa (tampón fosfatos 20 mM pH 7) y la discontinua a C-PC en medio micelar (isooctano-AOT, $w_0=40$). $\lambda_{ex}=580$.

Se han realizado experiencias similares, en iguales condiciones, con APC. Los espectros de absorción se representan en la Figura 4-80. Como se puede observar, se conserva la forma y posición del máximo a 280 nm, a la vez que la banda con máximo a 350 nm (aproximadamente) sufre una ligera alteración, similar a la descrita para C-PC. Sin embargo, es mucho más drástico el cambio en la forma y posición de la banda de absorción con

máximo a 650 nm, que presenta APC en disolución acuosa, ya que en el medio micelar el máximo sufre un desplazamiento hacia el azul de unos 40 nm, al tiempo que desaparece el hombro alrededor de 610 nm. Al igual que C-PC, las relaciones A_{650}/A_{350} y A_{650}/A_{280} disminuyen y la relación A_{350}/A_{280} permanece prácticamente invariable.

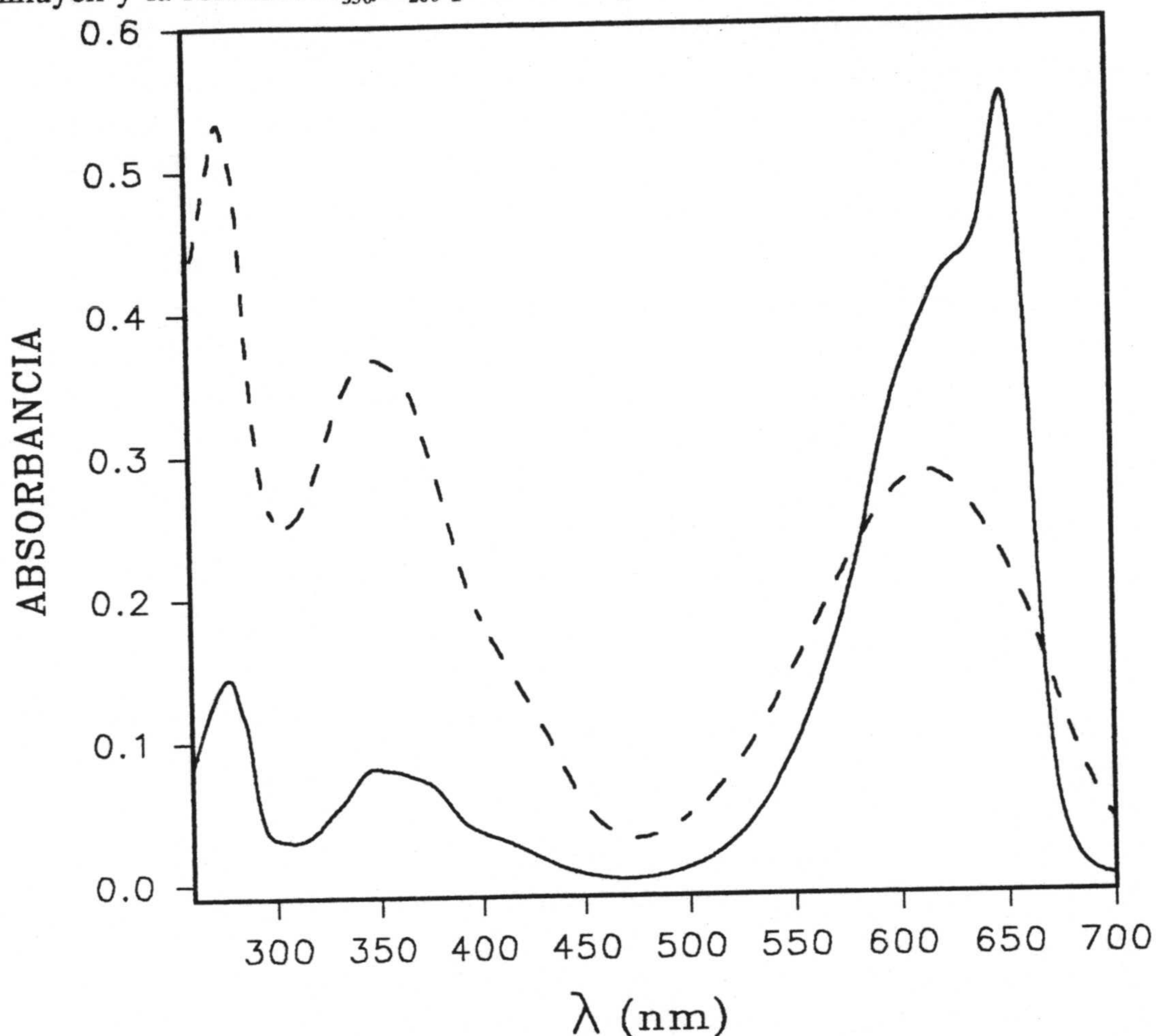


Figura 4-80

Espectros de absorción uv-visible de APC: la línea continua corresponde a disolución acuosa (tampón de fosfatos 20 mM pH 7) y la discontinua a APC en medio micelar (isooctano-AOT, $w_0=40$).

El espectro de emisión en el sistema micelar obtenido por excitación a 580 nm (Figura 4-81) muestra un desplazamiento hacia el azul de unos 30 nm respecto al que presenta APC en disolución acuosa a pH 7. La forma del espectro también cambia y así el hombro alrededor de 630 nm que presenta la emisión de APC en disolución acuosa, desaparece en el espectro de fluorescencia cuando la biliproteína está integrada en el núcleo acuoso restringido del interior micelar.

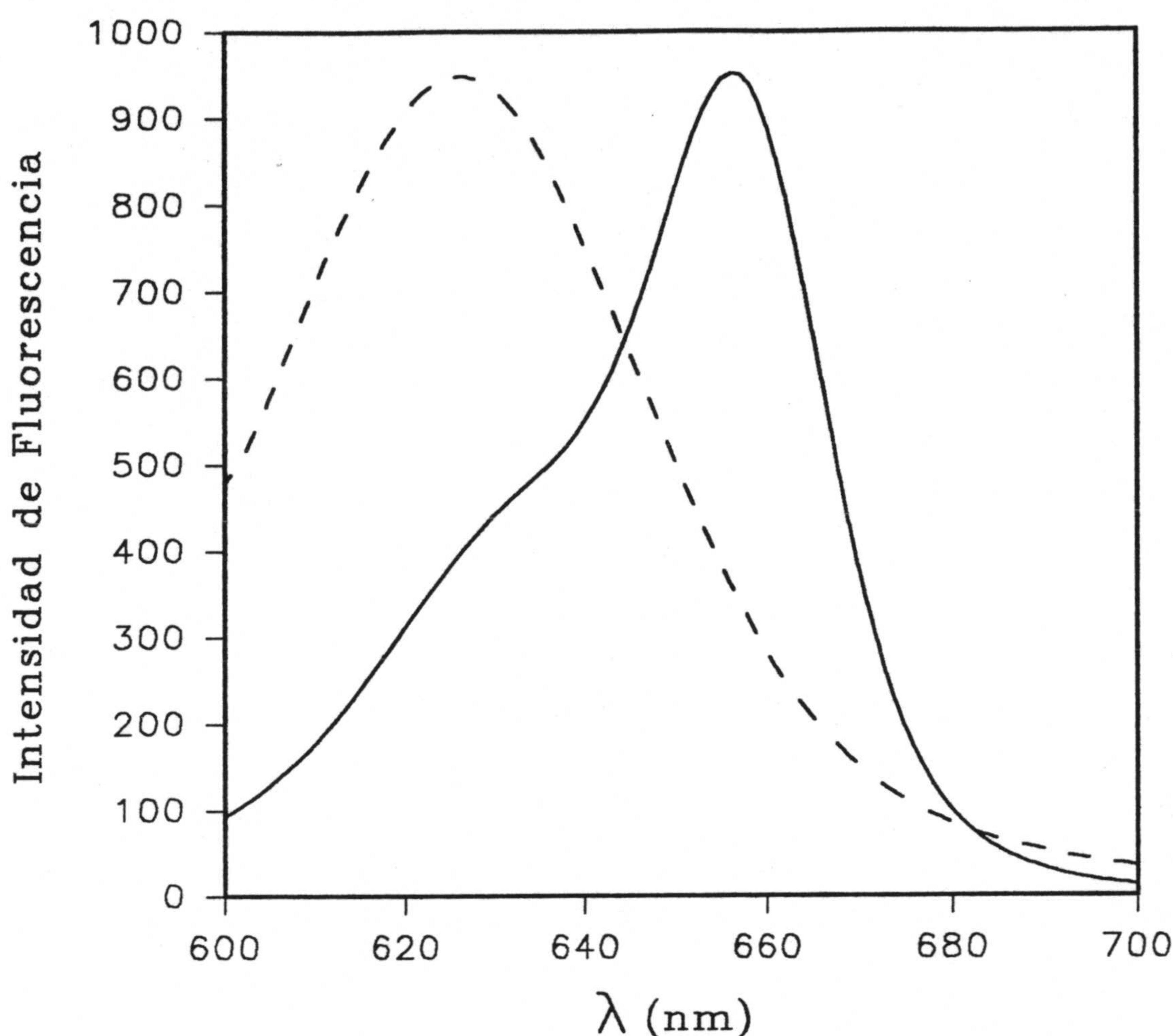


Figura 4-81

Espectros de emisión de fluorescencia de APC: la línea continua corresponde a disolución acuosa (tampón de fosfatos 20 mM pH 7) y la discontinua a APC en medio micelar (isooctano-AOT, $w_0=40$). $\lambda_{ex}=580$ nm.

Si se comparan las figuras correspondientes a la absorción (4-78 y 4-80) y las que muestran los espectros de emisión (4-79 y 4-81) de C-PC y APC, se puede observar que ambas biliproteínas presentan idénticas características espectroscópicas en el sistema AOT-isooctano-agua-proteína. Además, los espectros de absorción y de emisión no coinciden con los que presentan las disoluciones acuosas de monómeros de C-PC y APC (Figuras 4-50 y 4-52) siendo también muy diferentes de los obtenidos con las subunidades de estas biliproteínas en condiciones de desnaturalización (Figuras 4-17 y 4-20).

Estos resultados se pueden interpretar como indicativos de que las biliproteínas están integradas en el interior de las micelas reversas de AOT. En efecto, a pH 7 las cabezas

polares del surfactante tienen carga negativa, mientras que los restos lisina y arginina de las proteínas están cargados positivamente. La estructura primaria de C-PC es conocida en su totalidad y la de APC está dilucidada aproximadamente en las cercanías de los cromóforos (Brejc y col., 1995). La abundancia de lisina y arginina en las inmediaciones de las cisteínas α_{84} , β_{84} y β_{155} , como se observa en la Figura 4-82, hace que en las inmediatas cercanías de los cromóforos, las lisinas y argininas cargadas positivamente interactúen electrostáticamente con los grupos sulfonatos negativos de las moléculas de AOT, haciendo que los cromóforos estén mantenidos en el agua fuertemente inmovilizada localizada en la vecindad de la interfase del AOT. Esto modifica drásticamente el ambiente que rodea a los cromóforos y borra el diferente ambiente proteico en el que se encuentran en disolución acuosa, por lo que al ser aquellos químicamente idénticos y estar en un mismo ambiente, muestran iguales características espectrales.

| | | |
|-------------------|---|-----|
| α -Subunit | | |
| | 1 | 60 |
| CPC | MKTPLTEAVAAADSQGRFLSSTEIQTAFGFRFRQASASLAAKALTEKASSLASGAANAVY | |
| APC | ..SIVTKSIVNADAEARYLSPGELDRIKSFVSGGERLRRIAQILTENRERIVKQAGDQLF | |
| | 61 | 84 |
| CPC | SKFPYTTSQNGPNFASTQTGKDKCVRDIGYYLRMVTYCLVVGTTGGLDDYLIGGIAEINR | 120 |
| APC | QKRPDVVSPPGNAYGQEMTA..TCLRDLDYLLRLVTYGVSGDVTPIEEIGIVGVREMYK | |
| | | 174 |
| CPC | TFDLSPSWYVEALKYIK..ANHGLSGDPAVEANSYIDYAINALS | |
| APC | SLGTPIEAVAEGVRAMKSVASSLLSGEDAAEAGAYFDYVIGALS | |
| β -Subunit | | |
| | 1 | 59 |
| CPC | MLDAFAKVVSQADARGEYLSGSQIDALSALVADGNKRMDVVNRITGNSSTIVANA.ARSL | |
| APC | MQDAITAVINSSDVQGYLDTAALDKLKSYPATGELRVRAAATISANAAAIIVKEAVAKSL | |
| | | 84 |
| CPC | FAEQPQLIAPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYAIIFAGDASVLDDRCLNGLKETYLA | 121 |
| APC | LY..SDITRPPGNMYTTRRYAACIRDLDYLLRYATYAMLGDPCHILDRLNGLKETYNS | |
| | | 174 |
| CPC | LGTPGSSVAVGVQKMKDAALAIAGDTNGITRGDCASLMAEVASYFDKAAAAVA | |
| APC | LGVPI SATVQAIQAIKEVTASLVGPDAG.....KEMGVLDYISSGLS | |

Figura 4-82

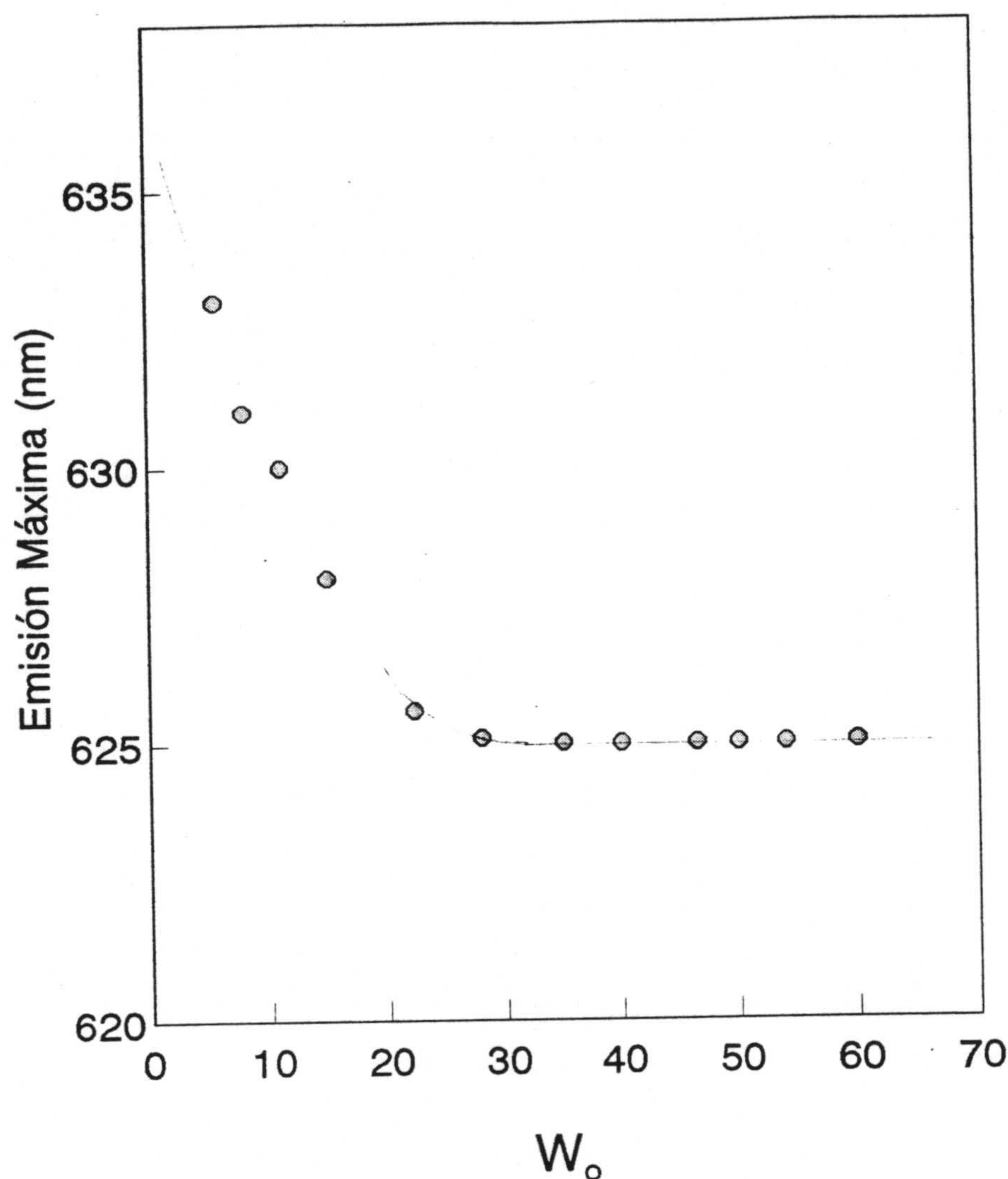
Secuencia de aminoácidos de las subunidades α y β de C-PC y APC (Brejc y col., 1995). Nomenclatura: Z, glutamina; R, arginina; A, alanina; B, asparragina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; H, histidina; K, lisina.

Las diferencias espectrales entre las biliproteínas en disolución acuosa homogénea y micelas reversas, podrían explicarse en términos de la incapacidad de los cromóforos (bilinas) para alcanzar el estado de relajación por disolvente, debido a la competición por las moléculas de agua asequibles, entre mencionados cromóforos y los grupos sulfonato del AOT.

Al objeto de corroborar la supuesta inclusión de las biliproteínas en el interior micelar, se han realizado experimentos en los que se ha variado w_0 en el intervalo de valores comprendido entre 2 y 60, manteniendo $s \leq 0.1$. Después de 24 horas para la estabilización del sistema, se han registrado los espectros de emisión correspondientes a los sistemas microheterogéneos generados de acuerdo con los valores de la Tabla 3-II. Se debe destacar que se registraron sólo los espectros de emisión por ser éstos más sensibles al ambiente micelar que los de absorción, cuando la biliproteína utilizada es C-PC, como es el caso en este conjunto de experimentos.

En la Figura 4-83 se han representado los valores de la longitud de onda del máximo de emisión frente a w_0 . En mencionada figura se observa que el desplazamiento hipsocrómico alcanza su máximo valor a $w_0 \approx 35$ y permanece constante a todos los $w_0 > 35$ investigados.

Estos resultados son coherentes con la interpretación realizada anteriormente, en lo que se refiere a la inclusión y localización de las biliproteínas en micelas reversas de AOT y sus características espectrales. Según se ha mencionado en la introducción de esta Memoria, se puede suponer que cuando el núcleo acuoso del interior micelar es relativamente pequeño, la solubilización de la proteína en el medio apolar podría suceder de acuerdo con las situaciones descritas en los casos b, c ó d de la Figura 2-14. De acuerdo con la naturaleza hidrófila de las biliproteínas, parece más probable la situación c ó d. A bajos valores de w_0 y de surfactante, la situación más probable sería la d y que ésta evolucionara hacia la c, conforme aumentan w_0 y el número de moléculas de surfactante. Estas suposiciones permiten la justificación, de forma sencilla aunque cualitativa, del paulatino desplazamiento hipsocrómico del máximo de emisión hasta que, a valores razonablemente altos de w_0 , se forman micelas de tamaño apropiado como para incluir la biliproteína completa, lo que sucede al valor de $w_0=35$ en el que el tamaño micelar es prácticamente igual al que tiene la biliproteína en estado trimérico de agregación, según se deduce de los datos bibliográficos y de los cristalográficos obtenidos en esta Memoria.

**Figura 4-83**

Variación de la emisión máxima de C-PC, como una función del ratio molar agua/surfactante (w_0), en micelas reversas de isooctano-AOT.

Valores mayores de w_0 muestran estabilización del desplazamiento del máximo espectral que no se altera con el aumento del tamaño micelar. Esta también es concordante con la idea de que los cromóforos se encuentran localizados en las cercanías de la interfase molecular agua-AOT, donde las moléculas de agua, que generan el ambiente que rodea a los cromóforos, están fuertemente inmovilizadas, lo que origina que las características espectrales resulten insensibles al mayor contenido de agua en las micelas.

4.7.2.-Polarización de estado estacionario.

El espectro de polarización de C-PC en micelas reversas con $w_0=40$ se representa en la Figura 4-84. El espectro muestra un drástico aumento de la polarización, respecto al que posee la biliproteína en disolución acuosa, teniendo incluso mayor grado de polarización que las disoluciones monoméricas de C-PC.

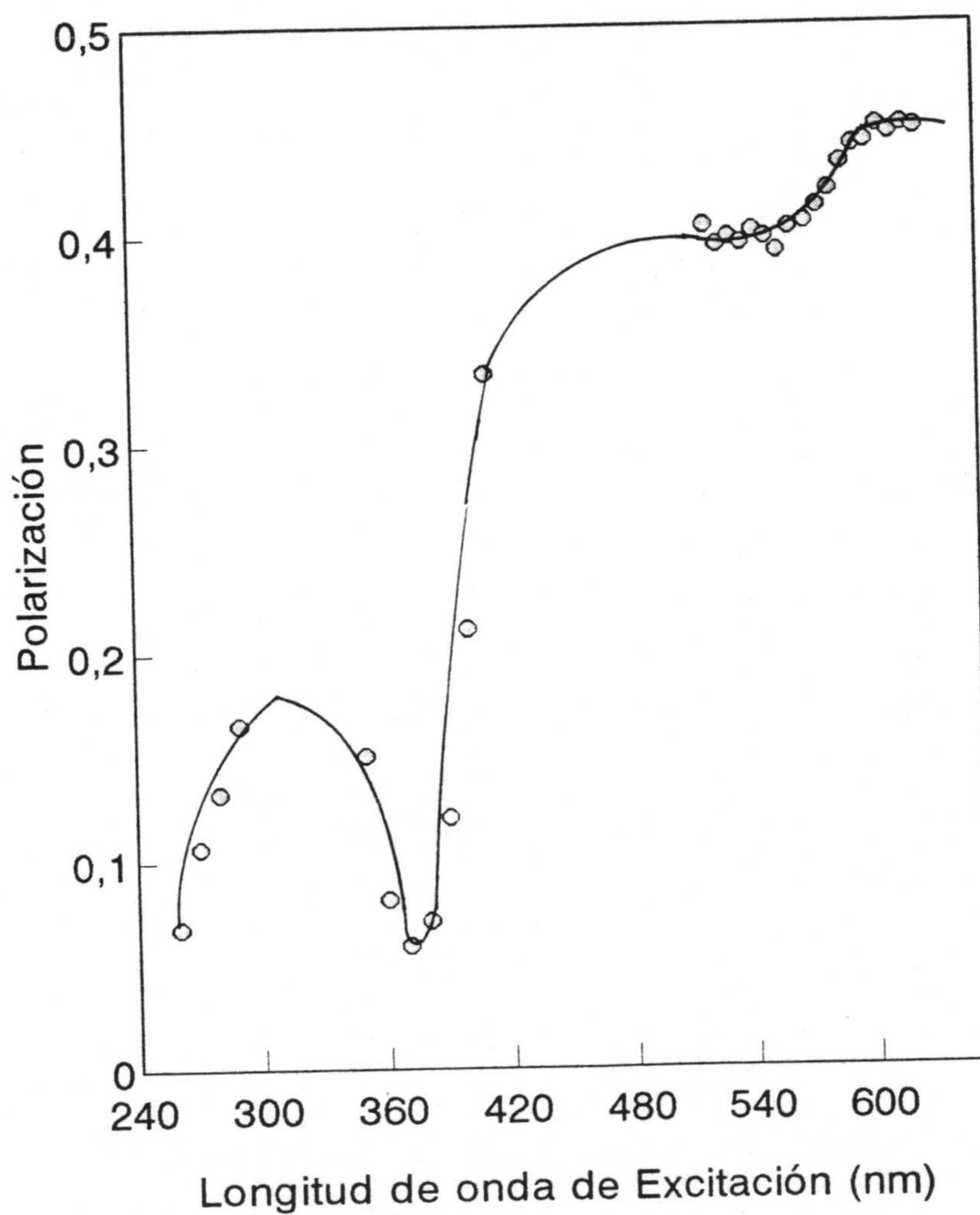


Figura 4-84

Espectro de polarización de fluorescencia de C-PC en micelas reversas de isooctano-AOT ($w_0=40$).

Esto confirma la movilidad rotacional impedida de los cromóforos, debido a su localización en la interfase micelar interna, ya que la alta microviscosidad del agua interfacial impone severas restricciones en la libertad rotacional de los cromóforos, lo que implica que el valor del grado de polarización alcanzado corresponda más bien a la difusión rotacional de la micela misma.

Además, el espectro de polarización muestra dos tipos de cromóforos polarizables, en lugar de los tres tipos que se observan en disolución homogénea. Esto, junto a los altos valores del grado de polarización, indica que la transferencia de energía entre cromóforos resulta impedida o muy disminuida lo que implica una sustancial alteración de la estructura trimérica tridimensional de la biliproteína.

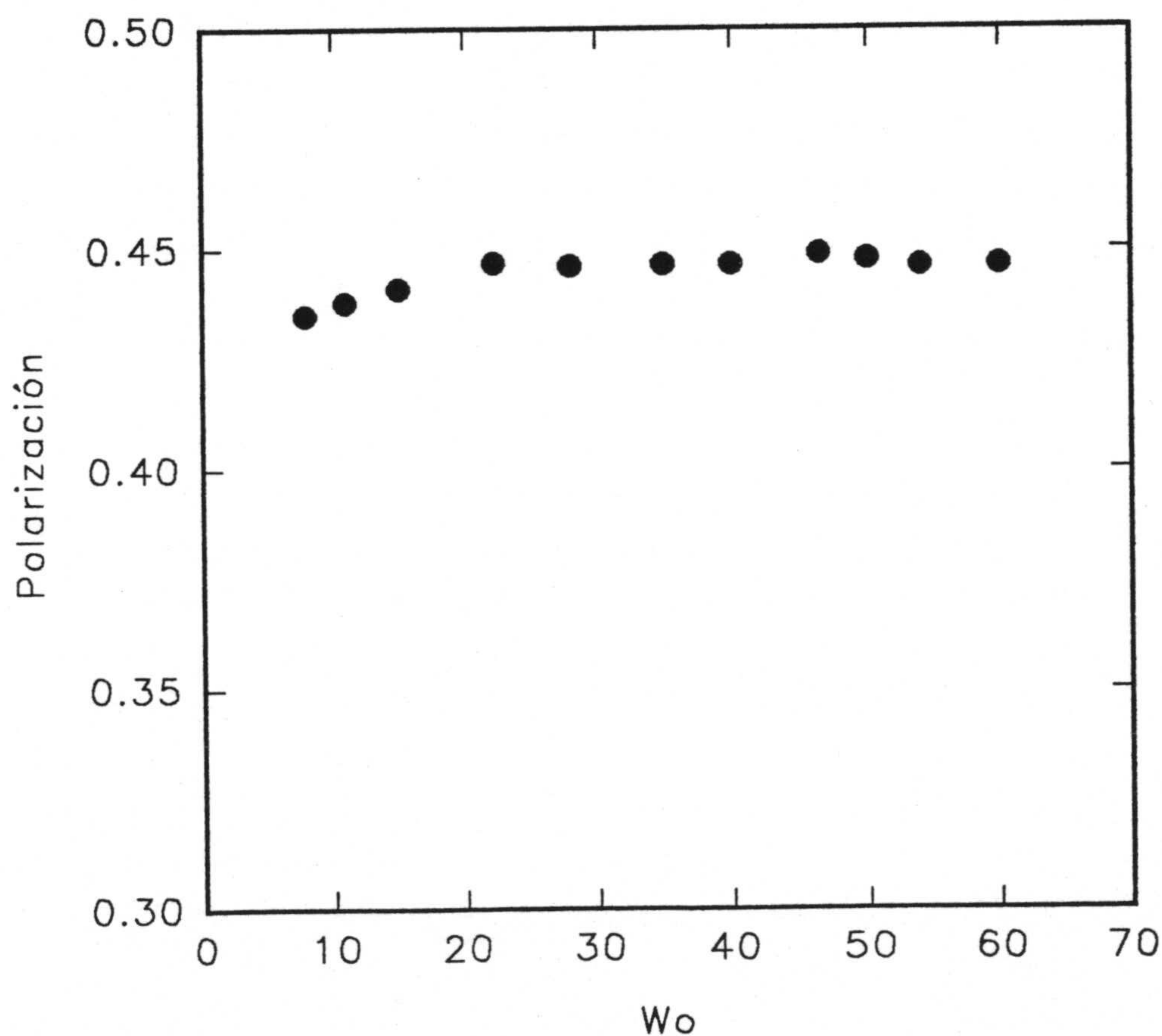


Figura 4-85

Variación de la polarización de fluorescencia en estado estacionario en función de w_0 , para C-PC en micelas reversas.

En la Figura 4-85 se representan los valores del grado de polarización, obtenidos por excitación a 600 nm, frente a w_0 . Se observa un suave aumento que se estabiliza a $w_0=23$, lo que está en aproximada concordancia con las suposiciones sobre la rígida localización de los cromóforos en la interfase micelar y el lógico tamaño creciente de las micelas con el aumento de w_0 .

4.7.3.-Cinética de la incorporación de las biliproteínas a las micelas.

Para llevar a cabo el estudio cinético de la formación del sistema micelas-proteínas se ha utilizado un valor de $w_0=35$ y se ha variado el pH del tampón de fosfatos 20 mM en que se disuelve la proteína a incorporar al sistema micelar (C-PC). El seguimiento de la incorporación de las biliproteínas se ha realizado registrando los espectros de emisión a intervalos determinados de tiempo. En primer lugar se ha investigado la influencia del pH en la velocidad de incorporación de C-PC en micelas reversas de AOT en isooctano.

En la Figura 4-86 se han presentado los espectros de emisión registrados a diferentes tiempos transcurridos a partir de la mezcla de los constituyentes del sistema, cuando el tampón en el que se incorpora disuelta la proteína tiene pH 7. Conforme avanza el tiempo se observa el paulatino desplazamiento hacia el azul del máximo de emisión, junto al aumento del semiancho de la banda y al descenso de la eficiencia de fluorescencia. Parecidos resultados se obtienen cuando se disminuye el pH del tampón en que se incorpora la biliproteína al sistema micelar, aunque la estabilización de la forma del espectro de emisión ocurre con mayor rapidez.

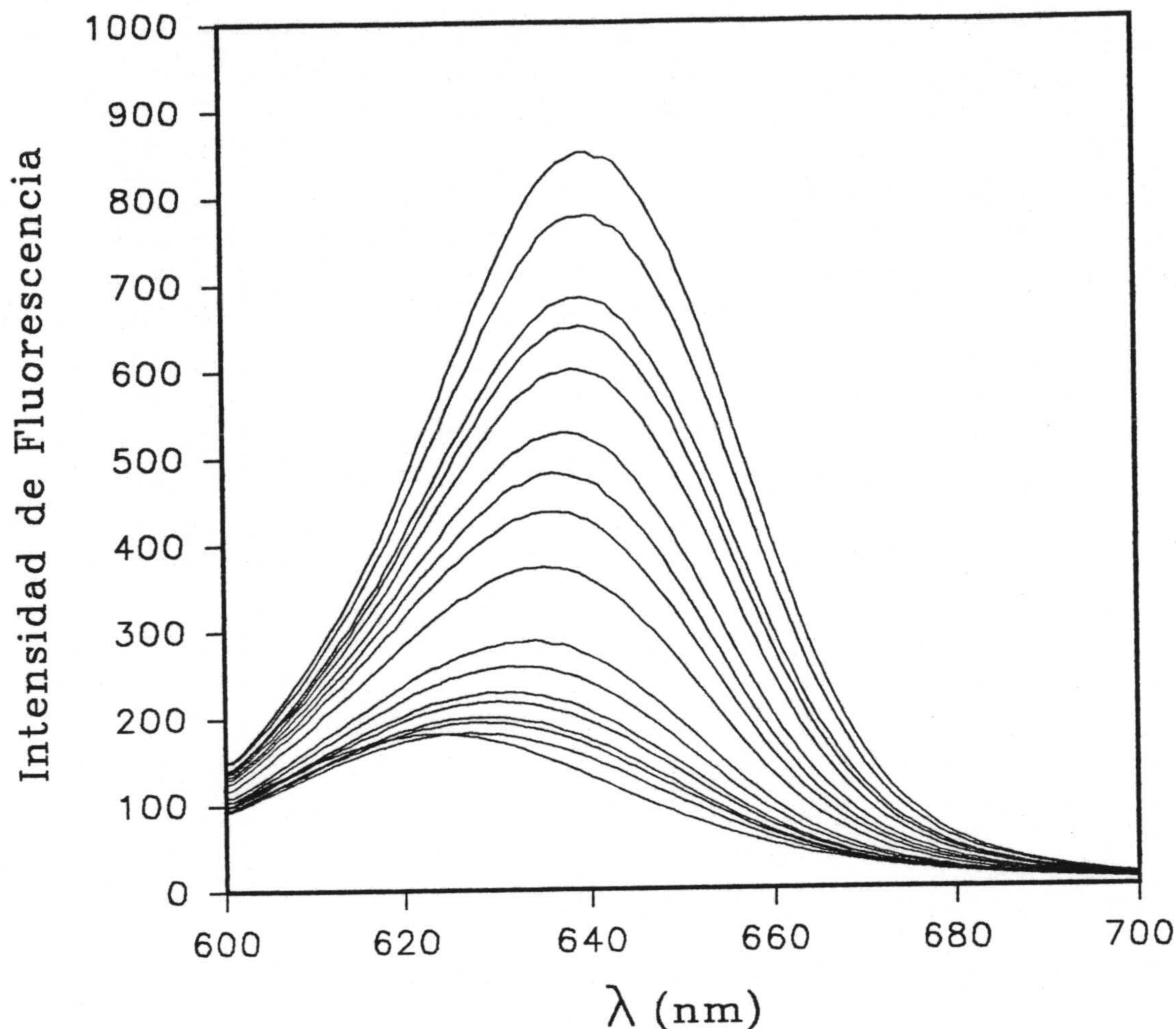
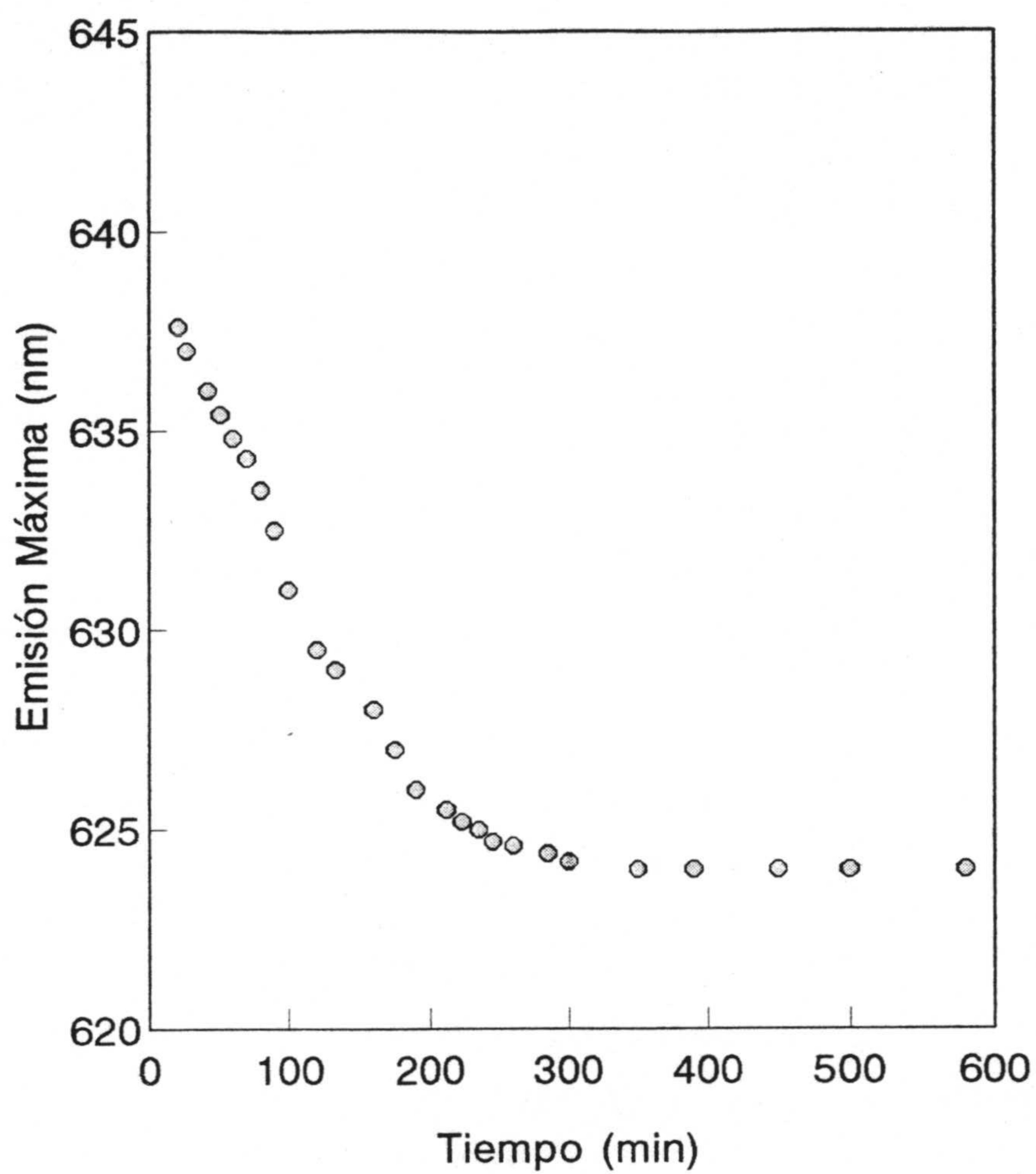


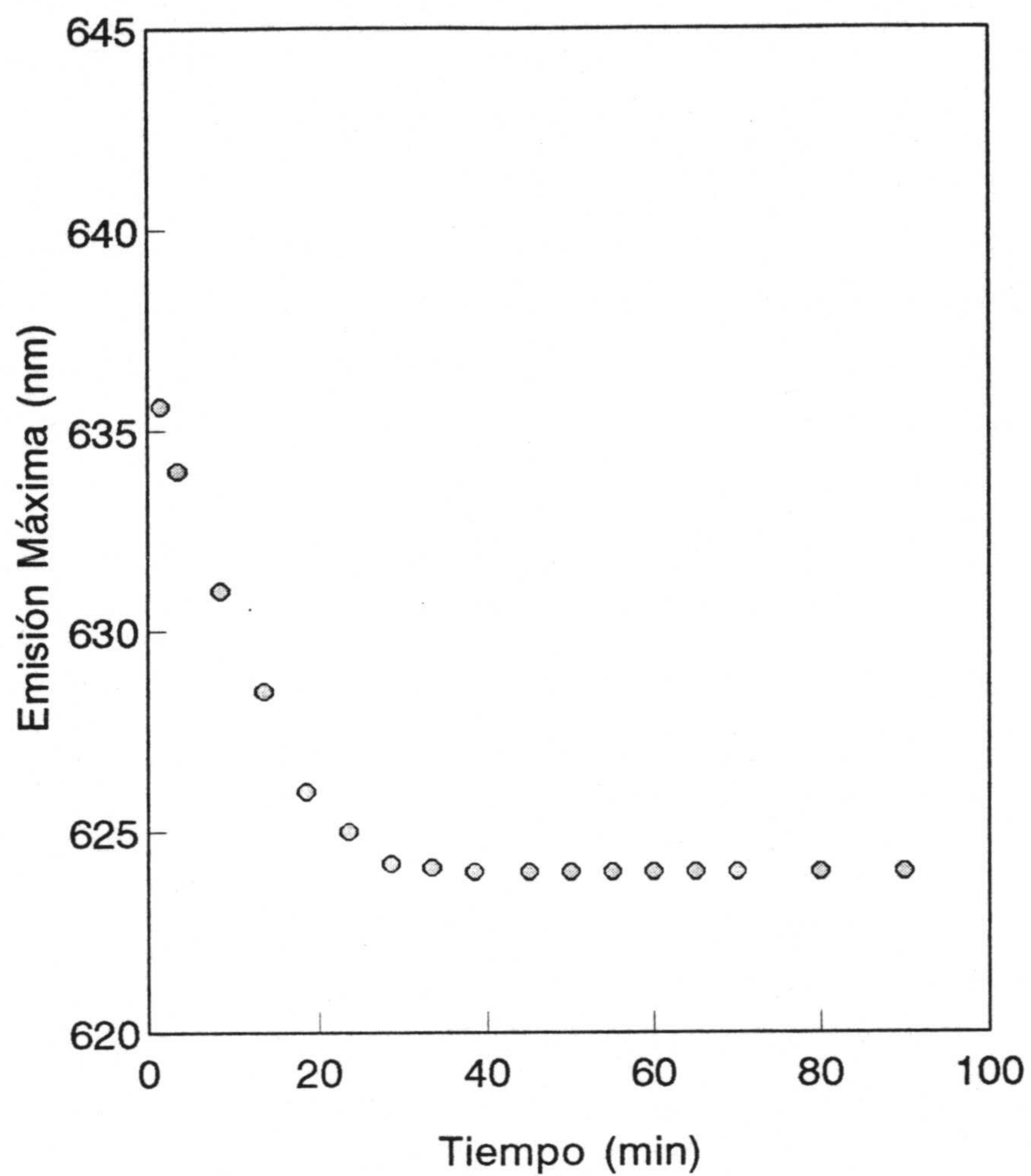
Figura 4-86

Espectros de emisión de fluorescencia de C-PC en micelas reversas (pH 7) ($\lambda_{\text{ex}} = 585 \text{ nm}$).

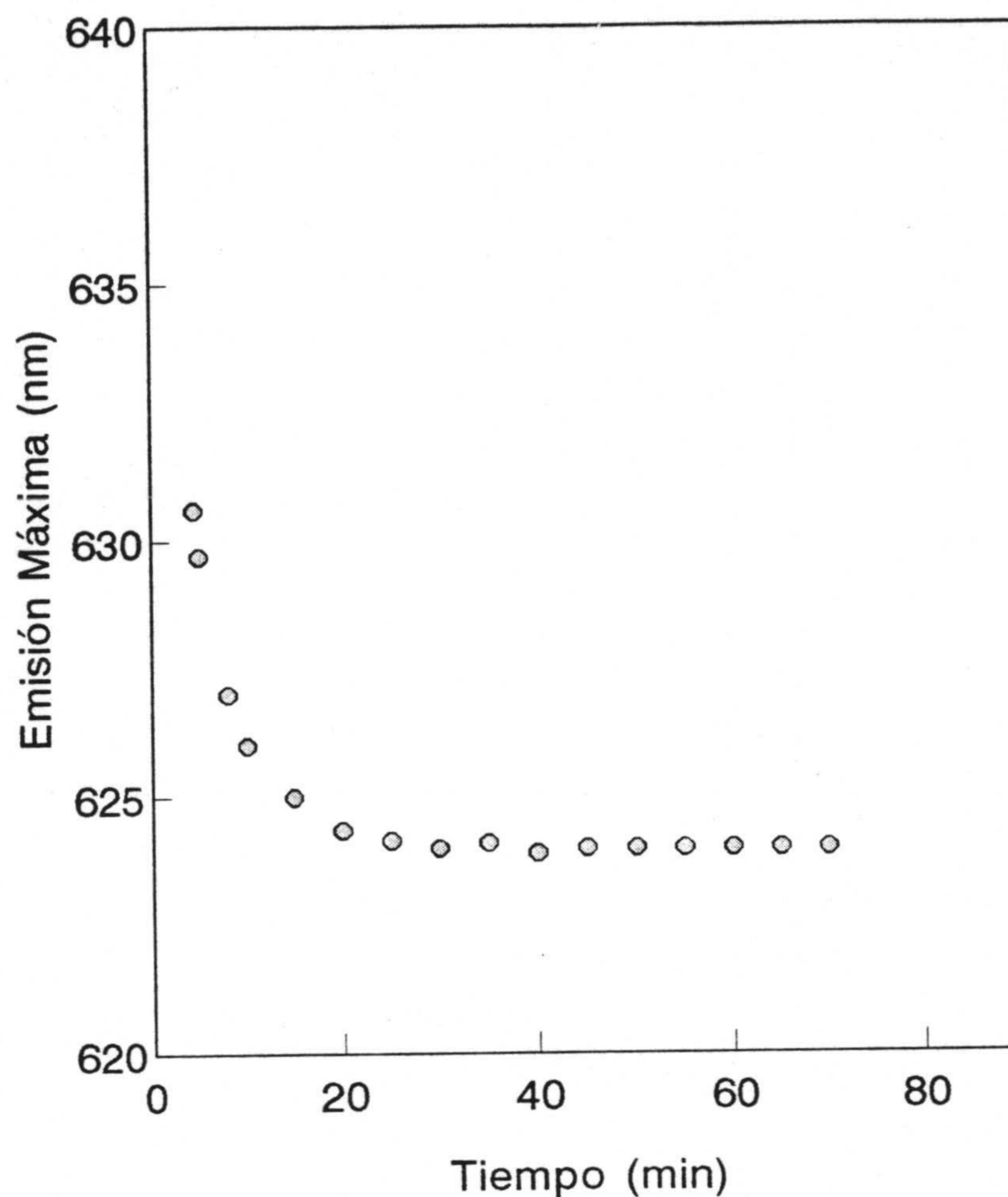
En las Figuras 4-87 a 4-89 se representan las longitudes de onda del máximo de emisión frente al tiempo, para los tres pH investigados, 7, 6 y 4.9. Se puede observar que el tiempo de estabilización del espectro de fluorescencia disminuye con el pH. Este resultado es concordante con la suposición ya realizada sobre la localización de los cromóforos, ya que la disminución del pH hasta el valor del punto isoeléctrico, supone una reducción asociada de cargas negativas en la matriz proteica, lo que facilita el acercamiento e interacción electrostática de los restos con carga positiva y las cargas negativas de las cabezas polares del surfactante.

**Figura 4-87**

Variación de la emisión máxima frente al tiempo, para un sistema de C-PC en micelas reversas de isooctano-AOT, incorporada en tampón de fosfato de pH 7.

**Figura 4-88**

Variación de la emisión máxima frente al tiempo, para un sistema de C-PC en micelas reversas de isooctano-AOT, incorporada en tampón de fosfato de pH 6.

**Figura 4-89**

Variación de la emisión máxima frente al tiempo, para un sistema de C-PC en micelas reversas de isooctano-AOT, incorporada en tampón de fosfato de pH 4.9.

Con el fin de proporcionar una descripción más completa del proceso de incorporación de biliproteínas a micelas reversas de AOT, los datos de las anteriores figuras se han tratado de ajustar a un modelo cinético sencillo. Para ello, se ha supuesto que la diferencia entre la λ_{\max} de emisión en disolución acuosa homogénea (es decir, en el tiempo inicial del proceso) y a un tiempo determinado, es proporcional a la proteína incorporada a la micela, correspondiendo la diferencia máxima obtenida cuando el espectro de emisión se estabiliza al 100 % de proteína incorporada.

De acuerdo con este simple modelo, se ha representado el logaritmo neperiano del % de proteína no incorporada frente al tiempo, obteniéndose las gráficas de las Figuras 4-90 a 4-92. La linealidad en las dos últimas resulta aceptable. A pH 7, los resultados se desvían algo más, aunque no lo suficiente para desechar este sencillo modelo, según el cual la reacción parece transcurrir a través de una cinética de pseudo-primer orden, lo que es de esperar debido a las condiciones experimentales empleadas ($s=0.1$).

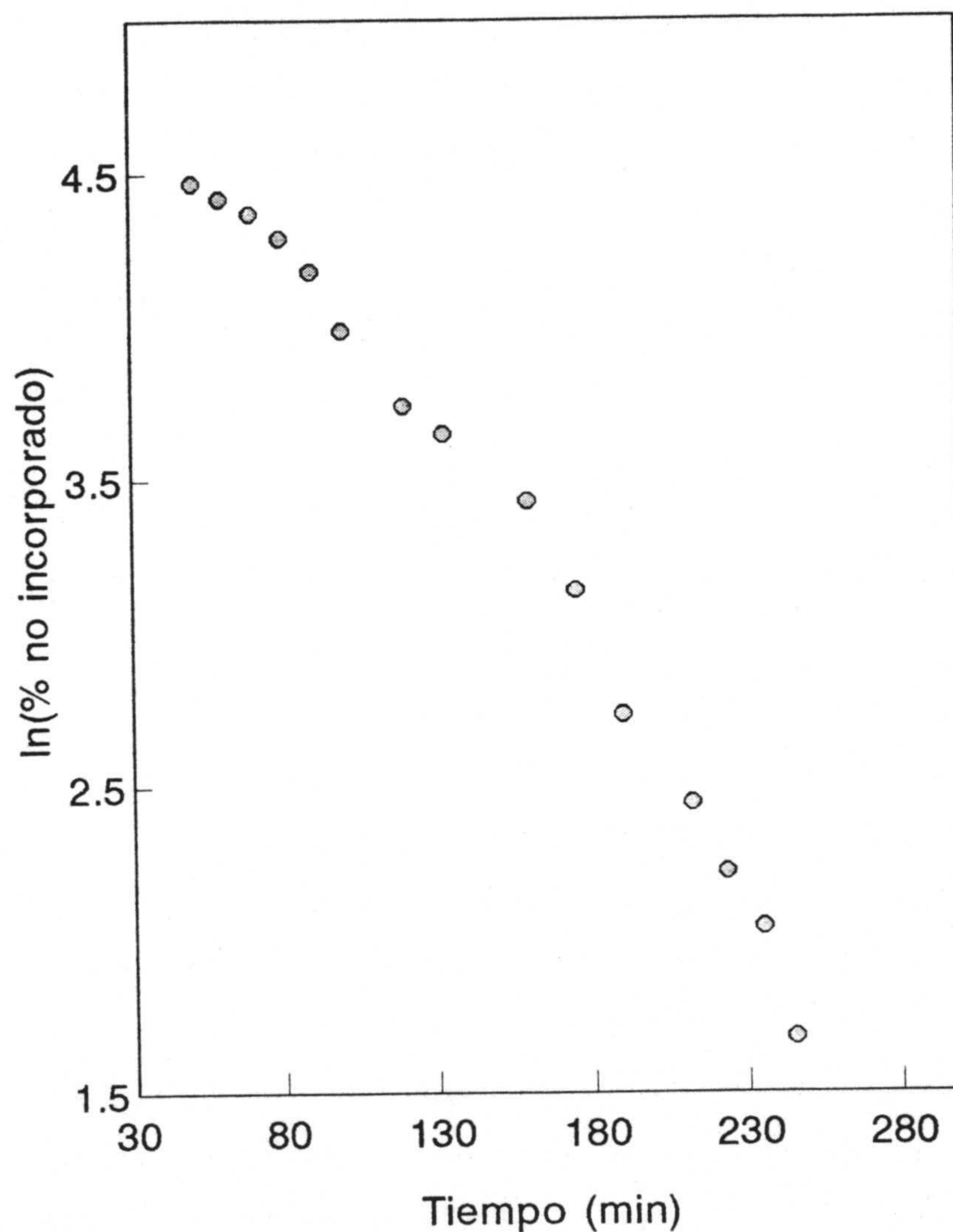
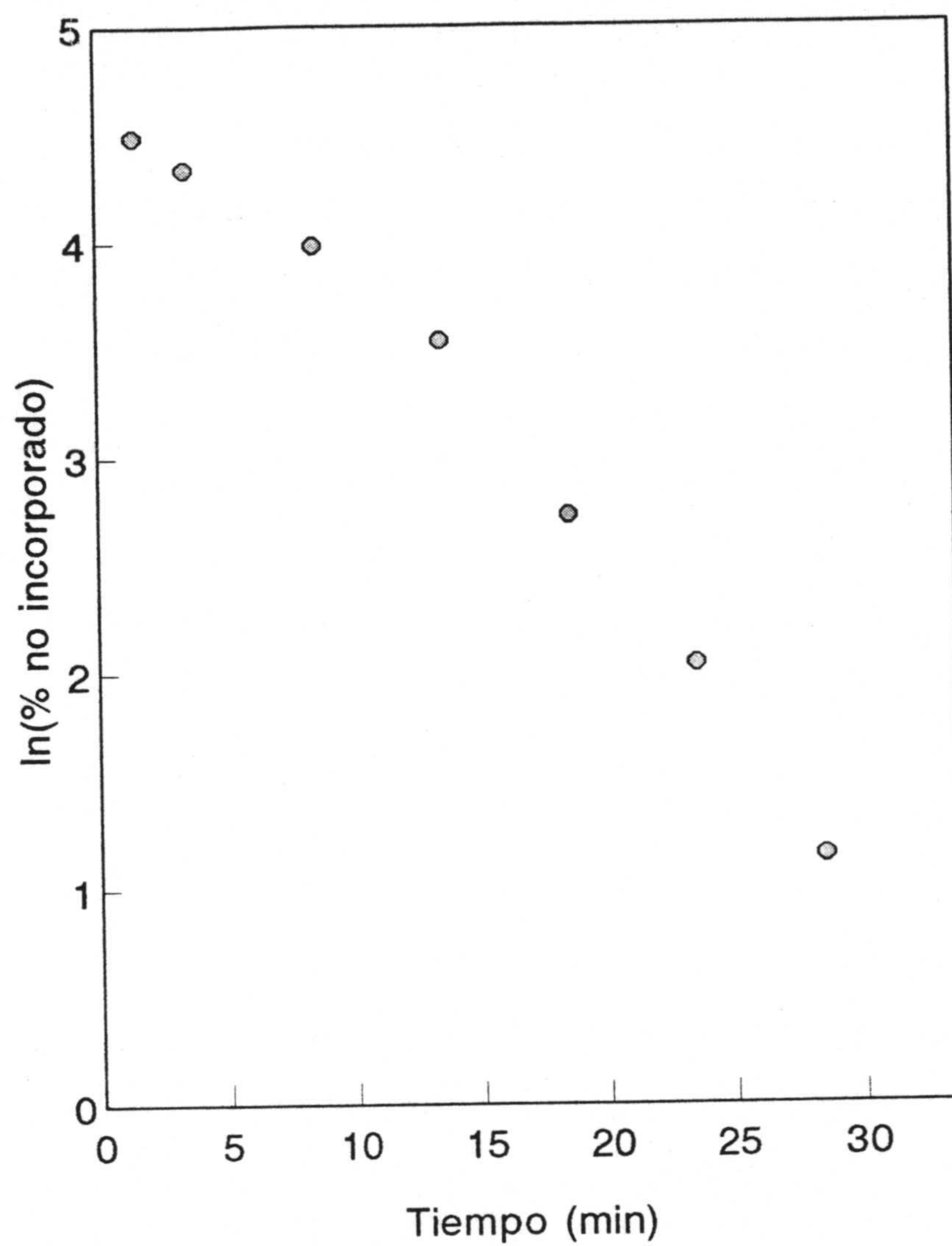


Figura 4-90

Ajuste según una cinética de pseudo-primer orden de los datos de incorporación de biliproteínas a micelas (pH 7).

**Figura 4-91**

Ajuste según una cinética de pseudo-primer orden de los datos de incorporación de biliproteínas a micelas (pH 6).

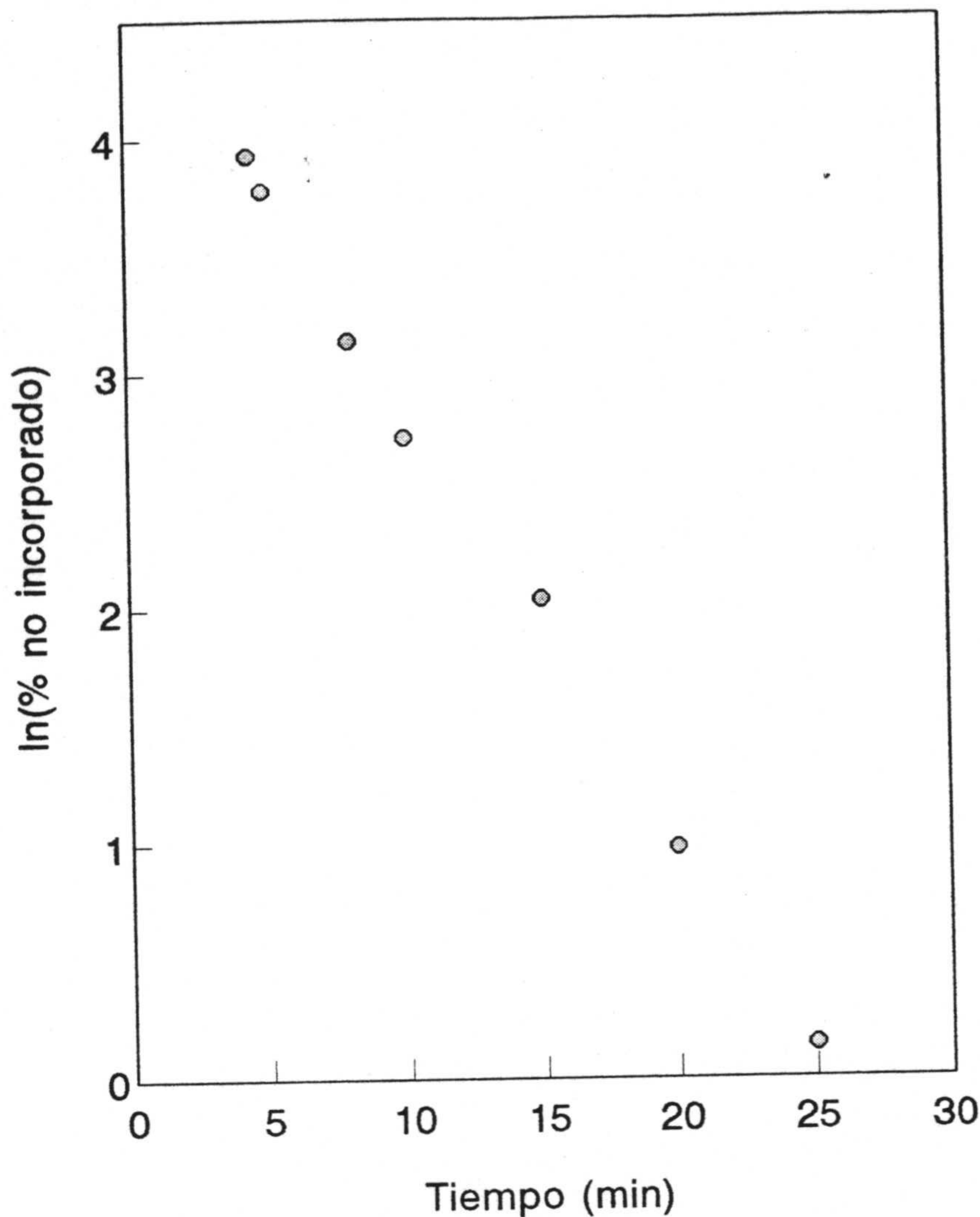


Figura 4-92

Ajuste según cinética de pseudo-primer orden de los datos de incorporación de biliproteínas a micelas (pH 4.9).

También se ha realizado un simple experimento que demuestra que el tiempo de estabilización del sistema micelar disminuye considerablemente cuando se aumenta el valor de w_0 . Así, se ha utilizado un $w_0=60$ y un pH igual al isoelectrico (4.9). El tiempo de formación e incorporación de las micelas resultó de sólo dos minutos.

Finalmente, se ha variado el medio apolar externo para conocer la posible contribución del disolvente hidrocarbonado. Así, se ha utilizado n-heptano de menor viscosidad que el isooctano anteriormente empleado. El pH de la disolución en la que fueron incorporadas las biliproteínas fué de 7, al objeto de observar mejor las posibles variaciones cinéticas en la

formación del sistema micelar.

Los resultados obtenidos se representan en las Figuras 4-93 y 4-94. Como es lógico, el sistema externo micelar no influye en las características espectrales de las proteínas, situadas en el interior de la micela. De otra parte, la velocidad de estabilización del sistema se alcanza en algo menos de tiempo, como corresponde a un medio externo de menor viscosidad.

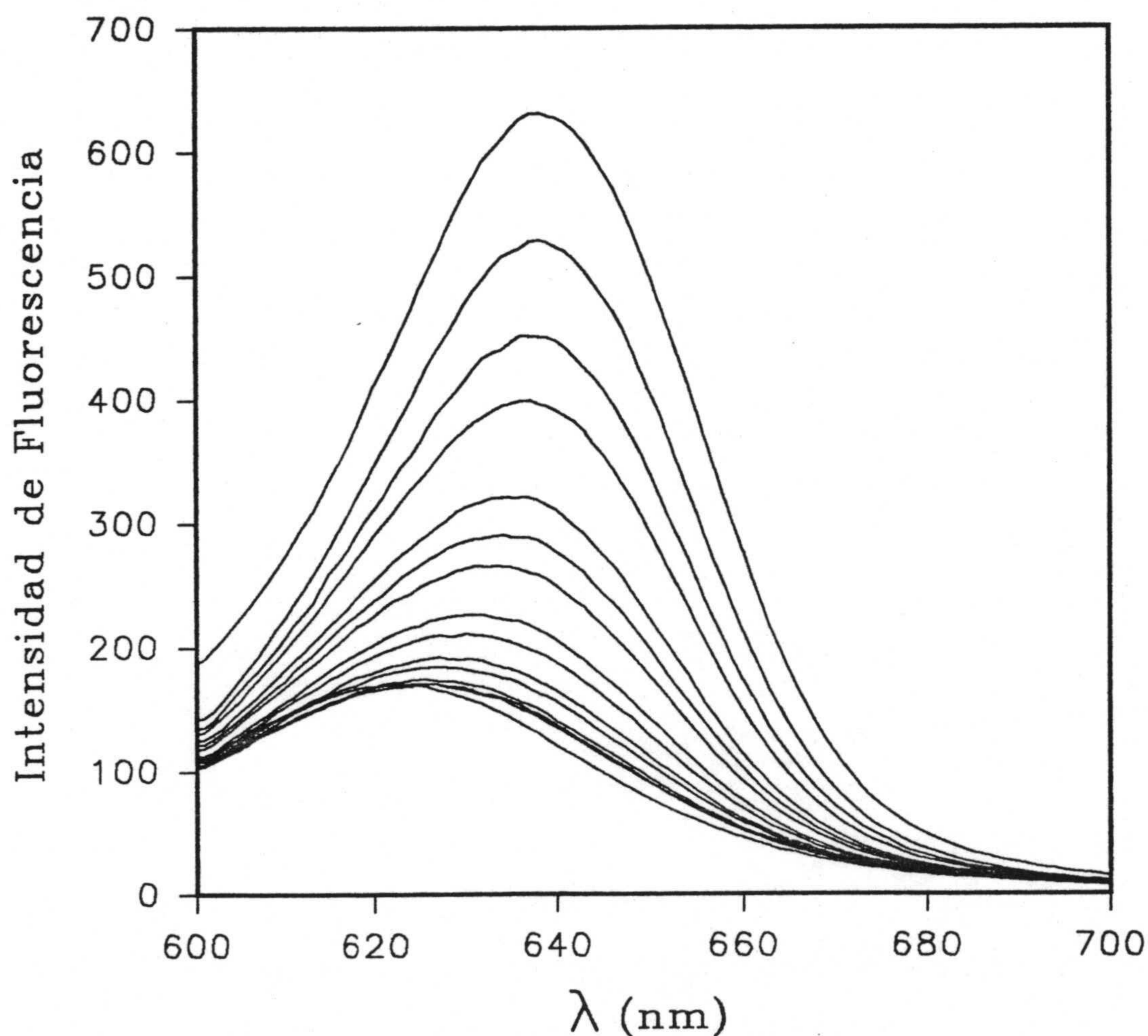


Figura 4-93

Espectros de emisión de fluorescencia de C-PC en micelas reversas de AOT-heptano ($w_0=35$) (pH 7).

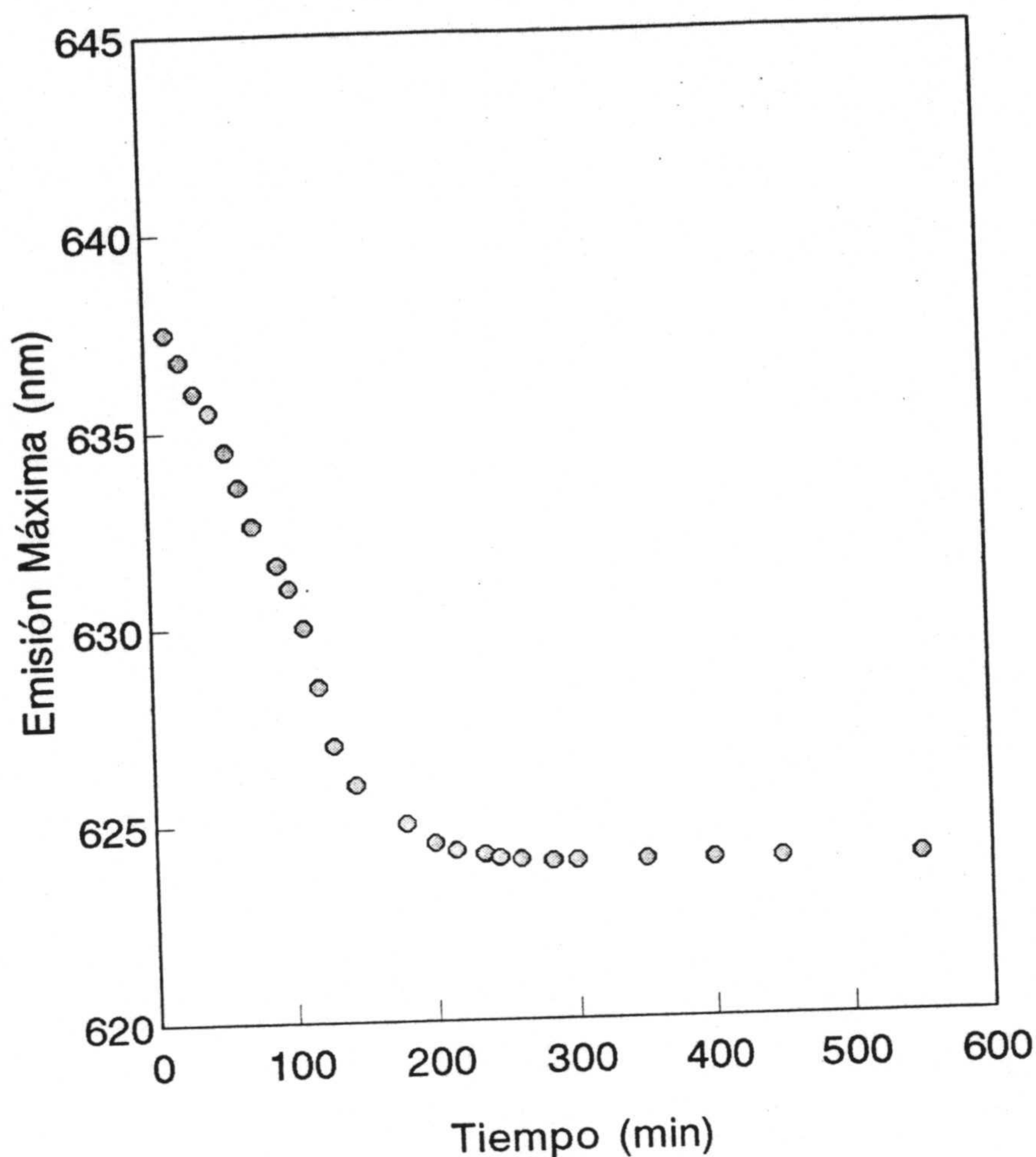


Figura 4-94

Variación de la emisión máxima frente al tiempo, de C-PC en micelas reversas de AOT-heptano ($w_0=35$) (pH 7).

En todos los experimentos realizados, la inclusión de las biliproteínas en las micelas reversas, lleva consigo una disminución de la eficiencia de fluorescencia. Aunque el comportamiento observado de λ_{\max} implica una mayor hidrofobicidad en los alrededores de los cromóforos en el interior micelar, el rendimiento cuántico permanece inalterado, para todos los valores investigados de $w_0 > 35$, a un valor menor que en disolución acuosa. Ya que el rendimiento cuántico se expresa como la relación de la constante de velocidad de fluorescencia y la suma de las constantes de velocidad de todos los procesos de desactivación incluyendo la fluorescencia, el decrecimiento de su valor en micelas, respecto al que posee en disolución acuosa homogénea, apunta la aparición de vías adicionales de desactivación probablemente originadas por la alteración de la estructura trimérica de las proteínas.

4.7.4-Incorporación de biliproteínas a hematíes.

Las conclusiones alcanzadas en los epígrafes anteriores, referidas a la localización de las biliproteínas en la interfase micelar del AOT, permiten hacer la suposición de que estas proteínas se pueden fijar, en su forma nativa, a aquellas membranas naturales que posean lípidos con cabezas polares cargadas negativamente a pH neutro.

Así, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.7 se han obtenido linfocitos y hematíes de sangre humana. Como agentes permeabilizantes que efectúen la perforación de las membranas de mencionadas células sanguíneas se han utilizado permeafix y tritón. Del primero, se ha empleado el preparado comercial sin modificación adicional, mientras que de tritón se ensayaron diversas disoluciones de concentraciones comprendidas en el intervalo entre 0.05 y 5% (v/v). La posible incorporación de C-PC en el interior celular se ha seguido mediante microscopía de fluorescencia.

El tratamiento con permeafix no parece efectivo en lo que se refiere a la apertura de canales que puedan ser utilizados por la biliproteína para penetrar en el interior celular. En cuanto al tratamiento con tritón, todas las concentraciones investigadas provocan lisis completa de los linfocitos, como se observa en las preparaciones vistas al microscopio, que mostraban la totalidad de las células fragmentadas y sin fluorescencia. En hematíes, el tritón a concentraciones del 5% lisa la mayoría de las células, mientras a concentraciones $\leq 0.1\%$, se observan células enteras en las que ninguna de ellas presenta fluorescencia. Sin embargo, a concentraciones comprendidas entre 0.5 y 1%, se observaron al microscopio una cantidad alta de hematíes sin lizar que, además presentan fluorescencia, como se pone de manifiesto en la Figura 4-95, que es una foto obtenida de un campo en donde se visualiza de forma nítida lo anteriormente comentado. En mencionada figura se puede observar que la fluorescencia está localizada en la pared celular y ésta es la disposición generalmente visualizada, aunque en algunos casos la fluorescencia se observa en casi la totalidad del interior celular.

En otra serie de experiencias, se ensayaron distintos tiempos de exposición de la suspensión celular al agente permeabilizante comprendidos entre 20 y 60 minutos, así como diferentes temperaturas en el intervalo 25-37 °C. Los resultados obtenidos fueron cualitativamente los mismos, no habiéndose realizado ninguna experiencia cuantitativa.

La fijación de la forma nativa de C-PC al interior de la membrana celular de hematíes demuestra que, aunque algunos autores indican que las biliproteínas tienen una baja tendencia a enlazarse inespecíficamente a células (Haugland, 1997), algunas membranas retienen C-PC de forma inespecífica, lo que podría falsear algunos resultados obtenidos en clasificación celular y citometría de flujo, técnicas en que se ha empleado como trazador ficoeritrina conjugada a diferentes anticuerpos y otras macromoléculas (Glazer y Stryer, 1984). De otra parte, los resultados obtenidos permiten proponer el empleo de C-PC para alcanzar una rápida visualización fluorescente de hematíes con una metodología sencilla, sin necesidad de conjugarla a ninguna biomolécula que se enlace de forma específica a la membrana celular de los mencionados glóbulos rojos de la sangre. No obstante, se deben de realizar adicionales experiencias sistemáticas que permitan seleccionar las condiciones más idóneas para el desarrollo analítico.

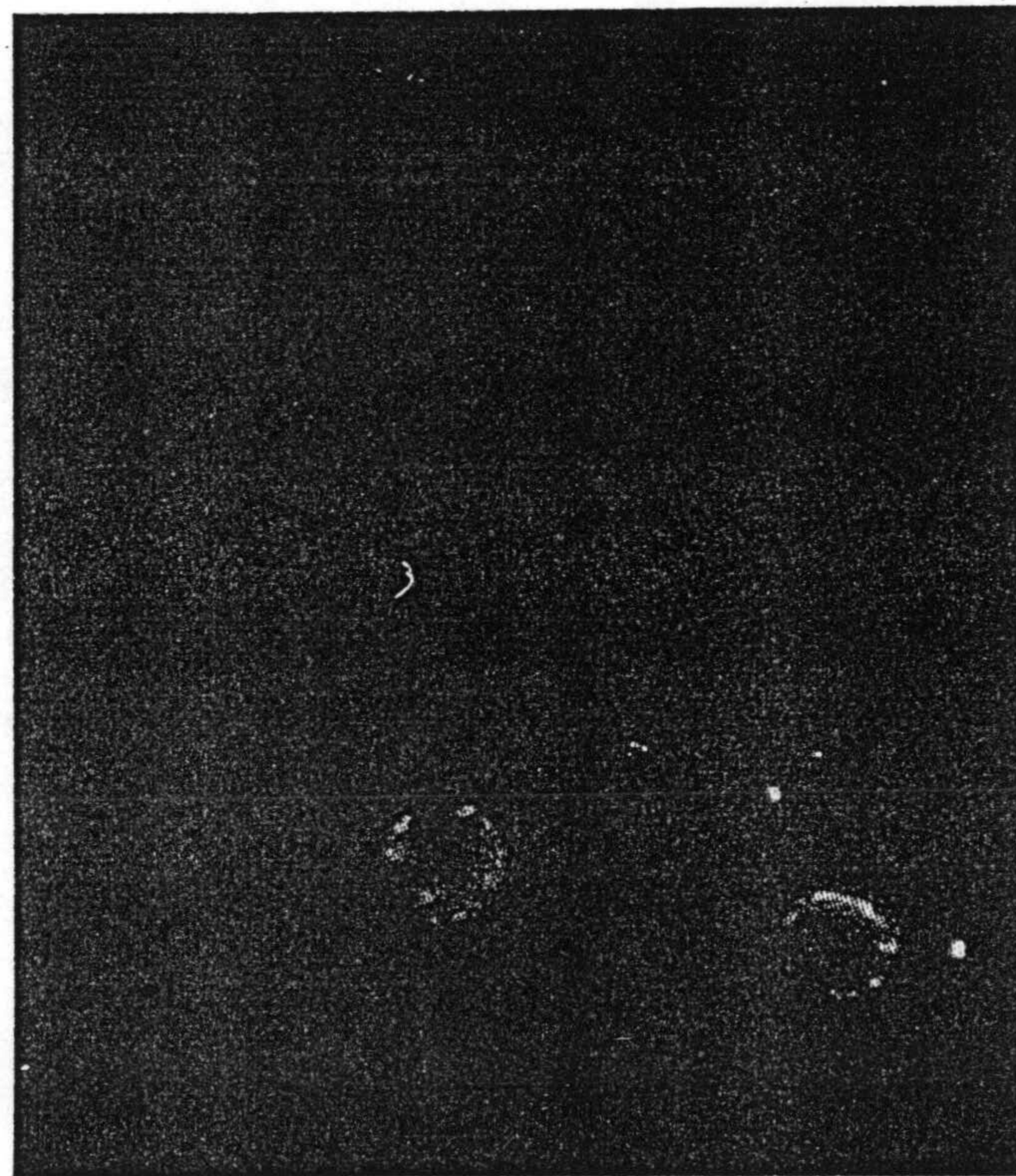


Figura 4-95

Fotografía al microscopio de fluorescencia, de hematíes con C-PC incorporada en su interior.

5.-CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados experimentales que han sido consignados y con la discusión que de ellos se ha efectuado, se han podido establecer las siguientes conclusiones:

1.-Se han separado eficazmente las subunidades de C-PC y APC en condiciones de desnaturalización, por cromatografía de HPLC en fase reversa, lo que ha permitido corroborar la pureza hasta homogeneidad, anteriormente comprobada por absorciometría y SDS-PAGE de las biliproteínas preparadas según la metodología descrita.

2.-Se ha obtenido y purificado el cromóforo ficocianobilina, único presente en ambas biliproteínas, mediante metanólisis y posterior extracción con una mezcla formada por cloruro de metileno:butanol (2:1). Su pureza se ha demostrado por cromatografía de HPLC en fase reversa.

3.-Por el método de acupuntura en gel se han cristalizado las dos biliproteínas. La calidad de los cristales obtenidos ha permitido su caracterización mediante difracción de rayos-X. Los cristales de ambas proteínas pertenecen al sistema hexagonal. En C-PC las ausencias sistemáticas de reflexiones indican que el grupo espacial corresponde al P6 o P6₃, con constantes de célula $a=b= 182.38 \text{ \AA}$, $c= 60.87 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta= 90^\circ$, $\gamma= 120^\circ$. Debido al mayor tamaño de los cristales de APC se ha podido determinar sin ambigüedad que corresponden al grupo espacial P6₃22, con constantes de célula $a=b= 102.04 \text{ \AA}$, $c= 131.22 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta= 90^\circ$, $\gamma= 120^\circ$.

4.-Las propiedades espectroscópicas de absorción y emisión de C-PC y APC no se alteran apreciablemente en los intervalos de temperatura y pH comprendidos entre 30-50 °C y 4-9, respectivamente.

5.-Por espectroscopía FT-IR se ha determinado la estructura secundaria de las biliproteínas en disolución. La cuantificación para C-PC ha resultado ser: estructura tipo α -hélice, 42%; β , 24-35 %; R, 13% y T, 21-10%. En lo que se refiere a APC, la distribución de estructuras es: α -hélice, 31%; β , 36-47%; R, 14% y T, 19-8%. En APC se observa una mayor ordenación en láminas β , frente a la predominante ordenación en hélices que presenta C-PC.

6.-Los espectros de polarización de fluorescencia (excitación) muestran la existencia de distintos tipos funcionales de cromóforos. Si se admite la clasificación ampliamente reconocida, en cromóforos de tipo sensibilizante y de tipo fluorescente propiamente dichos, se puede deconvolucionar el espectro de absorción. La anterior deconvolución y los bajos valores del grado de polarización, demuestran cualitativamente la eficaz transferencia de energía cuando ambas biliproteínas se encuentran en el estado de agregación trimérico. Por el contrario, la mencionada transferencia de energía entre cromóforos resulta más ineficaz cuando se encuentran como monómeros.

7.-Mediante la incorporación de una amina reactiva en la posición N⁴ de la citosina, se ha introducido el grupo 2-piridil disulfuro en el ácido polirribocitídílico [(Poli(c))]. Este mismo grupo se ha introducido en los residuos lisina de las biliproteínas. La posterior adición de ditiotretol provoca la conjugación efectiva entre las biliproteínas y Poli(C).

8.-Los conjugados biliproteínas-Poli(C) son de utilidad en la detección fluorimétrica de la hibridación con ácido polirribonucleosídico [Poli(I)]. Referida hibridación se puede detectar en medios homogéneos mediante el aumento del grado de polarización que ha resultado proporcional al porcentaje de híbrido formado.

9.-Se han incluido las biliproteínas en el interior de micelas reversas de AOT en isooctano. El cromóforo se encuentra localizado en las inmediaciones de la interfase molecular agua-surfactante, a causa de las interacciones electrostáticas entre los residuos con carga positiva de la apoproteína y los grupos sulfonato negativos del AOT. Por la misma razón las biliproteínas se unen de forma inespecífica al interior de la membrana celular de hematies. Las moléculas de agua fuertemente inmovilizadas en la interfase micelar que generan el entorno que rodea a los cromóforos, eliminan el diferente ambiente proteico en el que se encuentran en disolución acuosa por lo que, al ser aquellos químicamente idénticos, muestran iguales características espectrales. Además éstas resultan insensibles al contenido de agua en el interior de las micelas.

6.-BIBLIOGRAFÍA.

-
- Aaronson, S., Berner, T. y Dubinsky, Z., (1980). Microalgae as a source of chemicals and natural products. En: G. Shelef y C.J. Soeder (eds.), *Algae Biomass, Production and use*, Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 575-601.
 - Afkir, M. (1997) Tesis Doctoral en fase de redacción. Universidad de Granada.
 - Akervalt, K. y Strandberg, B. (1971) *J.Mol.Biol.* 62, 625.
 - Algarra, P., Thomas, J. y Mousseau, A., (1990). *Plant Physiol.* 92, 570-576.
 - Appelt, S., White, S.W. y Wilson, K.S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 13328.
 - Arnot, S., Hulkins, P., Dover, S., Fuller, W. y Hodgson, A. (1973) *J. Mol. Biol.* 81, 107-122.
 - Arrondo, J.L.R., Muga, A., Castresana, J. y Goñi, M.F. (1993) *Prog.Biophys.Molec. Biol.* 59, 23-56.
 - Badu, T.S., Kumar, A. y Varma, A.K. (1991) *Plant Physiol.* 95, 492-497.
 - Beale, S.I. y Comejo, J., (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* 227, 279.
 - Beale, S.I. y Comejo, J. (1991) *The Journal of Biological Chemistry* 266, 22333-22340.
 - Bennet, A. y Bogorad, L., (1971) *Biochemistry.* 10, 3625.
 - Benemann, J.R. y Weissman, J.C., (1984). Chemicals from microalgae. "Bioconversion System", Wise, D.L. (ed). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.59-70.
 - Benemann, J.R., Tillett, D.M. y Weissman, J.C., (1987). *Trends in Biotechnol.* 5, 47-53.
 - Bergeron J.A., (1963). Photosynthetic Mechanisms in Green Plants. Natn. Sci., USA., Natn. Res. Council Publ., 527-536.
 - Bermejo, R. (1994) Tesis de Licenciatura. Universidad de Granada.
 - Bernal, J.D. y Crowfoot, D.C. (1934) *Nature* 133, 794-795.
 - Berns, D.S., Scott, E. y O'Reilly, K.T., (1964). *Science* 145, 1054-1056.
 - Berns, D.S. y Edwards, M.R., (1965). *Archs. Biochem. Biophys.* 110, 511-516.
 - Berns, D.S. y Morgenstern, A., (1966). *Biochemistry* 5, 2985-2990.
 - Berns, D.S. y Scott, E., (1966). *Biochemistry* 5, 1529-1533.
 - Berns, D.S., (1967). *Plant Physiol.* 42, 1569-1586.
 - Berns, D.S. y Morgenstern, A., (1968). *Archs. Biochem. Biophys.* 123, 640-642.
 - Berns, D.S., (1971). *Biological Macromolecules* 5A, 105-148.
 - Berns, D.S. y MacColl, R. (1989) *Chem.Rev.* 89, 807-825.
 - Bernstein, J. (1993) *J.Phys.D. Appl.Phys.* 26, B66-B76.
 - Bhattacharyya, K. y Basak, S. (1993) *Biophys. Chem.* 47, 21-31.
 - Bhattacharyya, K. y Basak, S. (1995) *Photochemistry and Photobiology* 62, 17-23.
 - Bloomfield, V. y Jennings, B.R., (1969). *Biopolimers* 8, 297-299.

- Blumen, A. y Manz, J. (1979) *J.Chem.Phys.* 71, 46-94.
- Blundell, J.L. y Johnson, L.N. (1976) "Protein Crystallography". Academic Press. New York.
- Braiman, M.S. y Rothchild, K.J. (198) *Ann.Rev.Biophys.Chem.* 17, 541.
- Braslavsky, S.E., Holzwarth, A.R., Schaffner, K., (1983). *Angew. Chem. Int.Ed. Engl.* 22, 656.
- Braslavsky, S.E., Schneider, D., Heihoff, K., Nonell, S., Aramendia, P. y Schaffner, K. (1991) *J. American Chem. Society* vol 113, 19, 7323-7334.
- Brejc, K., Ficner, R., Huber, R. y Steinbacher, S. (1995) *J. Mol. Biol.* 249, 424-440.
- Bryant, D.A., Glazer, A.N. y Eiserling, F.A., (1976). *Arch. Microbiol.* 110, 61.
- Bryant, D.A., Hixson, G.S. y Glazer, A.N., (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 220-225.
- Bryant, D.A., Guglielmi, G., Tandeau, N., Castets, A. y Cohen-Bazire, G., (1979). *Arch. Microbiol.* 123, 113.
- Cabiaux, V., Goormaghtigh, E., Wattiez, R., Falmagne, P. y Ruyschaert, J.M. (1989a) *Biochimie* 71, 153-158.
- Cabiaux, V., Brasseur, R., Wattiez, R., Falmagne, P., Ruyschaert, J.M. y Goortmaghtight, E. (1989b) *J.Biol.Chem.* 264, 4928-4938.
- Carlsson, J., Drevin, H. y Axén, R. (1978) *Biochem. J.* 173, 723-737.
- Carter, C.W.Jr. y Carter, C.W. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 12219-12223.
- Chamberlin, M. y Patterson, D. (1965) *J. Mol. Biol.* 12, 410-428.
- Chapman, D.J., Cole, W.J. y Sigelman, H.W., (1967). *Biochem. J.* 105, 903-905.
- Chapman, D.J., Cole, W.J. y Siegelman, H.W., (1968a). *Phytochem.* 7, 1831-1835.
- Chapman, D.J., Cole, W.J. y Siegelman, H.W., (1968b). *Biochim. Biophys. Acta.* 153, 692-698.
- Chou, H. y Jeng, J. (1993) *Hydrobiologia* 260/261, 571-576.
- Cohen, Z., (1986). "Handbook of Microalgal Mass Culture"., Richmond, A. (ed), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.143-189.
- Cohen, S.G. y Inbar, S., PB Diagnostic System, Inc, (Patent), PCT International USA, WO 8809505 A1, (Cl.GOIN-033/53A, GOIN-033/52B), (1988); 23pp.
- Cohen-Bazire, G., Beguin, S., Rimon, S., Glazer, A.N. y Brown, M., (1977). *Arch. Microbiol.* 111, 225-238.
- Cooley, J.W. y Tuckey, J.W. (1965) *Math.Comput.* 19, 297.
- Cope, B.T., Smith, U., Crespi, H.L. y Katz, J.J., (1967). *Biochim. biophys. Acta* 133, 446-458.

-
- Cornejo, J., Beale, S.I., Terry, M.J. y Lagarias, J.C. (1992) *The Journal of Biological Chemistry* 267, 14790-14798.
 - Csatorday, K., MacColl, R., Csizmadia, V., Grabowski, J. y Bagyinka, C. (1984) *Biochemistry* 23, 6466-6470.
 - Csatorday, K., MacColl, R., Guar-Friar, D. y Hanzlik, C.A. (1987) *Photochem. Photobiol.* 45, 845-848.
 - Dainippon InK and Chemicals y Tokyo Kenkyukai (inventores) (1983) Antitumoral agents containing phycobilin; also used to treat ulcers and hemorrhoidal bleeding.
 - Dainippon InK and Chemicals Inc. (1987) Japanese Patent 06691.
 - Dale, R.E. y Teale, W.J. (1970) *Photochem. Photobiol.* 12, 99-117.
 - Davis, L.C., Radke, G.A. y Guikema, J.A. (1986) *J.Liq.Chromatogra.* 9, 1277-1295.
 - Debreczeny, P., Sauer, K., Zhou, J. y Bryant, D. (1993) *J. Phys. Chem.* 97, 9852-9862.
 - Deutscher, M.P. (1990) "Guide to protein purification" *Methods in Enzymol.* Vol 182.
 - Draper, D. y Gold, L. (1980) *Biochemistry* 19, 1774-1781.
 - Draper, D. (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 989-1001.
 - Dolbeare, F.A. y Gray, J.W., University of California, Berkeley. (Patent), United States, US 4812394 A, (Cl.435006000, Cl2Q-001/68A), (1989); 17 pp.
 - Dong, A., Huang, P. y Caughey, W.S. (1990) *Biochemistry* 29, 3303.
 - Dossena, A., Rizzo, V., Marchelli, R., Gasnati, G. y Luisi, P.L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 446, 493.
 - Dousseau, F., Therrier, M. y Pezolet, M. (1989) *Appl. Spectrosc.* 43, 538-542.
 - Dubinsky, O., Lerental, Y., Christiaen, D., Glaser, D., Barak, Z. y Arad, S. (1988) "Algal Biotechnology" (Stadler, L., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. y Christiaen, D. eds), 451-461, Elsevier.
 - Duerring, M., Huber, R. y Bode, W. (1988) *FEBS Letters* 236, 167-170.
 - Duerring, M.J., Schmidt, G.B. y Huber, R. (1991) *J.Mol.Biol.* 217, 577-592.
 - Durand-Chastel, H., (1980). Production and use of Spirulina in Mexico. *Algae Biomass*. G. Shelef and C.J. Soeder, Editors. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
 - Duval, J.C., Lichtlè, C. y Lemoine, Y., (1987). *Biochim. Biophys. Acta* 894, 76-90.
 - Eicke, H.F., Shepherd, J. C. y Steinemann, A. (1976) *J. Colloid Interface Sci.* 56, 168.
 - Eisenger, J. y Flores, J. (1985) *Biophysic. J.* 48, 77-80.
 - Elliot, A. y Ambrose, E.J. (1950) *Nature* 165, 921-922.
 - Evstigneev, V.B. y Bekasova, O.D., (1968). *Mol. Biol.* 2, 310-316.
 - Felsenfeld, G. y Miler, H. (1967) *Ann. Rev. Biochem.* 37, 407-412.

-
- Fendler, J.H. y Fendler, E.J. (1975) "Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems" Academic Press New York.
 - Fendler, J.H. y Mittal, P. (1982) "Solution Behavior of surfactants". New York Academic Press.
 - Fernández-Velasco, A., Sepúlveda-Becerra, M., G, Gabira, A., Darszon, M. y Gómez-Puyou, A. (1995) *Biochemistry* 34, 361-369.
 - Ferreria, S. y Gratton, E. (1990) *J.Mol.Liq.* 45, 253-272.
 - Fischer, R., Gottstein, J., Scheer, H., Geiselhart, P. y Schneider, S. (1990) *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 5, 151-165.
 - Förster, T. (1959) *Discuss. Faraday Soc.* 27, 7-17.
 - Füglistaller, P., Mimuro, M., Suter, F. y Zuber, H. (1987) *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 368, 353-367.
 - Fujimori, E. y Pecci, J., (1966) *Biochemistry* 5, 3500-3508.
 - Fujiwara, T., (1966). *J. Biochem.* 43, 195-203.
 - Gallay, J., Vincent, C., Nicot, M. y Waks, M. (1987) *Biochemistry* 26, 5738-5747.
 - Gantt, E., (1980). *Int. Rev. Cytol.* 66, 45.
 - García-Ruiz, J.M. (1981) PhD Thesis "Teoría del crecimiento de cristales en geles. Precipitación polimórfica y agregados cristalinos de morfología inducida" Universidad Complutense, Madrid.
 - García-Ruiz, J.M. (1991) *Key Engineering Materils.* 58, 87-106.
 - García-Ruiz, J.M., Moreno, A., Viedma, C. y Coll, M., (1993) *Mat. Res. Bull.*, 28, 541-546.
 - García-Ruiz, J.M. y Moreno, A., (1994). *Acta Cryst. D*50, 484-490.
 - García-Ruiz, J.M., Moreno, A., Párraga, A. y Coll, M. (1995) *Acta Crystal. D*51, 278-281.
 - Gingrich, J.C., Willians, R.C. y Glazer, A.N., (1982). *J. Cell. Biol.* 95, 170.
 - Gingrich, J.C., Lundell, D.J. y Glazer, A.N., (1983). *J. Cell. Biochem.* 22, 1.
 - Gitler, G. y Montal, M. (1972a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 1486.
 - Gitler, G. y Montal, M. (1972b) *Febs Letters* 28, 329.
 - Glazer, A.N. y Cohen-Bazire, G., (1971). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1398-1401.
 - Glazer, A.N. y Fang, S., (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 659.
 - Glazer, A.N., Fang, S. y Brown, D.M., (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 5679.
 - Glazer, A.N. (1976) "The biliproteins" Vol 11, 3rd.Ed. N. Neurath y R.L. Hill (eds) Academic Press, 1-103.
 - Glazer, A.N. y Stryer, L. United States Patent (1982); GO1N 33/54; GO1N 31/00. 436/501; 436/546.

- Glazer, A.N., (1982). *Ann. Rev. Microbiol.* 36, 173-198.
- Glazer, A.N., (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 768, 29-51.
- Glazer, A.N. y Stryer, L., (1984). *Trends Biochem. Sci.* 9, 423-427.
- Glazer, A.N. (1985) *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 14, 47-77.
- Glazer, A.N., (1988). *Methods Enzymol.* 167, 291-303.
- Glazer, A.N., (1990). *Methods Enzymol* 186, 161-168.
- Gillbro, T., Sandström, A., Sundström, V., Fischer, R., Scheer, H. Photosynthetic Light Harvesting Systems, Organization and Function; Walter de Gruyter: Berlin (1988) 457-467.
- Gombos, Z., Csizmadia, V. y Csatorday, K., (1984). *Anal. Biochem.* 136, 491-492.
- Grantt, E. y Lipschultz, C.A., (1974). *Biochem.* 13, 2960-2967.
- Grundstein, M. y Hogness, D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961-3966.
- Guerrero, M.G. y Losada, M., (1983a). *Mundo científico* 3, 616-630.
- Guerrero, M.G. y Losada, M., (1983b). La bioconversión de la energía solar. Libro del año Salvat Editores, Barcelona, pp. 247-251.
- Guerrero, M.G. y Losada, M., (1989). Producción fotosintética de compuestos de interés práctico por microalgas. En: "Fotosíntesis". Colección Nuevas Tendencias. CSIC, Madrid.
- Gustafson, K. (1989) *Journal of the National Cancer Institute*, 1254.
- Gysi, J.R. y Zuber, H. (1979) *Biochem. Journal* 181, 577-583.
- Hall, D.O., (1979). *Nature* 278, 114-117.
- Haugland, P.R. (1986) Handbook of fluorescent probes. Sixth edition. Spence, T.Z. editor.
- Hattori, A. y Fujita, Y., (1959). *J. Biochem.* 46, 633-644.
- Hattori, A., Crespi, H.L. y Katz, J.J., (1965a). *Biochemistry* 4, 1225-1236.
- Hattori, A., Crespi, H.L. y Katz, J.J., (1965b). *Biochemistry* 4, 1213-1224.
- Hefferle, P. (1982) Tesis Doctoral Tech. Universitat München.
- Henrikson, R. (1994) "Microalga Spirulina", Ediciones Urano, ISBN: 84-7953-047-2.
- Hilditch, C.M., Smith, A.J., Balding, P. y Rogers, L.J., (1991). *Phytochemistry* 30, No. 11, 3515-3517.
- Holzwarth, A.R., Uandler, J., Schaffner, K., Sundstrom, V., Sandstrom, A. y Gillbro, T., (1983). *Isr. J. Chem.* 23, 223.
- Holzwarth, A.R., Wendler, J. y Suter, G.W. (1987) *Biophys. J.* 51, 1-12.
- Holzwarth, A.R., Bittersmann, E., Reuter, W. y Wehrmeyer, W., (1990). *Byophys. J.* 57, 133-145.
- Grassetti, D.R. y Murray, J.F. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 119, 41-49.
- Hoppe-Seyler, F. (1864) *Virchows Arch.* A29, 233-235.

- Huang, C. y Berns, D.S. (1981) *Biochemistry* 20, 7016-7021.
- Huang, C., Berns, D.S. y MacColl, R. (1987) *Biochemistry* 26, 243-245.
- Jackson, J. (1991) Tesis Doctoral, Universidad de San Diego, California (USA).
- Jancarik, L. y Kim, S.H. (1991) *J. Appl. Cryst.* 24, 409-411.
- Jane, M., Cox, P. y Wever, P. (1987) *J. Appl. Cryst.* 20, 366-373.
- Kao, O. y Berns, D.S., (1968). *Biochem. biophys. Res. Commun.* 33, 457-462.
- Kao, O., Berns, D.S. y MacColl, R., (1971). *Eur. J. Biochem.* 19, 595-599.
- Kataoka, N. y Misaki, A. (1983) *Agric. Biol. Chem.* 47, 2349-2355.
- Kauppinen, J.K., Moffat, D.M., Mantsch, H.H. y Cameron, D.G. (1981) *Appl. Spectrosc.* 35, 271-276.
- Kelly, R.B., Cozzarelli, N.R., Deutcher, M.P., Lehman, I.R. y Kornberg, A. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 39.
- Kobayashi, T., Degenkolb, E.O., Behrson, R., Rentzepig, P.M., MacColl, R. y Berns, D.S. (1979) *Biochemistry* 18, 5073-5078.
- Kost, H.P. y Benedict, E., (1982). *Z. Naturforsch. Teil C*, 37, 1057.
- Kimmel, J.R. y Smith, E.L., (1958). *Bull. Soc. Chim-Biol.* 40, 2049-2065.
- Klausner, A., (1986). *Biotechnology* 4, 947-953.
- Koho, K.Y., Chlorella Industry Co., Ltd. (*Patent*). Jpn. JP 58,128, 322, [83, 128. 322] (Cl. A61k35/80), 30 July 1983, Appl. 82/11, 116, 27 Jan (1982), 5pp.
- Kotlarchyk, K.M., Huang, J.S., y Chen, S. (1985) *J. Phys. Chem.* 89, 4382-4386.
- Kronick, M.N. and Grossman, P.D., (1983). *Clin. Chem.* 29, 1582-1586.
- Kufer, W., Scheer, H. y Holzwarth, A.R., (1983). *Isr. J. Chem.* 23, 233.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 277, 680.
- Lefauchaux, F. y Roberts, M.C. (1988) *J. Cryst. Growth.* 90, 358-367.
- Lenz, J., Federwisch, M., Gattner, H-G., Bradenburg, D., Höcker, U., y Woldmer, A. (1995) *Biochemistry* 34, 6130-6141.
- Loken, M.R. y Terstappen, L.W.M.M., (*Patent*). Becton, Dickinson and Co., European Pat. Appl., EP 347210 A2, USA, (Cl. G01N-033/58A, G01N-033-50), (1989); 12 pp.
- Losada, M., (1977). *Investigación y Ciencia* Abril, 7, 6-18.
- Lundell, D.J. y Glazer, A.N., (1983a). *J. Biol. Chem.* 258, 894.
- Lundell, D.J. y Glazer, A.N., (1983b). *J. Biol. Chem.* 258, 902.
- Lundell, D.J., Glazer, A.N., DeLange, R.J. y Brown, D.M., (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 5472.
- Luisi, P.L., Henninger, F., Joppich, M., Dossena, A. y Gasnati, G. (1977) *Biochem. Biophys.*

Res. Commun. 74, 1384.

- Luisi, P.L. y Wolf, R. (1982) "Micellar solubilization of enzymes in hydrocarbons solvents" Editores: Mittal, K.L. y Fendler, E.J. New York and London Press.
- Luisi, P.L. y Magid, L.J. (1986) *Crit. Rev. Biochem.* 20, 409-474.
- MacColl, R., Lee, J.J. y Berns, D.S., (1971). *Biochem. J.* 122, 421-426.
- MacColl, R., Csatorday, K., Berns, D.S. y Traeger, E., (1980). *Biochem.* 19, 2817-2820.
- MacColl, R., Csatorday, K., Berns, D.S. y Traeger, E. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 208, 42-48.
- MacColl, R. y Berns, D.S., (1981). *Isr. J. Chem.* 21, 296.
- MacColl, R. y Guard-Friar, D., (1987). Phycobiliproteins. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- MacColl, R., Guard-Friar, D., Ryan, T.J., Csatorday, K. y Wu, P. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 934, 275-281.
- MacPherson, A.J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 6300.
- MacPherson, A.J (1992) *J. Cryst. Growth.* 122, 161-167..
- Mantsch, H.H., Moffat, D.M. y Casal, H.L. (1988) *J. Molec. Struct.* 173, 285-298.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.C. y Berezin, I.V. (1978) *Dokl. Akad. Nank. SSSR (Engl. Edition)* 236, 951.
- Marzola, P. y Gratton, E. (1991) *J. Phys. Chem.* 95, 9488-9495.
- Mathies, R.A., Peck, K. y Stryer, L., (1990). *Anal. Chem.* 62, 1786-1791.
- Miki, K., Ezoe, T., Masui, A., Yoshisaka, T., Mimuro, M., Fujiwara-Arasaki, T. y Kasai, N. (1990) *J. Biochem.* 108, 646-649.
- Mimuro, M., Murakami, A. y Fujita, Y. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 215, 266-273.
- Mimuro, M., Füglistaller, P., Rumbeli, R. y Zuber, H. (1986) *B.B.A.* 848, 155-166.
- Murakami, A., Mimuro, M., Ohki, K. y Fujita, Y.J. (1981) *J. Biochem.* 89, 79-86.
- Murphy, R.F. y O'Carra, P., (1970). *Biochim. biophys. Acta* 214, 371-373.
- Narayana, S.K. y Devanarayanan, S.J. (1987) *J. Cryst. Growth.* 83, 446.
- Nelson, C.D., (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 3894-3901.
- Neufeld, G., (1967). Structural Characterization of phycocyanin and phycoerythrin. Ph.D. thesis, University of Texas, U.S.A.
- Neufeld, G. y Riggs, A., (1969). *Biochim. biophys. Acta* 181, 234-243.
- Nicot, C., Vacher, M., Vicent, M., Gallay, J. y Waks, M. (1985) *Biochemistry* 24, 7024-7032.
- Nolan, D.N. y O'hEocha, C., (1967). *Biochem. J.* 103, 39-40.
- O'Carra, P. y O'hEocha, C., (1962). *Nature* 195, 173-174.

- O'Carra, P., (1970). *Biochem. J.* 119, 2.
- O'Carra, P. y Killilea, S.D., (1971). *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 45, 1192-1197.
- O'Carra, P. y O'hEocha, C., (1976). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments Vol 1*, Academic Press, Londres, 328-375.
- O'hEocha, C., (1965) *A. Rev. Plant. Physiol.* 16, 415-434.
- Oi, V.T., Glazer, A.N. y Stryer, L., (1982). *J. Cell Biol.* 93, 981-986.
- Ong, L., Glazer, A.N. y Waterbury, J.B., (1984). *Science* 224, 80-82.
- Ong, L.J. y Glazer, A.N., (1991). *The Journal of Biological Chemistry.* 266, 9515-9527.
- Oschkinat, H., Muller, T. y Dieckmann, T. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 277-293.
- Padgett, M.P. y Krogmann, D.W., (1987). *Photosynth. Res.* 11, 225-235.
- Pauling, L., Corey, R.B. y Branson, H.R. (1951) *Proc. Natn. Acad. Sct. USA.* 37, 205-211.
- Parkinson, G., (1987). *Chem. Eng.* 94, 19-22.
- Park, J. y Sauer, K. (1991) *B.B.A.* 1056, 181-189.
- Paulus, H.P., Boston Biomedical Research Institute, Inc, PCT International WO 8504811 A1, (Cl. A61K-039/395, GOIN-033/54), (1985); 37 pp.
- Pochon, F. y Michelson, A.M. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 53, 1425.
- Powell, J.R., Wasaca, F.M. y Jakobsen, J.R. (1986) *Appl. Spectrosc.* 40, 339-344.
- Priestle, J.P., Rhyne, R.H., Salmon, J.B. y Hackertt, M.C. (1982) *Photochem. Photobiol.* 35, 827-834.
- Pringle, J.R., (1970). *Biochem. biophys. Res. Commun.* 39, 46-52.
- Raftery, M.A. y O'hEocha C., (1965). *Biochem. J.* 94, 166-170.
- Reines, S. A. y Schulman, L.H. (1979) *Methods in Enzymology Vol LIX*, 146-166.
- Reuter, W. y Wehrmeyer, W. (1988) *Arch. Microbiol.* 150, 534-540.
- Reynolds, J.A. y Tanford, C., (1970). *J. biol. Chem.* 245, 5161-5165.
- Richmond, A.E., (1986a) *Rev. Biotechnol.* 4, 369-438.
- Rouviere, J., Couret, J.M., Lindheimer, M., Dejardin, J.L. y Marrony, R. (1979) *J. Chim. Phys.-Chim. Biol.* 76, 289.
- Rusckowski, M. y Zilinskas, B.A., (1982)., *J. Plant. Physiol.* 70, 1055-1059.
- Salemne, F.R. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 533.
- Sandström, A., Gillbro, T., Sundström, V., Fischer, R. y Scheer, H. (1988) *B.B.A.* 933, 42-53.
- Sato, K.J. (1993) *J. Phys. D: Appl. Phys.* 26, B77-B84.
- Sauer, K., Scheer, H. y Sauer, P. (1987) *Photochem. Photobiol.* 46, 427-440.
- Saxena, A.M., (1988). *J. Mol. Biol.* 200, 579-591.

- Schatz, G.H. y Witt, H.T., (1984). *Photobiochem. Photobiophys.* 7, 1-14.
- Scheer, H., (1981). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 20, 241.
- Schirmer, T., Bode, W., Huber, R., Sidler, W. y Zuber, H. (1985) *J. Mol. Biol.* 184, 257-277.
- Schirmer, T., Huber, R., Schneider, M. y Bode, W. (1986) *J.Mol. Biol.* 188, 651-676.
- Schirmer, T., Bode, W. y Huber, R. (1987) *J.Mol.Biol.* 196, 677-695.
- Schirmer, T. y Vincent, M.G. (1987) *B.B.A.* 893, 379-385.
- Schwartz, A., Flow Cytometry Standars Corp. (*Patent*), Britain UK Pat. Appl., G.B. 2172104 A1, (Cl.GOIN-021/64A), (1986); 15 pp.
- Schwartz, A., Caribbean Microparticles Corp. (*Patent*), United States, US 4689307 A, (Cl.GOIN-031/00A), (1987); 4 pp.
- Schwartz, A., Caribbean Microparticles Corp. (*Patent*), United States, US 4918004 A, (Cl.435007000, GOIN-033/546A, GOIN-033/547B), (1990); 10 pp.
- Scott, E. y Berns, D.S., (1965). *Biochemistry* 4, 2597-2606.
- Searle, G.F.W., Barber, J., Porter, G. y Tredwell, C.J. (1978) *B.B.A.* 501, 246-256.
- Shapiro, R., Selvis, R., Weicher, M. (1970). *J.Am.Chem.Soc.* 92, 422-424.
- Shelef, G. y Soeder, C.J. (1980) "Algal Biomass: Production and Use", Shelef, G. y Soeder, C.J. eds, Elsevier.
- Sheldrick, W.S. (1983) *Isr. J. Chem.* 23, 155.
- Siegelman, H.W., Chapman, D.J. y Cole, W.J., (1968). *Biochem. Soc. Symp.* 28, 107-120.
- Sing, A.K. y Majumdar, N. (1995) *Journal of Photochem. Photobiol. B: Biology* 30, 105-113.
- Siegelman, W.W. y Kycia, J.H., (1982). *Plant Physiol.* 70, 887-897.
- Singh, A.K. y Aruna, R.V. (1995) *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 89, 247-250.
- Stuchbury, T., Shipton, M., Norris, R., Malthouse, J.P.G., Brocklehurst, K., Herbert, J.A. y Suschitzky, H (1975) *Biochem. J.* 151, 417-432.
- Soini, E. and Hemmitä, I., (1979). *Clin. Chem.* 25, 353-361.
- Somogyi, B. (1993) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 18, 3-16.
- Southern, E.M. (1975) *J. Mol.Biol.* 98, 503-517.
- Stewart, D.E. y Farmer, F.H., (1984). *Limnol. Oceanogr.* 29, 392-397.
- Surewicz, W.K. y Mantsch, H.H. (1988) *B.B.A.* 952, 115-130.
- Susy, H. y Byler, M. (1986) *Meth. Enzym.* 130, 290-311.
- Stryer, L. y Glazer, A.N. United States Patent (1983); GOIN 33/52; GOIN 33/54; 436/536;

436/537.

- Stryer, L. y Glazer, A.N. United States Patent (1985), GO1n 33/54; GO1N 31/00; 436/501; 436:346.
- Stryer, L., Glazer, A.N. y Oi, V. United States Patent (1985) GO1N 33/54; GO1N 31/00, 436/501: 436/546.
- Svedberg, T. y Lewis, N.D., (1928). *J. Am. chem. Soc.* 50, 525-536.
- Svedberg, T. y Katsurai, T., (1929). *J. Am. chem. Soc.* 50, 3573.
- Svedberg, T. y Erikson, I.B., (1932). *J. Am. chem. Soc.* 54, 3998-4010.
- Swanson, R.V. y Glazer, A.N. (1990) *Analytical Biochemistry* 188, 295-299.
- Swanson, R.V., Ong, L., Wilbanks, S. y Glazer, A.N. (1991) *The Journal of Biological Chemistry* 266, 9528-9534.
- Switalski, S.L. y Sauer, K. (1984) *Photochem. Photobiol.* 40, 423-427.
- Talavera, E.M., Alvarez, J.M., Ballesteros, L.M. y Bermejo, R. (1997) *Applied Spectroscopy* 51, 122-127.
- Tamiya, H. (1957) *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 8, 309-334.
- Tandeau de Marsac, N. y Cohen-Bazire, G., (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1635-1639.
- Teale, W.J. y Dale, R.E. (1970) *Biochem. J.* 116, 161-169.
- Terstappen, L.W.M.M., Loken, R.M. y Shah, V.O., (Patent), Becton, Dickinson and Co., European Pat. Appl., EP 347039 A2, USA, (Cl. GOIN-033-58A, CI2Q-001/02B, GOIN-021/75B, GOIN-033/569, GOIN-033/577), (1989); 14 pp.
- Turro, N.J., Grätzel, M. y Braum, A.M. (1980) *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 19, 675-696.
- Valpuerta, J.M., Goñi, F.M., Alonso, A., Arrondo, J.L.R. y Macarulla, J.M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 42, 541-352.
- Venkataraman, L.V. y Becker, E.W. (1985) *Biotechnology and utilization of algae*, Sharada Press, 114-115.
- Waks, M. (1986) *Protein Struct. Funct. Genet.* 1, 4-15.
- Wells, M.A. (1974) *Biochemistry* 13, 4937.
- Wemmer, D.E., Wedemayer, T. y Glazer, A.N. (1993) *The Journal of Biological Chemistry*, vol 268, 3, 1658-1669.
- Wever, B.H. y Goodkin, P.E. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 489.
- Wever, P. (1991) *Adv. Prot. Chem.* 41, 1-36.
- Wold, F. (1972) *Methods Enzymol* 25B, 623-651.
- Wolfgang, R. y Werner, W., (1988). *Arch. Microbiol.* 150, 534-540.

- Wuthrich, K. (1989) *Science* 243, 45-50.
- Xia, A.D., Zhu, J.C., Jiang, L.J., Li, D.J. y Zhang, X.Y. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179, 558-564.
- Yamanaka, G., Glazer, A.N. y Willians, R.C., (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 11004.
- Yeh, S.W., Glazer, A.N. y Clark, J.H. (1986) *The Journal of Biological Chemistry*, vol 90, 19, 4578-4580.
- Yguerabide, J., Talavera, E.M., Alvarez, J.M. y Afkir, M. (1997) *Anal. Biochem.* En prensa.
- Yonath, A., Mussig, J. y Witlmann, H.G. (1982) *Journal of Cell Biochem.* 19, 145.
- Zeppezauer, M. y Zeppezauer, E. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 564.
- Zickendraht-Wendelstadt, B., Friedrich, J. y Rüdiger, W., (1980). *Photochem. Photobiol.*, 31, 367.
- Zilinskas, B.A., Zimmerman, B.K. y Gantt, E., (1978). *Photochem. Photobiol.* 27, 587-595.
- Zilinskas, B.A., Grabowski, J. y Campbell, S. (1984). *In advances in photosynthesis.* 2,687.
- Zulauf, M. y Eicke, H.F. (1979) *J. Phys. Chem.* 83, 480.