

**SIMPOSIO 13.
NUEVAS TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO
DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

MEDICINA (Buenos Aires) 2004; 64 (Supl. II): 57-59

APLICACIONES NO CRISTALOGRÁFICAS DE LA RADIACIÓN SÍNCROTRON

MARCELO CEOLÍN

Centro Regional de Estudios Genómicos, AUGM-UNLP. Av. Calchaquí, Km 23,5 (1888) Florencio Varela, Argentina.

En las últimas dos décadas el uso de la radiación síncrotron a cobrado un creciente interés dentro de la comunidad biomédica.

Las características espectrales de la radiación síncrotron (alta potencia y colimación, brillo, espectro continuo, control de la polarización de la radiación, etc.) la convierten en una poderosa herramienta para el estudio estructural y espectroscópico de sistemas biológicos.

La cristalografía de biomoléculas constituye sin dudas la aplicación más extendida de la radiación síncrotron al estudio de sistemas biológicos. La alta intensidad y brillo de las fuentes de luz permiten la obtención de estructuras cristalinas con resoluciones atómica en forma casi rutinaria. Sin embargo, su utilidad se ve limitada por la necesidad de obtener monocristales libres de defectos lo cual limita considerablemente su utilización generalizada.

Más aún, una multitud de procesos biológicos (folding, agregación, etc.) ocurren en condiciones donde la obtención de monocristales es imposible. Es en estas circunstancias donde otras técnicas asociadas al uso de la radiación síncrotron, han demostrado su enorme potencial para la caracterización estructural y espectroscópica y termodinámica de biomoléculas. Aquí se presentará una breve reseña de los fundamentos y alcances de dos de estas técnicas.

Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

En su ya clásico trabajo Guinier y Fournet demostraron que inhomogeneidades en la densidad local de electro-

nes producen la dispersión de un haz de radiación que incide sobre esa región del espacio. El análisis de la distribución espacial de la radiación dispersada permite la caracterización estructural de dichas inhomogeneidades. Así, la dispersión de rayos X de moléculas de interés biológico permite obtener información sobre el arreglo tridimensional de la molécula, los cambios conformacionales inducidos por la interacción con ligandos, componentes del solvente o con otras biomoléculas u originados en la acción de temperatura o presión.

Absorción de rayos-X (XAS).

Más del 50% de las proteínas o enzimas de cualquier organismo unen metales a su estructura mediante interacciones no-covalentes. Estos metales cumplen diversas funciones que van desde el transporte de electrones hasta la estabilización estructural de la proteína anfitriona. La caracterización de la estructura local y las propiedades electrónicas del sitio metálico pueden ser estudiadas a partir de la obtención de espectros de absorción de rayos X en las cercanías de los bordes de absorción de cada metal. Estos espectros poseen características distintivas propias de las distribuciones de densidad de carga entre el metal y sus ligandos y presentan patrones de interferencia sobre impuestos que contienen información a cerca de la distribución radial de ligandos.

EXCITATION-CONTRACTION COUPLING AT THE WHOLE HEART LEVEL

ARIEL L. ESCOBAR

Department of Physiology. School of Medicine. Texas Tech University, Health Sciences Center. Lubbock. Texas

In cardiac research, single-cell experimental models have been extensively used to study the molecular mecha-

nisms of intracellular Ca²⁺ homeostasis. The results of these studies are usually extrapolated to the tissue level

assuming that the phenomena studied at the cellular level are either similar in the intact organ, or only slightly modified by variables that exist at the whole-heart level. The validity of these assumptions has rarely been confirmed experimentally. Nevertheless, in the heart the cardiac cells are electric and metabolically coupled and preserve extra-cellular matrix proteins that regulate sympathetic and parasympathetic responses. Moreover, the propagation of signal between different regions of the heart and the relation between the cytosolic Ca^{2+} with the cardiac function (ventricular pressure and stroke volume) can only be studied at the whole organ level

Common obstacles associated with the study of intracellular Ca^{2+} signals in beating hearts include motion artifacts and spatio-temporal limitations of the recording system. In this work, action potentials and intracellular Ca^{2+} signals were measured in beating hearts from young rats, with spatio-temporal resolutions similar to cellular studies using a novel pulsed local-field fluorescence microscopy, pulsed LED local field fluorescence microscopy and whole heart confocal microscopy. The local field methods are based on epi-illumination through a small optical fiber. The fluorescence emission of the

indicator molecules was synchronized with brief (<1 ns), high-power (400 W) laser pulses or 20 us light pulses coming from a high power LED, the photons were integrated and the common mode noise of the fluorescence signal was differentially cancelled. To follow rapidly evolving signals, a highly sensitive and fast detection system was used. The spatial resolution was improved using a small (50-400 μ m diameters) multimode fiberoptic. Mechanical artifacts were effectively reduced by inserting the fiberoptic into a «floating» glass micropipette sealed to the heart wall by negative pressure. Our results demonstrate that local-field fluorescence microscopy offers an outstanding experimental approach for studying physiological signals at the whole-organ level with the high spatio-temporal resolution common to normal cellular approaches. Moreover, some key features of subepicardial and subendocardial aspects of mice cardiac excitation contraction coupling were defined during the heart development and in genetically modified transgenic animals. Finally, we think that this experimental approach to will allow us integrates cellular and sub-cellular phenomena defined in isolated cells into the behavior of the intact cardiac tissue.

LAS MÚLTIPLES CARAS DE FRET

**THOMAS M. JOVIN¹, DIANE LIDKE¹, PETER NAGY¹, BERND RIEGER¹; Y ELIZABETH JARES ERIJMAN²,
LUCIANA GIORDANO², CARLA SPAGNUOLO², MARIA JULIA ROBERTI^{1,2}**

¹ *Departamento de Biología Molecular, Instituto Max Planck de Química Biofísica, Goettingen, Alemania);*

² *Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires*

La transferencia resonante de energía de un donante fluorescente a un aceptor cercano (FRET) es un fenómeno empleado universalmente en estudios de sistemas moleculares debido a la dependencia muy sensible (sexta potencia) de las distancias en el rango de 1-10 nm. La teoría elaborada por Foerster le dio el impulso a las pioneras investigaciones de Gregorio Weber, ilustre bioquímico/biofísico argentino, basadas en la sistemática aplicación de sondas fluorescentes intrínsecas y extrínsecas en sistemas biológicos. FRET permite la determinación de conformación, de interacciones intermoleculares y del microentorno. Nuestros estudios de sistemas de señalamiento en/de células eucariotas utilizan como herramienta clave la microscopía cuantitativa. Hemos implementado FRET-FLIM (determinaciones de vida media) y «homoFRET» (FRET entre fluoróforos idénticos) en sistemas de expresión incorporando proteínas fluorescentes

visibles («VFPs») y el blanco peptídico para compuestos bioarénicos (FIAsH, ReAsH). La meta es elucidar:

- (i) el «donde, cuando, y cómo» de la activación de los receptores de factores de crecimiento, y
- (ii) el estado de asociación de moléculas como alfa-si nucleína involucrada en la enfermedad de Parkinson.

Estamos implementando otros nuevos métodos de FRET utilizando «agotamiento del donante o aceptor» («depletion» FRET) y modulación espectral. Los compuestos fotocromicos son de gran utilidad y han constituido el foco de extensas colaboraciones entre los dos grupos (ver título). De estas actividades han surgido «photochromic FRET» (pcFRET) y un nuevo método para cinética rápida, «pcRelaxationKinetics» (pcRelKin).

NOVEL MULTIMODE MICROSCOPY AND NANOMANIPULATION TOOLS FOR BIOMOLECULAR AND CELLULAR STUDIES

VINOD SUBRAMANIAM

Biophysical Engineering Group, Faculty of Science and Technology, University of Twente, Enschede, The Netherlands

Our group has developed a repertoire of novel enabling technologies combining nanomanipulation, imaging, and spectroscopy to detect, manipulate, and visualize biomolecules.

These tools include:

- the incorporation of fast and sensitive spectral detection capabilities into a confocal single molecule microscope
- the combination of high-resolution atomic force and confocal optical microscopy and spectroscopy with single molecule sensitivity
- the combination of optical and magnetic tweezers to enable stretching and torsion of DNA and chromatin
- the marriage of nanofabrication methodologies and magnetic fields to enable the intracellular manipulation of small magnetic beads
- the use of gold nanoparticles as contrast agents in novel photoacoustic imaging methodologies and for SERS studies
- the combination of optical and Raman imaging and spectroscopy on cells

These platforms are used to address and explore the biophysics of single molecules, molecular assemblies (protein aggregates, protein-DNA complexes, protein-protein complexes), cells, and even tissue *in vivo*. A selection of these technologies and their corresponding applications will be presented.