



***DINÁMICA DEL CROMÓFORO DE LA GFP RECOMBINANTE BAJO
LA INFLUENCIA DE UN GRADIENTE TÉRMICO***

Universidad Autónoma del Estado de México

PRESENTA.

P. en Fís. Juan Abimael Castro González

NOMBRE DEL (LOS) DIRECTOR(ES).

Dr. Daniel Osorio González

Laboratorio de Biofísica Molecular

Dra. Lorena Romero Salazar

Laboratorio de Nanotermodinámica y Sistemas Complejos

México, Toluca, Febrero 2017.

Índice de figuras

Figura 1.- Representación esquemática de la transformación bacteriana.

Figura 2.- Estructura de la GFP obtenida mediante técnica computacional.

Figura 3.- Estructura del cromóforo de la proteína GFP obtenida mediante técnica computacional.

Figura 4.- Colonias de bacterias *Escherichia coli* uniformes en cultivo con agar sólido.

Figura 5.- Observación de las colonias de bacterias *Escherichia coli* que expresaron la proteína GFP.

Figura 6.- Visualización de el anillo de proteína GFP.

Figura 7.- SET experimental con el cual se hizo el análisis de la intensidad de fluorescencia de la proteína GFP.

Figura 8.- Se muestra la estructura de la GFP y de su cromóforo en el vacío.

Figura 9.- Cromóforo hidratado después del proceso de minimización de energía.

Figura 10.- Variación de la temperatura en la simulación molecular clásica.

Figura 11.- Desviación cuadrática promedio por átomo del cromóforo de la GFP.

Figura 12.- Espectro de emisión de la GFP en solución.

Figura 13.- Espectro que muestra el máximo de emisión.

Figura 14.- Espectro que muestra una disminución de la fluorescencia cuando aumenta la temperatura.

RESÚMENES	
Resumen	7
Abstract	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	11
2.1. Inicio de la revolución fluorescente	11
2.2. aminoácidos	11
2.3. Proteínas	12
2.4. Estructura de la proteína GFP	12
2.5. Interacción hidrofóbica	14
2.6. Espectrometría de emisión	15
3. ASPECTOS RELEVANTES DE BIOFÍSICA MOLECULAR	15
3.1. Dinámica molecular clásica	15
3.2. GROMACS	16
3.3. Haz láser	17
3.4. Tecnología del ADN recombinante	17
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	18
4.1. Expresión de la proteína verde fluorescente	18
4.2. Purificación de la proteína GFP por interacción hidrofóbica	21
4.3. Excitación del cromóforo	22

5. ANÁLISIS COMPUTACIONAL	24
5.1. Simulación Biomolecular	24
6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	26
7. CONCLUSIONES	32
Referencias	33
Anexos	36

RESUMEN

En esta tesis estudiamos los cambios que produce la variación de la temperatura en una de las proteínas que revolucionó el estudio biológico y científico “la proteína verde fluorescente o GFP (por sus siglas en inglés)”, realizando un estudio teórico experimental y computacional para caracterizar dinámicamente y estructuralmente a la proteína; adjuntamente con una técnica experimental se obtuvo la GFP siguiendo un protocolo de especificaciones estandarizadas.

El trabajo se complementó realizando un estudio de espectrometría de emisión que nos permitió ver el efecto sobre la intensidad de fluorescencia que ocurre en el interior de la proteína verde fluorescente al variar el rango de temperatura, obteniendo un patrón de la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura. Se reconoce clásicamente que a mayor temperatura se adquiere una mayor vibración de los átomos de esta manera las vibraciones del cromóforo en el centro de la proteína aumentarán. Dado que dicho cromóforo es el responsable de la intensidad de fluorescencia, se propuso como hipótesis:

“A mayor temperatura mayor intensidad de fluorescencia”.

Se realizó un estudio de las vibraciones aleatorias del cromóforo de la proteína GFP en medio líquido a distintas temperaturas, utilizando dinámica molecular clásica. Termodinámicamente hablando se sabe que a mayor energía cinética mayor es la vibración de los átomos, esto afectará directamente al cromóforo por lo que se percibe en el espectro. Para el seguimiento de estos cambios se integró un set experimental que simultáneamente fuese sensible a inducir cambios de temperatura modulables y detectar con una interfaz la espectrometría de emisión de alta resolución. Obteniendo así los principios de un termómetro biológico intracelular.

1. INTRODUCCIÓN

La biomedicina requiere frecuentemente del uso de proteínas como marcadores de expresión genética para el desarrollo de sus investigaciones ya que su capacidad de ligarse con otras proteínas permite, entre otras cosas, estudiar rutas metabólicas de organismos vivos. La proteína verde fluorescentes se han posicionado como uno de los marcadores de expresión genética más importantes, su característica luminiscente ante estímulos de luz ultravioleta es ampliamente utilizada como monitor de propiedades fisicoquímicas de otras biomoléculas. En este sentido, la termodinámica biológica juega un papel relevante, pues con ella se realizan análisis físicos de proteínas fluorescentes, esto ha permitido caracterizar y mejorar algunas de las propiedades y generar una amplia variedad de proteínas que emiten fluorescencia dependiendo de la variante, en un amplio rango de frecuencias del espectro visible. Con el simple hecho de realizar una inserción o modificación de genes específicos, se permitiría la expresión de proteínas, sensibles a distintas longitudes de onda al interior de una célula; de esta forma se podría modificar y analizar el comportamiento, así como la dinámica de algunos componentes de la maquinaria celular (Luque Guillén, M.V., 2016).

Un estudio de interés es conocer la respuesta fluorescente ante cambios de temperatura, es decir contar con el equivalente a un termómetro biológico intracelular. Para ello se pretende encontrar una expresión que nos relacione intensidad de fluorescencia en función de la temperatura la cual nos servirá para crear dicho termómetro biológico intracelular, ya que como se sabe hasta ahora no existe tal y todos los medios para medir temperatura en procesos biológicos son por medios externos invasivos los cuales provocan alteraciones en la célula, con el simple hecho de atravesar la membrana celular, ésta de alguna manera se siente invadida por algún mecanismo externo, empieza a reaccionar generando mecanismos de auto defensa los cuales provocan alteraciones en las mediciones reales de temperatura, cabe resaltar que en una célula es muy importante conocer las temperaturas de desdoblamiento y acoplamiento de proteínas, ya que gracias a esto es como se pueden agrupar o mezclar distintos compuestos químicos para dar origen a un fármaco. Finalmente, el trabajo se complementó realizando modelado molecular por computadora con el cual se obtuvo la estructura de la proteína GFP.

En particular, en este trabajo se analizaron las propiedades dinámicas del cromóforo de la GFP cuando su entorno se somete a diferentes temperaturas con el propósito de identificar cambios en su fotoactivación. Para ello obtuvimos la proteína GFP usando la tecnología de ADN recombinante y evaluamos la eficiencia de la transformación midiendo el número de bacterias transformantes (que han adquirido el plásmido) por μg de DNA presente en el medio, con ello fue factible llevar a cabo el análisis espectroscópico. Usamos las muestras de GFP purificadas para obtener un espectro de emisión a bajas temperaturas, cercanas a la temperatura ambiental.

2. ANTECEDENTES

En este capítulo haremos una breve revisión de la historia de la fluorescencia en biofísica, así como de conceptos relacionados con el objeto de estudio.

2.1 Inicio de la revolución fluorescente

Mientras menos iluminado sea un entorno, una extraordinaria luz te podrá iluminar, esto marcó la vida de Osamu Shimomura y sus colaboradores debido a este grandioso fenómeno que observaron en los años 60, cuando estudiaban la bioluminiscencia de la medusa *Aequora victoria* en el laboratorio de Frank Johnson en la universidad de Princeton. ¡Pero! ¿Por qué esta medusa podía emitir luz verde? Se preguntaban Osamu Shimomura y sus colaboradores. Tiempo después se dieron a la tarea de recolectar miles de medusas, logrando identificar a la fotoproteína responsable de dicha bioluminiscencia, la nombraron aequorina; Ésta fotoproteína reacciona ante la presencia de calcio, lo que hace que emita luz azul, más tarde se dieron cuenta de que esta luz azul se tornaba de color verde al estar bajo luz ultravioleta, ¿será otra proteína la responsable de este nuevo fenómeno? Osamu Shimomura y sus colaboradores después de realizar más experimentos acertaron y encontraron a esta otra proteína a la que nombraron “proteína verde fluorescente” o GFP (por sus siglas en inglés), la propiedad de la GFP es la de transformar la luz azul emitida por la fotoproteína en luz verde con el objetivo de aumentar la producción de luz en la fotoproteína. La medusa *Aequorea victoria* es translúcida, decorada con estructuras brillantes ya que la GFP emite bioluminiscencia de color verde. (Azucena *et al*,2013)

2.2 Aminoácidos

Un aminoácido es la unidad de estructura básica de la proteína, integrado por 4 elementos;

- Un grupo amino -NH₂
- Un grupo carboxilo -COOH
- Un hidrógeno -H
- Una cadena lateral -R

Estos cuatro elementos están unidos entre sí a través de un carbono central, conocido como carbono α (alpha). Los aminoácidos se diferencian unos de otros por la cadena lateral R.

Del número total de aminoácidos sólo 20 aminoácidos son codificables para la síntesis de proteínas, dependiendo a las características de la cadena lateral (carga, estructurales, de tamaño, etc.) tendrán una clasificación química;

Aminoácidos aromáticos; Poseen un anillo aromático en la cadena lateral. Debido a ello, son altamente hidrofóbicos.

Aminoácidos alifáticos; Son hidrofóbicos y por ello tienen tendencia a situarse en el interior de las proteínas globulares cuando están en solución acuosa.

Aminoácidos que contienen azufre; son aminoácidos cuyas cadenas laterales poseen átomos de azufre

Aminoácidos hidroxilados; Los hay de carácter ácido, neutro y básico. (Luque Guillén et al,2005)

2.3 Proteínas

Las proteínas son moléculas complejas con formas definidas, compuestas esencialmente por 4 elementos químicos (carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno) imprescindibles. Tienen una determinada función dentro de un organismo, esta función dependerá de su conformación. Cada proteína tiene una descripción que contiene las coordenadas atómicas de la molécula, al formato correspondiente se le conoce como PDB. Este archivo se obtiene de una base de datos confiable denominada **Protein Data Bank** (Banco de Datos de Proteínas por sus siglas en inglés PDB). Estos datos, generalmente obtenidos mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear, son resultados de investigaciones realizadas y publicadas por investigadores de todo el mundo.

2.4 Estructura de la proteína GFP

La proteína verde fluorescente es una de las proteínas más importantes a nivel mundial por sus variadas aplicaciones ya que tiene la propiedad de emitir fluorescencia ante estímulos de luz UV, además no requiere de la presencia de cofactores o sustratos para generar esa luz verde. Lo que se demostró cuando el fragmento de DNA de la GFP pudo ser expresado en bacterias y en otros organismos por medio de una transformación (ver figura 1), esto hizo que esos organismos brillaran cuando se iluminaban con luz ultravioleta (Franco *et al.* 2009).

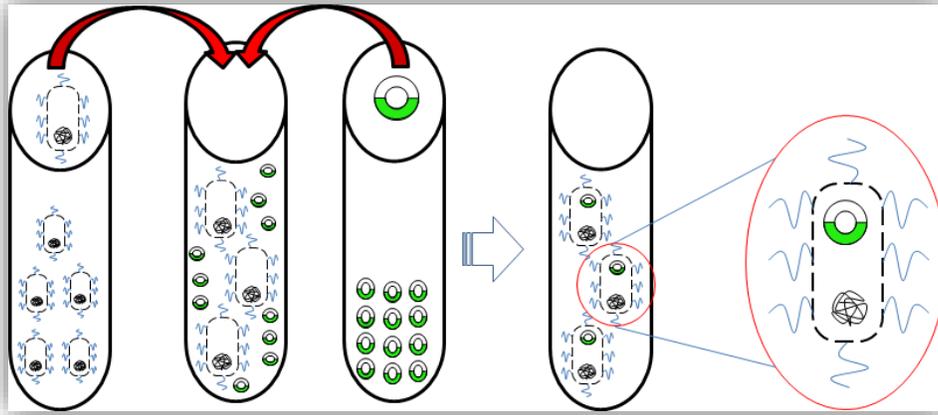


Figura 1 Esquema que muestra la transformación de una bacteria. El tubo de ensayo A) contiene a las bacterias *Escherichia coli* sin transformar, el tubo de ensayo C) contiene el pGLO (Proteína fluorescente), en el tubo de ensayo B) se agregan las bacterias y el pGLO con una sustancia transformada (CaCl_2 50 mM, pH 6.1), se agita vigorosamente, después se aplica un choque térmico que permitirá insertar el pGLO en el interior de la bacteria, en el tubo de ensayo D) se muestran las bacterias transformadas que expresaron la proteína GFP. (elaborado por el autor).

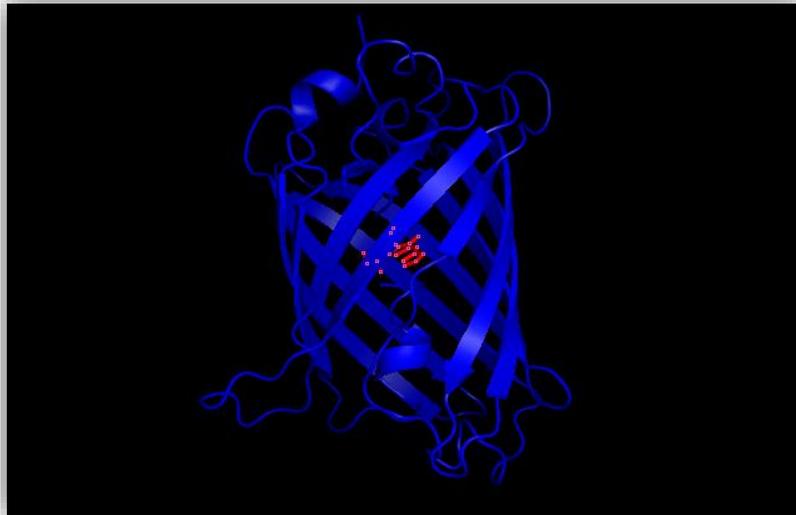


Figura 2 Estructura de GFP en forma de barril(azul) que rodea al cromóforo central(rojo). Esta representación se obtuvo en el laboratorio de Biofísica Molecular usando el software de visualización PyMol y el correspondiente archivo en formato PDB.

La proteína verde fluorescente tiene una conformación de barril por once láminas-beta que arropan en su interior una alfa-hélice la cual contiene al cromóforo en medio de su conformación (ver figura 2). Lo integran 238 aminoácidos, de los cuales solo 3 aminoácidos son responsables de que al ser estimulada con luz ultravioleta emita en la zona verde del espectro visible, a estos 3 aminoácidos se les denomina cromóforo y corresponde a los aminoácidos SER, TYR, y GLY con el número de aminoácido 65,66 y 67, respectivamente. En la figura 3, obtenida mediante modelado molecular, se puede observar el cromóforo en color verde, que está

ubicado en el centro de la proteína, si esta conformación es alterada repercutirá en la intensidad de fluorescencia, esta proteína se considera altamente hidrofóbica debido a la abundancia relativa de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas.

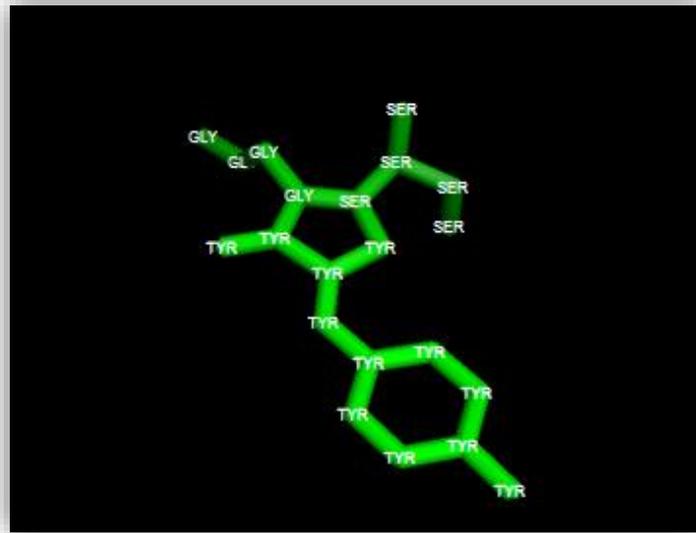


Figura 3 Estructura del cromóforo, se muestra la conformación de los tres aminoácidos que conforman el cromóforo de la proteína GFP, a la TYR se le confiere el anillo aromático. Esta representación se obtuvo en el laboratorio de Biofísica Molecular usando la plataforma de PyMol.

2.5 Interacción hidrofóbica

“Las interacciones hidrofóbicas” ocurren en las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos, estos aminoácidos se disponen generalmente en el interior de la proteína, donde la mayoría de cadenas laterales puede asociarse estrechamente y se encuentran protegidas de las interacciones con el disolvente (el agua). Este tipo de fuerzas hidrofóbicas intervienen en el correcto plegamiento de la proteína. (corzo,J. , 2016)

2.6 Espectrometría de emisión

La “espectrometría de emisión” (también llamada **espectrometría de fluorescencia**) examina las diferentes frecuencias de luz fluorescente emitida por una muestra. Para ello se utiliza un haz de luz ultravioleta a una longitud de onda constante, que excita los electrones de las proteínas o moléculas de ciertos compuestos, provocando que emitan fotones (luz) en el espectro visible (aunque no necesariamente) de menor energía.

3. ASPECTOS RELEVANTES DE BIOFÍSICA MOLECULAR

En este capítulo haremos una breve revisión de la Dinámica Molecular Clásica en biofísica, así como del funcionamiento físico de un haz láser comúnmente usado para la excitación de proteínas, además describiremos la técnica de ADN recombinante, usada para la obtención de la proteína de interés.

3.1 Dinámica molecular clásica

Es una técnica de simulación por computadora muy eficiente para el modelado de proteínas, permite la interacción entre átomos y moléculas por períodos de tiempo que varían desde los femtosegundos hasta los milisegundos, además nos permite una visualización del movimiento de las partículas, así como calcular propiedades de transporte y equilibrio de sistemas clásicos, para ello, se sigue la evolución de sistema por un tiempo conforme se resuelven las ecuaciones de movimiento. (Fernandez de Gortari, E., 2010)

En este trabajo se hicieron pruebas computacionales utilizando dinámica molecular con el motivo de obtener y analizar la desviación cuadrática promedio (RMSF por sus siglas en inglés) por átomo del cromóforo. Dicha desviación es una medida de las oscilaciones aleatorias de los átomos en el cromóforo. Al variar la temperatura también se modifica la distribución de RMSF, en un principio se puede atribuir a modificaciones en la energía cinética vibracional y de alguna manera estas oscilaciones afectarán en la fluorescencia emitida por el cromóforo. En específico, nos interesa relacionar la temperatura con la intensidad de fluorescencia al ser irradiada con luz ultravioleta.

La construcción de las coordenadas de los átomos, sus fluctuaciones y la evolución de configuraciones requiere de una serie de algoritmos y pasos previos, de los cuales solo enunciaremos 3 fundamentales (no profundizaremos en esta área) para este método de simulación son:

1.-Inicialización: Se obtienen energías iniciales, pero no son consistentes con la medición real, por ello nos vemos en la necesidad de calcular las posiciones y fuerzas originales mediante algoritmos con el propósito de minimizar la energía, esto nos permite que sea más realista nuestra simulación y relajar al sistema.

2.-Equilibrio: en esta parte se resuelven las ecuaciones de movimiento del sistema hasta que sus propiedades se estabilizan. Esta solución depende de las condiciones termodinámicas del sistema, como N = número de partículas, V = volumen, T = temperatura, P = presión y E = energía, para ello se debe elegir un determinado ensamble termodinámico en el cual se mantienen constantes algunas de estas variables (Microcanónico NVE , canónico NVT usando un termostato, Isotérmico isobárico NPT usando un baróstato), de esta manera se obtienen resultados independientes del tiempo. (GROMACS, 2013).

3.-Resultados: Este paso, así como el anterior, conforman el loop central de la simulación. Ellos son repetidos hasta haber calculado la evolución temporal del sistema durante el tiempo total de simulación deseado. Una vez que el sistema se encuentra ya en equilibrio y se han integrado las ecuaciones de movimiento de Newton, se van guardando las posiciones, velocidades, fuerzas, etc, durante cada paso en un archivo para luego ser procesadas. Una vez completado lo anterior, se calculan y se imprimen los diferentes promedios estadísticos relevantes.

3.2 GROMACS.

Es una suite de programas de licencia libre para realizar simulaciones a escala atómica. Sus iniciadores fueron investigadores de Suecia y Alemania. Este Software está orientado a la realización de simulaciones de Dinámica Molecular para biomoléculas como el caso de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Presenta algunas ventajas frente a otros programas de simulación atómica, sus desarrolladores aseguran que utilizan algoritmos que hacen que GROMACS sea más rápido en el cálculo de las interacciones del tipo van der Waals, repulsiones estéricas, atracciones y repulsiones electrostáticas, que usualmente son las que dominan los cálculos en este tipo de simulaciones. Además, es una plataforma con una interfaz simple para utilizarse y con resultados rápidos computacionalmente hablando, debido a optimizaciones algorítmicas (GROMACS, 2013).

3.3 Haz láser;

“Un láser suele tener forma alargada, donde se generan los fotones, tiene un núcleo el cual puede ser una estructura cristalina (de rubí), o un tubo de vidrio que contiene gas (el gas comúnmente usado es dióxido de carbono o la mezcla helio-neón).

Esto se debe a que poseen electrones fácilmente excitables, pero además no emiten inmediatamente de forma espontánea, por lo que estos pueden quedar excitados durante un tiempo mínimo. La excitación permite la emisión estimulada y no espontánea, adjunto al núcleo está el excitador hecho de un elemento que provoca la excitación de los electrones del material del núcleo con ayuda de una lámpara de destellos o de una descarga eléctrica de alta tensión producida por dos electrodos. Además, el láser cuenta con dos espejos paralelos colocados en los extremos del núcleo. Uno de estos espejos es reflectante y a diferencia del otro este deja pasar parte de la luz que le llega por lo cual es semirreflectante. Durante la excitación una gran cantidad de electrones pasa al estado excitado y la mayoría de ellos permanece en esta situación cierto intervalo de tiempo, adjuntamente pocos de ellos realizan emisión espontánea, de esta manera se generan fotones que se desplazan en direcciones arbitrarias, la mayoría se pierde en los laterales donde no hay espejos mientras que pocos de ellos rebotan en los espejos en dirección al núcleo, al pasar por el núcleo se provoca la emisión estimulada de nuevos fotones, estos a su vez realizan el mismo procedimiento con lo que se producen más fotones y como uno de estos espejos es semirreflectante una parte de estos fotones rebota y otra escapa que a su vez forman un chorro muy fino de fotones los cuales forman el rayo láser que podemos observar”.

En nuestro análisis experimental resulta relevante el uso del láser pues este nos permitirá la excitación de las muestras a una longitud de onda constante. De esta manera podremos caracterizar el espectro de emisión. (Pellini, C., 2001)

3.4 Tecnología del ADN recombinante

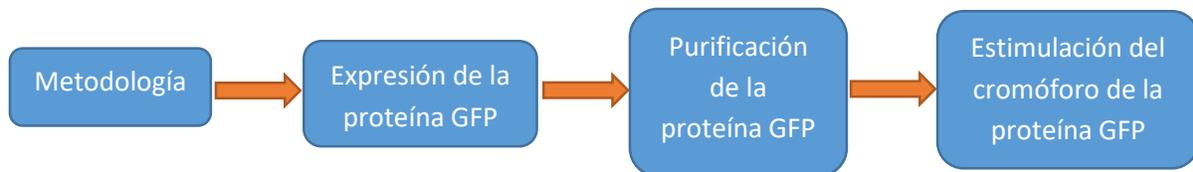
Esta técnica se realizó en el laboratorio de Biofísica Molecular de la Facultad de Ciencias, donde se encuentra muy bien controlada la tecnología de ADN recombinante ya que cuenta con un protocolo apropiado para ello. Principalmente consiste en manipular un sistema bacteriano mediante el cual es posible obtener proteínas a partir de un cultivo de bacterias introduciendo, con técnicas fisicoquímicas, genes apropiados en el citoplasma bacteriano, realizando una expansión en la membrana celular de nuestras bacterias y con ayuda de un choque térmico se introduce una secuencia de ADN que contendrá el gen que codifica para la proteína de interés. Las bacterias expresarán la proteína de nuestro interés en su interior de forma natural. Éstas deben *sembrarse* en medios de selección sólidos o

líquidos, donde además de contener el gen que expresa a la proteína contendrán otro gen que las hará inmunes al medio de selección. Ese medio selectivo nos permitirá contar sólo con las bacterias que expresan en su interior a la proteína de interés. Posteriormente es posible usar diversas técnicas de extracción y purificación para obtener las proteínas de interés y prepararlas a las concentraciones deseadas para su posterior uso.

Para realizar esta técnica se requiere de un lugar estéril y con condiciones termodinámicas fijas, por tratarse de un proceso biológico los pasos del protocolo experimental no se pueden interrumpir y optamos por seguir una serie de pasos estandarizados que se describen en el siguiente capítulo.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL:

En este capítulo se describirá de forma resumida la expresión y purificación de la proteína verde fluorescente, y la técnica que se utilizó para que la proteína sea estimulada usando medios ópticos.



4.1 Expresión de la proteína verde fluorescente

Para la expresión de la proteína GFP se partió de un protocolo con especificaciones estandarizadas por técnica de ADN recombinante, que nos permite alcanzar una mayor eficiencia de transformación en bacterias *E. coli* de la cepa HB101 K-12 que no es patógena para los seres vivos.

Inicialmente se crea el medio de cultivo LB (LB nutrient broth) al 4% (10 g de LB Agar Power en 250 ml de agua destilada), estas bacterias inicialmente estaban liofilizadas, se hidrataron con 250 µl de caldo LB e incubaron a 37°C durante 24 horas. Trascurrido este tiempo se revisó que el medio tuviera una consistencia coloidal-gel, enseguida se sembraron utilizando el método de estrías por cuadrantes.

Se incubaron nuevamente a 37°C en posición invertida durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se prosiguió con la transformación de bacterias, para ello sólo se utilizaron las colonias que presentaban una conformaciones definidas e individuales que estaban separadas por al menos por 2 mm. Como se muestra en la figura 4, con el propósito de asegurar que solo es el ADN de una colonia de bacterias.



Figura 4 En esta figura podemos apreciar Colonias de bacterias bien definidas, obtenidas en el Laboratorio de Biofísica Molecular, las colonias encerradas en la circunferencia roja mostraron un crecimiento de bacterias E. coli uniformes..

Para la transformación bacteriana se utilizaron 10 μ l de plásmido pGLO a una concentración de 0.08 μ g/ml y 250 ml de solución transformadora (CaCl₂ 50 mM, pH 6.1) mismos que se vertieron en una alícuota de 2 ml, a la mezcla se le agregó una colonia de bacterias usando un asa bacteriológica, asegurándonos de que esta se disolviera en la mezcla y se colocó en hielo durante 10 minutos.

Después se realiza un choque térmico (se inició con 10 min en hielo seguidos de 50 segundos en un baño térmico a 42 °C, una vez concluido el baño térmico se agregaron 250 µl de medio LB líquido y nuevamente se incubaron 2 min en hielo finalizando con 10 min a temperatura ambiente). Luego se cultivaron las bacterias transformadas en medios selectivos con LB sólido (4%) contenidos en cajas Petri con ampicilina (0.1 g/L) y L-arabinosa (5 g/L) a 37° C por 24 horas. Una vez concluido el tiempo de incubación se verificó que las bacterias que crecieron expresaron la GFP, para ello se usó una lámpara UV con longitud de onda de 395 nm como se muestra en la figura 5.

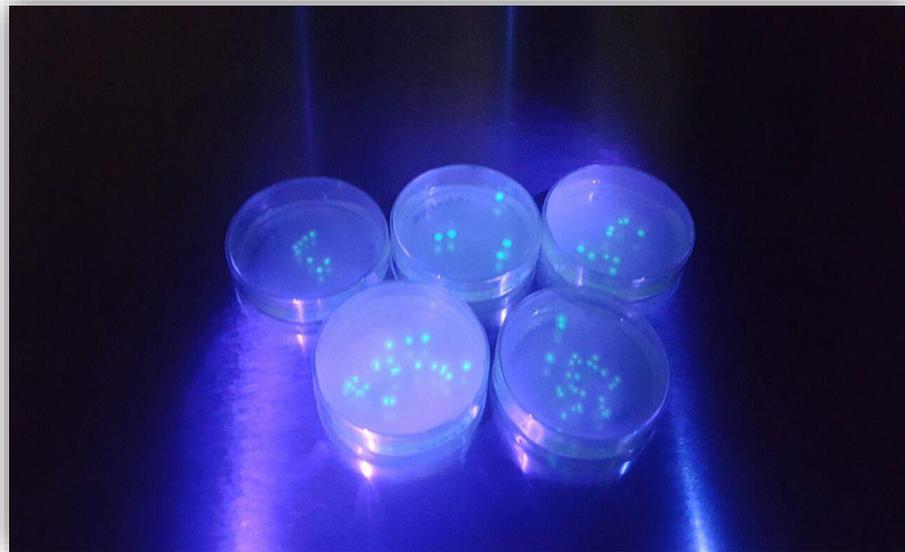


Figura 5 En esta imagen se observan las colonias de bacterias transformadas que expresaron la proteína GFP bajo luz ultravioleta, obtenidas en el Laboratorio de Biofísica Molecular.

Una vez que se observaron las colonias de bacterias *E. coli* recombinantes individuales y que expresaron la proteína con forma definida se tomaron nuevamente con un asa bacteriológica y se vertieron en viales con 2 ml de caldo LB/amp/ara [LB 4%, ampicilina (0.1 g/L) y L-arabinosa (2 g/L)] en una incubadora con agitación orbital a 200 rpm, se incubaron a 32° C por 24 h y una vez que las bacterias recombinantes crecieron el medio líquido, se separaron las células del

medio de cultivo utilizando una centrifugadora a velocidad de 14 800 rpm por 5 min, posteriormente de la centrifugación se extrajo todo el sobrenadante con una pipeta, después las células fueron resuspendidas en 250 µl de buffer Tris-EDTA (TE, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y se añadió una gota de lisozima se agitó suavemente y se almacenó en el congelador a 4°C por 24h con el propósito de que se lleve a cabo la lisis celular. Luego se descongeló en baño térmico y se centrifugó a 14 800 rpm durante 10 min, se extrajo el sobrenadante y fue conservado a 4°C.

4.2 Purificación de GFP por interacción hidrofóbica

Para la purificación de la GFP se utilizó cromatografía de interacción hidrofóbica (8 x 40mm) pre-empaquetadas con metil resinas (Macro-Prep®), la cual consiste en utilizar Buffer de distintas salinidades para aprovechar las interacciones hidrofóbicas de la GFP estas columnas deberán estar pre-equilibradas con 2 ml de buffer de equilibración [(NH₄)₂SO₄/TE 2M, pH 8.0].

Se añadieron 250 µl de sobrenadante a la columna de cromatografía y se observó el descenso de la proteína GFP, posteriormente se agregaron 250 µl de buffer de unión [(NH₄)₂SO₄/TE 4M, pH 8.0] a la mezcla y se observó una minúscula capa de color verde en la parte superior de la resina.

Finalmente se añadieron 250 µl de buffer de lavado [(NH₄)₂SO₄/TE 1.3 M, pH 8.0] seguido por 750 µl de TE como buffer elución, provocando el descenso de la GFP por las paredes de la columna, como se muestra en la figura 6. La muestra se recolecta en un vial y se almacena en el congelador. Todos los reactivos utilizados fueron de un mismo proveedor, BioRad.



Figura 6 En la purificación de la proteína GFP se observó el anillo de proteína GFP adherido a la resina que contiene la columna de interacción hidrofóbica, mediante un buffer de lavado dicho anillo descendió por las paredes de la columna de cromatografía.

4.3 Excitación del cromóforo

Para la excitación del cromóforo se utilizó un haz láser de onda continua de longitud de onda de 405 nm (Fermion I Series), de potencia modulable con fibra óptica acoplada. El haz es dirigido a la muestra a través de un arreglo de lentes que lo redirigen y coliman hacia el centro de la muestra, la cual se contiene en una celda de cuarzo. Una segunda fibra óptica está adaptada en un extremo a un espectrómetro de alta resolución para analizar la intensidad de fluorescencia, la información así capturada se manda a la interfaz computacional.

Simultáneamente, se obtuvo la variación de la temperatura del sistema bacterial transformado en tiempo real, se midió habilitando la celda de cuarzo con un sensor capacitivo LM35 de precisión militar, este sensor estuvo sumergido en el medio (aislando los cables del sensor con epóxico) conectado a una tarjeta de hardware libre, de comunicación USB. La intensidad de emisión del láser y la fluorescencia

de las muestras fueron medidas con un espectrómetro (USB4000-UV-VIS Ocean Optics), haciendo un barrido de 200-1100 nm, acercando la fibra óptica acoplada al espectrómetro a 1 mm de distancia de las paredes de la celda y perpendicular al eje del haz láser. Tanto la tarjeta de hardware libre como el espectrómetro fueron conectados a una PC para la manipulación, monitoreo y adquisición de datos. Para lograr las temperaturas deseadas, las muestras se mantuvieron en incubación y refrigeración verificando su estado con un termómetro infrarrojo de lectura rápida.

El SET experimental se muestra en la figura 7.

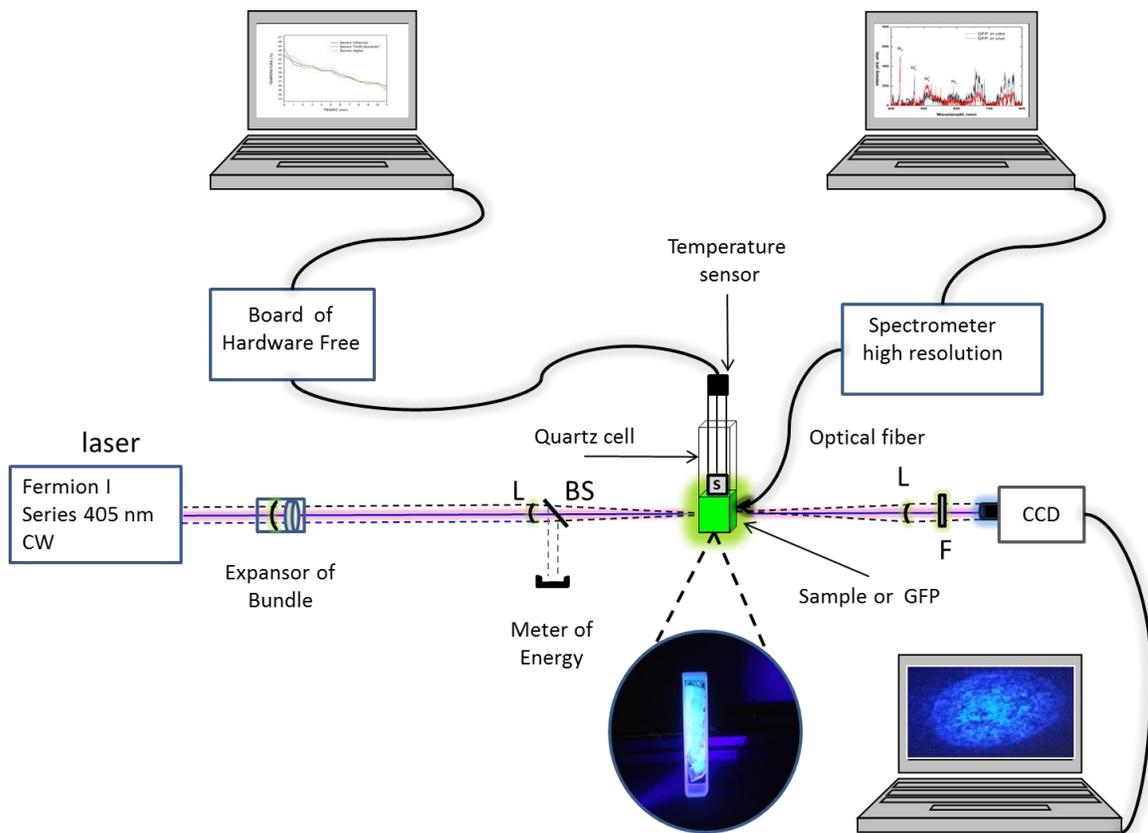


Figura 7 Se muestra el esquema del diagrama experimental con el cual se hizo el análisis de la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura de la proteína GFP (imagen tomada de Beltrán K. et al. (2016)).

5. ANÁLISIS COMPUTACIONAL

Es este capítulo se describirá la técnica de simulación molecular clásica la cual nos permitió calcular y analizar propiedades dinámicas y estructurales del cromóforo de la proteína GFP.

5.1 Simulación Biomolecular;

Se usó Dinámica Molecular (DM) clásica que consiste en resolver las ecuaciones del movimiento para un conjunto de N átomos colocados dentro de una caja de simulación cuya configuración inicial se obtiene a partir de las coordenadas obtenidas por difracción de rayos X, éstas se encuentran disponibles en el repositorio del Protein Data Bank (PDB). En nuestro caso se usó el archivo con código 1EMA. Posteriormente se asignan, por única ocasión, velocidades iniciales aleatorias usando la distribución de Boltzmann. Las posiciones y velocidades para tiempos posteriores se calculan usando las ecuaciones de Verlet dadas por

$$v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) + \delta t a(t) \quad (1)$$

$$r(t + \delta t) = r + \delta t v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) \quad (2)$$

$$v(t) = \frac{1}{2}\left[v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) + v\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right)\right] \quad (3)$$

Donde v es la velocidad, t el tiempo, δt el incremento del tiempo y a la aceleración misma que previamente se obtiene para cada átomo que interactúa mediante la relación.

$$\mathbf{F} = m\mathbf{a} = -\text{grad}U = -\frac{dU}{d\mathbf{r}} \quad (4)$$

Aquí m es la masa, \mathbf{r} es el vector de posición y la energía potencial U tiene la forma

$$U = \sum_{\text{pares}} \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 + \sum_{\text{diedros}} k_{ijkl}^\phi (1 - \cos(n\phi - \phi_2))$$

$$+ \sum_{\text{pares}} \frac{\alpha_{ij}}{r_{ij}} (e^{-2\beta(r_{ij}-\sigma_{ij})} - e^{-\beta(r_{ij}-\sigma_{ij})}) + \sum_{\text{pares}} f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \quad (5)$$

Donde

k_{ij}^b = constante de fuerza

r_{ij} = longitud de enlace

b_{ij} = longitud de enlace de equilibrio

k_{ijk}^θ = constante de fuerza

θ_{ijk} = ángulo de enlace

θ_{ijk}^0 = ángulo de enlace de equilibrio

k_{ijkl}^ϕ = altura de barrera rotacional

n = periodicidad

ϕ = ángulo diedro

ϕ_s = ángulo diedro inicial

α y β = son parámetros que regulan la intensidad del mínimo y el alcance del potencial

r_{ij} = distancia atómica

σ_{ij} = diámetro atómico

f = constante

q_i = carga parcial

q_j = carga parcial

r_{ij} = distancia entre las cargas

ϵ_r = constante dieléctrica

Los primeros 3 términos de la ecuación 5, corresponden a interacciones atómicas con enlace covalente, en tanto que los 2 últimos a interacciones sin enlace covalente. Enfatizamos en el penúltimo término debido a que esta interacción tipo van der Waals es una propuesta nuestra, los parámetros de alcance y profundidad pueden ser modulados con los parámetros α y β dependiendo de los valores

experimentales del pH, que en nuestro caso fue 7.0 y de la concentración de la proteína en solución.

Usamos Dinámica Molecular con la suite de programas GROMACS 4.7. El campo de fuerza empleado para los átomos del péptido fue GROMOS y para las moléculas de agua el modelo utilizado fue Simple Point Charge (SPC). El ensamble estadístico para la simulación fue el canónico (*NVT*) dicho ensamble se basa en un número fijo de partículas (*N*), con un volumen (*V*) a una temperatura (*T*). Para mantener la temperatura constante se implementó el termostato de Nosé-Hoover. El periodo de equilibración se desarrolló durante 250 ns y el de evolución 125 ns.

Para evitar las tensiones que promueven los enlaces de hidrógeno sobre la molécula se llevó a cabo un proceso de minimización en el vacío y una vez hidratada la proteína se repitió el procedimiento con posiciones restringidas de los átomos diferentes a los de hidrógeno incorporando en esta etapa las condiciones de frontera periódicas.

En la parte experimental se obtuvo el espectro de emisión para varias muestras de GFP en solución a diferentes concentraciones y temperatura de 37°C usando un espectrómetro OceanOptics HR-4000.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados computacionales y experimentales que se mostraran a continuación son los de mayor relevancia. Iniciaremos con los resultados computacionales ya que estos nos permitieron caracterizar dinámica y estructuralmente la proteína GFP. Después nos adentramos en el mundo experimental para obtener GFP y realizar los estudios previos.

Al llevar a cabo la equilibración del cromóforo en el vacío se pudo verificar la conservación de la energía total del sistema, las posiciones iniciales fueron tomadas considerando los ángulos diedros que los residuos que poseían al interior de la proteína. Los tiempos de vibración experimentales corresponden a la escala de tiempo de la simulación y fue del orden de nanosegundos. La figura 8 muestra la configuración de la proteína y del cromóforo en el vacío.

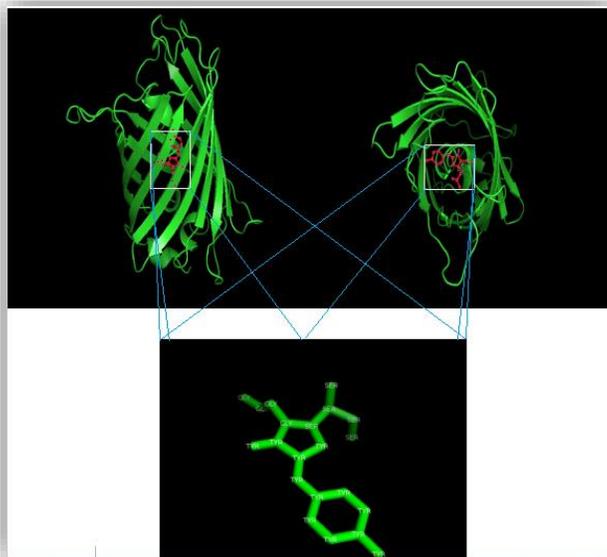


Figura 8 Configuración de la GFP y el Cromóforo en el vacío que permitió visualizar el estado inicial de nuestra proteína antes de someterla a un proceso de minimización de energía. Esta representación se obtuvo en el laboratorio de Biofísica Molecular usando la plataforma de PyMol empleando el archivo PDB.

Al incorporar las moléculas de agua, para simular la hidratación de la proteína, se efectuó un proceso de minimización de energía potencial. Para eliminar tensiones en el cromóforo hidratado se restringieron los movimientos de los átomos excepto los de hidrógeno. La figura 9 muestra la configuración del sistema hidratado.

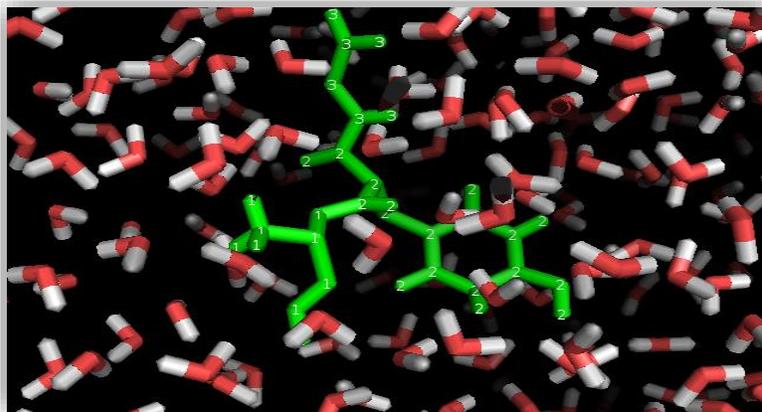


Figura 9 Configuración del cromóforo hidratado después del proceso de minimización de energía. Los sitios marcados con 1, 2 y 3 indican si los átomos pertenecen a los residuos SER, TYR, o GLY respectivamente.

Como los tiempos de vibración del cromóforo reportados experimentalmente son en escala de nanosegundos, fue de nuestro interés verificar las oscilaciones de la temperatura en etapas tempranas de la evolución, es decir antes de que el sistema llegue a un estado de termalización. Dichas variaciones se muestran en la figura 10 para valores de la temperatura cercanos a 310 K(37°C)

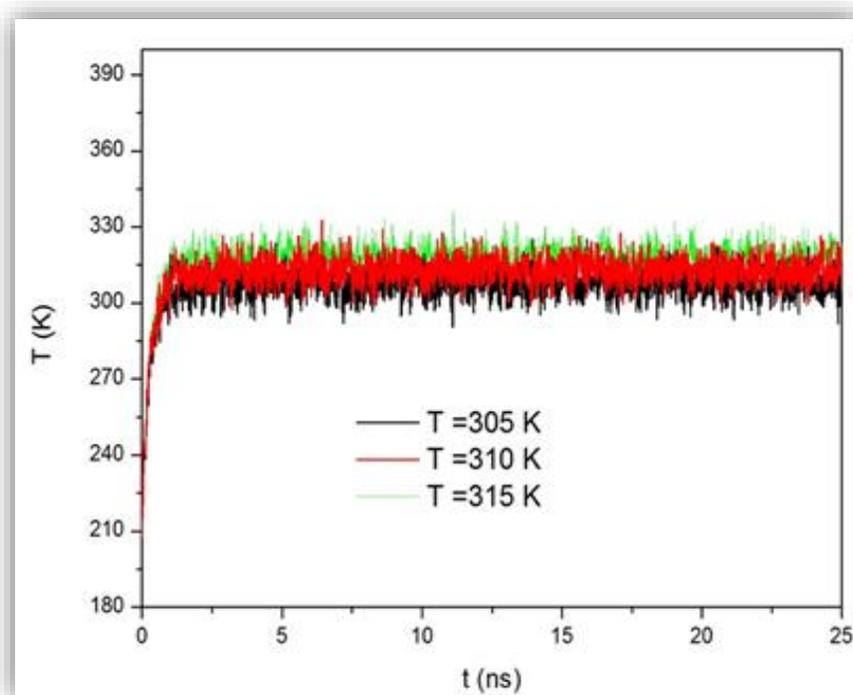


Figura 10 Variación de la temperatura en etapas tempranas del proceso de evolución.

Se analizaron los valores del desplazamiento cuadrático promedio por átomo del cromóforo para evaluar los efectos de las moléculas de agua en la vibración de éstos. Se muestran los resultados en la figura 11.

Una vez realizada la síntesis de GFP y bajo el set descrito en el capítulo 4, se midió el espectro de emisión de GFP en solución. Hallándose su máximo de emisión, alrededor de 509 nm, como se muestra en la figura 12.

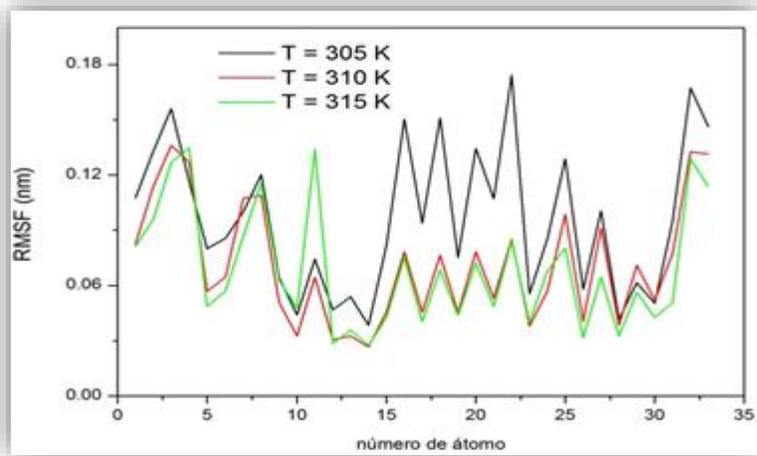


Figura 11 Desviación cuadrática promedio por átomo del cromóforo de la GFP hidratada para tres valores de temperatura.

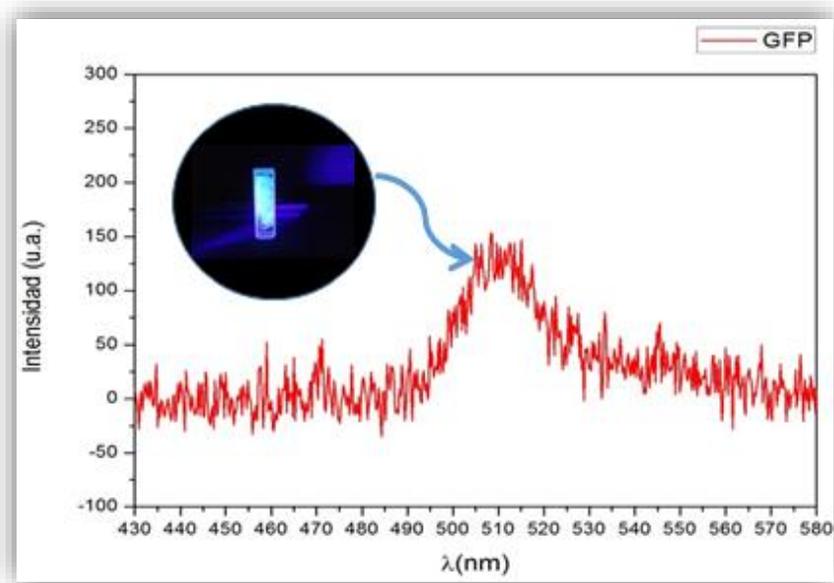


Figura 12 Espectro de Máxima de emisión de la proteína GFP en solución (círculo) a 37°C

Se sometió a irradiación láser 1 ml de proteína GFP purificada en solución de buffer TE a una concentración y temperaturas en el rango de 10°C y 25°C, se determinó el espectro de emisión tal y como se muestra en la figura 13. Usamos funciones de Lorentz para ajustar dicho espectro y se pudo constatar que el máximo de emisión se ubica en 510 nm con un hombro en 540 nm, tal y como se reporta en la literatura (Chalfie, 2004)

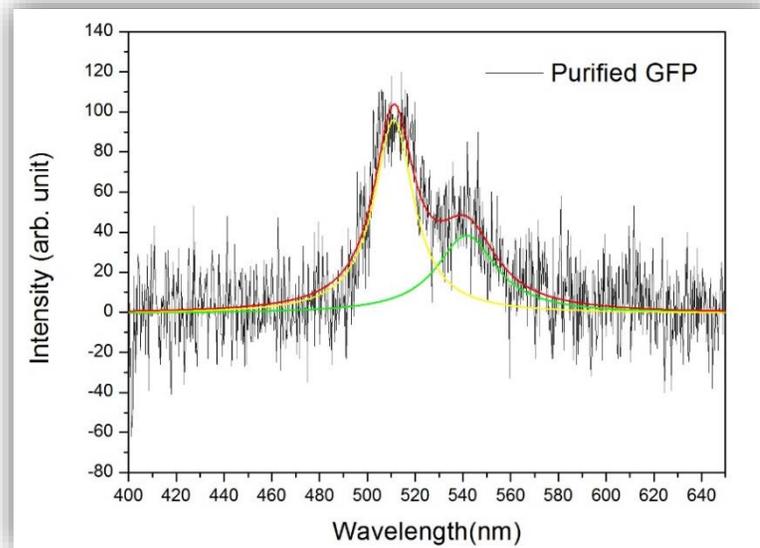


Figura 13 En las curvas del Espectro de emisión podemos ver que las curvas ajustadas exhiben un máximo de emisión en 509 nm (amarillo) y un hombro en 540 nm (verde). La curva resultante (rojo) es la superposición de ambas Lorentzianas. Imagen elaborada por el autor para Beltrán K. et al. (2016).

El espectro de fluorescencia de una proteína depende tanto de la composición de aminoácidos como de su estado conformacional. Estudios previos muestran que la intensidad de fluorescencia depende de factores como el pH, la cantidad de oxígeno disuelto en el medio y del número de bacterias transformadas (Zhang, 2009), sin embargo, para un sistema con las mismas condiciones fisicoquímicas es importante conocer la variación de la fluorescencia como función de la temperatura porque es un factor que permite monitorear el desplegamiento de proteínas.

Por lo anterior, se prepararon muestras de bacterias transformadas en medio sólido que se incubaron a 37°C y otras que se mantuvieron en refrigeración a 4° C durante 12 h. Se verificó la fluorescencia durante el tiempo que dichos sistemas alcanzaron la temperatura ambiente (22°C), y encontramos diferencia significativa en los espectros obtenidos de ambas muestras tal y como lo reportamos más adelante. Adjuntamente, se prepararon muestras de bacterias en medio líquido y bajo las mismas condiciones arriba descritas el espectro de emisión exhibió un decaimiento en la intensidad de fluorescencia a medida que la temperatura aumentaba, la diferencia fue más evidente entre 15°C y 25°C. Se eligieron tres curvas representativas (15°C;21°C;25°C) del ajuste a los espectros, las cuales se muestran en la figura 14, en dicha figura se aprecia una relación inversa entre temperatura y la intensidad del espectro efectivo.

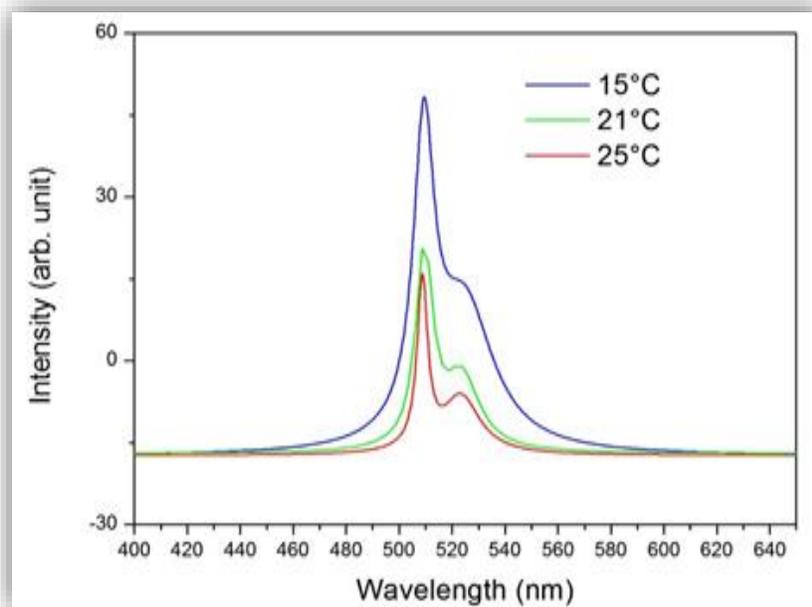


Figura 14 Ajuste a los espectros de emisión de la GFP expresada en bacterias dentro de un medio líquido. Se observa una disminución de la fluorescencia cuando aumenta la temperatura. Imagen generada por el autor para Beltrán K. et al. (2016).

7. Conclusiones

A continuación, se enuncian las principales conclusiones de este trabajo que combinó metodologías experimentales y de simulación.

- De acuerdo con los resultados de la simulación se pudo observar que el péptido hidratado mantuvo una estabilidad energética a partir de los primeros 25 ns de evolución, el modelo de van der Waals usado fue adecuado. Esto significa que los parámetros del alcance y profundidad energética obtenidos de una estimación experimental fueron apropiados para las condiciones establecidas en el experimento computacional.
- Los átomos con mayor vibración corresponden al residuo TYR y la mayor oscilación corresponde a una temperatura de 305 K lo cual se atribuye a la hidrofobicidad presente por la abundancia de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas.
- Se revisó especialmente la importancia en el proceso de excitación del cromóforo pues de él depende la intensidad de fluorescencia. Como éste es muy susceptible a cambios de temperatura fue de interés analizar el comportamiento de sus aminoácidos, el resultado obtenido muestra que la estructura de la proteína alrededor del cromóforo es más importante de lo esperado ya que los cambios de temperatura en dicha vecindad influyen considerablemente en la fluorescencia emitida.
- 👁 Se partió de un set experimental diseñado por el equipo de trabajo, no obstante, la técnica experimental para acoplar temperatura y respuesta fluorescente se tendrá que perfeccionar y estandarizar. Para obtener una función respuesta de fluorescencia acoplada a la temperatura, sentando así las bases de un posible desarrollo que facilite el diseño y la construcción de termómetro intramolecular.
- 👁 Los experimentos de espectrometría fueron consistentes con lo reportado en la literatura al hallar el máximo de emisión de la GFP en solución, cercano a una longitud de onda de 509 nm. Es importante mencionar que los parámetros identificados de la simulación computacional, densidad y pH fueron los apropiados para el desarrollo experimental.

Una perspectiva inmediata de este trabajo es el monitoreo de células espermáticas fluorescentes para obtener propiedades dinámicas que coadyuven con diagnósticos de infertilidad.

Referencias;

1. Alicia Y. Franco, Marinés Longart, Applications of Green Fluorescent Protein (GFP) in Cell Biology and Visualization of the Nervous System. 2 julio-diciembre 2009, 84-96
2. Andersen, D., Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opinion in Biotech.* 13: 117-123.
3. Beltrán K., de Jesús-Miranda J. M., Castro J. A., Mandujano-Rosas L. A., Paulin-Fuentes J. M., Osorio-González* D (2016). Using Green Fluorescent Protein to Correlate Temperature and Fluorescence Intensity into Bacterial Systems, *chitkara*49-57.
4. Blow, N. (2008). New ways to see a smaller world. *Nature.* 456: 825-828.
5. Cubbit, A.b., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using Green fluorescent proteins, *Trends Biochem. Sci.*, 20: 448-455.
6. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. y Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263, 802-805.
7. Chudakov, M., Matz, M., Lukyanov S., Lukianov K. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* 90: 1103-1163.
8. Dooley, C., Dore, T., Hanson, G., Jackson, W., Remington, S., Tsien, R. (2004). Imaging dynamics redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279: 22284-22293.
9. Donner, J., Thompson, S., Kreuzer, M., Baffou, G., Quidant, R. (2012). Mapping intracellular temperature using green fluorescent protein. *Nano Letters.* 12: 2107-2111.
10. Hernandez, C.M. Caracterización funcional y ensamblaje membranar del canal de potasio shaker H4, y de segmentos truncados en la porción amino o carboxilo. Tesis de maestría. Universidad de Colima, (2001).

11. Martin Chalfie, Steven R. Kain. Green Fluorescent Protein: properties, applications and protocols, octubre 2005, 1-11.
12. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. y Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111, 229-233.
13. Shimomura, O., Johnson, F.H. y Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa *Aequorea*. *Journal of Cell Comparative Physiology*, 59, 223-239.
14. Shimomura O. (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy*. 217: 3-15.
15. Shimomura O. (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy*. 217: 3-15.
16. Veera Krasnenko, Alan H. Tkaczyk, Eric R. Tkaczyk, KoitMauring. Physico chemical properties of Blue Fluorescent Protein determined via Molecular Dynamics Simulation. agosto 2008, 1139-1143.

1. "Espectrometría de emisión". Consulta en línea el 29 abril de 2016
www.espectrometria.com/espectrometra_de_emisin
2. "Dinámica molecular y Monte Carlo aplicado en física estadística". Consulta en línea el 26 abril de 2016
http://depa.fquim.unam.mx/jesusht/sfi_metodos_clasicos_efg.pdf
3. "Estructura y propiedades de la proteína". Consulta en línea el 25 abril del 2016
www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf
4. "GFP; del océano a la ciencia". Consulta en línea 21 de abril del 2016 en
www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol26num1/articulos/GPF.html
5. "GROMACS". *About Gromacs*. Consulta en línea 18 de abril de 2016.
www.gromacs.org
6. "La Interacción hidrofóbica". Consulta en línea 18 de abril de 2016
www.sebbm.es/BioROM/contenido/JCorzo/temascompletos/InteraccionesNC/agua/hidrofobicos.htm
7. "laser". Consulta en línea 18 de junio de 2016
historiaybiografias.com/laser/

ANEXOS