

Fotooxidación selectiva de metionina, tirosina y triptófano utilizando tionina y azul de toluidina como fotosensibilizadores

J. L. Iborra, F. I. Llorca, R. F. Pastor y J. V. García

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Valencia
Alicante

(Recibido el 11 de febrero de 1977)

J. L. IBORRA, F. I. LLORCA, R. F. PASTOR and J. V. GARCIA. *Selective Photooxidation of Methionine, Tyrosine and Tryptophane Using Thionine and Toluidine Blue as Sensitizers*. Rev. esp. Fisiol., 33, 297-304. 1977.

Thionine and toluidine blue were used as sensitizers on photooxidation processes of methionine, tyrosine and tryptophane. They were more effective than methylene blue.

Methionine was photooxidized to sulfoxide and tryptophane to kinurenine. A tyrosine-sensitizer addition compound was postulated. Dye concentration, pH, temperature and EDTA presence conditions were determined on each one of the modification reactions. Methionine at acid pH was selectively modified.

On the basis of obtained results and published references, a direct interaction of singlet oxygen with methionine and tryptophane and the excited dye with tyrosine was respectively discussed.

La modificación química de un aminoácido libre o formando parte de una proteína, producida por oxidación en presencia de luz visible y un fotosensibiliza-

dor adecuado, es un proceso bien conocido (16, 18) cuyo estudio puede ser muy útil para determinar la relación entre estructura y actividad de una cadena polipeptídica.

Existen numerosos ejemplos de fotooxidación de proteínas por irradiación en disoluciones oxigenadas y en presencia de colorantes fotodinámicos adecuados, tales como el azul de metileno y el rosa de bengala, para modificar los residuos de metionina (14), histidina (19) y demás aminoácidos aromáticos (9). Mediante un control de los parámetros de reacción, se puede hacer que la acción dinámica de

* Abreviaturas:

aa = Aminoácido.

EDTA = Sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético.

$^1\text{O}_2$ = Oxígeno singlete.

$^3\text{O}_2$ = Oxígeno triplete.

^3D = Fotosensibilizador estado triplete.

T = Tionina.

AT = Azul de toluidina.

AM = Azul de metileno.

los fotosensibilizadores sea selectiva sobre un determinado tipo de residuos de aminoácidos (20).

En el presente trabajo se establece la mayor efectividad de los colorantes de la familia de las tiazinas, tionina y azul de toluidina, frente al azul de metileno en procesos de fotooxidación de los aminoácidos tirosina, metionina y triptófano; se han estudiado las condiciones y parámetros que controlan la reacción para conseguir una selectividad en la modificación química de dichos aminoácidos y contribuir al establecimiento de los mecanismos de reacción.

Material y métodos

Los aminoácidos L-tirosina, L-triptófano y L-histidina, bajo la forma de clorhidrato, fueron suministrados por Merck AG, así como los productos sulfóxido de metionina y metionil sulfona. L-metionina por la firma Fluka y kinurenina por Sigma. Los colorantes tionina, azul de metileno y azul de toluidina y demás reactivos utilizados en el presente trabajo fueron todos de la firma Merck AG, de grado analítico y se emplearon sin purificarlos previamente.

PROCEDIMIENTO DE FOTOOXIDACIÓN. Las fotoreacciones se realizaron en un baño de agua de paredes transparentes, con un control de temperatura de $\pm 0,1^\circ \text{C}$. Los recipientes de reacción (tubos de ensayo Pirex de $12,5 \times 1,5$ cm) se iluminaron, a una distancia de 20 cm, mediante dos lámparas de incandescencia de luz blanca de 300 W, colocadas una a cada lado de las paredes transparentes del baño.

Cada ensayo de fotooxidación, mientras no se especifique lo contrario, se preparó mezclando 2 ml de la disolución de aminoácido 1×10^{-3} M y 4 ml del medio de reacción. Al mismo tiempo se realizaron los correspondientes ensayos de referencia sin colorante, aminoácido, oxígeno, ni luz, respectivamente, a una temperatura de $37 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

Los medios de reacción ensayados fueron los siguientes: ácido acético del 10 al 90 %, tampón acetato 0,2 M de pH 5,6, tampón fosfato 0,2 M de pH 8,4 e hidróxido sódico 10^{-3} M.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS Y PRODUCTOS DE FOTOOXIDACIÓN. Para la caracterización de aminoácidos y productos de fotooxidación se utilizó la cromatografía en capa fina, soporte Gel de Silice G, tipo 60, espesor de capa 0,25 mm. Se empleó como eluyente en la separación la mezcla n-butanol/ácido acético/agua (80/20/20; v/v/v). Las placas fueron reveladas con disolución de ninhidrina-colidina. La identificación de los productos de reacción se llevó a cabo por medidas de los Rf y su comparación con los Rf de patrones de estos productos.

Asimismo, los aminoácidos triptófano, tirosina y sus productos respectivos de fotooxidación que absorben en la zona ultravioleta del espectro se caracterizaron mediante un espectrofotómetro Beckman DB-GT de doble haz con registrador sincronizado. Los espectros diferenciales, en el caso particular de la tirosina, se realizaron por comparación de la absorbancia de una muestra fotooxidada a un determinado tiempo frente a una misma muestra no fotooxidada.

La determinación cuantitativa de metionina se realizó por la modificación de BOLLING al método del nitroprusiato sódico de McCARTHY y SULLIVAN (17).

La tirosina no fotooxidada se determinó mediante el método de GERNGROSS-HERFETT (17).

Para determinar el triptófano residual se utilizó la modificación del procedimiento de GRAHAM (17) y la disminución de la absorbancia a 280 nm.

Resultados

La figura 1 muestra la mayor efectividad de los colorantes ensayados, tionina y azul de toluidina, en comparación con

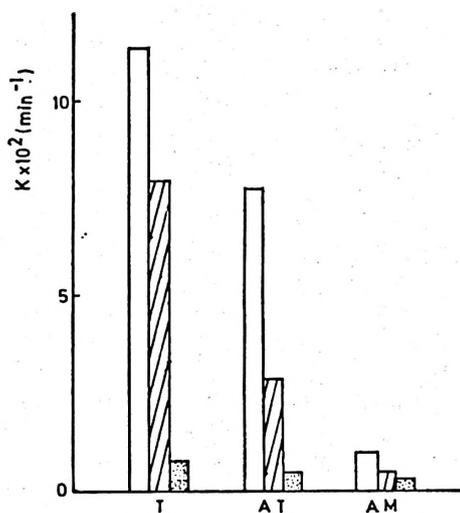


Fig. 1. Constantes de velocidad de primer orden de las fotooxidaciones con luz y oxígeno, a 37° C, utilizando como colorantes tionina, azul de toluidina y azul de metileno, cada uno de ellos a 10⁻⁴ M.

■ Tirosina 2 × 10⁻³ M en tampón acetato 0,2 M, pH 5,6. □ Triptófano 4 × 10⁻³ M en ácido acético 90 %, pH 1,5. ▨ Metionina 1 × 10⁻³ M en ácido acético 10 %, pH 2,5.

el azul de metileno en las fotooxidaciones de metionina, tirosina y triptófano. Esta efectividad se expresó en función de los valores de las constantes de velocidad de dichas fotooxidaciones al pH al que se observó la máxima velocidad de reacción para cada aminoácido. Las constantes de velocidad se calcularon, representando gráficamente los logaritmos de las concentraciones de los aminoácidos, determinadas a distintos tiempos de fotooxidación, entre 0 y 60 minutos, cada 5 minutos, y se calcularon, por mínimos cuadrados, los valores de las pendientes de las rectas así obtenidas.

Aminoácidos de carácter nucleofílico tales como histidina y cisteína son susceptibles de modificación frente a estos colorantes. Y así el aminoácido histidina también se modificó totalmente en 30 minutos al ser fotooxidado en presencia de

tionina o azul de toluidina a pHs comprendidos entre 5,6 y 11, no estudiándose los productos de fotooxidación. En el caso de la cisteína se observó una reacción oscura de oxidación de cisteína a cistina, independiente de la fotooxidación del aminoácido.

En la figura 2 se han expresado los valores de las constantes de velocidad de primer orden en función del pH de reacción para los aminoácidos objeto de estudio. Se observó que el aminoácido metionina se fotooxidó en todo el entorno de pH, mostrando un mayor grado de trans-

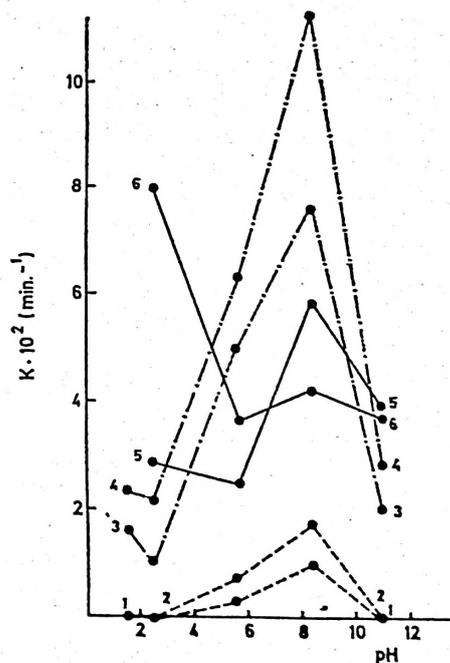


Fig. 2. Variación con el pH de las constantes de velocidad de primer orden de las fotooxidaciones a 37° C, con luz y oxígeno, de distintos aminoácidos.

1. Tirosina con azul de toluidina. 2. Tirosina con tionina. 3. Triptófano con azul de toluidina. 4. Triptófano con tionina. 5. Metionina 1 × 10⁻³ M con azul de toluidina. 6. Metionina con tionina. La concentración de colorantes en todos los casos es de 10⁻⁴ M y la de tirosina, triptófano y metionina 2, 4 y 10 × 10⁻³ M, respectivamente.

formación a sus productos de fotooxidación de pH muy ácidos. La tirosina sólo se modificó parcialmente a pH ligeramente neutro y al igual que el triptófano el máximo de velocidad de modificación se obtuvo a pH próximos a 8.

Por cromatografía en capa fina, no sólo se comprobó que el sulfóxido de metionina es el producto de fotooxidación de la metionina en estos procesos, sino que también es el único, ya que el siguiente grado de fotooxidación del aminoácido, la sulfona, no se identificó como producto de la reacción; asimismo el análisis cromatográfico del producto de fotooxidación del triptófano condujo a kinurenina.

El aminoácido tirosina se modificó de forma distinta. La gráfica 4 de la figura 3 corresponde al espectro diferencial respecto al aminoácido del producto de fo-

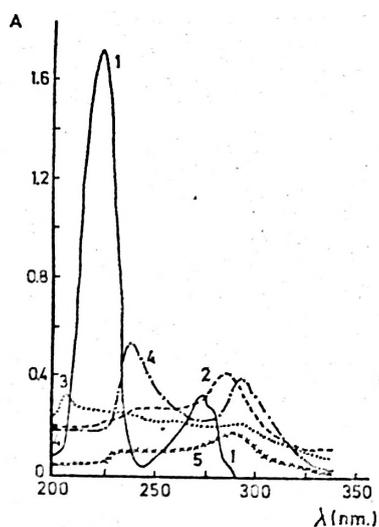


Fig. 3. Espectros de absorción UV de tirosina (2×10^{-3} M) y tionina (10^{-4} M).

1. Tirosina. 2. Tionina. 3. Tionina fotoreducida con luz blanca. 4. Tirosina fotooxidada durante 30 minutos con tionina con respecto a tirosina. 5. Tirosina no fotooxidada con tionina con respecto a tirosina. Todas las disoluciones se han efectuado en tampón acetato 0,2 M, pH 5,6.

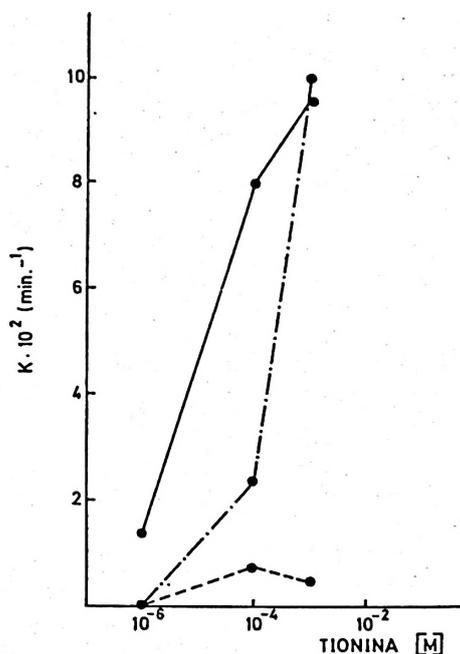


Fig. 4. Variación de la constante de velocidad de primer orden con la concentración de fotosensibilizador tionina, a 37° C, con luz y oxígeno, para distintos aminoácidos.

●-----● Tirosina 2×10^{-3} M, en tampón acetato 0,2 M, pH 5,6. ●-.-.-● Triptófano 4×10^{-3} M, en ácido acético 90 %, pH 1,5. ●-----● Metionina 1×10^{-3} M, en ácido acético 10 %, pH 2,5.

tooxidación a los 30 minutos de la tirosina con tionina, que si se compara con el espectro de tirosina no fotooxidada, gráfica 5, en las condiciones expresadas al pie de la figura, se observa la aparición de dos bandas de absorción a 235 y 288 nm, respectivamente, cuyas intensidades se incrementaron proporcionalmente con el tiempo de irradiación de las muestras y con la temperatura de reacción. Dichos máximos no coincidieron con los máximos de absorción correspondientes a la tirosina, tionina oxidada y tionina reducida (gráficas 1, 2 y 3, respectivamente). Por otra parte, la caracterización cromatográfica en capa fina de dicho producto de reacción dio una mancha de

bajo Rf, próximo al del colorante, cuya intensidad se incrementó proporcionalmente a la desaparición del aminoácido fotooxidado y con características fluorescentes a la excitación de luz de 280 nm. De todo ello se postula la formación de un compuesto de adición entre el colorante y el aminoácido, como producto de la modificación, y cuya estructura está en estudio.

La figura 4 muestra el efecto de la concentración de uno de los fotosensibilizadores ensayados, tionina, en función de la constante de velocidad de primer orden de las reacciones de fotooxidación. Se observó un incremento en el valor de dichas constantes al aumentar la concentración de colorante para los aminoácidos metionina y triptófano, mientras que para la tirosina la constante de velocidad no aumentó con la concentración del fotosensibilizador, sino que mostró un valor óptimo para una concentración de tionina de 10^{-4} M.

Un efecto también diferente se observó para la velocidad de fotooxidación de la tirosina en presencia de EDTA (tabla I). Empleando tionina como fotosensibilizador a pH 6, donde presenta máxima velocidad de fotoreducción (1), se observó que las velocidades de fotooxidación se incrementaron, en el caso de la metionina y del triptófano, y disminuyeron para la tirosina cuando el EDTA está presente en el medio.

Cuando se calcularon los valores de las

energías de activación de las fotooxidaciones de los tres aminoácidos estudiados con cada uno de los dos colorantes, a partir de las pendientes de las representaciones de los logaritmos de las constantes de velocidad de fotooxidación frente a la inversa de la temperatura absoluta y utilizando la ecuación de ARRHENIUS, en un rango de temperatura de 25 a 45° C y al pH de máxima fotooxidación, se obtuvieron unos valores de energía de activación de 5 a 7 kcal/mol, magnitudes que confirman los valores normales de los procesos de fotosensibilización.

Discusión

Los colorantes azul de toluidina y tionina participan en el proceso de modificación del aminoácido, a través de una interacción del colorante y el grupo fenólico de la tirosina, del anillo indólico del triptófano o del grupo tioéter de la metionina. De manera que los grupos amino de los colorantes influyen en la velocidad de fotooxidación en tal medida que a menor grado de sustitución de los grupos amino del fotosensibilizador, se observó una mayor velocidad de fotooxidación. Esto podría implicar un menor tiempo de fotooxidación para la modificación de estos aminoácidos en proteínas cuando se emplearan estos colorantes en lugar del azul de metileno.

Esta relación está de acuerdo con los resultados obtenidos por BONNEAU *et al.* (2) y POTTIER *et al.* (13) respecto a la variación de producción de oxígeno singlete vía los colorantes azul de metileno, tionina y azul de toluidina.

Correlacionando tanto los valores de las energías aproximadas para los estados tripletes de los fotosensibilizadores, ya sea en su forma ácida como en la básica (tabla II), como los de la diferencia de energía entre cada colorante en estado triplete y el oxígeno singlete, con la naturaleza del colorante, se observa que dichas diferencias implican una produc-

Tabla I. Constantes de velocidad de primer orden de las fotooxidaciones de los aminoácidos indicados, con tionina 10^{-4} M como fotosensibilizador, en presencia de EDTA (10^{-2} M) y en su ausencia, a pH 5,6 a 37° C, luz y oxígeno.

Aminoácido	[M]	K × 10 ² (min ⁻¹)	
		con EDTA	sin EDTA
Metionina	1×10^{-2}	5,5	3,6
Tirosina	2×10^{-3}	0,35	0,74
Triptófano	4×10^{-3}	10,4	6,3

Tabla II. Valores de niveles de energía de los estados triplete de los colorantes en su forma ácida y básica y sus diferencias con el nivel del oxígeno singlete.

Especie	Energías (cm ⁻¹)	Δ Energía ³ D- ¹ O ₂ (cm ⁻¹)	Referencia
³ TH ⁺	13640	5760	(12)
³ TH ₂ ²⁺	10300	2420	(2)
³ ATH ⁺	12600	4720	(14)
³ ATH ₂ ²⁺	9000	1120	(14)
³ AMH ⁺	11500	3620	(11)
³ AMH ₂ ²⁺	7670	90	(2)
¹ O ₂	7880	—	(14)

ción de ¹O₂ que es mayor cuando se emplea tionina, que azul de toluidina o azul de metileno, respectivamente, como fotosensibilizadores.

SLUYTERMANN (15) estableció que la tirosina se fotooxidaba cuando el grupo fenólico estaba ionizado, mientras que la velocidad de fotooxidación no dependía del grado de ionización de sus grupos α-amino y α-carboxílico. Ni para tirosina, metionina, ni triptófano cabe afirmar, a la vista de la figura 2, la dependencia de la velocidad de fotooxidación con el grado de ionización de estos grupos y los de las cadenas laterales de los aminoácidos. Y así el pH óptimo de la fotooxidación de metionina, triptófano y tirosina se encontró a pH 8,5.

Si se supone que la reacción ¹O₂ + aa → productos es independiente del pH, lo cual parece razonable ya que los pKs de los aminoácidos están entre los valores de 2 a 3 y de 9 a 10, las curvas experimentales de la figura 2 representarían los rendimientos relativos de formación de ¹O₂ como una función del pH. De esta forma la velocidad de desaparición del triptófano es mayor en medio débilmente básico, incrementándose en un factor de aproximadamente 5 en el rango de pH entre 4 y 8.5 para volver a decrecer en un mismo factor en medio básico. Esta variación de velocidad sigue pareja a la

variación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete, tanto para tionina como azul de toluidina (2, 13) que depende del estado de ionización del colorante (tabla II). Especies iónicas cuyas propiedades físicas y químicas son diferentes, y cuyos pKs de los equilibrios ácido-base del estado triplete de los colorantes están en la vecindad de 7 (5, 6).

Tan sólo para metionina existió un máximo valor de modificación a pH ácido, lo que podría tener importancia en orden a la selectividad de la modificación frente a los demás aminoácidos fotooxidables, que en esta zona de pH muestran muy poca o ninguna capacidad de fotooxidación.

El que se obtuvieran mayores constantes de velocidad para las fotooxidaciones de triptófano y metionina conforme aumentó la concentración de colorante cabe interpretarlo en función de la formación de un dímero, el cual es *quenched* más eficazmente por el oxígeno (12). Mientras que para la tirosina a altas concentraciones de colorantes existe una agregación del mismo que impediría la formación del posible compuesto de adición (8).

En base a los resultados obtenidos se puede argumentar que las fotooxidaciones de metionina y triptófano tuvieron lugar, probablemente, mediante un mecanismo diferente al de la modificación de tirosina. Así, para metionina y triptófano se podría postular que el fotosensibilizador en el estado ³D reaccionó con el oxígeno ³O₂ como primer reactivo, originándose el oxígeno ¹O₂ de gran reactividad y que posiblemente es el que interaccionó con el sustrato (aa) provocando la oxidación del mismo (3). La formación del fotoperóxido sería la causa de la fotooxidación de metionina a sulfóxido de metionina y de triptófano a kinurenina. Además el proceso se encontró acelerado en presencia de moléculas que en medio aeróbico fotoreducen rápidamente los estados tripletes de los fotosensibilizadores, entre los

que se incluyen aminas terciarias tales como el EDTA, y que reaccionaron con el colorante en el estado triplete reduciéndolo a su forma leuco, proceso que retornaría a su estado inicial en presencia de oxígeno molecular (1, 7).

Por el contrario, en el caso de tirosina se podría admitir que la primera interacción del colorante excitado sería con el aminoácido, que generaría radicales que rápidamente reaccionarían con el oxígeno molecular para dar el posible producto de modificación derivado de la tirosina. El EDTA se comportaría en este caso como un sustrato que desactivaría al colorante, tanto en su estado singlete como triplete, debido a las altas concentraciones de EDTA utilizadas fotoreduciendo al colorante a su forma leuco (1, 4).

Resumen

Se ha establecido una mayor efectividad de los colorantes tironina y azul de toluidina frente al azul de metileno en procesos de fotooxidación de los aminoácidos tirosina, metionina y triptófano.

Se ha caracterizado el producto de fotooxidación de metionina como sulfóxido de metionina, de triptófano como kinurenina, y se postula como posible producto de la tirosina un compuesto de adición entre el aminoácido y el fotosensibilizador. Se han determinado las condiciones y parámetros cinéticos en cada uno de los procesos de fotooxidación, a saber, pH, concentración de fotosensibilizador, temperatura, EDTA. La metionina se fotooxidó selectivamente a pH ácidos.

Se argumenta que metionina y triptófano se modificarían por un mecanismo de interacción directa con el oxígeno singlete. Mientras que tirosina reaccionaría en primer lugar con el colorante excitado. El EDTA acelera la modificación de triptófano y metionina y disminuye la de tirosina.

Bibliografía

- BONNEAU, R., DUBIEN, J. J. y FAURE, J.: *Photochem. Photobiol.*, **17**, 313-319, 1973.
- BONNEAU, R., POTTIER, R., BAGNO, O. y DUBIEN, J. J.: *Photochem. Photobiol.*, **21**, 159-163, 1975.
- COREY, E. J. y TAYLOR, W. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3881-3886, 1964.
- DAVIDSON, R. S. y TRETHERWEY, K. R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 4008-4009, 1976.
- FAURE, J., BONNEAU, R. y DUBIEN, J. J.: *Photochem. Photobiol.*, **6**, 331-339, 1967.
- FISCHER, H.: *Z. Physik. Chem.*, **43**, 177-190, 1964.
- GOODSPEED, F. C., SCOTT, B. L. y BURR, J. C.: *J. Phys. Chem.*, **60**, 1214-1220, 1963.
- JORI, G. y CAUZZO, G.: *Photochem. Photobiol.*, **12**, 231-237, 1970.
- JORI, G., GALIAZZO, G., MARZOTTO, A. y SCOFFONE, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 1-9, 1968.
- KEARNS, D. R., HOLLINS, R. A., KHAN, A. V., CHAMBERS, R. W. y RADLICK, P.: *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5455-5456, 1967.
- KRAMER, H. E. A. y MAUTE, A.: *Photochem. Photobiol.*, **15**, 7-23, 1972.
- NILSSON, R., MERKEL, P. B. y KEARNS, D. R.: *Photochem. Photobiol.*, **16**, 109-116, 1972.
- POTTIER, R., BONNEAU, R. y DUBIEN, J. J.: *Photochem. Photobiol.*, **22**, 59-61, 1975.
- SCOFFONE, E., JORI, G. y GALIAZZO, G.: En «Chemical Reactivity and Biological Role of Functional Groups in Enzymes» (Smellie, R. M. S., ed.), Academic Press, Nueva York, 1970, p. 163.
- SLUYTERMANN, L. A.: *Rec. Trav. Chim.*, **80**, 989-996, 1961.
- SPIKES, J. D. y STRAIGHT, R.: *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **18**, 408-415, 1967.
- UDENFRIEND, S.: En «Methods in Enzymology» (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.), Vol. III, Academic Press, Nueva York, 1957, pp. 592-613.
- WEIL, L., GORDON, W. G. y BUCHERI, A. R.: *Arch Biochem. Biophys.*, **46**, 266-274, 1951.
- WESTHEAD, E. W.: *Biochem.*, **4**, 2139-2144, 1965.
- WESTHEAD, E. W.: En «Methods in Enzymology» (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.), Vol. XXV, Academic Press, Nueva York, 1972, pp. 401-409.

