



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Sondas Luminiscentes para Microscopía.
Modulación de sus propiedades ópticas y
marcación específica de biomoléculas.**

Carla Cecilia Spagnuolo

Director de tesis
Dra. Elizabeth A. Jares-Erijman

Lugar de Trabajo
Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

2007

A Pablo y Lucila

Agradecimientos

A mi Directora de Tesis, Elizabeth Jares-Erijman, por recibirme en su grupo, confiarme el proyecto y sobre todo, por su permanente optimismo, estímulo y libertad en el trabajo diario. También, por procurar un grupo de trabajo de total compañerismo, solidaridad e igualdad de oportunidades.

A María Etchehón por su apoyo incondicional, su ayuda desinteresada y por traer alegría todos los días.

A Luciana Giordano por sus consejos y por enriquecerme con su amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Ely G., Sandra, Guille, Tami, Vicky, Jenny, los mas nuevitos y todos los que pasaron, por aguantar mis manías y por todos los días que compartimos en el laboratorio, las risas, los mates, las catarsis y el apoyo mutuo permanente.

A mis compañeras del segundo piso, Ely Garfinkel, por su ayuda y sus consejos y a Sandra Miskoski, por las sugerencias y correcciones al revisar este manuscrito y su ayuda en los experimentos fotoquímicos.

A Tom Jovin, por recibirme en su grupo del Instituto Max Planck (Göttingen, Alemania) en las dos estadías que realicé allí, y por su generosidad y sus valiosas enseñanzas. También por leer la tesis. También a toda la gente que forma parte del grupo por la ayuda recibida.

A mis compañeros de Orgánica: Diego, Andrea, Olga, Javier, Fernando, Lorena, Romina, Verónica, Pablo, Florencia, Laura, Isabel, Lucía y Eleonora, por la terapia grupal en los pasillos y los turnos de laboratorio compartidos.

A Ma. Julia Roberti por su ayuda con el microscopio en Alemania y por los ensayos con la α -sinucleína.

A Donna Arndt-Jovin por enseñarme a trabajar con las células y el microscopio mientras estuve en Alemania.

A Rolf Vermeij por sus ideas para enriquecer mi trabajo.

Al Dr. Walter Massad y al Dr. Norman García, de la Univ. Nac. de Río Cuarto, Córdoba. por realizar los experimentos de flash fotólisis.

Al Dr. Juan Llopis y su grupo, de la Univ. de Castilla-La Mancha, España, por los experimentos de FLIM.

A la Dra. Gertrude Bunt, del Inst. Max Planck de Medicina Experimental, Göttingen, Alemania, por los experimentos en células vivas con las sondas tioéster.

Al Dr. Pedro Aramendía por facilitarme el uso del fluorómetro y filtros varios.

A la Universidad de Buenos Aires por la Beca Doctoral.

A Maripí, Olga, Sergio y Mabel por su colaboración siempre.

A Jorge Palermo por enseñarme y darme un lugar en su grupo mientras era estudiante.

A la SECyT por financiar los viajes a Alemania.

Al Dpto. de Química Orgánica de la Universidad de Göttingen por los espectros de masa.

A mis amigos de la carrera, Ignacio, Laura, Eva y Javier, Diego, Gustavo, Karina y Mario, por las horas de estudio, de trabajo y de celebración que compartimos.

A mis padres, Marisa y César, por el amor y el apoyo de siempre.

A mis hermanos Paula y Guido, mis sobrinos Renzo y Victoria, a mis tíos Tessie y Ricky, mis primos Luisma y Francisco, mis cuñados Adrián, Moni, Fer y Dani, mis suegros Adriana y Roberto y mis abuelos postizos, Dora y Carlos.

A mi abuelita Josefa que es mi ejemplo en todo y es la luz de mis ojos. Y a mi abuela Carmen que está siempre en mi corazón.

Finalmente, a Pablo, a quien amo y admiro profundamente, y que me alentó y me guió todos estos años y de quien nunca dejo de aprender. Por su honestidad, su amor, su compañerismo y por ser un gran padre para Lucila.

A mi hijita Lucila por acompañarme pacientemente desde su cunita en el tramo final de la tesis.

Esta Tesis comprende dos objetivos fundamentales: uno es el desarrollo de sondas fluorescentes para marcación específica de proteínas y el segundo es el control de las propiedades ópticas de nanopartículas luminiscentes para lograr la detección específica de biomoléculas de interés y su seguimiento en el tiempo por microscopía de fluorescencia. El desarrollo de sondas para marcación específica se llevó adelante por dos estrategias: una involucró compuestos biarsenicados y la segunda la síntesis de compuestos con grupos tioéster.

Se prepararon dos nuevas sondas de la familia de los fluoresceinditioarseniato (FLAsH), con propiedades espectroscópicas mejoradas en comparación con las previamente descritas, destinadas a su aplicación en la metodología sonda biarsenicada-motivo tetracisteína. Como parte del diseño de estas sondas, se estudió la fotoquímica de los fluoróforos precursores con espectrometría UV-vis y fotólisis de destello. Se realizó una completa caracterización espectroscópica de los complejos sonda-péptido así como también se estudió la cinética de la reacción de marcación *in vitro* en un sistema modelo y se analizó la fotoestabilidad del mismo. Por otra parte, se estudió la eficiencia de estos compuestos como donantes del proceso de transferencia de energía con aceptores fotocromicos (pcFRET) y se evaluó la marcación específica en distintos sistemas *in vivo*, a través de técnicas de microscopía de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal (FLIM).

Se obtuvieron también distintas sondas derivadas de tioésteres para su aplicación en la metodología de marcación que utiliza la reacción de unión química nativa (NCLR, native chemical ligation reaction). Se estudió la viabilidad de la marcación *in vitro* por esta técnica utilizando un péptido modelo. La aplicación de estos compuestos en un sistema *in vivo* permitió evaluar esta estrategia de marcación específica por primera vez en células eucariotas vivas.

Por último, se trabajó en el control de las propiedades ópticas de las nanopartículas fluorescentes Quantum dots, con la metodología de pcFRET. Se obtuvieron resultados exitosos en los experimentos por espectroscopía así como también, por microscopía.

Palabras clave: sondas biarsenicadas; fluoróforo; pcFRET; nanopartículas; tioéster

This Thesis concerns the development of luminiscent probes for specific targeting of proteins and for time resolved tracking of biomolecules in the fluorescence microscope. The first group of probes was based on two strategies, namely bisarsenical derivatives of fluorescein and thioester fluorophores. The second group involved the modulation of the luminescence of Quantum dots with photochromic acceptors for FRET.

Two novel probes from the dithioarsenatefluorescein (FLAsH) family were prepared, resulting in improved spectroscopic properties as compared with previously reported compounds. A spectroscopic characterization of the peptide-probe complex was developed, as well as, a kinetic and photostability study of the reaction involved in the *in vitro* labelling of a model system. On the other hand, the efficiency of these compounds as pcFRET donors was studied in acceptor-donor pairs involving diheteroarylethenes developed in our laboratory. Specific labelling of different *in vivo* systems was studied with these molecules through steady-state and time-resolved fluorescence microscopy (FLIM). The photochemistry of the parent fluorophores was characterized through UV-vis spectroscopy and flash photolysis techniques.

Different thioester based probes were also prepared for their application in NCLR (native chemical ligation reaction) labelling. *In vitro* labelling viability was tested by using a model peptide. For the first time, *in vivo* labelling in eucariotic cells was performed with these probes.

Finally, modulation of the optical properties of semiconductor nanoparticles (Quantum Dots) was performed by attaching photochromic compounds to the polymeric surface of the nanoparticles and carrying out pcFRET experiments. Modulation of the emission was succesfully observed by spectroscopy and microscopy.

Keywords: bisarsenicals probes; fluorophores; pcFRET; nanoparticles; thioester

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

REACTIVOS Y SOLVENTES:

2-ME	2-mercaptoetanol
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
BAL	2,3-dimercaptopropanol
Biotina	ácido 5-(2-oxohexahidro-1H-tien[3,4d] imidazol-4-il)pentanoico
Boc	<i>ter</i> -butoxicarbonilo
Boc ₂ O	di- <i>ter</i> -butildicarbonato
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DIPEA	diisopropiletilamina
DMF	dimetilformamida
DMPS	ácido 2,3-dimercapto-1-propansulfónico
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDC	1-etil-3,3-(dimetilaminopropil)carbodiimida
EDT	1,2-etanoditiol
EtOH	etanol
HEPES	ácido 4-(2-hidroxi)etil-1-piperazintansulfónico
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
MESNA	2-mercaptoetansulfonato de sodio
MES	ácido 2-mercaptoetansulfónico
NHS	N-hidroxisuccinimida
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidinona
PD	fenilendiamina
Pd(AcO) ₂	acetato de paladio (II)
Py	piridina
TCEP	tris(2-carboxi)etilfosfina
TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético
TFAA	anhidrido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano

OTRAS

aa	aminoácidos
CCD	Charge Coupled Device
CGRGDSP	cisteína-glicina-arginina-glicina-aspártico-serina-prolina
CIS	Configuration Interaction Single
Cys	Cisteína
DAE	diheteroarileno
DFT	Density Functional Theory
ϵ	coeficiente de extinción molar
EMAR	Espectroscopía de masa de alta resolución
ESI	Electrospray Ionization
f	fuerza del oscilador
Φ	rendimiento cuántico
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging
FRET	Transferencia de energía de resonancia
GFP	en inglés, proteína verde fluorescente
Gly	Glicina
HF	Hartree-Fock
HPLC	en inglés, cromatografía líquida de alta resolución
λ	longitud de onda
mCFP	en inglés, proteína ciano fluorescente monomérica
NCLR	Native Chemical Ligation Reaction
O ₂ (¹ Δ_g)	Oxígeno singlete
O ₂ (³ Σ_g)	Oxígeno fundamental o molecular
P12	péptido de secuencia FLNCCPGCCMEP (fenilalanina-leucina-cisteína-cisteína-prolina-glicina-cisteína-cisteína-metionina-glutámico-prolina)
P6	péptido de secuencia CCPGCC (cisteína-cisteína-prolina-glicina-cisteína-cisteína)
pcFRET	photochromic FRET
QD	Quantum dot
SCRf-PCM	Self Consistent Reaction Field-Polarized Continuum Model
τ	tiempo de vida media
t.a.	temperatura ambiente
TCSPC	Time Correlated Single Photon Counting
TDDFT	Time Dependent Density Functional Theory
TEV	tobacco etch virus

ÍNDICE

Introducción

1	Sondas fluorescentes	1
2	Marcación específica de biomoléculas	12
3	Objetivo General	17
4	Referencias	21

CAPÍTULO 1

Fluoróforos precursores

1.1	Fluorfluoresceínas: Síntesis y características espectroscópicas	23
1.2	Fotoestabilidad de las fluoresceínas fluoradas	30
1.3	Cálculo de los espectros de absorción y emisión de los fluoróforos	55
1.4	Conclusiones	64
1.5	Parte Experimental	65
1.5.1	Síntesis de los fluoróforos	65
1.5.2	Determinación de las propiedades espectroscópicas	70
1.5.3	Determinación de los rendimientos cuánticos de triplete	74
1.5.4	Fotoestabilidad	77
1.5.5	Fotólisis flash inducida por láser	78
1.5.6	Cálculos teóricos	82
1.6	Referencias	83

CAPÍTULO 2

Derivados Biarsenicados

2.1	Introducción: Antecedentes y Fundamentos	87
2.1.1	Compuestos Organoarsenicales	91
2.1.2	La secuencia peptídica	95

2.2	Derivados fluorados de FIAsh	96
2.2.1	Síntesis de FIAsh, F2FIAsh y F4FIAsh	98
2.3	Características espectroscópicas de las sondas biarsenicadas	103
2.3.1	Espectroscopía electrónica	103
2.3.2	Variación del espectro de absorción con el pH	110
2.3.3	Espectroscopía de fluorescencia	111
2.4	Marcación específica <i>in vitro</i>	116
2.4.1	Formación del complejo	116
2.4.2	Cinética de formación del complejo FIAsh-P12	119
2.5	Fotoestabilidad de FIAsh-P12, F2FIAsh-P12 y F4FIAsh-P12	125
2.6	Conclusiones	127
2.7	Parte Experimental	128
2.7.1	Síntesis de derivados biarsenicados	128
2.7.2	Mediciones de las propiedades espectroscópicas	133
2.7.3	Cálculos de los espectros de absorción	135
2.7.4	Marcación específica <i>in vitro</i>	136
2.7.5	Cinética de formación del complejo	136
2.7.6	Fotoestabilidad	137
2.8	Referencias	138

CAPÍTULO 3

Aplicaciones de FIAsh y derivados

3.1	Aplicación en transferencia de energía (FRET)	141
3.1.1	Transferencia de energía de resonancia (FRET)	141
3.1.2	Evaluación de FRET en el par F2FIAsh-F4FIAsh	145
3.1.3	Modulación de la fluorescencia del complejo FIAsh-P6 por pcFRET intermolecular	153
3.2	Marcación específica en células en cultivo	160
3.2.1	Estudios con α -sinucleína	160

3.2.1.1	Determinaciones <i>in vitro</i>	161
3.2.1.2	Medidas <i>in vivo</i> sobre la línea celular HeLa	164
3.2.2	Estudios de FLIM	168
3.3	Conclusiones	179
3.4	Parte Experimental	180
3.4.1	Experimento de FRET en el par F2FlAsH-F4FlAsH	180
3.4.2	Anisotropía de fluorescencia en el estado estacionario	182
3.4.3	Experimento de FRET intermolecular entre FlAsH y DAE	183
3.4.4	Determinaciones de FLIM en el microscopio	184
3.5	Referencias	187

CAPÍTULO 4

Sondas derivadas de tioésteres

4.1	Introducción	189
4.2	Sondas derivadas de bencilmercaptano	194
4.3	Estudios de marcación específica <i>in vitro</i>	201
4.4	Estudios de marcación específica <i>in vivo</i>	205
4.5	Conclusiones	211
4.6	Parte Experimental	211
4.6.1	Síntesis de sondas derivadas de tioésteres	211
4.6.2	Marcación específica <i>in vitro</i>	220
4.7	Referencias	222

CAPÍTULO 5

Nanopartículas fluorescentes: Quantum dots

5.1	Introducción	225
5.2	Quantum dots y transferencia de energía (FRET)	232
5.2.1	Espectros de emisión y anisotropía de QD605, QD585 y QD565	233
5.2.2	Quantum dots como donantes de FRET	237

5.3	Modulación de la fluorescencia de Quantum dots con aceptores fotocromicos	245
	5.3.1 Modulación de la fluorescencia del donante por espectroscopía	248
	5.3.2 Modulación de la fluorescencia del donante observada por microscopía de fluorescencia	251
5.4	Conclusiones	254
5.5	Parte Experimental	256
	5.5.1 Quantum dots como donantes de FRET	256
	5.5.2 pcFRET en el par QD565-DAE	258
5.6	Referencias	261
	Conclusión general	265

Introducción

1 SONDAS FLUORESCENTES

La *fluorescencia* es un tipo de fotoluminiscencia en el que la luz es emitida por las moléculas por un corto período de tiempo, luego de la absorción. Las moléculas que emiten fluorescencia se denominan *fluoróforos*, *fluorocromos* o *sondas fluorescentes*. Una sonda fluorescente es una molécula cuyas propiedades de fluorescencia permiten explorar y examinar la estructura y dinámica de un sistema. Hay cuatro parámetros fundamentales de una molécula fluorescente que brindan información útil: la intensidad de fluorescencia, la longitud de onda, el tiempo de vida de fluorescencia y la anisotropía.

- La *intensidad de fluorescencia* depende de Φ , el rendimiento cuántico de fluorescencia y de ϵ , el coeficiente de extinción molar.

- La *longitud de onda* de emisión, λ_f presenta un corrimiento hacia el rojo respecto del máximo de absorción que da idea de la polaridad local del fluoróforo y sirve como: indicador del pH local, enlaces de hidrógeno, reacciones del estado excitado y potencial eléctrico del sistema.

- El *tiempo de vida media de fluorescencia*, τ , es el promedio de tiempo que la molécula pasa en el estado excitado antes de emitir un fotón. Se expresa como:

$$\tau_f = \frac{1}{(k_f + \sum k_{nr})}$$

donde k_f y k_{nr} se refieren a procesos radiativos y no radiativos, respectivamente. El tiempo de decaimiento es una de las características más importantes de una molécula

fluorescente ya que define la ventana de observación de un fenómeno dinámico. La observación del tiempo de vida permite examinar uno o mas fluoróforos presentes en el mismo sistema o el mismo fluoróforo en diferentes sitios.

La mayoría de los fluoróforos que se utilizan para marcación de biomoléculas tienen valores de τ del orden de los nanosegundos.

La polarización de la emisión se describe en términos de la *anisotropía, r*. La anisotropía de fluorescencia se origina en la existencia de momentos de transición para la absorción y la emisión, que tienen direcciones específicas en la estructura de la molécula. Las mediciones de anisotropía revelan el desplazamiento angular del fluoróforo que ocurre entre la absorción y la emisión. Este desplazamiento angular depende de la velocidad y la rotación difusional durante el tiempo de vida del estado excitado, que a su vez dependen de la viscosidad del solvente y del tamaño y la forma de la molécula que rota.

Las moléculas fluorescentes que se utilizan como sondas en la investigación de sistemas biológicos, bioquímicos y físico-químicos se pueden clasificar en:

- *Sondas intrínsecas*: son el caso ideal ya que permiten observar un sistema sin perturbarlo químicamente. Existen muy pocos ejemplos, como ser, el triptofano, la tirosina y la fenilalanina de las proteínas. En especial, el triptofano, ha sido la sonda de elección para el estudio de la dinámica y función de proteínas individuales en solución. Absorbe entre 280-295 nm y emite a 350 nm en medio acuoso y es muy sensible a la polaridad del medio.

- *Sondas extrínsecas unidas covalentemente*: tienen la ventaja de que permiten conocer exactamente la localización de la molécula marcada.
- *Sondas extrínsecas asociadas*: se unen por interacciones específicas no covalentes a determinada región del sistema en estudio.

En cuanto a las aplicaciones biológicas, una propiedad fundamental que hay que tener en cuenta al elegir un fluoróforo, es la longitud de onda del máximo de excitación o absorción, especialmente cuando se quiere trabajar con material biológico *in vivo*. Aquellas sondas fluorescentes que requieran luz de excitación en la región del ultravioleta para producir fluorescencia en el visible, tienen problemas de interferencia en la señal debido a la autofluorescencia de componentes citoplasmáticos como flavinas, flavoproteínas y NADPH. En el caso de trabajar con material fijado, estos metabolitos dejan de ser un problema. Pero si se quiere realizar determinaciones *in vivo* entonces es conveniente utilizar aquellas sondas cuya emisión se ubique en el rojo del espectro.

Las sondas fluorescentes ofrecen una variedad de información en distintos campos de aplicación:

Tabla 1. Áreas de aplicación de las sondas fluorescentes¹

<i>Área</i>	<i>Información</i>
Polímeros	Dinámica de las cadenas; microviscosidad; volumen libre; orientación de las cadenas, miscibilidad; separación de fases, difusión de especies entre las redes; degradación.
Superficies sólida	Naturaleza de la superficie de sílica coloidal, zeolitas, sílica gel, vidrios porosos, alúmina; rigidez, polaridad y modificación de las superficies.
Soluciones surfactantes	Concentración micelar crítica (CMC); distribución de reactivos entre partículas; número de agregación del surfactante; propiedades de interfase y polaridad; dinámica de la solución.
Membranas biológicas	Fluidez; parámetros de orden, interacciones lípido-proteína, difusión translacional, accesibilidad a sitios, cambios estructurales, potenciales de membrana; efecto de aditivos; localización proteica; organización lateral y dinámica.
Vesículas	Caracterización de la bicapa; microviscosidad; parámetros de orden; transiciones de fase; efecto de aditivos; pH interno; permeabilidad.
Proteínas	Sitios de unión; desnaturalización; accesibilidad a sitios; dinámica; distancias; transiciones conformacionales.
Ácidos nucleicos	Flexibilidad, dinámica torsional, estructura de hélice; deformaciones, fotoclivajes; carcinogénesis.
Células vivas	Visualización de membranas, lípidos, proteínas, ADN, ARN, antígenos de superficie, glicoconjugados de superficie; dinámica de membrana; permeabilidad de membrana; potencial de membrana; pH intracelular; concentración de calcio, sodio, cloruro y protón citoplasmático; cambios redox; actividad enzimática; interacciones célula-célula y célula-virus; fusión de membranas, endocitosis; viabilidad; actividad citotóxica.

Idealmente, una sonda molecular fluorescente debe tener las siguientes propiedades:

- 1) alto coeficiente de extinción molar (ϵ) a la longitud de onda de excitación
- 2) alto rendimiento cuántico (Φ)
- 3) longitud de onda de excitación >500 nm y emisión en el rojo
- 4) alta fotoestabilidad
- 5) mínima perturbación del funcionamiento celular, organela o biomolécula blanco
- 6) baja fototoxicidad

Muy pocas sondas alcanzan todos estos requisitos pero muchas han demostrado ser muy útiles y han sido extensamente aplicadas (Fig. 1).

Como herramienta en microscopía, la fluorescencia tiene ventajas respecto de los métodos de absorción. Las sondas fluorescentes pueden ser excitadas y detectadas selectivamente en una mezcla compleja de especies, en un número muy pequeño e incluso a nivel de molécula individual.

Las técnicas de fluorescencia han sido ampliamente utilizadas para visualizar la biología de la células ya sea a nivel molecular como en organismos enteros. En particular, la microscopía de fluorescencia es desde hace varias décadas, la técnica más importante en el estudio de los procesos biológicos celulares. La obtención de imágenes sobre células vivas, solo puede llevarse a cabo por microscopía, ya que brinda la

resolución temporal y espacial necesarias para conocer la verdadera dinámica que tiene lugar en sistemas vivos.

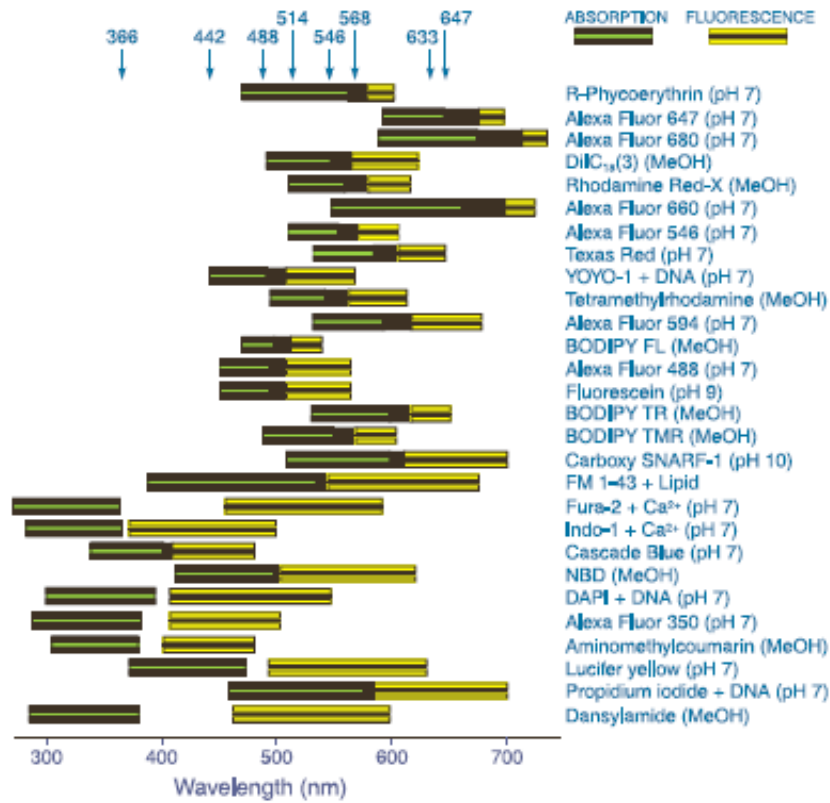


Figura 1. Rangos de absorción y fluorescencia para 28 fluoróforos de importancia práctica. Los fluoróforos están ordenados en forma vertical en orden decreciente de coeficiente de extinción molar (ϵ_{\max}). En el eje horizontal superior se indican algunas de las líneas de excitación mas importantes².

<i>Aplicaciones biológicas de la fluorescencia</i>
Secuenciación genómica
Interacciones proteicas
Hibridación <i>in situ</i>
Localización proteica
Movimiento proteico
Interacciones ADN-proteína
Interacciones droga-proteína
Interacciones droga-ADN

<i>Ventajas de la fluorescencia</i>
Alta sensibilidad (molécula individual)
Compatibilidad con biomoléculas y células
Resolución estructural ~nm
Resolución dinámica ~ns
Detección múltiple
Alternativa a las técnicas radiactivas

La marcación de proteínas con sondas fluorescentes o reactivos de afinidad ha facilitado la elucidación de la estructura, la dinámica y las interacciones proteína-proteína en estudios *in vitro*. La microscopía de inmunofluorescencia es la aplicación más común en biología celular. Esta técnica permite la detección de múltiples regiones en la misma célula por la unión específica de anticuerpos marcados con diferentes sondas de distintos colores. Sin embargo, la marcación de proteínas intracelulares a través de anticuerpos requiere la fijación celular y permeabilización. En la actualidad, existen distintos marcadores celulares, particularmente fluorescentes, que poseen

dimensiones moleculares adecuadas y que ofrecen la especificidad y sensibilidad que se requiere, incluso para estudios a nivel de molécula individual, y que son capaces de reconocer organelas, ácidos nucleicos y iones dentro de las células vivas.

Actualmente hay una gran variedad de compuestos comerciales que cubren un amplio rango de propiedades fluorescentes y cuentan además, con distintos grupos reactivos para la conjugación con biomoléculas a través de distintos tipos de uniones (Fig. 2). Los fluoróforos orgánicos pequeños (<1 kDa) están en continua evolución en cuanto a sus propiedades espectroscópicas, a través de la optimización de distintas variables como: extensión de la conjugación, aumento de la rigidez, introducción de átomos electroattractores o grupos cargados sobre su estructura, como flúor o sulfonatos.

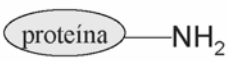
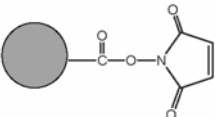
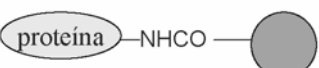

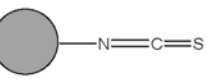
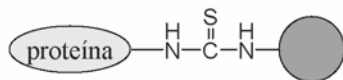

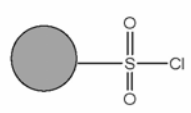
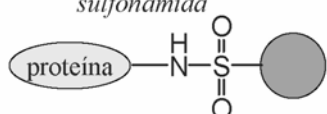
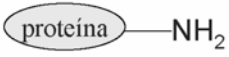
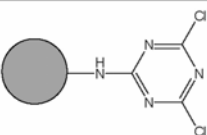
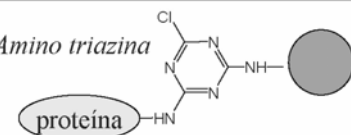

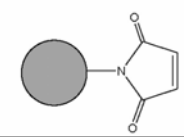
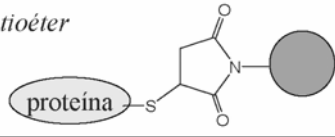
Proteína blanco	Marca reactiva	Unión	Sondas
		<p><i>amida</i></p> 	Fluoresceína Alexa Biotina Rodamina
		<p><i>tiourea</i></p> 	Fluoresceína Rodamina Oregon green
		<p><i>sulfonamida</i></p> 	Texas Red Rodamina B
		<p><i>Amino triazina</i></p> 	5-DTAF
		<p><i>tioéter</i></p> 	Biotina Alexa Fluoresceína Rodamina

Figura 2. Grupos reactivos y sondas utilizadas comúnmente en la marcación de proteínas

Además de los requisitos discutidos previamente, un fluoróforo que se utilice para marcación covalente debe cumplir también las siguientes propiedades:

1) reactividad y selectividad adecuadas. Si es demasiado reactivo, es probable que se hidrolice antes de marcar la molécula blanco. Solo algunos grupos funcionales tienen la reactividad justa: isotiocianatos, derivados de clorotriazina y ésteres succinimidilo, que reaccionan con los grupos $-NH_2$ libres. Esta funcionalidad es abundante naturalmente y por lo tanto este tipo de marcación es inespecífica. En general, estas reacciones se llevan a cabo a pH 8,5-9,0. Grupos como iodoacetamido y

maleimido² se utilizan para la marcación de grupos –SH. Estos grupos son menos abundantes y en general, cuando aparecen, son importantes para la función de la proteína. Pueden ser introducidos en proteínas mutantes para llevar adelante una marcación específica.

2) buena solubilidad en medio acuoso

3) baja sensibilidad frente a cambios en la polaridad y el pH del medio.

Las posibilidades van desde moléculas fluorescentes pequeñas, hasta las nanopartículas fluorescentes (Quantum dots), pasando por los anticuerpos marcados y las proteínas fluorescentes (Fig. 3).

Sin duda, es necesario el desarrollo de nuevas sondas, mas fotoestables y menos sensibles a cambios en el microentorno, para aprovechar aún más la versatilidad de técnicas poderosas como la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo. Sondas que pueden ser excitadas en la región del rojo o infrarrojo cercano serán muy valiosas ya que se está incrementando el uso de microscopios equipados con cámaras que pueden cuantificar la fluorescencia de seis a ocho sondas de diferente color en forma simultánea.

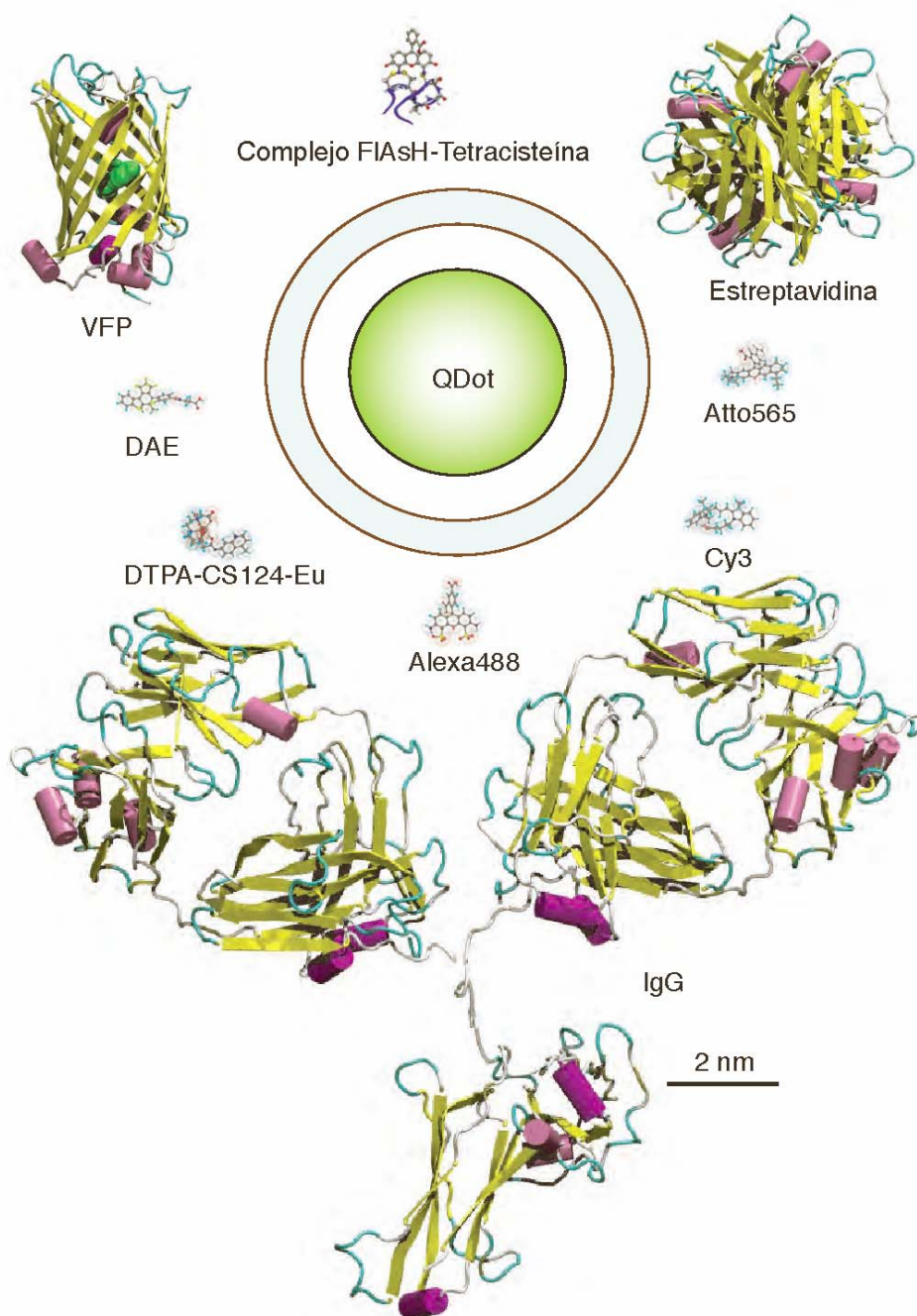


Figura 3. Tamaños comparativos de distintas moléculas y proteínas fluorescentes³. VFP (visible fluorescent protein), DAE (diheteroarileno), IgG (inmunoglobulina G), Alexa488, Atto565, Cy3 y DTPA-CS124-Eu son fluoróforos orgánicos de uso común³

También es importante poder controlar las propiedades ópticas de una sonda de manera que sea posible el seguimiento de la marcación en el tiempo, en células vivas.

2 MARCACIÓN ESPECÍFICA DE BIOMOLÉCULAS

La comprensión de ciertos procesos biológicos depende de la visualización y cuantificación de los eventos en el contexto celular. El análisis *in vitro* es una herramienta muy valiosa para la formulación de modelos que describan los mecanismos que operan en la célula viva. El estudio *in vivo* de estos mecanismos es esencial para la validación de los modelos propuestos y para el entendimiento de procesos adicionales que no pueden ser reproducidos *in vitro* debido a la ausencia de ciertos componentes participantes.

Los métodos tradicionales de marcación de proteínas son, en general, inadecuados para el estudio *in vivo*, ya que constan de pasos sucesivos de purificación de la proteína, marcación de la misma, repurificación y re inserción en la célula, por métodos invasivos, como la microinyección. Estas limitaciones, condujeron al desarrollo de distintas estrategias de marcación específica, de forma no invasiva, en células y tejidos vivos⁴. La marcación específica de sitio de biomoléculas con fluoróforos requiere de un cuidadoso control de la química de marcación, optimización de la reacción de marcación y una rigurosa caracterización de la biomolécula marcada en cuanto a la eficiencia de marcación, la especificidad y retención de la funcionalidad.

Uno de los métodos mas prominentes que ha surgido en los últimos años es el de las proteínas de fusión, la Proteína Verde Fluorescente (Fig. 4) (o GFP, *Green*

Fluorescent Protein) y sus variantes (VFP, *Visible Fluorescent Protein*). Originalmente obtenida a partir de la medusa *Aequorea victoria*⁵, es introducida genéticamente a la proteína de interés, de manera de detectarla por microscopía luego de la expresión del gen.

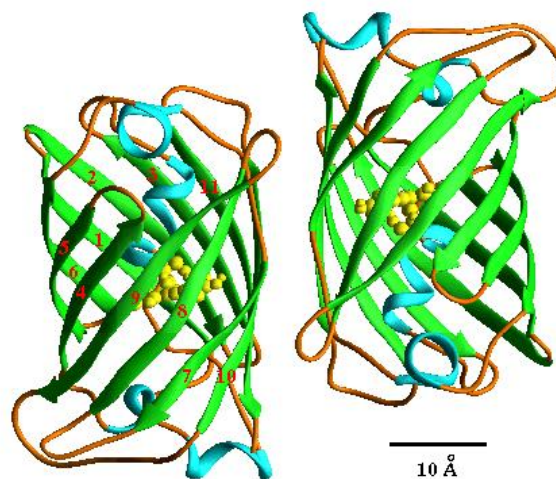


Figura 4. Estructura tridimensional de la GFP. Se observan 11 láminas β que forman un cilindro dentro del que se ubica una hélice α que contiene el cromóforo⁵

Dado que la GFP y la proteína de interés están unidas covalentemente generando una proteína de fusión, se elimina cualquier posibilidad de marcación no específica. Esta GFP tiene un peso molecular de ~ 27 kDa y es compacta. Su estructura contiene un único dominio, lo que facilita la fusión a una variedad de proteínas blanco, pero con cierta posibilidad de interferencia en la funcionalidad de las mismas, dependiendo de su tamaño. Esta metodología ha sido extremadamente útil para estudios *in vivo*, especialmente luego de la aparición de distintas variantes de la GFP que extendieron la paleta de colores.

Apuntando a la generación de proteínas de fusión, se realizaron distintas investigaciones para combinar estas proteínas de interés modificadas con sondas moleculares pequeñas. Éstas son más ventajosas ya que poseen menor impedimento estérico y mayores velocidades de marcación. Se ha intentado obtener sondas con alta fotoestabilidad, ya que esta característica, disminuída en las PF (proteínas fluorescentes), las hace inadecuadas para el estudio de una determinada función celular en el tiempo.

La estrategia general de una marcación específica *in vivo* se basa en la interacción entre un blanco introducido por ingeniería genética en la proteína de interés, ya sea un dominio, un receptor o una secuencia peptídica, y una molécula pequeña que puede ser un fluoróforo solo o unido a un ligando sintético del receptor que se ha utilizado (Figura 5).

El éxito de la marcación depende de cuán específico sea el reconocimiento entre el sitio y la sonda, y de las posibles alteraciones que ejerza la sonda en la función celular de la proteína. En la célula, la interacción entre la sonda y el sitio, debe ser lo suficientemente quimioselectiva como para competir con otras proteínas citoplasmáticas, ADN, ARN, carbohidratos y otras moléculas pequeñas.

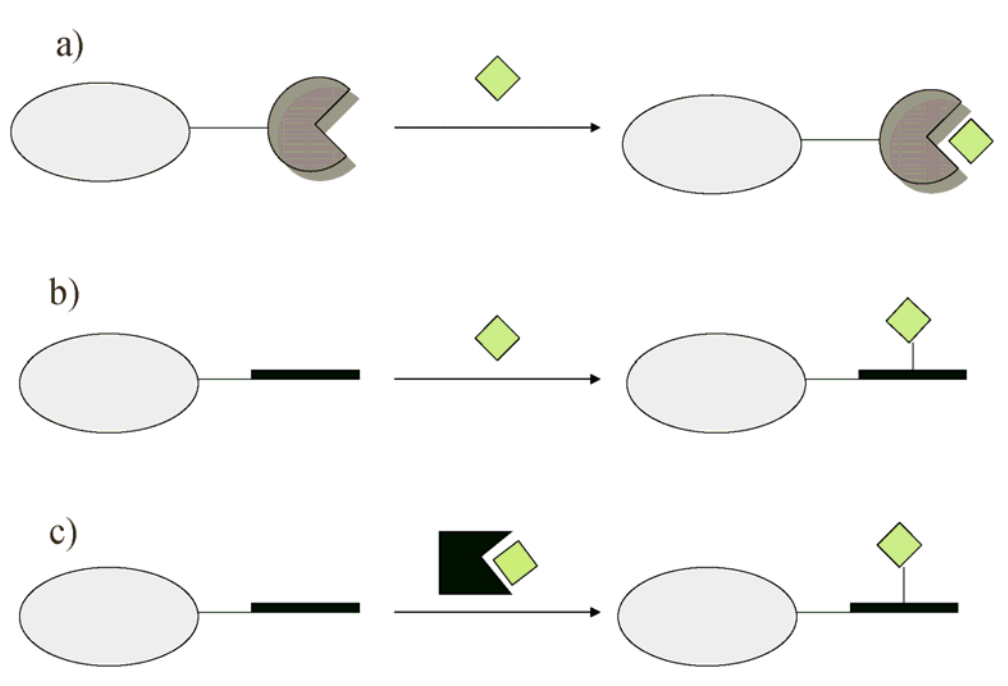


Figura 5. Estrategias para la marcación específica de sitio con moléculas pequeñas en células vivas. a) la proteína de interés es expresada con una proteína de fusión que se une covalente o no covalentemente a la sonda; b) la proteína de interés es expresada con un péptido de fusión que se une a la sonda; c) el péptido de fusión se une a la sonda por mediación enzimática.

El sitio receptor, es idealmente, una secuencia peptídica pequeña que pueda ser incorporada a la proteína, incluso en varias posiciones de la misma. La sonda molecular debe unirse selectivamente a este sitio de forma estable, a fin de permitir el estudio del proceso por varias horas. Es deseable también, que la interacción sitio-sonda tenga una cinética rápida.

Los procesos celulares que se pueden estudiar con las distintas técnicas de marcación específicas de blancos generados por fusión genética son numerosas. Algunos ejemplos relevantes son: expresión y actividad, localización, difusión y

transporte, cambios conformacionales, interacciones proteínas-proteína, síntesis proteica, manipulación de la actividad. En muchos de estos estudios se requiere la marcación ortogonal de varias proteínas con diferentes colores en forma simultánea. Por ejemplo, cuando se utilizan técnicas basadas en transferencia de energía entre dos fluoróforos (Fig. 6).

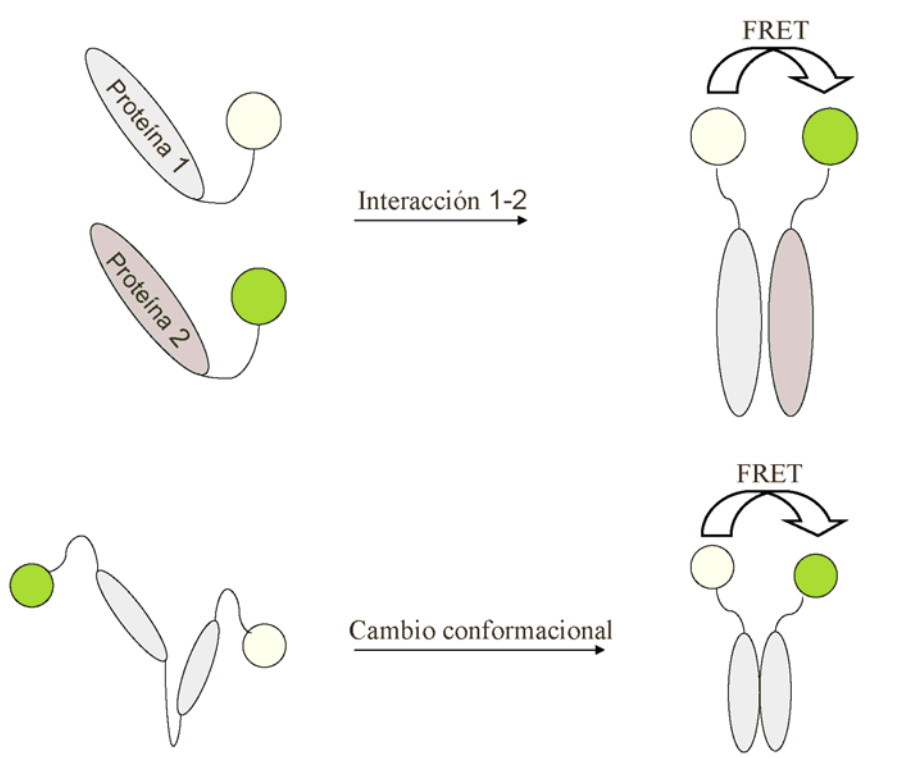


Figura 6. Diseño general para el estudio de interacciones entre proteínas y cambios conformacionales por transferencia de energía (FRET) entre dos sondas diferentes introducidas por marcación específica de sitio

3 OBJETIVO GENERAL

El trabajo presentado en esta Tesis está enmarcado en un proyecto general de desarrollo de sondas especiales para microscopía de fluorescencia.

Dentro de este proyecto se encararon varios objetivos específicos:

a) desarrollo de métodos para marcación específica. Se trabajó con dos estrategias:

(i) marcación de una secuencia peptídica específica (CCPGCC) introducida por modificación genética en una proteína de interés, con una molécula fluorogénica (FAsH) derivada de la fluoresceína;

(ii) marcación específica sobre un residuo cisteína en el extremo amino terminal de la proteína de interés con moléculas pequeñas derivadas de tioésteres, a través de la reacción de unión química nativa (*NCLR, native chemical ligation reaction*).

b) control de las propiedades ópticas de nanopartículas fluorescentes (Quantum dots) con la técnica de pcFRET⁶

Primeramente, se decidió encarar la preparación de derivados fluorados de la familia de compuestos biarsenicados de fluoresceína (FAsH) (Fig. 7). Este tipo de compuestos pueden ser aplicados en la exitosa metodología de marcación específica introducida por Tsien y col.⁷ En esta técnica, se incorpora genéticamente a la proteína de interés un péptido blanco que contiene cuatro cisteínas dispuestas de manera tal que se unen con gran afinidad al reactivo arsenicado derivado de fluoresceína.

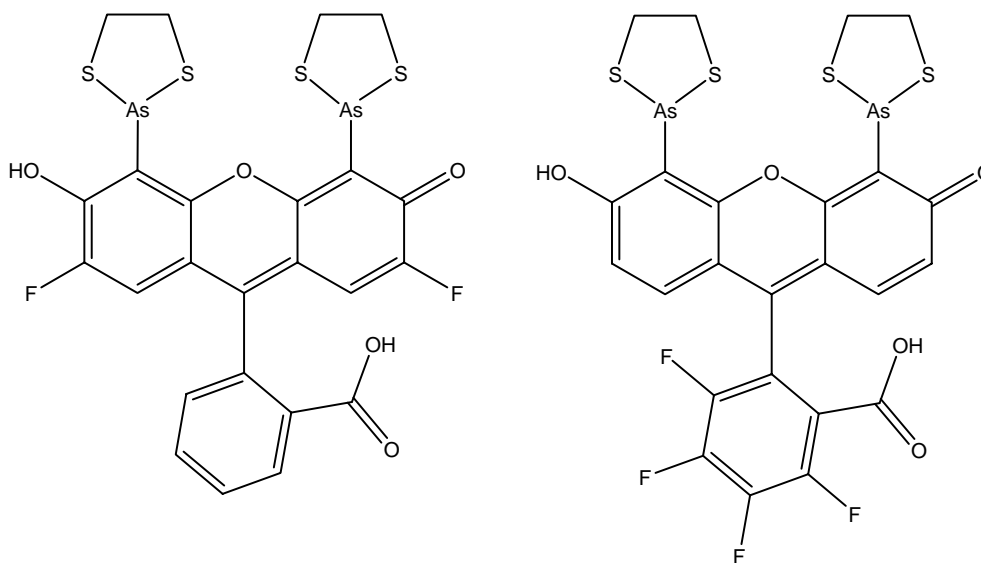


Figura 7. Nuevos derivados F2FlAsH-EDT₂ y F4FlAsH-EDT₂ para marcación específica de motivos tetracisteína

Este tipo de moléculas son permeables a la membrana y tienen la característica de volverse fuertemente fluorescentes una vez ocurrida la unión específica a una secuencia peptídica del tipo Cys-Cys-X-X-Cys-Cys. Por esta razón, se las llama *sondas fluorogénicas*. Esta característica es altamente deseable ya que minimiza la señal de fondo al no observarse el fluoróforo no unido. Esta estrategia de marcación es de aplicación reciente y ha contribuido en la elucidación de procesos significativos en la biología celular⁸⁻¹³.

Por ello, hemos considerado un desafío interesante la obtención de nuevas sondas de este tipo. Si bien, existe una colección de compuestos biarsenicados que abarca una buena parte del espectro visible¹⁴, encontramos promisorio la obtención de derivados fluorados de FlAsH, considerando la mejora en la fotoestabilidad y el

rendimiento cuántico que poseen las fluoresceínas fluoradas respecto de la fluoresceína, así como otras características, como una menor sensibilidad al pH en el rango fisiológico. Las propiedades de los fluoróforos precursores serán discutidas en el capítulo 1. En éste se discutirán aspectos de la síntesis de los mismos así como también sus características espectroscópicas.

Los derivados biarsenicados preparados para esta Tesis, han sido utilizados en el estudio de la proteína α -sinucleína, altamente relevante en la enfermedad de Parkinson¹⁵. La agregación *in vivo* de esta proteína ha sido detectada por primera vez, sobre constructos conteniendo el motivo tetracisteína marcados con estos compuestos biarsenicados.

Los antecedentes y fundamentos de esta metodología de marcación específica, las generalidades de la síntesis de los derivados biarsenicados, su caracterización fotofísica y la interpretación de las mismas a través de métodos de cálculo, serán tratados en el capítulo 2. También se discuten en este capítulo aspectos relevantes de la metodología de marcación y la determinación de la cinética de formación del complejo fluorescente sonda-péptido. Se incluyen, finalmente, los estudios realizados sobre la fotoestabilidad de las nuevas sondas. Otros estudios relevantes como la aplicación de las nuevas sondas en transferencia de energía (FRET) y su evaluación en sistemas biológicos, *in vitro* e *in vivo*, serán tratados en el capítulo 3.

Otra estrategia interesante de marcación específica de tipo covalente se basa en la reacción de unión química nativa (*Native Chemical Ligation Reaction*, NCLR)¹⁶. Por distintos mecanismos que explicaremos mas adelante, se puede obtener una cisteína en

el extremo N-terminal de la proteína de interés, que funciona como sitio de unión sobre el cual reacciona específicamente, vía transtioesterificación, una sonda funcionalizada con un tioéster (Fig. 8).

De esta manera, se obtiene una marcación covalente a través de un enlace peptídico, el cuál es suficientemente estable como para permitir la observación de la marca por períodos prolongados. Hemos preparado un conjunto de compuestos con esta función tioéster los cuales han sido utilizados en el estudio de una nueva estrategia de expresión que apunta a minimizar el tamaño requerido en la secuencia peptídica blanco. La aplicación de estos compuestos permitieron evaluar la eficiencia del método aplicado por primera vez en células eucariotas vivas. Los estudios concernientes a esta parte del trabajo de Tesis, serán desarrollados en el capítulo 4.

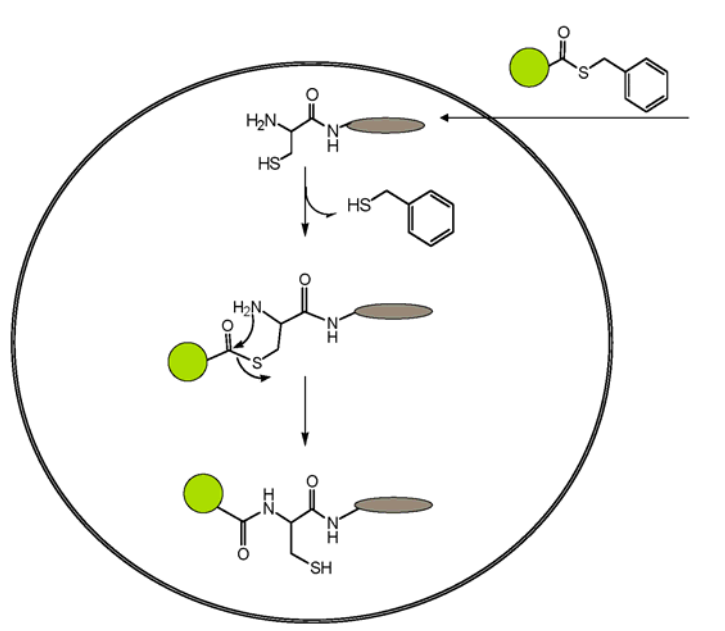


Figura 8. Reacción quimioselectiva entre una sonda derivada de tioéster y una cisteína en el extremo N-terminal de la proteína blanco dentro de la célula

Por último, en el capítulo 5, se discutirán los resultados obtenidos en base a estudios sobre *Quantum Dots (QD)* o nanopartículas fluorescentes. Dentro de las llamadas *nanoherramientas*, estos cristales semiconductores resultan muy atractivos debido a sus características espectrales: amplio rango de excitación y angosto rango de emisión, fotoestabilidad, brillo, bioconjugabilidad, etc. En el marco de un estudio integral sobre las propiedades fotofísicas de esta nanopartículas¹⁷ en solución y en células vivas, hemos estudiado la eficiencia de los QDs como donores en el proceso de transferencia de energía de Förster (FRET). Asimismo, hemos demostrado que la emisión de los QDs puede ser modulada a través de un interruptor fotocromico (DAE), conjugado directa o indirectamente a la nanopartícula.

Finalmente, se discutirán las conclusiones generales y perspectivas que este trabajo ha generado. Con el mismo, hemos pretendido establecer una línea de investigación en nuestro laboratorio que apunte a la innovación en el área de la marcación específica y nanotecnología, fusionando los conocimientos y logros de la química orgánica con los de la biología celular y espectroscopía.

4 REFERENCIAS

1. Valeur B. *Molecular fluorescence: Principles and applications*. 2002, Wiley-VCH. Weinheim.
2. Haugland R.P. *Handbook of fluorescent probes and research products*. 2002, 9th, Molecular Probes. Eugene, OR.
3. Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1387-1395.

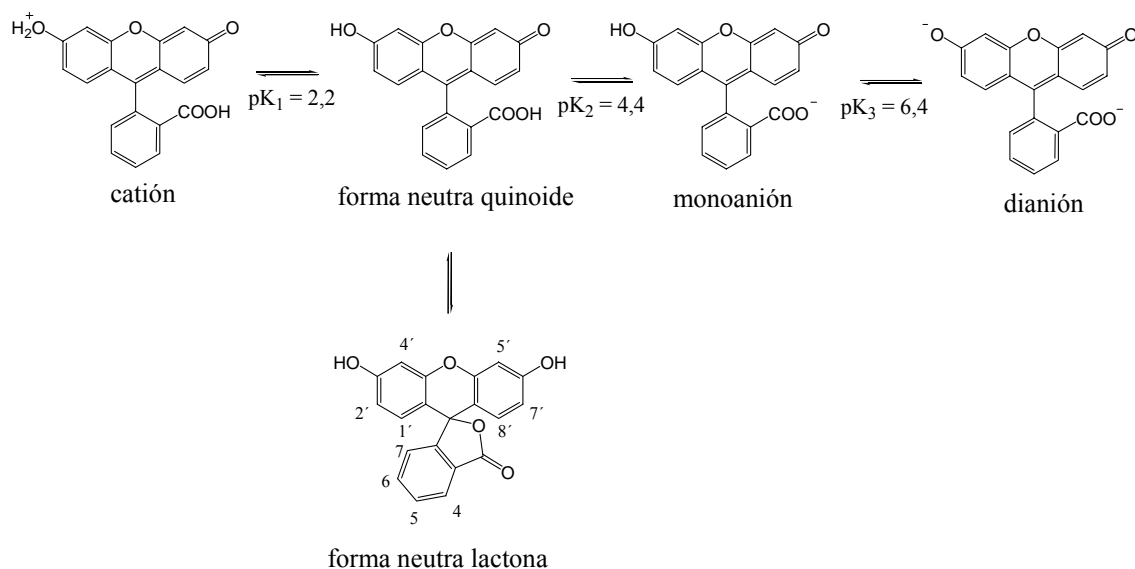
4. Chen I., Ting A.I. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005, 16, 35-40.
5. Tsien R.Y. *Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67, 509-544.
6. Giordano L., Jovin T. M., Irie M., Jares-Erijman E. A. *J.Am.Chem.Soc.* 2002, 124, 7481-7490.
7. Griffin B.A., Adams S.R., Tsien A.R. *Science.* 1998, 281, 269-272.
8. Gaietta G., Deerinck T.J., Adams S.R., Bouwer J., Tour O., Laird D.W., Sosinsky G.E., Tsien R.Y., Ellisman M.H. *Science.* 2002, 296, 503-507.
9. Ju W., Morishita W., Tsui J., Gaietta G., Deerinck T.J, Adams S.R., Garner C.C., Tsien R.Y., Ellisman M.H., Malenka R.C. *Nature Neuroscience.* 2004, 7, 244-253.
10. Panchal R.G., Ruthel G., Kenny T.A., Kallstrom G.H., Lane D., Badie S.S., Li L., Bavari S., Aman M.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100, 15936-15941.
11. Poskanzer K.E., Marek K.W., Sweeney S.T., Davis G.W. *Nature.* 2003, 426, 559-563.
12. Ignatova Z, Gierasch L.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101, 523-528.
13. Rice M.C., Czymbek K., Kmiec E.B. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 321-326.
14. Adams S.R., Campbell R.E., Gross L.A., Martin B.R., Walkup G.K., Yao Y., Llopis J., Tsien R.Y. *J.Am.Chem.Soc.* 2002, 124, 6063-6076.
15. Roberti M.J. Tesis Doctoral, *en preparación*. FCEN-UBA y MPI f. Biophysical Chemistry (Alemania).
16. Dawson P.E., Muir T.W., Clark-Lewis I., Kent S.B.H. *Science.* 1994, 266, 776-779.
17. Grecco H.E., Lidke K.A., Heintzmann R., Lidke D.S., Spagnuolo C., Martinez O.E., Jares-Eijman E.A., Jovin T.M. *Microsc. Res. Tech.* 2004, 65, 169-179.

CAPÍTULO 1
Fluoróforos precursores

1.1 FLUORFLUORESCÉINAS: SÍNTESIS Y CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS

La fluoresceína fue reportada por primera vez en 1871¹ y ha servido como punto de partida para el desarrollo de una variedad de derivados fluorescentes utilizados como sensores o sondas en técnicas de biología molecular, especialmente en experimentos que requieren de la unión covalente de la marca a péptidos, proteínas, nucleótidos y otras biomoléculas.

Esta molécula posee un elevado coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{491} = 88.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH=12)², excelente rendimiento cuántico de fluorescencia ($\Phi_f = 0,92$ en NaOH 0,01 M)³ y buena solubilidad en agua. Además, sus conjugados proteicos no son susceptibles a la precipitación. Sin embargo, posee algunas desventajas importantes. Una de ellas es su baja fotoestabilidad, sobre todo en sistemas de iluminación intensa como los que se usan en el microscopio confocal o en el citómetro de flujo, donde la fuente de excitación es generalmente la línea espectral de 488 nm del láser de argón. La fluoresceína sufre un rápido fotoblanqueo en estas condiciones⁴. Este fluoróforo existe en diferentes especies en medio acuoso (Fig. 1.1). Como consecuencia sus espectros de absorción y emisión son fuertemente dependientes del pH, como factor adicional no deseado. La forma neutra predomina como lactona en solventes orgánicos.



<i>pH</i>	λ/nm	$\epsilon/10^4 M^{-1} cm^{-1}$	<i>especie</i>
0	437	5,5	catión
3,3	437	1,6	neutra
5,5	455/475	3,0/3,1	monoanión
12	491	8,8	dianión

Figura 1.1. Equilibrios de protonación y ciclización de fluoresceína² dependientes del pH

Finalmente, es sabido que la fluorescencia de muchas sondas de alto rendimiento cuántico se ve disminuída en el bioconjugado⁵⁻⁷. Esto es debido a que las moléculas de fluoróforo se encuentran a distancias intermoleculares pequeñas entre sí en el bioconjugado, lo que equivale a una alta concentración local. Esto favorece la interacción de las moléculas de fluoróforo que conllevan a un apagamiento (“*quenching*”) de la emisión por distintos mecanismos. Por ejemplo, la formación de

dímeros no fluorescentes, transferencia de energía o de carga inducida por proximidad, etc.

El gran desarrollo de la química de los compuestos organofluorados que ha tenido lugar en los últimos años, posibilitó la introducción de átomos de flúor y sustituyentes fluorados, como $-CF_3$, en la estructura de varios colorantes orgánicos. Se obtuvieron así, compuestos con una marcada resistencia a la oxidación, a la acción de la luz y con interesantes variaciones en sus propiedades espectroscópicas⁸. Tal es el caso, por ejemplo, del derivado polifluorado de una tiocarbocianina (Fig. 1.2) reportada recientemente. En comparación con el análogo no fluorado, esta sonda exhibe un marcado aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia y mayor resistencia al fotoblanqueo⁹.

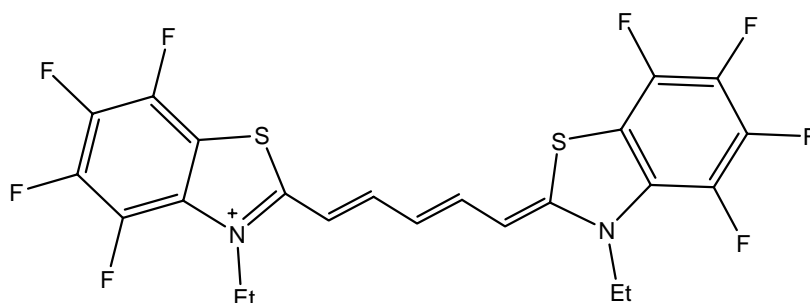
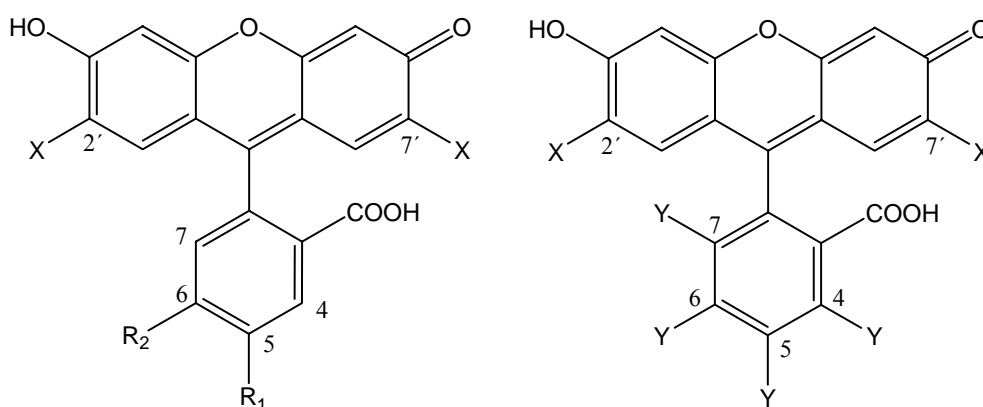


Figura 1.2. Derivado polifluorado de la tiocarbocianina⁹

Los análogos fluorados¹⁰ de la fluoresceína (Fig. 1.3) fueron reportados en 1997 resultaron ser una excelente alternativa ya que presentan una marcada resistencia a la fotodestrucción, altos rendimientos cuánticos de fluorescencia y una disminución en el

“quenching” de la emisión por conjugación con biomoléculas, incluso a elevados grados de marcación. Además, poseen menores valores de pKa, lo que hace que los espectros de absorción y emisión sean menos sensibles a los cambios de pH en el rango fisiológico.



1: X = H, R₁ = R₂ = H

2a: X = H, R₁ = COOH, R₂ = H

2b: X = H, R₁ = H, R₂ = COOH

3a: X = F, R₁ = COOH, R₂ = H

3b: X = F, R₁ = H, R₂ = COOH

4: X = F, Y = H

5: X = H, Y = F

6: X = Y = F

Compuesto	Abs/Em (nm)	Φ_f	pK _a (monoanión)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^a	Tiempo de vida media de fluorescencia (ns) ^b
1	490/514	0,92	6,5	90.000	4,07
2a,b	492/516	0,92	6,4	84.700	-
3a, b	492/516	0,92	4,8	85.900	-
4	490/514	0,97	4,8	82.400	4,02
5	508/527	0,85	6,1	85.600	4,13
6	508/527	0,96	4,5	82.200	4,26

(a) en buffer fosfato pH = 9¹⁰; (b) en buffer Hepes pH = 7,4 (determinados en esta tesis)

Figura 1.3. Estructura general y propiedades espectroscópicas de la fluoresceína y sus derivados fluorados

Como se puede ver en la tabla de la figura 1.3, existe un desplazamiento batocrómico de los máximos de absorción y emisión cuando los átomos de flúor se encuentran en las posiciones 4, 5, 6, 7 (compuestos **5** y **6**), mientras que tienen poca influencia cuando se hallan en las posiciones 2' y 7' (compuestos **1**, **2a,b**, **3a,b** y **4**).

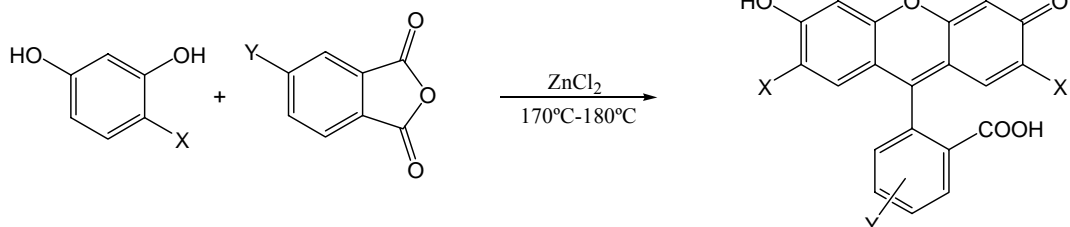
En base a estas características, decidimos utilizar estos compuestos como reactivos de partida para la obtención de nuevas sondas biarsenicadas para marcación específica de biomoléculas, que se detallará en el capítulo 2.

La síntesis de estos fluoróforos precursores se realizó por condensación de resorcinol o 4-fluororesorcinol con anhídrido ftálico, trimelítico o tetrafluoroftálico, según corresponda, en ácido metansulfónico como solvente y agente deshidratante, a alta temperatura¹⁰ (Fig. 1.4). Esta metodología, resulta más conveniente que la tradicional condensación catalizada con cloruro de zinc¹, ya que se obtienen rendimientos mayores en condiciones más moderadas. Las fluorfluoresceínas se obtuvieron de forma prácticamente cuantitativa y no se requirió de una purificación posterior. Los compuestos obtenidos fueron caracterizados por RMN-¹H y espectrometría de masa.

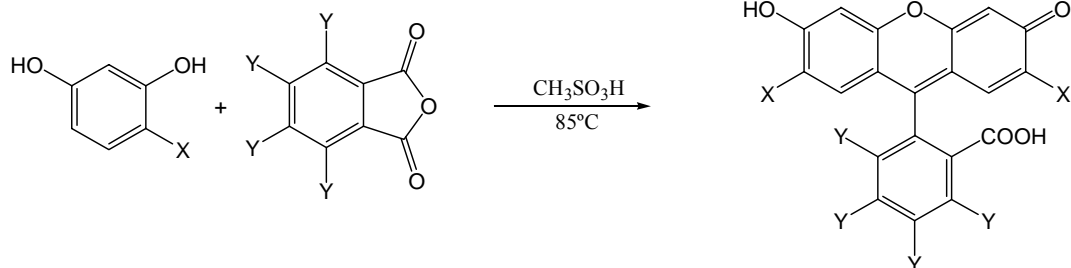
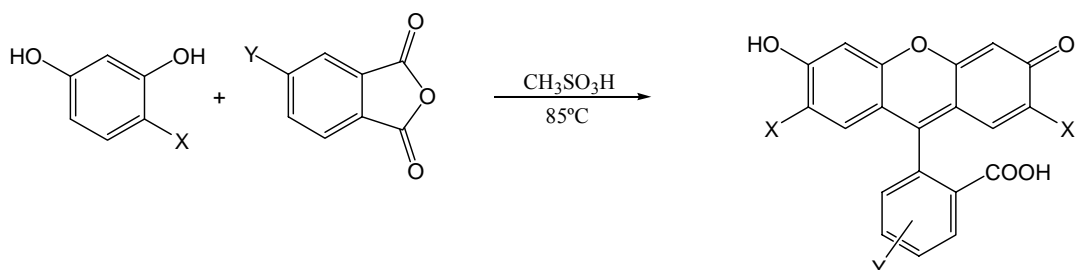
En trabajos recientes, se ha informado la obtención de colorantes tipo xanteno a través de un acoplamiento de Grignard entre xantonas y bromobenceno con distintos patrones de sustitución^{11,12} (Fig. 1.4). La ventaja de esta ruta sintética radica en la obtención de los isómeros puros con alto rendimiento, sobre todo en el caso de la síntesis de colorantes con la función -COOH en las posiciones 5 o 6. Esta funcionalidad

es necesaria para la aplicación de estos compuestos como marcadores covalentes a través de la formación de enlaces tipo amida con la biomolécula de interés.

Síntesis tradicional



Síntesis mejorada



Síntesis vía Grignard: obtención directa de isómeros puros

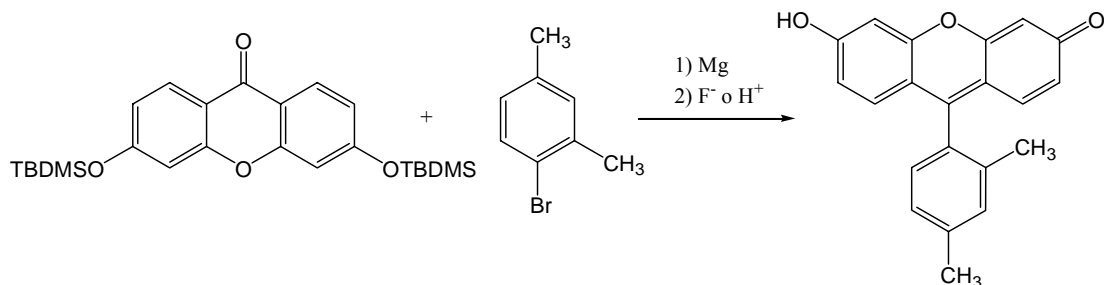


Figura 1.4. Principales rutas de obtención de fluoresceína y derivados^{1,10,11}.

X = H, F; Y = H, F, COOH

En los compuestos **5** y **6**, que poseen átomos de flúor en las posiciones 4, 5, 6 y 7, es posible realizar una posterior modificación (Fig. 1.5) por sustitución nucleofílica del flúor en la posición *para* del anillo benzoico, con diferentes nucleófilos como ácido tioglicólico o cisteamina, según conveniencia, en condiciones suaves y ausencia de base¹³. Con este procedimiento se puede obtener la funcionalidad deseada para realizar posteriores marcaciones.

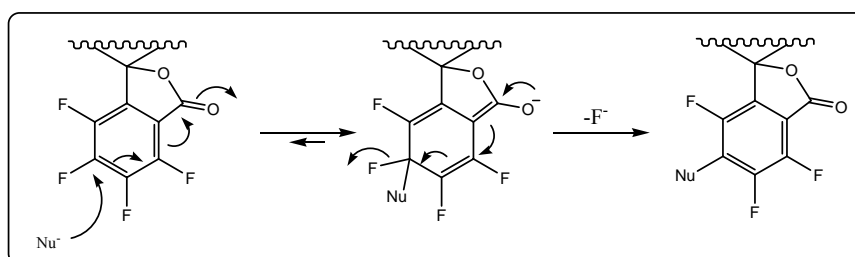
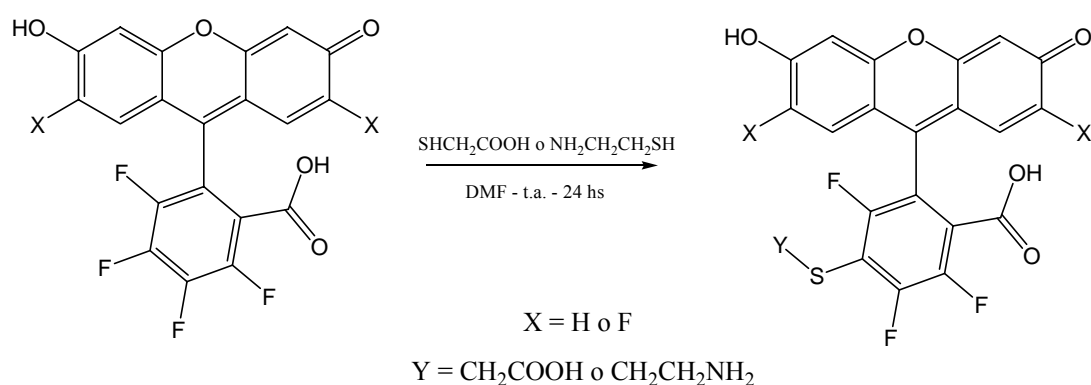


Figura 1.5. Derivatización de los compuestos **5** y **6**.

La introducción de átomos electro-atractores como el flúor, en la estructura de la fluoresceína, conduce a una disminución en los valores de pKa de la especie

monoaniónica. Esto resulta favorable para las aplicaciones biológicas ya que, a pH celular, predomina el dianión y disminuyen las variaciones espectroscópicas en el rango de pH fisiológico, 6,8-7,8. Esto es consecuencia de la fuerte acción electroattractora del flúor y el efecto es mayor cuando éste se encuentra en las posiciones 2' y 7'.

Sin embargo, no está claro de qué forma influyen estos átomos de flúor en el aumento de la fotoestabilidad. Para abordar este aspecto, realizamos una serie de experimentos que se discuten en la siguiente sección.

1.2 FOTOESTABILIDAD DE LAS FLUORESCÉINAS FLUORADAS

En el diagrama de la figura 1.6, S_0 , S^* y T^* representan el estado fundamental y los estados excitados singulete y triplete, respectivamente. Las moléculas absorben luz de excitación con una constante de velocidad k_{exc} y vuelven al estado fundamental por procesos radiativos (k_f , fluorescencia) y no radiativos (k_{nr}) con una constante de velocidad $k_d = k_f + k_{nr}$. También pueden sufrir un cruce entre sistemas (CIS, *Cruce Intersistemas*) con una constante de velocidad k_{CIS} hacia el estado excitado triplete, desde donde pueden retornar al estado fundamental con una constante de velocidad k_1 , que engloba procesos radiativos (fosforescencia) y no radiativos. También pueden sufrir una fotodestrucción irreversible generando productos de fotoblanqueo a una velocidad k_{fs} desde el estado S^* y a k_{ft} desde T^* .

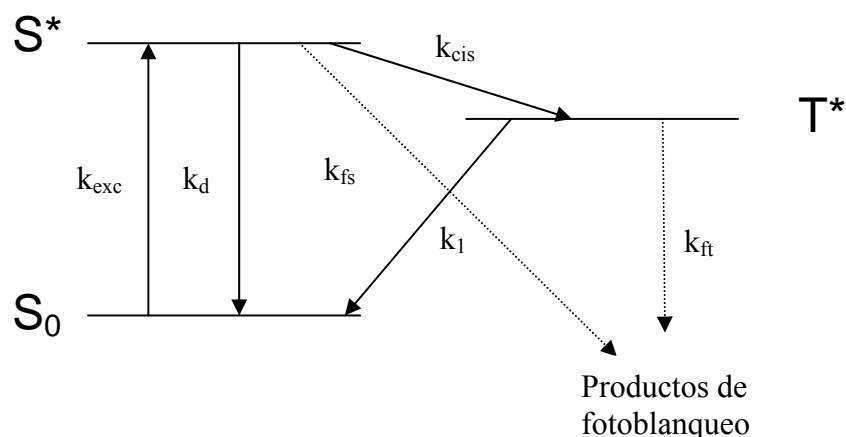


Figura 1.6. Diagrama de Jablonski de un fluoróforo. k_{exc} : excitación; $k_d = k_f + k_{nr}$, desactivación de S^* , k_{cis} : cruce intersistemas, k_1 : desactivación de T^* ; k_{ft} : fotoblanqueo desde T^* ; k_{fs} : fotoblanqueo desde S^* .

Por exposición de un fluoróforo a la luz de excitación de irradiancia H (Wcm^{-2}) y λ_{exc} (nm), la molécula absorbe un fotón de energía hc/λ_{exc} (h , constante de Planck, c , velocidad de la luz) y sufre una transición electrónica desde el estado fundamental S_0 al estado excitado S^* de mayor energía. La velocidad de absorción del fotón k_{exc} (s^{-1}) por parte de la molécula de fluoróforo con una sección eficaz de absorción σ_a (cm^2 molécula $^{-1}$), es directamente proporcional al flujo fotónico, ψ (fotones $cm^{-2} s^{-1}$), y por lo tanto a la irradiancia H , y a σ (cm^2 molécula $^{-1}$) (ec. 1.1).

$$k_{exc} = \sigma_a \left[H \cdot \frac{\lambda_{exc}}{hc} \right] \quad 1.1$$

La sección eficaz de absorción, σ , es un parámetro es muy usado en microscopía ya que corresponde la luz absorbida, especialmente en el caso de especímenes delgados donde es difícil especificar el camino óptico.

σ está relacionada con el coeficiente de absorción molar según⁴:

$$\sigma_a = 3,82 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^3 \text{ molL}^{-1} \text{ molec}^{-1} \cdot \epsilon(\lambda) \quad \mathbf{1.2}$$

con $[\epsilon] = \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, y representa la probabilidad de excitación de un fluoróforo bajo un flujo fotónico, ψ , de 1 fotón $\text{cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para la fluoresceína⁴, σ_a es $3,06 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2 \text{ moléc}^{-1}$ a 488 nm y $\text{pH} > 7$. El flujo fotónico ψ está relacionado con la irradiancia H (W cm^{-2}) y la longitud de onda, λ (nm):

$$\psi(\lambda) = 5,10^5 \cdot H \cdot \lambda \quad \mathbf{1.3}$$

La absorción es un proceso extremadamente rápido ($\sim 10^{-15}$ s) mientras que los distintos eventos que conducen a la molécula excitada de vuelta al estado fundamental pueden llevar entre 10^{-14} a varios segundos. El decaimiento es el efecto de los procesos (k_f , k_{nr} , k_{CIS}) que contribuyen a despoblar el estado excitado S^* luego de que la molécula se expone a la luz de excitación. El tiempo de vida, τ_S , del estado excitado S^* es la inversa de la suma de las constantes de velocidad de estos procesos y otros que estuvieran involucrados (como por ejemplo, transferencia de energía).

$$(\tau_S)^{-1} = \Sigma k = k_f + k_{nr} + k_{CIS} + \dots$$

Los fluoróforos orgánicos utilizados normalmente en microscopía tienen valores de τ en el rango 1-10 ns. El tiempo de vida del estado excitado es intrínseco de un fluoróforo en particular y no depende de la intensidad de excitación.

En cambio, durante un proceso de fotoblanqueo disminuye el número de moléculas en el estado fundamental por destrucción fotoquímica permanente, de manera que ya no pueden participar en los sucesivos ciclos de excitación-emisión.

La cinética de fotoblanqueo sí depende de la intensidad de excitación. Como consecuencia, el proceso se observa en la escala de tiempo de segundos a minutos cuando se utilizan lámparas de mercurio mientras que ocurre en el orden de los mili a microsegundos, cuando se utiliza un láser como fuente de excitación.

El fluoróforo puede ser considerado un catalizador fotofísico y el número de ciclos de activación y desactivación (el “turnover”) estará dado por el cociente de las constantes de velocidad para la emisión de fluorescencia, k_f , y para el proceso de fotoblanqueo, k_{fb} . (Fig. 1.7)¹⁴.

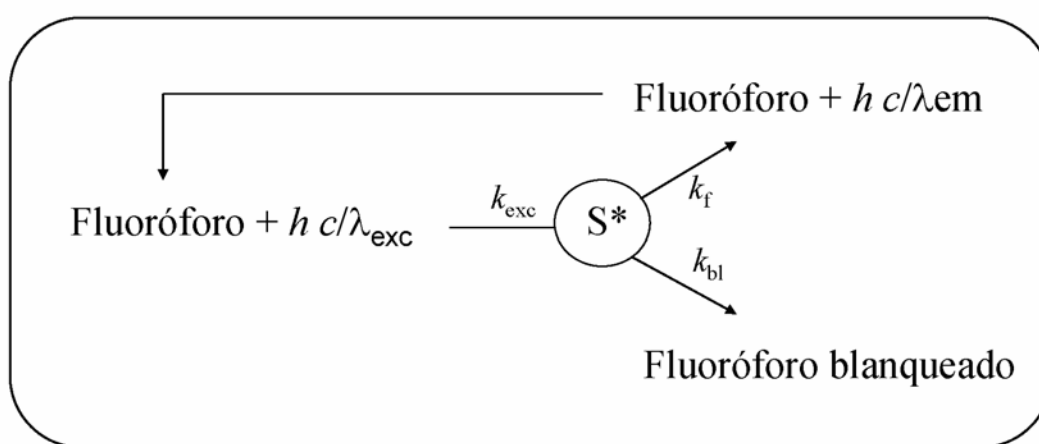


Figura 1.7. “turnover” de un fluoróforo como catalizador fotofísico¹⁴

En cualquier instante, la intensidad de fluorescencia I_f está relacionada con el producto de k_f y $[S^*]$ ($[S^*]$, concentración del estado excitado). En el estado estacionario de un sistema en el que no ocurre fotoblanqueo del fluoróforo, la relación entre el estado excitado y el estado fundamental está dada por:

$$\frac{S^*}{S_0} = \frac{k_{exc}}{\sum k} \quad 1.4$$

donde k_{exc} (s^{-1}) es la probabilidad de excitación por unidad de tiempo, $\sum k$ representa la suma de todas las constantes de desactivación al estado fundamental y es la inversa del tiempo de vida (τ).

Cuando la fuente de irradiación no es monocromática, σ se estima a partir de un valor promedio de la función de distribución espectral del flujo fotónico.

Como resultado del proceso de fotoblanqueo, la población total de fluoróforo (S_{tot}) decae desde su valor inicial (S_{tot}^0) según:

$$S_{tot}(t) = S_{tot}^0 \exp\left\{-\left[\frac{k_{fb}k_{exc}}{k_{fb} + \sum k}\right]t\right\} \quad 1.5$$

En un régimen de excitación de irradiancia moderada en el que $[S^*] < [S_0]$

$$I_f(t) \propto k_f \left(S_{tot}^0 \tau\right) (\Psi\sigma) \exp(-k_{fb} \tau \Psi\sigma t) \quad 1.6$$

donde el término de la exponencial ($-k_{fb} \tau \psi \sigma t$) corresponde a la $k_{observada}$ que se obtiene del ajuste de la curva experimental de fotoblanqueo, I_f en función del tiempo.

La resistencia a la fotodescomposición ha sido analizada para cada una de las fluorfluoresceínas sintetizadas en condiciones similares a las que serán utilizadas en los estudios de las sondas biarsenicadas para marcación específica (capítulos 2 y 3). Se utilizó un sistema de irradiación de alta potencia y soluciones de concentración 10 μ M preparadas en buffer HEPES 20 mM, pH 7,4. El fotoblanqueo se monitoreó en presencia de oxígeno, por la disminución de la emisión durante el tiempo de irradiación (Fig. 1.8). Se observó una mayor resistencia al fotoblanqueo en las fluoresceínas con átomos de flúor en su estructura. Los porcentajes de pérdida total de emisión de fluorescencia luego del tiempo total de irradiación (35 minutos) fueron: 7%, 10% y 3% para los compuestos **4**, **5** y **6**, respectivamente y 25% para la fluoresceína.

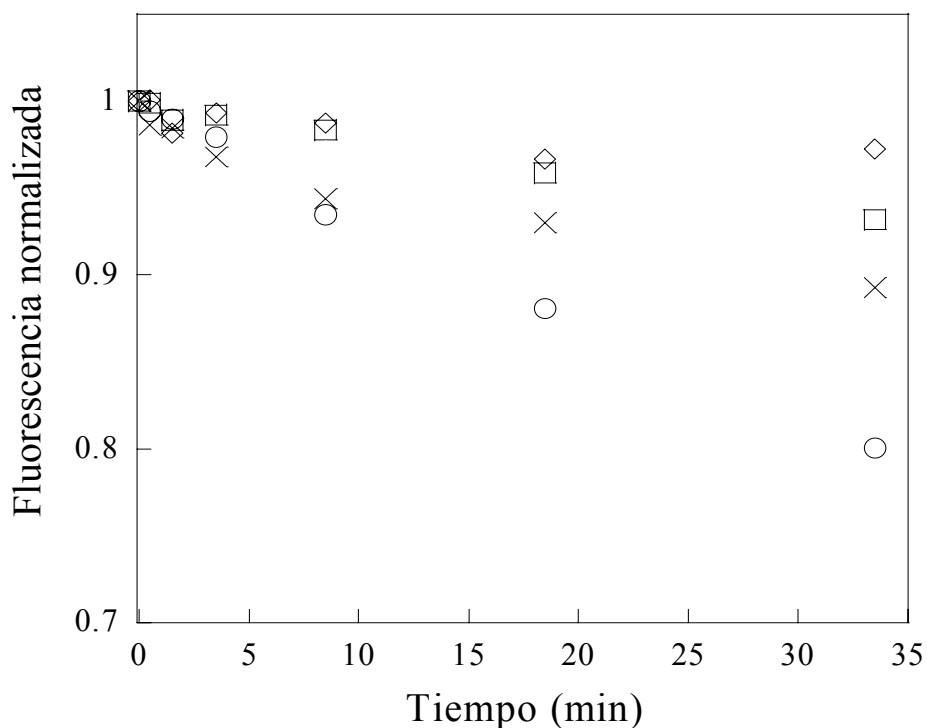


Figura 1.8. Fotoblanqueo de los compuestos **1**(○), **4**(□), **5**(×) y **6**(◇). Soluciones 10 μM en buffer HEPES 20 mM, pH = 7,4, en presencia de oxígeno.

Como se observa en la figura 1.8, los decaimientos de los fluoróforos son lineales en las condiciones del experimento, de manera que analizando directamente la pendiente de cada uno se obtiene una estimación de las velocidades relativas de fotoblanqueo.

Si bien existen varios trabajos en los que se utilizan estos fluoróforos aprovechando su fotoestabilidad, no se ha profundizado en este aspecto. Existen en literatura varios estudios sobre la fotoquímica de la fluoresceína^{2,15} en los cuales se muestran evidencias de que la actividad fotoquímica de la fluoresceína tiene lugar desde un estado triplete de tiempo de vida largo ($\sim\mu\text{s}$) aunque para la fluoresceína la

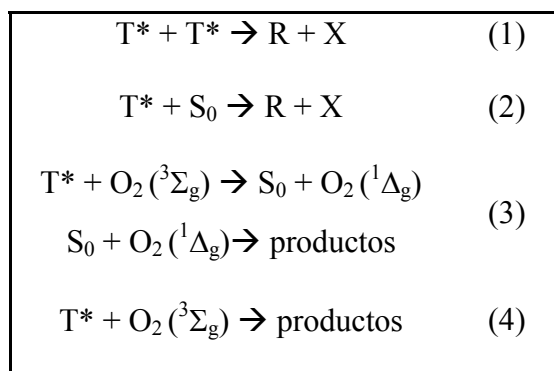
conversión $S^* \rightarrow T^*$ es baja ($\Phi_{\text{CIS}} \sim 0,032$)¹⁶. La absorción, emisión, rendimiento cuántico de fluorescencia y tiempos de vida media de fluorescencia de los derivados fluorados (tabla de la figura 1.3) son muy similares a los de la fluoresceína. Por lo tanto, los caminos de desactivación del estado excitado singulete no se ven mayormente afectados por la presencia de los átomos de flúor, por lo que se podría considerar que la diferencia en la fotoestabilidad estaría relacionada con los procesos que tienen lugar desde el estado excitado triplete. En la tabla 1.2 se muestran las distintas reacciones que tienen lugar luego de la excitación de la molécula.

Tabla 1.2. Reacciones fotoquímicas de la fluoresceína^{15,17}

<i>Reacción</i>	<i>Descripción</i>	<i>Constante de velocidad^a</i>
$S_0 + h\nu \rightarrow S$	Absorción	$(\sigma_a = 3,06 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 \text{ molec}^{-1})$
$S^* \rightarrow S_0 + h\nu'$	Emisión de fluorescencia	$k_d = 2,134 \times 10^8 \text{ s}^{-1(a)}$
$S^* \rightarrow S_0$	Conversión interna	
$S^* \rightarrow T^*$	Cruce intersistemas	$k_{\text{CIS}} = 6,6 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
$T^* \rightarrow S_0$	Desactivación no radiativa	$k_1 = 50 \text{ s}^{-1}$
$T^* + T^* \rightarrow T^* + S_0$	Quenching de triplete	$k_2 = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + S_0 \rightarrow S_0 + S_0$	Quenching de triplete	$k_3 = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + T^* \rightarrow R + X$	Transferencia electrónica	$k_4 = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + S_0 \rightarrow R + X$	Transferencia electrónica	$k_5 = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + X \rightarrow S_0 + X$	Quenching de T por X	$k_6 + k_7 = 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + R \rightarrow S_0 + R$	Quenching de T por R	k_7
$T^* + O_2 \rightarrow S_0 + O_2$	Quenching físico por O_2	$k_8 = 1,56 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + O_2 \rightarrow X + O_2^-$	Quenching químico por O_2	$k_9 = 1,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

(a) k_d es la constante combinada de los procesos radiativos y no radiativos de la transición $S^* \rightarrow S_0$.

Las reacciones que pueden conducir a la generación de productos no fluorescentes por fotoblanqueo son:



donde X es el catión radical, R es el anión radical, $O_2(^1\Delta_g)$ es oxígeno singlete y $O_2(^3\Sigma_g)$ es oxígeno fundamental.

Los procesos mencionados anteriormente están afectados por la introducción de átomos de flúor en la estructura y su influencia por alguna de las siguientes posibilidades:

- (i) una disminución del rendimiento cuántico de formación del triplete (Φ_T)
- (ii) una disminución del tiempo de vida media del triplete (τ_T) a partir del cual se generan las formas radicalarias activas
- (iii) una desactivación más rápida del par radical hacia el estado fundamental por transferencia electrónica reversa (BET, *back electron transfer*) ($R + X \rightarrow 2 S_0$)
- (iv) una menor reactividad con oxígeno singlete y/o con oxígeno molecular.

La hipótesis (i) implica que exista una marcada diferencia entre las constantes de cruce intersistemas (k_{CIS}) de los derivados fluorados respecto de la fluoresceína, ya que

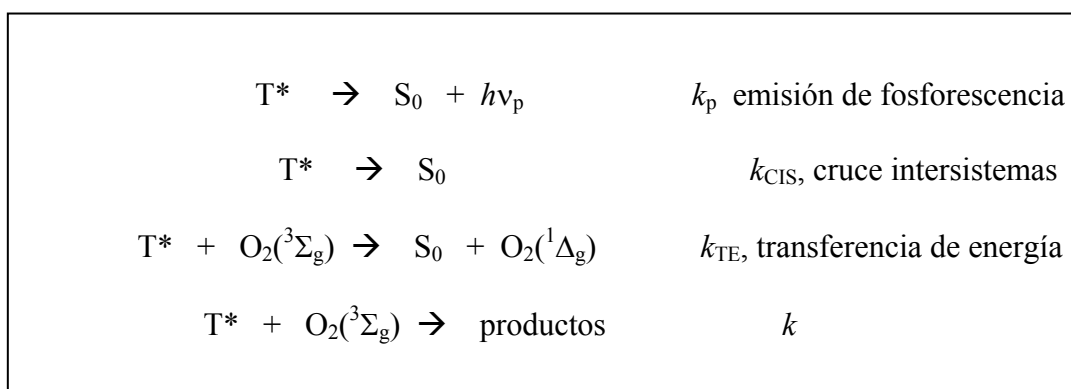
$$\Phi_T = k_{CIS} \tau_S$$

donde Φ_T es el rendimiento cuántico de triplete y τ_s es el tiempo de vida media del estado excitado singulete, que como se mencionó previamente, son muy similares para los fluoróforos que se comparan. La velocidad del proceso $S^* \rightarrow T^*$, una transición prohibida por spin, ocurre debido al acoplamiento spin-órbita entre ambos estados, el cuál se ve favorecido al aumentar el número atómico de los sustituyentes dando lugar al *efecto de átomo pesado*. Sin embargo, es de esperar que la sustitución de un átomo de H por un átomo de F no sea suficiente para producir una diferencia sustancial en el Φ_T .

Hemos determinado los rendimientos cuánticos de triplete (Φ_T) en forma indirecta a partir de los rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singulete (Φ_Δ). Los rendimientos cuánticos de triplete (Φ_T) y de formación de oxígeno singulete (Φ_Δ) se relacionan por¹⁸:

$$\Phi_\Delta = f_\Delta \cdot \Phi_T \quad 1.5$$

donde f_Δ es la eficiencia de formación de oxígeno singulete, por desactivación de un sensibilizador en el estado triplete. La desexcitación del estado triplete ocurre por alguno de los siguientes caminos:



Entonces f_{Δ} está dada por:

$$f_{\Delta} = \frac{k_{TE} \cdot [O_2(^3\Sigma_g)]}{k_p + k_{CIS} + (k_{TE} + k) \cdot [O_2(^3\Sigma_g)]} \quad 1.6$$

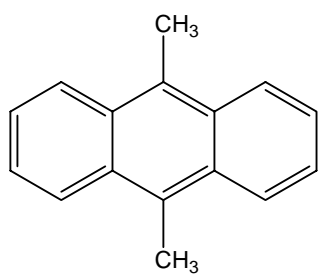
Para soluciones saturadas en aire (concentraciones típicas de O_2 en el rango milimolar) se cumple que:

$$k_p + k_{ISC} \ll (k_{TE} + k) \cdot [O_2(^3\Sigma_g)] \quad y \quad f_{\Delta} = \frac{k_{TE}}{k_{TE} + k}$$

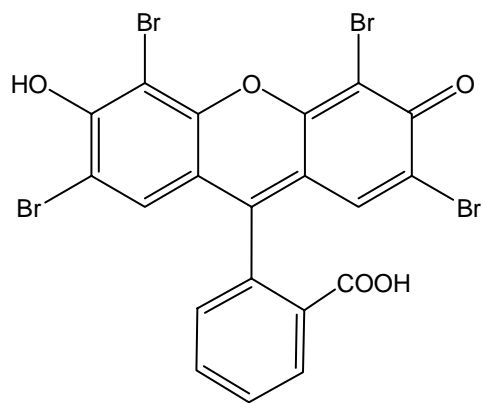
Si el sensibilizador no reacciona químicamente con el O_2 en el estado fundamental:

$$f_{\Delta} \cong 1 \quad y \quad \Phi_{\Delta} \cong \Phi_T$$

Para monitorear la producción de oxígeno singulete utilizamos el método del aceptor químico¹⁸. Lo que se hizo fue medir el consumo de 9,10-dimetilantraceno (DMA) en función del tiempo de irradiación del sensibilizador, utilizando las distintas fluoresceínas como sensibilizadores y eosina como referencia.



DMA



Eosina

El consumo de oxígeno singlete por reacción con DMA en estado estacionario se midió por espectroscopía UV ($\lambda = 341$ nm) en condiciones tales que los datos se ajustaron a una cinética de *pseudo*-primer orden, con constantes experimentales que incluyen la concentración de oxígeno singlete en el estado estacionario. Los resultados se muestran en la figura 1.9.

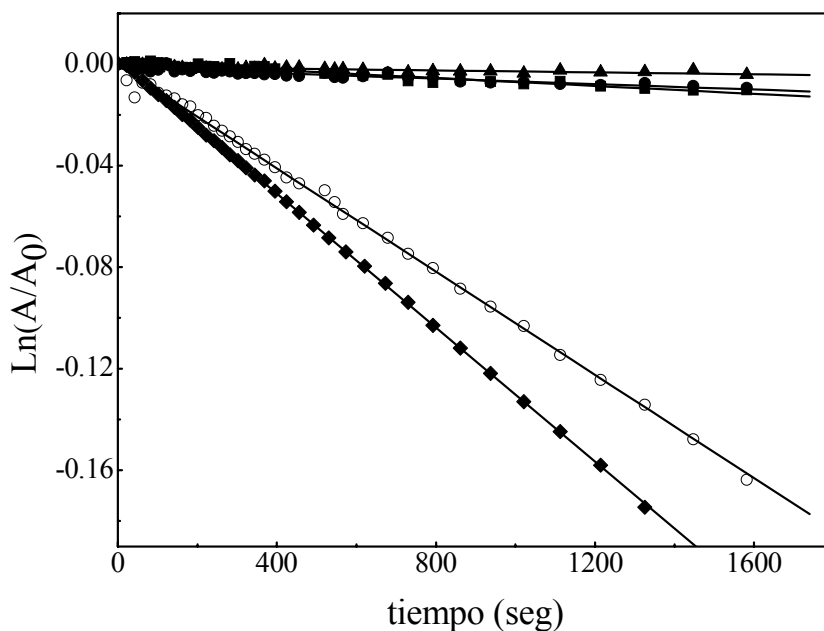


Figura 1.9. Consumo de DMA por reacción con oxígeno singlete en metanol monitoreado a $\lambda = 341$ nm. (\circ) Eosina, (\blacklozenge) 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína, (\blacktriangle) 2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína, (\bullet) 2',7'-difluorofluoresceína, (\blacksquare) fluoresceína. Para 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína se utilizó otra curva de eosina como referencia que no se incluye en esta figura.

En las condiciones de trabajo, se cumple:

$$\Phi_{\Delta}^X = \Phi_{\Delta}^{\text{Eosina}} \frac{\text{pendiente}^X \cdot I_{\text{abs}}^{\text{Eosina}}}{\text{pendiente}^{\text{Eosina}} \cdot I_{\text{abs}}^X} \quad 1.7$$

donde la pendiente sale del gráfico de $\ln(A/A_0)$ vs t e I_{abs} es la luz absorbida por cada sensibilizador.

Se obtuvieron los siguientes valores a partir de la ecuación 1.8:

Tabla 1.3. Rendimientos cuánticos de oxígeno singulete en metanol

	$\Phi_{\Delta}=\Phi_T$
Eosina ¹⁹	0,26
Fluoresceína	0,021
4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína	0,19
2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína	0,005
2',7'-difluorofluoresceína	0,015

Lo primero que podemos observar es que la formación de triplete no correlaciona con la cantidad de átomos de flúor en la molécula, como habíamos supuesto en un principio. Para la 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína se obtuvo el mayor valor de Φ_T lo que se corresponde con el hecho de que es el de rendimiento de cuántico de fluorescencia más bajo, $\Phi_f = 0,85$ contra 0,97 y 0,96 para la 2',7'-difluorofluoresceína y para la 2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína, respectivamente. Pero también se vió que es mas fotoestable que la fluoresceína (Fig. 1.8) y sin embargo el rendimiento cuántico de triplete es mayor que el de ésta. Por lo cual, concluimos respecto de la hipótesis (i), que en este caso, una disminución en el rendimiento cuántico de triplete no se relaciona con una mayor fotoestabilidad. La suma del rendimiento cuántico de fluorescencia (Fig. 1.3) y del rendimiento cuántico de triplete es aproximadamente 1 en todos los casos, lo que sugiere una contribución despreciable de los procesos no radiativos.

Para determinar el peso de la hipótesis (ii) decidimos llevar a cabo estudios con técnicas de fotólisis de destello inducida por láser (*fotólisis flash*), a fin de determinar los tiempos de vida media del triplete. La técnica de fotólisis de destello permite el estudio espectroscópico y cinético de especies transitorias generadas a partir de luz de excitación pulsada. Habitualmente se utiliza un pulso intenso de corta duración para producir una especie transitoria en concentración adecuada para su observación espectroscópica. Se monitorean los cambios en la absorbancia con una luz de análisis en modo continuo focalizada en la muestra. Con la introducción de láseres pulsados en la escala de los nanosegundos, la técnica se convirtió en una herramienta poderosa en el estudio de especies transitorias de vida media muy corta.

La existencia de especies transitorias radicalarias de la fluoresceína ya ha sido determinada previamente². Se identificaron y estudiaron las formas semireducida (**R**) y semioxidada (**X**) de la fluoresceína (Fig. 1.10).

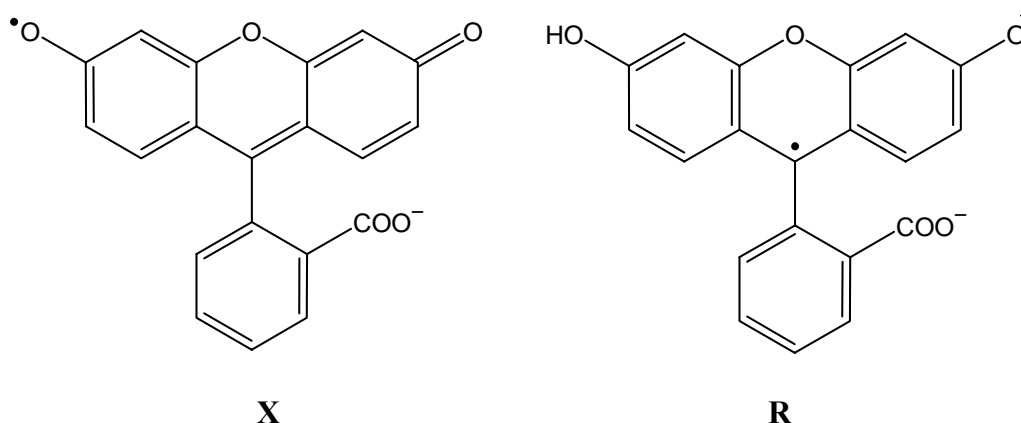


Figura 1.10. Estructuras de las formas radicalarias semioxidada (**X**) y semireducida (**R**) de la fluoresceína.

La forma semireducida (**R**) absorbe a 355 nm y la semioxidada (**X**) a 428 nm. Para realizar las mediciones en esta tesis, se utilizaron soluciones de concentración 50 μM en buffer fosfato 10 mM a pH 7,75, en ausencia de oxígeno, para minimizar el “*quenching*” de triplete. En el espectro de especies transitorias que se obtuvo para la fluoresceína y sus análogos fluorados (Fig. 1.11), ambas especies se identificaron claramente así como también el pico correspondiente al triplete a $\lambda > 540$ nm. En la región espectral entre 450 y 540 nm, existe posiblemente una combinación de la absorción del estado fundamental y del triplete, que resulta en una mezcla de cambios de absorbancia positivos y negativos.

En el caso de las fluoresceínas hexafluorada y difluorada (Fig. 1.11 D y B), el pico correspondiente al anión radical aparece desplazado ~ 50 nm al rojo, respecto de los otros fluoróforos. La asignación en este caso se realizó en base a un experimento en presencia de un dador de electrones, como la *p*-fenilendiamina (ver Parte Experimental). Las formas radicalarias se generan inmediatamente luego del pulso láser, por medio de las reacciones mencionadas anteriormente, por procesos de transferencia electrónica. Estos procesos bimoleculares se ven favorecidos debido a la alta concentración con la que se trabajó (50 μM). Este orden de concentración es necesario para poder obtener una señal apreciable como consecuencia del bajo rendimiento cuántico de formación de triplete. Se excluye la formación del catión radical, **X**, por reacción con oxígeno, ya que como se mencionó se trabajó con soluciones en atmósfera de argón para minimizar el quenching por oxígeno y favorecer la observación de la señal.

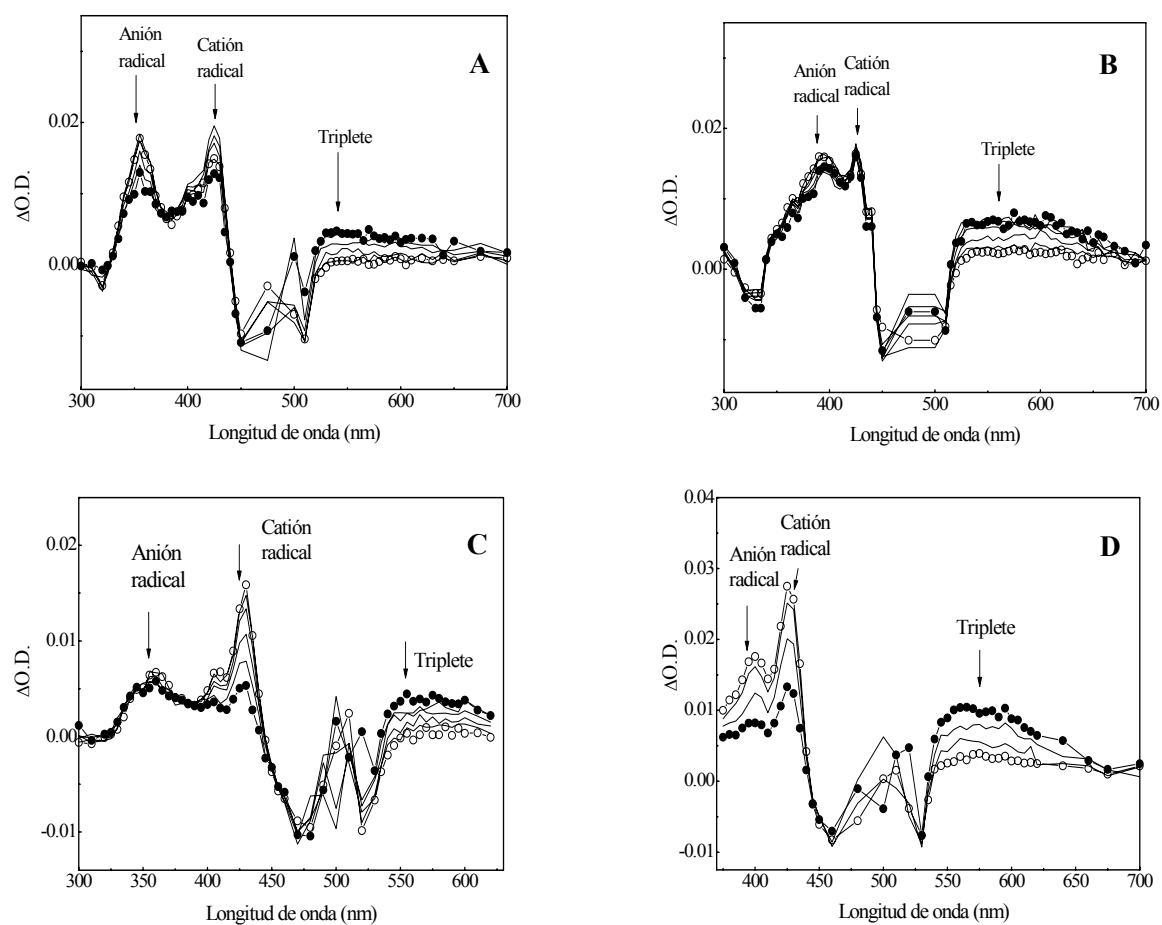


Figura 1.11. Espectro de especies transitorias de fluoresceína (A), 2',7'-difluorofluoresceína (B), 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína (C) y 2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína (D) a distintos tiempos luego del pulso láser. (●) 2-4-10-20 μ s respectivamente, (○)160 μ s

Una vez identificados las especies transitorias de interés, se procedió a analizar los decaimientos temporales de los tripletes para los distintos fluoróforos (Figura 1.12,

Tabla 1.4). En todos los casos se realizaron ajustes monoexponenciales de los decaimientos.

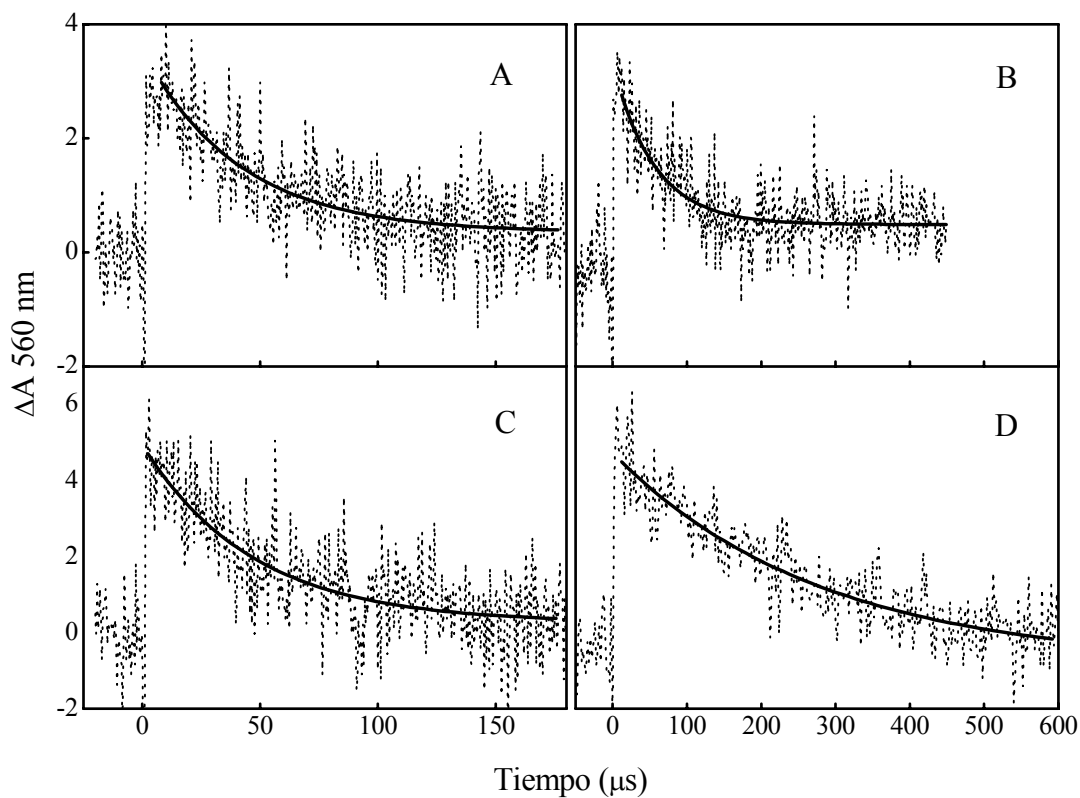


Figura 1.12. Decaimientos de los tripletes de la fluoresceína (A) y análogos fluorados: 2',7'-difluorofluoresceína (B), 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína (C) y 2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína (D). Concentración: 50 μ M, buffer fosfato 10 mM, pH = 7,75. $\lambda_{\text{análisis}} = 560$ nm, $\lambda_{\text{excitación}} = 266$ nm para A y B y 532 nm para C y D.

Tabla 1.4. Tiempos de vida de triplete obtenidos mediante ajuste monoexponencial

<i>Compuesto</i>	<i>Tiempo de vida del triplete (τ_T)/μs</i>
Fluoresceína (1)	45 ± 6
2',7'-difluorofluoresceína (4)	57 ± 6
4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína (5)	45 ± 5
2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína (6)	230 ± 20

Se pudo observar que los τ_T para la 2',7'-difluorofluoresceína (57 μ s) y para la 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína (45 μ s) son similares a los de la fluoresceína (45 μ s). En cambio, es notable el alto valor obtenido para el derivado **6**, que es el análogo fluorado que presenta mayor fotoestabilidad (Fig 1.8). Evidentemente, la hipótesis de que una disminución del τ_T está directamente relacionada con una menor producción de formas radicalarias activas y por lo tanto con una mayor fotoestabilidad, no sería correcta. Sin embargo, para el análogo hexafluorado la generación de las formas radicalarias a partir del triplete, como una de las vías de disminución de la población de este estado, estaría menos favorecida para este compuesto. El valor obtenido indica que la molécula queda más tiempo “atrapada” en el estado triplete pero sin consecuencias sobre su fotodestrucción.

Respecto del destino de los radicales, ya sea la reversión al estado fundamental ($X + R \rightarrow 2 S_0$) o la formación de productos no fluorescentes, es difícil de determinar. En las condiciones del experimento, se observó en todos los casos una fotodestrucción de los fluoróforos menor al 10%. El análisis de los decaimientos del catión y anión

radical de los distintos fluoróforos, mostró que son especies independientes, lo que indica que la recombinación de los mismos no es un proceso predominante.

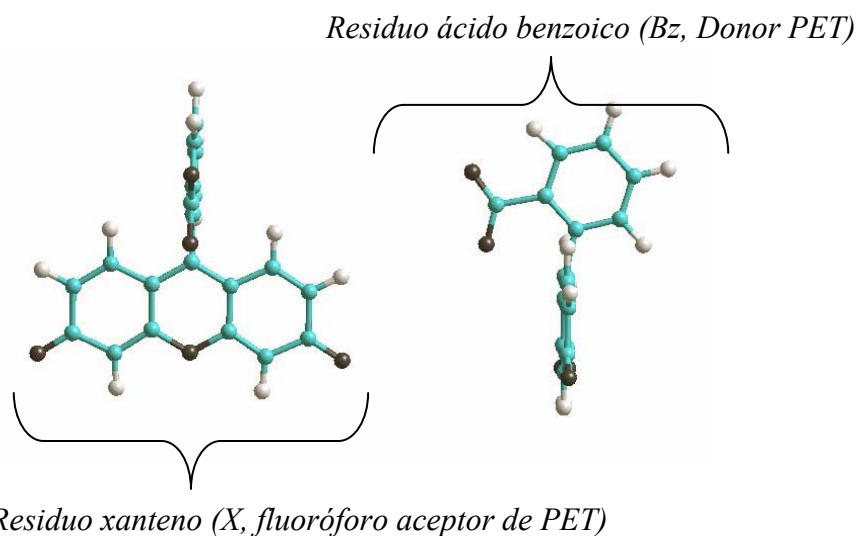
Finalmente, teniendo en cuenta los experimentos de fotoblanqueo en presencia de oxígeno (Figura 1.8), es probable que la diferencia en la fotoestabilidad resida principalmente en la reacción del triplete con el oxígeno molecular, como reacción predominante. Tampoco podemos descartar la reacción con oxígeno singulete como una vía importante de fotodegradación. Hay que tener en cuenta que si bien, los rendimientos cuánticos de oxígeno singulete no son valores altos, en condiciones de iluminación intensa como una fuente láser del microscopio, dan lugar a concentraciones significativas de oxígeno singulete reactivo, con el consecuente efecto sobre la fotoestabilidad.

Sin duda, en las condiciones típicas en las que se utilizan estos fluoróforos para marcación de biomoléculas, bajas concentraciones y presencia de oxígeno, los procesos T^*-T^* y T^*-S_0 se minimizan y predomina la interacción con el oxígeno. En este caso, lo que hay que comparar es la facilidad con que los distintos fluoróforos reaccionan con esta molécula. Es razonable pensar que al introducir átomos electro-atradores en la estructura, su tendencia a la oxidación disminuya. Así, en los análogos fluorados la formación del catión radical a partir del cual se formarían los productos no fluorescentes, se ve menos favorecida, debido a la presencia de átomos de flúor en la molécula.

No podemos ignorar en esta discusión los resultados reportados por Tanaka y col.²⁰ sobre la influencia de procesos de *transferencia electrónica fotoinducida* (PET,

Photoinduced Electron Transfer) en los parámetros espectrales de la fluoresceína y estructuras relacionadas. Se ha demostrado que este proceso ocurre intramolecularmente en este tipo de fluoróforos con consecuencias sobre el rendimiento cuántico de fluorescencia y la estabilidad.

La molécula de fluoresceína puede verse como un par donor-aceptor formado por el residuo de ácido benzoico y el fluoróforo 6-hidroxi-3H-xanten-3-ona, debido a la disposición ortogonal que adoptan entre sí²¹. La presencia del grupo –COOH impide la libre rotación alrededor del enlace C-C que conecta ambas unidades, de manera que el acoplamiento electrónico entre ellas es casi nulo a pesar de encontrarse directamente unidas.



En este sistema ocurre una transferencia electrónica fotoinducida intramolecular desde la unidad de ácido benzoico electrodonora al estado excitado aceptor del residuo xanteno. Como consecuencia de esta transferencia electrónica se pueden formar intermediarios radicalarios altamente reactivos cuyos espectros de absorción han sido

detectados en experimentos de fotólisis de destello inducida por láser²². Estas especies transitorias se generan en forma reversible a partir del estado excitado singlete o triplete, de manera que los factores que aumenten la velocidad de transferencia electrónica reversa (BET, Back Electron Transfer) del par radical, provocan un aumento en la estabilidad de la molécula frente a la descomposición, ya que disminuye el tiempo de vida de estos intermediarios reactivos. Miura plantea que si el HOMO (orbital ocupado de mayor energía) del residuo benzoico está lo suficientemente alto en energía como para que ocurra la transferencia electrónica hacia el xanteno excitado, entonces se observará una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y una menor fotoestabilidad (Figura 1.13).

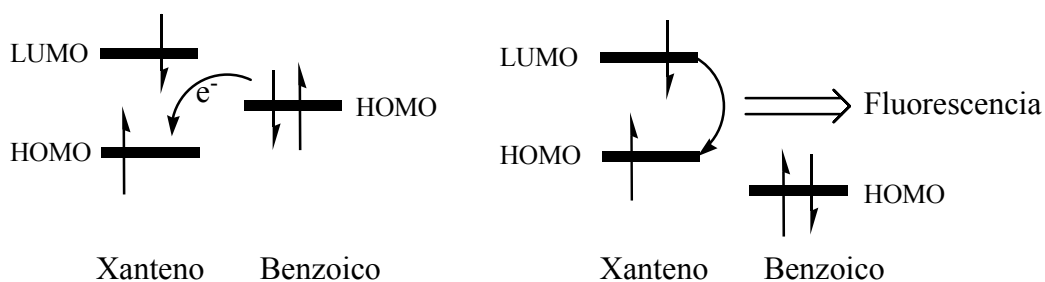


Figura 1.13. Diagrama de orbitales de frontera. Influencia del proceso de PET en la fluorescencia²².

Decidimos evaluar esta hipótesis en los fluoróforos en estudio. Para ello se calculó la energía del HOMO para las estructuras de la figura 1.14, a partir de cálculos semiempíricos PM3, a fin de correlacionar nuestros resultados con los reportados, aplicando la misma metodología.

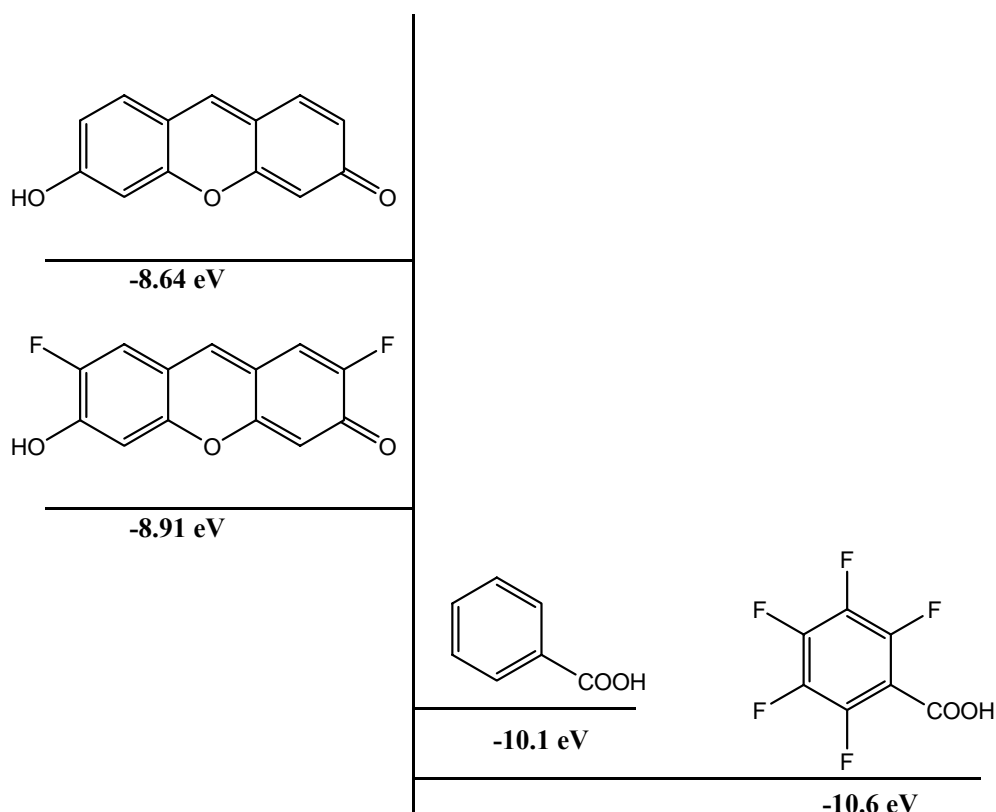


Figura 1.14. Energías relativas (no a escala) de los orbitales HOMO para diferentes derivados de fluoresceína obtenidos de cálculos semiempíricos PM3

La introducción de átomos electroattractores como flúor en el residuo benzoico condujo a valores de energía para el HOMO un poco por debajo que el del benzoico, desfavoreciendo el proceso de PET hacia el residuo xanteno. Esto es consistente con la mayor fotoestabilidad encontrada en la 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína respecto de la fluoresceína. Pero al estimar la energía del HOMO del xanteno fluorado en las posiciones 2' y 7', se obtuvo una energía menor que la del xanteno sin átomos de flúor

como era de esperar al introducir átomos electroattractores en la molécula. Por lo tanto, esta aproximación nos estaría indicando un proceso de PET más favorable en la 2',7'-difluorofluoresceína que en la fluoresceína, con la consecuencia de una menor fotoestabilidad y mayor rendimiento cuántico de fluorescencia del análogo fluorado, que no es lo que se observa experimentalmente. Comprobamos entonces que este cálculo preliminar carece de confiabilidad ya que los métodos semiempíricos no son adecuados porque no se pueden aplicar al estudio de estados excitados que es lo que habría que hacer en el caso del residuo xanteno. Otro detalle que habría que considerar en el cálculo es la estructura de los dianiones, tanto del xanteno como del residuo benzoico, que son las que predominan en las soluciones que se utilizan en los experimentos.

Otra aproximación es la que correlaciona las variaciones del potencial de oxidación del residuo benzoico con el proceso de PET y el rendimiento cuántico de fluorescencia¹¹. Urano y col. demostraron cómo predecir el rendimiento cuántico de fluorescencia de ciertos derivados de fluoresceína. La hipótesis se basa en la correlación que existe entre el potencial de oxidación del residuo xanteno con la energía del HOMO del mismo. La relación del rendimiento cuántico de fluorescencia del fluoróforo con la energía del HOMO del residuo benzoico calculada por métodos *ab initio* sigue la misma tendencia que con los potenciales de oxidación del mismo. Es decir, a mayor potencial de oxidación del residuo benzoico (por introducción de grupos electrodonores), menor será la energía del HOMO, por lo tanto menos favorecido estará el proceso de transferencia electrónica del residuo benzoico al xanteno excitado y el rendimiento cuántico y la fotoestabilidad serán mayores. Esta hipótesis puede explicar la mayor

fotoestabilidad de 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína, ya que al tener átomos electroattractores en el residuo benzoico, estaría menos favorecida la transferencia de un electrón al residuo xanteno, como se discutió previamente. Pero nuevamente no es aplicable al caso de 2',7'-difluorofluoresceína, donde los átomos de flúor en el residuo xanteno harían más oxidable esa estructura, en especial en el estado excitado, con la consecuente disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y de la fotoestabilidad. El análisis es más complejo si se quiere aplicar al análogo hexafluorado.

La manera correcta de saber si este proceso de PET controla la fotoestabilidad de nuestros compuestos, sería por comparación directa de las velocidades de transferencia electrónica de las distintas moléculas. La velocidad de la reacción de transferencia electrónica fotoinducida se puede calcular a partir de la ecuación de Marcus (ecuación 1.8) si se tienen los valores de λ , V y ΔG_{PET} .

$$k_{\text{ET}} = \left(\frac{4\pi^3}{h^2 \lambda k_{\text{B}} T} \right)^{1/2} V^2 \exp \left[\frac{(\Delta G_{\text{PET}}^0 + \lambda)^2}{4\lambda k_{\text{B}} T} \right] \quad 1.8$$

La energía de reorganización, λ (eV), y V (cm⁻¹), el elemento de acoplamiento electrónico deberían ser similares para las estructuras relacionadas, de manera que el valor determinante es el ΔG_{PET} que se obtiene de la ecuación de Rehm-Weller (ecuación 1.9).

$$\Delta G_{\text{ET}} = E_{\text{ox}} - E_{\text{red}} - \Delta E_{00} - w_{\text{p}} \quad 1.9$$

donde E_{ox} y E_{red} son los potenciales de oxidación y reducción del donante (residuo

benzoico) y el aceptor (residuo xanteno), ΔE_{00} es la energía del primer estado excitado del fluoróforo (residuo xanteno) y w_p es la energía de interacción electrostática del par radical, que corresponde al trabajo que se requiere para mantener los iones a la distancia de transferencia electrónica. A mayor potencial de oxidación del residuo benzoico, menor será la velocidad de transferencia electrónica. Nos vimos limitados en la obtención de estos parámetros al carecer de los precursores correspondientes para la estimación de E_{ox} y E_{red} por técnicas de voltametría cíclica. Además, como se mencionó previamente, los radicales observados por flash fotólisis, se asignaron a moléculas independientes debido a la falta de correlación de las constantes de decaimiento. Esto indica que el par formado es consecuencia de una transferencia electrónica intermolecular y los eventos que siguen a su formación son independientes. Podemos decir que el proceso de PET intramolecular no es el proceso que influye terminantemente en la fotoestabilidad de los compuestos que se comparan. Si así fuera, la diferencia de fotoestabilidad observada en los derivados fluorados respecto de la fluoresceína, debería correlacionarse con una marcada diferencia de los rendimientos cuánticos de fluorescencia, que no es lo que ocurre experimentalmente (ver tabla de la figura 1.3).

1.3 CÁLCULO DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN DE LOS FLUORÓFOROS

Dado el extenso uso que se ha dado a la fluoresceína en diversas áreas, es llamativa la falta de estudios teóricos que permitan establecer un método conveniente

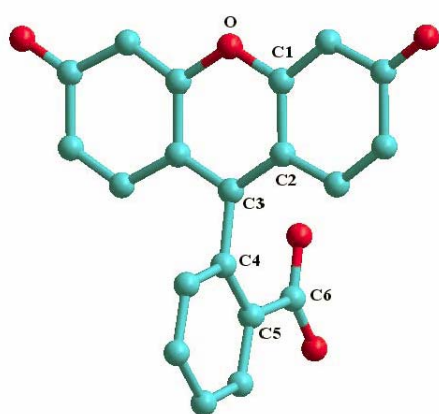
para la interpretación de la estructura electrónica en el estado fundamental, así como también de los estados excitados. La interpretación de determinadas características fotoquímicas y fotofísicas puede realizarse mediante el estudio detallado de los procesos de excitación y emisión, con una aproximación teórica adecuada.

Uno de los métodos de cálculo de primeros principios de menor costo computacional, TDDFT (*Time Dependent Density Functional Theory*), se ha convertido en el método de elección para la interpretación de la espectroscopía electrónica de moléculas orgánicas de tamaño mediano a grande y de moléculas biológicas de hasta ~200 átomos²³. Este modelo extiende las ideas fundamentales de la teoría del funcional de la densidad (DFT) para el estado fundamental a fenómenos dependientes del tiempo y permite el estudio de transiciones electrónicas.

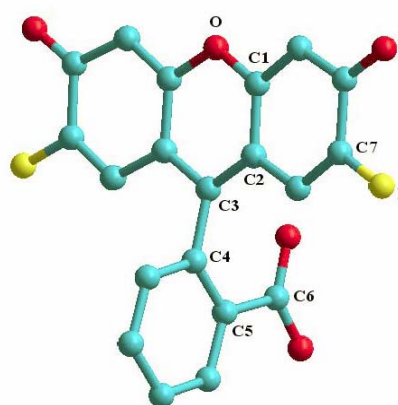
Resulta interesante, entonces, evaluar la eficiencia del método para calcular las propiedades de excitación y de emisión de los fluoróforos utilizados, tanto en fase gaseosa como en solución. Los mayores desafíos son: obtener geometrías adecuadas de los estados excitados a partir de las cuales se puedan predecir espectros de emisión, y realizar el estudio en fase condensada, ya que es necesario reproducir los efectos de solvatación. Esto último es importante debido a que los datos espectroscópicos se obtienen en solución, para este tipo de moléculas.

Para los fluoróforos que se utilizaron como precursores de los derivados biarsenicados (Fluoresceína, 2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína y 2',7'-difluoro-4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína) se optimizó la estructura del dianión en el estado fundamental y en el estado excitado, ya que es la especie que predomina en las

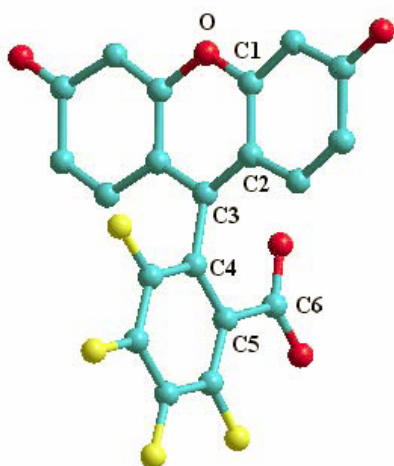
condiciones de trabajo a pH fisiológico (Figura 1.15). Para la optimización de la geometría del estado fundamental se utilizó el método DFT/BP86(6-31G**) y para los estados excitados el método HF/CIS/6-31G**, implementados en Gaussian 03²⁴. A continuación se pueden visualizar las estructuras optimizadas:



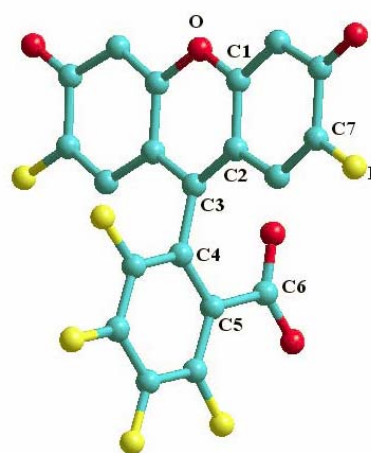
fluoresceína



2',7'-difluorofluoresceína



4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína



2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína

Figura 1.15. Estructuras de los fluoróforos en el estado fundamental optimizadas por DFT/BP86(6-31G*)

En la tabla 1.5 se comparan los parámetros geométricos relevantes para el estado fundamental y el primer estado excitado.

Tabla 1.5. Parámetros geométricos del estado fundamental y del estado excitado (en cursiva) optimizados mediante HF/6-31G** y HF/CIS/6-31G**, respectivamente.

	<i>Distancias de enlace (Å)</i>				<i>Ángulo entre átomos (°)</i>	<i>Ángulo torsional (°)</i>
	C3-C4	C1-O	C5-C6	C7-F	C3-C4-C5	C2-C3-C4-C5
Datos cristalográficos*	1,499	1,381	1,506	-	124,16	74,8
Fluoresceína	1,506 <i>1,497</i>	1,350 <i>1,359</i>	1,552 <i>1,556</i>	- -	126,1 <i>127,0</i>	95,8 <i>79,8</i>
2',7'-difluorofluoresceína	1,505 <i>1,497</i>	1,348 <i>1,362</i>	1,553 <i>1,556</i>	1,345 <i>1,341</i>	125,7 <i>126,3</i>	95,7 <i>81,5</i>
4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína	1,509 <i>1,495</i>	1,385 <i>1,361</i>	1,579 <i>1,555</i>	- -	124,3 <i>124,7</i>	98,4 <i>96,0</i>
2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína	1,503 <i>1,494</i>	1,347 <i>1,361</i>	1,563 <i>1,556</i>	1,340 <i>1,337</i>	123,9 <i>124,3</i>	83,5 <i>93,8</i>

*de la estructura de Rayos X de la sal de sodio de la fluoresceína²¹

Los enlaces C-C entre la unidad xanteno y el residuo benzoico (C3-C4), y entre C7-F se acortan en el estado excitado, en todos los casos, mientras que el enlace C5-C6 se acorta en el estado excitado en el caso de 2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína y de 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína. El enlace C1-O se alarga en todos los casos en el estado excitado. El ángulo de enlace C3-C4-C5 es comparable en ambos estados para todos los casos. El ángulo de torsión C2-C3-C4-C5 es menor en el estado excitado para todos los casos, excepto para 2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína y de 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína en las que probablemente predomine la repulsión electrónica y estérica entre los átomos de flúor del anillo xanteno y del residuo benzoico, haciendo que se dispongan más alejados entre sí y más cercanos a una disposición ortogonal.

Sobre las estructuras optimizadas por DFT/BP86/6-31G** del estado fundamental se realizaron cálculos de TDDFT en fase gaseosa y en fase condensada utilizando agua como solvente, de los cuales se obtuvieron los espectros electrónicos. El modelo que se aplicó para el cálculo en solución fue SCRF-PCM (*Self Consistent Reaction Field-Polarized Continuum Model*). Este modelo tiene en cuenta la forma de la molécula en la construcción de la caja de solvente y permite un acoplamiento total entre la cavidad y la densidad electrónica.

Tabla 1.6. Espectros de absorción calculados por TDDFT/BP86(6-31G**)

	<i>Fase gaseosa^a</i>	<i>Fase condensada^a (agua)</i>	<i>Exp.^a</i>	<i>Contribución mayoritaria a la transición^b</i>
Fluoresceína	453 (0,383)	470 (0,533)	490	33% (HOMO → LUMO)
2',7'-difluorofluoresceína	455 (0,4045)	473 (0,5383)	490	32% (HOMO → LUMO)
4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína	447 (0,1932)	476 (0,5408)	508	33% (HOMO → LUMO)
2',7'-difluoro-4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína	453 (0,273)	480 (0,5426)	508	33% (HOMO → LUMO)

(a) longitud de onda en nm. Entre paréntesis, *f*, fuerza del oscilador. (b) corresponde al cálculo en fase condensada.

El método de cálculo utilizado provee resultados consistentes con los valores experimentales. En todos los casos, el método subestima los máximos de absorción por ~40 nm en el cálculo en fase gaseosa y por ~20 nm en fase condensada. Al considerar los efectos de solvatación, se observa una notable mejora en la estimación del espectro electrónico de las moléculas consideradas, especialmente en el perfil de la banda (Fig.1.16).

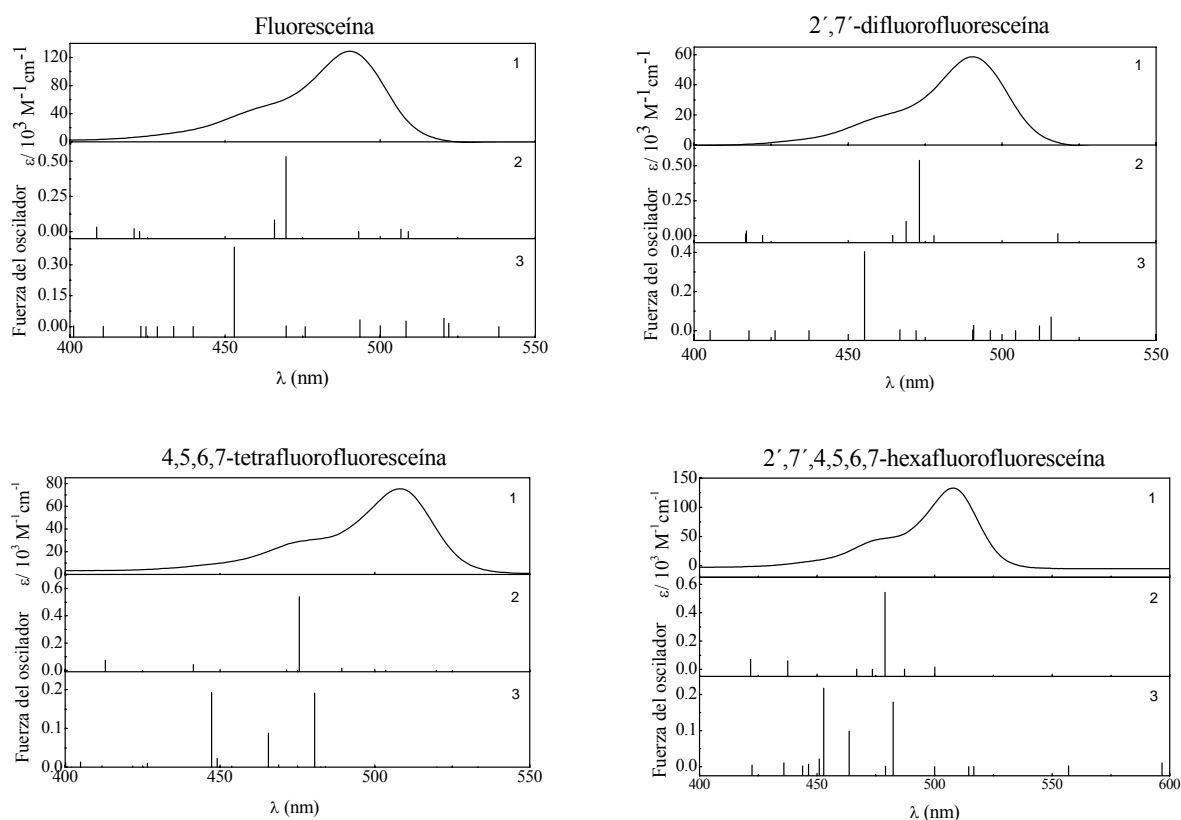


Figura 1.16. Comparación entre los espectros electrónicos experimentales (1) y los calculados en fase condensada (2) y fase gaseosa (3).

Por inspección de los orbitales involucrados en la transición de mayor contribución al estado excitado en solución acuosa, se asigna la banda de mayor intensidad a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$. Ambos orbitales están localizados sobre el anillo xanteno, y la excitación corresponde a la promoción de un electrón desde el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) al orbital molecular vacante de menor energía (LUMO). En la figura 1.17 se ilustran los orbitales HOMO y LUMO involucrados.

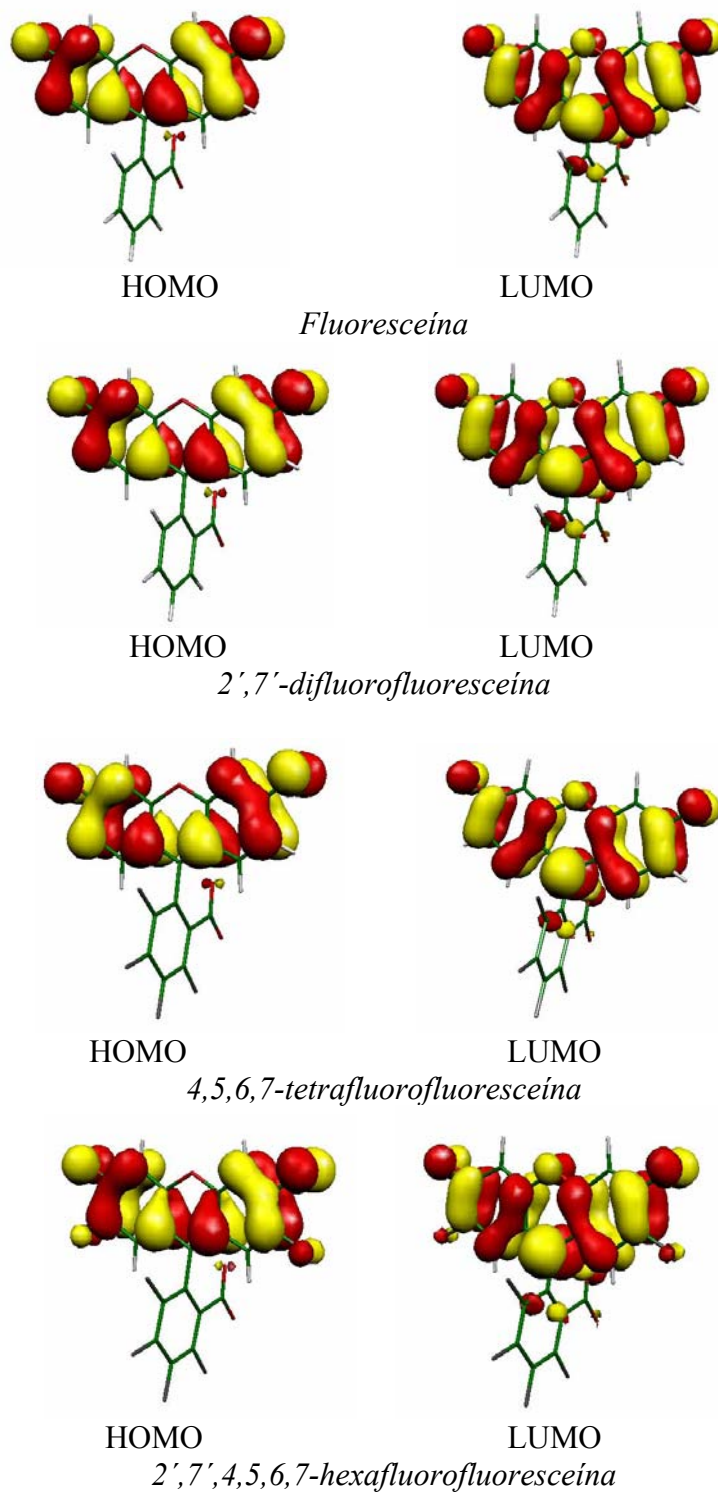


Figura 1.17. Orbitales de frontera de los fluoróforos provenientes del cálculo TDDFT

Se observó un desplazamiento batocrómico del máximo para todos los casos en fase condensada, característico de las transiciones de naturaleza $\pi \rightarrow \pi^*$ en solventes polares, debido a la estabilización de la molécula por el solvente en el estado excitado.

Con las estructuras optimizadas de los estados excitados se calcularon los corrimientos de Stokes correspondientes a partir de las energías de transición derivadas del cálculo TDDFT ($S_1 \rightarrow S_0$) y por comparación con las transiciones obtenidas en el estado fundamental ($S_0 \rightarrow S_1$) (Tabla 1.6). La obtención de las estructuras optimizadas del primer estado excitado S_1 es importante ya que son las que se utilizan para analizar las propiedades de emisión, porque la estructura relajada luego de la excitación no puede ser reproducida a partir de optimizaciones del estado fundamental. El fundamento es el siguiente: la absorción de un fotón excita a las moléculas al estado S_1 de Franck-Condon (transiciones verticales) que poseen la geometría del estado fundamental S_0 (Figura 1.18). Luego de la excitación, las moléculas relajan a la geometría más estable antes de que ocurra la emisión al estado fundamental S_0 . Debido a esto la energía de la primer transición decrece. Esta transición corresponde a la energía de emisión.

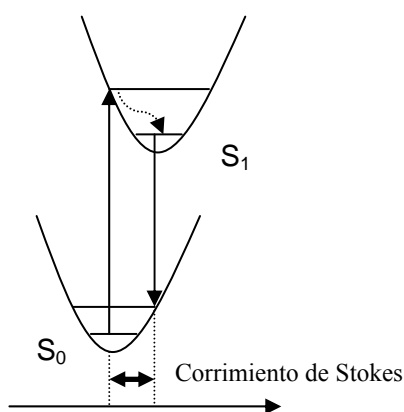


Figura 1.18. Transiciones de Franck-Condon más probables: $S_0 \rightarrow S_1$ (absorción) y $S_1 \rightarrow S_0$ (emisión)

Tabla 1.7. Corrimientos de Stokes calculados y experimentales

	<i>Corrimiento de Stokes (nm)</i>		
	<i>Fase gaseosa</i>	<i>Fase condensada</i>	<i>Experimental</i>
Fluoresceína	44	24	24
2',7'-difluorofluoresceína	38	20	24
4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína	29	37	19
2',7',4,5,6,7, -hexafluorofluoresceína	28	31	19

En el caso de la predicción de los corrimientos de Stokes (Tabla 1.7), se debieron utilizar geometrías optimizadas por métodos Hartree-Fock, ya que no fue posible realizar la optimización de estados excitados por DFT al no encontrarse implementado en Gaussian. Los resultados obtenidos correlacionan satisfactoriamente con los experimentales.

En base a estos resultados, podemos concluir que el método TDDFT predice aceptablemente los espectros de absorción de los compuestos preparados, obteniéndose resultados que se ajustan consistentemente a los datos experimentales. En particular, la predicción mejora considerablemente cuando se tienen en cuenta efectos de solvatación, sin ser computacionalmente más costoso.

La posibilidad de predecir las propiedades espectroscópicas de este tipo de compuestos y otros estructuralmente relacionados (Rodaminas, Alexa, etc), es muy importante para encarar el diseño y síntesis de nuevas sondas, por ello consideramos importante establecer el método de cálculo adecuado que se aplique a este tipo de moléculas.

1.4 CONCLUSIONES

Hemos presentado en este capítulo una descripción de las características fotoquímicas de los fluoróforos precursores que se utilizaron como material de partida para la preparación de sondas fluorogénicas de marcación específica que se tratará en los capítulos siguientes. A través de la determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete se puede estimar el rendimiento cuántico de triplete de forma indirecta para los derivados fluorados de la fluoresceína. Los valores obtenidos nos permitieron descartar una relación directa entre las variaciones de este parámetro y la diferencia en la fotoestabilidad.

Por experimentos de fotólisis flash de los fluoróforos, pudimos verificar la existencia de especies transitorias radicalarias, activas en los procesos de fotodegradación. Se determinó la existencia de las mismas y el tiempo de vida del triplete de los fluoróforos. El análisis global de todos estos experimentos, nos permite postular que la diferencia en la fotoestabilidad se debe a una menor reactividad del estado excitado triplete de los análogos fluorados con oxígeno molecular.

También hemos realizado un estudio teórico de las transiciones electrónicas de la fluoresceína y sus derivados fluorados, estableciendo un método de cálculo conveniente para este tipo de compuestos, cuestión que no ha sido abordado hasta este trabajo. Se obtuvieron valores para la absorción y emisión muy satisfactorios en comparación con los experimentales.

Las propiedades fotoquímicas discutidas en base a distintos modelos justifican la elección de estos fluoróforos para el trabajo subsiguiente.

1.5 PARTE EXPERIMENTAL

1.5.1 Síntesis de los fluoróforos

Los solventes utilizados fueron de calidad “para análisis” o superior, y se purificaron según métodos descritos en bibliografía²⁵.

El reactivo 4-Fluororesorcinol fue provisto por CPC Scientific, San Jose, CA, USA. Todos los otros reactivos fueron provistos por Sigma-Aldrich Co.

Cromatografía en columna: se utilizó sílica gel 60 de malla 230-400 llamada “flash” (Merck). Los solventes de elución se indican en cada caso.

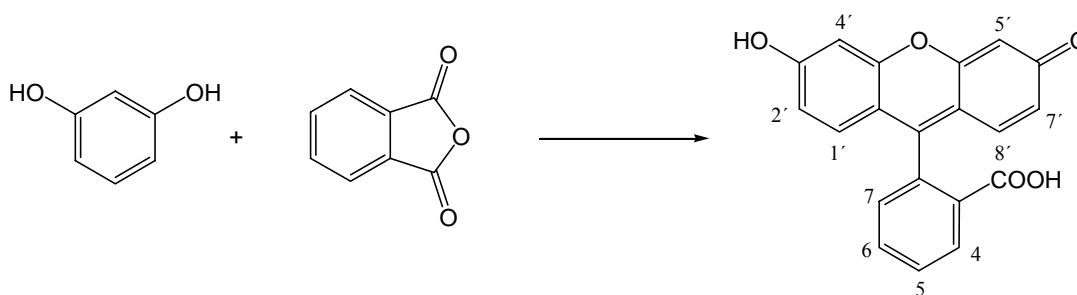
Resonancia magnética nuclear: los espectros de RMN se adquirieron con espectrómetros Bruker AC-200 (Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA, a 200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C) y Bruker AM-500 (LANAIS RMN-500, CONICET, a 500 MHz para ^1H , 125 MHz para ^{13}C). Se utilizaron solventes deuterados que se indican en cada caso. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón (ppm) respecto de la señal de tetrametilsilano (TMS) o el solvente deuterado. Los patrones de acoplamiento se consideraron de primer orden, y las constantes se expresaron en Hz. Las señales se describen como *s* (singulete), *d* (doblete), *t* (triplete), *q* (cuarteto), *dd* (doble doblete), *sa* (singulete ancho) y *m* (multiplete).

La asignación de los espectros de RMN se realizó mediante comparación con datos publicados o de compuestos estructuralmente relacionados.

Espectrometría de masa: los espectros de masa de alta y baja resolución fueron determinados en un APEX IV 7 Tesla-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR)- Mass spectrometer (Bruker) o un TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Instrument (Finnigan) con Electrospray-Ionisation (Universidad de Göttingen, Alemania).

Procedimiento general para la obtención de fluoresceína y sus análogos¹⁰: Se agrega anhídrido ftálico, anhídrido trimelítico o anhídrido tetrafluoroftálico (1 eq) a una solución de resorcinol o 4-fluororesorcinol (2 eq) en ácido metansulfónico (1M) y se deja reaccionar a 80-85 °C, bajo atmósfera de nitrógeno por 24-48 hs, con agitación y protección contra la luz. Luego se deja enfriar a temperatura ambiente y se vuelca sobre agua helada acidulada. Se filtra el precipitado obtenido y se seca al vacío a 60°C sobre P₂O₅.

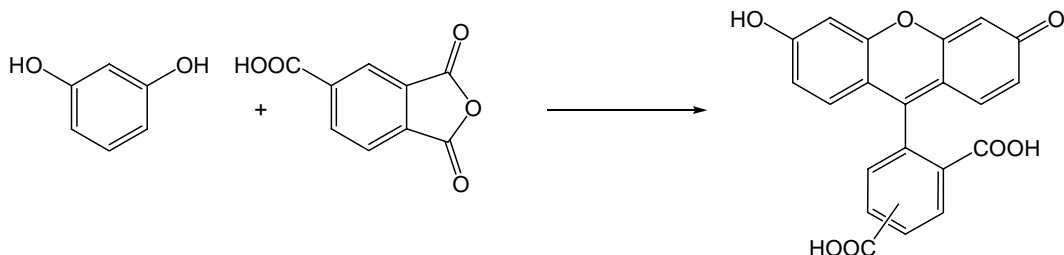
Fluoresceína (1)



Se obtiene fluoresceína como un sólido naranja intenso. Rend. 95% .

RMN-¹H (200 MHz, MeOD): 8,1 (H-4, 1H, *d*, *J* = 8,0), 7,74 (H-5/6, 2H, *dt*, *J* = 8,0), 7,21 (H-7, 1H, *d*, *J* = 8,0), 6,67 (H-4'/5', 2H, *s*), 6,54 (H-1'/2'/7'/8', 4H, *d*, *J* = 8,0).

5(6)-carboxifluoresceína (2a,b)



Se obtiene 5(6)-carboxifluoresceína como un sólido amarillo fuerte. Rend. 98%

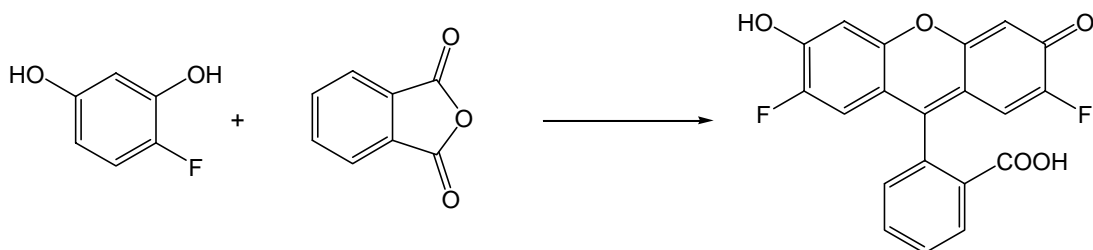
RMN-¹H (200 MHz, MeOD): 8,59 (1H, *s*), 8,38 (1H, *dd*, *J* = 8,2), 8,32 (1H, *dd*, *J* = 8,2), 8,08 (1H, *d*, *J* = 8), 7,74 (1H, *s*), 7,31 (1H, *d*, *J* = 8), 6,70 (2H, *dd*), 6,69 (2H, *dd*), 6,57 (8H, *m*). EM(ESI): (M+H)⁺ 377,4 calc. C₂₁H₁₂O₇ 376,3

Separación de isómeros 5 y 6²⁶: 5(6)-carboxifluoresceína (5 g, 13 mmol) se refluja con anhídrido trimetilacético (10 ml, 49 mmol) por 2 hs. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, se diluye con tetrahydrofurano (10 ml) y agua (10 ml) y se agita por 2 hs. Luego se agrega éter etílico (50 ml) y se separa la fase acuosa. La fase orgánica se lava con buffer fosfato (3 x 25 ml, 1,4 M, pH = 7), HCl (1 M, 1 x 50 ml), NaCl (solución saturada) y se seca con sulfato de sodio anhidro. Se filtra, se remueve el solvente y el residuo amarronado resultante se resuspende en etanol absoluto (50 ml). Se agrega DIPEA (5 ml, 36 mmol) y se enfría a -20°C. Se filtra el sólido y se lava con etanol frío. El sólido obtenido corresponde a 6-carboxifluoresceína dipivalato como la sal de diisopropilamina. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 8,26 (1H, *d*, *J* = 8), 8,00 (1H, *d*, *J* = 8), 7,69 (1H, *s*), 7,03 (2H, *d*, *J* = 2), 6,85 (2H, *d*, *J* = 8), 6,74 (2H, *dd*, *J* = 8, 2), 3,20 (2H, *m*, *J* = 6), 1,36 (18H, *s*), 1,22 (12H, *d*, *J* = 6).

Al tratarlo con la mezcla MeOH: NaOH 1M (25:3) por 30 minutos y posterior acidificación, se obtiene 6-carboxifluoresceína. RMN-¹H (200 MHz, MeOD): 8,13 (1H, *d*, *J* = 8,0), 7,98 (1H, *d*, *J* = 8,0), 7,78 (1H, *s*), 7,06 (2H, *d*, *J* = 10), 6,51 (4H, *m*).

El filtrado obtenido se evapora obteniéndose un residuo que se diluye con éter (50 ml) y se extrae con agua (4 x 25 ml) y con HCl (1M, 1 x 25 ml). La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora el solvente. Se obtiene un aceite semi-sólido el cual se purifica por cromatografía en columna de sílica utilizando ciclohexano y acetato de etilo como solvente de elución. Se obtiene un sólido que al ser tratado con THF: NaOH 1 M (1:1) y posterior acidificación dá la 5-carboxifluoresceína: RMN-¹H (200 MHz, MeOD): 8,78 (1H, *s*), 8,43 (1H, *d*, *J* = 8,0), 7,45 (1H, *d*, *J* = 8,0), 7,05 (4H, *m*), 6,86 (2H, *d*, *J* = 10).

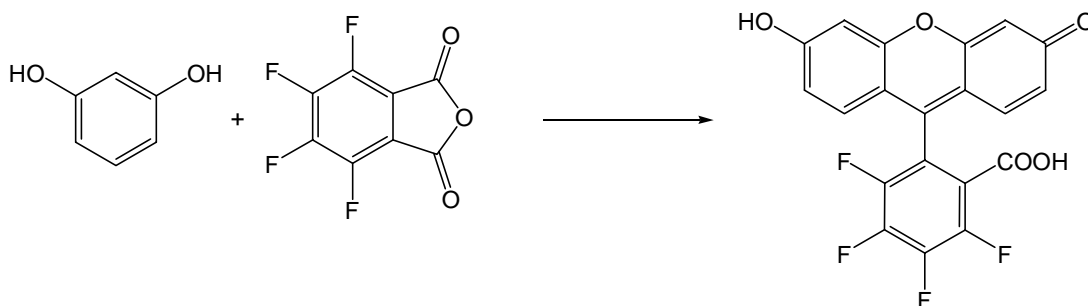
2',7'-difluorofluoresceína (4)



Se obtiene 2',7'-difluorofluoresceína como un sólido naranja. Rend. 95%

RMN-¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): 7,99 (H-4, 1H, *d*, *J* = 8,0), 7,81 (H-5 o 6, 1H, *t*, *J* = 6), 7,73 (H-5 o 6, 1H, *t*, *J* = 8), 7,28 (H-7, 1H, *d*, *J* = 6), 6,68 (H-4'y5', 2H, *d*, *J* = 8), 6,47 (H-1'y 8', 2H, *d*, *J* = 12). EM(ESI): (M+H)⁺ 369,3 calc. C₂₀H₁₀F₂O₅ 368,3

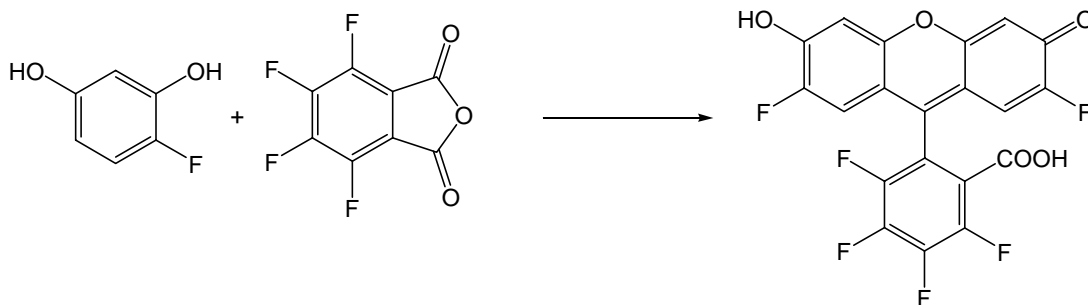
4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína (5)



Se obtiene 3,4,5,6-tetrafluorofluoresceína como un sólido rojo. Rend. 99%

RMN-¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): 6,99 (H-1' y 8', 2H, *d*, *J* = 8,0), 6,70 (H-4' y 5', 2H, *d*, *J* = 2,0), 6,60 (H-2' y 7', 2H, *dd*, *J* = 2,0 y 8,0. EM(ESI): (M+H) 405,3 calc. C₂₀H₈F₄O₅ 404,3

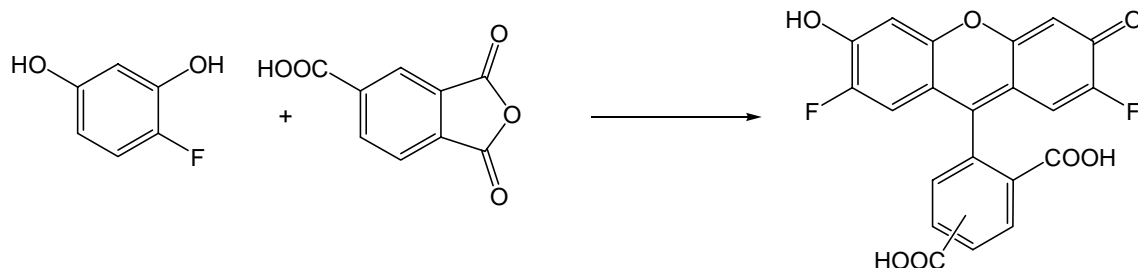
2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína (6)



Se obtiene 2',7',4,5,6,7-hexafluorofluoresceína como un sólido naranja. Rend. 80%.

RMN-¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): 7,11 (H-1' y 8', 2H, *d*, *J* = 10,0), 6,89 (H-4' y 5', 2H, *d*, *J* = 8,0. EM(ESI): (M-H)⁻ 439,0 calc. C₂₀H₆F₆O₅ 440,2

2',7'-difluoro-5(6)-carboxifluoresceína (3a, b)



Se obtiene 2',7'-difluoro-5(6)-carboxifluoresceína como un sólido rojo. Rend. 100%

RMN-¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): 8,39 (*H*-4, 1H, *s*), 8,29 (*H*-6 o *H*-7, 1H, *d*, *J* = 8,0), 8,23 (*H*-4 o *H*-5, 1H, *d*, *J* = 8,0), 8,09 (*H*-4 o *H*-5), 1H, *d*, *J* = 8,0), 7,69 (*H*-7, 1H, *s*), 7,39 (*H*-6 o *H*-7, 1H, *d*, *J* = 8,0), 6,88 (*H*-1', *H*-8', 4H, *d*, *J* = 8,0), 6,64 (*H*-4', 5' 2H, *d*, *J* = 10,0), 6,57 (*H*-4', *H*-5', 2H, *d*, *J* = 10,0). Las asignaciones en cursiva corresponden al isómero 5 y en imprenta al isómero 6. EM(ESI): (*M*-H)⁻ 411,1 calc. C₂₁H₁₀F₂O₇ 412,3

1.5.2 Determinación de las propiedades espectroscópicas

Espectroscopía de absorción: Los espectros de absorción en estado estacionario se adquirieron con un espectrofotómetro Kontron Uvikon 920 a temperatura ambiente (23°C) con 1 nm de resolución.

Espectroscopía de fluorescencia: Las determinaciones de fluorescencia en estado estacionario se realizaron con un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS50B a temperatura ambiente (23°C).

Determinación de los tiempos de vida de fluorescencia: los tiempos de vida fueron determinados según el método TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*) en un sistema Horiba Jobin Yvon IBH. La fuente de excitación utilizada fue un NanoLED N-01 Aqua de 495 nm y el detector TBX-04-A. Se dispuso un filtro de corte (Schott KV500) a la entrada del detector. Se utilizó una solución de sílica gel en agua como muestra dispersa (ludox).

El método se basa en que la probabilidad de detectar un fotón individual a un tiempo t luego del pulso de excitación es proporcional a la intensidad de fluorescencia en ese momento. La muestra es excitada por un pulso corto de luz y la respuesta fluorescente se registra en función del tiempo. La señal llega a un máximo y luego se convierte en la verdadera respuesta al pulso.

En la figura 1.19 se muestra un arreglo instrumental convencional para esta técnica. Un pulso eléctrico asociado con un pulso óptico es dirigido a través de un discriminador a la entrada INICIO de un conversor de tiempo-amplitud (TAC). Mientras tanto, la muestra es excitada y emite fluorescencia. El tubo fotomultiplicador detecta no más de un fotón por pulso de excitación. El pulso eléctrico correspondiente es dirigido hacia la entrada STOP del TAC, lo que genera un pulso de salida cuya amplitud es directamente proporcional al tiempo transcurrido entre la señal de INICIO y la de STOP. Luego de un número considerable de eventos de excitación y detección, se obtiene un histograma que representa la curva de decaimiento de fluorescencia. Es importante que el número de pulsos fluorescentes sea mucho menor que el número de pulsos de excitación ($< 0,01$ -

0,05 stops por pulso) de manera que la probabilidad de detectar dos fotones fluorescentes por pulso de excitación sea despreciable.

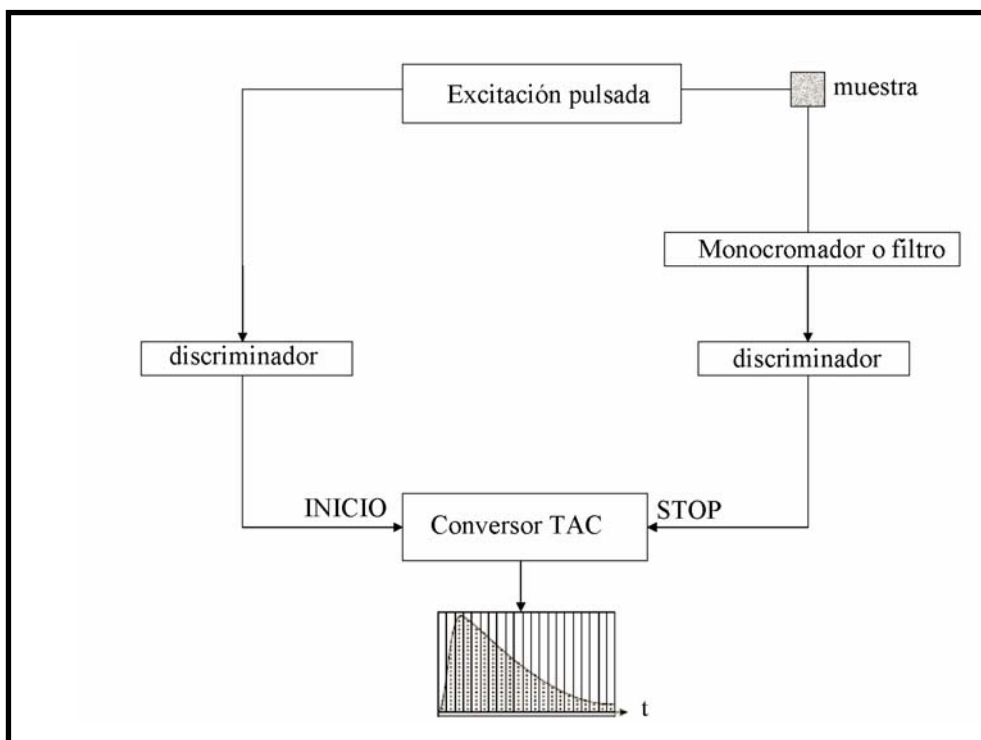


Figura 1.19. Diagrama esquemático del arreglo experimental para TCSPC.

La función de decaimiento observada, $F(t)$, es la convolución de la respuesta instrumental $R(t)$ y del decaimiento de la intensidad de fluorescencia $I(t)$ de la muestra:

$$F(t) = R(t) \otimes I(t)$$

$R(t)$ se determina experimentalmente. El análisis de los datos implica la determinación de los parámetros desconocidos en $I(t)$. La función de decaimiento se ajusta a una función que contiene una suma discreta de exponenciales:

$$I(t) = \sum \alpha_j \exp\left(\frac{-t}{\tau_j}\right)$$

donde α_j son las amplitudes y son proporcionales a la población del estado excitado que decae con τ_j . Para determinar las amplitudes y los tiempos de vida se aplica una reconvolución iterativa. Conociendo $F(t)$ y $R(t)$ se obtiene $I(t)$ por deconvolución de $F(t)$ utilizando el método de cuadrados mínimos no lineal. La descripción óptima es aquella que minimiza los residuales χ^2 . En general, el ajuste se considera aceptable cuando $0,99 < \chi^2 < 1,4$.

Se observó un decaimiento monoexponencial para la fluoresceína y sus análogos fluorados (Fig. 1.20).

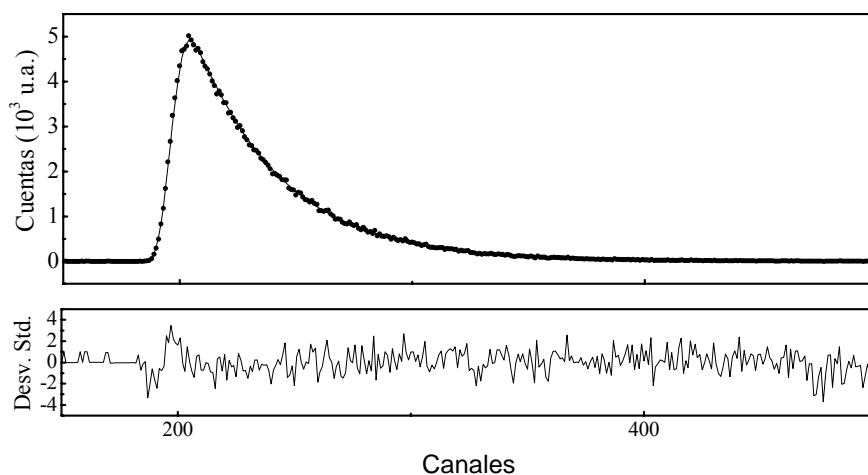


Figura 1.20. Decaimiento de la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína.

Preparación de las soluciones: para la determinación de los espectros de absorción se utilizó como solvente un buffer HEPES 20 mM, pH 7,4 en concentraciones de muestras tales que la absorbancia sea menor que 1. Para los tiempos de vida se utilizaron soluciones 10 μM en el mismo buffer. En todos los casos se utilizaron celdas de cuarzo de 10 y 3 mm de paso óptico, según fuera necesario.

1.5.3 Determinación de los rendimientos cuánticos de triplete:

Se determinaron en base a un método relativo a través de la medición de los rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singulete¹⁸ teniendo en cuenta la relación

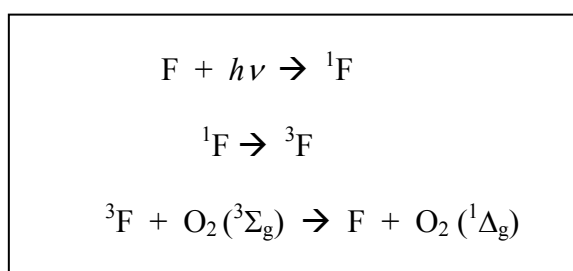
$$\Phi_{\Delta} = f_{\Delta} \cdot \Phi_T$$

con $f_{\Delta} = 1$.

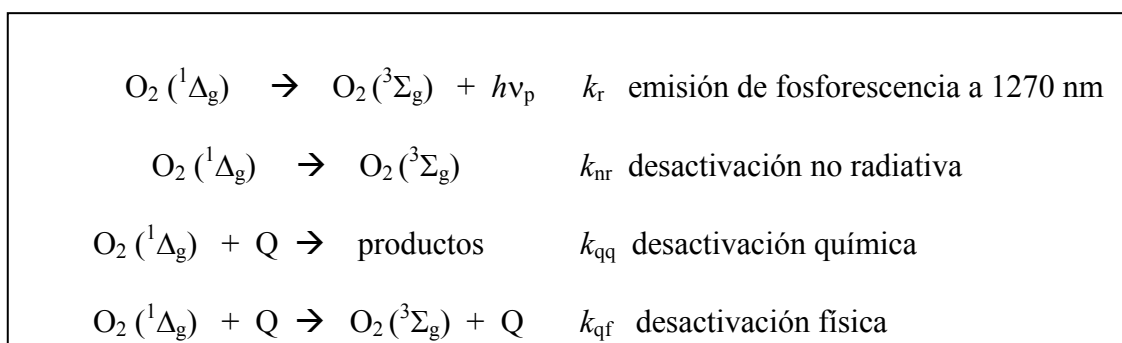
Se prepararon soluciones en metanol (5 μM) de los distintos fluoróforos a las que se agregó 9,10-dimetilantraceno (DMA) a una misma concentración final de 125 μM . La irradiación de las soluciones se llevó a cabo en un portacelda especialmente diseñado para el equipo utilizado que fue un espectrofotómetro de absorción de arreglo de diodos Hewlett-Packard 8452. El portacelda tiene un LED verde como fuente de excitación (máximo de emisión a 510 nm) el cual se dispone a 90° del haz monitor. El espectrofotómetro toma espectros en forma automática a distintos tiempos de fotólisis. El número de fotones absorbidos por cada fluoróforo, I_{abs} , se determinó según:

$$I_{\text{abs}} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I(\lambda) \cdot (1 - 10^{-\text{Abs}(\lambda)}) d\lambda \quad (1.8)$$

donde $I(\lambda)$ es el espectro de emisión del LED y $\text{Abs}(\lambda)$ es el espectro de absorción de cada fluoróforo. Por absorción de luz tienen lugar las siguientes reacciones y a la generación de oxígeno singlete:



Los mecanismos de desactivación de oxígeno singlete son:



El método determina la velocidad de desaparición del monitor, Q (DMA), que reacciona químicamente con $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$.

$$\frac{d[\text{O}_2(^1\Delta_g)]}{dt} = I_{\text{abs}} \cdot \Phi_{\Delta} \quad \text{vel. de formación de } \text{O}_2(^1\Delta_g) \quad \mathbf{1.10}$$

$$-\frac{d[\text{O}_2(^1\Delta_g)]}{dt} = k_d \cdot [\text{O}_2(^1\Delta_g)] + k_{\text{qq}} \cdot [\text{Q}] \cdot [\text{O}_2(^1\Delta_g)] \quad \text{vel. de desaparición de } \text{O}_2(^1\Delta_g) \quad \mathbf{1.11}$$

$$k_d = k_r + k_{\text{nr}}$$

$$-\frac{d\text{Q}}{dt} = k_{\text{qq}} \cdot [\text{Q}] \cdot [\text{O}_2(^1\Delta_g)] \quad \text{vel. de desaparición de Q} \quad \mathbf{1.12}$$

En el estado estacionario

$$I_{\text{abs}} \cdot \Phi_{\Delta} - k_d [\text{O}_2(^1\Delta_g)] - k_{\text{qq}} \cdot [\text{Q}] \cdot [\text{O}_2(^1\Delta_g)] = 0 \quad \mathbf{1.13}$$

$$[\text{O}_2(^1\Delta_g)]_{\text{ce}} = \frac{I_{\text{abs}} \cdot \Phi_{\Delta}}{k_d + k_{\text{qq}} \cdot [\text{Q}]} \quad \mathbf{1.14}$$

$$-\frac{d\text{Q}}{dt} = \frac{k_{\text{qq}} \cdot [\text{Q}] \cdot I_{\text{abs}} \cdot \Phi_{\Delta}}{k_d + k_{\text{qq}} \cdot [\text{Q}]} \quad \mathbf{1.15}$$

A bajas concentraciones de Q vale que $k_d \gg k_{\text{qq}} \cdot [\text{Q}]$ entonces

$$-\frac{d\text{Q}}{dt} = \frac{k_{\text{qq}} \cdot [\text{Q}] \cdot I_{\text{abs}} \cdot \Phi_{\Delta}}{k_d} \quad \mathbf{1.16}$$

$$\ln(Q/Q_0) = \frac{k_{qq} \cdot I_{abs} \cdot \Phi_{\Delta} \cdot t}{k_d} \quad 1.17$$

y se observa una cinética de primer orden. Si la desaparición de Q se mide para cada fluoróforo, manteniendo iguales las condiciones para todos, entonces el cociente de las pendientes del gráfico de $\ln(Q/Q_0)$ vs t corregidas por la I_{abs} para cada fluoróforo (ecuación 1.18), da una escala relativa de los valores de rendimiento cuántico de oxígeno singlete para cada compuesto.

$$\Phi_{\Delta}^X = \Phi_{\Delta}^{Ref} \frac{\text{pendiente}^X \cdot I_{abs}^{Ref}}{\text{pendiente}^{Ref} \cdot I_{abs}^X} \quad (1.17)$$

1.5.4 Fotoestabilidad

La fuente de alta potencia utilizada fue un irradiador (Lumatec Superlite SUV-DC-P), equipado con una lámpara de arco de Hg (200W DC Super Pressure Short Arc Mercury) y salida acoplada por fibra óptica. El irradiador cuenta con selector de tiempo de apertura del mismo y dos filtros de banda ancha que seleccionan entre el visible y el UV. El mismo fue utilizado con el agregado de un filtro de banda ancha Schott BG18 para seleccionar la luz de irradiación. Para estimar la potencia de la luz se utilizó un potenciómetro Ophir Nova con un detector PD-300-UV (Ophir Optronics, Jerusalem, Israel). La potencia de la lámpara fue de 70 mW/cm².

El fotoblanqueo se monitoreó por disminución de la fluorescencia luego de distintos tiempos de exposición a la fuente de irradiación con un sistema espectrofotométrico de fibra óptica Ocean Optics cuya fuente de excitación para absorción y fluorescencia es una lámpara de deuterio-tungsteno DT1000A y la detección fue realizada con un espectrofotómetro serie dual de fibra óptica SD2000 optimizado para detección en la región espectral de 250-800 nm.

Preparación de las soluciones: se utilizó como solvente un buffer HEPES 20 mM, pH 7,4 en concentraciones de muestras tales que la absorbancia sea menor que 0,1.

Tratamiento de datos: el porcentaje de fotoblanqueo informado se expresa como el porcentaje de fluorescencia que se pierde luego del tiempo total de irradiación (35 minutos) tomando la intensidad a los respectivos máximos de emisión.

1.5.5 Fotólisis flash inducida por láser

El diagrama esquemático del equipo utilizado se muestra en la figura 1.21. El equipo utiliza una lámpara de xenón (HLX 150 W) como haz monitor. Para eliminar la radiación IR proveniente de la lámpara, se hizo pasar la luz por un filtro de agua de 10 cm de paso óptico. Para alinear este haz se utilizaron lentes de cuarzo. Frente a la lámpara se colocó un diafragma y posteriormente una lente de distancia focal corta cuyo foco coincide con el diafragma, de forma que se obtiene un haz casi paralelo a la salida de la lente. Luego de que el haz pasa por el filtro IR se colocó una lente de 10 cm

de distancia focal de forma tal que el haz monitor posea una forma cilíndrica de aproximadamente 2 mm de diámetro durante todo el trayecto en la solución y una lente ($d = 10$ cm) para focalizar el haz monitor en la rendija de entrada del monocromador.

Se utilizó un láser de Nd:YAG (Spectron) como fuente de excitación, sintonizado a 532 o a 266 nm, según la muestra. Como sistema de detección se usó un tubo fotomultiplicador (Hamamatsu R666). La señal se adquirió con un osciloscopio digital Hewlett-Packard 54504 y se transfirió a la computadora vía una interfase HPIB. La lámpara de xenón emite radiación de forma continua lo que disminuye notablemente la cantidad de luz que puede recibir el tubo fotomultiplicador (PMT) antes de saturarse; por lo tanto, delante del portamuestra se coloca un obturador controlado electrónicamente, que permite que la luz continua de la lámpara llegue a la muestra y al tubo fotomultiplicador durante un período de tiempo pequeño (\sim ms), obteniendo de esta forma un haz monitor pulsado.

Para obtener la señal de absorción de una especie transitoria con tiempo de vida del orden de los ms o μ s, se lleva a cabo el siguiente procedimiento: se ilumina la muestra con la luz de análisis durante un tiempo determinado para obtener una línea de base (S_0 , Fig. 1.22) en el sistema de detección. Un instante después de la apertura de esta ventana temporal se realiza el disparo sincronizado del láser, que incide en la muestra en forma perpendicular al haz de análisis generando la especie transitoria de interés. Esta especie absorbe parte de la luz de análisis produciendo una disminución en la intensidad de la señal correspondiente a la línea de base (S_0) (Fig. 1.22).

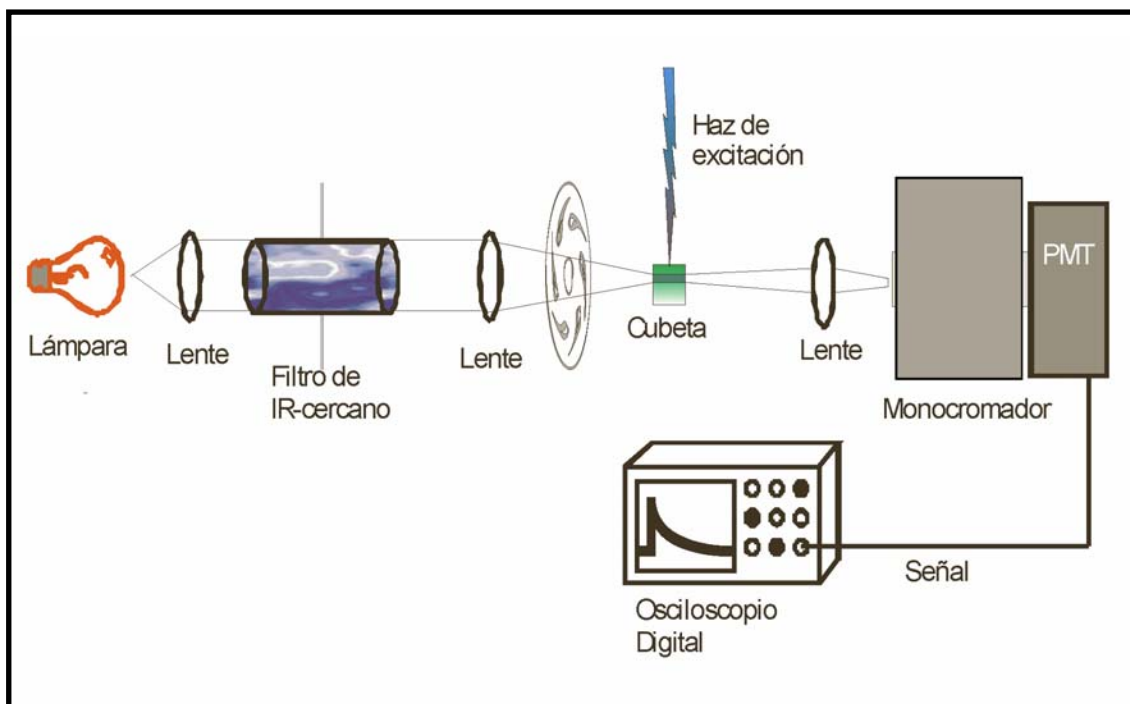


Figura 1.21. Arreglo experimental del equipo de Láser Flash Fotólisis

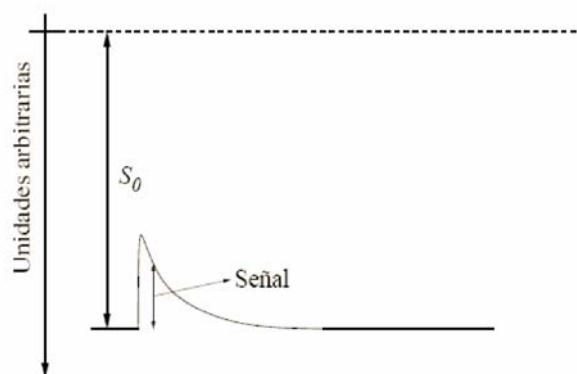


Figura 1.22. Determinación de la absorbancia de una especie transitoria

Por lo tanto, observando el comportamiento de la señal del haz monitor, es posible medir la aparición y/o desaparición de las especies generadas directamente por el pulso láser o de compuestos que se forman como consecuencia de la reacción fotoquímica y cuyo tiempo de vida media se encuentra en los μs .

Preparación de las soluciones: se utilizó como solvente un buffer fosfato 10 mM, pH 7,75 en concentraciones de muestras 50 μM , las cuales fueron saturadas con argón.

Fotólisis flash de 2',7', 4, 5, 6, 7 -hexafluorofluoresceína en presencia de p-fenilendiamina: este experimento se realizó a fin de asignar las bandas de absorción en el espectro de especies transitorias de este fluoróforo. Se utilizó *p*-fenilendiamina (PD) como dador de electrones que al reaccionar con el fluoróforo en el estado excitado triplete lleva a la formación del catión radical de la amina (320 nm) y del anión radical del fluoróforo (400 nm). Se preparó una solución de fluoróforo 50 μM que se hizo reaccionar con una solución 419 mM de PD. Las soluciones fueron preparadas en buffer fosfato 10 mM, pH 7,75 y se utilizó el láser sintonizado a 532 nm (Fig. 1.23)

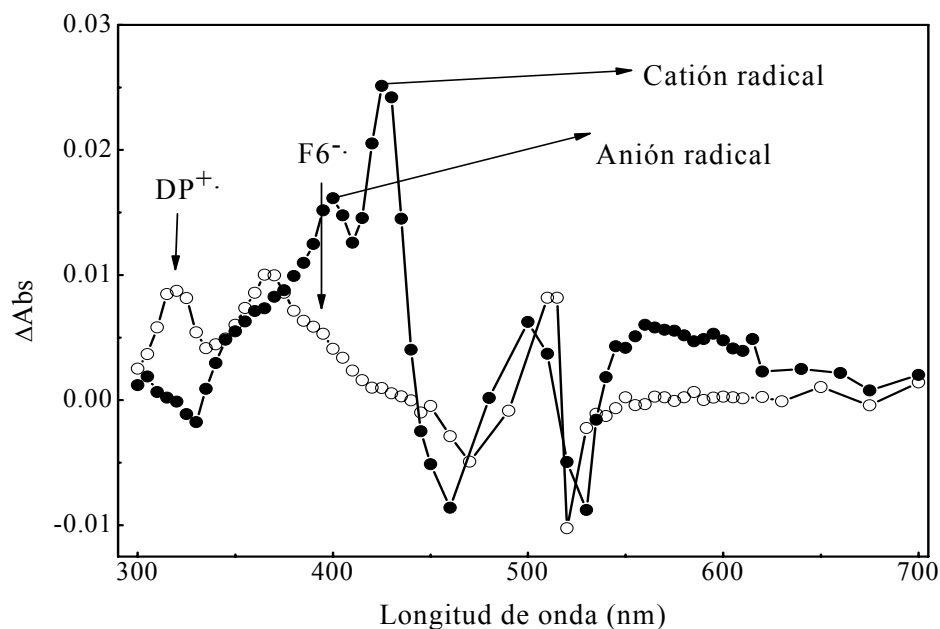


Figura 1.23. Espectros de absorción de los especies transitorias del análogo hexafluorado (F6) en presencia (○) y ausencia (●) de *p*-fenilendiamina (PD) luego de 100 μs de aplicado el pulso láser.

1.5.6 Cálculos teóricos

Para la estimación de las energías de los orbitales de frontera en la discusión de la sección 1.2, se utilizaron cálculos semiempíricos con el método PM3 implementado en HyperChem 7.5.

Optimización de las geometrías del estado fundamental: se utilizaron cálculos *ab initio* con la teoría de DFT implementado en Gaussian 03 {M. J. Frisch #143}. Se eligió el funcional BP86 y la base 6-31G**. Para poder comparar variaciones en los parámetros

geométricos más relevantes entre el estado fundamental y el estado excitado, es necesario que ambas minimizaciones se realicen por el mismo método, de manera que también se optimizaron las estructuras del estado fundamental por el método Hartree-Fock (HF) con la misma base.

Optimización de geometrías del estado excitado: se utilizó el método Hartree-Fock/CIS y la base 6-31G** implementado en Gaussian 03.

Cálculo de los espectros electrónicos: se realizaron con el método TDDFT (*Time Dependent Density Functional Theory*). Se hicieron dos cálculos, en fase gaseosa y en fase condensada. Para este último caso, se utilizó el modelo SCRF-PCM (*Self Consistent Reaction Field - Polarized Continuum Model*) con los parámetros apropiados para agua como solvente, implementado en Gaussian 03.

Los programas soporte utilizados para la manipulación y visualización de los datos fueron: HyperChem 7.5, Chem3D Ultra 7.0 (del paquete ChemOffice 2000), Molekel 4.3²⁷ y GausSum 0.9.

1.6 REFERENCIAS

1. von Bayer A. *Chem. Ber.* 1871, 5, 255.
2. Lindqvist L. *Arkiv för Kemi.* 1960, 16, 79-138.
3. Weber G., Teale F.W.J. *Trans. Faraday Soc.* 1958, 54, 640.
4. Tsien R.Y., Waggoner A. *Fluorophores for confocal microscopy.* 1995, Plenum Press. New York.
5. Chapple M. R., Johnson G. D., Davidson R. S. *J. Microsc.-Oxf.* 1990, 159, 245-253.

6. Chen R.F., Knutson J.R. *Anal.Chem.* 1988, 172, 61-77.
7. Zuk R.F., Rowley G.L., Ullman E.F. *Clinical Chem.* 1979, 25, 1554-1560.
8. Yagupolskii L.M., Gandelsman L.Z. *Russ.Chem.Rev.* 1983, 52, 993-1009.
9. Renikuntla B.R., Rose H.C., Eldo J., Waggoner A.S., Armitage B.A. *Org.Lett.* 2004, 6, 909-912.
10. Sun W., Gee K.R., Klaubert D.H., Haugland R.P. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 6469-6475.
11. Urano Y., Kamiya M., Kanda K., Ueno T., Hirose K., Nagano T. *J.Am.Chem.Soc.* 2005, 127, 4888-4894.
12. Mottram L.F., Boonyarattanakalin S., Kovel R.E., Peterson B.R. *Org.Lett.* 2006, 8, 581-584.
13. Gee K.R., Sun W., Klaubert D.H., Haugland R.P., Upson R.H., Steinberg T.H., Poot M. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 7905-7908.
14. Jovin T.M., Arndt-Jovin D.J., Marriott G., Clegg R.M., Robert-Nicaud M., Schormann T. *Distance, wavelength & time: the versatile 3rd dimensions in light emission microscopy.* 1990, 575-602. Wiley-Liss. New York.
15. Song L., Hennink E.J., Young T., Tanke H.J. *Biophys.J.* 1995, 68, 2588-2600.
16. Soep B., Kellmann A., Martin M., Lindqvist L. *Chem.Phys.Lett.* 1972, 13, 241-244.
17. Kasche V., Lindqvist L. *J.Phys.Chem.* 1964, 68, 817-823.
18. Gandin E., Lion Y., Van de Vorst A. *Photochem.Photobiol.* 1983, 37, 271-278.
19. Amat-Guerri F., Lopez-Gonzalez M.M.C., Martinez-Utrilla R. *J. Photochem. Photobiol. A.* 1990, 53, 199-210.

20. Tanaka K., Miura T., Umezawa N., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, *123*, 2530-2536.
21. Yamaguchi K., Tamura Z., Maeda M. *Acta Crystallogr. Sect. C - Cryst. Struct. Commun.* 1997, *53*, 284-285.
22. Miura T., Urano Y., Tanaka K., Nagano T., Ohkubo K., Fukuzumi S. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 8666-8671.
23. Georgieva I., Trendafilova N., Aquino A., Lischka H. *J. Phys. Chem. A.* 2005, *109*, 11860-11869.
24. M. J. Frisch G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople; Gaussian 03, Revision A.1, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

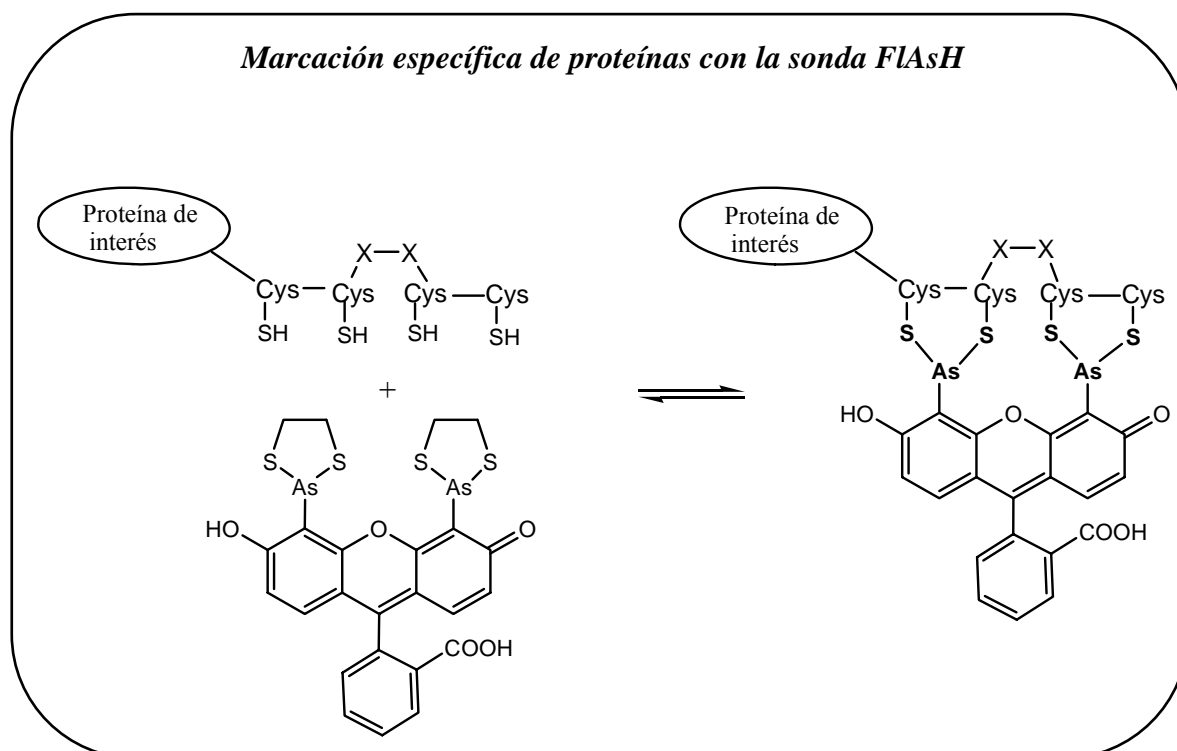
25. Armarego W.L.F., Perrin D.D. *Purification of laboratory chemicals*. 1988, 4th Ed., Pergamon Press. Oxford.
26. Rossi F.M., Kao J.P.Y. *Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 495-497.
27. Portmann Stefan, Lüthi Hans Peter. *Chimia*. 2000, 54, 766-770.

CAPÍTULO 2
Derivados Biarsenicados

2.1 INTRODUCCIÓN: ANTECEDENTES Y FUNDAMENTOS

La estrategia de marcación específica de proteínas basada en el sistema *sonda biarsenicada-motivo tetracisteína*¹ fue introducida por el grupo de Roger Tsien en el año 1998 como alternativa a las proteínas fluorescentes (PF). Si bien estas últimas se utilizan exitosamente para marcación específica, no son adecuadas si se quiere marcar una proteína pequeña o péptido. Existe la posibilidad de que se vea afectada la función de la biomolécula debido a que las proteínas fluorescentes son, en general, más voluminosas (>220 aminoácidos) que la proteína blanco a la que se fusionan. Por lo tanto, es deseable trabajar con moléculas pequeñas que se puedan utilizar para marcar con la misma especificidad que las PF pero con la ventaja de un menor impedimento estérico, mayores velocidades de unión y una emisión de fluorescencia en la zona del rojo del espectro, para minimizar el daño celular.

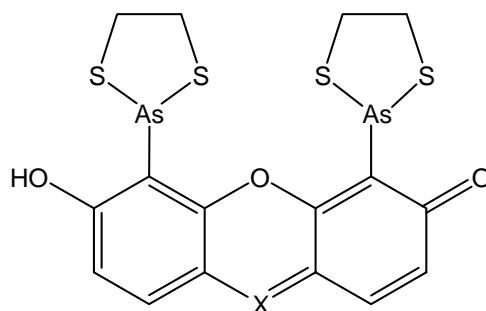
En esta estrategia, una proteína recombinante con la secuencia peptídica CCPGCC añadida por fusión genética, es expresada en una célula viva y puede ser marcada específicamente con un colorante biarsenicado derivado de fluoresceína llamado FIAsh (**F**luorescein **A**rsenical **H**elix). Se forma así un complejo covalente en el cual cada átomo de arsénico de la sonda se une cooperativamente a un par de cisteínas adyacentes en la secuencia, con alta afinidad.



Al momento de la realización de este trabajo, han sido reportados distintos derivados biarsenicados con variadas características espectrales² (Figura 2.1).

Los ligandos biarsenicados son permeables a la membrana plasmática y se administran a células vivas junto con 1,2-etanoditiol (EDT) para minimizar la toxicidad protegiendo los sulfhidrilos endógenos de los arsénicos. Las sondas “apagadas” poseen muy poca luminiscencia hasta que se unen a la secuencia blanco, luego de lo cual se tornan fuertemente fluorescentes. Por esta característica, se las llama fluorogénicas.

La fluorogenicidad obtenida es una característica muy interesante ya que permite minimizar las señales de marcación inespecífica (background), aumentando la sensibilidad y el límite de detección.



Compuesto	Sustituyente X	$\lambda_{abs}/\lambda_{em}$ (nm)	Rend. cuántico
FlAsH-EDT ₂	C-C ₆ H ₄ COOH	508/530	0,50
ReAsH-EDT ₂	N	593/608	0,20
HoXAsH-EDT ₂	CO	380/430	0,12

Figura 2.1. Derivados biarsenicados para marcación específica²

Estas sondas han sido aplicadas en variadas investigaciones entre las que podemos mencionar estudios de marcación secuencial (“*pulse-chase*”) para determinar el ciclo de vida de la conexina-43, principal componente de los canales de unión intercelulares³ y estudios sobre la inactivación espacio-temporal de proteínas con técnicas de inactivación por luz asistida por cromóforos (CALI, *chromophore assisted light inactivation*)⁴, entre otros trabajos relevantes⁵⁻⁹.

Además, esta metodología facilita la obtención de imágenes tanto en el microscopio de fluorescencia como en el microscopio electrónico. Esto es porque el derivado biarsenicado del fluoróforo resorufina (ReAsH, Fig 2.1) genera oxígeno singlete bajo condiciones de iluminación intensa. En presencia de diaminobencidina,

se produce la polimerización localizada en muestras fijadas transformándose en un precipitado insoluble el cual puede ser tratado con tetróxido de osmio para su visualización en el microscopio electrónico³.

Algunas de las ventajas de esta metodología de marcación específica son¹⁰:

- el gran aumento de fluorescencia del derivado biarsenicado luego de la unión al péptido
- el pequeño tamaño de la secuencia de tetracisteína (entre 6 y 12 aminoácidos), que permite su fusión no sólo al extremo N o C terminal sino también en posiciones intermedias, sin interferir con la función de la proteína
- la estabilidad del complejo formado con alta afinidad
- la resistencia del complejo formado al tratamiento para realizar un SDS-PAGE

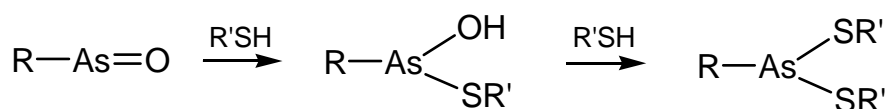
Respecto de la comparación de la metodología FIAsh-tetracisteína con las proteínas fluorescentes (PF), en la tabla 2.1 se presentan los aspectos más relevantes.

Tabla 2.1. Comparación entre las proteínas fluorescentes y el sistema tetracisteína-biarsenicado²

	<i>Proteínas autofluorescentes</i>	<i>Sistema tetracisteína-biarsenicado</i>
<i>Longitud del péptido</i>	238-900 aa	6-12 aa
<i>Generación de señal fluorescente</i>	Minutos a días	Segundos a minutos
<i>Requerimientos</i>	Presencia de oxígeno	Cisteínas reducidas
<i>Aspectos tóxicos</i>	Generación de H ₂ O ₂	Presencia de antídotos ditiolados
<i>emisión</i>	Azul al rojo	Azul al rojo
<i>Coeficientes de extinción (10³ M⁻¹ cm⁻¹)</i>	20-60	30-80
<i>Rendimientos cuánticos</i>	0,2-0,8	0,1-0,8
<i>Resistencia al fotoblanqueo</i>	Baja a muy alta	Baja a buena
<i>Resistencia a electroforesis desnaturante (SDS)</i>	Ninguna a baja	buena
<i>Marcación multicolor simultánea de distintas proteínas</i>	sí	sí

2.1.1 Compuestos organoarsenicales

Los arsenóxidos, R-AsO, son conocidos inhibidores enzimáticos y su actividad biológica se debe a la facilidad con que el grupo arsenóxido reacciona con los grupos -SH, de forma específica¹¹. En general, el resto de la molécula (R) no participa en la reacción pero influye en sus propiedades, especialmente en lo que se refiere a la permeabilidad celular, solubilidad y características redox del arsenóxido. La interacción entre el arsenóxido y el tiol se puede visualizar como una adición progresiva, en dos etapas:



o como un reemplazo simultáneo del átomo de oxígeno, siendo en este caso, el ácido arsonoso la forma reactiva:



A partir del estudio de la hidrólisis de tioarsinitas [R-As-(SR')₂] de lewisita con diferentes monotioles, ditioles y proteínas¹¹, se observó una mayor estabilidad de los compuestos formados con los ditioles respecto de las monotioarsinitas y los complejos con las proteínas.

muchas enzimas que utilizan disulfuros activos en procesos redox. En éstos, la transferencia de electrones ocurre en forma cíclica entre la forma reducida del ditiol y la forma oxidada disulfuro. Este efecto tóxico se puede revertir en presencia de pequeños ditiolos como el BAL (British Anti-Lewisite, 2,3-dimercaptopropanol) o el EDT (1,2-etanoditiol), que forman complejos más afines con los arsenicados que los ditiolos celulares (Fig. 2.2).

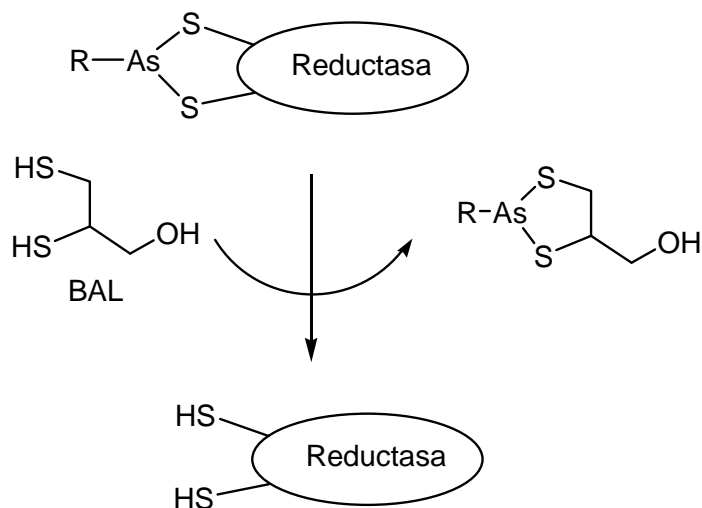


Figura 2.2. Reversión de la toxicidad de un compuesto trivalente de arsénico por el antídoto 2,3-dimercaptopropanol (BAL)

Los compuestos pentavalentes de arsénico, en cambio, son tóxicos por su similitud con el fosfato¹² ya que son introducidos en la célula por el transportador de fosfato, que no puede distinguir entre ambos. Intracelularmente, el arsenato puede

sustituir al fosfato como sustrato de las quinasas, generando ésteres de arsenato que se hidrolizan espontáneamente. El resultado neto es la disipación de energía.

La reactividad de un grupo $-SH$ en una proteína varía con la localización de dicho grupo. Los arsenicales voluminosos están impedidos de llegar a ciertos $-SH$ y también, la densidad electrónica del entorno influye en el acercamiento de los arsenicales cargados. Es poco probable que un mismo compuesto arsenicado pueda reaccionar con grupos $-SH$ de distintas proteínas, debido a los factores estéricos y electrostáticos, que desfavorecen esta situación.

La idea original de Tsien y col., se basó en el diseño de un pequeño péptido receptor que pueda ser fusionado genéticamente a una proteína de interés y que sirva como blanco de una sonda arsenicada. El péptido debía contener cuatro cisteínas en su secuencia, de manera de proveer dos sitios de unión para una molécula que contenga dos arsénicos trivalentes. Al haber dos sitios de interacción arsénico-ditiol, se esperaba conseguir una mayor afinidad que la que se tiene a través una interacción simple. Esto fue necesario ya que, la marcación inespecífica por unión del compuesto biarsenicado con ditioles endógenos se minimizaría con la administración conjunta de pequeñas cantidades de una molécula pequeña de ditiol. Para ello, la distancia entre los dos pares de cisteínas debía coincidir con el espaciamiento de los arsénicos, de manera que las dos interacciones arsénico-ditiol resulten cooperativas y entrópicamente favorables.

2.1.2 La secuencia peptídica

La secuencia peptídica blanco original¹ se diseñó de manera tal de favorecer la inserción de la sonda biarsenicada en las posiciones i , $i+1$, $i+4$, $i+5$, de una hélice α (Fig. 2.3).

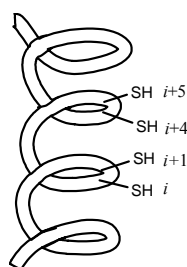


Figura 2.3. Esquema de una hélice α blanco de una sonda biarsenicada.

Uno de los problemas que surgieron en las primeras aplicaciones de estas sondas fue el alto grado de marcación inespecífica que se observaba^{2,13}. Al profundizar en este aspecto se encontró que al introducir prolina (P) y glicina (G) entre los pares de cisteínas, se formaban complejos con mayor afinidad y mayor estabilidad respecto de aquellos que contenían otros aminoácidos en su secuencia². Se cree que el aumento en la afinidad se debería a una pre-organización de las cuatro cisteínas en una estructura tipo “*hairpin*” o hebilla en lugar de una hélice α , al menos para la secuencia CCPGCC. El aumento en la afinidad de la unión que se determinó para esta secuencia (\sim pM) *in vitro* e *in vivo*, sugiere que una vez introducida la sonda en la célula, la fluorescencia por formación del complejo debería observarse unos pocos segundos después de que haya tenido lugar la biosíntesis de la proteína blanco.

Recientemente se investigaron distintas variantes de los residuos que rodean al motivo tetracisteína, a fin de obtener una secuencia optimizada¹⁴. Se encontró que las secuencias FLNCCPGCCMEP y HRWCCPGCCKTF formaban complejos con mayor rendimiento cuántico y mayor afinidad hacia la sonda, lo que aumenta la tolerancia a los lavados con tioles competidores, sin pérdida sustancial de la marcación específica. Hay que destacar que estos experimentos se realizaron directamente en células vivas. Además, estas secuencias con motivos tetracisteína optimizados, mantuvieron sus propiedades una vez fusionados a GFP o β -actina, en estudios realizados con células de mamíferos¹⁴. Los autores sugieren que en estas secuencias los residuos aromáticos podrían “proteger” al complejo de los ditioles competidores.

Un segundo problema que también influye en la relación señal/ruido se debe a la baja fotoestabilidad que presenta la sonda FIAsh al ser un derivado de la fluoresceína.

En este trabajo abordamos este problema, llevando a cabo la síntesis y el estudio de las características fotofísicas de nuevos derivados biarsenicados fluorados, en base a las convenientes propiedades que presentan los fluoróforos precursores, discutidas en el capítulo 1.

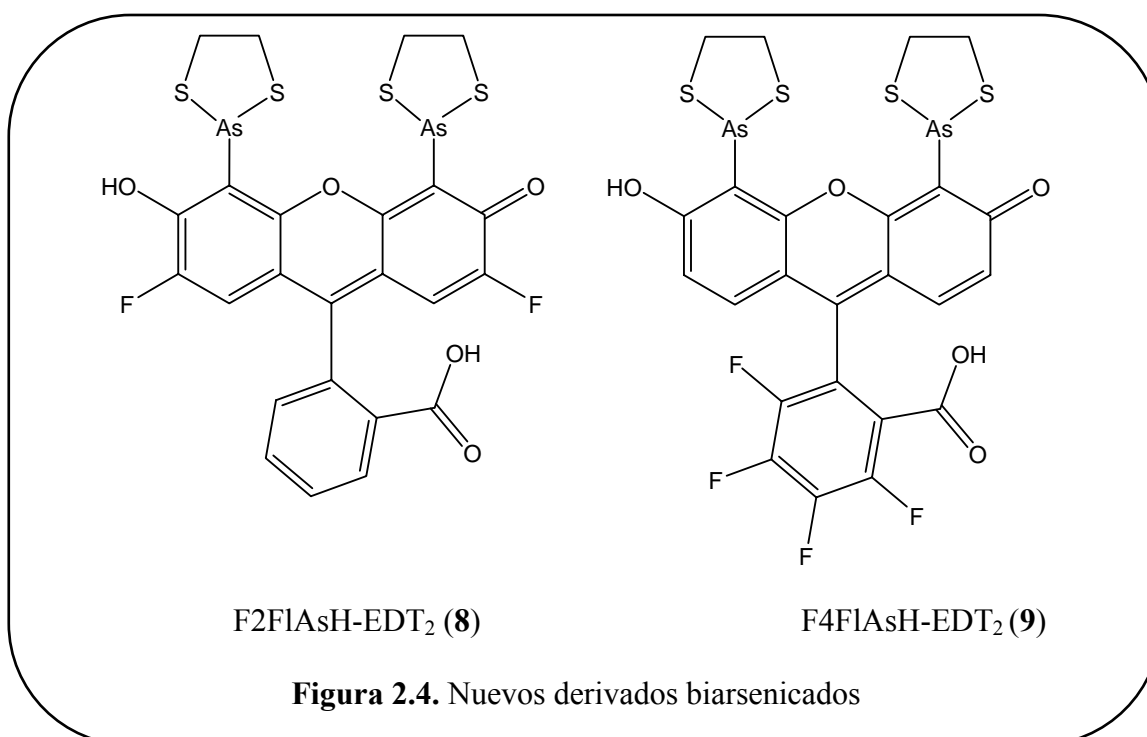
2.2 DERIVADOS FLUORADOS DE FIAsh

Si bien la sensibilidad frente a cambios en el microentorno del FIAsh-EDT₂ o de los complejos FIAsh-CCPGCC no había sido estudiada hasta este trabajo, la similitud estructural y espectroscópica entre el FIAsh-EDT₂ y la fluoresceína sugiere una correlación en este aspecto. Además, las diferencias observadas a lo largo de los

distintos estudios sobre la optimización de la secuencia blanco, indican que las propiedades de fluorescencia de los complejos son altamente dependientes del microentorno.

Las propiedades espectroscópicas de los análogos fluorados de la fluoresceína discutidas en el capítulo 1, nos llevó a encarar la síntesis y aplicación de los correspondientes derivados biarsenicados. La idea fue obtener sondas de características superiores que generen complejos FIAsh-péptido con mayores rendimientos cuánticos de fluorescencia, mayor fotoestabilidad y menor dependencia a las variaciones de pH en el rango fisiológico, tal como se observara en los fluoróforos precursores.

Hemos logrado sintetizar dos nuevos compuestos biarsenicados fluorados (Fig. 2.4), los cuales presentan las características esperadas y también una serie de propiedades interesantes que dieron lugar a estudios adicionales.



Para cada una de las nuevas sondas se estudiaron sus propiedades fotofísicas, siempre en comparación con el compuesto FIAsh original. También se estudiaron aspectos relevantes de la cinética de formación del complejo FIAsh-péptido *in vitro*.

2.2.1 Síntesis de FIAsh, F2FIAsh y F4FIAsh

El ligando biarsenicado 4',5'-Bis(1,2,3-ditioarsolan-2-il)fluoresceína, FIAsh-EDT₂ se sintetiza en dos pasos a partir de fluoresceína (Fig 2.5). En la primera etapa se obtiene el producto mercuriado en las posiciones 4' y 5' para luego llevar a cabo la transmetalación de estos átomos de mercurio por arsénico, en presencia de Pd(AcO)₂ como catalizador. Se obtiene así la 4',5'-bis(dicloroarsina)fluoresceína, la cual se hace reaccionar directamente con etanoditiol (EDT) para llegar al compuesto final.

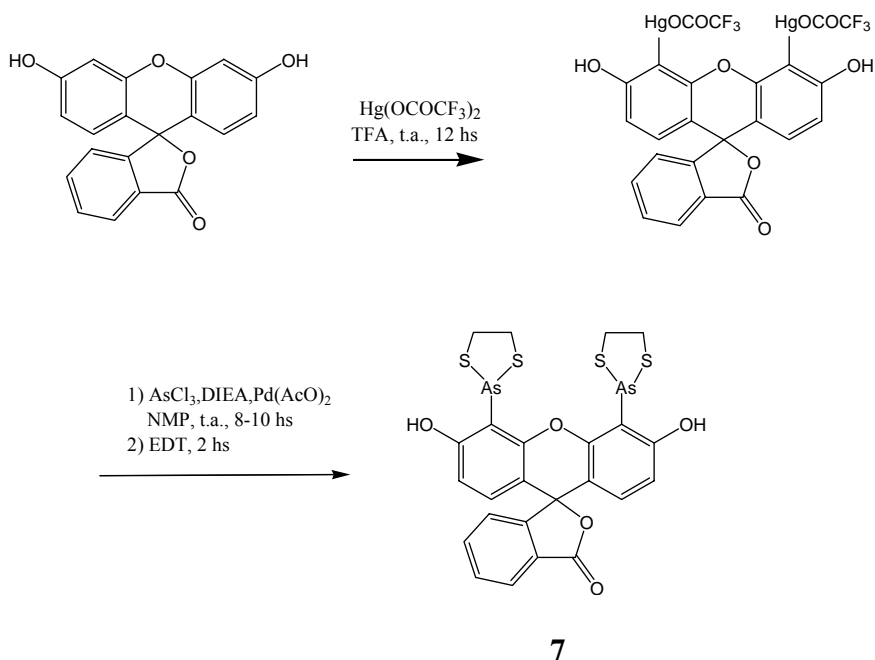


Figura 2.5. Ruta sintética de FIAsh

La sustitución electrofílica ocurre en las posiciones 4' y 5' de la fluoresceína. Ha sido sugerido¹⁵ que esto se debe a que el intermediario de reacción I (Fig. 2.6) tiene una estabilización por resonancia tipo naftaleno, energéticamente más favorable que el intermediario con estructura quinoide que se produce por ataque en la posición 7' (II).

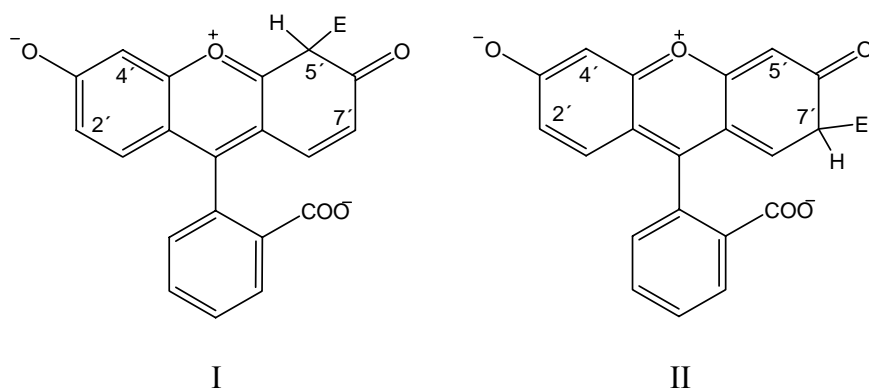


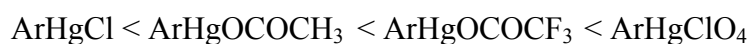
Figura 2.6. Sustitución electrofílica sobre la fluoresceína

La posición sobre la que ocurre el ataque electrofílico ha causado confusión en la literatura, e incluso en el catálogo de Aldrich se muestra la estructura de la fluoresceína dimercuriada en las posiciones 2' y 7' cuando en el espectro de RMN-¹H del compuesto comercial se puede apreciar claramente el acoplamiento *orto* de los hidrógenos 1'-2' y 7'-8', indicando que la sustitución ocurre en las posiciones 4' y 5'.

Los compuestos organomercuriales son valiosos intermediarios sintéticos, especialmente en las síntesis de otros organometálicos, en las que se los usa como intermediarios en reacciones de transmetalación. Entre sus ventajas se cuentan una alta estabilidad térmica y química al aire, al agua y frente a ácidos y bases, lo que permite su utilización en variadas condiciones de reacción. La mayor desventaja es, por

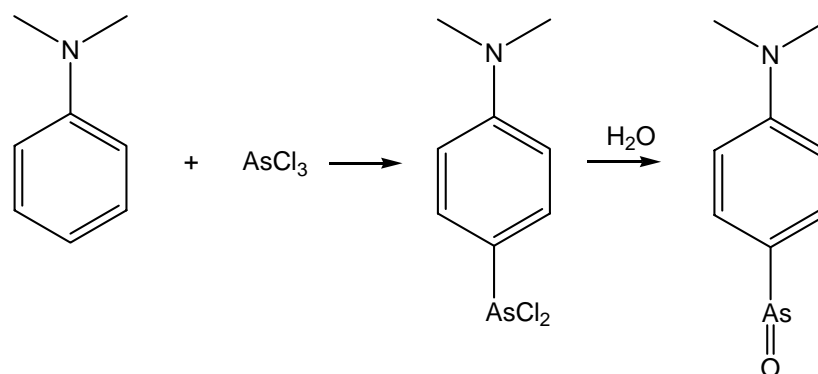
supuesto, la alta toxicidad de los mercuriales más volátiles. Sin embargo, los mercuriales aromáticos, especialmente los heterocíclicos, resultan ser muy poco volátiles y prácticamente insolubles en los solventes comunes y por lo tanto menos peligrosos que los alifáticos¹⁶. La poca solubilidad de estas moléculas, impide una purificación satisfactoria lo que dificulta un análisis estructural apropiado.

La mercuriación directa de sistemas aromáticos es simple y los productos mercuriados que se obtienen son de fácil clivaje¹⁶. La eficiencia de la mercuriación depende de la reactividad del anillo al ataque electrofílico y de la electrofilicidad de la sal de mercurio(II) que se utilice: HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{OCOCH}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{OCOCF}_3)_2$ y $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$. Los productos que se obtienen tienen el siguiente orden creciente de reactividad frente al ataque de otro electrófilo:



En este trabajo se obtuvieron los derivados mercuriales de las fluoresceínas con $\text{Hg}(\text{OCOCF}_3)_2$, generado *in situ* a partir de HgO y ácido trifluoroacético (TFA), a temperatura ambiente, durante 10 horas. Este método resulta más práctico que aquel que utiliza $\text{Hg}(\text{OCOCH}_3)_2$ en ácido acético², debido a la fácil eliminación de TFA por volatilización. Además, en estas condiciones la reacción es aproximadamente 10^5 veces más rápida que en ácido acético como solvente¹⁷. Los productos se precipitan con agua del medio de reacción, se secan adecuadamente y se utilizan sin posterior purificación.

El ataque electrofílico del arsénico trivalente en sistemas aromáticos ha sido reportado para la reacción de anilina o fenol con trióxido de arsénico o tricloruro de arsénico, de la que se obtiene el producto *para* sustituido¹⁸. La sustitución ocurre en *orto* si la posición *para* está bloqueada.



En esta Tesis se trabajó con gran exceso de cloruro de arsénico (III), en presencia de Pd(AcO)₂ y diisopropiletilamina (DIPEA), con *N*-metilpirrolidinona (NMP) como solvente, a temperatura ambiente, en atmósfera inerte. Los tiempos de reacción fueron entre 8 y 10 horas, luego de las cuales, se cortó la reacción con una mezcla de acetona y buffer fosfato a pH 7 para luego adicionar el etanoditiol (EDT) en gran exceso. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna utilizando Florisil[®] como fase estacionaria ya que encontramos que resultó ser más inerte y se perdió menos material durante la purificación que cuando se utilizó sílica gel. Esto mejoró levemente el rendimiento y requirió menor cantidad de solvente de elución. El paso de purificación es bastante delicado, teniendo en cuenta que la mayoría de las impurezas corresponden a grandes cantidades de aductos de arsénico y mercurio con el

EDT que resultan en siembras sobrecargadas. Las fracciones eluidas, además, no pueden ser sometidas a sequedad total *in vacuo* ya que es posible que se remueva el EDT, generando el arsenóxido el cual tiende a polimerizar cuando está concentrado, dando un material gomoso e insoluble. Debido a esto, se tratan cuidadosamente las fracciones de interés con mezclas de etanol-agua, para precipitar el producto deseado.

A pesar de que se sabe que el intercambio Hg-As ocurre de forma más lenta y en muy bajo rendimiento en ausencia del catalizador, los rendimientos obtenidos no superan el 20% y tienen gran variabilidad. Hemos probado el uso de aditivos como cloruro de cobre (II) (CuCl_2) o cloruro de litio (LiCl) a fin de conseguir una mejora en el rendimiento del paso de transmetalación, pero estos intentos no han dado resultados reproducibles.

El compuesto final que se obtiene, en el que el arsénico forma un anillo de 5 miembros con el EDT, es estable. Esta característica es la base de los antídotos contra compuestos de arsénico trivalente, como ya se mencionó.

Los nuevos derivados biarsenicados fluorados, F2FIAsH-EDT₂ y F4FIAsH-EDT₂, se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento. También se preparó el derivado carboxilado en las posiciones 5 y 6 a fin de utilizar esta función -COOH para posteriores conjugaciones con otras moléculas de interés. En este caso, para lograr una purificación más eficiente, es necesario partir de los isómeros puros de la 5(6)-carboxifluoresceína¹⁹. El compuesto F4FIAsH-EDT₂ podría ser funcionalizado en el residuo benzoico por sustitución nucleofílica del átomo de flúor en posición *para* al anillo lactona, por un nucleófilo como ácido tioglicólico o cisteamina, como se discutió

en el capítulo 1. Los compuestos obtenidos fueron caracterizados por RMN-¹H y espectrometría de masa de alta resolución.

2.3 CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LAS SONDAS BIARSENICADAS

2.3.1 Espectroscopía electrónica

Como se muestra en la figura 2.7, el máximo de absorción del F2FlAsH-EDT₂ está desplazado 11 nm al azul, mientras que el de F4FlAsH-EDT₂, se ubica 17 nm al rojo, respecto de FlAsH-EDT₂. En la tabla 2.2, se presentan los valores obtenidos para los máximos de absorción y coeficientes de extinción molar (ϵ).

Tabla 2.2. Parámetros espectroscópicos de las sondas biarsenicadas

	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
FlAsH-EDT ₂	511 (490) ^a	52.000
F2FlAsH- EDT ₂	500 (490) ^a	65.500
F4FlAsH- EDT ₂	528 (508) ^a	35.100

^aentre paréntesis, máximos de absorción de los precursores

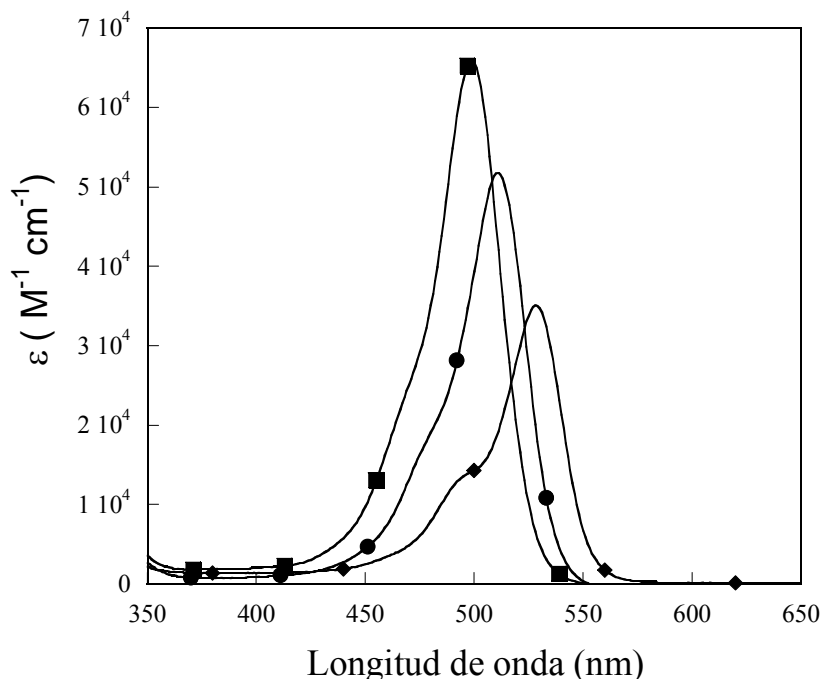


Figura 2.7. Espectros de absorción UV/VIS de F1AsH-EDT₂ (●), F2F1AsH-EDT₂ (■) y F4F1AsH-EDT₂ (◆)

Para todos los derivados se observan corrimientos al rojo de los máximos de absorción respecto de las fluoresceínas precursoras, siendo menos marcado este efecto para F2F1AsH-EDT₂, que presenta un corrimiento de 10 nm.

Se calcularon los espectros de absorción de las distintas sondas, tanto en fase gaseosa como en solución (agua como solvente) con la misma metodología que se utilizó para los fluoróforos precursoras y que se discutió en el capítulo 1. En primer lugar se procedió a optimizar las estructuras de los dianiones, ya que es la especie que predomina en las condiciones de trabajo a pH fisiológico. Se utilizó el método de cálculo DFT/B3P86/6-31G* para la optimización de las geometrías del estado

fundamental de las sondas biarsenicadas. Analizando los datos de la tabla 2.3 vemos que no hay variación en la longitud de enlace C3-C4, que es el que une la unidad xanteno con el benzoico. Hay un leve estiramiento del enlace C1-O, probablemente debido a la presencia de los sustituyentes -As(EDT)₂ en los derivados biarsenicados, lo que también debe influir en el pequeño estiramiento observado en la unión C7-F de F2FlAsH-EDT₂. El ángulo C3-C4-C5 es menor en todos los biarsenicados respecto de los fluoróforos precursores mientras que el ángulo de torsión C2-C3-C4-C5 es mayor en todos los casos.

Tabla 2.3. Parámetros geométricos del estado fundamental de los derivados biarsenicados en comparación con las fluoresceínas precursoras.

	<i>Distancias de enlace (Å)</i>				<i>Ángulo entre átomos (°)</i>	<i>Ángulo torsional (°)</i>
	C3-C4	C1-O	As-C	C7-F	C3-C4-C5	C2-C3-C4-C5
<i>Datos cristalográficos*</i>	1,499	1,381	-	-	124,1	74,8
<i>Fluoresceína</i>	1,506	1,350	-	-	126,1	95,8
<i>FlAsH-EDT₂</i>	1,506	1,378	1,950	-	121,8	100,8
<i>2',7'-difluorofluoresceína</i>	1,505	1,348	-	1,345	125,7	95,7
<i>F2FlAsH-EDT₂</i>	1,504	1,378	1,948	1,368	121,2	101,3
<i>4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína</i>	1,509	1,385	-	-	124,3	98,4
<i>F4FlAsH-EDT₂</i>	1,509	1,399	1,946	-	121,8	101,2

*de la estructura de Rayos X de la sal de sodio de la fluoresceína²⁰

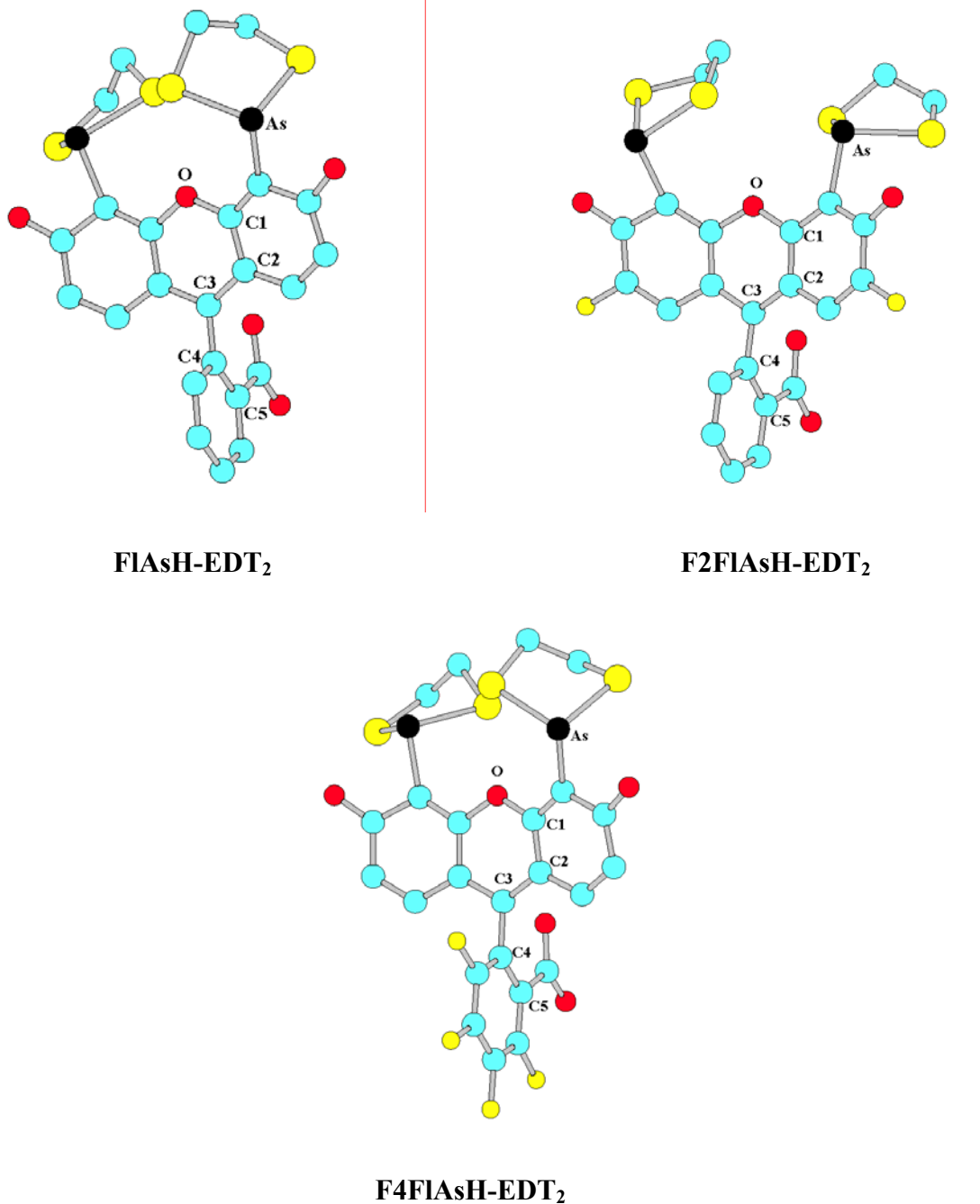


Figura 2.8. Estructuras optimizadas de los derivados biarsenicados

Sobre las estructuras optimizadas por DFT/BP86/6-31G** (Fig. 2.8) se realizaron cálculos de TDDFT de los cuales se obtuvieron las transiciones electrónicas

más intensas. Por inspección de los orbitales involucrados, se realizó la asignación de la naturaleza de dichas transiciones.

Tabla 2.4. Valores del máximo de absorción obtenidos por cálculos TDDFT

	<i>Fase gaseosa^a</i>	<i>Fase condensada^a (agua)</i>	<i>Exp.^a</i>	<i>Contribución mayoritaria a la transición^b</i>
<i>FlAsH-EDT₂</i>	466 (0,982)	488 (0,288)	511	32% (HOMO → LUMO)
<i>F2FlAsH-EDT₂</i>	440 (0,098)	481 (0,187)	500	15% (HOMO → LUMO)
<i>F4FlAsH-EDT₂</i>	505 (0,104)	489 (0,270)	528	24% (HOMO → LUMO)

(a) longitud de onda en nm. Entre paréntesis, *f*, fuerza del oscilador. (b) corresponde al cálculo en fase condensada.

En los tres casos se asigna la banda de mayor intensidad a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$, localizada sobre el residuo xanteno de la molécula, como se observa en la figura 2.9. De manera que es razonable encontrar un desplazamiento batocrómico del máximo cuando el cálculo se realiza considerando un solvente polar como el agua, ya que es típico de transiciones de esta naturaleza una estabilización de la molécula en el estado excitado en medios polares. Sin embargo esto no se vió en el cálculo efectuado para F4FlAsH-EDT₂. El valor obtenido en el cálculo en fase condensada resultó ser menos satisfactorio que el obtenido en el cálculo en vacío. Aún así, la diferencia respecto del valor experimental (29 nm) es aceptable y se considera una buena aproximación.

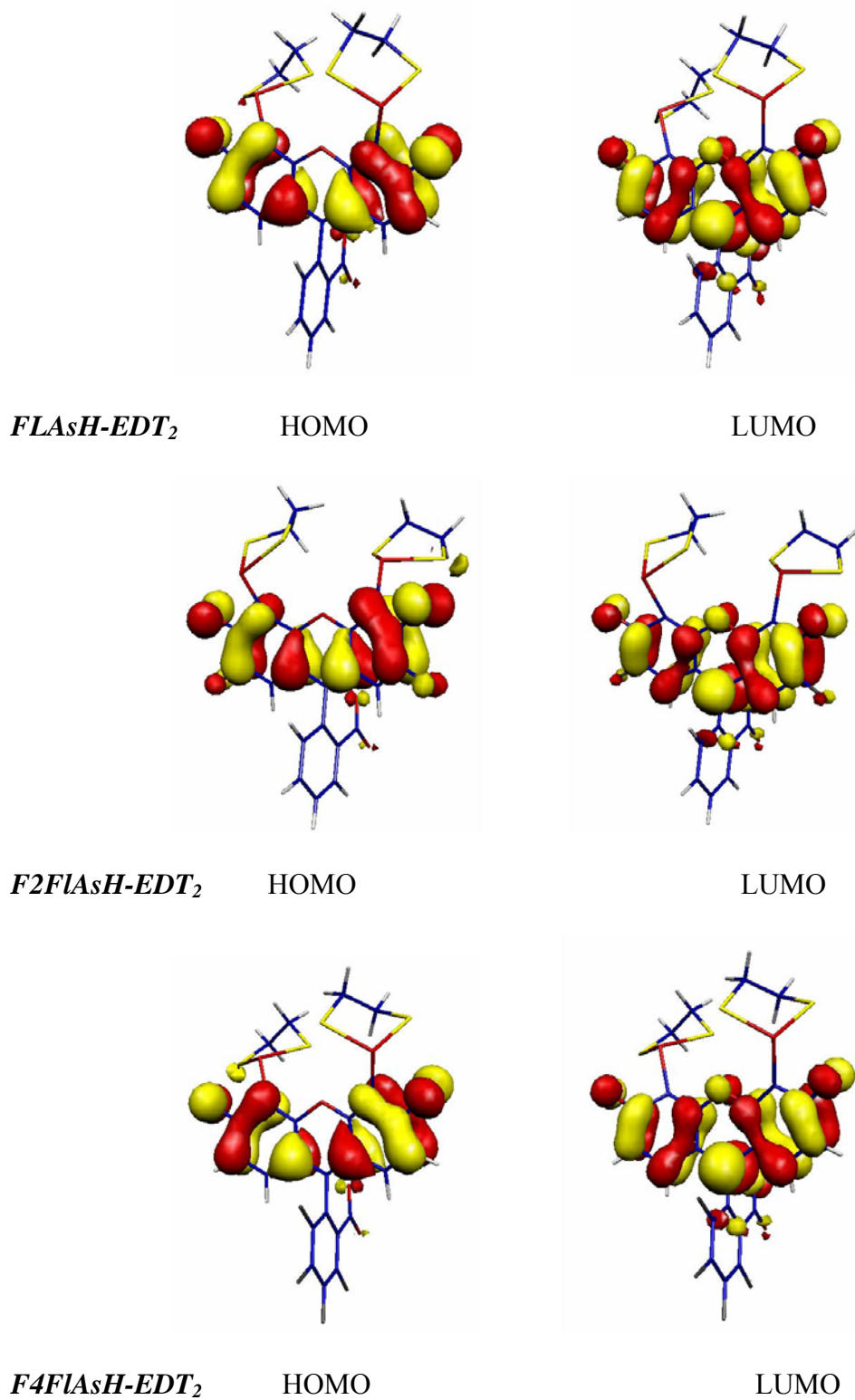


Figura 2.9. Orbitales involucrados en la transición de mayor intensidad

En la figura 2.10 se muestran los espectros calculados en fase gaseosa y condensada en comparación con el espectro experimental. Se observa claramente que el cálculo en fase condensada reproduce satisfactoriamente el perfil del espectro de absorción.

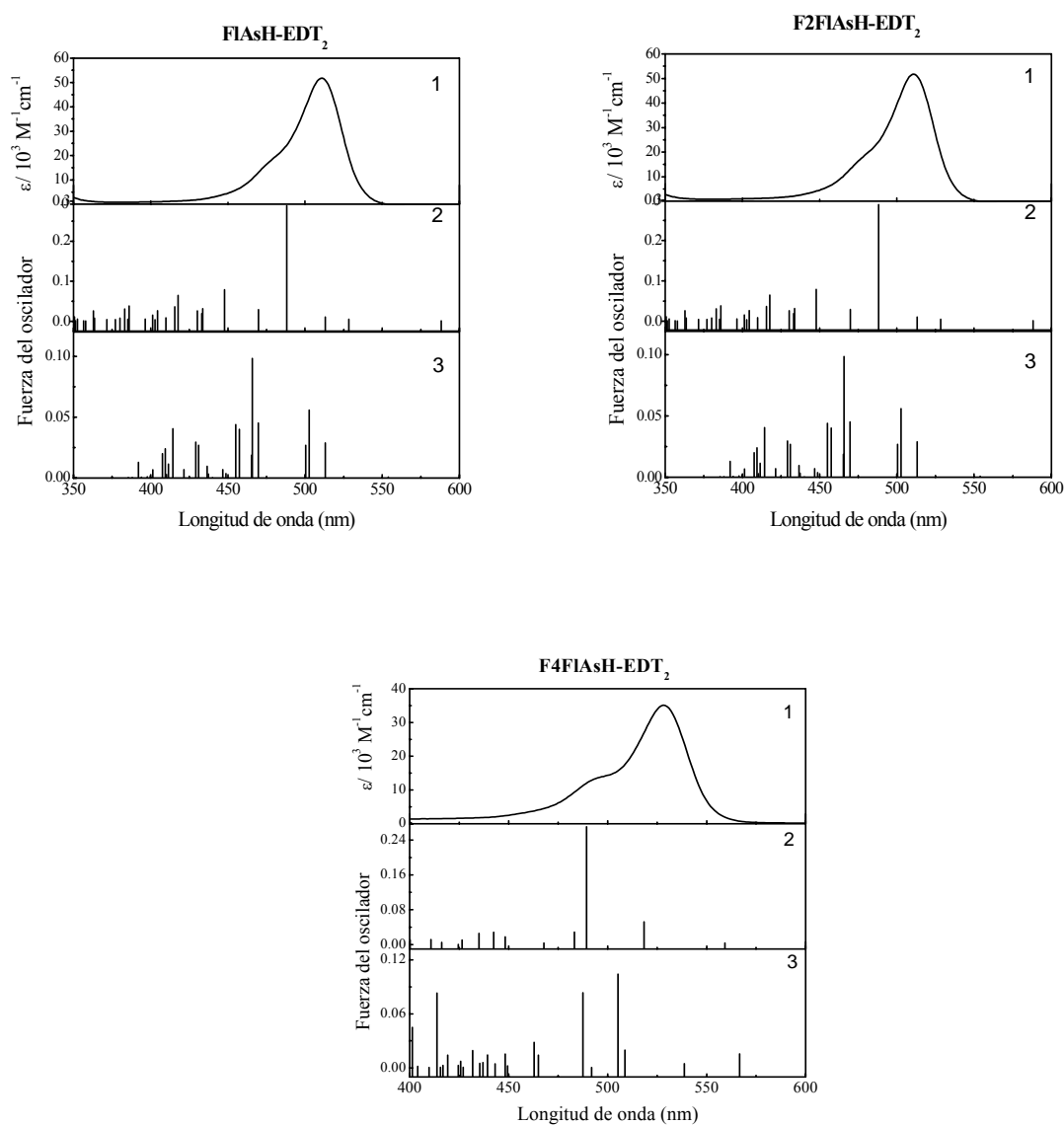


Figura 2.10. Comparación entre los espectros electrónicos experimentales (1) y los calculados en fase condensada (2) y fase gaseosa (3), de los derivados biarsenicados

El método subestima en todos los casos el valor del máximo de absorción siendo los valores calculados en fase condensada altamente consistentes con los experimentales, excepto en el caso del F4FlAsH-EDT₂ donde el valor obtenido en fase gaseosa es más cercano al experimental, aunque la diferencia no es relevante y el perfil obtenido en fase condensada es satisfactorio (Fig. 2.10). Se concluye que el método de cálculo utilizado, TDDFT en combinación con el modelo PCM, predice adecuadamente las energías de absorción para este tipo de moléculas, en particular considerando la introducción de átomos de arsénico en la molécula. Este estudio tiene relevancia en el caso de querer predecir los espectros de absorción en un proyecto de diseño de nuevos derivados estructuralmente relacionados.

2.3.2 Variación del espectro de absorción con el pH

Para evaluar la sensibilidad a los cambios de pH, se tomaron los espectros de absorción de las sondas disueltas en buffer fosfato en un rango de pH entre 5,6 y 7,8 (Figura 2.11). Este rango de pH es importante en las aplicaciones en el contexto celular. Las proteínas marcadas en compartimentos ácidos pierden su emisión cuando están marcadas con FlAsH. Se pudo ver que FlAsH-EDT₂ muestra una disminución del 50% en la absorbancia de la banda correspondiente al dianión, al aumentar la acidez del medio hasta pH 5,6, mientras que la absorción de F2FlAsH-EDT₂ y de F4FlAsH-EDT₂ solo disminuye en un 16%. Este resultado concuerda con lo esperado, en vista de los bajos valores de pK_a de las fluoresceínas precursoras (pág. 2, capítulo 1).

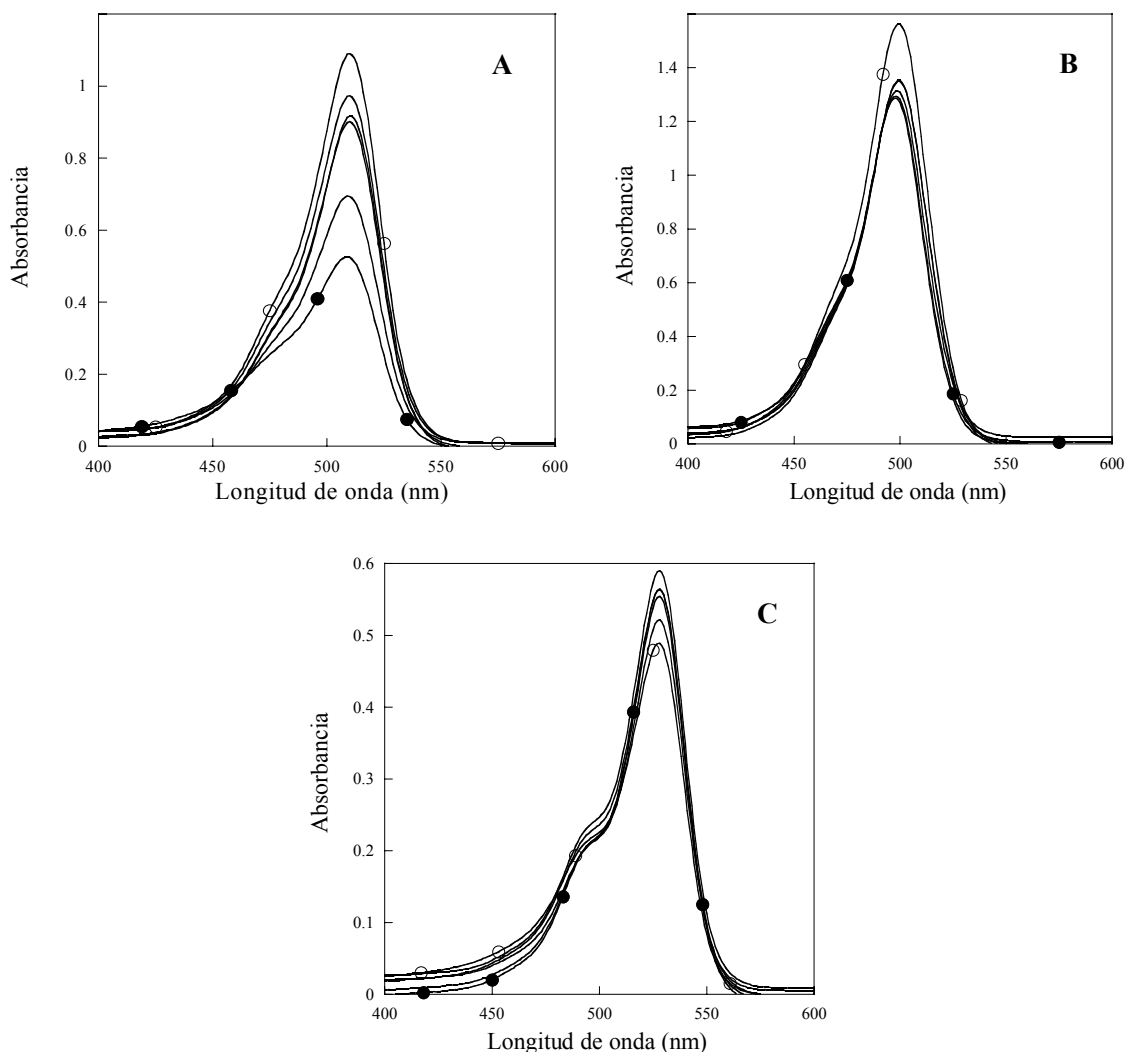


Figura 2.11. Dependencia de la absorbancia en el rango de pH 5.6 (●) – 7.8 (○) de FIAsh-EDT₂ (a), F2FIAsh-EDT₂ (b) y F4FIAsh-EDT₂ (c). Concentración 20 μM

2.3.3 Espectroscopía de fluorescencia

Una de las características sobresalientes de FIAsh es sin duda, el hecho de que la molécula sea no fluorescente cuando está unida a EDT y fuertemente fluorescente

cuando se une al motivo CCXXCC. El complejo entre FIAsh-EDT₂ y el hexapéptido (CCXXCC) tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia² de 0,50.

Probablemente, las pequeñas moléculas de EDT permiten la libre rotación alrededor del enlace As-C, dando lugar a una desactivación vibracional muy eficiente del estado excitado. En el complejo, en cambio, este movimiento no tiene lugar por la rigidez del sistema. La disminución en el rendimiento cuántico del complejo respecto del valor de la fluoresceína (0,85), puede ser consecuencia de la bioconjugación y del efecto de átomo pesado que ejercen los átomos de arsénico, favoreciendo un cruce intersistemas (CIS) S* → T*, a expensas del rendimiento cuántico de fluorescencia.

El péptido modelo utilizado en este trabajo contiene la secuencia FLNCCPGCCMEP¹⁴ y en adelante lo llamaremos P12. Su alta afinidad por FIAsh ya ha sido discutida previamente. Las condiciones de marcación *in vitro* serán tratadas en la siguiente sección. Se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia para los derivados fluorados obteniéndose un alto valor para el complejo F2FIAsh-P12. Los resultados se muestran en la tabla 2.5 y en la figura 2.12.

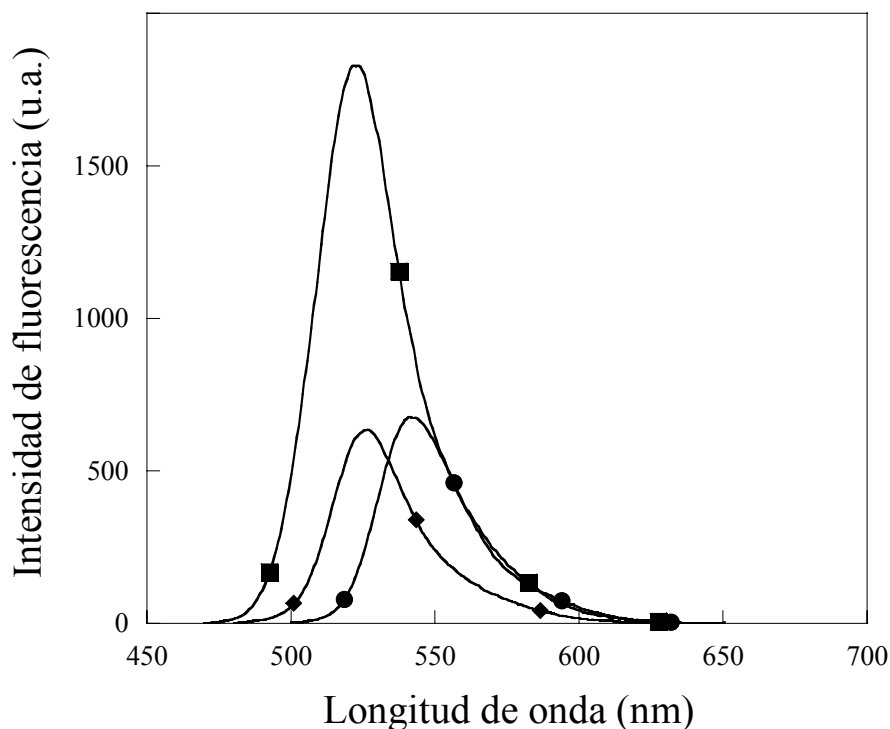


Figura 2.12. Espectros de emisión de los complejos F1AsH-P12 (◆), F2F1AsH-P12 (■) y F4F1AsH-P12 (●) a λ_{exc} : 490, 490 y 520 nm, respectivamente. Los mismos fueron tomados a la misma concentración (0,1 μ M).

Tabla 2.5. Parámetros de fluorescencia de los complejos

	λ_{em}/nm (λ_{exc}/nm)	Φ_f
F1AsH-P12	527 (490)	0,4 ^a
F2F1AsH- P12	522 (490)	0,8
F4F1AsH- P12	544 (520)	0,4

(a) Ref. 2

Se observó un mayor corrimiento de Stokes para el complejo F1AsH-P12 (37 nm) en comparación con el complejo F2F1AsH-P12 (32 nm) y una intensidad de

fluorescencia tres veces mayor. Esto último es consecuencia de un mayor valor en el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda de excitación (490 nm) y un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia (ver tabla 2.5).

La emisión del complejo F4FlAsH-P12 a 544 nm (recordemos que 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína emite a 527 nm) convierte a este compuesto en un nuevo color de la familia de derivados biarsenicados. Tanto F2FlAsH-EDT₂ como F4FlAsH-EDT₂ se establecen como nuevas alternativas para distintas combinaciones donador-aceptor de FRET (capítulo 3).

Las posibles variaciones en el espectro de emisión de los distintos complejos con el pH fueron estudiadas en forma similar a lo realizado para los espectros de absorción. Los resultados de este estudio se observan en la figura 2.13. Según lo esperado, no se observaron cambios apreciables en dichos espectros al modificar el pH para los nuevos complejos fluorados.

También se han determinado los tiempos de vida media de fluorescencia de los complejos con el método TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*) los cuales se muestran en la tabla 2.6 junto con los valores correspondientes a las fluoresceínas precursoras a modo de comparación.

Tabla 2.6. Tiempos de vida del estado excitado de los complejos

<i>Complejo</i>	τ (ns)	<i>Fluoróforo</i>	τ (ns)
FlAsH-P12	4,88	Fluoresceína	4,07
F2FlAsH-P12	4,78	2',7'-difluorofluoresceína	4,02
F4FlAsH-P12	5,18	4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína	4,13

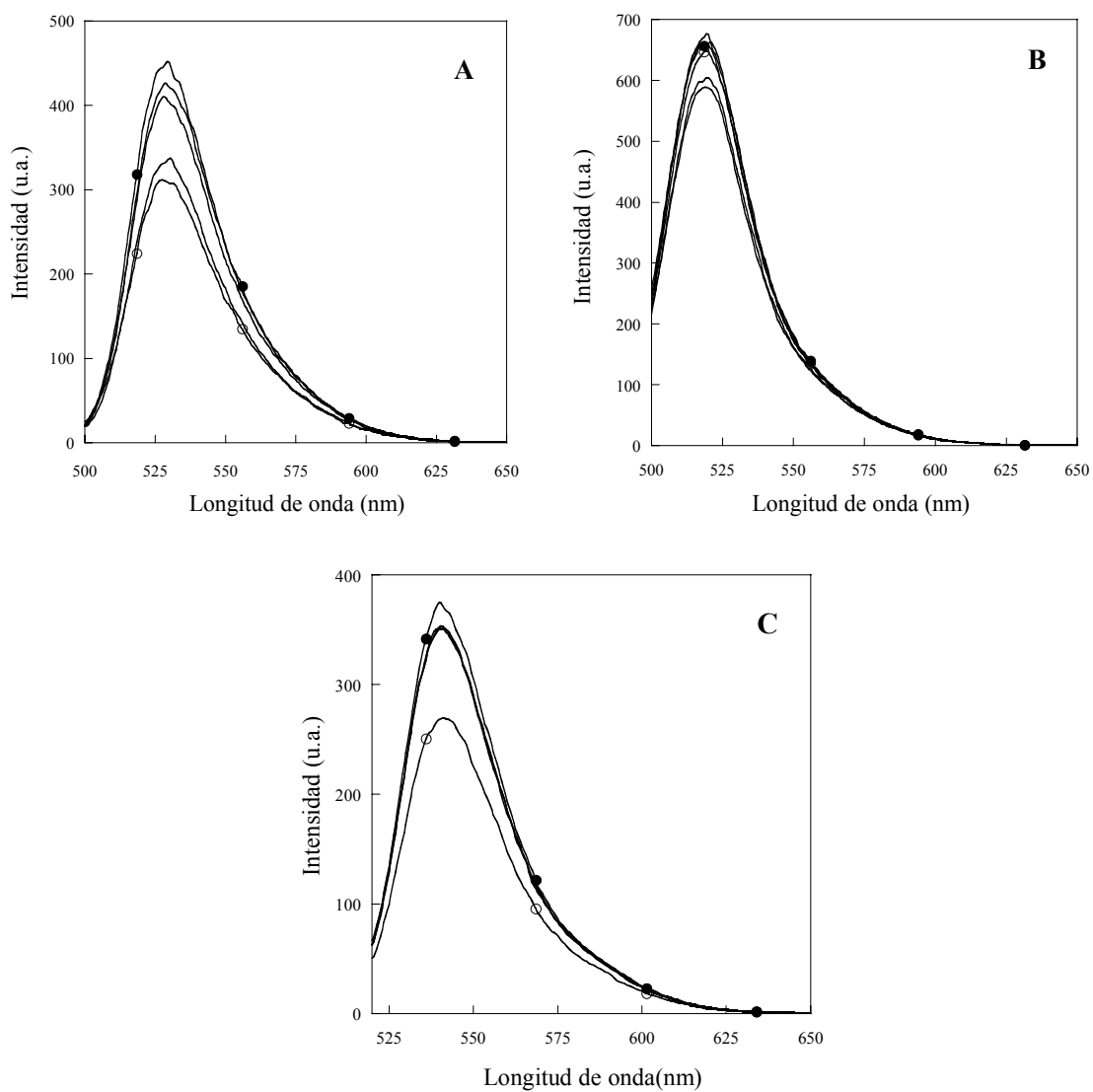
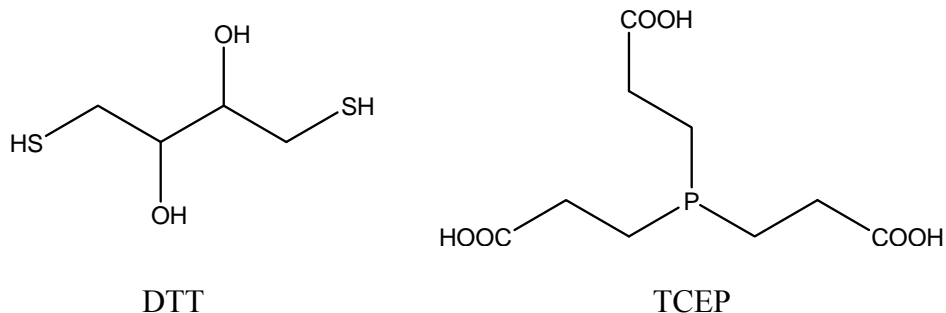


Figura 2.13. Dependencia de la fluorescencia en el rango de pH 5.6 (○) – 7.8 (●) de FIAsh-EDT₂ (a), F2FIAsh-EDT₂ (b) y F4FIAsh-EDT₂ (c). λ_{exc} : 490, 490 y 510 nm, respectivamente. Concentración 0,6 μ M

2.4 MARCACIÓN ESPECÍFICA *in vitro*

2.4.1 Formación del complejo

La marcación *in vitro* del péptido modelo P12 se lleva a cabo de forma simple y puede ser monitoreada por el aumento de la fluorescencia. Es importante que los grupos sulfhidrilo se encuentren reducidos para que reaccionen con el compuesto biarsenicado. Para ello, se suele tratar al péptido blanco con un exceso de un agente reductor como ditioneitol (DTT) o tris(2-carboxi)etilfosfina (TCEP).



Altas cantidades de DTT pueden competir con las cisteínas del péptido por FlAsH, dando marcaciones ineficientes, de manera que resulta más conveniente el uso de TCEP. Además este último es más estable durante el almacenamiento de las soluciones²¹.

Se ha observado que la presencia de monotioles como 2-mercaptoetanol (2-ME) o ácido 2-mercaptoetansulfónico (MES) en concentraciones milimolares como componentes del buffer, favorecen la marcación². Una explicación sugerida, es que uno

de los arsénicos podría unirse a dos cisteínas en el péptido de manera que las otras dos queden lejos del otro átomo de arsénico. El agua por sí sola no podría clivar el enlace arsénico-azufre para permitir una reacomodación del fluoróforo. Sin embargo, al tener los monotioles baja afinidad por los arsenóxidos podrían ayudar a que esto ocurra y que la sonda se pueda posicionar correctamente, ya que se ha observado² que la reacción ocurre más rápido en presencia de estos aditivos. En el medio celular, esta función sería llevada a cabo por el glutatión endógeno. La fluorescencia también puede aumentar por descomposición del FIAsh (especialmente si se usa un exceso), aunque este efecto en la intensidad de emisión es prácticamente despreciable frente al aumento proveniente de la marcación y no influye en la fluorogenicidad de la sonda.

La fluorescencia máxima *in vitro* se alcanza en presencia de un exceso de péptido respecto del FIAsh según se observó a partir de un experimento de titulación de la sonda con el péptido, monitoreando la fluorescencia del complejo en cada punto (Fig. 2.14). A partir de soluciones de los distintos derivados biarsenicados FIAsh-EDT₂, F2FIAsh-EDT₂ y F4FIAsh-EDT₂ de concentración 0,1 μM se agregaron alícuotas del péptido blanco, P12, hasta llegar a saturación de la señal de fluorescencia.

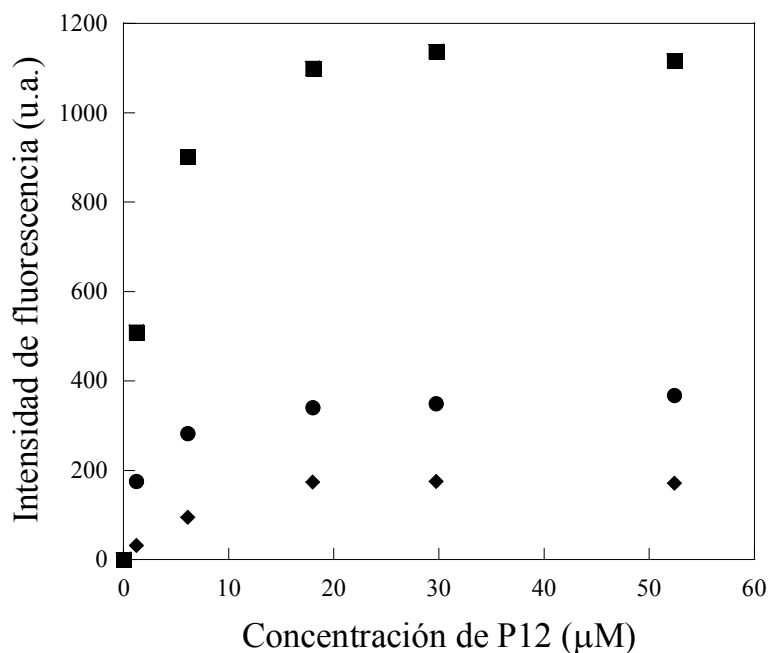


Figura 2.14. Fluorogenicidad de las sondas arsenicadas por agregado del péptido blanco P12 y formación del complejo (■) F2FlAsH, (●) FlAsH, (◆) F4FlAsH.

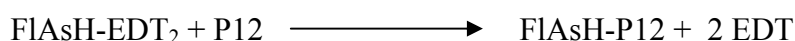
Titulación de soluciones 0,1 µM con P12.

En cada agregado se incubó durante 1 hora para dar lugar a la formación del complejo. Se pudo observar una mayor fluorogenicidad para el complejo F2FlAsH-P12, con un aumento de la fluorescencia total tres veces mayor respecto de los otros derivados a la misma concentración (Fig. 2.14).

Los experimentos discutidos hasta aquí, muestran las diferencias observadas entre los nuevos derivados y el FlAsH original, siendo F2FlAsH el más ventajoso en cuanto a: su mayor coeficiente de extinción molar y mayor rendimiento cuántico, mientras que F4FlAsH aporta un nuevo color a la colección de biarsenicados existentes. Ambas sondas tienen, además, la ventaja de ser menos sensibles al pH que FlAsH.

2.4.2 Cinética de formación del complejo FIASH-P12

El estudio de la cinética de formación del complejo brinda información útil para el diseño racional de péptidos blanco tetracisteína con mayor afinidad. A partir de la reacción de formación del complejo:



Se obtiene la siguiente ley de velocidad para la reacción:

$$v = k \cdot [\text{FIAsH-EDT}_2]^m \cdot [\text{P12}]^n \quad 2.1$$

En condiciones de exceso de P12 tenemos:

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [\text{FIAsH-EDT}_2]^m \quad 2.2$$

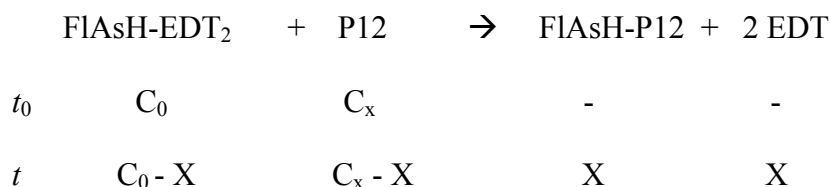
con

$$k_{\text{obs}} = k \cdot [\text{P12}]^n \quad 2.3$$

Suponiendo que la reacción es de orden 1 en FIAsH-EDT₂, o sea m = 1, se obtiene que

$$v = d[\text{FIAsH-P12}] / dt = k_{\text{obs}} \cdot [\text{FIAsH-EDT}_2] \quad 2.4$$

Si



tenemos que [FIAsH-EDT₂]_t = C₀ - X y [FIAsH-P12]_t = X, entonces [FIAsH-EDT₂]_t = C₀ - [FIAsH-P12]_t. Reemplazando en (2.4) e integrando respecto del tiempo se obtiene:

$$[\text{FLAsH-P12}]_t = C_0 \cdot (1 - e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}) \quad \mathbf{2.5}$$

La cinética de formación del complejo se mide a través de la intensidad de fluorescencia del mismo, I_f , y por lo tanto

$$I_f = f \cdot C_0 \cdot (1 - e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}) \quad \mathbf{2.6}$$

donde f es un factor de proporcionalidad.

Se realizaron un número considerable de determinaciones de la cinética de unión a distintas concentraciones de P12, trabajando siempre en condiciones de exceso del péptido respecto de la sonda. En todos los casos se pudieron ajustar las curvas experimentales con funciones monoexponenciales (Fig. 2.15), verificando el orden 1 en FLAsH-EDT₂. En la figura 2.15 se presenta una curva de la cinética a modo de ejemplo. En total se realizaron 32 determinaciones.

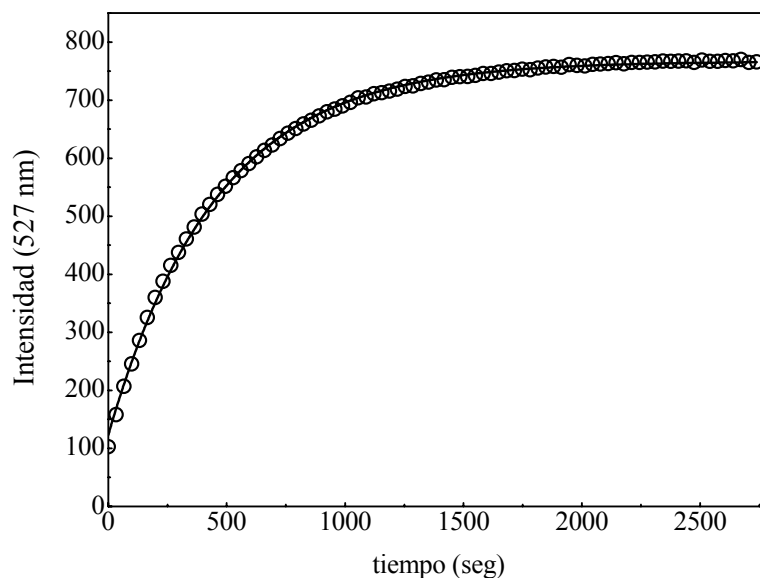
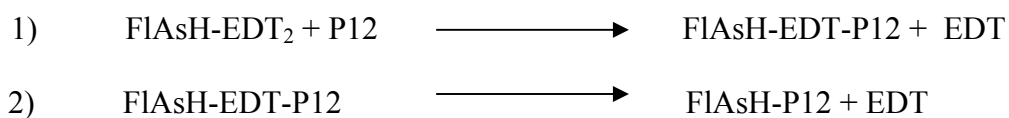


Figura 2.15. Cinética de formación del complejo FIAsH-P12 a partir de una solución 0,34 μM de FIAsH-EDT₂ tratada con P12 en exceso (10:1, péptido: sonda), en buffer HEPES 20 mM, pH=7,4, 2-ME 1 mM. (○) experimental, (—) ajuste.

Esto nos permite descartar la posibilidad de que la reacción de formación del complejo ocurra a través de pasos consecutivos del tipo:



ya que en este caso se observarían cinéticas biexponenciales. Sin embargo, es posible que la velocidad del paso 2 sea mucho mayor que la del paso 1 y la situación sea equivalente a un único paso de intercambio de ligando. Esto es probable debido a la cooperatividad de la unión. El motivo tetracisteína funciona como un ligando bidentado frente al derivado biarsenicado.

Con las distintas curvas I_f vs tiempo, podemos construir un gráfico de k_{obs} en función de la concentración de P12 (Fig. 2.16).

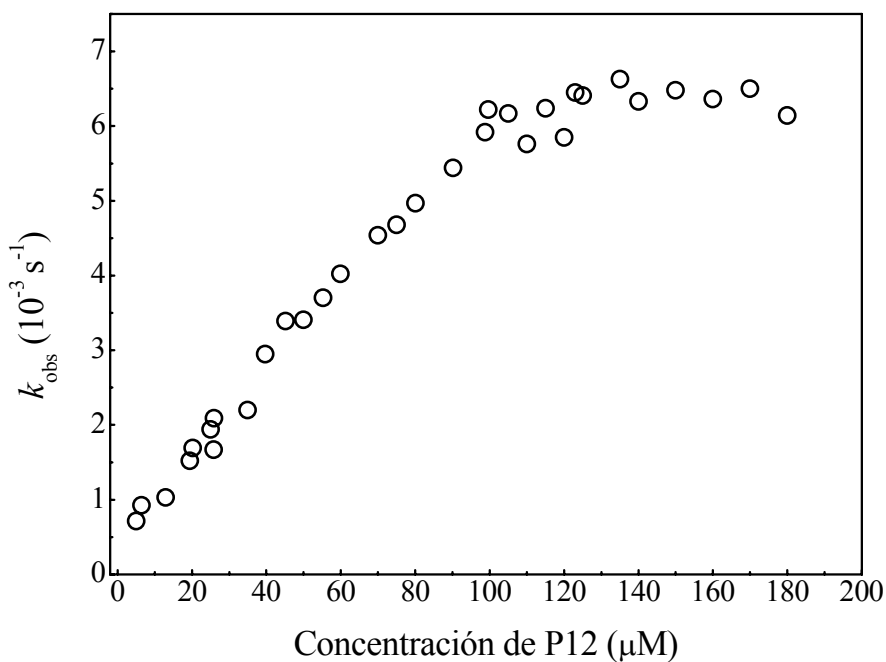
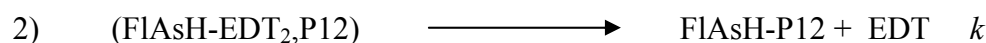
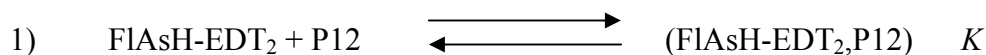


Figura 2.16. Dependencia de la k_{obs} respecto de la concentración de P12

Lo que se observa a partir de esta curva es que al aumentar la concentración del péptido se alcanza un régimen de saturación, a partir del cual la velocidad de reacción se vuelve independiente de la concentración de P12. Este comportamiento es característico de un *mecanismo de intercambio de ligando tipo disociativo*²². Dentro de esta categoría se pueden tener dos posibilidades: un mecanismo *tipo I_D* y un mecanismo *tipo D* para la formación del complejo FLaSH-P12. Para el mecanismo tipo I_D se pueden establecer las siguientes etapas de reacción:



donde $K = \frac{[(\text{FlAsH} - \text{EDT}_2, \text{P12})]}{[\text{FlAsH} - \text{EDT}_2] \cdot [\text{P12}]}$.

Este mecanismo es análogo a una reacción tipo SN_2 , o sea es una reacción concertada en la que se plantea un complejo de encuentro ($\text{FlAsH-EDT}_2, \text{P12}$).

En el caso de un mecanismo tipo D o SN_1 límite se genera un intermediario estable que permite discriminar entre los distintos ligandos presentes, en este caso, EDT y P12. Como no existen evidencias de la presencia de este intermediario, suponemos que la formación del complejo FlAsH-P12 ocurre a través de un mecanismo disociativo de intercambio tipo I_D .

De manera que para el mecanismo propuesto se puede escribir:

$$v = \frac{d[\text{FlAsH} - \text{P12}]}{dt} = k \cdot [(\text{FlAsH} - \text{EDT}_2, \text{P12})] \quad 2.7$$

$$[\text{FlAsH-EDT}_2]_i = [\text{FlAsH-EDT}_2] + [(\text{FlAsH-EDT}_2, \text{P12})] \quad 2.8$$

$$[\text{P12}]_i = [\text{P12}] + [(\text{FlAsH-EDT}_2, \text{P12})] \quad 2.9$$

Como se trabajó en exceso de P12,

$$[(\text{FlAsH-EDT}_2, \text{P12})] \ll [\text{P12}] \quad \text{y} \quad [\text{P12}]_i = [\text{P12}]$$

Despejando $[(\text{FlAsH-EDT}_2, \text{P12})]$ de la expresión de K y reemplazando en la expresión de v (ecuación 2.10) se obtiene:

$$v = k.K. \frac{[\text{FlAsH} - \text{EDT}_2] \cdot [\text{P12}]}{1 + K \cdot [\text{P12}]_i} \quad \mathbf{2.10}$$

y

$$k_{\text{obs}} = k.K. \frac{[\text{P12}]_i}{1 + K \cdot [\text{P12}]_i} \quad \mathbf{2.11}$$

A altas concentraciones de P12 cuando la etapa 1 es completa y $K \cdot [\text{P12}]_i \gg 1$, $k_{\text{obs}} = k$ y lo que se estudia es la reacción de intercambio dentro del complejo de encuentro. Del gráfico 2.16 sale que en este caso $k = 6,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Cuando $K \cdot [\text{P12}]_i \ll 1$ la formación del complejo de encuentro es baja, $k_{\text{obs}} = k.K \cdot [\text{P12}]_i$ y la constante de segundo orden es igual a $k.K$. Esto nos permite asegurar la irreversibilidad del proceso de formación del complejo FlAsH-P12 a partir del complejo de encuentro, ya que si así no fuera aparecería un término adicional conteniendo esa constante de reversibilidad y no se observaría una $k_{\text{obs}} \approx 0$ cuando $[\text{P12}] \approx 0$.

En conclusión, el análisis de la cinética de formación del complejo FlAsH-P12 nos permitió conjeturar un posible mecanismo por el cual interaccionan ambas especies para llegar al producto deseado, que se ajusta al comportamiento experimental.

El estudio se realizó en condiciones de exceso de péptido ya que así se minimizan las especies intervinientes y se favorece la formación del complejo deseado. En exceso de FlAsH podrían tener lugar la formación de otras especies como dímeros de FlAsH o el caso de tener dos moléculas de FlAsH por péptido.

2.5 FOTOESTABILIDAD DE FIAsh-P12, F2FIAsh-P12 Y F4FIAsh-P12

Una de las razones para utilizar fluoresceínas fluoradas como precursores de FIAsh es la alta fotoestabilidad de las mismas respecto de la fluoresceína, como se discutió en el capítulo 1. Para evaluar si esta característica se extiende a los derivados biarsenicados, se evaluó la resistencia al fotoblanqueo de cada uno de ellos, por irradiación de los complejos con una lámpara de arco de mercurio de alta potencia a fin de simular condiciones de trabajo similares a la del microscopio. En la figura 2.17 se muestra la disminución de la intensidad de fluorescencia de los complejos luego de un tiempo determinado de irradiación (5-15 minutos) y en la figura 2.18, la cinética de fotoblanqueo para cada complejo.

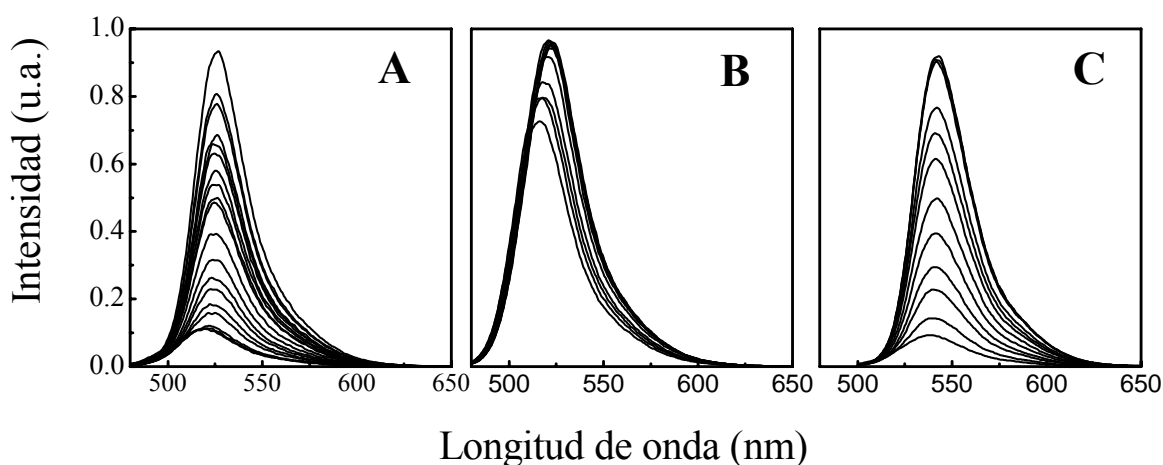


Figura 2.17. Disminución de la fluorescencia de los complejos por fotoblanqueo.

(A) FIAsh-P12, (B) F2FIAsh-P12 y (C) F4FIAsh-P12

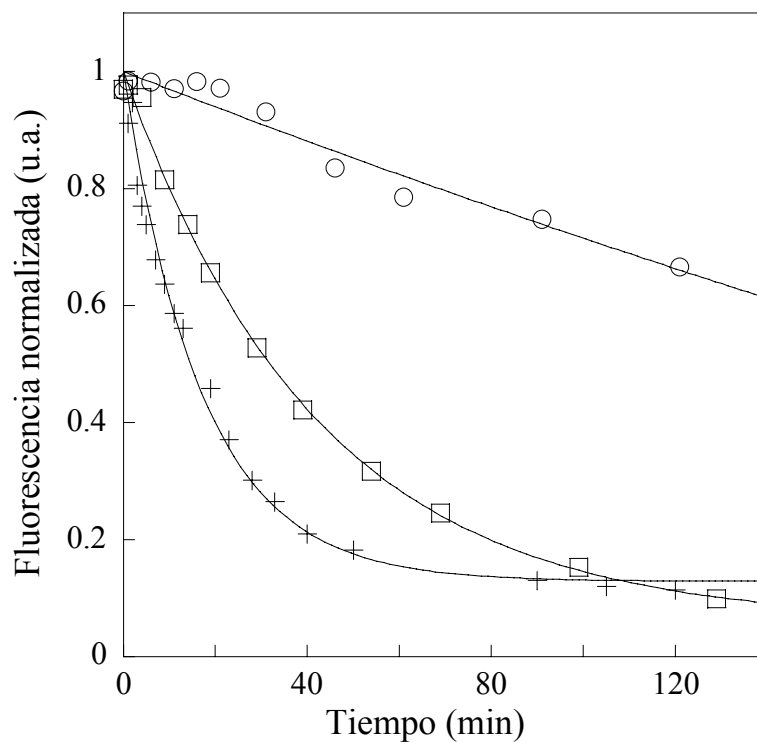


Figura 2.18. Cinética de fotoblanqueo de los complejos FIAsH-P12 (+), F2FIAsH-P12 (o) y F4FIAsH-P12 (□)

Los valores de la constante de velocidad del proceso de fotoblanqueo, k_{fb} , se obtienen por ajuste monoexponencial de los datos experimentales según lo descrito en el capítulo 1 (página 13). Los resultados se muestran en la tabla 2.7.

Tabla 2.7. Parámetros de fotoblanqueo de los complejos

	k_{fb} / s^{-1}	% Fb ^a
FIAsH-P12	$3,2 \cdot 10^4$	87
F2FIAsH-P12	$6,2 \cdot 10^2$	32
F4FIAsH-P12	$9,1 \cdot 10^3$	89

(a)Fotoblanqueo: pérdida de fluorescencia luego de 120 minutos de irradiación.

Se ha observado que el complejo F2FlAsH-P12 es más fotoestable que FlAsH-P12 mientras que para F4FlAsH-P12, se obtienen resultados finales similares al compuesto original aunque con una cinética un orden más lenta.

Este resultado es muy importante en cuanto a la aplicación de la sonda en estudios biológicos llevados a cabo en el microscopio y representa una notable mejora en los compuestos aplicados a esta metodología de marcación específica.

2.6 CONCLUSIONES

Hemos introducido dos nuevos compuestos para marcación específica de biomoléculas aplicables a la estrategia general sonda biarsenicada-motivo tetracisteína. Los experimentos presentados en este capítulo a partir de distintas técnicas espectroscópicas y estudios de marcación específica *in vitro*, demuestran las ventajas de estos nuevos compuestos: alto coeficiente de extinción molar, mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y mayor fotoestabilidad, en lo que se refiere al derivado F2FlAsH, mientras que el derivado F4FlAsH aparece como un nuevo color en la colección de derivados biarsenicados, entre el FlAsH (emisión 530 nm) y el ReAsH (emisión 608 nm). Ambos compuestos resultaron tener una menor dependencia de la absorción y emisión respecto del pH.

Hemos presentado también un análisis teórico de las transiciones electrónicas de este tipo de sondas, estableciendo un método de cálculo adecuado para estas estructuras y de utilidad en el diseño de nuevas sondas de estructuras similares.

También hemos propuesto un mecanismo para la formación del complejo fluorescente en base al estudio de la cinética de la unión entre la sonda y el péptido modelo.

En el siguiente capítulo se tratarán distintas aplicaciones de las sondas en estudios de transferencia de energía y marcación específica *in vivo*.

2.7 PARTE EXPERIMENTAL

2.7.1 Síntesis de derivados biarsenicados

Uso de solventes anhidros y reactivos sensibles a la humedad: los solventes utilizados fueron de calidad “para análisis” o superior, y se purificaron según métodos descritos en bibliografía²³. En todos los casos las reacciones con solventes o reactivos sensibles a la humedad se llevaron a cabo con material de vidrio previamente flameado y bajo atmósfera de nitrógeno o argón.

Cromatografía en placa delgada: se utilizaron cromatofolios de sílica gel F₂₅₄ de 0,20 mm de espesor, sobre soporte de aluminio y cromatofolios de sílica RPC18 F_{254S} sobre soporte de aluminio (Merck). El revelado se realizó con luz UV o por inmersión en una solución de 0,04 M de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 3mM de Ce(SO₄)₂ en H₂SO₄-H₂O (9:1) y posterior calentamiento.

Cromatografía en columna: se utilizó sílica gel 60 de malla 230-400 llamada “flash”, sílica 60H (Merck) y Florisil® 60-100 mesh, J.T.Baker. Los solventes de elución se indican en cada caso.

Resonancia magnética nuclear: los espectros de RMN se adquirieron con espectrómetros Bruker AC-200 (Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA, a 200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C) y Bruker AM-500 (LANAIS RMN-500, CONICET, a 500 MHz para ^1H , 125 MHz para ^{13}C). Se utilizaron solventes deuterados que se indican en cada caso. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón (ppm) respecto de la señal de tetrametilsilano (TMS) o el solvente deuterado. Los patrones de acoplamiento se consideraron de primer orden, y las constantes se expresaron en Hz. Las señales se describen como *s* (singulete), *d* (doblete), *t* (triplete), *q* (cuarteto), *dd* (doble doblete), *sa* (singulete ancho), y *m* (multiplete).

La asignación de los espectros de RMN se realizó mediante comparación con datos publicados.

Espectrometría de masa: los espectros de masa de alta resolución (EMAR) fueron determinados en un APEX IV 7 Tesla-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR)- Mass spectrometer (Bruker) o un TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Instrument (Finnigan) con Electrospray-Ionisation (Universidad de Göttingen, Alemania).

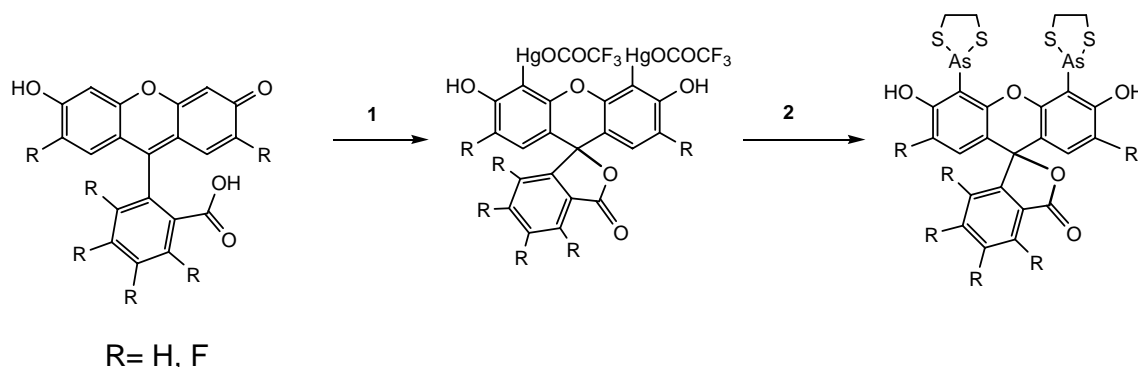
Procedimiento general para la obtención de intermediarios mercuriados² :

Fluoresceína, 2'7'-difluorofluoresceína o 4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína (1eq) se agrega a una solución de HgO (4 eq) en ácido trifluoroacético (0,3 M). La reacción se lleva a cabo a t.a. por 10 hs. Se adiciona agua y se recoge el precipitado por succión al vacío y seca en vacío sobre P₂O₅. Los productos obtenidos se utilizan sin posterior purificación. El análisis de los productos mercuriados se vé dificultado por la alta insolubilidad de los mismos. Sin embargo, el avance de la reacción se puede monitorear por CCD por la conversión del material de partida en un producto que no se eluye del punto de siembra. Los rendimientos varían entre el 85-95 %.

Procedimiento general para la obtención de derivados biarsenicados² : los

intermediarios mercuriados correspondientes se suspenden en NMP anhidra (0,06 M) bajo argón y se agrega AsCl₃ (20 eq), DIPEA (8 eq) y Pd(AcO)₂ (1 mg). La reacción se lleva a cabo a t.a. por 8-10 hs y se vuelca sobre una mezcla de buffer fosfato: acetona (1:1 v/v 50 mL, 0.25 M K₂HPO₄), se agita por 5 min y se adiciona EDT (59 eq). Luego de 20 min de agitación, se agrega CHCl₃ (30 mL) y se agita la mezcla por 1 hora antes de separar las fases. La fase acuosa se extrae con CHCl₃ (2 x 30 mL) y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se lleva a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando Fluorisil® como fase estacionaria empacada en CHCl₃-0.5% HAcO. La muestra se siembra en CHCl₃ y se eluye con un gradiente que incorpora AcOEt. Las fracciones que contienen el producto se llevan a sequedad y se

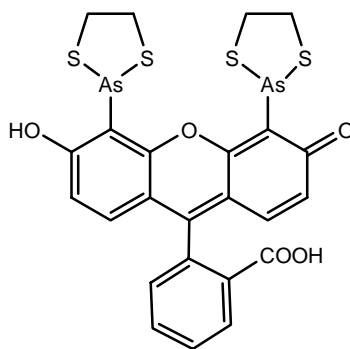
tratan con EtOH 95% para precipitar el compuesto final. Los rendimientos obtenidos mostraron gran variabilidad pero en ningún caso resultó ser mayor que a 30%.



1- HgO, TFA, t.a., 12 h

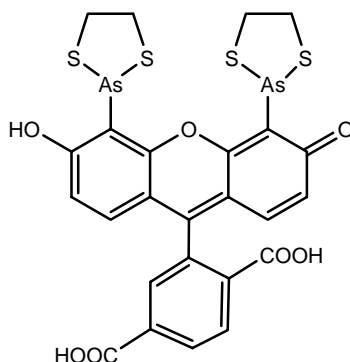
2- i) AsCl₃, DIPEA, Pd(AcO)₂, NMP; t.a., 12 h; ii) K₂HPO₄ 0.25 M: Acetona (1:1), EDT

4',5'-Bis(1,2,3-dithioarsolan-2-yl)-fluoresceína, FIAsh-EDT₂ (7)



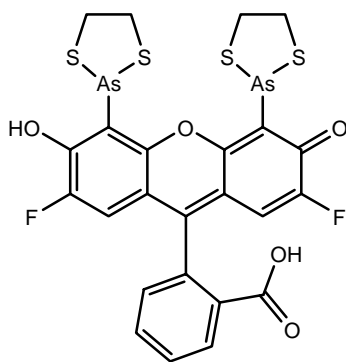
Se obtiene un sólido rosado. RMN-¹H (CDCl₃-CD₃OD 1:1): 3.54 (m, parcialmente oculto por el solvente), 6,49 (d, 2H, *J* = 9 Hz), 6,62 (d, 2H, *J* = 9 Hz), 7,20 (d, *J* = 6 Hz, H-6), 7,65 (dd, *J* = 6 and 2 Hz, H-4,5), 8,00 (d, *J* = 6 Hz, H-3), 9,89 (s, 2H, OH). EMAR(ESI): [M+H]⁺: 664,8541. Calc. C₂₄H₁₉O₅As₂S₄ 663,8547.

4',5'-Bis(1,2,3-ditioarsolan-2-yl)-6-carboxifluoresceína, carboxiFlAsH-EDT₂ (10)



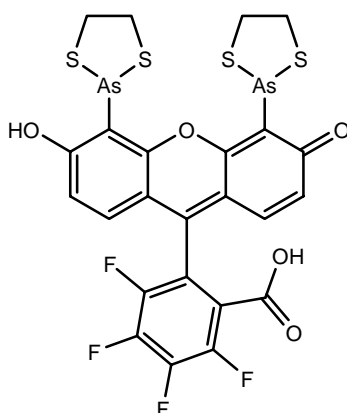
Se obtiene un sólido anaranjado. RMN-¹H (CDCl₃-CD₃OD 1:1): 3,59 (m, 8H), 6,49 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 6,57 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7,85 (s, H-4), 8,03 (d, *J* = 8 Hz, H-7), 8,29 (d, *J* = 8 Hz, H-6). EMAR(ESI): [M+H]⁺: 708,7440. Calc. C₂₅H₁₈O₇As₂S₄ 707,8367.

4',5'-Bis(1,2,3-ditioarsolan-2-yl)-2',7'-difluorofluoresceína, F2FlAsH-EDT₂ (8)



Se obtiene un sólido naranja. RMN-¹H (CDCl₃): 3,61 (m, 8H), 6,42 (d, 2H, *J* = 10 Hz), 7,21 (d, 1H, *J* = 5 Hz, H-3), 7,65 – 7,74 (m, 2H, H-4, 5), 8,03 (d, 1H, *J* = 5 Hz, H-6), 10,13 (s, 2H, OH). EMAR(ESI) [M+H]⁺: 700,8358 Calc. C₂₄H₁₇F₂O₅As₂S₄ 700,8358.

4',5'-Bis(1,2,3-ditioarsolan-2-yl)-4,5,6,7-tetrafluorofluoresceína, F4FlAsH-EDT₂ (9)



Se obtiene un sólido rosado. RMN-¹H (CDCl₃-CD₃OD, 1:1): 3,49 (m, parcialmente oculto por el solvente), 7,06 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7,25 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 10,50 (s, 2H, OH). EMAR(ESI): [M+H]⁺: 736,8168. Calc. C₂₅H₁₅As₂F₅O₅S₄ 736,8170.

2.7.2 Mediciones de las propiedades espectroscópicas

En todos los casos se utilizaron celdas de cuarzo de 10 y 3 mm de paso óptico, según fuera necesario.

Medición de los espectros de absorción UV/Vis: los espectros de absorción en estado estacionario se adquirieron con un espectrofotómetro Kontron Uvikon 920 a temperatura ambiente (23 °C) con 1 nm de resolución. Se utilizaron soluciones de los compuestos biarsenicados **7**, **8** y **9** de concentración 19,7, 20 y 19.2 μM, respectivamente en buffer HEPES 20 mM, pH 7,4, preparadas a partir de soluciones stock en DMSO. Se utilizaron celdas de cuarzo de 10 mm de paso óptico.

Variación de la absorción con el pH: se prepararon soluciones 20 μM de **7**, **8** y **9** en buffer fosfato de pH 5,6, 6,3, 6,7, 6,9, 7,3 y 7,8.

Medición de los espectros de fluorescencia de los complejos: Las determinaciones de estado estacionario de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS50B.

Se utilizaron soluciones de los distintos complejos, preparadas a partir de mezclas 1:1 del derivado biarsenicado y del péptido blanco P12, preincubado con TCEP a 4°C durante 12 hs, utilizando buffer HEPES 20 mM, 2-ME 1 mM, pH 7,4. Los espectros de emisión se adquieren luego de 1-2 hs de incubación, a temperatura ambiente (23°C).

Variación de la emisión con el pH: a partir de soluciones de concentración 0,6 μM de los complejos formados según el ítem anterior, se prepararon diluciones en buffer fosfato de pH 5,6, 6,3, 6,7, 6,9, 7,3 y 7,8. Se tomaron los espectros de emisión a las siguientes longitudes de onda de excitación: 490 nm para F1AsH-P12 y F2F1AsH-P12 y 510 nm para F4F1AsH-P12.

Determinación del tiempo de vida: fueron determinados según el método TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) (ver capítulo 1, Parte experimental) en un sistema Horiba Jobin Yvon IBH. La fuente de excitación utilizada fue un NanoLED N-01 Aqua de 495 nm y el detector TBX-04-A. Se dispuso un filtro de corte Schott KV500 entre la muestra y el detector.

Se utilizaron soluciones 10 μM de los complejos en buffer HEPES 20 mM, 2-ME 1 mM, pH 7,4. El ajuste se realizó con el software DAS6 Data Station implementado en el equipo. Se obtuvieron en todos los casos decaimientos que se ajustan con funciones monoexponenciales ($\chi^2 < 1.3$).

Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia de los complejos: se realizaron a partir de soluciones 0,1 μM de los complejos en buffer HEPES 20 mM, 2-ME 1 mM, pH 7,4. Los valores informados se calcularon en relación al valor informado para FIAsH^{2,24} aplicando la ecuación 2.12.

$$\frac{\Phi_x}{\Phi_{\text{FIAsH}}} = \frac{\int I_x(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}}) d\lambda}{\int I_{\text{FIAsH}}(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}}) d\lambda} \cdot \frac{1 - 10^{-A_{\text{FIAsH}}(\lambda_{\text{exc}})}}{1 - 10^{-A_x(\lambda_{\text{exc}})}} \quad 2.12$$

donde I_x e I_{FIAsH} son los espectros de fluorescencia corregidos y A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación.

2.7.3 Cálculos de los espectros de absorción

Optimización de geometrías del estado fundamental: se utilizaron cálculos *ab initio* con la teoría de DFT implementado en Gaussian 03²⁴. Se eligió el funcional BP86 y la base 6-31G**.

Cálculo de los espectros electrónicos: se realizaron con el método TDDFT (Time Dependent Density Functional Theory). Se hicieron dos cálculos, en fase gaseosa y en fase condensada. Para este último caso, se utilizó el modelo SCRF-PCM (Self

Consistent Reaction Field - Polarized Continuum Model) con los parámetros apropiados para agua, implementado en Gaussian 03.

Los programas soporte utilizados para la visualización de los datos fueron: HyperChem 7.5, Chem3D Ultra 7.0 (del paquete ChemOffice 2000), Molekel 4.3²⁵ y GausSum 0.9.

2.7.4 Marcación específica *in vitro*

El péptido modelo de secuencia FLNCCPGCCMEP (P12) fue provisto por Wita GmbH (Teltow, Alemania). Los experimentos de titulación de las sondas con el péptido se realizaron a partir de soluciones 0,1 μM de las mismas en buffer HEPES 20 mM, 2-ME 1 mM, pH 7,4. Se procedió al agregado de alícuotas de 1 a 20 μL de una solución de P12 1,1 mM, incubando por un lapso de 1 hora antes de tomar el espectro de emisión. Se utilizó una celda de cuarzo provista de agitador magnético, para lograr condiciones homogéneas.

2.7.5 Cinética de formación del complejo

Cada punto de la curva k_{obs} vs [P12] corresponde a una determinación de la cinética de formación del complejo FLAsH-P12 a partir de soluciones 0,34 μM de FLAsH-EDT₂ en buffer HEPES 20 mM, 2-ME 1 mM, pH = 7,4, con P12 en distintas relaciones estequiométricas pero siempre en exceso. Se utilizó una celda de cuarzo provista de agitador magnético y la adquisición de la fluorescencia a $\lambda_{\text{em}} = 527 \text{ nm}$ se realizó inmediatamente luego del agregado del péptido en la celda ubicada en el

fluorómetro. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (23°C). Se realizaron controles en ausencia de péptido para verificar que el aumento de la fluorescencia por descomposición del FIAsh-EDT₂ en el tiempo de reacción sea despreciable frente al aumento de la intensidad por formación del complejo.

2.7.6 Fotoestabilidad

La fuente de alta potencia utilizada fue un irradiador Lumatec Superlite SUV-DC-P, equipado con una lámpara de arco de Hg (200W DC Super Pressure Short Arc Mercury) y salida acoplada por fibra óptica. El irradiador cuenta con selector de tiempo de apertura del mismo y dos filtros de banda ancha que seleccionan entre el visible y el UV. El mismo fue utilizado con el agregado de un filtro de banda ancha Schott BG18 para seleccionar la luz de irradiación. Para estimar la potencia de la luz a la salida de los filtros se utilizó un potenciómetro Ophir Nova con un detector PD-300-UV (Ophir Optronics, Jerusalem, Israel).

El fotoblanqueo se monitoreó por disminución de la fluorescencia luego de distintos tiempos de exposición a la fuente de irradiación. Se utilizó en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS50B para tomar los espectros de emisión en cada punto.

Se utilizaron soluciones de los complejos de concentración 10 µM en buffer HEPES 20 mM, 2-ME 1 mM, pH 7,4.

2.8 REFERENCIAS

1. Griffin B.A., Adams S.R., Tsien A.R. *Science*. 1998, 281, 269-272.
2. Adams S.R., Campbell R.E., Gross L.A., Martin B.R., Walkup G.K., Yao Y., Llopis J., Tsien R.Y. *J.Am.Chem.Soc.* 2002, 124, 6063-6076.
3. Gaietta G., Deerinck T.J., Adams S.R., Bouwer J., Tour O., Laird D.W., Sosinsky G.E., Tsien R.Y., Ellisman M.H. *Science*. 2002, 296, 503-507.
4. Tour O., Meijer R.M., Zacharias D.A., Adams S.R., Tsien R.Y. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1505-1508.
5. Nakanishi J., Nakajima T., Sato M., Ozawa T., Tohda K., Umezawa Y. *Anal.Chem.* 2001, 73, 2920-2928.
6. Ignatova Z, Gierasch L.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004, 101, 523-528.
7. Poskanzer K.E., Marek K.W., Sweeney S.T., Davis G.W. *Nature*. 2003, 426, 559-563.
8. Hoffmann C., Gaietta G., Bünemann N, Adams S.R., Oberdorff-Maass S., Behr B., Vilardaga J.P., Tsien R.Y., Ellisman M.H., Lohse M.J. *Nat. Methods*. 2005, 2, 171-176.
9. Ju W., Morishita W., Tsui J., Gaietta G., Deerinck T.J, Adams S.R., Garner C.C., Tsien R.Y., Ellisman M.H., Malenka R.C. *Nature Neuroscience*. 2004, 7, 244-253.
10. Miller L.W., Cornish V.W. *Curr.Opin. Chem. Biol.* 2005, 9, 56-61.
11. Webb J.L. *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. 1966, Academic Press. New York.
12. Adams R.S., Sparkes M.J. , Dixon H.B.F. *Biochem. J*. 1984, 221, 829-836.
13. Stroffekova K., Proenza C., Beam K.G. *Eur. J. Physiol.* 2001, 442, 859-866.

14. Martin B.R., Giepmans B.N.G., Adams S.R., Tsien R.Y. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 1308-1314.
15. Sandin R.B., Orvis R.L. *J. Org. Chem.* 1958, 23, 1234-1235.
16. Skulski L., Wroczynski P. *Molecules.* 2001, 6, 927-958.
17. Fung C.W., Khorramdel-Vahed M., Ranson R.J., Roberts R.M.G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* 1980, 267-272.
18. Michaelis A. *Ber. d. D. Chem. Gesell.* 1908, 41, 1514-1516.
19. Rossi F.M., Kao J.P.Y. *Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 495-497.
20. Yamaguchi K., Tamura Z., Maeda M. *Acta Crystallogr. Sect. C - Cryst. Struct. Commun.* 1997, 53, 284-285.
21. Getz E. B., Xiao M., Chakrabarty T., Cooke R., Selvin P.R. *Anal. Chem.* 1999, 73, 73-80.
22. Wilkins R.G. *The study of kinetics and mechanism of reactions of transition metal complexes.* 1974, Allyn and Bacon, Inc. Boston.
23. Armarego W.L.F., Perrin D.D. *Purification of laboratory chemicals.* 1988, 4th Ed., Pergamon Press. Oxford.
24. M. J. Frisch G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O.

Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople; Gaussian 03, Revision A.1, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

25. Portmann Stefan, Lüthi Hans Peter. *Chimia*. 2000, 54, 766-770.

CAPÍTULO 3
Aplicaciones de FlAsH y derivados

3.1 APLICACIÓN EN TRANSFERENCIA DE ENERGÍA (FRET)

3.1.1 Transferencia de energía de resonancia (FRET)

La transferencia de energía de resonancia es un proceso físico en el cual la energía se transfiere no radiativamente desde el estado excitado de una molécula cromófora donante (D) a otro cromóforo aceptor (A)^{1,2}. Esta transferencia es principalmente el resultado de una interacción coulombica dipolo-dipolo de larga distancia entre el donante y el aceptor^{3,4}. Para que la transferencia sea efectiva se requiere que: (a) la distancia donante-aceptor sea de 1-10 nm, (b) exista una buena superposición entre el espectro de emisión del donante y el espectro de absorción del aceptor (esto hace que varias transiciones vibrónicas del donante posean la misma energía que las correspondientes transiciones en el aceptor, por lo que pueden estar acopladas es decir, en resonancia) y (c) el rendimiento cuántico del donante (Φ_D) y el coeficiente de extinción molar del aceptor (ϵ_A) ($\Phi_D \geq 0,1$ y $\epsilon_A \geq 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sean suficientemente altos. Además, para que la interacción dipolo-dipolo ocurra, los momentos dipolares de emisión del D y de excitación del A deben estar orientados favorablemente uno con el otro.

Förster derivó la siguiente expresión para la constante de velocidad de la transferencia de energía², k_T :

$$k_T = k_D \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 = \left(\frac{1}{\tau_D} \right) \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad 3.1$$

donde k_D es la constante de emisión del donante, τ_D es el tiempo de vida de fluorescencia del donante D en ausencia del aceptor, r es la distancia entre D y A (la cual se supone que permanece sin cambios durante el tiempo de vida del estado excitado del donante), y R_0 es la distancia crítica o radio de Förster, en la cual la transferencia y el decaimiento espontáneo del donante excitado son igualmente probables ($k_T = k_D$, cuando $r = R_0$, $k_T = 1/\tau_D$). La integral de solapamiento, J , la cual expresa el grado de superposición espectral entre la emisión del donante y la absorción del aceptor, esta dada por:

$$J = \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 3.2$$

donde I_D es el espectro de fluorescencia del donante y ϵ_A el coeficiente de extinción molar del aceptor. R_0 puede determinarse a partir de datos espectroscópicos y esta dada por:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \Phi_D^0}{128\pi^5 N_A n^4} \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \Phi_D^0}{128\pi^5 N_A n^4} \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 3.3$$

donde κ^2 es el factor de orientación, Φ_D^0 es el rendimiento cuántico de fluorescencia del donante en ausencia del aceptor, n es el índice de refracción del medio, I_D es el espectro de fluorescencia del donante normalizado y ϵ_A es el coeficiente de extinción molar del aceptor. El factor de orientación κ^2 esta dado por:

$$\kappa^2 = (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad 3.4$$

donde θ_{DA} es el ángulo entre los momentos de transición del donante y el aceptor, θ_D y θ_A son los ángulos entre el momento de transición respectivo y el vector separación, r (Fig. 3.1).

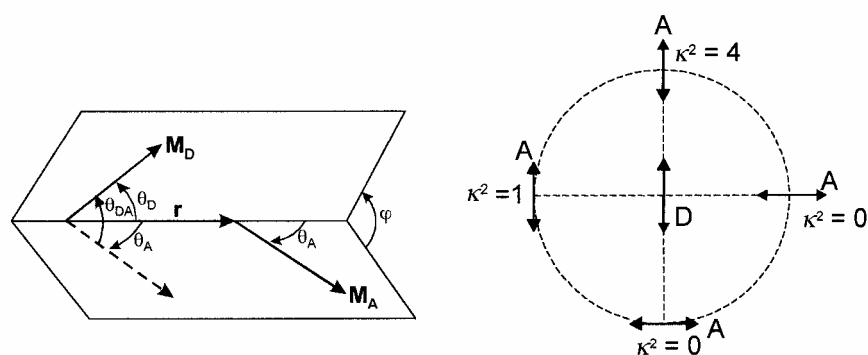


Figura 3.1. Ángulos involucrados en la definición del factor de orientación

En principio, κ^2 puede tomar valores desde 0 (momentos de transición perpendiculares) a 4 (momentos de transición colineales). Cuando los momentos de transición están paralelos, $\kappa^2=1$. Cuando las moléculas, donante y aceptor, rotan libremente a una velocidad mayor que la velocidad de desexcitación del donante (promedio dinámico isotrópico), el valor promedio de κ^2 es $2/3$. Este es el valor que se supone para cálculos de R_0 . En un medio rígido, el promedio para κ^2 es 0,476 para un arreglo de aceptores que están estadísticamente distribuidos de manera aleatoria con respecto al donante en distancia y orientación (este caso es comúnmente nombrado promedio estadístico isotrópico).

La eficiencia de la transferencia de energía (E) puede expresarse como:

$$E = \frac{k_T}{k_D + k_T} = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T} \quad 3.5$$

y puede ser determinada a partir de mediciones de estado estacionario o resueltas en el tiempo. Para medir E por el método del estado estacionario, se determina la intensidad de fluorescencia del donante (F_D) en ausencia y en presencia del aceptor (F_{DA}). Los valores de F_D y F_{DA} son normalizados a las respectivas concentraciones de D, por lo que la eficiencia del par D-A puede ser calculada de la siguiente manera:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad 3.6$$

Cabe destacar que la eficiencia de la transferencia es igual al 50% cuando la distancia donante-aceptor es igual al radio crítico de Förster R_0 (Fig. 3.2).

La metodología de FRET ha sido extensamente utilizada en el estudio de las interacciones entre biomoléculas a escala molecular. Aplicado en forma cualitativa, el fenómeno de FRET permite determinar si dos entidades moleculares se encuentran próximas como resultado de agregación, asociación, cambios conformacionales, etc. Valoraciones cuantitativas de la eficiencia de FRET permiten la determinación de

distancias de separación y por lo tanto de aspectos estructurales y dinámicos de la interacción.

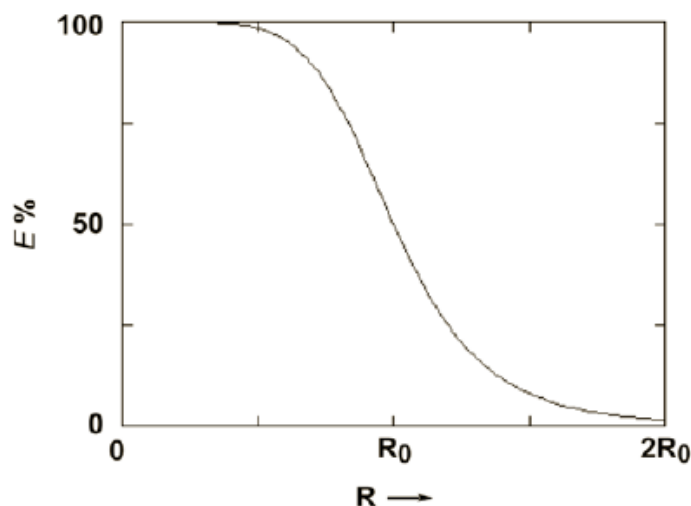


Figura 3.2. Eficiencia de la transferencia (E) versus distancia donante-aceptor

La utilización del fenómeno de FRET asociada a microscopía de fluorescencia permite estudiar con gran selectividad interacciones moleculares en células vivas⁵.

3.1.2 Evaluación de FRET en el par F2FIAsh - F4FIAsh

Para evaluar la utilidad de los nuevos derivados biarsenicados en procesos de FRET resulta útil hacer una inspección de los valores de J , el solapamiento espectral y de R_0 , la distancia crítica de Förster, de distintas combinaciones donor-aceptor. Estos valores se obtienen a partir de las ecuaciones (3.2) y (3.3), respectivamente y de datos espectrales experimentales. Los valores se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Distancias críticas de Förster

Donante	Aceptor			
	<i>ReAsH</i>		<i>F4FLAsH</i>	
	$J \cdot 10^{14}{}^b$	$R_o \text{ nm } (\Phi_d)^a$	$J \cdot 10^{13}$	$R_o \text{ nm } (\Phi_d)$
<i>FLAsH</i>	5,03	3,9 (0,4) ⁶	1,48	4,7 (0,4)
<i>F2FLAsH</i>	3,44	4,1 (0,8)	1,58	5,4 (0,8)
<i>F4FLAsH</i>	6,45	4,1 (0,4)	1,17	4,5 (0,4)
	<i>F2FLAsH</i>		<i>FLAsH</i>	
	$J \cdot 10^{13}$	$R_o \text{ nm } (\Phi_d)$	$J \cdot 10^{14}$	$R_o \text{ nm } (\Phi_d)$
<i>F2FLAsH</i>	1,37	5,2 (0,8)	6,41	4,1 (0,4)

(a) Rendimiento cuántico de emisión. (b) $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{nm}^4$

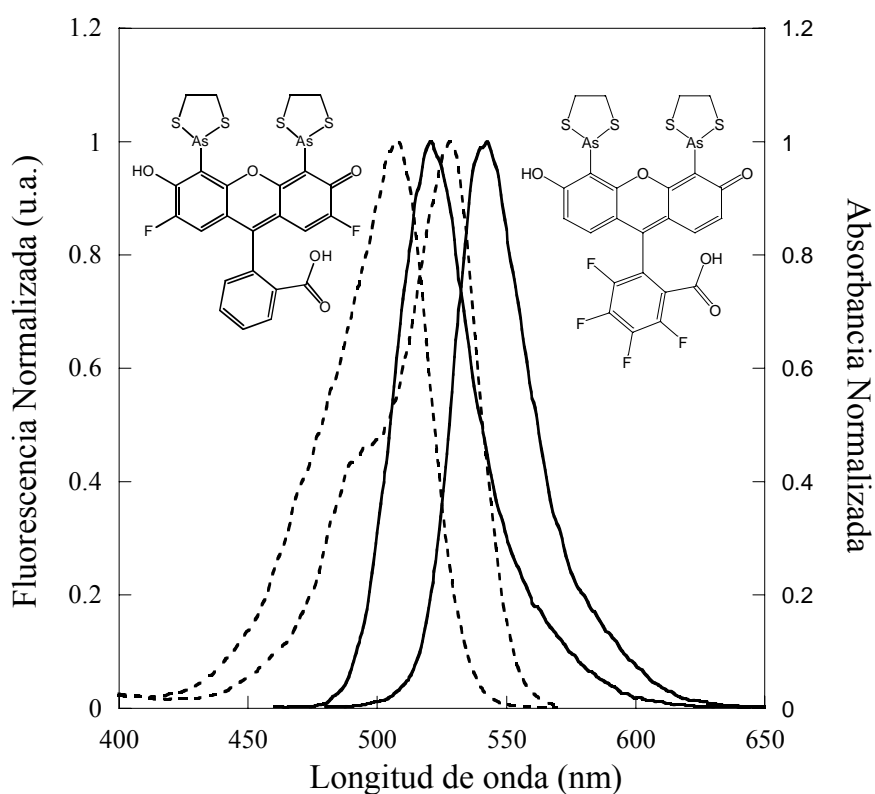


Figura 3.3. Estructuras de las sondas y espectros de absorción y emisión de F2FLAsH-P12 (----) y F4FLAsH-P12 (—)

F2FAsH y F4FAsH tienen un solapamiento espectral muy favorable (Fig. 3.3), con un R_0 de 5,4 nm, mayor que cualquiera de las otras combinaciones basadas en derivados biarsenicados. Por ejemplo, el par más comunmente utilizado FAsH-ReAsH tiene un R_0 de 3,9 nm. Dado que la eficiencia (E) tiene una dependencia con la sexta potencia inversa de la separación entre donante y aceptor, el rango útil en los que E puede utilizarse para extraer información sobre la distancia, es muy restringido alrededor de R_0 . Un aumento de 1,5 nm permite ampliar la región de trabajo en la que se puede utilizar la sonda. De esta forma, la combinación F2FAsH-F4FAsH surge como un nuevo par donante-aceptor para aplicaciones de FRET en estudios *in vivo*. Además, aparecen como alternativa en combinación con otros donores y aceptores de FRET fuera de la familia de biarsenicados, como veremos mas adelante.

El par donante-aceptor F2FAsH - F4FAsH fue evaluado en un experimento de FRET en el sistema biotina-estreptavidina. La interacción entre esta proteína y la biotina es la interacción biológica no covalente mas fuerte que se conoce ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) entre una proteína y su ligando. Cada molécula de proteína de 55 kD posee cuatro sitios de unión a biotina y tiene una dimensión de 54 x 58 x 48 Å.

La formación de la unión es muy rápida y una vez que ocurre no es afectada por pH extremos ni por la temperatura, solventes orgánicos u otros agentes desnaturizantes. El par biotina-estreptavidina es muy utilizado en diversas aplicaciones biotecnológicas.

A partir del F2FAsH y un péptido modelo de la misma secuencia que P12 pero biotinilado (FLNCCPGCCMEP-Biotina), se formó el complejo en las condiciones

usuales y luego se lo hizo reaccionar con estreptavidina en relación 1: 3, de manera de obtener un complejo F2FIAsh-P12biotina por molécula de proteína (Fig. 3.4).

Luego se tituló esta solución con cantidades crecientes del complejo F4FIAsh-P12biotina (Fig. 3.5). Al saturar los sitios libres de la estreptavidina tetramérica, se computó una eficiencia de FRET de 0,34 que corresponde a una distancia de 5 nm entre donador y aceptor, en base a los cálculos realizados con los datos experimentales y la ecuación (3.6). Esta distancia se corresponde satisfactoriamente con la distancia entre sitios que sale de la estructura de Rayos X de la proteína⁷.

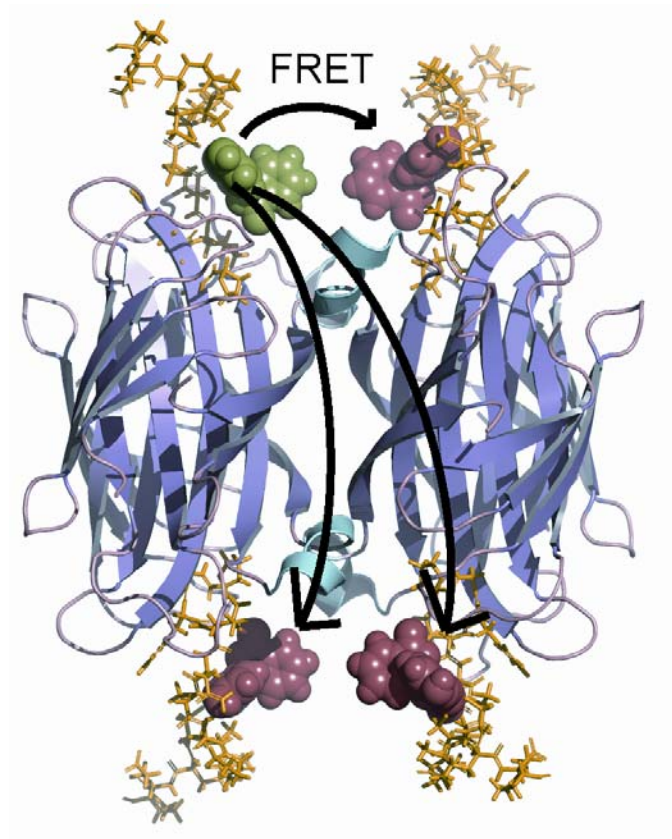


Figura 3.4. Sistema modelo estreptavidina-Biotina-P12-F2/F4FIAsh

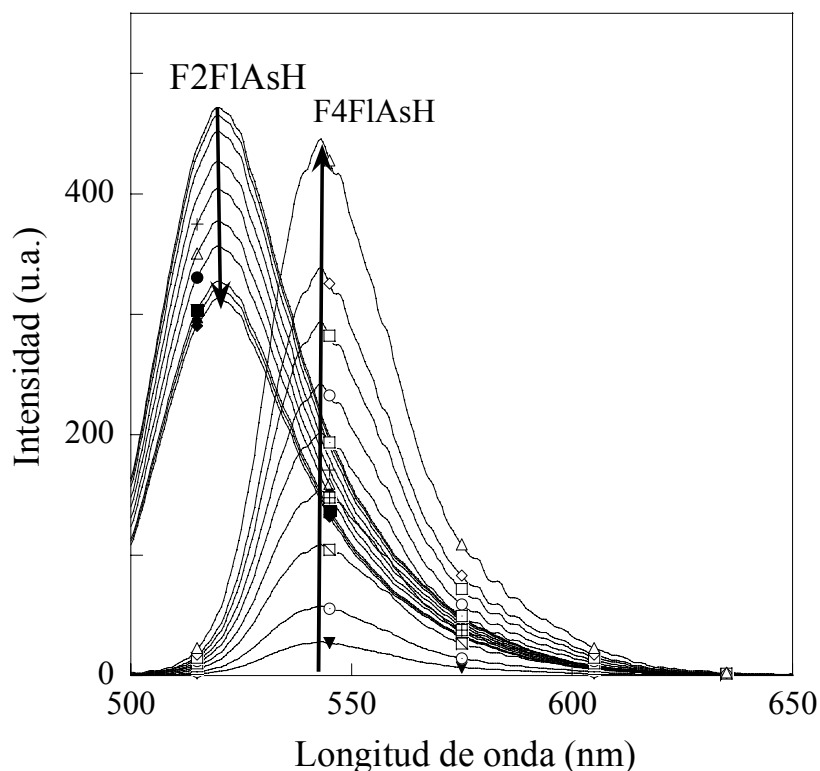


Figura 3.5. Titulación de una solución 0,8 μM del complejo estreptavidina-biotinaP12-F2F1AsH, con F4F1AsH-P12biotina ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$)

Las curvas de la figura 3.5 se obtuvieron a partir de la deconvolución de la curva de titulación total, suponiendo una superposición lineal de las intensidades de fluorescencia del donante y del aceptor. La contribución debida a la excitación directa del aceptor a $\lambda = 490 \text{ nm}$ fue tomada en cuenta en la señal del aceptor a cada concentración. En la figura 3.6 se observa el cambio relativo en la emisión del donante a $\lambda = 520 \text{ nm}$ en el transcurso de la titulación. La eficiencia de la transferencia de energía es máxima cuando los sitios están saturados con el aceptor.

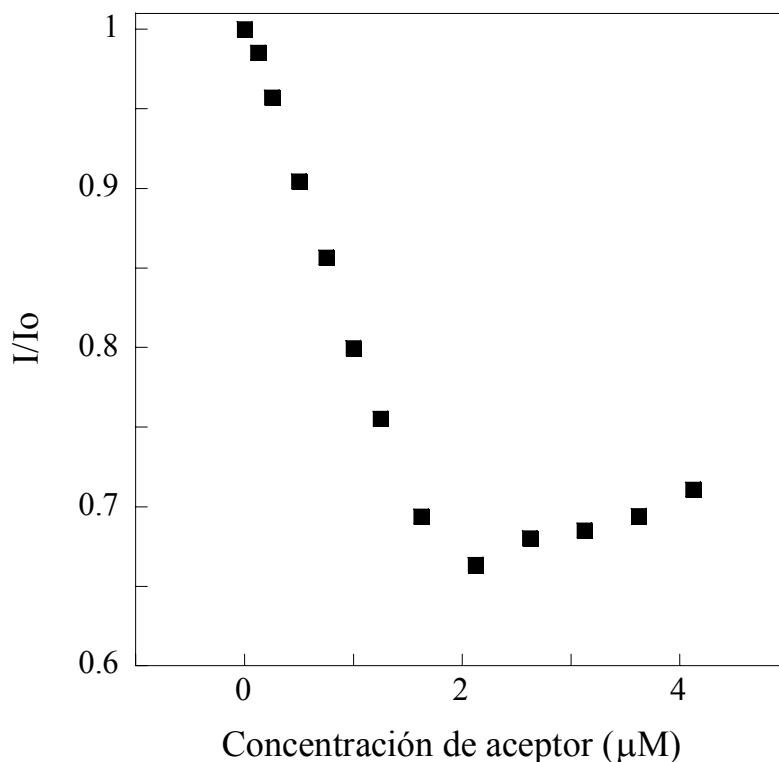


Figura 3.6. Cambios en la emisión del donante ($\lambda_{em} = 520$ nm)

Se observó que a partir del punto de saturación de los sitios con aceptor, la emisión del donante comienza a aumentar. Esto podría ser consecuencia de intercambios entre sondas en los sitios de manera que no se establezcan las condiciones de distancia necesarias para una transferencia de energía eficiente. Este experimento nos permitió cuantificar la eficiencia de la transferencia de energía en este par de sondas aunque debemos considerar que el valor calculado corresponde a una situación global del sistema utilizado. Esto es porque la determinación de la eficiencia por medidas de intensidad, no nos permite discernir entre los distintos pares que en realidad existen sobre la proteína. Debido a que la distancia entre el donante F2FLAsH y el aceptor

F4FAsH en cada uno de los tres sitios restantes es distinta, existe cierta variabilidad en la eficiencia de cada par individual. Una forma saltar esta incerteza sería realizar el seguimiento de la transferencia de energía con determinaciones de vida media.

Para una precisa determinación de distancias por FRET, se requiere conocer la orientación relativa de los fluoróforos. En general, se asume un valor de κ^2 , el factor de orientación, de $2/3$ que es un valor promedio, pero solo se aplica si tanto el donador como el aceptor se encuentran en un movimiento rotacional rápido e isotrópico. En esta situación los momentos de transición del donador y del aceptor se promedian rápidamente durante el tiempo de vida media del donador en todas las orientaciones posibles. Esto no es posible en el caso de las FP (proteínas fluorescentes) debido a su tamaño (27 KDa), que hace que los tiempos de correlación globales de rotación sean más largos que los tiempos de vida media de fluorescencia. La información sobre la libertad rotacional del donador y del aceptor se obtiene a partir de experimentos de polarización de la fluorescencia.

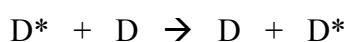
Hemos determinado la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario para F2FAsH-P12Biotina y F4FAsH-P12Biotina (1 μ M en buffer HEPES 20 mM, pH 7,4). Los valores de anisotropía, r , se calculan a partir de la ecuación (3.6).

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad 3.6$$

donde I es la intensidad de fluorescencia y los subíndices corresponden a la excitación/emisión, horizontal, H, o verticalmente, V, polarizadas, y el factor G depende de la sensibilidad del sistema de detección (ver Parte experimental).

Los valores de r calculados fueron 0,038 y 0,046 para F2FLAsH-P12Biotina y F4FLAsH-P12Biotina, respectivamente. Al ser valores bajos, indican que las moléculas de donante y aceptor están orientadas al azar y rotan rápida e isotrópicamente durante el tiempo de vida del estado excitado del donor. Por lo tanto, se puede aplicar el valor de κ^2 de $2/3$ en forma confiable. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el movimiento rotacional puede estar restringido en blancos proteicos de mayor tamaño.

En algunas ocasiones es deseable utilizar un solo tipo de cromóforo en estudios de FRET, sobre todo cuando se quieren eliminar incertezas provenientes de marcaciones con sondas de distintos color pero dirigidas a los mismos sitios blanco, como es el caso de F2FLAsH y F4FLAsH. Este proceso de transferencia de energía entre moléculas del mismo tipo es posible debido al solapamiento “anti-Stokes” de la fluorescencia con la absorción del mismo fluoróforo y tiene lugar cuando el donante se encuentra en concentraciones suficientemente altas, por ejemplo a altas relaciones de marcación sonda/biomolécula. La excitación puede pasar de una molécula a otra y a este proceso se lo llama *migración de energía* u *homotransferencia*.



Si una molécula cede su energía de excitación a otra de su misma especie, esta última tendrá las mismas características de fluorescencia que la primera, de manera que unas cuantas transferencias ocurren como si ninguna hubiera tenido lugar. La

homotransferencia no causa una desexcitación adicional de las moléculas de donante y por lo tanto no resulta en un quenching de la fluorescencia como ocurre en heteroFRET. Sin embargo, cada proceso de homotransferencia contribuye al ensanchamiento de la distribución angular de los dipolos de emisión porque los momentos de transición de las moléculas no son paralelos, de manera que la anisotropía de fluorescencia sí se ve afectada por el proceso de homotransferencia y disminuye en función de la concentración del donante¹. Para este fenómeno de despolarización por concentración, se puede definir una concentración crítica, C_0 , para homotransferencia, donde el número de moléculas presentes en una esfera de radio R_0 (la distancia de Förster para homotransferencia) dividido por el volumen de dicha esfera:

$$C_0 = 3000 / 4\pi N_A R_0^3 \quad 3.7$$

donde N_A es el número de Avogadro.

Como F2FIAsh y F4FIAsh se unen a la misma secuencia blanco, la evaluación de FRET con este par requerirá que se tenga en cuenta la posibilidad de que los procesos de homo y heteroFRET ocurran en forma simultánea. Un tratamiento cuantitativo a este problema fue abordado por Robia y col.⁸ para la evaluación de homoFRET en proteínas marcadas con FIAsh.

3.1.3 Modulación de la fluorescencia del complejo FIAsh-P6 por pcFRET intermolecular

Este estudio es parte de un nuevo método desarrollado en nuestro laboratorio, basado en la modulación de la emisión fluorescente de un donante por un aceptor

fotocrómico de la familia de diheteroariltenos (DAE), denominado **pcFRET** (photochromic FRET)^{9,10}. El cambio estructural del aceptor inducido por la irradiación de luz resulta en cambios en sus propiedades de excitación (Fig. 3.7).

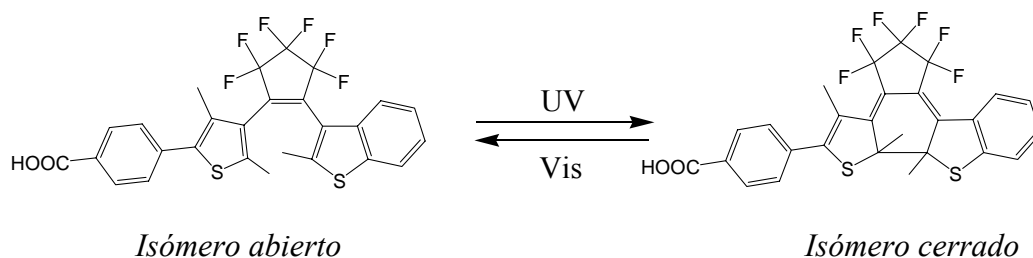


Figura 3.7. Estructuras de los isómeros fotoconvertibles del diheteroarilteno utilizado como aceptor de FRET

El aceptor es elegido de modo tal que el espectro de absorción de sólo uno de los isómeros se superponga con el de emisión del donante. De esta forma el proceso de transferencia de energía puede ser "encendido" o "apagado" en forma reversible, posibilitando la evaluación directa en un mismo sistema del cambio en el rendimiento cuántico del donante debido a FRET (Fig. 3.8).

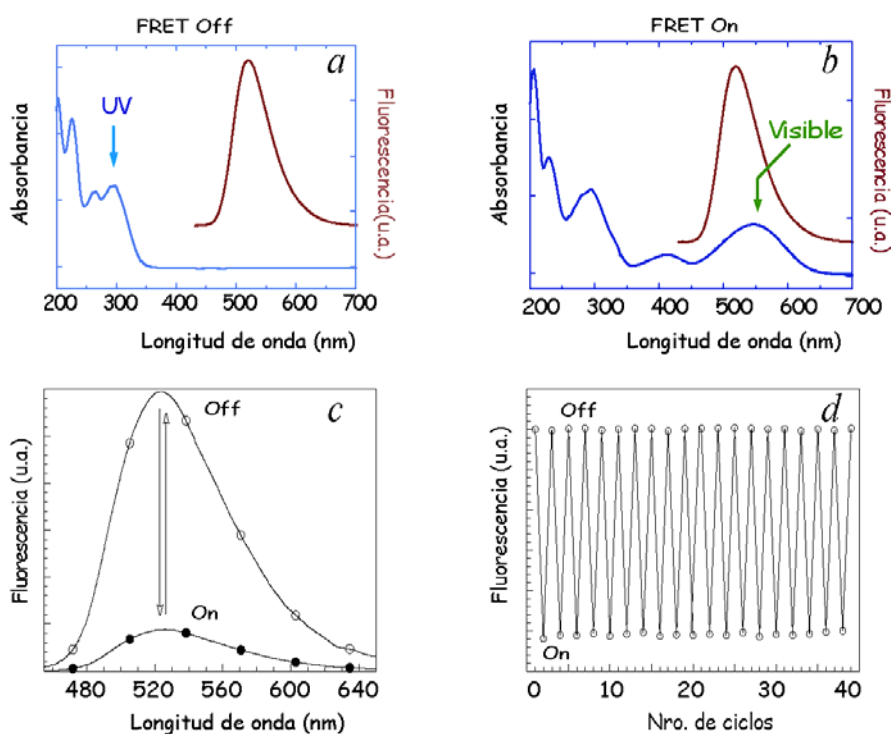


Figura 3.8. pcFRET basado en diheteroarilhetenos como aceptores fotocromicos⁵. Las estructuras químicas corresponden a los diheteroarilhetenos (DAE) en su forma abierta y cerrada. **(a)** Espectro de absorción de la forma abierta no coloreada. **(b)** El espectro de absorción del isómero cerrado solapa convenientemente con el espectro de emisión del donador. **(c)** La irradiación con luz UV produce la transición fotocromica a la forma cerrada (On) y con luz visible revierte a la forma abierta (Off). **(d)** Múltiples ciclos de encendido-apagado del proceso de FRET en el sistema⁹.

Esta característica hace que el método sea especialmente adecuado para microscopía ya que genera el estado de referencia requerido para determinaciones cuantitativas de la eficiencia de FRET, y así puede ser usado para mediciones continuas en sistemas celulares.

La estrategia fue probada en una serie de compuestos modelo constituídos por un donante fluorescente unido covalentemente a un diheteroarileno (DAE) como aceptor (Fig. 3.9).

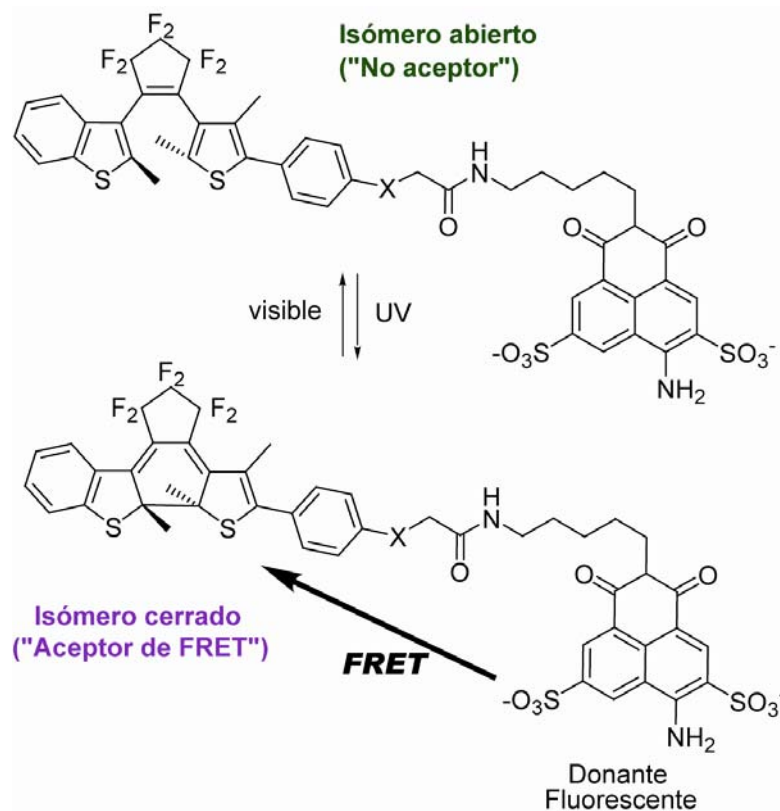


Figura 3.9. Sistema modelo DAE-Lucifer yellow como aceptor y donante, respectivamente¹¹

Los diheteroarileno demostraron ser excelentes aceptores de FRET debido a su gran estabilidad térmica frente a la conversión y su alta resistencia a la fatiga a lo largo de varios ciclos. Uno de los objetivos en el diseño de ligandos biarsenicados para pcFRET fue demostrar que el complejo FLAsH-péptido funciona eficientemente como

donante del compuesto fotocromico en un proceso de transferencia de energía, con la ventaja adicional de que podría ser introducido específicamente en células vivas. Para ello se estudió *in vitro* un sistema modelo en el que el complejo FIAsh-P6 (donde P6 es el péptido blanco de secuencia CCPGCC) actúa como donante de pcFRET, utilizando diheteroariletanos como aceptores.

Se tituló una solución de FIAsh-EDT₂ 50 μM en EtOH: buffer Tris (4:1 v/v) con el hexapéptido CCPGCC para obtener el complejo FIAsh-P6. En la figura 3.10 se observa el aumento de la fluorescencia de la sonda debido a la adición de péptido y como consecuencia de la formación del complejo fluorogénico. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 508 y 524 nm, respectivamente.

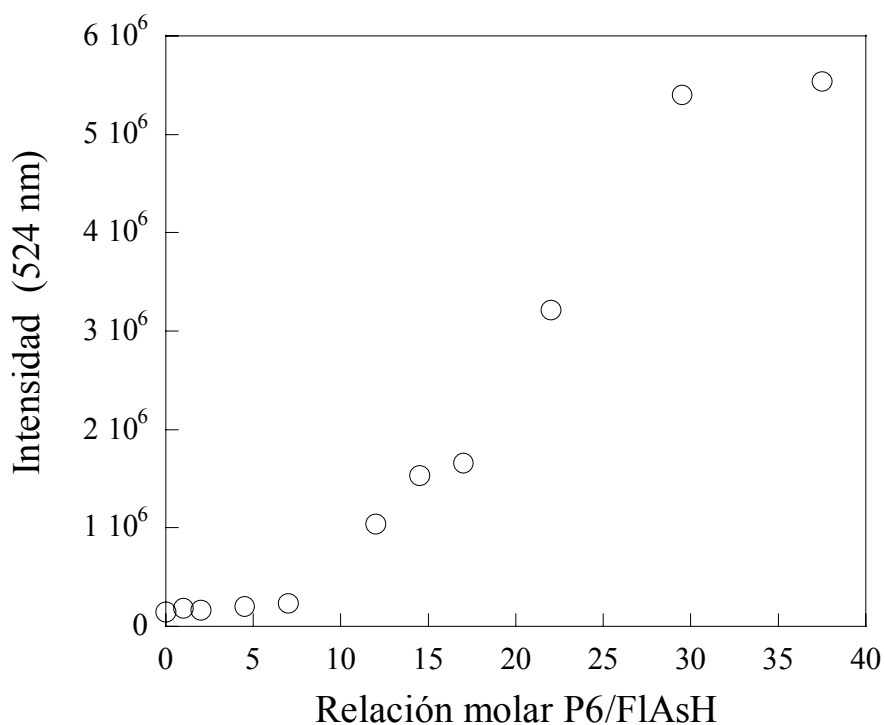


Figura 3.10. Comportamiento fluorogénico de FIAsh-EDT₂ en función de la concentración de P6 (CCPGCC). $\lambda_{exc} = 508$ nm.

A la solución de complejo resultante se la tituló con el diheteroarileno de la figura 3.7 en su forma cerrada aceptora. A lo largo de la titulación se produjo una disminución en la emisión del complejo. El cambio en la pendiente de la curva I_0/I vs [DAE] (Fig. 3.11) a una concentración de DAE 0,54 mM es consistente con el establecimiento de un proceso de transferencia de energía de resonancia intermolecular. A mayor concentración aparece un segundo proceso que se sumaría al quenching colisional. Dadas las características espectrales de ambos compuestos y la distancia intermolecular promedio es razonable postular que el segundo proceso corresponde a transferencia de energía de Förster.

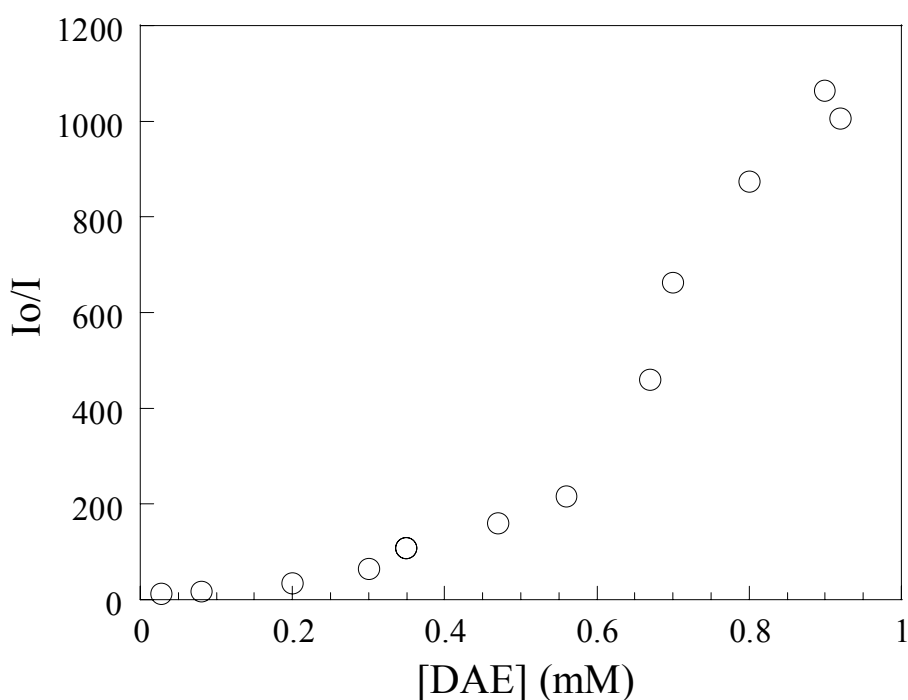


Figura 3.11. Cambios en la fluorescencia del complejo FLAsH-P6 titulado con DAE.

Finalmente, se procedió a modular la emisión del complejo FIAsh-P6 por fotoconversiones cíclicas del diheteroarileno. Al fotoconvertir al DAE a su forma abierta por irradiación con luz visible de $\lambda > 520$ nm, la transferencia se ve inhibida y se recupera la fluorescencia del complejo FIAsh-P6. La transferencia de energía se reestablece por fotoconversión del compuesto fotocromico a su forma cerrada por irradiación con luz UV de 340 nm. El ciclo de encendido-apagado (ON/OFF) se repitió varias veces para evaluar la reversibilidad del proceso (Fig. 3.12).

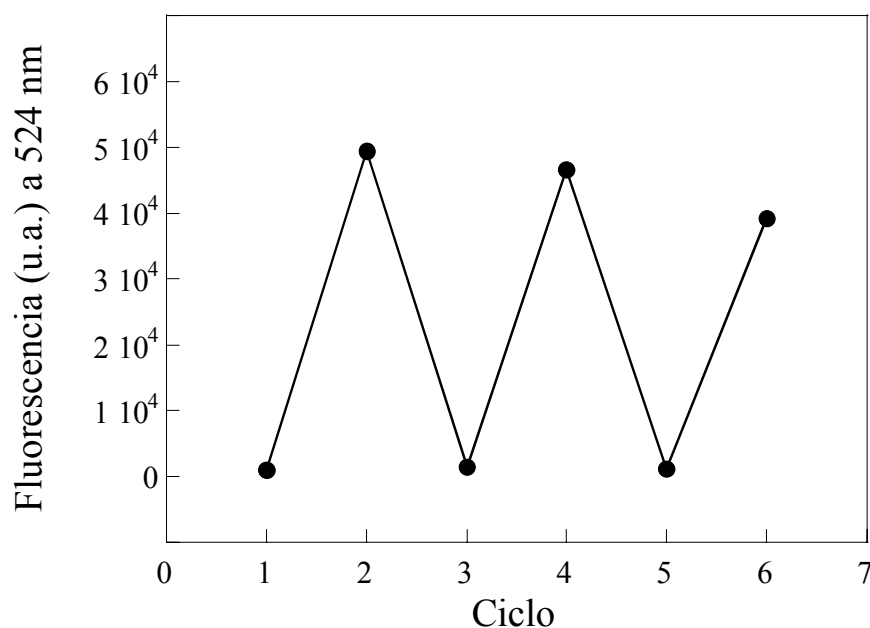


Figura 3.12. Modulación de la fluorescencia del complejo FIAsh-P6 por activación y desactivación cíclica de FRET, por fotoconversión del DAE por irradiación a 340 y 520 nm, respectivamente.

La eficiencia con que se establece el proceso de FRET en el par FIAsh-DAE con la ventaja adicional de poder modular la emisión de la sonda por fotoconversión del

compuesto fotocromico, hacen que sea una combinación con alto potencial para aplicaciones de marcación específica.

3.2 MARCACIÓN ESPECÍFICA EN CÉLULAS EN CULTIVO

Las sondas biarsenicadas preparadas en esta tesis han sido aplicadas exitosamente en distintos estudios biológicos *in vivo* en varios proyectos de nuestro laboratorio y en colaboración con otros grupos. El siguiente estudio sobre F2FIAsh, que incluye la marcación de α -sinucleína, su microinyección y evaluación por microscopía en células de mamífero, ha sido llevada adelante por Maria Julia Roberti, quien utilizó una proteína recombinante obtenida por ella. Maria Julia Roberti es estudiante de Doctorado de esta Facultad y realiza su trabajo en parte en el Departamento de Biología Molecular del Instituto Max Planck de Química Biofísica de Göttingen y en parte en nuestro laboratorio. Los experimentos de FLIM se realizaron en colaboración con Beatriz Domingo, Charo Sabariego y Juan Llopis, de la Universidad de Castilla-La Mancha, España.

3.2.1 Estudios con α -sinucleína

Una de las aplicaciones *in vivo* se realizó con el objeto de comparar las características de los nuevos compuestos FIAsh en el microscopio de fluorescencia en un sistema biológico previamente caracterizado. De acuerdo a las propiedades espectroscópicas descritas (capítulo 2) para los complejos FIAsh-P12 y F2FIAsh-P12

en estudios *in vitro*, se procedió a realizar diversos experimentos para evaluar dichas propiedades en marcaciones *in vivo*.

La proteína de interés es la α -sinucleína. Esta proteína presináptica de 140 aminoácidos es el mayor componente de las lesiones patológicas características de la enfermedad de Parkinson así como también de inclusiones intracelulares de otros desórdenes neurodegenerativos¹². En nuestro grupo, se está estudiando la cinética de agregación y estructura de las fibras resultantes, por diversos métodos. En particular, uno de ellos involucra la modificación de la proteína con un péptido de 12 aminoácidos que contiene los sitios de unión específicos para derivados biarsenicados en el extremo carboxilo terminal y que es parte de la tesis doctoral de María Julia Roberti. Los detalles experimentales del diseño y aplicación de esta proteína recombinante serán discutidos en dicho trabajo. Se presentan a continuación, los resultados preliminares conseguidos con los compuestos preparados en esta tesis.

3.2.1.1 Determinaciones *in vitro*

La proteína α -sinucleína modificada genéticamente con el sitio de unión para compuestos biarsenicados, en una concentración 100 μ M (adecuada para realizar ensayos de microinyección *a posteriori*), fue marcada con una cantidad en defecto de las sondas FAsH y F2FAsH (0,4: 1), dado que a los efectos del estudio no fue necesaria una relación proteína:fluóforo 1:1, y se deseó minimizar el consumo de

estos valiosos compuestos. La reacción se llevó a cabo en buffer HEPES 20 mM pH 7,2, en presencia de DTT 300 μ M para mantener los grupos tioles libres.

La marcación se realizó incubando las muestras 1 hora a temperatura ambiente, luego de lo cual se dejaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se eliminó el exceso de fluoróforo no complejo utilizando columnas de exclusión BioSpin con corte 6000.

Se tomaron los espectros de absorción de las muestras y se calculó la concentración de sonda a partir de los valores de los coeficientes de extinción molar: 52.000 $M^{-1}cm^{-1}$ para FIAsh y 65.500 $M^{-1}cm^{-1}$ para F2FIAsh. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Concentración de las muestras de proteína marcadas con FIAsh y F2FIAsh.

	α -sinucleína-FIAsh	α -sinucleína-F2FIAsh
Concentración (μ M)	38	39

A continuación se registraron los espectros de emisión excitando a 488 nm (Fig. 3.13). Las soluciones fueron diluídas para evitar efectos de filtro interno.

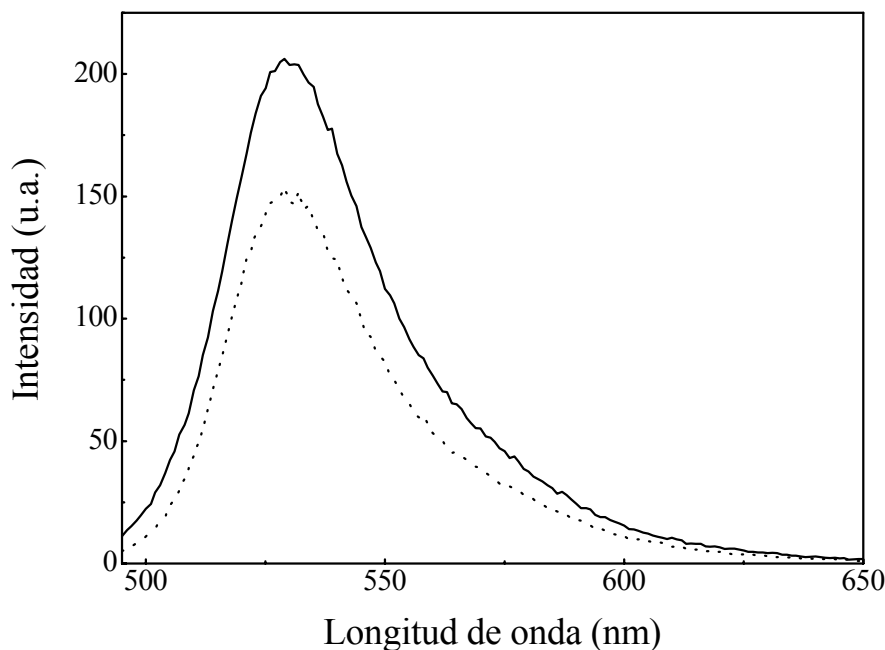


Figura 3.13. Espectros de emisión de los bioconjugados α -Sinucleína-FIAsh (...) y α -Sinucleína-F2FIAsh (—) a la misma concentración. $\lambda_{exc.} = 488$ nm.

La emisión de α -Sinucleína-F2FIAsh resultó ser más intensa que la de α -Sinucleína-FIAsh a la misma concentración, pero no llega a ser tan marcada la diferencia como lo observado *in vitro* con el péptido P12 (capítulo 2). Es posible que la formación del complejo en la proteína provoque algún cambio estructural y del entorno que afecte la intensidad de la emisión de ambos complejos y se vea un menor incremento de la fluorescencia respecto de lo que se observó para los complejos con P12. De todas maneras, se observó en el bioconjugado una mayor luminescencia a favor de F2FIAsh.

3.2.1.2 Medidas *in vivo* sobre la línea celular HeLa

Las mismas muestras de proteína caracterizadas *in vitro* fueron utilizadas en los ensayos *in vivo*, a través de la microinyección de las mismas en las células. El objetivo fue comparar la intensidad de la emisión y la fotoestabilidad de las sondas ligados a α -sinucleína en el contexto celular. Para ello es necesario conocer la concentración en el interior de la célula luego de la microinyección. En principio, la microinyección automática permite estimar que el volumen microinyectado es $\sim 10\%$ del volumen celular, pero es posible que durante el procedimiento se produzcan pérdidas de solución antes de que la membrana se recupere de la lesión, por lo que se coinyectó dextrano marcado (D*) como estándar interno. De este modo, la señal fluorescente puede normalizarse respecto de la señal de D* en cada célula, y esos valores serán los que se comparen para obtener una relación entre las intensidades de las sondas estudiadas, independientemente de la cantidad de solución microinyectada. Es deseable la utilización de un dextrano conjugado con un fluoróforo cuya emisión no interfiera con las de FIAsh o F2FIAsh. Un fluoróforo ideal para la función de estándar interno sería uno fotoestable y que pudiera ser excitado por el láser de 633 nm. Se utilizó el D* marcado con el fluoróforo Atto647.

Luego del proceso de microinyección con α -sinucleína-FIAsh/F2FIAsh + D*-Atto647 y posterior incubación, las células se fijaron y se procedió a realizar el análisis en un microscopio de fluorescencia confocal LSM 510 Meta (Zeiss) provisto de un láser de argón como fuente de excitación. La potencia del láser fue seteada al 1% para la obtención de imágenes y al 10% los para ensayos de fotoblanqueo. Se utilizó un filtro

LP 545 para la emisión de FIAsh y F2FIAsh. Se utilizó un láser de excitación de 633 nm para Atto647 y un filtro de emisión LP 650.

Se tomaron imágenes de distintos campos de las células marcadas con FIAsh y con F2FIAsh, y sobre esas imágenes se calculó la intensidad efectiva de cada fluoróforo (I_{ef}) como:

$$I_{ef} = I_{FIAsh \text{ o } F2FIAsh} / I_{Atto}$$

que tiene en cuenta la variación en volumen microinyectado y así permite una directa comparación entre las señales de FIAsh y F2FIAsh. La figura 3.14 muestra ejemplos de las imágenes adquiridas (la intensidad de los canales se ajustó para apreciar mejor el resultado de la microinyección, pero en los cálculos fueron usados los valores crudos) y en la Tabla 3.3 se vuelcan los valores de intensidad comparados.

Tabla 3.3. Valores relativos de intensidad normalizados de FIAsh y F2FIAsh en células HeLa microinyectadas

FIAsh	F2FIAsh
0,18	0,30

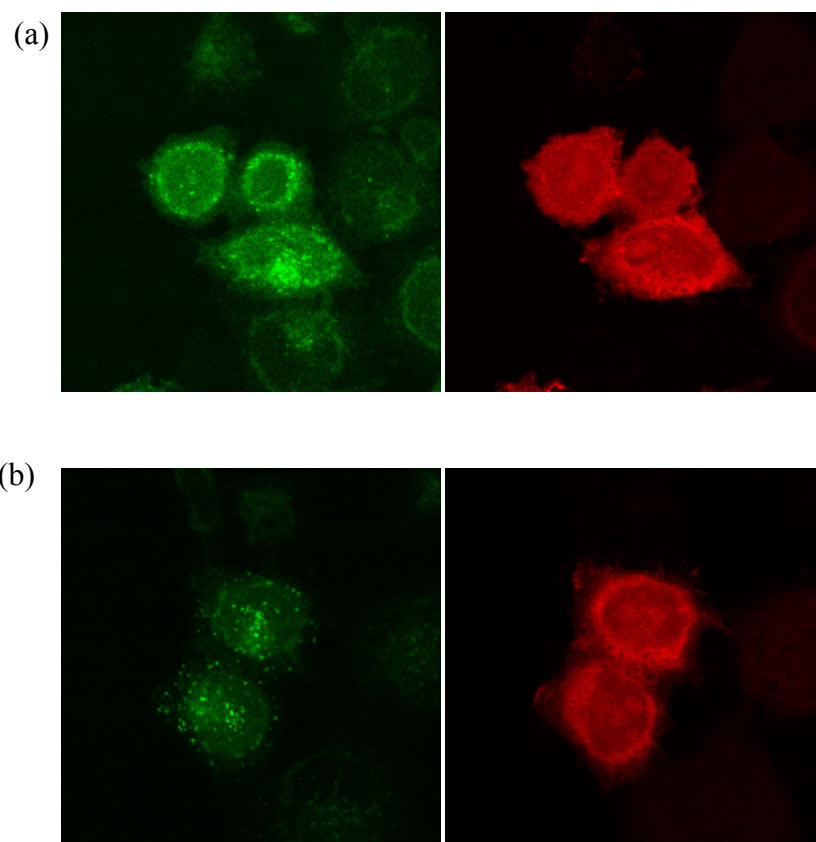


Figura 3.14. Células HeLa microinyectadas con (a) α -Sinucleína-F2F₁AsH (verde) + D*-Atto647 (rojo) y (b) α -Sinucleína-F₁AsH (verde) + D*-Atto647 (rojo)

Estos valores indican que F2F₁AsH tiene una intensidad 1,5 veces mayor que F₁AsH en el contexto celular. La marcación de la α -sinucleína con F2F₁AsH dá una señal de fluorescencia un 40% mas intensa que la marcación con F₁AsH, en las mismas condiciones experimentales.

Para los ensayos de fotoblanqueo se seleccionó una pequeña región circular (“region of interest”, ROI) en cada uno de los campos adquiridos previamente.

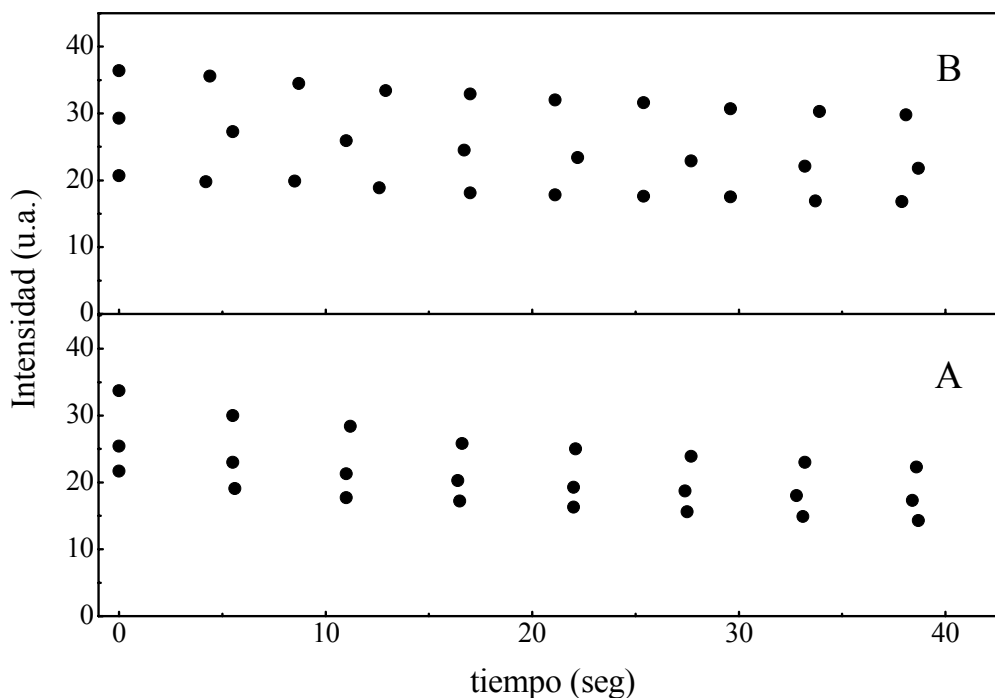


Figura 3.15. Curvas de fotoblanqueo de distintas ROI en muestras de células microinyectadas con (A) α -sinucleína-FAsH y (B) α -sinucleína-F2FAsH sometidas a fotoblanqueo

Las curvas obtenidas (Fig. 3.15) muestran que en la mayoría de las regiones seleccionadas, el porcentaje total correspondiente a la pérdida de intensidad de fluorescencia por fotoblanqueo a los 40 segundos de irradiación es mayor para las células marcadas con FAsH (~ 35%) que para las marcadas con F2FAsH (~ 18%). El fotoblanqueo sigue un decaimiento monoexponencial:

$$I(t) = I_0 + A \exp(-\alpha t)$$

El promedio de las constantes de decaimiento de las ROI es de $\alpha = 0,044 \text{ s}^{-1}$ para FLAsH y $\alpha = 0,030 \text{ s}^{-1}$ para F2FLAsH.

Estos valores de α indican que la cinética de fotoblanqueo es un poco mas lenta para F2FLAsH en las condiciones del ensayo. El haber utilizado una potencia del láser elevada (10% respecto del 1% que se suele usar en condiciones típicas de adquisición de imágenes en este sistema) podría ser la causa del efecto observado.

3.2.2 Estudios de FLIM

La marcación multicolor con varios fluoróforos se utiliza habitualmente para observar la distribución simultánea de distintos componentes celulares. La técnica de FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) es una tecnología reciente en el área de la microscopía y se utiliza para estudiar los factores del microentorno que afectan las propiedades de los tiempos de vida media de fluorescencia de una molécula en el microscopio. En la microscopía de fluorescencia convencional, se utilizan las diferencias en las características espectrales de los distintos fluoróforos (longitud de onda de emisión), lográndose distinguir 5 o 6 colores en el rango UV-IR sin confusión. Como cada fluoróforo tiene su tiempo de vida característico del estado excitado, es posible distinguir aún entre moléculas que tienen el mismo color, por métodos resueltos en el tiempo. Incluso se pueden llegar a obtener imágenes de alta relación señal-ruido si se utiliza una sonda con un tiempo de vida media largo en relación a los fluoróforos

comunes. Con la técnica de FLIM se obtienen imágenes en 2 o 3 dimensiones en las que cada valor en un dado pixel o voxel representa el tiempo de vida de fluorescencia.

Los factores que afectan el tiempo de vida de fluorescencia son: el pH, la presencia de iones, las propiedades hidrofóbicas, la concentración de oxígeno, las uniones entre moléculas y las interacciones por transferencia de energía. Por otro lado, el tiempo de vida media es independiente de la concentración de fluoróforo, el fotoblanqueo, la luz de scattering y la intensidad de la luz de excitación. Por estas razones, la técnica de FLIM es especialmente útil en la medición de la concentración de iones y en determinaciones de FRET en células vivas. La técnica ha sido ampliamente utilizada en la determinación de parámetros celulares como el pH, concentraciones iónicas y saturación de oxígeno, detección de proteínas y ADN¹³⁻¹⁸.

Existen dos métodos por los que se puede llevar a cabo una determinación por FLIM (ver Parte experimental):

- *FLIM en el dominio del tiempo*: el tiempo de vida (\sim ns) se mide luego de aplicar un pulso láser de unos picosegundos de duración. Las imágenes son capturadas por un PMT funcionando como un contador de fotones que detecta el decaimiento exponencial y las imágenes se obtienen en distintos colores de acuerdo a sus tiempos de vida.
- *FLIM en el dominio de las frecuencias*: el tiempo de vida se calcula midiendo el corrimiento de fase de la fluorescencia y/o la disminución en su amplitud utilizando un láser modulado como fuente de excitación continua.

La óptica y el sistema de detección que se utilizan son similares a menos de la fuente de excitación que es pulsada o continua, según el método.

Durante el proceso de FRET, el tiempo de vida del donante disminuye y por lo tanto la determinación de este parámetro brinda una medida de la eficiencia. En situaciones en las que no se puede discriminar entre múltiples fluoróforos, la técnica de FLIM permite obtener resolución por discriminación de las componentes de un decaimiento multiexponencial. El requisito que debe cumplir la técnica para ser buena es contar con una eficiente recolección de fotones en la detección para lograr el análisis multifrecuencias.

En colaboración con el grupo de Juan Llopis, de la Universidad de Castilla-La Mancha (España), hemos aplicado la técnica de FLIM sobre células de la línea HeLa con la nueva sonda biarsenicada F₂F_lAsH-EDT₂ preparada en esta tesis en comparación con F_lAsH y ReAsH. Las células utilizadas fueron transfectadas con una proteína fluorescente modificada con un motivo tetracisteína específico para la unión de F_lAsH en el extremo C-terminal, mCFP-CCPGCC (*monomeric Cyan Fluorescent Protein*). La mCFP tiene un máximo de excitación a 433 nm (ϵ : 32.500 M⁻¹cm⁻¹) y de emisión a 475 nm ($\Phi = 0,4$). La expresión de esta proteína fue citoplasmática y nuclear.

Las células transfectadas fueron tratadas con F_lAsH, F₂F_lAsH y ReAsH a fin de estudiar la transferencia de energía entre la CFP (donante) y las sondas biarsenicadas (aceptor) en el microscopio con la técnica de FLIM. El análisis de los datos obtenidos por determinaciones resueltas en el tiempo se correlacionaron con medidas en estado estacionario.

Para analizar los cambios en la intensidad de fluorescencia tanto del donante como del aceptor a lo largo de la marcación en el microscopio, se utilizaron dos canales de observación de la emisión con distintos filtros pasabanda: 480 ± 15 nm para la mCFP y 535 ± 13 para FAsH y F2FAsH. En la figura 3.16 se muestra el análisis realizado sobre una región de interés (ROI) seleccionada sobre una célula individual (en total se seleccionaron 6 ROI). A los 12 minutos de iniciada la adquisición de imágenes se agregó F2FAsH-EDT₂ 5 μ M a las células y se siguió la marcación en el microscopio. Se observó que la relación de intensidades I_{535}/I_{480} aumentó de 0,5 a 2 a lo largo de 3,5 horas desde el agregado de F2FAsH-EDT₂. El aumento de la intensidad de emisión de F2FAsH (aceptor) indica que el proceso de FRET está ocurriendo a medida que las moléculas de la sonda se unen específicamente a la mCFP-CCPGCC.

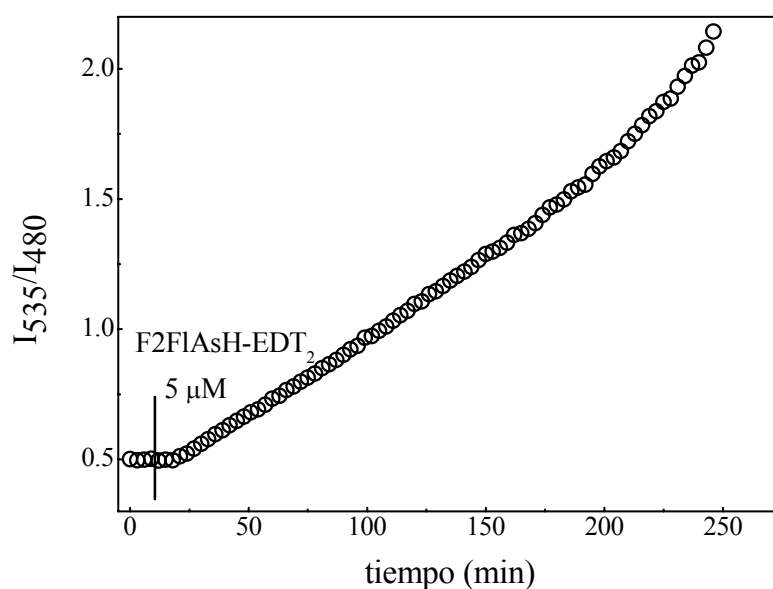


Figura 3.16. Cambios en la relación I_{535}/I_{480} por FRET en el par CFP-F2FAsH

Luego de este tiempo la señal no alcanzó un valor que indicara la saturación del constructo. Si bien, 4 horas es un tiempo largo, es cierto que el período de marcación sería mas corto en un incubador que a temperatura ambiente, en la que se realizaron estos experimentos. También se vió que la señal de fondo fluorescente proveniente del F2F_lAsH-EDT₂ extracelular, desapareció al lavar las células con medio limpio. Esta señal no se vió en el experimento llevado a cabo con F_lAsH-EDT₂, lo que indicaría que el derivado fluorado tiene cierta fluorescencia antes de unirse al motivo tetracisteína. De todas maneras, esta señal de fondo extracelular solo influye durante el proceso de marcación ya que se elimina totalmente con el lavado.

En el gráfico 3.17 se representa la disminución de la fluorescencia del donante (mCFP) en el tiempo de marcación como consecuencia de la transferencia de energía con F2F_lAsH. Sin embargo, esta disminución no es tan marcada como el aumento de fluorescencia del aceptor y esto podría deberse a la detección de cierta emisión del aceptor (~ 520 nm) por el canal del donante (filtro 480 ± 15) que contribuiría a la señal.

Esto podría suceder porque el espectro de emisión del aceptor, está desplazado hacia el azul comparado con el de F_lAsH.

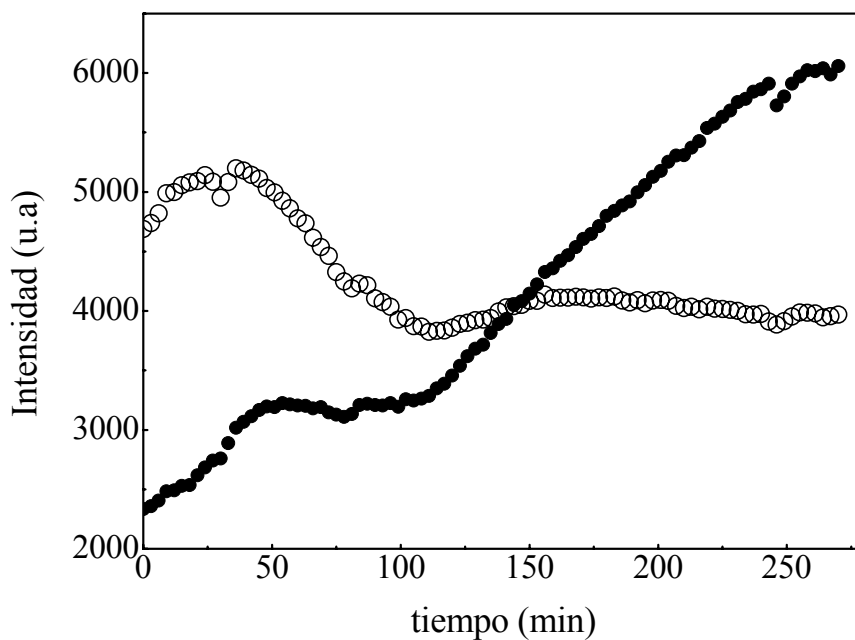


Figura 3.17. Aumento de la emisión del aceptor (●) F2FAsH a 535 nm y disminución de la emisión del donante (○) CFP a 480 nm

Luego de finalizada la marcación se procedió a realizar un lavado con BAL (2,3-dimercaptopropanol) 0,25 mM a fin de desplazar el compuesto biarsenicado del complejo con el motivo tetracisteína. La remoción completa de la marca F2FAsH ocurrió con una concentración de BAL de 10 mM (Fig. 3.18).

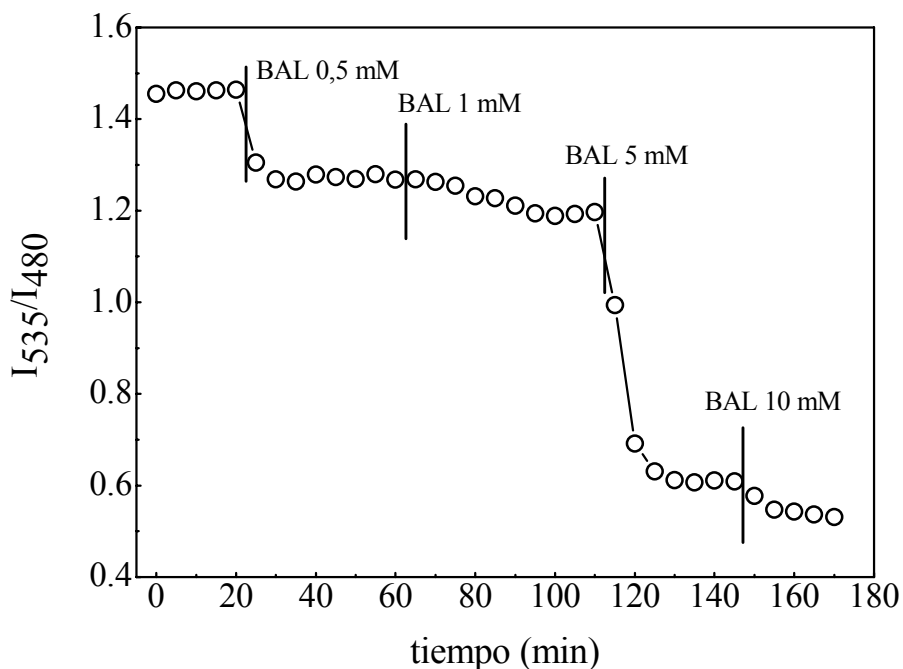
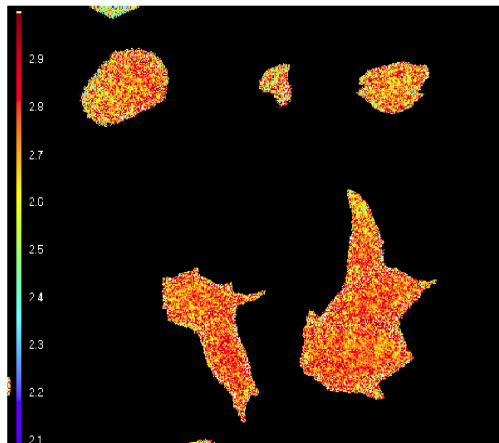
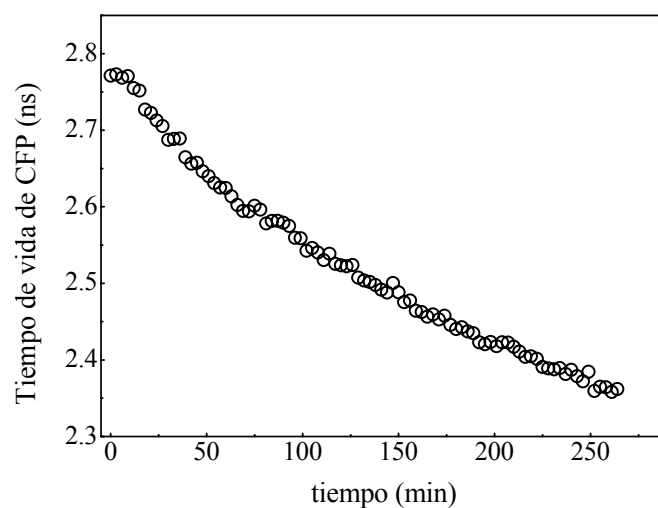


Figura 3.18. Remoción de F₂F_lAsH del motivo CCPGCC con BAL a distintas concentraciones

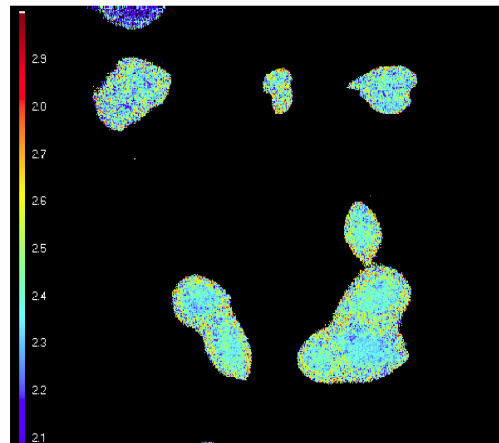
Se requirió una concentración de BAL 5 mM para remover la sonda y llegar al valor inicial de la relación de intensidades, o sea, para recuperar la intensidad de emisión inicial de la mCFP.

A continuación se detallan los resultados de las determinaciones resueltas en el tiempo. El tiempo de vida del estado excitado de mCFP-CCPGCC en ausencia del aceptor fue de 2,7 ns. Al agregar el F₂F_lAsH-EDT₂ se observó una disminución de este valor debido al proceso de FRET entre la CFP y la sonda a medida que avanza la marcación. En la figura 3.19 se grafica esta evolución para una dada región de interés

(ROI) junto a las imágenes de las células en ausencia y presencia de la sonda biarsenicada aceptora. La escala de colores referencia los valores de tiempo de vida.



(a)



(b)

Figura 3.19. Disminución del tiempo de vida de mCFP por transferencia de energía (FRET) con F2FAsH (gráfico superior). La imagen (a) corresponde a las células en ausencia de F2FAsH-EDT₂ y la imagen (b) en presencia de la sonda a los 264 min de comenzada la marcación

El tiempo que se tardó en alcanzar la mitad del quenching total de la fluorescencia de mCFP por la marcación con las distintas sondas biarsenicadas fue menor con ReAsH y FLAsH que con F2FLAsH.

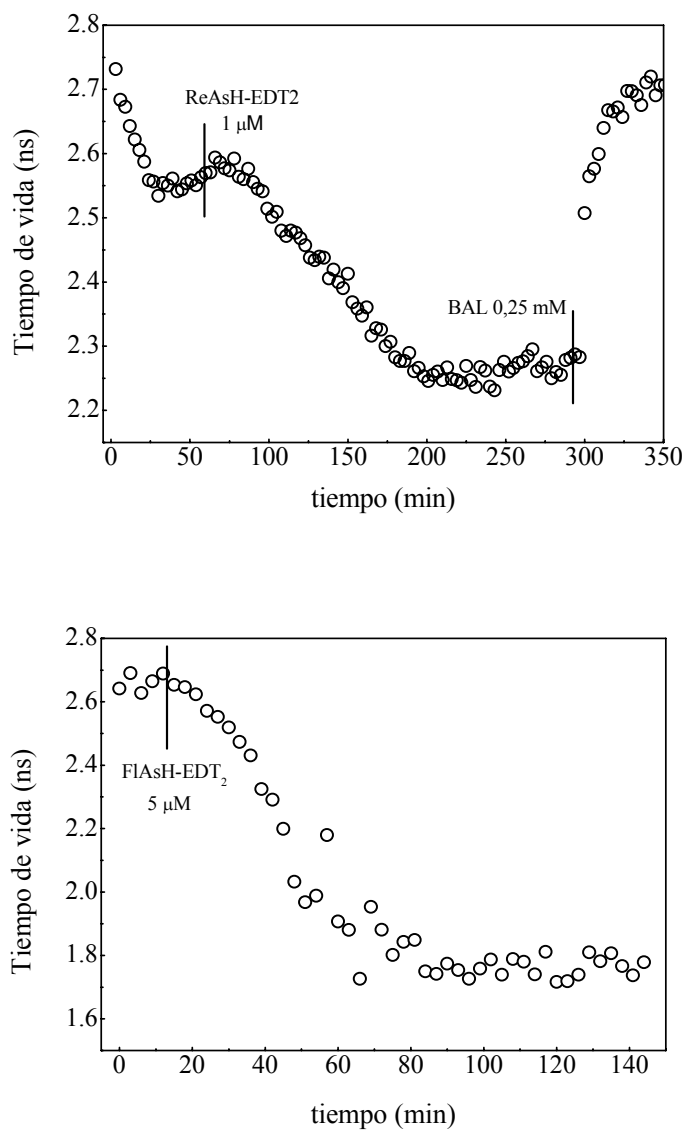


Figura 3.20. Disminución del tiempo de vida de CFP por FRET con ReAsH (panel superior) y con FLAsH (panel inferior).

La comparación de los tiempos de vida de CFP antes y después de la marcación con F2F_lAsH como aceptor, nos permitió computar una eficiencia de FRET de 0,15, según la ecuación (3.8), donde τ_{DA} y τ_D es el tiempo de vida de CFP en presencia y ausencia del aceptor, respectivamente. En el caso de la marcación con F_lAsH y ReAsH, la eficiencia máxima fue de 0,38 y 0,18, respectivamente.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad 3.8$$

Luego de haberse completado la marcación se procedió a realizar lavados con BAL (2,3-dimercaptopropanol). Las células marcadas con ReAsH mostraron un aumento del tiempo de vida de la CFP a los valores iniciales en ausencia del aceptor en 10-15 minutos luego del lavado con BAL 0,25 mM. Como se mencionó previamente, F2F_lAsH requirió un lavado con una solución de concentración 5 mM para remover la marca (Fig. 3.20).

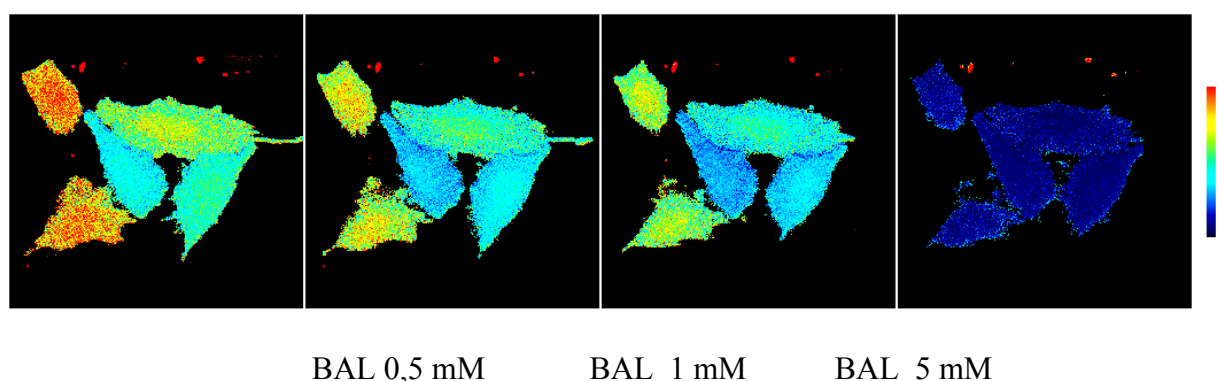


Figura 3.20. Remoción de la sonda F2F_lAsH por lavados con BAL a distintas concentraciones

Hasta aquí, la evaluación preliminar de F₂FlAsH en células vivas nos permite establecer las siguientes diferencias con FlAsH y ReAsH:

- Se observó una marcación mas lenta de las células para F₂FlAsH, tanto en el experimento en estado estacionario como en el experimento de FLIM. Esta diferencia no es importante si tenemos en cuenta que la marcación puede realizarse en un incubador o a temperatura ambiente y no en el microscopio como se hizo en estos experimentos.
- La señal de fondo en las células no transfectadas y por lo tanto sin sitio de marcación para los derivados biarsenicados, fue mayor para F₂FlAsH que para FlAsH. Sin embargo, esta diferencia se eliminó luego de lavar las células con medio de cultivo HBSS al final del procedimiento de marcación y luego de lavar con BAL las células no transfectadas, en las que existe una eventual marcación inespecífica debido a las cisteínas endógenas.
- El bioconjugado CFP-CCPGCC-F₂FlAsH resultó ser mas resistente que los correspondientes con FlAsH y ReAsH frente a los lavados con BAL a altas cocentraciones, lo que indica la formación de un bioconjugado mas estable.

En el arreglo experimental para FLIM que se introdujo en el microscopio utilizado puede existir una dificultad técnica en cuanto a los filtros utilizados. Esto afecta la cuantificación de FRET por FLIM ya que el mismo canal de emisión que captura la luz emitida por la CFP puede detectar la emisión del F₂FlAsH (Fig. 3.17). De hecho, si bien se observó una disminución del τ_{CFP} en la marcación con F₂FlAsH, también se observó

una contribución progresiva de fluorescencia de mayor τ (4,8 ns, correspondiente al complejo de F2FAsH). Esta dificultad técnica puede mejorarse con un arreglo de filtros mas adecuado o utilizando el derivado F4FAsH-EDT₂ que emite a 544 nm.

3.3 CONCLUSIONES

Hemos discutido la aplicación de los derivados biarsenicados en distintos estudios de transferencia de energía (FRET) tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*, demostrando la versatilidad de estos compuestos en este tipo de experimentos. También pudimos comprobar la mejora en la señal y en la fotoestabilidad que se obtiene al utilizar los derivados fluorados preparados en esta tesis en sistemas biológicos.

Los resultados obtenidos en la aplicación de los derivados biarsenicados en la reciente metodología de pcFRET son alentadores en cuanto al diseño de nuevas sondas combinadas basadas en estos compuestos y moléculas fotocromicas tipo DAE, para marcación específica de biomoléculas. Los nuevos derivados biarsenicados fluorados conforman un par donante-aceptor para FRET con un valor de R_0 mayor que el del par FAsH-ReAsH, comúnmente utilizado en este tipo de estudios.

3.4 PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1 Experimento de FRET en el par F2FLAsH-F4FLAsH

Los espectros de absorción en estado estacionario se adquirieron con un espectrofotómetro Kontron Uvikon 920 a temperatura ambiente (23 °C) con 1 nm de resolución. Las determinaciones de fluorescencia en estado estacionario se realizaron con un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS50B.

En todos los casos se utilizaron celdas de cuarzo de 10 y 3 mm de paso óptico, provistas de agitador magnético, según fuera necesario.

El péptido modelo P12Biotina (FLNCCPGCCMEP-Biotina) fue provisto por Wita GmbH (Teltow, Alemania) y la estreptavidina por Sigma-Aldrich CO.

Preparación de las soluciones:

El buffer utilizado para todas las soluciones fue HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, 2-ME 1 mM, pH 7,4.

Solución de donante F2FLAsH-P12Biotina-estreptavidina: se realizó primero la formación del complejo F2FLAsH-P12Biotina a partir de sus componentes en relación 1:1 y en concentración final 0,8 μ M, por un lapso de incubación de 1 h. Luego se agregó estreptavidina en relación 1:1 y concentración final 0,8 μ M.

Solución de aceptor titulante F4FLAsH-P12Biotina: se preparó el complejo en relación 1:1 y concentración final 1 μ M.

Solución control de aceptor F₄FlAsH-P12Biotina-estreptavidina: se realizó primero la formación del complejo F₄FlAsH-P12Biotina a partir de sus componentes en relación 1:1 y concentración final 1 μM, por un lapso de incubación de 1 h. Luego se agregó estreptavidina en relación 1:1.

Se adquirió el espectro de emisión de esta solución a $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm.

Se procedió a titular la solución de donante con alícuotas crecientes de la solución de aceptor, con agitación, y luego de un tiempo prudencial para permitir la unión biotina-estreptavidina, se tomó el espectro de emisión a $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm.

Tratamiento de datos: los espectros obtenidos en cada punto de la titulación fueron corregidos por el factor de dilución correspondiente y deconvolucionados por el método de mínimos cuadrados asumiendo una superposición lineal de las intensidades de fluorescencia del donante y del aceptor, para obtener las curvas de la figura 3.5 (capítulo 3). El método utiliza la relación

$$E_D \cdot C_D + E_A \cdot C_A$$

donde E_D es el espectro de emisión del donante en ausencia del aceptor (el punto inicial de la titulación) y E_A el espectro de emisión del aceptor en ausencia del donante, a la λ_{exc} del donante (490 nm) obtenido a partir de la solución control de aceptor. C_D y C_A son coeficientes arbitrarios que se obtienen del ajuste de mínimos cuadrados y que se utilizan para reconstruir las curvas del experimento para el donante y el aceptor.

3.4.2 Anisotropía de fluorescencia en el estado estacionario

Se determinó la anisotropía en soluciones 1 μM de F2FLAsH-P12-biotina y F4FLAsH-P12-biotina en buffer HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, 2-ME 1 mM, pH 7,4, a $\lambda_{\text{exc}} = 490$ y 520 nm, respectivamente. Los espectros de anisotropía fueron adquiridos con polarizadores de excitación y emisión en configuraciones vertical-vertical (VV) y vertical-horizontal (VH). El factor de corrección instrumental G se determinó a partir de la misma muestra con los polarizadores en configuración horizontal-vertical (HV) y horizontal-horizontal (HH). La anisotropía, r , está dada por la ecuación (3.6).

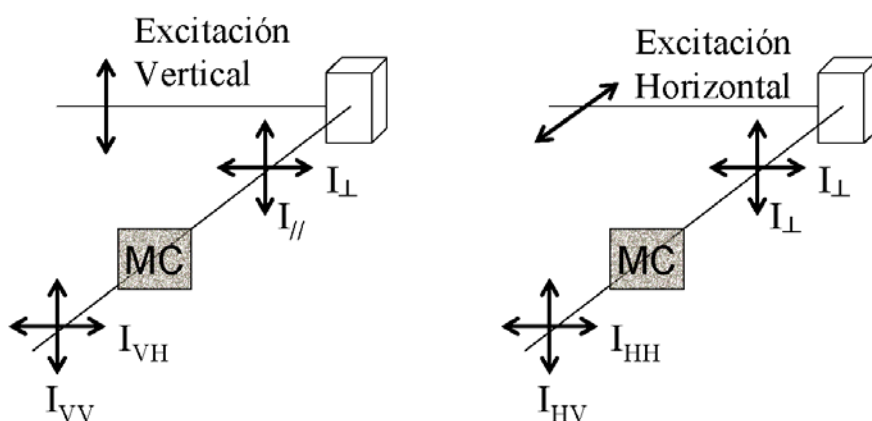


Figura 3.21. Diagrama esquemático para determinaciones de anisotropía de fluorescencia según el formato-L¹. MC, monocromador.

3.4.3 Experimento de FRET intermolecular entre FAsH y DAE

Formación del complejo FAsH-P6: una solución 50 μM de FAsH-EDT₂ en buffer TRIS pH 7,3: etanol (4:1) se tituló con alícuotas crecientes de P6 (CCPGCC) hasta intensidad de fluorescencia constante. λ_{exc} 508nm, λ_{em} 524 nm.

Titulación del complejo con DAE: la solución obtenida en el ítem anterior se tituló con alícuotas crecientes del diheteroarileno (DAE) aceptor de FRET en su forma cerrada. La solución del aceptor se preparó en una mezcla de buffer Tris pH 7,3; Etanol 4:6. Luego de cada agregado se sometió la solución a irradiaciones a 340 nm durante 120 segundos antes de medir el espectro de emisión a $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm.

Modulación de la fluorescencia del complejo FAsH-P6: fue llevada a cabo por fotoconversión del DAE fotocromico por sucesivos ciclos de irradiación UV (filtro de banda P10-340-F Corion) y Visible (filtro de corte 520 nm). La fuente de alta potencia utilizada fue un irradiador Lumatec Superlite SUV-DC-P, equipado con una lámpara de arco de Hg (200W DC Super Pressure Short Arc Mercury) y salida acoplada por fibra óptica. El irradiador cuenta con selector de tiempo de apertura del mismo y dos filtros de banda ancha que seleccionan entre el visible y el UV.

3.4.4 Determinaciones de FLIM en el microscopio

Células: se utilizaron células de la línea HeLa provistas por el grupo del Dr. Juan Llopis. Estas fueron transfectadas con la proteína fluorescente mCFP modificada con el motivo tetracisteína específico de FIAsh, CCPGCC.

Marcación de las células: se prepararon soluciones 5 μM de FIAsh-EDT₂ y F2FIAsh-EDT₂ y 1 μM de ReAsH en buffer HEPES 10 mM, pH 7,4. Las sondas se agregaron a las células junto con EDT 10 μM para minimizar su toxicidad y mantener el estado no fluorescente de las mismas hasta la formación del complejo con el motivo tetracisteína. En el microscopio, luego de la marcación, las células fueron lavadas con medio HBSS (Hanks) conteniendo glucosa y HEPES 10 mM a pH 7,4.

Microscopía: se utilizó un microscopio de fluorescencia invertida Olympus IX70 provisto de una lámpara de Xe como fuente de excitación. Esta luz de excitación pasa a través de un monocromador centrado en 430 nm y de un filtro de excitación pasabanda de 440 ± 20 nm. La emisión de fluorescencia se colecta a través de dos canales con filtros de 535 ± 26 nm y 480 ± 30 nm.

Para el experimento de FLIM se utilizó la siguiente configuración (LIFA Lambert Instruments): un LED de excitación centrado a 456 nm cuya luz pasa a través de un filtro de excitación PB 436 ± 20 nm, un dicroico 455 y un filtro emisor 480 ± 40 nm (Fig. 3.22)

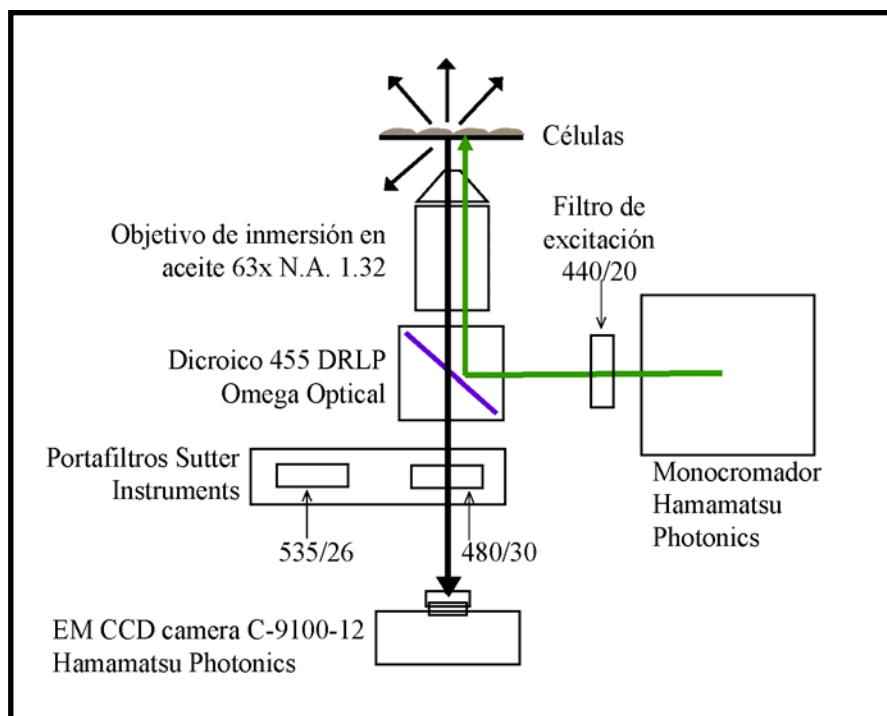


Figura 3.22. Esquema del arreglo para FLIM utilizado en el microscopio de fluorescencia

Se utilizó el método del dominio de las frecuencias. La fase y modulación se calcularon a partir de una serie de imágenes tomadas a 12 corrimientos de fase diferentes. Se usó una frecuencia de modulación de la excitación de 40 MHz. Se tomó un promedio de dos imágenes por fase.

Fundamentos del método²: la fuente de excitación no es pulsada sino que se trata de un láser continuo acoplado a un modulador optoacústico. La muestra es excitada por luz modulada sinusoidalmente a alta frecuencia (10-100 MHz). La emisión resultante está modulada a la misma frecuencia pero retardada en fase y parcialmente desmodulada respecto de la excitación. El corrimiento de fase, ϕ , y el radio de modulación, $M = m/m_0$ (Fig. 3.23) caracterizan la respuesta del sistema.

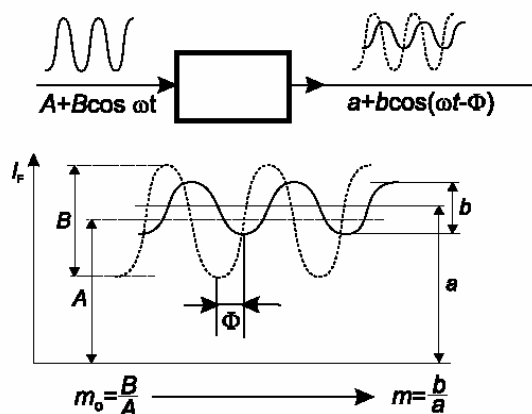


Figura 3.23. Método de modulación-fase.

Los parámetros ϕ y M se miden en función de la frecuencia de modulación. ϕ y M están relacionados con el tiempo de vida, τ , por las ecuaciones (3.10) y (3.11), respectivamente:

$$\tan \phi = \omega \tau \quad 3.10$$

$$M = \frac{1}{(1 + \omega^2 \tau^2)^{1/2}} \quad 3.11$$

Los valores determinados tanto por mediciones de fase como de modulación deben ser idénticos e independientes de la frecuencia de modulación utilizada, si el decaimiento es monoexponencial, de lo contrario se obtendrán valores distintos en situaciones donde el decaimiento es multiexponencial y $\tau_\phi < \tau_M$. En este caso, se toman una serie de imágenes a diferentes frecuencias.

3.5 REFERENCIAS

1. Lakowicz J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 1999, 2nd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
2. Valeur B. *Molecular fluorescence: Principles and applications*. 2002, Wiley-VCH. Weinheim.
3. Förster T. *Naturwissenschaften*. 1946, 6, 166.
4. Förster T. *Fluoreszenz organischer verbindungen*. 1951, Vandenhöck & Ruprecht, Eds., Göttingen.
5. Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1387-1395.
6. Adams S.R., Campbell R.E., Gross L.A., Martin B.R., Walkup G.K., Yao Y., Llopis J., Tsien R.Y. *J.Am.Chem.Soc.* 2002, 124, 6063-6076.
7. Freitag S., Le trong I., Klumb L., Stayton P.S., Stenkamp R.E. *Protein Sci.* 1997, 6, 1157-1166.
8. Robia S.L., Flohr N.C., Thomas D.D. *Biochemistry*. 2005, 44, 4302-4311.
9. Giordano L., Jovin T. M., Irie M., Jares-Erijman E. A. *J.Am.Chem.Soc.* 2002, 124, 7481-7490.
10. Jares-Erijman E.A., Giordano L., Spagnuolo C., Kawior J., Vermeij R.J., Jovin T.M. *Proc. SPIE*. 2004, 5323, 13-26.
11. Giordano L. *Síntesis de diheteroariltenos fotocromicos y su aplicación como aceptores en transferencia de energía*. Tesis Doctoral, 2006. FCEN, UBA
12. Binolfi A., Rasia R.M., Bertoncini C.W., Ceolin M., Zweckstetter M., Griesinger C., Jovin T.M., Fernandez C.O. *J.Am.Chem.Soc.* 2006, 128, 9893-9901.

13. Baeyens W.R.G, de Keukeleire D., Korkidis K. *Luminescence techniques in chemical and biochemical analysis*. 1991, Dekker. New York.
14. Eftink M.R. *Fluorescence quenching: Theory and application*. 1991, 53-126. Plenum Press. New York.
15. Lakowicz J.R., Szmecinski H. *Sens. Actuators B: Chem.* 1993, 11, 133-134.
16. Gerritsen H.C., Sanders R., Draaijer A., Levine Y.K. *J. Fluoresc.* 1997, 7, 11-16.
17. Van Zandvoort M.A.M.J., de Grauw C.J., Gerritsen H.C., Broers J.L.V., Egbrink M.G.A, Ramaekers F.C.S., Slaaf D.W. *Cytometry*. 2002, 47, 226-223.
18. Knemeyer J.P., Marmé N., Sauer M. *Anal.Chem.* 2000, 72, 3717-3724.

CAPÍTULO 4
Sondas derivadas de tioésteres

4.1 Introducción

La marcación específica mediada por sondas derivadas de tioésteres es una de las técnicas más novedosas dentro de los denominados “sistemas de expresión” para identificar proteínas específicas en células vivas. Está basada en la reacción de unión química nativa (*Native Chemical Ligation Reaction*, NCLR) introducida por Dawson y col.¹ Este proceso se utilizó inicialmente en la síntesis de péptidos por condensación de fragmentos no protegidos para lograr péptidos, polipéptidos y proteínas de mayor tamaño que los que se pueden obtener por los métodos tradicionales.

Se basa en la reacción entre un tioéster y una cisteína (Cys), reportada por primera vez por Wieland y col.² El primer paso de este proceso (Fig. 4.1) es la transtioesterificación quimioselectiva de un péptido con la función tioéster en el extremo C-terminal, con una cisteína presente en el extremo N-terminal del segundo péptido. El nuevo tioéster formado sufre espontáneamente una aciltransferencia S→N para formar un enlace peptídico. Este método se aplicó exitosamente en la síntesis de proteínas en fase sólida³ (SPCL, *Solid-phase chemical ligation*) y en reacciones en tándem donde se requieren varios pasos de unión⁴.

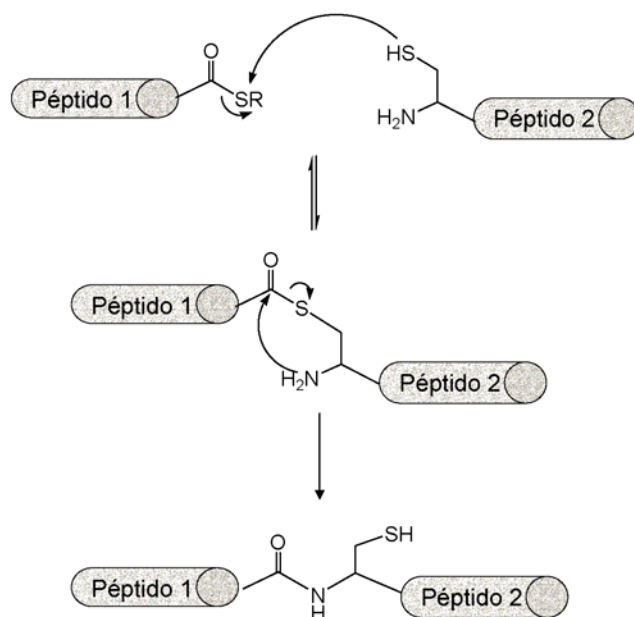


Figura 4.1. Reacción de unión química nativa (NCLR, Native Chemical Ligation Reaction)

En células vivas la expresión de una proteína de interés conteniendo una cisteína en el extremo N-terminal puede realizarse por dos caminos:

- 1) por fusión de la proteína de interés con inteínas
- 2) por proteólisis selectiva

Las inteínas son segmentos internos de las proteínas precursoras que catalizan el proceso intramolecular de autoensamblado (“splicing”) que culmina en la formación de una proteína en su estructura final, en forma análoga a la función de los intrones en el ARN.

El paso inicial del proceso de autensamblado (Fig. 4.2) es la transferencia de la unidad exteína N-terminal al grupo –OH o –SH de un residuo serina o cisteína

localizado en el extremo N-terminal de la inteína (transferencia $N \rightarrow S$). El paso siguiente es una nueva transferencia de la exteína N-terminal a la exteína C-terminal (transtioesterificación). En el paso final, un residuo Asp del extremo C de la inteína se cicla al mismo tiempo que se forma un enlace peptídico entre las dos exteínas a través de un desplazamiento $S \rightarrow N$.

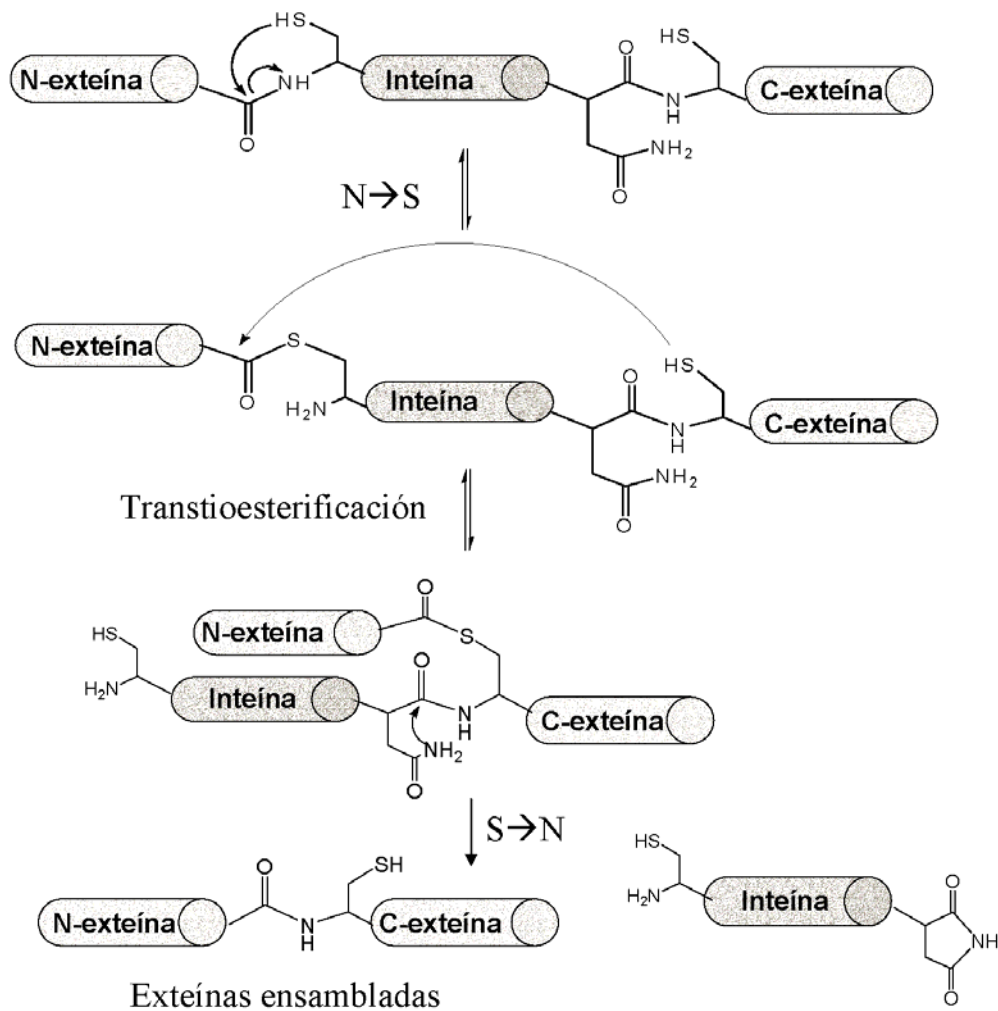


Figura 4.2. Mecanismo de autoensamblado de proteínas mediado por inteínas⁵

Al utilizar inteínas como proteínas de fusión de una proteína de interés en la que se quiere generar una función tioéster, se aprovecha la actividad catalítica de la inteína en el proceso de ruptura intramolecular (Fig.4.3).

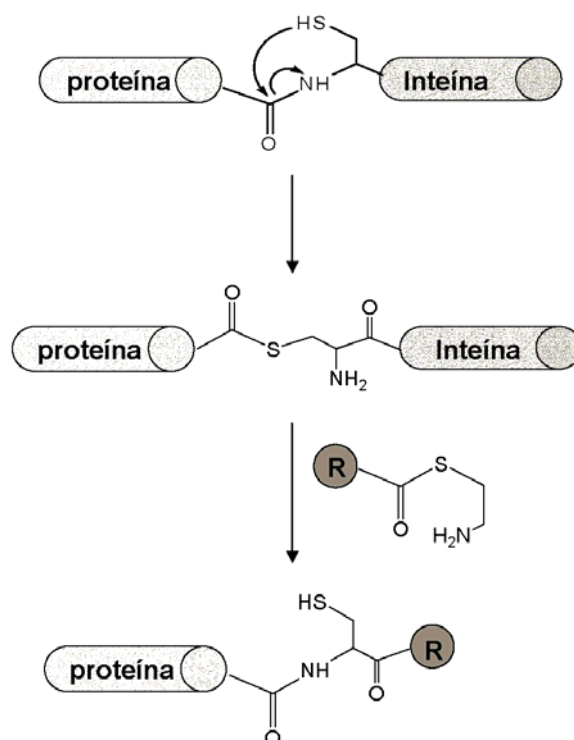


Figura 4.3. Estrategia de marcación específica sobre tioésteres mediada por inteínas fusionadas con la proteína de interés. R es la sonda de marcación

La dificultad del método reside en la posibilidad de que el proceso de ruptura *in vivo* pueda ser afectado por varios factores como las condiciones de expresión, la estructura de la proteína de interés y los aminoácidos que se encuentren alrededor del

sitio de fusión en el extremo Cys-N-terminal. Además, esta técnica tiene la desventaja de que las inteínas son fragmentos proteicos de tamaño considerable.

Dentro de la estrategia de proteólisis específica, ha sido exitoso el uso de la proteasa TEV (*tobacco etch virus*), altamente específica, para generar proteínas con extremos Cys-N-terminal⁶.

Este método fue probado *in vitro* sobre proteínas de fusión expresadas en *E. coli*, purificadas y sometidas a un tratamiento secuencial de clivaje y marcación con sondas derivadas de tioéster⁶ (Fig. 4.4).

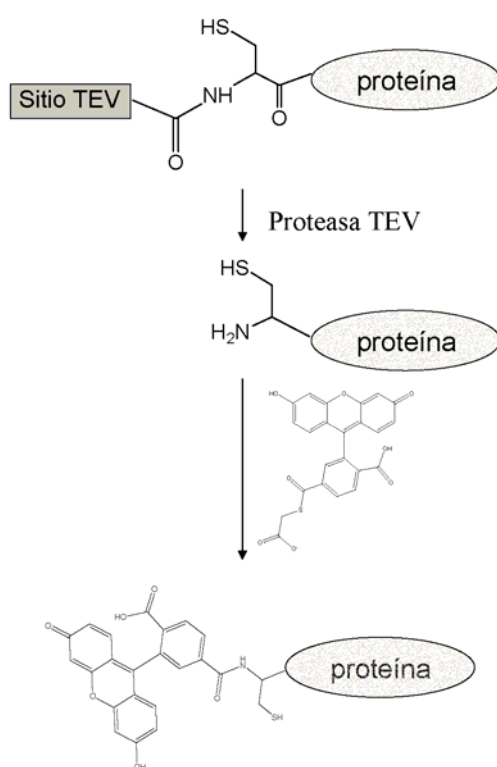


Figura 4.4. Marcación de una proteína de interés fusionada con un sitio de clivaje específico para la proteasa TEV y posterior marcación con sondas fluorescentes derivadas de tioésteres⁶

Las ventajas de este método incluyen la alta selectividad de la proteasa y la simplicidad con la que se pueden generar proteínas de fusión con el sitio de clivaje de TEV. En el marco de un proyecto en conjunto con el grupo de Gertrude Bunt (Instituto Max Planck de Medicina Experimental, Göttingen, Alemania) nos hemos interesado en la implementación de este método de marcación específica en células eucariotas en cultivo.

En este capítulo se detalla la síntesis de una serie de sondas fluorescentes derivadas de tioéster, el estudio de la marcación *in vitro* y por primera vez, la aplicación de las mismas en células vivas de mamíferos.

4.2 Sondas derivadas de bencilmercaptano

Se han preparado una serie de sondas derivadas de bencilmercaptano (Fig. 4.5) a fin de utilizarlas en los experimentos de marcación específica *in vivo*.

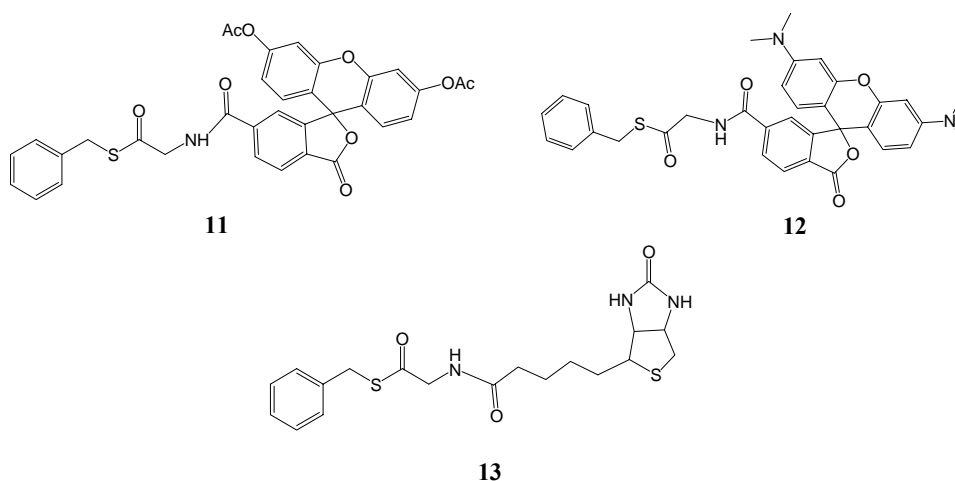


Figura 4.5. Estructuras de las sondas derivadas de bencilmercaptano y fluoresceína (11), rodamina (12) y biotina (13).

La síntesis se llevó a cabo en base a una secuencia previamente reportada⁷ con ligeras modificaciones. Las sondas de interés se obtuvieron mediante la conjugación de biotina, y los fluoróforos fluoresceína o rodamina con un precursor tioéster derivado de glicina y bencilmercaptano (Fig. 4.6).

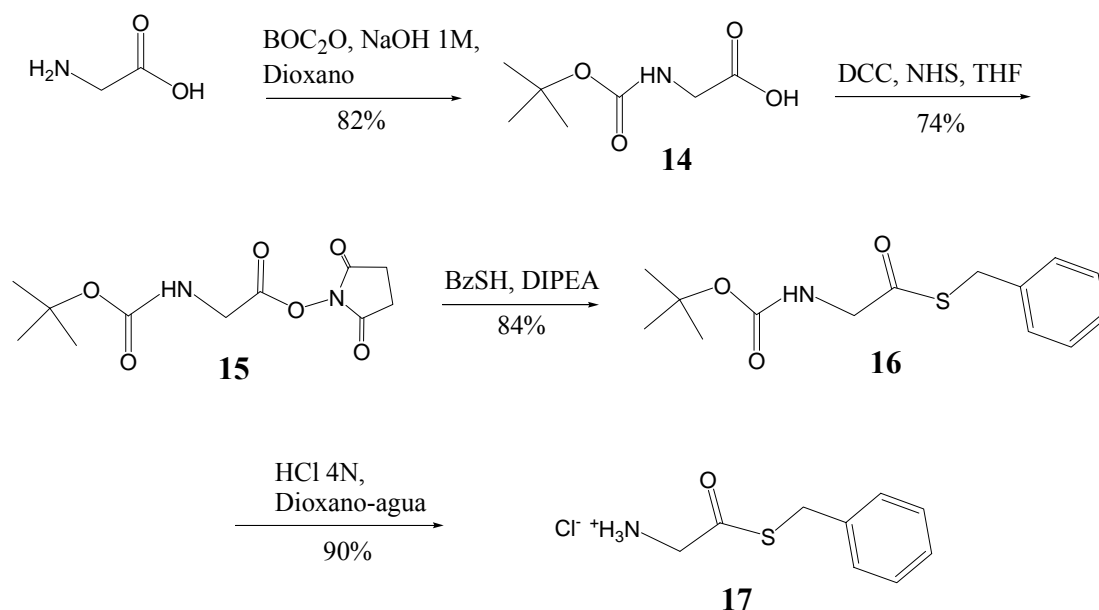


Figura 4.6. Síntesis del precursor tioéster derivado de glicina y bencilmercaptano⁷

Para el acoplamiento final entre el precursor de interés y el compuesto **17** se utilizó la metodología de activación del grupo $-\text{COOH}$ con dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) para generar el ester *N*-hidroxisuccinimido correspondiente, o con 1-etil-3,3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) en conjunto con 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), según conveniencia (Fig. 4.7).

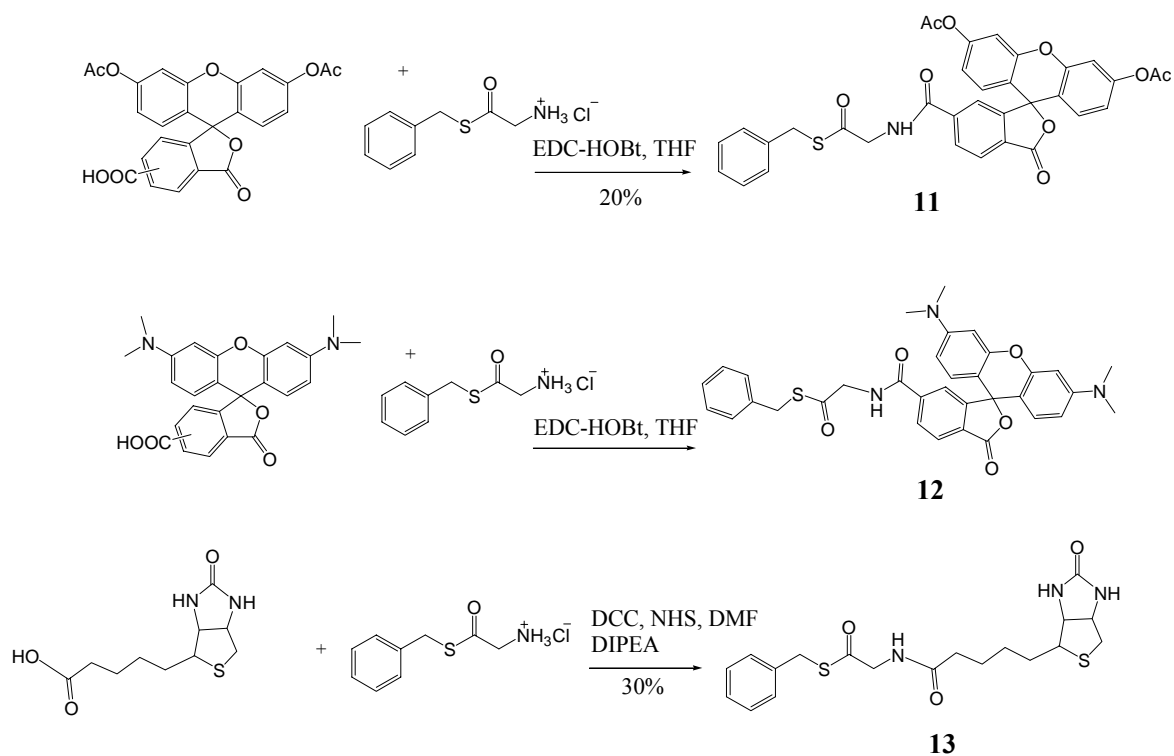


Figura 4.7. Acoplamiento entre distintos precursores y el derivado tioéster **17**

Es sabido que esta metodología, utilizada para la obtención de enlaces peptídicos, funciona muy bien en la síntesis de péptidos en fase sólida pero se encuentra gran variabilidad en los rendimientos cuando se la utiliza para acoplar moléculas en solución. En nuestro caso, los rendimientos de este acoplamiento fueron muy poco reproducibles, especialmente en el caso de los precursores fluorescentes, fluoresceína y rodamina. Hemos probado otros agentes activantes como diisopropilcarbodiimida (DIC), cloruro de oxalilo y oxiclورو de fósforo (POCl₃). En ningún caso se obtuvo una mejora en el rendimiento final. El paso de activación del grupo -COOH ocurre, para

todos los reactivos probados, en forma casi total, a juzgar por el análisis realizado en cromatografía en capa delgada. Suponemos que existe un alto grado de reversión de la activación durante el paso en el que se agrega el compuesto **17** que se quiere acoplar, ya que luego de la purificación cromatográfica se recuperan cantidades considerables, aunque variables, del material de partida. Otro detalle que hay que tener en cuenta es que se utilizó el clorhidrato del compuesto **17** para llevar a cabo el acoplamiento en lugar de la molécula con la función $-\text{NH}_2$ como tal. Para aumentar la reactividad de este grupo en la reacción de formación de la amida, se suele utilizar un exceso (2-5 eq) de una base tipo trietilamina (TEA) o diisopropiletilamina (DIPEA), en el paso de acoplamiento luego de la activación. Vimos que esto no es recomendable en presencia del tioéster ya que dá lugar a la hidrólisis del mismo u otras transtioesterificaciones no deseadas.

En el caso de la fluoresceína fue necesario acetilar los grupos $-\text{OH}$ fenólicos para trabajar con la molécula en su forma neutra y evitar posibles reacciones entre este grupo y el derivado tioéster. A pesar de esto hemos notado una alta labilidad de estos grupos acetato en el medio de reacción lo que influye en el rendimiento final. Otra posibilidad sería proteger estos $-\text{OH}$ con grupos pivalato ($-\text{COC}(\text{CH}_3)_3$) mas estables, pero en este caso la desprotección se lleva a cabo en un medio básico relativamente fuerte como es NaOH 1 M, en el cual estaría mas favorecida la hidrólisis del tioéster, mientras que los grupos acetatos pueden ser desprotegidos en un medio mas moderado como es K_2CO_3 , en el cual la función tioéster es mas resistente.

Otra sonda de interés es el compuesto **18**, el cual es un derivado de tiofenol (Fig. 4.8).

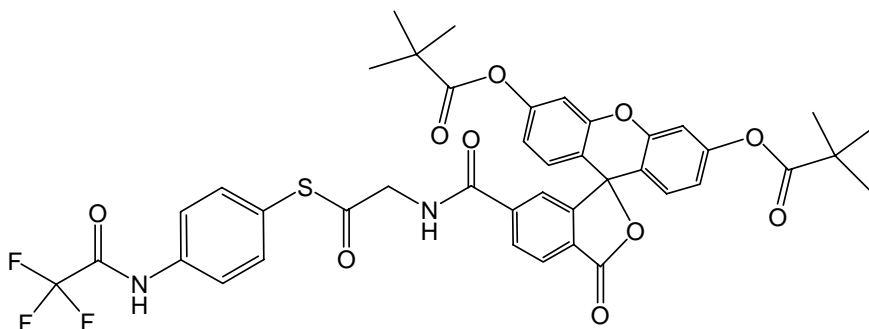


Figura 4.8. Compuesto **18** derivado de tiofenol

Para sintetizar este compuesto, se comenzó trabajando con *p*-aminotiofenol como compuesto de partida. La idea era proteger los grupos -SH y -NH₂ en un solo paso con BOC₂O para luego desproteger selectivamente el BOC sobre el -SH con medio básico⁸ y continuar la secuencia con el acoplamiento del fluoróforo (Fig. 4.9). Si bien el compuesto diprotegido se obtuvo con buenos rendimientos (70%), el paso de desprotección resultó muy ineficiente debido a la poca solubilidad del compuesto **19** en medio acuoso.

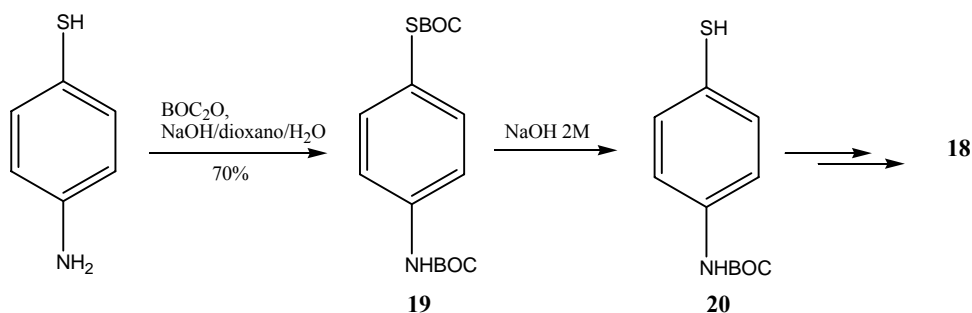


Figura 4.9. Obtención de **18** a partir de *p*-aminotiofenol

Otra posibilidad era proteger el grupo –SH con cloruro de tritilo⁹ pero también se obtuvieron bajos rendimientos y un poco del producto tritilado sobre el grupo –NH₂. Finalmente decidimos trabajar con el compuesto disulfurado **21** como estrategia de protección del grupo –SH pero obteniéndolo a partir de *p*-cloroanilina y no de *p*-aminotiofenol ya que este último es mas difícil de manipular y es mas costoso (ver Parte Experimental). Por lo tanto, el compuesto **18** fue preparado según la ruta sintética de la figura 4.10.

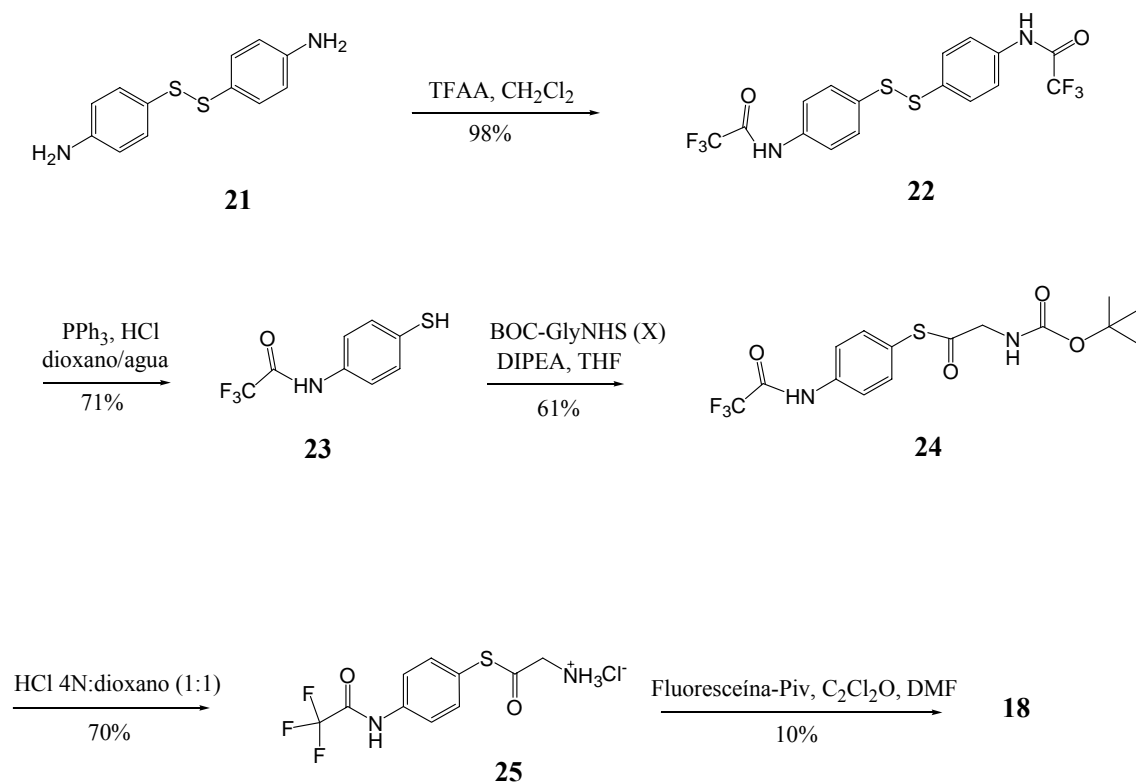


Figura 4.10. Ruta sintética del compuesto **18**

A partir del compuesto **21** se procedió a la protección de los grupos amino con anhídrido trifluoroacético (TFAA)⁹. Esta reacción ocurre casi instantáneamente y de forma casi cuantitativa. El producto **22** precipita en el medio de reacción y se utiliza sin purificación posterior. Luego se realizó la reducción de la función disulfuro con trifenilfosfina (PPh₃) en medio levemente ácido¹⁰. El producto **23** se purificó por cromatografía flash en sílica. A continuación se procedió al acoplamiento de este compuesto con BOC-Gly-NHS (**15**) para obtener la función tioéster. Luego de la purificación se desprotegió el grupo amino de la glicina en medio ácido⁹ y se realizó el acoplamiento con carboxifluoresceína, cuyos grupos –OH fenólicos fueron previamente protegidos como pivalatos. Este acoplamiento se realizó con cloruro de oxalilo como activante del grupo –COOH de la carboxifluoresceína en base a resultados previos en el uso de este reactivo con esta molécula¹¹ aunque en nuestro caso obtuvimos rendimientos bajos y muy variables.

La presencia del grupo –NH₂ protegido como trifluoroacetato en el compuesto **18** provee un sitio de conjugación adicional para otras moléculas como podría ser, por ejemplo, un colorante que funcione como aceptor de FRET de la fluoresceína. Con un sistema como este, se podría obtener una sonda fluorogénica, ya que la señal de fluorescencia se observaría luego de la marcación y por pérdida del fragmento que contiene al aceptor.

4.3 Estudios de marcación específica *in vitro*

La metodología se testeó *in vitro* con un péptido modelo de secuencia CGRGDSP conteniendo una cisteína en el extremo N-terminal. Se utilizaron distintos aditivos como agentes reductores y el análisis de la distribución de productos de reacción se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las fracciones de interés se analizaron mediante espectrometría de masa (ESI).

Para estos ensayos se utilizaron los compuestos **13** y **11** y el compuesto **16** (BOC-Gly-SBz) como comparación. Se trabajó con soluciones preparadas en buffer Rab de pH 7,6, ya que a este pH se favorece la formación del producto acilado en posición α N por sobre el producto acilado en α S y el producto α SSR, y se minimiza la hidrólisis del tioéster¹² (Fig. 4.11).

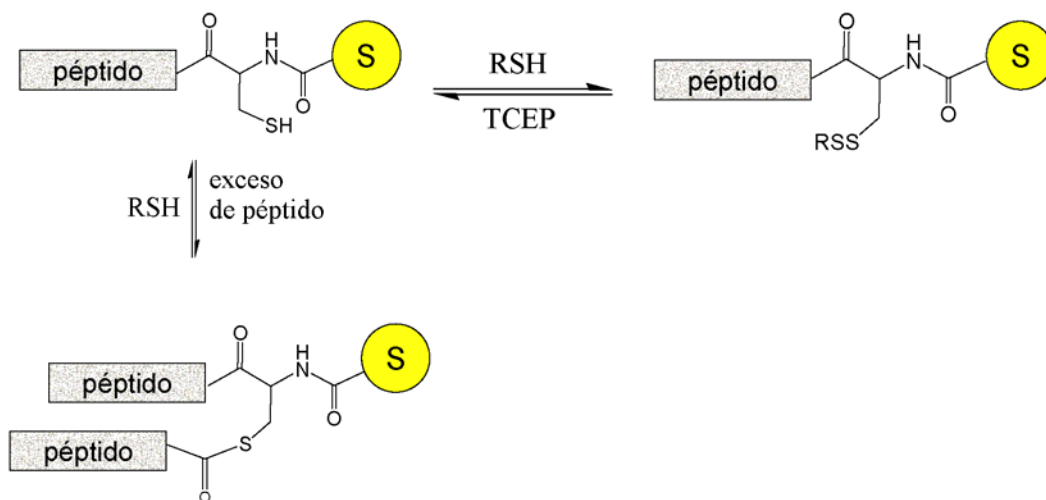


Figura 4.11. Productos mayoritarios y su interconversión en el sistema modelo utilizado.

Se probaron distintos agentes reductores como TCEP, MESNA (2-mercaptoetansulfonato de sodio) y DMPS (Ácido 2,3-dimercapto-1-propansulfónico) (Figura 4.12).

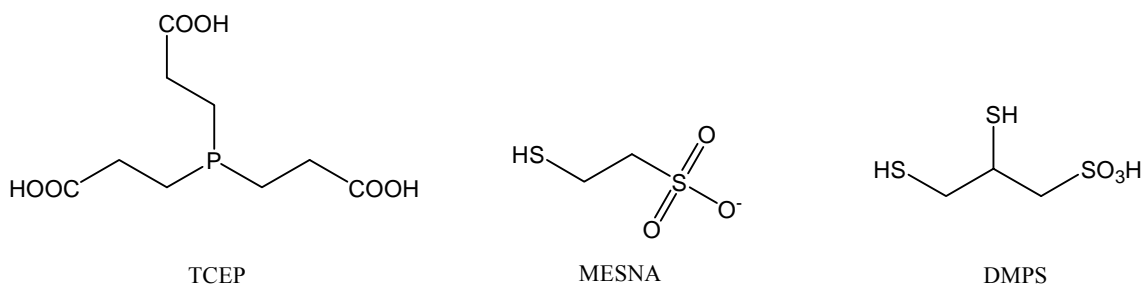


Figura 4.12. Agentes reductores utilizados

Los aditivos TCEP y MESNA se utilizaron en conjunto en relación 2: 10 (TCEP: MESNA) ya que es sabido que en esta proporción la fosfina favorece la reducción de disulfuros mientras que un exceso del alquiltiol reconvierte los productos α , S-diacilados¹² (Fig. 4.11). No se observaron diferencias sustanciales en cuanto a la eficacia de cada uno de ellos.

En todos los casos, se preincubó el péptido modelo en concentración 1,45 mM con el agente reductor en relación 1:1,5 por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron alícuotas de los distintos compuestos disueltos en metanol y en una relación final 1: 1,5 (péptido: sonda). Se incubó por 4 horas y se cortaron las reacciones con el agregado de cisteína en exceso. Las reacciones se analizaron por HPLC, con una columna de fase reversa RP-18 a escala analítica, utilizando como sistema de elución un gradiente lineal de H₂O 0,1% TFA – MeCN 0,1% TFA (Fig. 4.13). Se detectó a 220,

260 y 488 nm. Las fracciones de interés se evaluaron por espectrometría de masa (ver Parte Experimental).

En estas condiciones de pH 7,6, temperatura ambiente y agente reductor en exceso respecto del péptido (1,5 eq) notamos una marcación prácticamente cuantitativa del péptido en 4 horas. En cada producto se comprobó la marcación con una sola molécula de la sonda. En los cromatogramas analizados se pudo observar la desaparición de la señal del péptido (tiempo de retención: 8 minutos) y la aparición de una señal intensa a los 23 minutos correspondiente al bencilmercaptano liberado durante la reacción de marcación.

En resumen, la reacción de estas sondas derivadas de tioéster con el residuo cisteína N-terminal del péptido modelo dió lugar a la formación del bioconjugado esperado. El protocolo presentado puede ser aplicado a un amplio rango de péptidos, polipéptidos y proteínas, incluso aquellos que contengan varios grupos sulfhidrido o amino en su estructura.

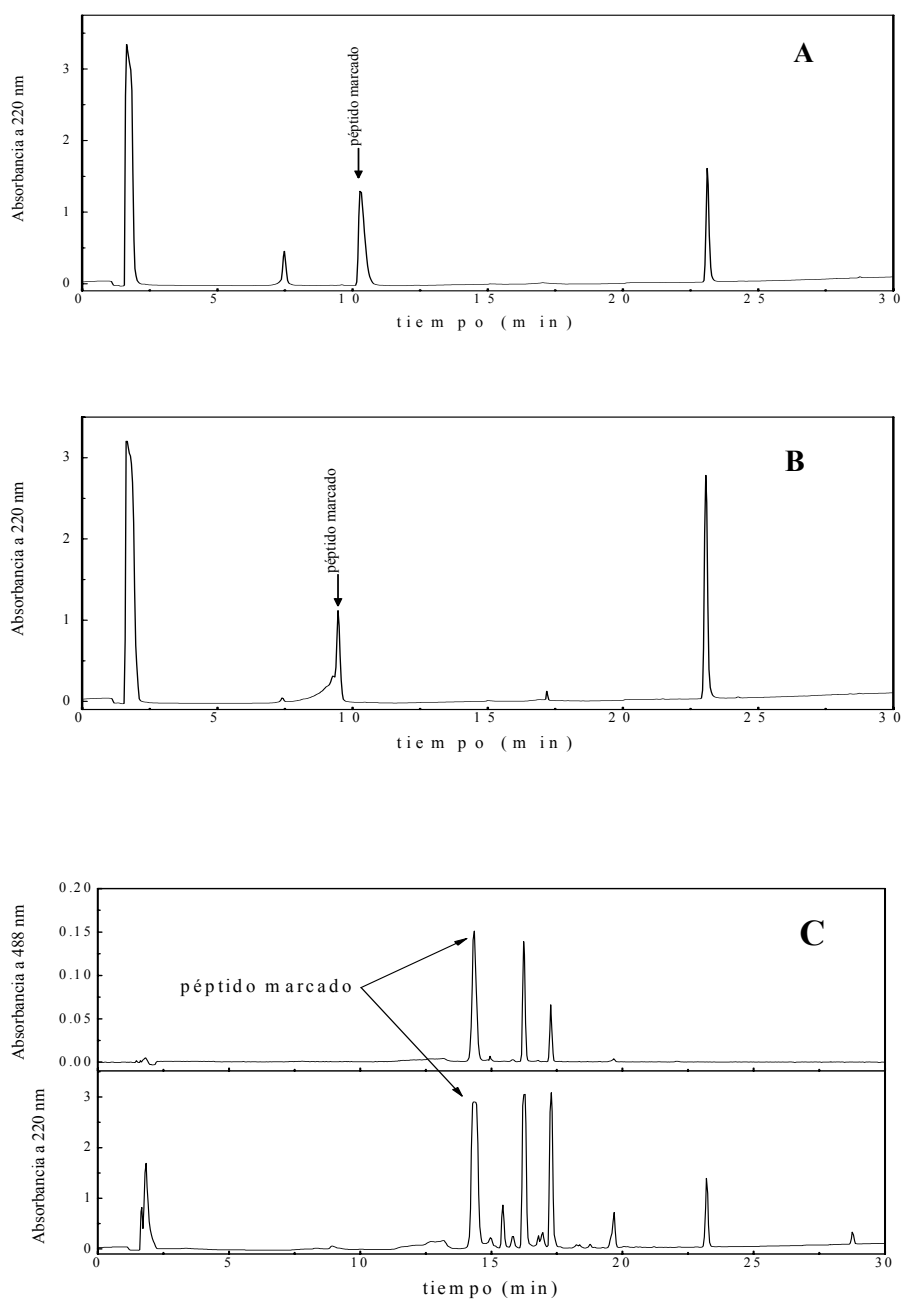


Figura 4.13. Cromatogramas de los conjugados de BOC-Gly (A), Biotina (B) y Fluoresceína (C) con el péptido Cys-N-terminal. Los picos señalados corresponden a los productos analizados por ESI-MS

4.4 Estudios de marcación específica *in vivo*

Para llevar a cabo la optimización de esta metodología de marcación en células de mamíferos de la línea HeLa se construyó una proteína de fusión que combina una GFP (*green fluorescent protein*) y un sitio específico de reconocimiento para la proteasa del virus TEV en el extremo N-terminal. Esta tecnología fue llevada a cabo en el laboratorio de la Dra. Bunt. Esta proteína fue co-expresada con la proteasa en las células. La modificación genética incluye la introducción de un residuo de cisteína en la posición adyacente al sitio de reconocimiento de la proteasa, la que al clivar la proteína deja a la cisteína como amoniácido N-terminal. La cisteína N-terminal que se obtiene puede reaccionar quimioselectivamente con las sondas derivadas de tioéster. Asimismo, los constructos incluyeron un sitio HA que es reconocido por anticuerpos específicos (Fig. 4.14) y pueden ser detectados utilizando los anticuerpos marcados con sondas fluorescentes.

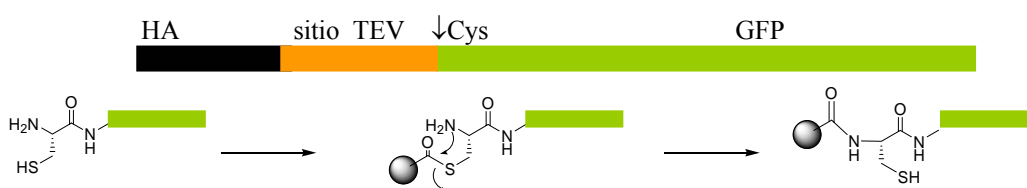


Figura 4.14. Esquema de la proteína de fusión expresada en células HeLa para marcación específica con derivados de tioéster.

El clivaje de la proteína de fusión en el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV co-expresada se verificó por experimentos de transferencia de energía (FRET) entre la

proteína fluorescente GFP y un anticuerpo específico para HA marcado con el fluoróforo Cy3. En la figura 4.15 se observan las imágenes correspondientes.

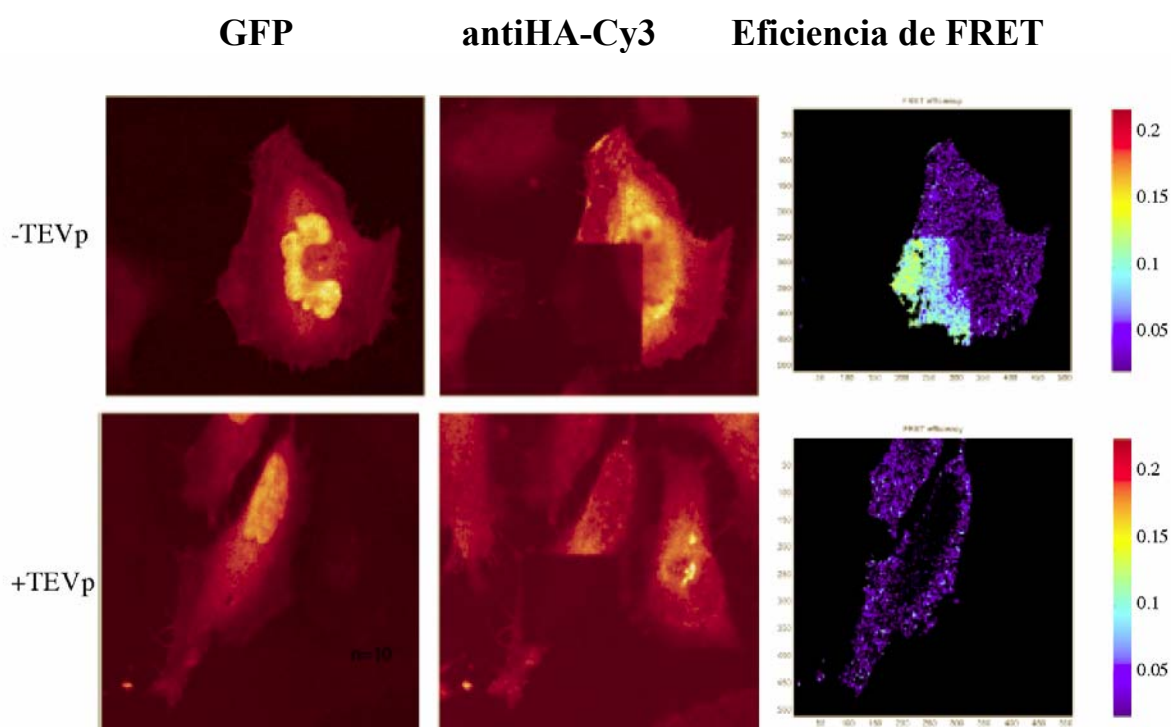


Figura 4.15. Evidencia del clivaje de la proteasa en el sitio TEV de la proteína de fusión HA-TEV-GFP. *Panel superior:* detección en el canal de GFP (izquierda), en el canal de Cy3 (medio) se observa la región de interés donde se ha eliminado el aceptor y la eficiencia de FRET en ausencia de la proteasa (derecha). *Panel inferior:* ídem en presencia de la proteasa.

Los valores de eficiencia están dados con la escala de colores indicada a la derecha. Se computó una eficiencia de ~5-10% para la transferencia de energía entre GFP y Cy3 (región de color celeste en el panel superior derecho) en las células en las

que no se co-expresó la proteasa específica, lo que indica que no hubo clivaje. En las células con la proteasa el valor de eficiencia es prácticamente nulo, lo que se atribuye al clivaje esperado, con pérdida del fragmento HA sobre el que se realiza la inmunomarcación con Cy3.

Las células transfectadas con la proteína de fusión HA-TEV-GFP fueron tratadas *in vivo* con la sonda derivada de rodamina **12** y la sonda derivada de biotina **13**. Esta última fue visualizada a través de la conjugación con avidina marcada con el fluoróforo Cy3 y se utilizó en concentraciones entre 5-25 μM , con idénticos resultados. La expresión de la proteasa se detectó a través de la marcación de la misma con un anticuerpo específico marcado con el fluoróforo Cy5. Se observó que la marca se localizó en el núcleo solo en las células transfectadas. El panel superior de la figura 4.16 representa la situación de control en ausencia de la proteasa. En la imagen de la izquierda superior e inferior se ve la señal de la GFP localizada principalmente en el núcleo de las células transfectadas mientras que en la imagen del medio del panel superior se vé que no hay señal de Cy3 en los núcleos indicando la ausencia de marcación al no estar expuesta la cisteína N-terminal de la GFP. En el panel inferior, se muestran células transfectadas en las que se co-expresó la proteasa, como se evidencia en la imagen de la derecha, con la señal de Cy5. En la imagen del medio del panel inferior vemos la emisión del Cy3 evidenciando la marcación específica de la GFP con la sonda biotinilada. Como se puede ver en las imágenes, algunas células no transfectadas (aquellas “invisibles” en el canal de GFP) muestran cierta marcación con avidina-Cy3, aunque esta señal de fondo no está localizada en el núcleo. En el panel

superior del medio la intensidad de luz fue aumentada en 50 veces con respecto a lo observado en el panel izquierdo y los paneles inferiores.

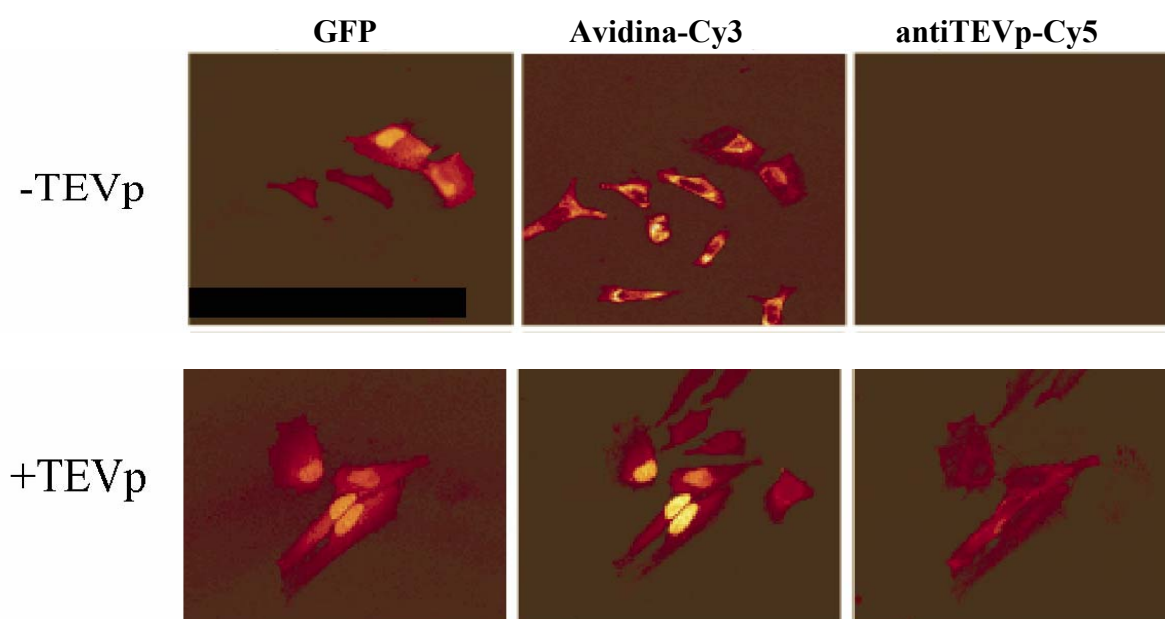


Figura 4.16. Marcación específica de la proteína de fusión HA-TEV-GFP con la sonda biotinilada **13** en concentración 5 μ M. *Panel superior:* detección en el canal de GFP (izquierda), en el canal de Cy3 (medio) y en el canal de Cy5 (derecha), de células en las que no se co-expresó la proteasa TEV (TEVp). *Panel inferior:* ídem en presencia de la proteasa.

Es interesante notar que se observó una leve señal de fluorescencia en las células transfectadas con la proteína de fusión pero en las que no se co-expresó la proteasa. Lo que puede estar ocurriendo es que las células mismas estén clivando el sitio de la proteasa TEV en la proteína de fusión exponiendo la cisteína N-terminal a la sonda.

En base a estudios de FRET por fotoblanqueo del aceptor en las células marcadas con la sonda derivada de rodamina **12** en concentración 2 μM , se determinaron altas eficiencias de FRET (Fig. 4.17) entre este fluoróforo y la GFP, lo que indica una marcación covalente directa entre ambos y en gran proximidad espacial. En este experimento también se detectó marcación en el núcleo en las células transfectadas que no co-expresaron la proteasa (panel superior y central de la figura 4.17).

También se observó que existe una dependencia del grado de marcación con la concentración de la sonda, como se vé en las imágenes del panel inferior de la figura 4.17, que corresponde a células tratadas con el compuesto **12** en concentración 1 μM .

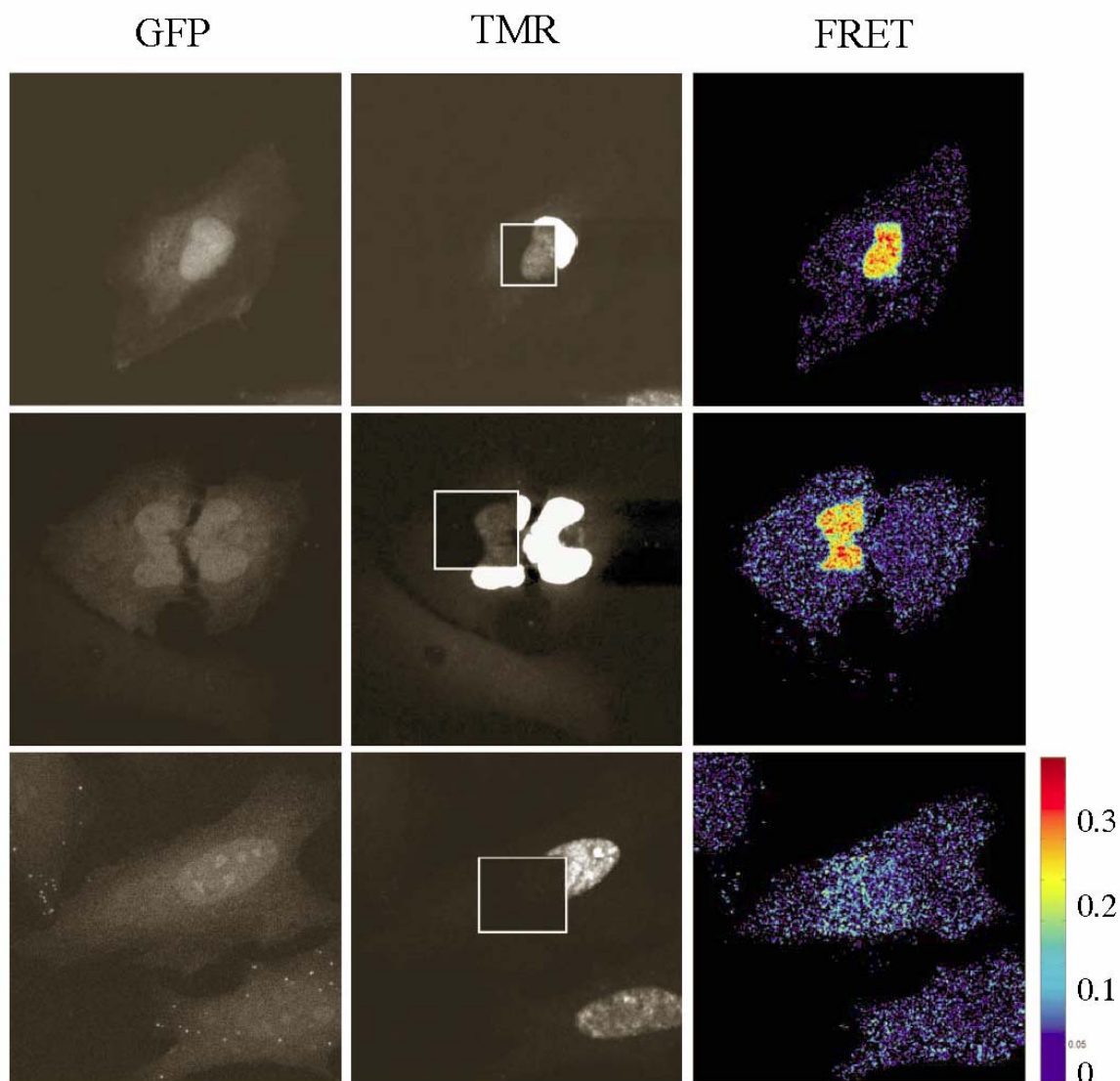


Figura 4.17. Marcación específica de la proteína de fusión HA-TEV-GFP con la sonda derivada de rodamina **12**. *Panel superior:* detección en el canal de GFP (izquierda), en el canal de Cy3 (medio) y eficiencia de FRET (derecha), de células en las que se co-expresó la proteasa TEV (TEVp) y se marcó con **12** 2 μ M. *Panel central:* ídem pero en células en las que no se co-expresó la proteasa. *Panel inferior:* células con la proteasa pero marcadas con **12** 1 μ M.

Estos resultados indican que: (i) el microentrono nuclear favorece la marcación con derivados de tioéster y (ii) es posible la existencia de una proteasa endógena con actividad para clivar el sitio TEV. Si bien esto no estaba pensado, el hecho resulta ser una ventaja ya que evitaría la necesidad de co-expresar la proteasa de TEV y simplificaría el método de marcación.

4.5 CONCLUSIONES

La introducción de un sitio de clivaje específico de la proteasa TEV en una proteína de interés, provee un camino directo en la producción de sitios cisteína N-terminal, en células eucariotas, generando un sitio de marcación específica para sondas derivadas de tioéster. La aplicación de esta estrategia por primera vez en células de mamíferos permite el uso de estas sondas permeables a la membrana para el estudio del comportamiento celular.

4.6 PARTE EXPERIMENTAL

4.6.1 Síntesis de sondas derivadas de tioésteres

Los solventes utilizados fueron de calidad “para análisis” o superior, y se purificaron según métodos descritos en bibliografía¹³.

Los reactivos fueron provistos por Sigma-Aldrich Co.

Cromatografía en placa delgada: se utilizaron cromatofolios de sílica gel F₂₅₄ de 0,20 mm de espesor, sobre soporte de aluminio y cromatofolios de sílica RPC18 F_{254S} sobre soporte de aluminio (Merck). Los sistemas de solventes empleados (técnica ascendente) se indican en cada caso. El revelado se realizó con luz UV (254 o 366 nm), con ninhidrina y con un revelador específico para biotina que consiste en una solución de cinamaldehído 2% en ácido sulfúrico concentrado diluída en etanol.

Cromatografía en columna: se utilizó sílica gel 60 de malla 230-400 llamada “flash” (Merck). Los solventes de elución se indican en cada caso.

Resonancia magnética nuclear: los espectros de RMN se adquirieron con espectrómetros Bruker AC-200 (Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA, a 200 MHz para ¹H y 50 MHz para ¹³C) y Bruker AM-500 (LANAIS RMN-500, CONICET, a 500 MHz para ¹H, 125 MHz para ¹³C). Se utilizaron solventes deuterados que se indican en cada caso. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón (ppm) respecto de la señal de tetrametilsilano (TMS) o el solvente deuterado. Los patrones de acoplamiento se consideraron de primer orden, y las constantes se expresaron en Hz. Las señales se describen como *s* (singulete), *d* (doblete), *t* (triplete), *q* (cuarteto), *dd* (doble doblete), *sa* (singulete ancho) y *m* (multiplete).

La asignación de los espectros de RMN se realizó mediante comparación con datos publicados y de compuestos estructuralmente relacionados.

Espectrometría de masa: los espectros de masa de alta y baja resolución fueron determinados en un APEX IV 7 Tesla-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR)- Mass spectrometer (Bruker) o un TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupole-Instrument (Finnigan) con Electrospray-Ionisation (Universidad de Göttingen, Alemania).

A continuación se describe la síntesis del precursor tioéster derivado de bencilmercaptano y glicina según la figura 4.5 y de las sondas de las figuras 4.6.

Ácido *t*-Butoxicarbonilaminoacético (14, BocGly)¹⁴

A una solución de glicina (5g, 0,066 moles) en 250 ml de una mezcla de dioxano-agua-NaOH 1M (2:1:5) enfriada en baño de hielo, se agregó (BOC)₂O (16g, 0,073 moles). Se agitó por 1 h a 0°C y luego a t.a. por 12 horas. Se ajustó el pH a 5 con ácido cítrico y se extrajo con AcOEt (2 x 100 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro. Luego de evaporar el solvente en vacío se obtuvieron 10,24 g de un residuo aceitoso amarillento. Rend. 82%. RMN-¹H (200 MHz, MeOD): 3,75 (s, 2H), 1,44 (s, 9H).

Ácido *t*-Butoxicarbonilaminoacético 2,5-dioxo-pirrolidin-1-yl ester (15, BocGlyNHS)

BocGly (2 g, 0,01 mol) se disolvió en 50 ml THF anhidro a t.a. bajo atmósfera de argón. Se agregaron DCC (2,27 g, 0,011 moles) y NHS (1,26 g, 0,011 moles). Luego de 1 h de reacción se filtró la dicitclohexilurea y se concentró la solución en vacío. El residuo se recristalizó de isopropanol obteniéndose 2,12 g de un sólido blanco. Rend.

74%. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 7,2 (broad, 1H), 4,28 (d, J = 5,22 Hz, 2H), 2,84 (s, 4H), 1,46 (s, 9H). EMAR(ESI): (M+Na)⁺ 295,0900 calc. C₁₁H₁₆N₂O₆ 272,1008.

Ácido *t*-Butoxicarbonilaminotioacético S-bencil ester (16, BocGlySBz):

15 (2 g, 7 mmol) se disolvió en 50 ml de THF anhidro. Se agregaron DIPEA (2,44 ml, 14 mmol) y bencil mercaptano (1,64 ml, 14 mmol). La reacción se agitó durante toda la noche a t.a. Se evaporó a sequedad y se redisolvió en AcOEt. Luego se lavó con HCl 1N, NaHCO₃ sol. sat., agua, NaCl sol.sat. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente. El residuo se recristalizó con DCM/Ciclohexano. Se obtuvieron 1,73 g de un sólido blanco. Rend. 84%. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) 7,29-7,26 (m, 5H), 4,14 (s, 2H), 4,06 (d, J = 5,61 Hz, 2H), 1,45 (s, 9H). EMAR (ESI): (M+Na)⁺ 304,0977 calc. C₁₄H₁₉NO₃S 281,1085.

Clorhidrato de bencilsulfanilcarbonilmetilamonio (17, GlySBz):

16 (1,73 g, 5,8 mmol) se disolvió en HCl 4 N (10 ml) y dioxano (10 ml), y se agitó por 4 hs. La solución se concentró en vacío y el residuo se trató con éter etílico para precipitar el producto como un sólido blanco que se filtró. Rend. 75%. RMN-¹H (200 MHz, DMSO-d₆) 7,29 (sa, 5H), 4,07 (s, 2H), 3,83 (d, J = 6,12 Hz, 2H). EMAR(ESI): (M-Cl)⁺ 182,0634. calc. C₉H₁₂ClNOS 217,0328.

[5-(2-Oxo-hexahidro-tieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-tioacetico S-bencil ester (13):

Se disolvió la biotina (0,1 g, 0,41 mmol) en 20 ml de DMF caliente (50-60°C). Luego se dejó llegar a t.a. y se agregaron DCC (101,5 mg, 0,049 mmol) y NHS (60 mg, 0,049 mmol). Esta solución se dejó reaccionar toda la noche. Se filtró el precipitado y se redujo el volumen. Luego se adicionó el compuesto **17** disuelto en la mínima cantidad de DMF. Luego de 6 hs de reacción se eliminó el DMF y se redisolvió en AcOEt. Se lavó con HCl 1N, agua y NaCl sol.sat. El residuo se purificó por HPLC con una columna de fase reversa RP18, 25 x 2 cm con un gradiente lineal de MeCN: H₂O (1: 1) a MeCN. El producto se obtuvo como un sólido blanco. Rend. 30%. RMN-¹H (500 MHz, MeOD/CDCl₃) 7,29 (sa, 5H), 4,44 (dd, 1H, J = 5,5; 1,5Hz), 4,30 (dd, J = 7,5; 4,5 Hz, 1H), 4,09 (s, 2H), 4,08 (d, 2H, J = 2,5 Hz), 2,86 (dd, 1H, J = 13; 4 Hz), 2,68 (d, 2H, J = 12,5 Hz), 2,25(t, 2H, J = 7,5 Hz), 1,750-1,38 (m, 6H). EMAR(ESI): (M+H)⁺ 408,14101 calc. C₁₉H₂₅N₃O₃S₂ 407,13373.

Ácido 4-(3,6-diacetoxi-3H-xanten-9-yl)-isofталico (26)

5-carboxifluoresceína (1 g, 2,6 mmol) obtenida según el procedimiento descrito en el capítulo 1 se hizo reaccionar con anhídrido acético (4 eq) y piridina (1 eq) a 80°C por 15 min. Una vez enfriada a t.a. se purificó por cromatografía flash (ciclohexano: AcOEt:HAcO) obteniéndose un sólido beige al evaporar el solvente de la fracción de interés. Rend. 50%. RMN-1H (200 MHz, CDCl₃/MeOD): 8,64 (s, 1H), 8,42 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,38 (d, J = 7,8, 1H), 7,21 (s, 2H), 6,89 – 6,94 (m, 4H), 2,29 (s, 6H).

Ácido N-Bencilsulfanilcarbonilmetil-6-(3,6-dihidroxi-3H-xanthen-9-yl)-isoftalamico (11):

A una solución de **26** (0,096 g, 0,21 mmol) en THF anhidro se agregó EDC (0,040 g, 0,21 mmol) y HOBt (0,032 g, 0,21 mmol). La solución se agitó por 30 min. en baño de hielo seguido por la adición de **17** (0,057 g, 0,26 mmol) disuelto en la mínima cantidad de DMF. Se agitó por 6 hs a t.a. luego de lo cual se evaporó el solvente. El residuo se redisolvió en AcOEt y se lavó con HCl 1N, agua y NaCl sol.sat. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y fue concentrada en vacío luego de la filtración. El residuo se purificó por cromatografía en columna (silica gel, ciclohexano/AcOEt) para obtener **11** (0,0258 g, 20%). RMN-¹H (200 MHz, MeOD) 8,51 (s, 1H), 8,24 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,30-7,21 (m, 6H), 7,15-7,10 (m, 2H), 6,89-6,81 (m, 4H), 4,33 (sa, 2H), 4.15 (s, 2H), 2.3 (s, 6H). EMAR (ESI): (M+Na)⁺: 646,1147calc. C₃₄H₂₅NO₉S 623,1250.

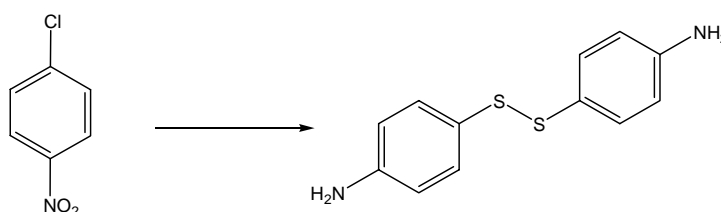
Amino tioacetico S-bencil ester de 5(6)-carboxi-tetrametilrodamina (12):

A una solución de 5(6)-tetrametilrodamina (0,056 g, 0,116 mmol) en THF anhidro se agregó EDC (0,024 g, 0,116 mmol) y HOBt (0,012 g, 0,116mmol). La solución se agitó por 30 minutos en baño de hielo, seguido de la adición de **17** (0,028 g, 0,116 mmol) disuelto en la mínima cantidad de DMF. La solución se agitó 6 hs a t.a. Se removió el solvente en vacío y el residuo se redisolvió en AcOEt y se lavó con HCl 1N, agua y NaCl sol.sat. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y concentrada en vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (RP18, MeOH:H₂O:HAcO, 8:2:0,1%). Las fracciones de interés se juntaron y se repurificó por CCD preparativa

(RP18, MeOH:H₂O:HAcO, 8:2:0,1%). Se obtuvieron 2 mg del producto deseado, el cual se caracterizó por EM (ESI): (M+H)⁺: 594,3. calc. C₃₄H₃₁N₃O₅S 593,6.

A continuación se describe la síntesis del compuesto **18** siguiendo el esquema de la figura 4.10.

***p*-aminofenildisulfuro (21)¹⁵**



Se adicionaron *p*-cloronitrobenzono (5 g, 0,032 mol) con sulfuro de sodio nonahidratado (11 g, 0,085 mol) y agua (53 ml) en un balón y se agitaron calentando lentamente hasta llegar a reflujo, el cual se mantuvo por 20 hs. Luego se enfrió a 15°C y se filtró el material insoluble. A continuación se redujo el volumen al 60% por destilación y se agregó H₂O₂ 30% lentamente manteniendo la temperatura en 70°C. Una vez enfriada la reacción, el producto precipitó, se filtró y se recrystalizó de etanol. Se obtuvieron 2,18 g de un sólido amarillo. Rend. 55%. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): 7,18 (d, 4H, J = 8 Hz), 6,58 (d, 4H, J = 8 Hz). RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): 147,3; 133,3; 124,6; 114,9. EMAR(ESI): (M+H)⁺ 249,0514 calc. C₁₂H₁₂N₂S₂ 248,04419.

2,2,2-Trifluoro-N-{4-[4-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-fenildisulfanil]-fenil}-acetamida (22)¹⁶

El compuesto **21** (2 g, 8 mmol) se disolvió en (CH₂)₂Cl₂ (50 ml) a 0°C. Se adicionó anhídrido trifluoroacético (2,35 ml, 16,1 mmol) lentamente. Al final del agregado el producto precipitó, se filtró y se purificó por cromatografía flash (Ciclohexano/AcOEt). Se obtuvieron 3,45 g de un sólido blanco. Rend. 98%. RMN-¹H (200 MHz, MeOD): 7,51 (d, 4H, J = 8 Hz), 7,64 (d, 4H, J = 8 Hz). RMN-¹³C (50 MHz, MeOD): 138,7; 135,8; 131,1; 123,8. EMAR(ESI): (M-H)⁻ 439,0015 calc. C₁₆H₁₀F₆N₂O₂S₂ 440,0087.

2,2,2-Trifluoro-N-(4-mercapto-fenil)-acetamida (23)¹⁰

Se disolvió el compuesto **22** (0,61 g, 1,4 mmol) en una mezcla de dioxano: agua (25:10) a t.a. y bajo atmósfera de nitrógeno. Se adicionó trifenilfosfina (0,36 g, 1,4 mmol) y una gota de HCl (c). Luego de 5 hs de reacción se elimina el solvente en vacío y el residuo se purifica por cromatografía flash (ciclohexano/AcOEt). Se obtuvieron 0,45 g del producto como un sólido blancuzco. Rend. 71%. RMN-¹H (200 MHz, MeOD): 7,52 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,30 (d, 2H, J = 8 Hz). RMN-¹³C (50 MHz, MeOD): 156,9 (q, J = 37,6 Hz); 135,2; 130,6; 130,4; 122,8; 117,4 (q, J = 285,0 Hz). EM (ESI): (M-H)⁻ 220,1 calc. C₈H₆F₃NOS 221.012.

***t*-Butoxicarbonilamino-tioacetico-S-[4-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-fenil] ester (24)**

BOCGlyNHS (**15**) (0,17 g, 0,6 mmol) se agregó a una solución de **23** (0,14 g, 0,63 mmol) en THF anhidro, seguido de DIPEA (0,10 ml, 0,6 mmol). Se dejó reaccionar a t.a. toda la noche. Se eliminó el solvente y el residuo se purificó por cromatografía flash (ciclohexano/AcOEt). Se obtuvieron 0,16 g del producto. Rend. 61%. RMN-¹H (200

MHz, MeOD): 7,75 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,42 (d, 2H, J = 8 Hz), 4,00 (s, 2H), 1,48 (s, 9H).
RMN-¹³C (50 MHz, MeOD): 200,0; 159,1; 157,9 (q, J = 36,9 Hz); 139,8; 137,4; 126,3;
123,36; 117,9 (q, J = 284,7 Hz); 81,9; 51,8; 29,4. EMAR(ESI): (M+Na)⁺ 401,0753 calc.
C₁₅H₁₇F₃N₂O₄S 378,0861.

Clorhidrato de 4-(2,2,2-Trifluoro-acetilamino)-fenilsulfanilcarbonilmetilamonio (25). El compuesto **24** (0,092 g, 0,21 mmol) se disolvió en una mezcla HCl 4N: dioxano (1:1) y se agitó por 4 hs. La solución se concentró en vacío y el residuo se trató con éter etílico para precipitar el producto como un sólido blanco que se filtró. Rend. 70%. RMN-¹H (200 MHz, MeOD): 7,81 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,53 (d, 2H, J = 8 Hz), 4,20 (s, 2H). EMAR(ESI): (M-Cl)⁺ 279,0409 calc. C₁₀H₁₀ClF₃N₂O₂S 314,0103.

Compuesto 18 (FluoGlySfeniltioéster)¹¹

El compuesto **25** (0,2 g, 0,37 mmol) se disolvió en DCM y se adicionó DMF (1,43 µl) y cloruro de oxalilo 2M en DCM (44 µl, 0,55 mmol) lentamente. Se agitó bajo atmósfera de nitrógeno por 45 min. y se evaporó el solvente en vacío. Se redisolvió el residuo en THF anhidro y se agregó fluoresceína-pivalato¹⁷ (0,080 g, 0,03 mmol) seguido de DIPEA (66 µl). La reacción se dejó toda la noche. Luego se evaporó el THF, se rsuspendió en AcOEt y se lavó con HCl 1M y agua. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El crudo obtenido se purificó por cromatografía flash (ciclohexano/AcOEt).

Se obtuvieron 2,4 mg del producto **18**. Rend. 10%. RMN-¹H (200 MHz, MeOD): 8,19 (d, 2H, J = 8 Hz), 8,10 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,69 (d, 2H, J = 7 Hz), 7,66 (d, 2H, J = 8 Hz),

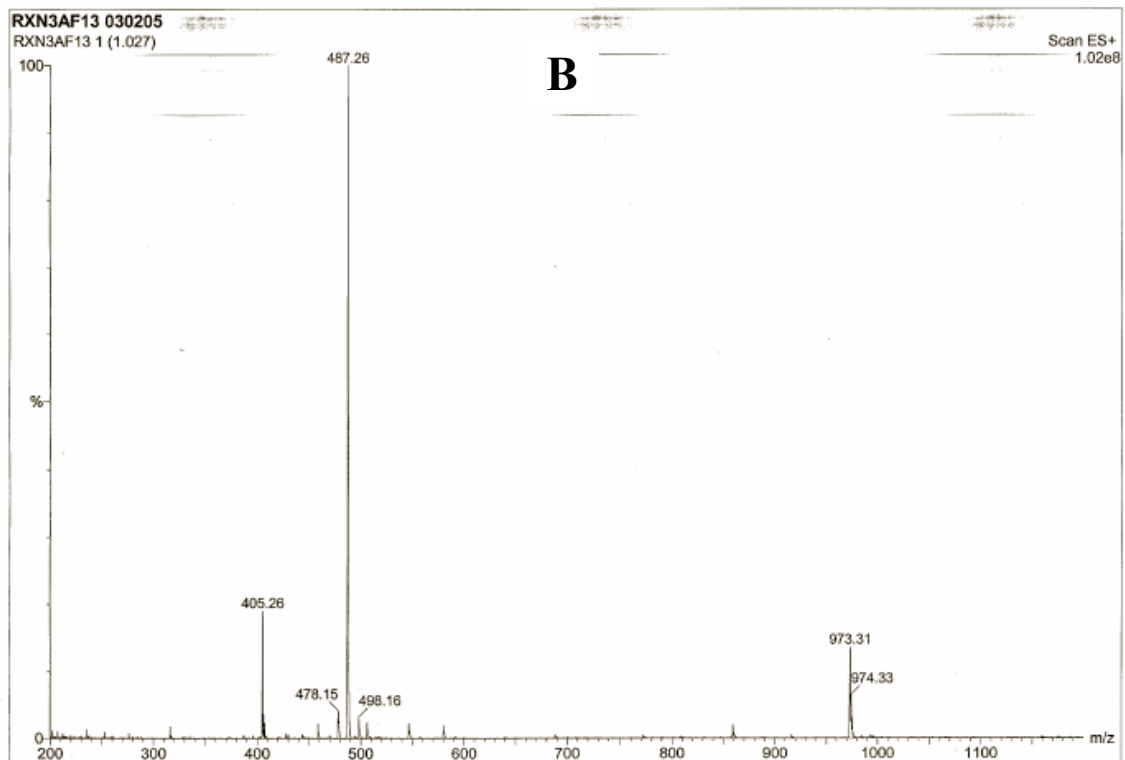
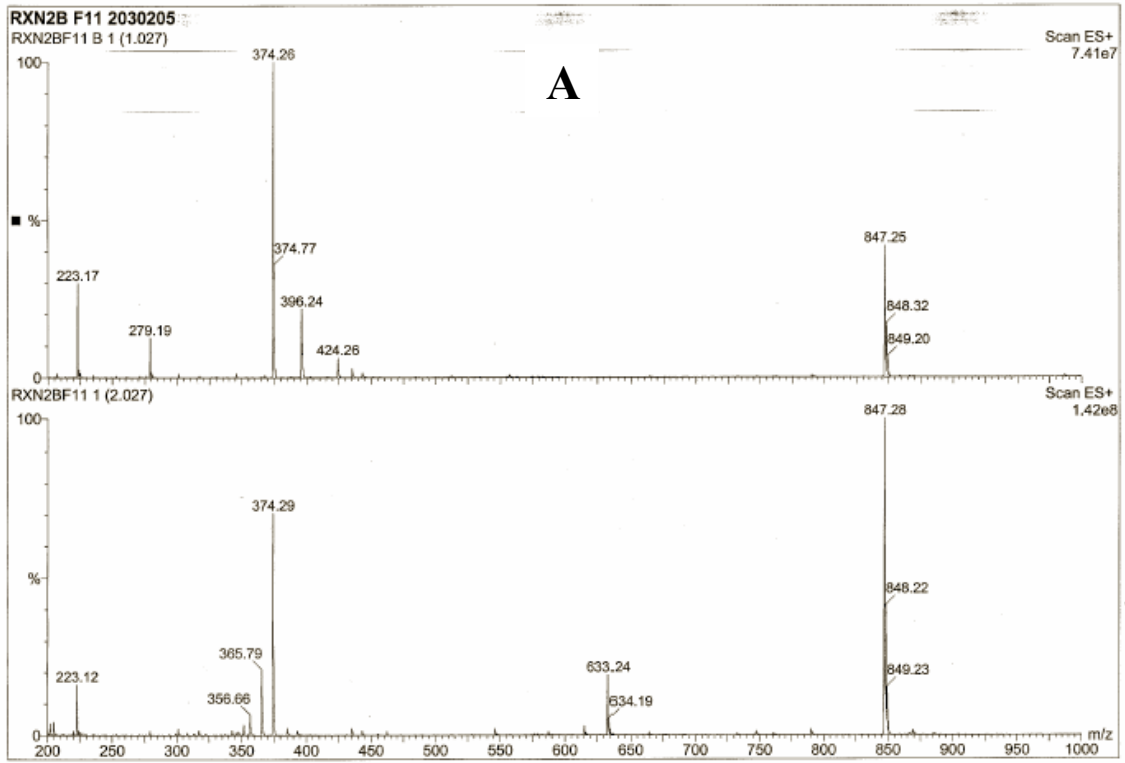
7,30 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,10 (s, 2H), 6,87 (d, 4H, J = 10 Hz), 6,79 (d, 4H, J = 10 Hz), 4,23 (s, 2H), 1,30 (s, 36 H). RMN-¹³C (50 MHz, MeOD): 197,5; 178,6; 170,5; 169,0; 157,4 (q, J = 37,6 Hz); 155,4; 155,1; 153,6; 142,4; 139,8; 137,3; 131,7; 131,0; 130,6; 127,4; 125,5; 124,8; 123,3; 120,12; 118,0 (q, J = 286,7 Hz); 117,8; 112,3; 84,1; 51,2; 40,9; 28,1. EMAR(ESI): (M+H)⁺ 805,2037 calc. C₄₁H₃₅F₃N₂O₁₀S 804,1964.

4.6.2 Marcación específica *in vitro*

El péptido modelo de secuencia CGRGDSP fue sintetizado por Volker Klaukien del Instituto Max Planck de Química Biofísica (Göttingen, Alemania). Se preparó una solución del péptido de concentración 1,45 mM en buffer Rab de pH = 7,6. Se trató una parte con TCEP: MESNA (2:10) y otra parte con DMPS, por 30 minutos. Luego se incubó con los compuestos **11**, **13** y **16** por 4 hs. Se analizó la distribución de productos por HPLC con una columna analítica RP18 de 4,6 x 150 mm, 5µm. Se utilizó un gradiente lineal H₂O,1% TFA- MeCN 0,1% TFA. Se detectó a 220, 260 y 488 nm. Las fracciones de interés fueron analizadas por espectrometría de masa (ESI).

Buffer Rab: NaCl 135 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 0,4 mM, CaCl₂ 1 mM, HEPES 5,6 mM, pH = 7,6.

A continuación (Fig. 4.18) se presentan los espectros de masa (ESI) de las fracciones que contenían al producto de interés en cada caso. En el caso de la reacción con la sonda **11** los otros picos mayoritarios que aparecen en el cromatograma entre los 15 y 20 minutos se analizaron por EM para descartar que sean el producto deseado y no fueron analizados en profundidad.



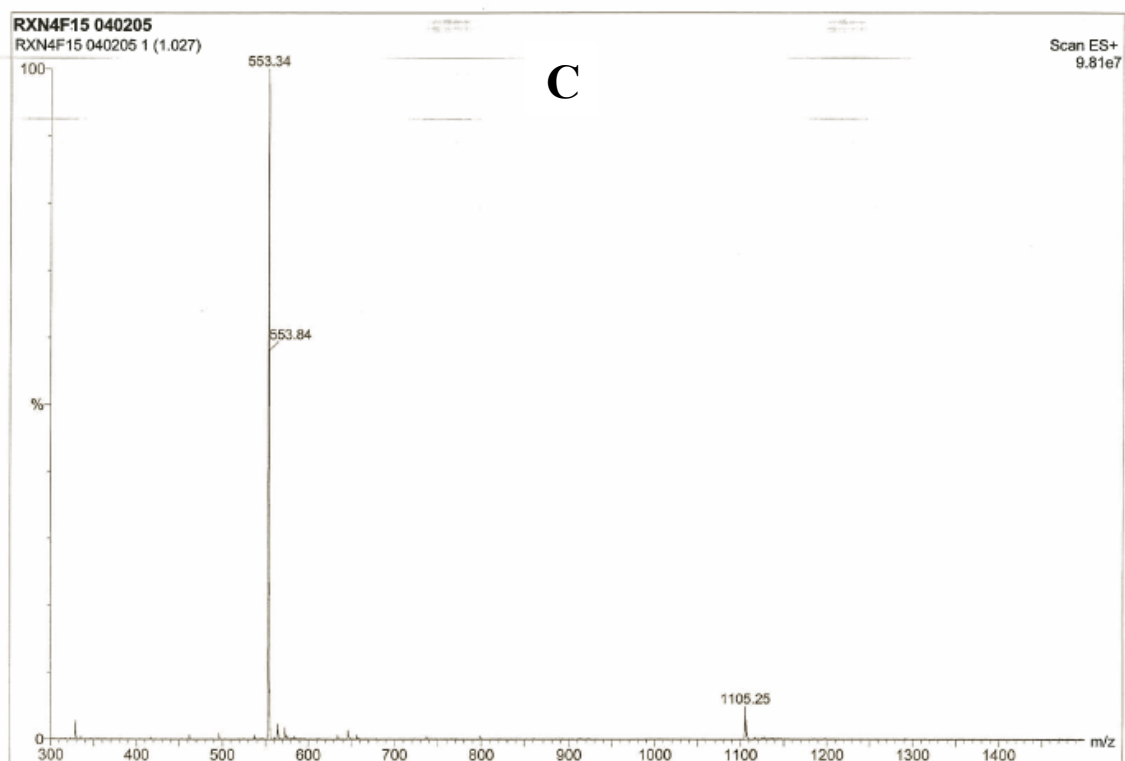


Figura 4.18. Espectros de masa (ESI) de las fracciones de interés que contenían el conjugado del péptido modelo con BOC-Gly (**A**), Biotina (**B**) y Fluoresceína (**C**)

4.7 REFERENCIAS

1. Dawson P.E., Muir T.W., Clark-Lewis I., Kent S.B.H. *Science*. 1994, 266, 776-779.
2. Wieland T., Bokelmann E., Bauer L., Lang H.U., Lau H. *Annalen Chemie*. 1953, 583, 129-149.
3. Canne L.E., Botti P., Simon R.J., Chen Y., Dennis E.A., Kent S.B.H. *J.Am.Chem.Soc.* 1999, 121, 8720-8727.
4. Tam J.P., Yu Q., Lu Y.A. *Biologicals*. 2001, 29, 189-196.

5. David R, Richter M.P.O., Beck-Sickinger A.G. *Eur. J. Biochem.* 2004, 271, 663-677.
6. Tolbert T.J., Wong CH. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2171-2174.
7. Yeo D.S.Y., Srinivasan R., Uttamchandani M., Chen G.Y.J., Zhub Q. , Yao S.Q. *Chem. Commun.* 2003, 2870-2871.
8. Muraki M., Mizoguchi T. *Chem. Pharm. Bull.* 1971, 19, 1708-1713.
9. Green T.W., Wuts P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis.* 1999, Wiley-Interscience. New York.
10. Overman L.E., Matzinger D., O'Connor E.M., Overman J.D. *J. Am. Chem. Soc.* 1974, 96, 6081-6089.
11. Adamczyk M., Chan C.M., Fino J.R., Mattingly P.G. *J. Org. Chem.* 2000, 65, 596-601.
12. Tam J.P., Lu Y., Liu C., Shao J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92, 12485-12489.
13. Armarego W.L.F., Perrin D.D. *Purification of laboratory chemicals.* 1988, 4th Ed., Pergamon Press. Oxford.
14. Zhang J., Wang X., Tu CH., Lin J., Ding J., Lin L., Wang Z., He CH., Yan CH., You X, Guo Z. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 3502-3507.
15. Price CH.C., Stacy G.W. *Org. Synth.* 3, 86.
16. Pyne S.G. *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 4737-4740.
17. Rossi F.M., Kao J.P.Y. *Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 495-497.

CAPÍTULO 5
Nanopartículas fluorescentes:
Quantum dots

5.1 INTRODUCCIÓN

El uso de fluoróforos orgánicos para la marcación de biomoléculas encuentra su mayor limitación en sus propiedades fotofísicas intrínsecas: restricción en la excitación, perfiles anchos de emisión y bajos umbrales de fotoblanqueo. Esto acota las posibilidades en cuanto a la adquisición de imágenes y la obtención simultánea de múltiples señales. Las primeras aplicaciones biológicas de las nanopartículas luminiscentes denominadas *Quantum dots (QDs)* demostraron la capacidad de estos materiales para superar estos problemas^{1,2}.

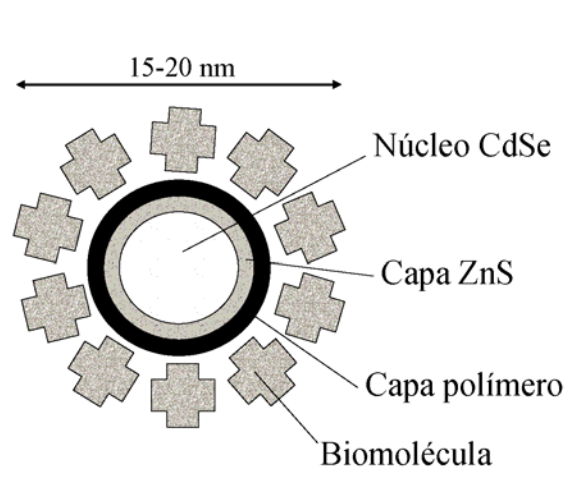


Figura 5.1. Estructura esquemática de un Quantum dot

Los QDs utilizados en estudios biológicos son nanocristales coloidales compuestos de un núcleo de CdSe de diámetro variable cubierto por una capa de ZnS (2-6 nm de diámetro) (Fig. 5.1). Esta capa pasivante tiene la función de proteger el

núcleo de la oxidación, evitar la pérdida de Cd o Se a la solución y mejorar la fotoluminiscencia.

Los QDs no son solubles en agua por eso es necesaria la funcionalización de la superficie con ligandos hidrofílicos ya sea a través de procesos de intercambio o por encapsulamiento del nanocrystal con capas de material orgánico heterofuncional, como son las cubiertas de TOP/TOPO (tri-*n*-octilfosfina/óxido de tri-*n*-octilfosfina). Estos ligandos no sólo mejoran la solubilidad en agua sino que también sirven como sitio de unión de biomoléculas.

En la figura 5.2 se esquematizan los métodos de bioconjugación más usuales: por funcionalización con espaciadores como ácido mercaptoacético (HSCH₂COOH), ácido dihidrolipoico (DHLA)³ o ácido poliacrílico modificado⁴. Estas capas cumplen además la función de estabilizar al QD y evitar la agregación.

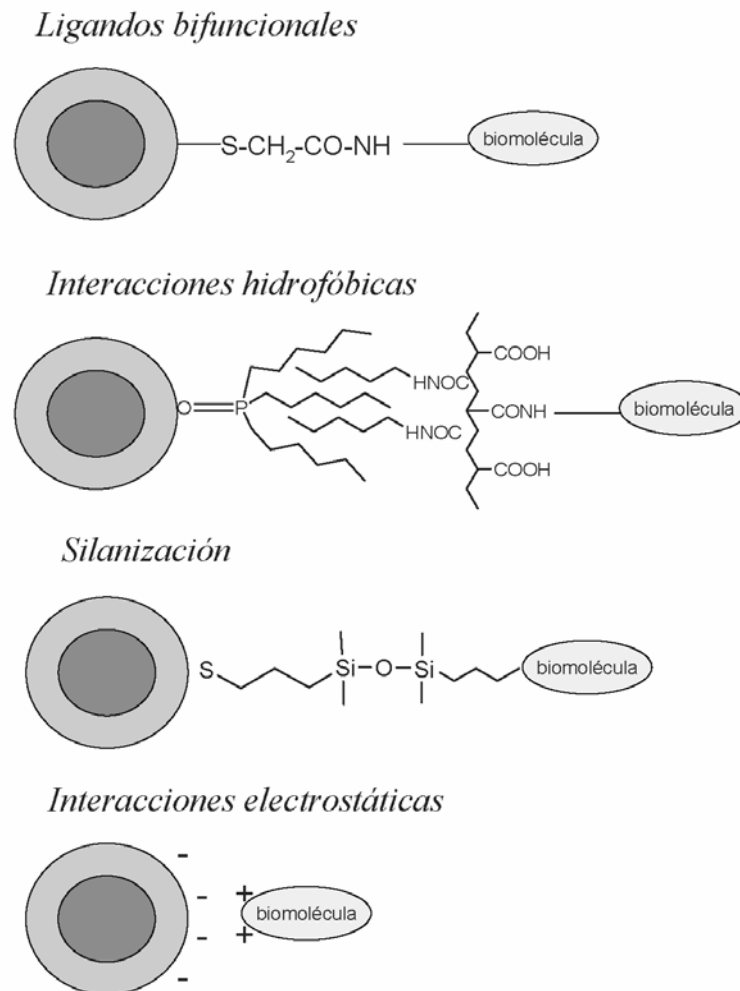


Figura 5.2. Esquema de los distintos métodos de bioconjugación: ligandos bifuncionales como ácido mercaptoacético; capas de TOP/TOPO unidas a polímeros modificados de ácido acrílico por interacciones hidrofóbicas; mercaptosilanización; interacciones electrostáticas.

Las propiedades espectroscópicas de los Quantum dots se deben al efecto de confinamiento cuántico en el semiconductor. Los excitones (par coulombico hueco/electrón en un semiconductor) pueden pensarse como análogos a los estados excitados de los fluoróforos orgánicos con la diferencia de que tienen tiempos de vida

mucho más largos (~ 20 ns). Este efecto aparece cuando el tamaño de la nanopartícula es comparable al radio de Bohr del excitón (distancia electrón-hueco en el estado excitado) y el par electrón/hueco queda “confinado”⁵. Estos nanocristales pueden absorber fotones en un amplio rango de energía pero emiten a una longitud de onda característica. El QD semiconductor absorbe fotones cuando la energía de excitación es mayor que la energía de *bandgap* (separación entre la banda de valencia y la de conducción, en el semiconductor). El estado excitado de menor energía se conoce como el estado de confinamiento cuántico. La excitación a menores longitudes de onda es posible porque existen múltiples estados electrónicos a mayores niveles de energía y de hecho el coeficiente de extinción molar aumenta gradualmente hacia menores longitudes de onda. Como consecuencia se obtienen espectros de absorción anchos en los que el corte de longitud de onda en el visible depende del tamaño (a mayor tamaño, el corte se produce a mayores longitudes de onda) mientras que la emisión queda confinada a bandas angostas centradas en longitudes de onda características del tamaño de la partícula (a menor tamaño, menor longitud de onda de la luz emitida) (ver Fig. 5.3 y 5.4). Esto es importante para las aplicaciones biológicas porque permite la excitación simultánea de diferentes colores de QDs con la misma fuente de excitación y la observación selectiva de la emisión a través de una correcta selección de filtros².

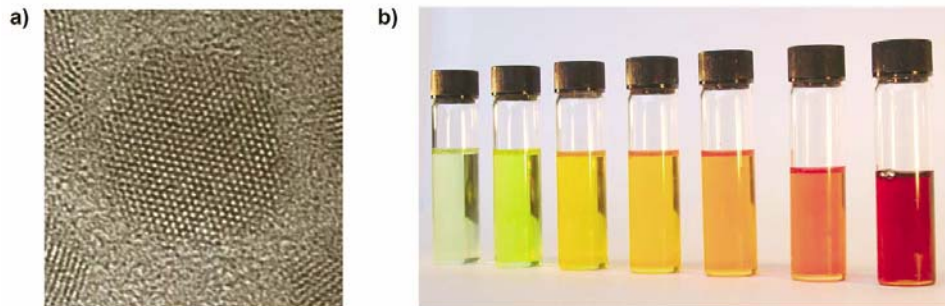


Figura 5.3. a) Imagen de TEM de un QD con capa de TOPO de ~ 4 nm de diámetro. b) Soluciones de QDs de 2 nm a 6 nm, de izquierda a derecha. (Nano Co. Technologies)

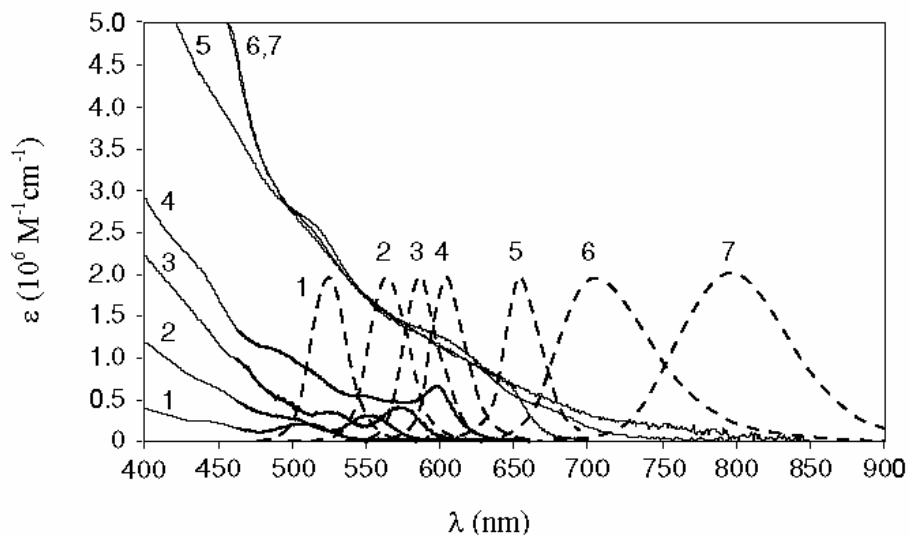


Figura 5.4. Espectros de absorción (—) y emisión (---) de QD525 (1), QD565 (2), QD585 (3), QD605 (4), QD655 (5), QD705 (6), QD800 (7), conjugados a estreptavidina.

El estado excitado en los nanocristales suele tener decaimientos multiexponenciales, siendo la componente con tiempo de vida de 20-30 ns la mayoritaria. Estos decaimientos son más lentos que los que usualmente se observan en los fluoróforos orgánicos, de ~ 1 -5 ns. Una consecuencia ventajosa de este hecho es que

la señal de fondo proveniente de la autofluorescencia de algunos componentes intracelulares no se llega a observar al momento en que se ve la emisión del QD.

Las principales características de los QDs son:

- Altos rendimientos cuánticos
- Altos coeficientes de extinción molar (10^5 - 10^6 M⁻¹cm⁻¹ dependiendo del tamaño y la λ_{exc} . Estos valores son ~10-100 veces mayores que los de los fluoróforos orgánicos)
- Perfiles de absorción anchos y de emisión angostos y simétricos
- Emisión desde el UV al IR
- Corrimientos de Stokes grandes que permiten un aumento de la sensibilidad por disminución de la autofluorescencia
- Alta resistencia al fotoblanqueo
- Resistencia a la degradación fotoquímica

En comparación con los marcadores fluorescentes orgánicos, sobresalen dos propiedades: la posibilidad de sintonizar la emisión en función del tamaño del núcleo de la nanopartícula y de excitar simultáneamente QDs de diferente tamaño a una longitud de onda alejada de las respectivas emisiones (> 100 nm). Un aspecto negativo en cuanto a la fotofísica de los QD es que presentan intermitencia en la fluorescencia en escalas de tiempo que van de 200 μ s a cientos de segundos, períodos en los cuales entran en un estado de “apagamiento” reversible (*blinking*). Para este fenómeno no se ha encontrado aún una explicación definitiva, pero establece un límite en la cuantificación absoluta

del blanco aunque sí es posible una cuantificación relativa⁶. Este aspecto, sin embargo, permite reconocer QDs individuales ya que las señales conjuntas correspondientes a más de una nanopartícula tienen muy baja probabilidad en mostrar “blinking” simultáneo. Por lo tanto, en esos casos no se observa el fenómeno.

Existen distintas formas de bioconjugación de QDs a proteínas, cada uno con sus limitaciones:

- 1) Condensación entre los grupos -COOH de los QDs (por adsorción directa del ligando bifuncional como HSCH₂COOH) con los grupos -NH₂ de las proteínas, a través de la reacción de acoplamiento con EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) para formar una unión amida.
- 2) Unión directa a la superficie del QD de péptidos tiolados o de residuos polihistidina
- 3) Adsorción por interacciones electrostáticas entre QDs cargados negativamente y proteínas cargadas positivamente³
- 4) Interacción a través de biotina con QDs conjugados a estreptavidina (~ 20 proteínas por conjugado)

Hasta el momento existen numerosos ejemplos de aplicaciones exitosas de los QDs en estudios de marcación celular *in vivo* (Tabla 5.1).

En general, se ha visto que la marcación con Quantum dots permite la visualización de las células bajo iluminación continua por períodos prolongados así

como la detección de varios colores simultáneamente utilizando la misma fuente de excitación.

Tabla 5.1. Componentes celulares y proteínas representativas marcadas con QDs en células vivas

<i>Componente celular/proteína</i>	<i>Función</i>
Núcleo/proteínas nucleares	Organela que contiene el material genético (ADN) ⁴
Mitocondria	Organela donde ocurren los procesos esenciales de distribución energética ⁷
Compartimentos endocíticos	Vesículas internalizadoras de moléculas extracelulares ⁸
Transportadores de serotonina	Transportadores de la superficie celular ⁹
Her2	Proteína sobreexpresada en la superficie de células cancerosas de la mama ⁴
erbB/HER	Receptor de superficie mediador de la respuesta celular a factores de crecimiento, sobreexpresado en muchos tipos de cáncer ¹⁰

5.2 QUANTUM DOTS Y TRANSFERENCIA DE ENERGÍA (FRET)

Hemos llevado a cabo como parte de esta Tesis el estudio del comportamiento de los QDs como donantes en transferencia de energía (FRET). Estos resultados forman parte de un estudio integral¹¹ sobre la caracterización de Quantum dots conjugados con estreptavidina disponibles comercialmente (QDC, Quantum Dot Corporation). En este trabajo se presentaron datos sobre la excitación de dos fotones, tiempos de vida media

de fluorescencia, anisotropía de QDs en agregados y como partículas individuales, su utilidad en estudios *in vivo* y en estudios de FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*).

5.2.1 Espectros de emisión y anisotropía de QD605, QD585 y QD565

El espectro de excitación y de emisión del QD605 se muestra en la figura 5.5. Se observa el gran corrimiento de Stokes (>350 nm) entre la banda de excitación, ancha y de absorbancia creciente hacia el UV, y el angosto pico de emisión (ancho de banda a media altura ~ 20 nm). Además, las características espectrales son constantes en el rango de pH 5-8, una característica muy importante para los estudios biológicos basados en estas sondas.

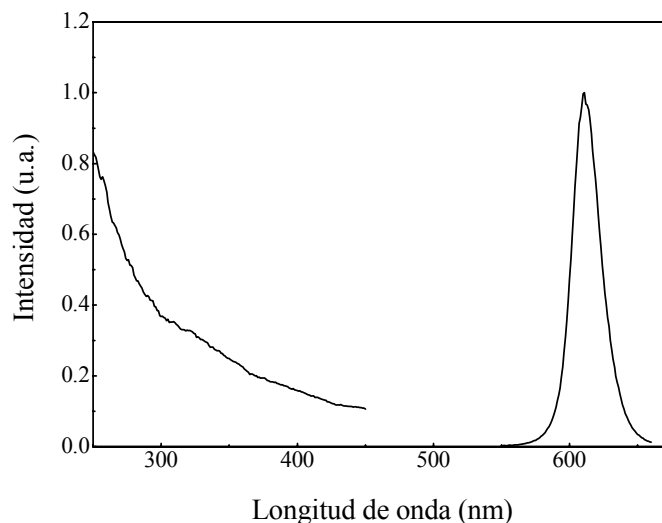


Figura 5.5. Espectro de excitación y de emisión de los QD605.

La emisión de una solución de QD605 de concentración nanomolar excitada en el rango del UV-azul, resultó ser polarizada. El valor de la anisotropía determinado según la ecuación 5.11 (ver Parte Experimental) fue de $0,084 \pm 0,008$.

El espectro de anisotropía de excitación de los QD605 resultó similar tanto en agua (viscosidad 1 cP) como en glicerol 95% (viscosidad 500-1000 cP) (Fig. 5.6).

La anisotropía de emisión también fue determinada para los QD585 y QD565, de naturaleza esférica de acuerdo al fabricante, a diferencia de los QD605 para los que la distorsión axial del núcleo es mayor que 2. Los valores de anisotropía obtenidos fueron nulos indicando que la forma no esférica de los QD605 podría ser la causa más importante de la anisotropía observada. No es claro si la forma de la nanopartícula ejerce su influencia a nivel de la excitación o la emisión.

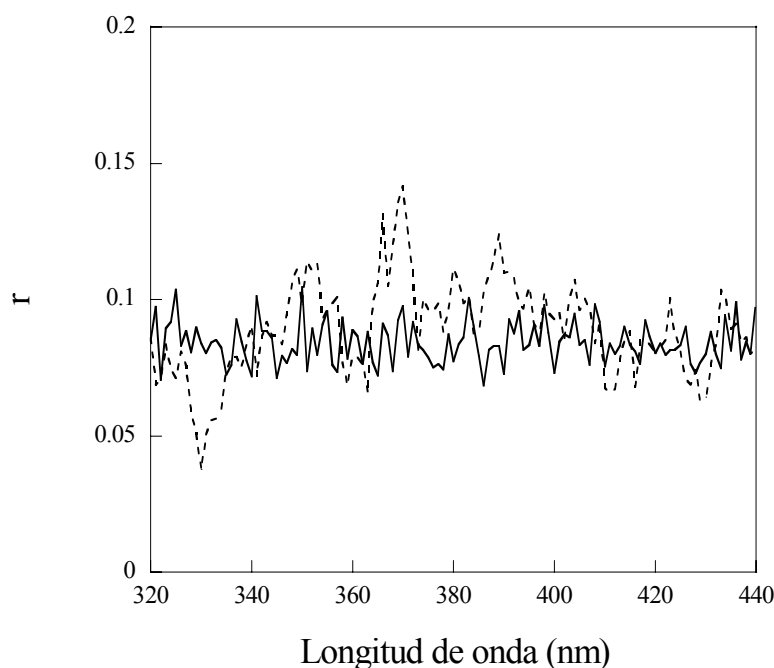


Figura 5.6. Anisotropía de excitación en glicerol (...) y agua (—). $\lambda_{em} = 615$ nm

Si consideramos a los QD605 como esferas de 15-20 nm de diámetro, se aplica la ecuación de Stokes-Einstein-Debye (5.1) para calcular el tiempo de correlación rotacional, ϕ , suponiendo un rotor esférico y simétrico de volumen V inmerso en un medio de viscosidad η , con k_B , la constante de Boltzmann. El valor de ϕ obtenido es de 0,4-1 μ s en agua y 0,2-1 ms en glicerol.

$$\phi = \frac{V\eta}{k_B T} \quad 5.1$$

Esto indica que los QDs permanecen inmóviles en cualquiera de los dos medios durante el tiempo de vida del estado excitado (10-20 ns) y en consecuencia, la despolarización rotacional es un factor despreciable. Esto explica que el cambio de viscosidad no afecta la anisotropía y corresponde a la anisotropía límite.

A fin de complementar los datos de anisotropía obtenidos con arreglos de QDs orientados al azar en solución, hemos realizado determinaciones sobre QDs individuales inmovilizados sobre una superficie de vidrio, con el microscopio de fluorescencia. En la figura 5.7 podemos analizar la emisión polarizada de los QD605 para cuatro orientaciones diferentes de excitación polarizada (488 nm). Las dos señales de emisión ortogonales distribuidas en el campo de la imagen muestran orientaciones al azar. O sea, la dirección del dipolo de emisión (rojo = 0°, verde = 90°) es esencialmente independiente de la orientación de la polarización incidente. Las variaciones individuales en el brillo total observadas pueden ser atribuidas a fluctuaciones estadísticas y “blinking”.

Estos experimentos son consistentes con el hecho de que el dipolo de emisión de los QD605 tiene una dirección bien definida y que a diferencia de los QD585 y QD565, estas nanopartículas no son esféricas.

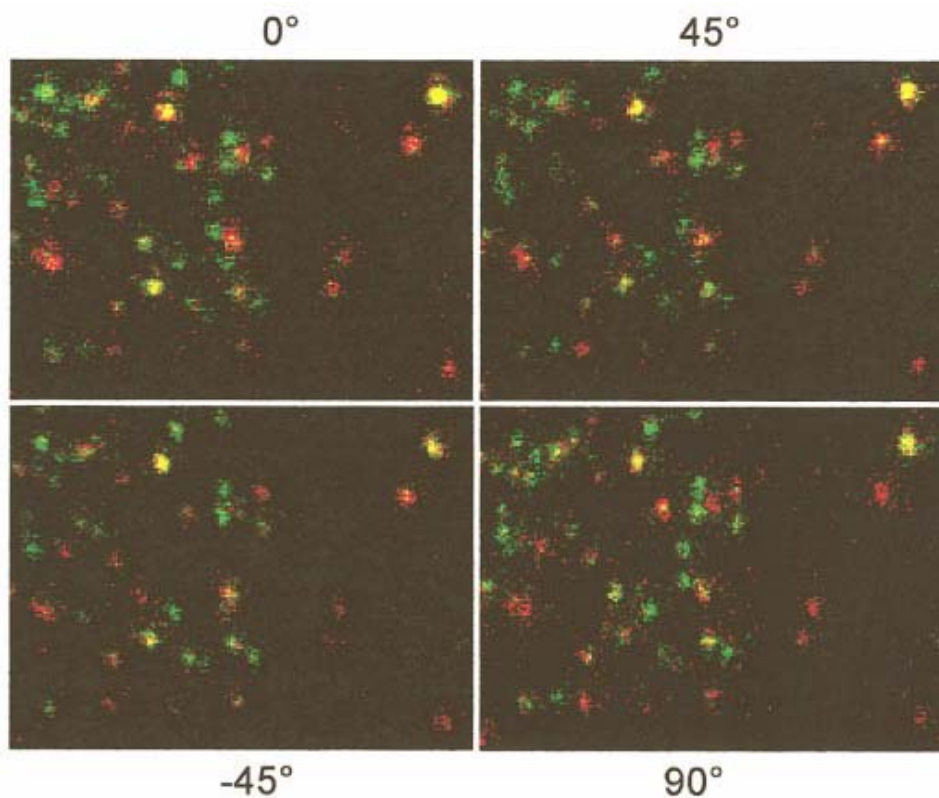


Figura 5.7. Características de polarización de QDs individuales. Imágenes de la polarización de la emisión de una dada región de QD605 unidos a cubreobjetos de vidrio biotilado para cuatro orientaciones distintas de la polarización de la luz de excitación (-45° , 0° , 45° , 90°). La dirección del dipolo de emisión se asignó 0° en rojo y 90° en verde. Cada QD tiene un color independientemente de la polarización de la excitación.

En conclusión, los QDs de menor tamaño correspondientes a valores de emisión de hasta 585 nm, no presentan emisión polarizada. Los de mayor tamaño (605 nm) presentan un valor de polarización que probablemente esté relacionado con la falta de simetría esférica. Dicha polarización no cambia con la viscosidad, lo que es coherente con su tamaño y vida media de emisión.

5.2.2 Quantum dots como donantes de FRET

Dos ventajas aparentes del uso de QDs como donantes de FRET respecto de los fluoróforos orgánicos son:

- La emisión del QD puede ser sintonizada con el tamaño para lograr buenos solapamientos espectrales con un aceptor en particular
- Al poder acomodar varias moléculas de aceptor sobre la superficie de un mismo QD, se logra una mayor eficiencia de FRET.

Para el estudio de transferencia de energía (FRET) se han utilizado QD585-estreptavidina como donantes y Alexa 594[®] biocitina (Fig. 5.8) como aceptor. Este fluoróforo tiene las siguientes propiedades¹²: alto coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{591} = 80.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH = 7), alta fotoestabilidad y baja sensibilidad a cambios de pH en el rango 4-10.

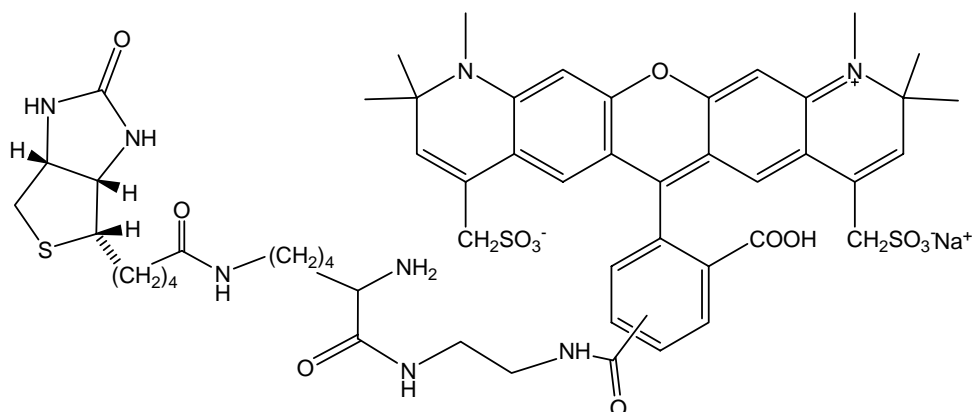


Figura 5.8. Estructura del aceptor Alexa594[®]-biotina

Se calculó para este par una integral de solapamiento J de $1,08 \cdot 10^{16} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$ que condujo a un valor de R_0 de 6,4 nm. Se utilizaron como parámetros para el cálculo (ec. 5.2 y 5.3): $\Phi_D = 0,4$ (dato obtenido de QDC), $\kappa^2 = 2/3$ y $n = 1,33$ (H_2O).

$$J = \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 5.2$$

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \Phi_D^0}{128 \pi^5 N_A n^4} \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 5.3$$

donde κ^2 es el factor de orientación, Φ_D^0 es el rendimiento cuántico de fluorescencia del donante en ausencia del aceptor, n es el índice de refracción del medio, I_D es el

espectro de fluorescencia normalizado del donante y ϵ_A es el coeficiente de extinción molar del aceptor ($M^{-1} cm^{-1}$).

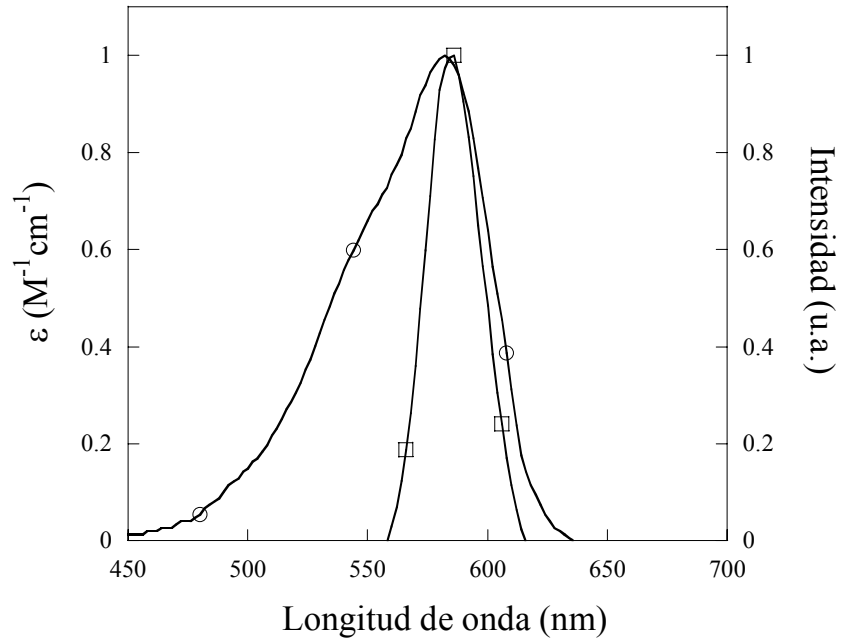
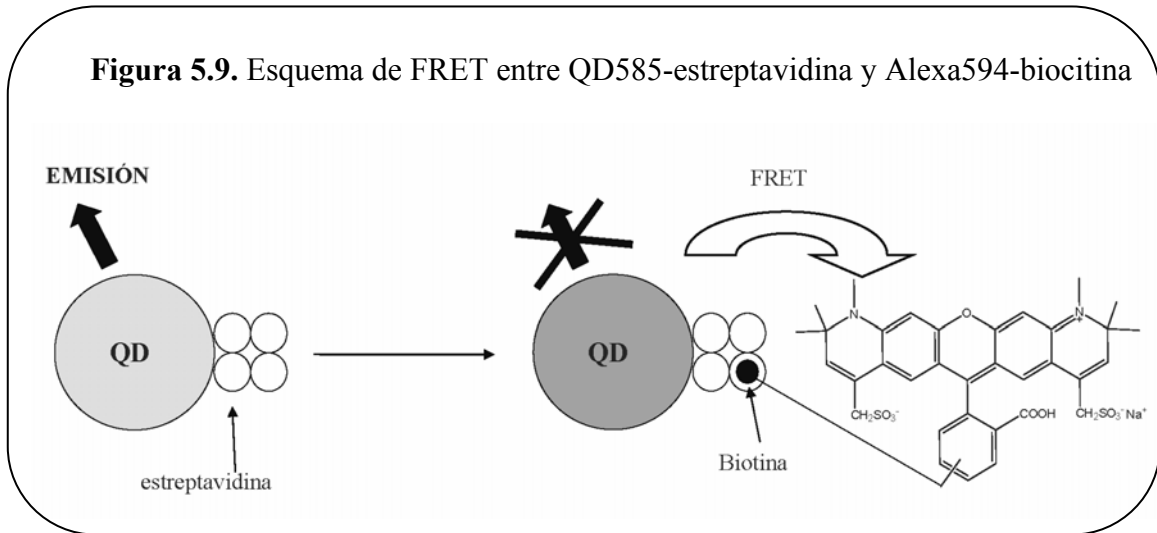


Figura 5.10. Espectro de absorción (○) de Alexa594-biotina y de emisión (□) de QD585-estreptavidina

Se procedió a titular una solución de concentración 2 nM de QD585-estreptavidina con Alexa594-biotina (Fig. 5.11). Se observó una fuerte disminución de la intensidad de emisión de los QDs, computándose un valor de $E \sim 0,85$, para la transferencia de energía, según la relación 5.4:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad 5.4$$

donde F_{DA} es la intensidad de fluorescencia del donante en presencia del aceptor a una relación aceptor/QD de ~ 1 y F_D en ausencia del aceptor.

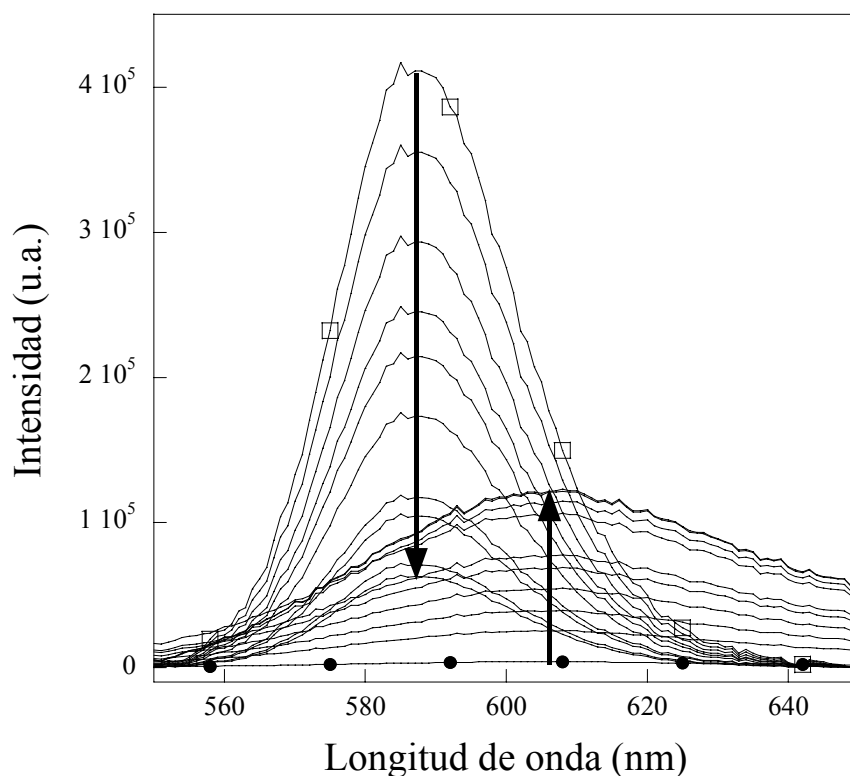


Figura 5.12. Evolución del espectro de emisión de una solución 2 nM de QD585-estreptavidina a concentraciones crecientes de Alexa594-biotina. (□) espectro inicial de los QDs, (●) emisión sensibilizada de Alexa594. ($\lambda_{exc} = 370$ nm). Se muestran los espectros deconvolucionados.

La determinación también se realizó por espectroscopía resuelta en el tiempo. El decaimiento de la fluorescencia del donante llevada a cabo en ausencia del aceptor y en una relación aceptor/QD de 0,5 (Fig. 5.12) permitió estimar un valor de $\sim 0,6$ para la eficiencia de la transferencia de energía, E , según la ecuación 5.5

$$E = 1 - \frac{\tau_D}{\tau_D^0} \quad 5.5$$

donde τ_D es el tiempo de vida del donante en presencia del aceptor y τ_D^0 es el tiempo de vida del donante en ausencia del aceptor.

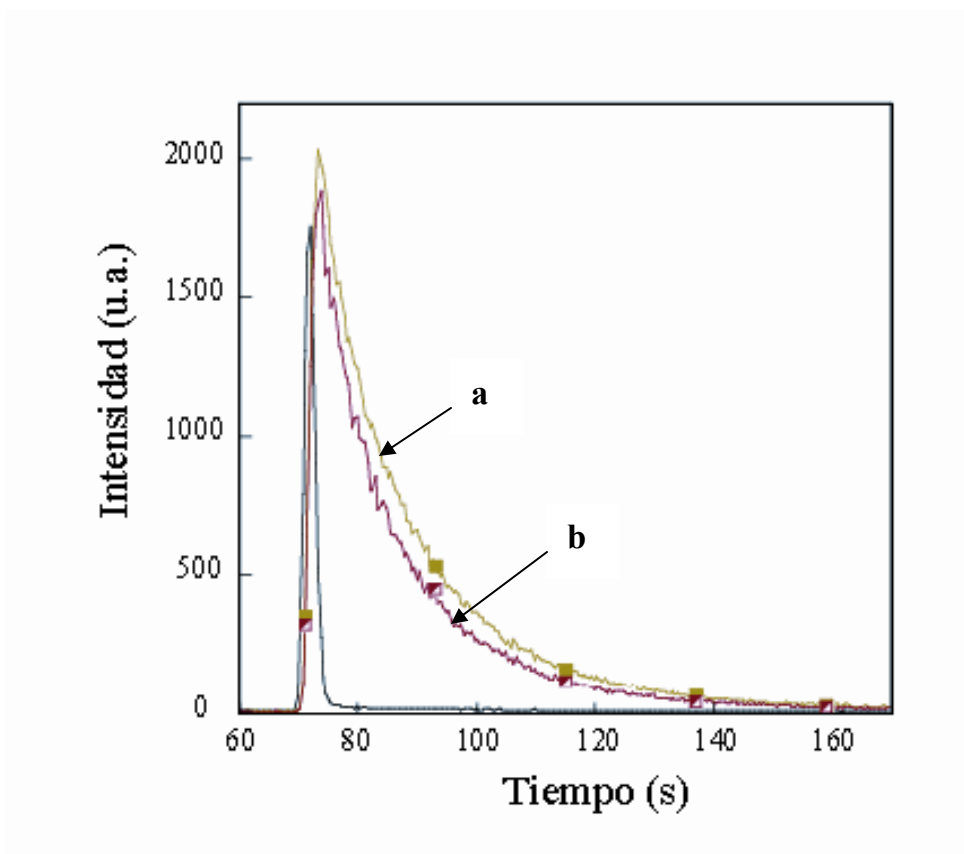


Figura 5.12. Decaimiento de la emisión de fluorescencia de una solución 2 nM de QD585, (a) en ausencia (τ^0) y (b) en presencia de medio equivalente de Alexa594[®]- biocitina (τ). $\lambda_{exc} = 437$ nm

Como se mencionó previamente, los tiempos de vida de fluorescencia de los QDs son más largos que los de los fluoróforos convencionales y los de las distintas fuentes de autofluorescencia celular. En ausencia del aceptor, el decaimiento resultó ser monoexponencial con un $\tau^0 = 17 \pm 1$ ns. En presencia de cantidades subestequiométricas del aceptor (0,5:1), el decaimiento se ajustó con una función biexponencial (ec. 5.6) con $\tau_1 = 21 \pm 1$ ns y $\tau_2 = 9 \pm 1$ ns siendo sus correspondientes amplitudes, $\alpha_1 = 0,6 \pm 0,1$ y $\alpha_2 = 0,4 \pm 0,1$.

$$I(t) = \alpha_1 \cdot \exp(-\tau_1 t) + \alpha_2 \cdot \exp(-\tau_2 t) \quad \mathbf{5.6}$$

La disminución del tiempo de vida del donante es evidencia de que el proceso de transferencia de energía tiene lugar y hemos asignado las componentes τ_1 y τ_2 a QDs sin aceptor y con aceptor unido, respectivamente. El valor de la eficiencia, E , se estimó según 5.5 y resultó ser de 0,57.

Esta discrepancia entre el valor para la eficiencia obtenido en las mediciones en estado estacionario (0,85) y el valor calculado a partir de las mediciones de tiempo de vida (0,57) podría deberse a factores adicionales tales como la formación de agregados e incertezas respecto de la concentración de las soluciones comerciales, que influyen mayormente en las determinaciones en estado estacionario. La ventaja de utilizar tiempos de vida en lugar de intensidades de fluorescencia para determinar la eficiencia de FRET es que los tiempos de vida se pueden medir de forma más precisa, lo que en general, es conveniente si la eficiencia (E) es baja. Además, el espectro de emisión en presencia del aceptor puede cambiar por procesos de reabsorción mientras que los tiempos de vida no se ven afectados por este fenómeno. Lo ideal es obtener E a partir de

ambas medidas en forma combinada, ya que una marcación incompleta puede conducir a resultados erróneos a partir de determinaciones del tiempo de vida en forma exclusiva. Una forma alternativa de obtener E sería a partir de la emisión sensibilizada del aceptor a través de la relación (5.7)¹³:

$$E = \frac{\varepsilon_A(\lambda_{exc}) \cdot F_{AD}}{\varepsilon_D(\lambda_{exc}) \cdot F_A} \quad 5.7$$

donde ε_A y ε_D son los coeficientes de extinción molar del aceptor y del donante respectivamente a la λ_{exc} , y F_{AD} y F_A son los espectros de emisión del aceptor en presencia y ausencia del donante, respectivamente.

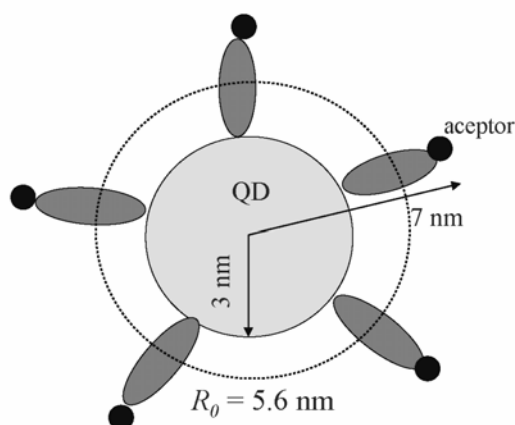
Esta determinación resulta difícil cuando la emisión sensibilizada del aceptor no domina totalmente la emisión por excitación directa y aunque se pueden realizar correcciones en este aspecto, se requiere de la obtención de valores precisos para los coeficientes de extinción molar tanto del donante como del aceptor, lo cual no es siempre posible, sobre todo en el caso de los QD donde existen incertezas respecto de su concentración¹⁴.

La interpretación de las determinaciones de FRET dependen fuertemente de la precisión y exactitud de los datos. Además, hay que tener en cuenta las posiciones de los sitios de unión a biotina en la estreptavidina y de la orientación relativa del aceptor. Es muy posible que no todas las posiciones donde puede unirse el aceptor se encuentren a una distancia adecuada para que ocurra el fenómeno.

En forma simultánea a nuestras investigaciones, Clapp y col.¹⁵ reportaron un estudio utilizando QDs que emiten a 510-555 nm como donantes de fluoróforos

aceptores como Cy3 o rodamina, conjugados con la proteína de unión a maltosa (MBP, *Maltose Binding Protein*) (Fig. 5.13). En este estudio¹³ se utilizaron QDs de 3 nm de radio con la proteína marcada con los fluoróforos sobre su superficie a una distancia fluoróforo-núcleo estimada de 7 nm. Utilizando un R_0 de 5,6 nm y un J de $8,91 \cdot 10 \text{ cm}^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{nm}^4$ para la combinación QD555-Cy3, la eficiencia para un par individual sería de 0,22. Al aumentar a 5 el número de aceptores sobre la superficie, la eficiencia llega a 0,58 ya que es el caso en el que n moléculas de aceptor interaccionan con una única molécula de donante, lo que incrementa la eficiencia de FRET según:

$$E = \frac{nR_0^6}{nR_0^6 + r^6} \quad 5.8$$



r (nm)	n	E(%)
7	1	21,6
7	5	58,0

Figura 5.13. Aumento de la eficiencia de FRET como consecuencia de múltiples aceptores sobre el mismo Quantum dot¹⁶

En nuestro sistema, QD605-estreptavidina-Alexa, existe la incerteza sobre el número de aceptores sobre la superficie del QD, pero es probable que este efecto opere sobre la eficiencia.

Se concluye entonces, que los QDs son buenos donantes de FRET con la ventaja de que al poseer múltiples sitios de unión del aceptor, se vé favorecido el proceso aún con aceptores con los que el grado de solapamiento espectral no sea muy bueno.

5.3 MODULACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DE QUANTUM DOTS CON ACEPTORES FOTOCRÓMICOS

En el campo de la bio-nanoelectrónica, donde se integran biomoléculas y nanomateriales como componentes de sistemas optoelectrónicos, los dispositivos controlados por luz tienen una importancia central. Los Quantum dots constituyen un componente ideal en este esquema.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha introducido el uso de compuestos fotocromicos como aceptores de transferencia de energía de resonancia en la metodología llamada *pcFRET* (photochromic FRET)^{17,18}. En el capítulo 3 de esta Tesis se ha discutido el uso de esta herramienta en la modulación de la fluorescencia de la sonda FIAsh. La incorporación de aceptores fotocromicos de la familia de diheteroariletanos (DAE) en fenómenos de transferencia de energía con Quantum dots, aventaja a estudios realizados con el sistema espiropirano-merocianina¹⁹, debido a que los diheteroariletanos poseen mayor estabilidad térmica en su forma cerrada, mayor resistencia a la fatiga y mayor compatibilidad con sistemas biológicos acuosos.

El diheteroarileno elegido como aceptor¹⁷ (Fig. 5.14) presenta las siguientes propiedades: (i) la forma cerrada tiene un máximo de absorción entre 540-570 nm; (ii) ambos isómeros, cerrado y abierto, son térmicamente estables y (iii) dispone de una función -COOH que permite la conjugación a aminas o hidroxilos. El espectro de emisión del QD donante solapa convenientemente con el espectro de absorción del diheteroarileno en su forma cerrada pero no con el de la forma abierta.

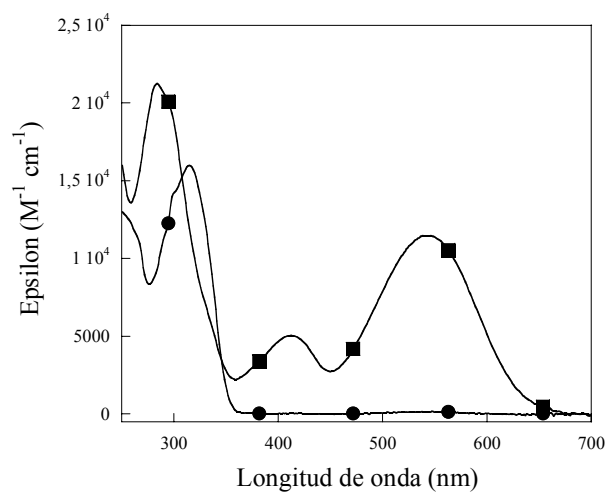
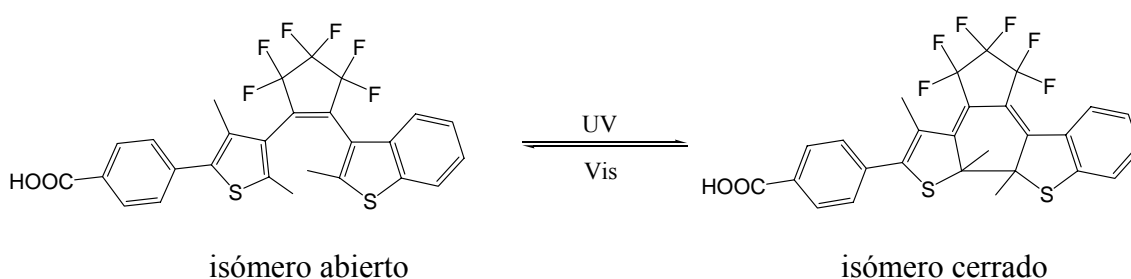


Figura 5.14. Espectros de absorción para la forma abierta (●) y cerrada (■) del diheteroarileno (DAE) utilizado como aceptor fotocromico.

Para la conjugación con el QD565-estreptavidina es necesario biotinar el DAE con un espaciador adecuado (Fig 5.15). Esto se llevó a cabo acoplando el DAE con un compuesto comercial derivado de biotina con un amino terminal.

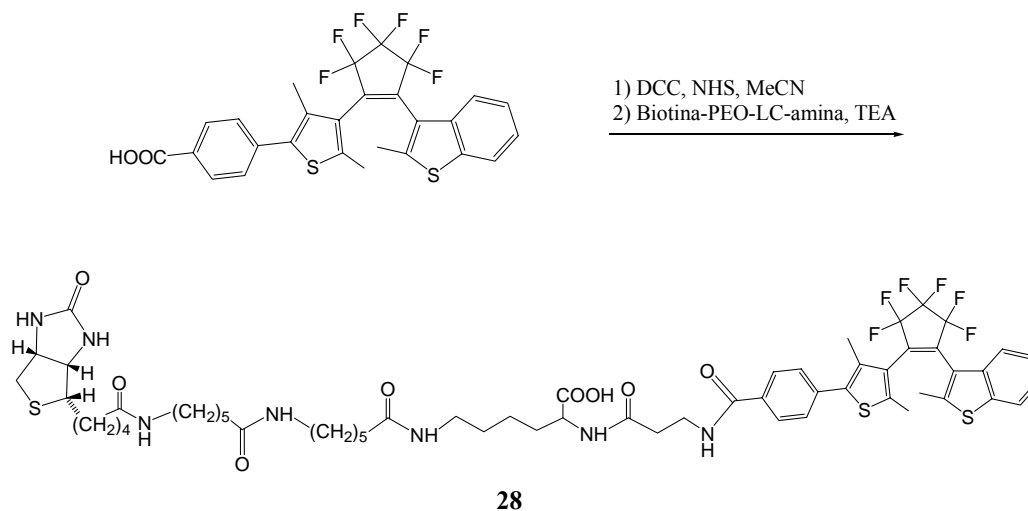
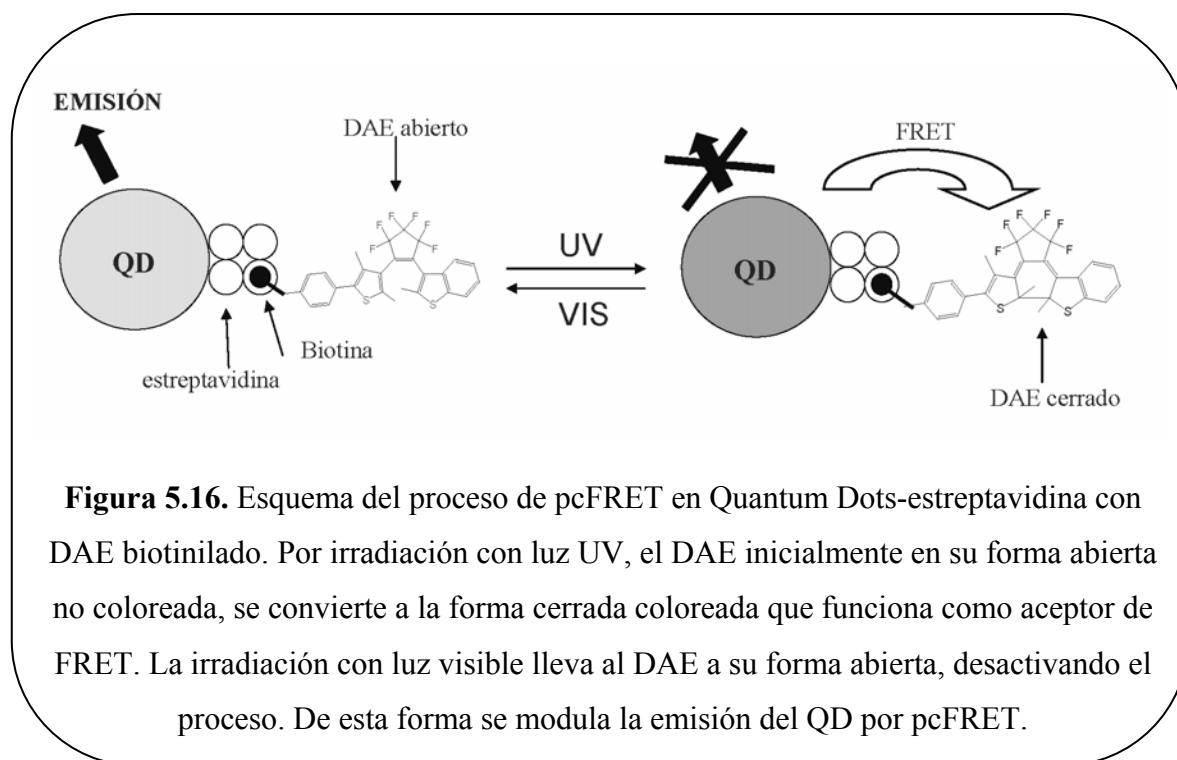


Figura 5.15. Estructura del DAE derivatizado con el espaciador Biotina-PEO-LC-Amina

La distancia crítica de Förster, R_0 , calculada para el DAE cerrado es de 4,4 nm con un valor de J , de $1,00 \cdot 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$, mientras que la calculada para el isómero abierto es de 2,3 nm.

5.3.1 Modulación de la fluorescencia del donante por espectroscopía

En la figura 5.16 se presenta un diagrama esquemático para el sistema en estudio. Se determinó la eficiencia del proceso por medición del tiempo de vida de QD565 y por cambios en la intensidad del QD565 en estado estacionario. Se trató una solución 4 nM de QD565-estreptavidina con el compuesto **28** hasta una concentración final de 2,8 nM. Luego de 30 segundos de irradiación con luz UV (365 nm) se obtuvo un quenching de la emisión del QD565 de 34%. La posterior irradiación con luz visible (60 seg) permitió recuperar la fluorescencia del QD565 hasta su valor inicial.



En el experimento resuelto en el tiempo para el conjugado QD565-DAEa (donde el diheteroarileno se encuentra en su forma abierta no aceptora) se observó un decaimiento biexponencial con $\tau_1 = 20$ ns (83% amplitud) y $\tau_2 = 2,4$ ns (17% amplitud). Luego de la fotoconversión del aceptor a su forma cerrada con luz UV (30 segundos), la intensidad de la emisión disminuyó un 70% (Figura 5.17) con una reducción en el tiempo de vida de $\tau_1 = 9,5$ ns (53% amplitud) y $\tau_2 = 1,75$ ns (47% de amplitud) (Fig. 5.18). La eficiencia computada fue de 0,71 a partir de los datos de intensidad en estado estacionario y de 0,52, según las determinaciones del tiempo de vida.

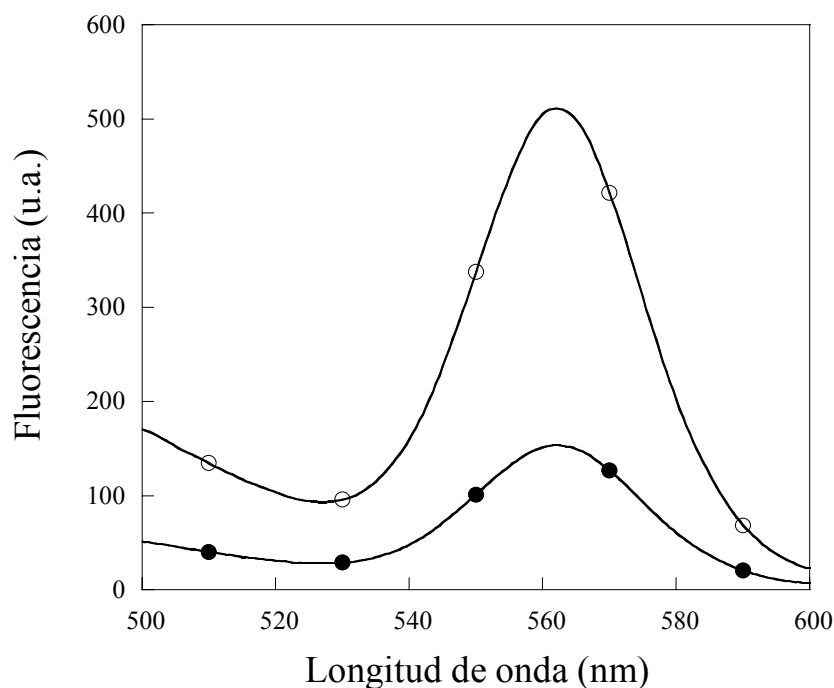


Figura 5.17. Cambios en la fluorescencia del QD565 según la fotoconversión del aceptor fotocromático unido al QD565. (○) forma abierta no aceptora; (●) forma cerrada aceptora

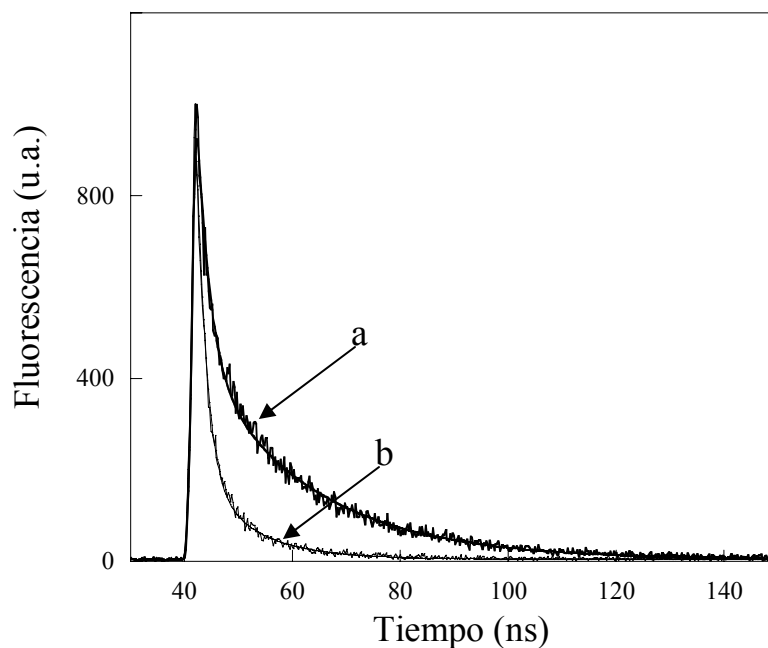


Figura 5.18. Cambios en en el tiempo de vida del donante QD565 según la fotoconversión del aceptor fotocromático. (a) forma abierta no aceptora; (b) forma cerrada aceptora

La posterior irradiación con luz visible (60 segundos) permitió recuperar la señal de emisión a su valor original. En la figura 5.19 se muestran 28 ciclos del apagado-encendido de la emisión del QD565-estreptavidina modulada por la fotoconversión del DAE, que demuestran la reversibilidad y estabilidad del proceso.

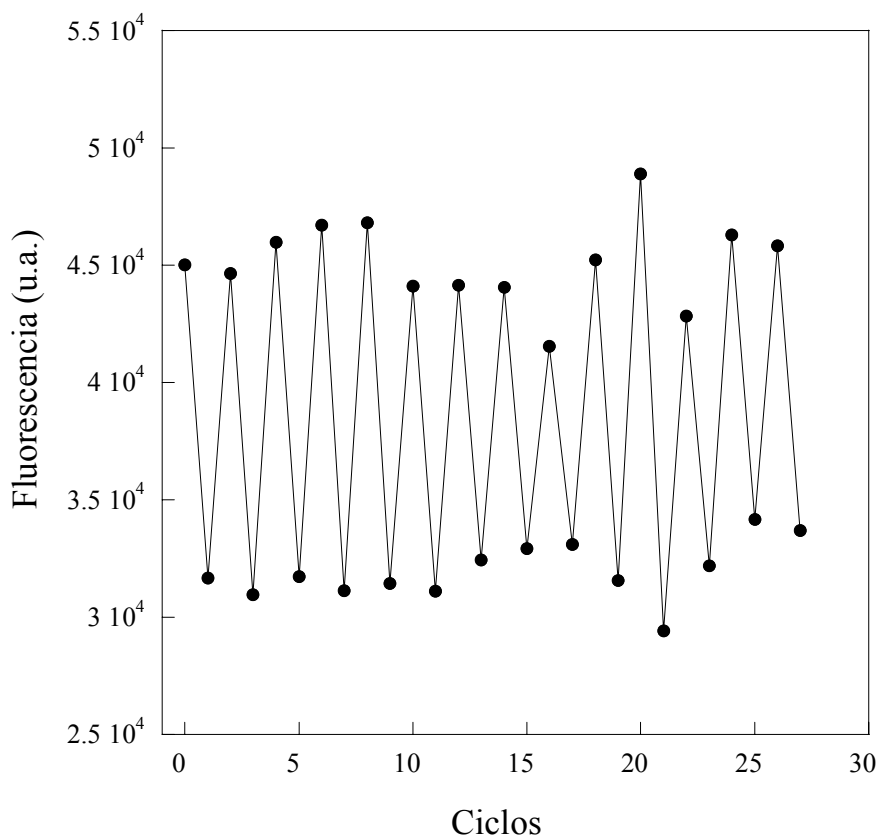


Figura 5.19. Modulación de la fluorescencia del QD565- DAE en solución, por ciclos de irradiación UV-Vis para la fotoconversión del aceptor fotocromático.

5.3.2 Modulación de la fluorescencia del donante observada por microscopía de fluorescencia

Para llevar a cabo este experimento se inmovilizaron microesferas magnéticas conjugadas a estreptavidina sobre cubreobjetos cubiertos de polilisina. Posteriormente se saturaron las microesferas con bis-biotina, se lavaron y se expusieron a una suspensión de QD565-estreptavidina. De esta manera se obtienen cubreobjetos con microesferas magnéticas de 2,6 μm cada una de las cuales queda cubierta de QDs a

través de bis-biotina, obteniéndose QDs individuales o formando agregados, distribuidos aleatoriamente sobre la superficie. Finalmente, luego de varios lavados, se expusieron los portaobjetos así preparados a una solución del conjugado DAE-Biotina-PEO-LC (28) (Fig. 5.20).

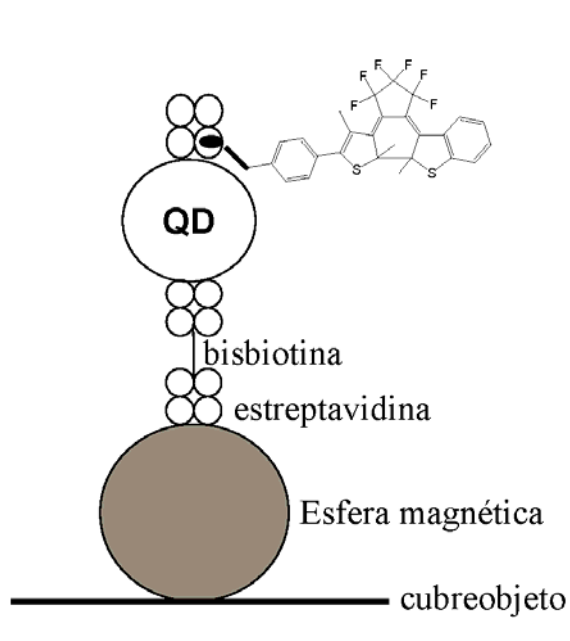


Figura 5.20. Esquema del sistema inmobilizado para la observación de pcFRET en el microscopio de fluorescencia

En la figura 5.21 se observa en el panel superior una región que contiene dos microesferas. La emisión del QD es intensa sobre la superficie de la microesfera debido a la alta concentración local pero también se observan QDs individuales y formando agregados.

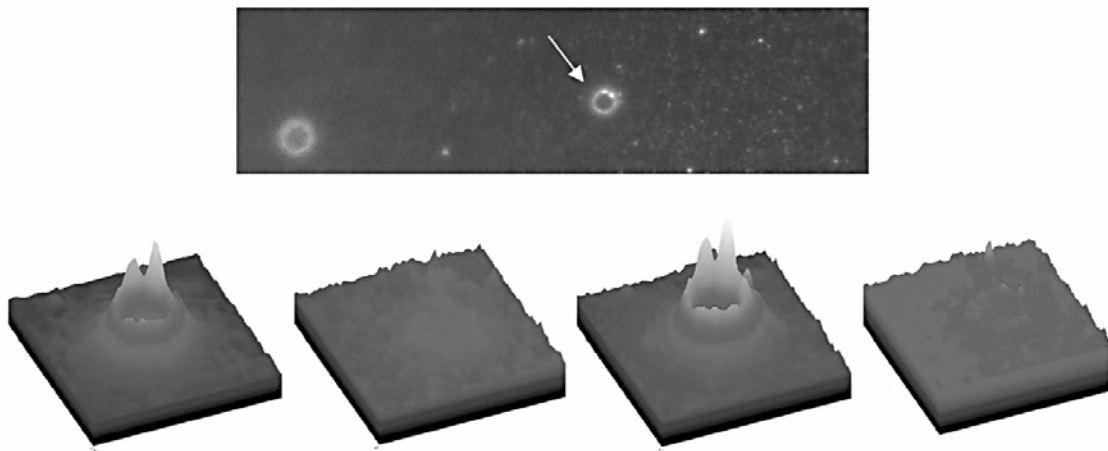


Figura 5.21. Emisión modulada del QD por pcFRET. *Panel superior:* se observan QDs sobre las microesferas magnéticas, así como también QDs individuales y agregados unidos directamente a la superficie. *Panel inferior:* intensidad de emisión de los QD sobre una microesfera seleccionada (flecha); de izquierda a derecha: estado inicial, irradiación UV, Vis y UV.

En el panel inferior de la figura 5.21 se observa la señal de fluorescencia de una microesfera seleccionada durante los sucesivos ciclos de fotoconversión. Inicialmente se irradió con luz UV lo que resultó en un aumento en la emisión del QD en lo que llamamos una fase de preirradiación. Luego de este período de pre-irradiación, cada ciclo de irradiación UV condujo a una disminución sistemática en la emisión del QD, la cual se recuperó a su valor inicial por irradiación con luz visible. En la figura 5.22 se muestran las imágenes que resultan de cuatro ciclos de conversión UV-Vis para una

dada región. La intensidad fue modulada por la fotoconversión, llegando a casi el 100% de desaparición de la emisión en el estado activo para FRET del aceptor fotocromico.

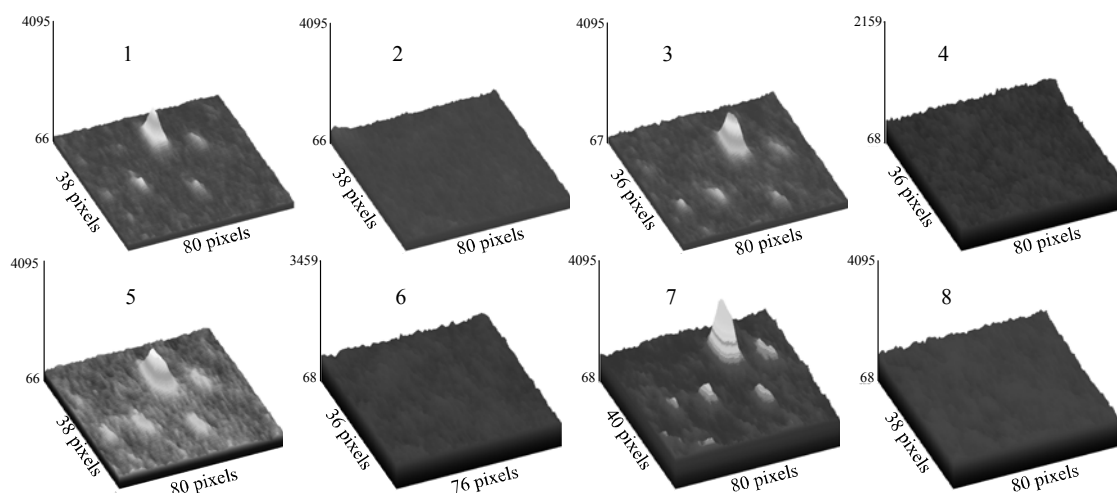


Figura 5.22. Imágenes de una región de interés en las que se aprecia la modulación de la emisión de los QDs por pcFRET (4 ciclos).

Otras regiones en las que se observaron agregados de QDs, mostraron diferentes grados de apagamiento, lo que refleja la heterogeneidad en el número de nanopartículas en cada agregado. Algunas partículas se distinguieron en forma individual ya que presentaban un mismo nivel de señal y mostraban el fenómeno de “blinking”.

5.4 CONCLUSIONES

La aplicación de diheteroariltenos como aceptores programables de FRET ha sido demostrada previamente^{17,20}. La fotoreversibilidad del aceptor fotocromico provee

ventajas en cuanto a las determinaciones cuantitativas de FRET, en condiciones repetitivas y en situaciones donde la relación estequiométrica donante/aceptor es desconocida, como suele ocurrir en la mayoría de los experimentos biológicos llevados a cabo en microscopía. Las determinaciones cíclicas permiten la evaluación continua de sistemas *in vivo* durante períodos de tiempo prolongados. En nuestro laboratorio se han desarrollado diheteroariltenos con características espectroscópicas mejoradas, como mayores rendimientos cuánticos de fotoreversión, así como también la obtención de fotoconversiones con luz azul, lo que evita la exposición del espécimen vivo a los potenciales efectos fototóxicos de la irradiación UV²¹.

En este estudio hemos extendido el uso de la metodología de pcFRET, utilizando Quantum dots como donantes y la hemos aplicado por primera vez en microscopía. En un trabajo reciente¹⁹ se utilizó un interruptor fotocromico de QDs, basado en el sistema espiropirano-merocianina cuyas propiedades son claramente inferiores a las de los diheteroariltenos. Estos últimos tienen la capacidad de realizar más de 10^4 ciclos de fotoconversión sin sufrir fatiga. Esta característica es fundamental en la aplicación del método en el estudio de sistemas dinámicos donde se realizan determinaciones continuas, como por ejemplo, células vivas.

Finalmente, aunque la motivación principal del estudio fue el desarrollo de sondas para biomoléculas y estructuras celulares, la tecnología “QD-pcFRET” constituye una variante interesante en otras áreas como el desarrollo de dispositivos para memoria óptica de alta densidad.

5.5 PARTE EXPERIMENTAL

5.5.1 Quantum dots como donantes de FRET

Los Quantum dots (QD) QD525, QD565, QD585, QD605 y QD655 conjugados a estreptavidina fueron provistos por QDC, Quantum Dot Corporation (Hayward, CA, USA). Según el fabricante las dimensiones de las nanopartículas determinadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) son: QD525: esférico, 3-4 nm de diámetro, QD585: esférico, 5,3 nm de diámetro, QD605: esférico con ejes mayor y menor de 9,4 y 4 nm, respectivamente. Por determinación con técnicas de cromatografía de exclusión los diámetros de los QDs conjugados (QD + capa pasivante de ZnS + capa hidrofílica TOP/TOPO trioctilfosfina/óxido de trioctilfosfina + capa de conjugación AMP amina poliacrílica) es de 13,4 nm para el QD585 y 15,3 nm para QD605. El fluoróforo Alexa Fluor 594-biotina (Alexa594[®]) fue provisto por Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Espectroscopía en estado estacionario: se utilizó un espectrofluorómetro Photon Technology International (PTI) C60 y un equipo Cary Eclipse. Los espectros de anisotropía fueron adquiridos con polarizadores de excitación y emisión en configuraciones vertical-vertical (*VV*) y vertical-horizontal (*VH*). El factor de corrección instrumental *G* se determinó a partir de la misma muestra con los polarizadores en configuración horizontal-vertical (*HV*) y horizontal-horizontal (*HH*). La anisotropía, *r*, está dada por¹³:

$$r = \frac{VV - G.VH}{VV + 2G.VH}; \quad G = \frac{HV}{HH} \quad 5.9$$

Espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo: los tiempos de vida media de fluorescencia se tomaron en un espectrofluorómetro PTI Time Master equipado con un láser de colorante bombeado por un láser de N₂ como fuente de excitación y un monocromador de emisión. Se utilizó una solución de sílica gel en agua como muestra dispersa.

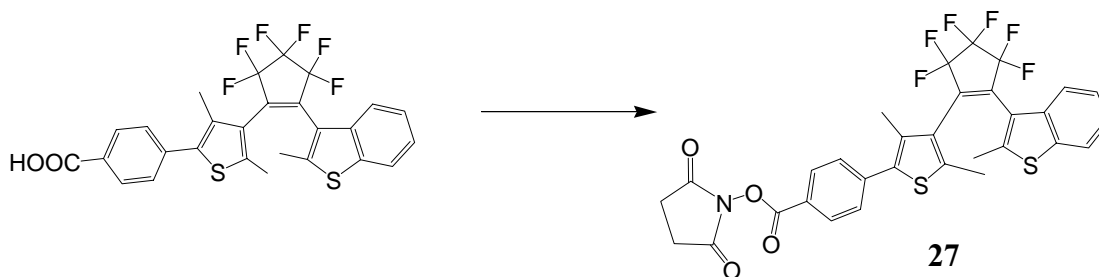
Microscopía de fluorescencia: una solución 2 nM de QD605 en el buffer de dilución provisto por QDC, se incubó por 5 minutos sobre cubreobjetos biotinilados. Luego se lavaron con agua y se montaron en un portaobjeto. Los QDs inmovilizados en la superficie del vidrio fueron analizados con un microscopio de fluorescencia confocal Carl Zeiss LSM310 provisto de un láser de argón de 488 nm y un láser de diodos de 408 nm. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite de 63X AN 1,4. La emisión se colectó a través de un filtro pasabanda de 580-650 nm. El plano de polarización de la excitación se hizo rotar con un compensador Soleil-Babinet. Las componentes ortogonales de la emisión fueron separadas y colectadas simultáneamente con dos detectores PMT. Se generó una señal superpuesta, a la que se asignaron los colores rojo y verde para la polarización paralela y perpendicular, respectivamente. El factor de corrección instrumental se midió con una solución de fluoresceína en agua, despolarizada en virtud de una rápida difusión rotacional ($\phi \ll \tau$)²².

Titulación: una solución de QD585-estreptavidina 2 nM se preparó a partir del stock comercial en el buffer de dilución provisto por QDC. La misma se tituló con cantidades crecientes de Alexa594-biotina tomándose el espectro de emisión del QD a $\lambda_{exc} = 370$ nm en un espectrofotómetro Cary Eclipse. Los espectros tomados fueron corregidos por el factor de dilución, la excitación directa del aceptor (para minimizar este factor, se eligió una λ_{exc} en la zona de mínima absorbancia del aceptor) y posteriormente deconvolucionados a fin de separar las señales características del donante QD585 y del aceptor Alexa594. La deconvolución se realizó suponiendo una superposición lineal de las intensidades de fluorescencia del donante y del aceptor.

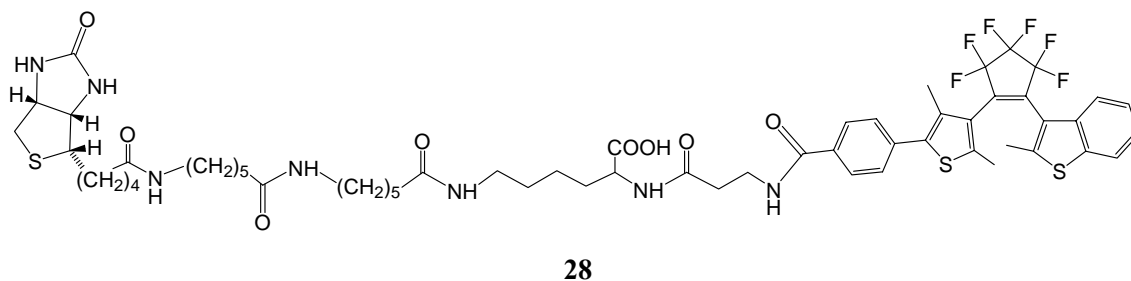
5.5.2 pcFRET en el par QD565-DAE

Biotina-PEO-LC-Amina fue provista por Pierce (USA). *N*, *N'*-diciclohexilcarbodiimida y *N*-hidroxisuccinimida fueron provistas por Fluka Chemie (Buchs, Suiza). El compuesto fotocromico DAE fue previamente reportado¹⁷.

Compuesto 27. 10 mg (0,016 mmol) de DAE se hicieron reaccionar con 4 mg (0,020 mmol) de DCC y 2 mg (0,017 mmol) de NHS en 3 ml de acetonitrilo seco a temperatura ambiente por 2 hs. Se filtró la dicitclohexilurea y **27** fue evaporado en vacío.



Compuesto 28. 16 mg de Biotina-PEO-LC-amina (32 μmol) se disolvieron en 100 μL de acetonitrilo seco y se hicieron reaccionar con 32 μmol del compuesto **27** disuelto en 200 μl de acetonitrilo por 12 hs a temperatura ambiente en presencia de 10 μl de trietilamina. El producto se obtiene como un precipitado blanco que se filtra. Se caracterizó por EMAR-ESI: (M + H): 1204,4550, $\text{C}_{58}\text{H}_{71}\text{O}_8\text{F}_6\text{N}_7\text{S}_3$: 1203,4430.



Espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario: se llevó a cabo en un espectrofluorómetro SLM 8000S (Urbana, IL) o en un Perkin Elmer LS50B (Boston, MA) a temperatura ambiente.

Espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo: los tiempos de vida fueron determinados según el método TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) en un sistema Horiba Jobin Yvon IBH (Edison, NJ). La fuente de excitación utilizada fue un

NanoLED N-01 Aqua de 373 nm y el detector TBX-04-A. Se utilizó una solución de sílica gel en agua como muestra dispersa.

Fotoconversiones: La fuente de irradiación utilizada para las fotoconversiones fue una Lumatec Superlite SUV-DC-P, equipada con una lámpara de arco de Hg (200W DC Super Pressure Short Arc Mercury) y salida acoplada por fibra óptica. Dicha fuente cuenta con un selector de tiempo de apertura del mismo y dos filtros de banda ancha que seleccionan entre el visible y el UV. Se utilizó un filtro pasabanda UV (320-380 nm, irradiancia de salida $3,5 \text{ mW cm}^{-2}$) para la fotoconversión hacia la forma cerrada y un filtro verde (510-580 nm, irradiancia de salida 20 mW cm^{-2}) para la reacción de vuelta a la forma abierta.

Microscopía: se utilizó un microscopio de fluorescencia invertida Olympus IX71, equipado con un sistema dual de iluminación: (1) una lámpara de arco de mercurio con selector de filtro ($365 \pm 10 \text{ nm}$, plano focal e irradiancia: $0,13 \text{ mW}$, $0,09 \text{ W cm}^{-2}$; $546 \pm 10 \text{ nm}$, plano focal e irradiancia: 11 mW , 8 W cm^{-2}) y alternativamente (2) una lámpara de arco de xenón + monocromador P130 Optoscan ($450 \pm 15 \text{ nm}$, plano focal e irradiancia: $0,4 \text{ mW}$, $0,03 \text{ W cm}^{-2}$). Para la epi-iluminación se utilizó un filtro dicróico 570 nm y la emisión se colectó con un filtro optimizado para QD565 de $565 \pm 20 \text{ nm}$. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite de 60x AN 1,45. Las imágenes (0,5 seg de exposición) se adquirieron con una cámara Sensicam CCD (PCO, Alemania) en series

de 60 imágenes (exposiciones de 0,5 seg, intervalos de 10 seg) durante la irradiación a 365 y 546 nm.

Las muestras se prepararon sobre micro-cubreobjetos planos de 18 cavidades precubiertos con poli-L-lisina (Integrated Biodiagnostics, Munich, Alemania) que se incubaron con 20 μ l de una solución 1 nM de microesferas magnéticas (DynaBeads) de 2,5 μ de diámetro conjugadas a estreptavidina. Luego de 3 lavados con buffer fosfato salino (PBS) 50 mM, 150 mM NaCl, se incubaron con una solución de 2,6 μ M de bisbiotina por 10 minutos. Se lavó nuevamente y se incubó con 5 μ l QD565-estreptavidina por 10 minutos. Luego de 3 lavados se expuso por 10 minutos con 20 μ l de una solución 2,5 μ M de **28**. Los cubreobjetos fueron sellados sobre el portaobjetos con esmalte incoloro.

5.6 REFERENCIAS

1. Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P. *Science*. 1998, *281*, 2013-2016.
2. Chan W.C.W, Maxwell D.J., Gao X., Bailey R.E., Han M., Nie S. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, *13*, 40-46.
3. Jaiswal J.K., Mattoussi H., Mauro J.M., Simon S.M. *Nat. Biotechnol.* 2003, *21*, 47-51.
4. Wu X., Liu H., Liu J., Haley K.N., Treadway J.A., Larson J.P., Ge N., Peale F., Bruchez M.P. *Nat. Biotechnol.* 2003, *21*, 41-46.

5. Arya H., Kaula Z., Wadhwa R., Tairaa K., Hiranob T., Kaula S.C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, *329*, 1173-1177.
6. Kuno M., Fromm D.P., Hamann H.F., Gallagher A., Nesbitt D.J. *J. Chem. Phys.* 2000, *112*, 3117-3120.
7. Derfus A.M., Chan W.C.W., Bhatia S.N. *Adv. Mater.* 2004, *16*, 961-966.
8. Hanaki K., Momo A., Oku T., Komoto A., Maenosono S., Yamaguchi Y., Yamamoto K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, *302*, 496-501.
9. Rosenthal S.J., Tomlinson, I., Adkins E.M., Schroeter S., Adams S., Swafford L., McBride J., Wang Y., DeFelice L.J., Blakely R.D. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, *124*, 4586-4594.
10. Lidke D.S., Nagy P., Heintzmann R., Arndt-Jovin D.J., Post J.N., Grecco H.E., Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. *Nat. Biotechnol.* 2004, *22*, 198-203.
11. Grecco H.E., Lidke K.A., Heintzmann R., Lidke D.S., Spagnuolo C., Martinez O.E., Jares-Eijman E.A., Jovin T.M. *Microsc. Res. Tech.* 2004, *65*, 169-179.
12. Haugland R.P. *Handbook of fluorescent probes and research products*. 2002, 9th, Molecular Probes. Eugene, OR.
13. Lakowicz J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 1999, 2nd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
14. Leatherdale C.A., Woo W.K., Mikulec F.V., Bawendi M.G. *J. Phys. Chem. B.* 2002, *106*, 7619-7622.
15. Clapp A.R., Medintz I.L., Mauro J.M., Fisher B.R., Bawendi M.G., Mattoussi H. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, *126*, 301-310.

16. Medintz I.L., Clapp A.R., Mattoussi H., Goldman E.R., Fisher B., Mauro J.M. *Nat. Materials*. 2003, 2, 630-638.
17. Giordano L., Jovin T. M., Irie M., Jares-Erijman E. A. *J.Am.Chem.Soc.* 2002, 124, 7481-7490.
18. Jares-Erijman E.A., Giordano L., Spagnuolo C., Kawior J., Vermeij R.J., Jovin T.M. *Proc. SPIE*. 2004, 5323, 13-26.
19. Medintz I. L., Trammell S. A., Mattoussi H., Mauro J. M. *J.Am.Chem.Soc.* 2004, 126, 30-31.
20. Giordano L. *Síntesis de diheteroariltenos fotocromicos y su aplicación como aceptores en transferencia de energía*. Tesis Doctoral, 2006. FCEN, UBA
21. Giordano L., Vermeij R.J., Jares-Erijman E.A. *Arkivoc*. 2005, Part (xii), 268-281.
22. Clayton A.H., Hanley Q.S., Verveer P.J. *J. Microsc.-Oxf.* 2004, 213, 1-5.

Conclusión General

El presente trabajo de tesis se ha focalizado en el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes para microscopía, a partir de moléculas pequeñas, y su aplicación en distintas estrategias de marcación específica de biomoléculas. Por otra parte, se estudió el control de las propiedades ópticas de las nanopartículas fluorescentes Quantum dots.

El trabajo involucró la síntesis de las sondas, el estudio de sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas y su aplicación en sistemas biológicos, a fin de validar su utilidad.

En primer lugar, se estudiaron las características y propiedades de los fluoróforos precursores (análogos fluorados de la fluoresceína) que se utilizaron como moléculas de partida para la obtención de las sondas biarsenicadas para marcación específica (Capítulo 1). Por medio de distintos experimentos, basados en técnicas de espectroscopía UV/Vis, de fluorescencia y de fotólisis de destello inducida por láser (fotólisis flash), hemos determinado el rendimiento cuántico de triplete, el tiempo de vida del triplete y el tiempo de vida de fluorescencia. El análisis de estos estudios nos llevó a postular que la alta fotoestabilidad observada en los análogos fluorados de la fluoresceína respecto de ésta, es consecuencia de una menor reactividad hacia el oxígeno en el estado excitado a partir del cual ocurren las reacciones de fotoblanqueo.

También se abordó el estudio teórico de los espectros de absorción y emisión de estos fluoróforos, por métodos de primeros principios. Basandonos en la adecuada correlación entre los espectros calculados y experimentales, se pudo establecer que el método TDDFT (Time Dependent Density Functional Theory) resultó adecuado para el estudio de las transiciones electrónicas en este tipo de moléculas. Esto es importante ya

que provee una herramienta de predicción de las propiedades espectrales de una molécula, muy útil para el futuro diseño de las mismas.

En el capítulo 2 se describieron la síntesis y las propiedades fotofísicas de dos nuevas sondas fluorogénicas para la aplicación en la metodología de marcación específica sonda biarsenicada-motivo tetracisteína. Los compuestos F2FlAsH-EDT₂ y F4FlAsH-EDT₂ se obtuvieron a partir de una secuencia de mercuriación-transmetalación con arsénico. El compuesto F2FlAsH-EDT₂ una vez unido al péptido blanco, forma un complejo con mejores propiedades que las del compuesto original, FlAsH: alto coeficiente de extinción molar, alto rendimiento cuántico de fluorescencia y alta fotoestabilidad. El derivado F4FlAsH mostró características similares al compuesto original, pero al igual que F2FlAsH sus espectros de absorción y de emisión son muy poco sensibles a los cambios de pH en el rango fisiológico. Además su máximo de emisión (544 nm) se ubica entre el de FlAsH (530 nm) y el de ReAsH (608 nm), estableciéndose como un nuevo color en la familia de sondas biarsenicadas.

También hemos estudiado la aplicación del método TDDFT en la predicción de los espectros de absorción de este tipo de compuestos con resultados aceptables basandonos nuevamente en la coincidencia entre los espectros calculados y experimentales.

Otro aspecto abordado fue un estudio cinético para lograr obtener información sobre el mecanismo de formación del complejo sonda bisarsenicada-motivo tetracisteína. A través del análisis de la cinética de la reacción se propuso un mecanismo disociativo para este proceso de unión, *in vitro*.

Una vez caracterizado el sistema con las nuevas sondas, se procedió al estudio de distintas aplicaciones de las mismas, *in vitro* e *in vivo* (Capítulo 3).

Hemos dirigido el estudio hacia la aplicación de estas sondas fluorogénicas en experimentos de transferencia de energía de resonancia (FRET) y en particular, a la metodología de pcFRET (photochromic FRET). Este método aprovecha las propiedades de los compuestos fotocromicos diheteroariltenos actuando como aceptores de energía. El fundamento es la modulación de la fluorescencia del donante por transformaciones cíclicas entre los isómeros del aceptor fotocromico.

Se demostró la alta eficiencia del proceso de pcFRET en un sistema en el que el donante es el complejo FAsH-peptido tetracisteína y el aceptor es un compuesto fotocromico. También se estudió el proceso en el par F2FAsH-F4FAsH (donante-aceptor, respectivamente) para el cual se calculó un valor de R_0 (distancia crítica de Förster) mayor que el del par FAsH-ReAsH.

En cuanto a las aplicaciones para marcación *in vivo*, se determinó que el nuevo compuesto F2FAsH es capaz de lograr una mejora en la luminosidad y en la fotoestabilidad, respecto de FAsH, en experimentos de marcación de la proteína α -sinucleína en células vivas de la línea HeLa, visualizadas por microscopía de fluorescencia confocal. Además, se comprobó la utilidad de estas sondas en experimentos de transferencia de energía resuelta en el tiempo, llevados a cabo en el microscopio con la técnica de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging), realizando marcaciones específicas en células vivas. Las propiedades encontradas para estas sondas facilitarán el estudio de la estructura y dinámica de las proteínas en células vivas.

Otro tipo de sondas para marcación específica preparadas en esta tesis (Capítulo 4) son aquellas en las que se introduce la función tioéster en su estructura. Con esta modificación, estas moléculas pueden participar de la reacción de unión química nativa (NCLR, native chemical ligation reaction) en presencia de un péptido o proteína con un residuo de cisteína en el extremo amino terminal. La caracterización de la reacción *in vitro* se llevó a cabo con un péptido modelo, por técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masa. Los compuestos preparados fueron utilizados en la aplicación de esta metodología en células de mamíferos *in vivo* por primera vez. Con esta aplicación se logró validar una nueva técnica de modificación genética en células eucariotas para obtener extremos cisteína-N-terminal en una proteína de interés.

Como parte del estudio sobre el control de las propiedades ópticas de una sonda dada, hemos trabajado con las nanopartículas fluorescentes Quantum dots como donantes en procesos de transferencia de energía de resonancia (FRET) (capítulo 5).

Se estudiaron sus propiedades espectroscópicas y su aplicación en el estudio de distintos sistemas biológicos. Luego se caracterizaron los quantum dots como donantes de FRET utilizando un fluoróforo orgánico como aceptor. Se obtuvieron altos valores de eficiencia del proceso de FRET en este par. A partir de estos resultados, se evaluó un sistema en el que el aceptor es un compuesto fotocromico de la familia de los diheteroariletanos. La transferencia de energía del par estudiado resultó también en un valor alto de eficiencia para la forma cerrada del diariletano, mientras que la forma abierta dio lugar a eficiencias muy bajas, tanto en estudios por espectroscopía como en

el análisis realizado en el microscopio de fluorescencia. De este modo, se logró encender y apagar la emisión de las nanopartículas y por primera vez se lograron imágenes de ese fenómeno. Se pueden diseñar distintos dispositivos de este tipo, combinando los Quantum dots con el aceptor adecuado, según el análisis de la integral de solapamiento espectral (J) y la distancia crítica de Förster (R_0). Estos sistemas permitirían la individualización de la marca en una configuración multidetección y a lo largo del tiempo.

El trabajo descrito ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Improved photostable FRET-competent biarsenical-tetracysteine probes based on fluorinated fluoresceins.

Carla C. Spagnuolo, Rudolph J. Vermeij and Elizabeth Jares-Erijman.

Journal of the American Chemical Society, **2006**, 128, (37), 12040-12041.

Imaging Quantum Dots Switched On and Off by Photochromic Fluorescence Resonance Energy Transfer (pcFRET).

Elizabeth Jares-Erijman, Luciana Giordano and Carla Spagnuolo; Keith Lidke and Thomas M. Jovin

Molecular Crystals and Liquid Crystals, **2005**, 430, 257-266.

Ensemble and Single Particle Photophysical Properties (Two-photon Excitation, Anisotropy, FRET, Lifetime, Spectroconversion) of Commercial Quantum Dots in Solution and on/in Live Cells.

H.E. Grecco, K.A. Lidke, R. Heintzmann, D.S. Lidke, C. Spagnuolo, O.E. Martinez, E.A. Jares-Erijman, and T.M. Jovin.

Microscopy Research and Technique **2004**, *65*, 169-179.

Novel (bio)chemical and (photo)physical probes for imaging living cells.

Jares-Erijman, E.A., Spagnuolo, C., Giordano, L., Etchehon, M., Kawior, J., Mañalich-Arana, M.V., Bossi, M., Lidke, D.S., Post, J.N., Vermeij, R.J., Heintzmann, R., Lidke, K.A., Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M..

Supramolecular Structure and Function 8 (Ed. G. Pifat-Mrzljak), **2004**, Kluwer Academic, Holanda,