

GUIA DE PROBLEMAS DE FLUORESCENCIA:

1. Se registraron espectros de emisión de fluorescencia a 2 longitudes de onda de excitación diferentes de una mezcla equimolar de 2 compuestos obteniéndose los resultados observados en la Figura 1. La figura 2 muestra los espectros de absorción de muestras de igual concentración de los componentes puros

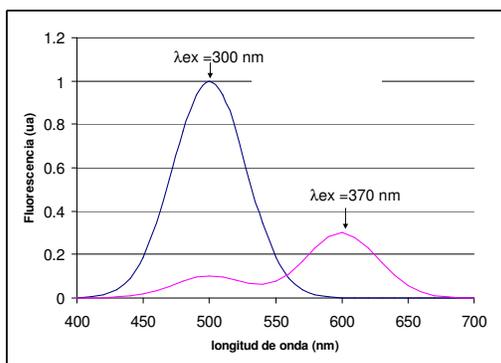


Figura 1

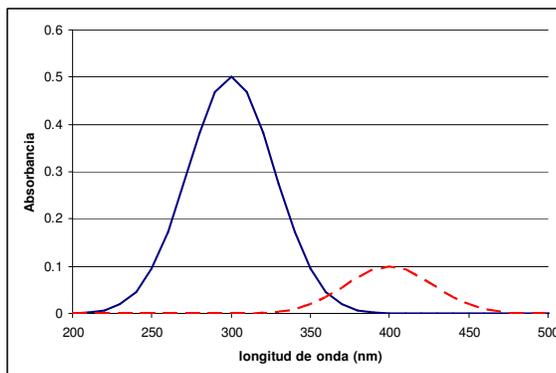
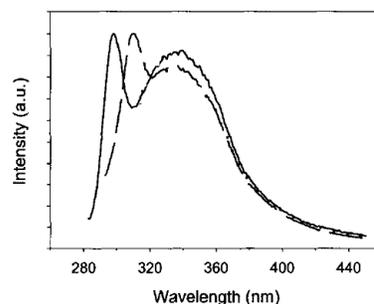


Figura 2

- a) Identificar cada uno de los picos del espectro de emisión y explicar las variaciones en intensidad observadas a las 2 λ_{ex} . Indicar suposiciones
 - b) Graficar cualitativamente los espectros de excitación que se obtendrían utilizando $\lambda_{em} = 600 \text{ nm}$ y 550 nm .
 - c) Graficar el espectro de emisión a $\lambda_{ex}=400 \text{ nm}$. Discutir la intensidad relativa de los picos observados respecto a los espectros observados en la figura 1
2. La siguiente figura muestra el espectro de emisión de albúmina bovina obtenido a distintas longitudes de onda de excitación. Explicar la forma del espectro obtenida y los cambios observados (Jameson, Meth Enzymol 360, 2003).



Scans of $\sim 3 \times 10^{-8} M$ bovine serum albumin
excited at 270 nm (solid line), 280 nm (dashed line)

3. Se ha aislado una proteína que contiene un único residuo triptófano. Para estudiar ciertas propiedades estructurales de la proteína, se utiliza la sonda dinitrofenol (DNP), la cual se une en el sitio activo. El espectro de absorción del DNP solapa con el espectro de emisión del residuo triptófano. Suponga $R_0 = 50 \text{ \AA}$ y que la molécula de DNP no es fluorescente. Las intensidades de fluorescencia de la proteína son 20.5 y 4.1 en ausencia y en presencia de DNP respectivamente.

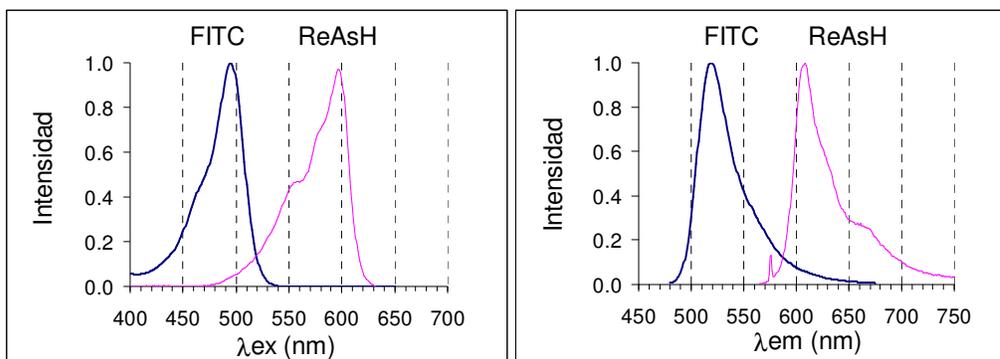
- a) Determinar la eficiencia de la transferencia de energía.

- b) Si el tiempo de vida del residuo triptofano en ausencia de DNP es 5 ns, indique cuál es el tiempo de vida esperado en presencia de DNP?
- c) Determinar la distancia entre triptofano y DNP.
- d) Suponga que cambia la distancia entre D y A, siendo $R = 20 \text{ \AA}$.Cuál será la intensidad de fluorescencia del triptofano?
4. Se quiere estudiar la asociación de dos proteínas A y B. La proteína A tiene un único triptofano en la interfaz, mientras que la B no tiene residuos aromáticos. Es posible estudiar la interacción mediante espectroscopía de fluorescencia? Qué cambios esperaría observar en la fluorescencia de la proteína A durante la asociación?
5. Se quiere determinar si dos proteínas A y B interactúan. Para ello, se marca la proteína A con la sonda fluorescente FITC en una relación 1:1 (moles de sonda a moles de proteína) y la proteína B con la sonda fluorescente ReAsH, también en relación 1:1. Posteriormente se mezclan ambas proteínas marcadas hasta las concentraciones indicadas en la siguiente tabla y se mide la fluorescencia de la muestra resultante utilizando $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$ obteniéndose los siguientes resultados:

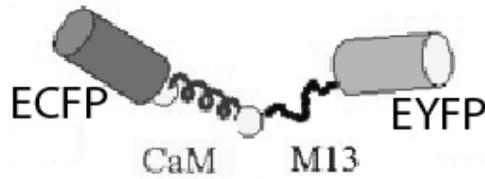
Muestra	[A-FITC] (μM)	[B-ReAsH] (μM)	Intensidad a $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$	Intensidad a $\lambda_{em} = 620 \text{ nm}$
1	1	0	3.00	0.02
2	1	1	1.81	0.33
3	1	2	1.12	0.54
4	1	3	0.95	0.63

- a. Existe asociación entre ambas proteínas? Justificar explicando cualitativamente los resultados obtenidos en la tabla.
- b. Que pasaría si a la muestra 4 le agrega proteína B sin marcar? Grafique esquemáticamente los espectros de emisión obtenidos antes y después del agregado.

Datos:

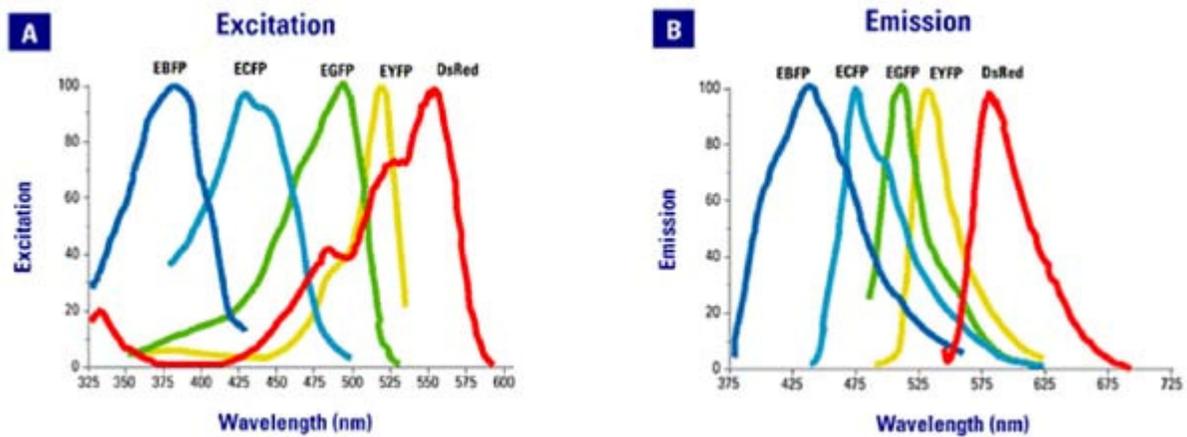


6. Para medir Ca^{2+} en células vivas, se puede expresar la proteína de fusión “camaleón” esquematizada en la siguiente figura:



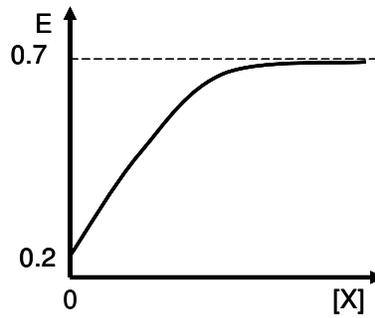
ECFP= cyan fluorescent protein, EYFP= Yellow fluorescent protein, CaM = calmodulina, M13= péptido que une calmodulina en presencia de Ca^{2+} .

- Graficar en forma aproximada los espectros de emisión a $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$ que esperaría medir para camaleón en ausencia y presencia de una alta concentración de Ca^{2+} . Justificar
- Funcionaría este sensor usando BFP y CFP? Qué parámetros instrumentales debería modificar para usar este sensor alternativo en un espectrofluorómetro? Justificar
- Grafique esquemáticamente la fluorescencia de camaleón en función de la concentración de Ca^{2+} . En base a este gráfico discuta si el sensor puede ser usado para medir Ca^{2+} en cualquier rango de concentraciones.



- Se quiere estudiar la función de una proteína compuesta por dos subunidades A y B. Para ello se marca la subunidad A con la sonda fluorescente fluoresceína y la subunidad B con tetrametilrodamina (TMR) y se mezclan ambas subunidades marcadas estequiométricamente obteniéndose la muestra M.

Para estudiar la interacción de la proteína A-B con un péptido X, se adiciona a la muestra M cantidades crecientes del péptido y se mide la eficiencia de la transferencia de energía luego de cada agregado. Los resultados obtenidos son los siguientes:



- a. Representar esquemáticamente
- el espectro de emisión de la muestra M excitando a 450 nm, en ausencia de X
 - el espectro de emisión de la muestra M excitando a 540 nm, en ausencia de X
 - espectro de excitación de la muestra M utilizando $\lambda_{em} = 600$ nm, en ausencia de X
- b. Calcular la distancia donador-aceptor antes del agregado de péptido X.
 c. Plantear una hipótesis que justifique los resultados obtenidos.
 d. Indicar qué resultados esperaría encontrar si en lugar de agregar péptido X agrega proteína B sin marcar.

Justificar todas las respuestas

Datos: R_0 fluoresceína-TMR = 55 Å.

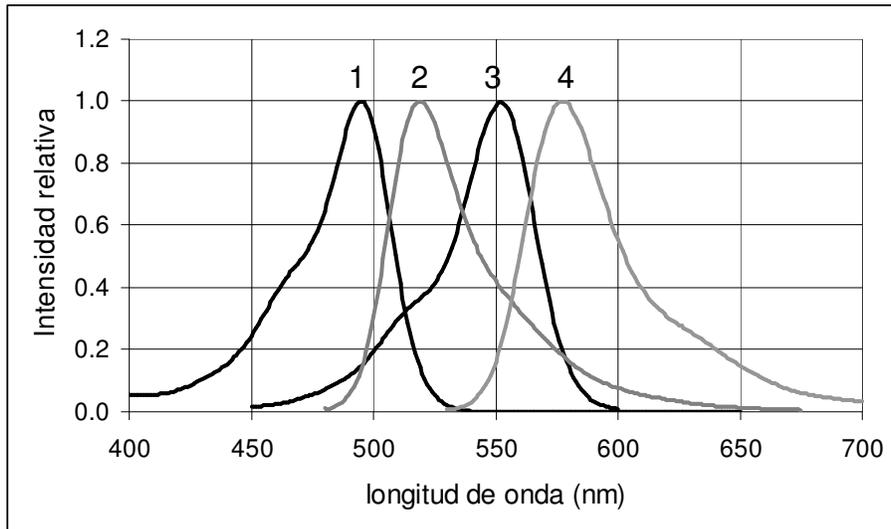
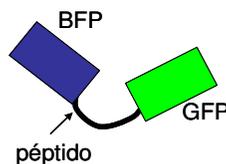
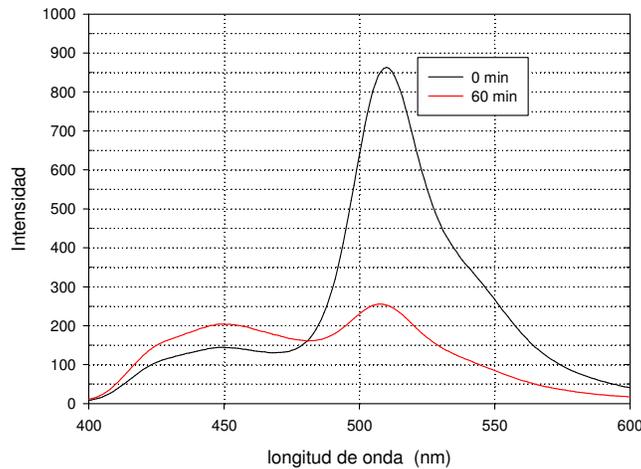


Figura: Espectros de excitación y emisión de fluoresceína (1 y 2 respectivamente) y espectros de excitación y emisión de TMR (3 y 4 respectivamente).

8. Se quiere estudiar la función de una proteasa que corta en una secuencia de aminoácidos específica. Para ello se construye la siguiente proteína:



En la siguiente figura se muestra el espectro de emisión de la proteína antes (0 min) y luego de 1 h de incubación con la proteasa (60 min), momento a partir del cual el espectro no presenta más cambios.



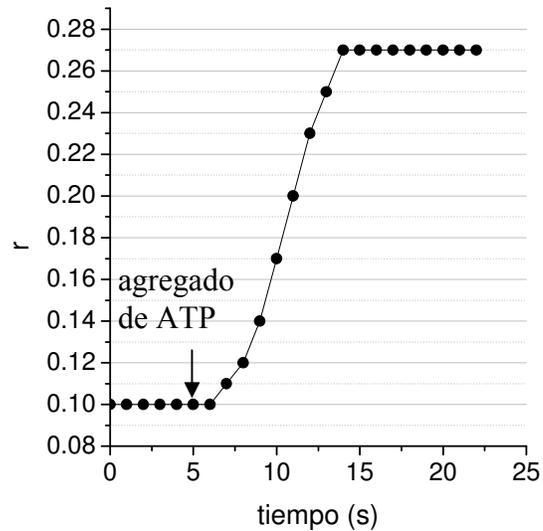
- Qué longitud de onda de excitación se habrá utilizado para tomar los espectros? (Usar los espectros del problema 6).
- Explicar los cambios observados entre los espectros antes y después de la incubación.
- Estimar la distancia entre las proteínas fluorescentes antes de la proteólisis.
Dato: $R_0 = 4.1 \text{ nm}$

9. Se quiere estudiar la cinética del corte de ADN para una enzima de restricción dependiente de Ca^{2+} utilizando como técnica anisotropía de fluorescencia. Se cuenta con un oligonucleótido doble cadena, conteniendo la secuencia específica de reconocimiento, unido a una sonda fluorescente en una de sus hebras. Haga un gráfico indicando los valores relativos de anisotropía que esperaría para:

- Oligonucleótido marcado en solución
- Oligonucleótido marcado + enzima de restricción
- Oligonucleótido marcado + enzima de restricción + Ca^{2+}
- Todo lo anterior + una DNAsa inespecífica

¿Qué condición (a-d) elegiría para estudiar la cinética de corte específico?

10. Se quiere estudiar la cinética de fosforilación de la proteína Compactina. Para ello, se marca la proteína con la sonda fluorescente fluoresceína y se mide la anisotropía de esta sonda unida a la proteína en función del tiempo obteniéndose los siguientes resultados:



- Explique los resultados obtenidos en base a un modelo estructural sencillo de la proteína fosforilada y sin fosforilar.
- Calcular la variación de volumen de Compactina producida por la fosforilación
- Si la fosforilación de la proteína induce una posterior dimerización lenta de la misma, que cambios esperaría observar en el gráfico?
- Podría haber utilizado la sonda fluorescente pireno en lugar de fluoresceína para este estudio?

Datos $\tau_{FITC} = 4 \text{ ns}$; $\tau_{pireno} = 100 \text{ ns}$; $\eta = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$; $T = 298 \text{ K}$; $r_o = 0.4$

RESPUESTAS NUMÉRICAS

3- a) 0,8 b) 1 ns c) 39,7 Å d) 0.08

7-b) 69,3 Å

8-c) 49,2 Å