

90



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“Elaboración de un sistema reportero para evaluar la actividad de ribozimas recombinantes, utilizando la tecnología FRET (Transferencia de Energía Fluorescente en Resonancia)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

CLAUDIA AIDEÉ MONTIEL EQUIHUA



MÉXICO, D.F.

2001



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

292884



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Profra. Marisol López López.
Vocal: Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre.
Secretario: Prof. Luis Marat Álvarez Salas.
1er. Suplente: Prof. Javier Plasencia de la Parra.
2do. Suplente: Profra. Sobeida Sánchez Nieto.

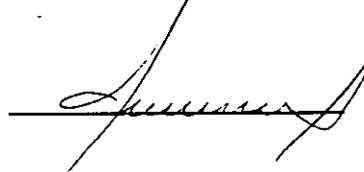
Lugar donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Terapia Génica, Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN.

Asesor:

Dr. Luis Marat Álvarez Salas.

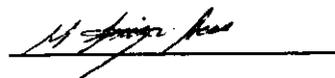
Firma:



Supervisor técnico:

M. en C. María Luisa Benítez Hess.

Firma:



Sustentante:

Claudia Aideé Montiel Equihua.

Firma:



INDICE.

	Página
Justificación	1
Antecedentes	2
1. Breve Introducción	2
2. Proteína verde fluorescente (GFP)	3
2.1 Propiedades estructurales	3
2.2 Formación del fluoróforo	4
2.3 Propiedades espectroscópicas	5
2.4 Efectos del pH y temperatura	6
2.5 Mutantes de GFP	7
2.5.1 Variedad EGFP	7
2.5.2 Variedad ECFP	8
2.6 Aplicaciones de la GFP	10
3. Transferencia de energía fluorescente en resonancia	10
3.1 Transferencia de energía en resonancia	10
3.2 Condiciones del efecto FRET	12
3.3 Efecto FRET entre mutantes de GFP	14
3.4 Aplicaciones del efecto FRET entre GFP's	15
4. Opacamiento de la fluorescencia o <i>quenching</i>	16
5. Ribozimas	17
5.1 ¿Qué son las ribozimas?	17
5.2 Características generales	18
5.3 Aplicación terapéutica de las ribozimas	21

5.4 Diseño, selección y evaluación de ribozimas	22
6. Hipótesis	24
Estrategia experimental	27
Objetivos	32
Métodos	33
1. Preparación de bacterias competentes	33
2. Transformación de bacterias	35
3. Extracción de plásmidos	36
4. Electroforesis horizontal en gel de agarosa	37
5. Extracción fenólica y precipitación con etanol de ADN	38
6. Restricción de plásmidos	40
7. Ligación de vectores con fragmentos	40
8. Secuenciación	41
9. Inducción de proteínas recombinantes	42
10. Densidad óptica	45
11. Ensayos de fluorescencia	45
12. Purificación de proteínas recombinantes ligadas a GST.	47
13. Inmunoelectrotransferencia	48
Resultados	52
1. Generación del plásmido pEFSCFP-kos	52
2. Obtención del fragmento FSCFP-kos	54
3. Obtención del fragmento CFP	55
4. Obtención del plásmido pGEX-2TK-MCS	56
5. Generación del plásmido pGST-CFP	57
6. Generación del plásmido pGST-FRET1	58
7. Generación del plásmido pGST-FRET	60

8. Inmunoelectrotransferencia	63
9. Mapas de los plásmidos	64
10. Ensayos de fluorescencia	72
Barrido de excitación - emisión	72
Ensayos <i>in vitro</i>	79
Efecto de la temperatura	79
Tiempo de integración	86
Discusión	92
Conclusiones	98
Bibliografía	97
Apéndice A	i
Apéndice B	iii
Apéndice C	ix

A Dios ... Tú y yo sabemos que las razones sobran.

*A mis padres Alberto y Rosa María y mi hermana Alma Adriana,
por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional.*

*A la profesora Consuelo Salas Cuevas,
por descubrir para mí este camino.*

AGRADECIMIENTOS.

A mi asesor, el Dr. Luis Marat Álvarez Salas, por compartir conmigo sus conocimientos y darme su apoyo y consejos en el ámbito académico y el personal.

A mi supervisora, la M. en C. Ma. Luisa Benítez Hess, por depositar su confianza en mí y brindarme su ayuda en el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales, la Profra. Marisol López López y el Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre por sus valiosas contribuciones a este trabajo.

Al profesor Raúl Garza Velasco, por el millón de veces que me ha ayudado a salvar obstáculos.
¡Es usted un sol!

A mis compañeros del laboratorio de Terapia Génica: Rocío, Arturo, Mario, Ramón, Pablo, Jorge y Miguel, por hacer de mi estancia una experiencia muy agradable.

A mis amigos de la UNAM, del IPN y del CINVESTAV, por todo lo que hemos compartido y por hacer de ésta una etapa inolvidable.

¡MIL GRACIAS A TODOS!

JUSTIFICACIÓN.

Las ribozimas son agentes terapéuticos en pleno desarrollo, que tienen un futuro promisorio en el campo de la medicina moderna por su plasticidad, su especificidad, su capacidad de recambio múltiple; su expresión en células puede ser regulada y no producen efectos secundarios indeseables.

Durante el desarrollo de ribozimas nuevas es necesario probar su acción en un ambiente lo más cercano posible al que reina en los tejidos blanco, para que únicamente se seleccionen aquéllas que en verdad puedan ser funcionales.

En la actualidad no se cuenta con un sistema que permita evaluar las ribozimas *in situ*, a tiempo real, con gran sensibilidad, precisión y exactitud. Es nuestra finalidad el generar un sistema con estas características, basado en el efecto FRET (Transferencia de energía fluorescente en resonancia) entre dos mutantes de la proteína GFP (proteína verde fluorescente).

Sin embargo, antes de generar el sistema que podrá detectar el corte de secuencias blanco por las ribozimas, es necesario comprobar que puede obtenerse un efecto FRET entre las dos variantes de GFP elegidas (ECFP y EGFP) *in vivo*. Este es el propósito del presente trabajo.

ANTECEDENTES.

1. Breve introducción.

En 1975, Shimomura y sus colaboradores aislaron de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria* una proteína productora de luz: la *aequorina*^{1, 3, 4, 34}. Este celenterado produce luz verde, y se pensaba que la aequorina era la proteína productora de esta luz (lo cual es parcialmente cierto), pero al estudiar *in vitro* sus espectros de absorción y emisión de luz, se encontró que la aequorina produce luz azul, en vez de luz verde⁴.

Posteriormente, al analizar los extractos provenientes de este organismo marino, se descubrió que produce otra proteína, la ahora llamada **Proteína verde fluorescente** (*Green fluorescent protein* o GFP, por sus siglas en inglés) que, mediante un proceso llamado **Transferencia de energía fluorescente en resonancia** (*Fluorescence resonance energy transfer* o FRET, por sus siglas en inglés), acepta la energía que emite la aequorina excitada y después la reemite como luz verde^{4, 34}. Ambas proteínas son responsables de la bioluminiscencia de la medusa.

Esta proteína GFP es una herramienta muy útil hoy en día porque no requiere de sistemas enzimáticos complejos para producirse ni tampoco cofactores para fluorescer; con las herramientas moleculares actuales se ha logrado su expresión en organismos tan alejados entre sí en la escala evolutiva como son bacterias, nemátodos, plantas, células de mamífero e incluso animales transgénicos

(ANDi)^{2, 4, 6, 9}. GFP y FRET son dos conceptos en los cuales se abundará en las siguientes páginas para una mejor comprensión de este trabajo.

2. Proteína verde fluorescente (GFP).

Las proteínas verdes fluorescentes existen en varios celenterados¹; sin embargo, la más utilizada es la de *A. victoria*, cuyas características se describen a continuación.

2.1 Propiedades estructurales.

La GFP es una proteína de 238 aminoácidos, con un peso de entre 27 y 30 kDa, determinado por SDS-PAGE^{1 a 4}. Su estructura tridimensional fue dilucidada por Ormö et.al. y Yang et.al. en 1996, siendo ésta descrita como un "barril" formado por 11 hojas β -plegadas y una α -hélice en el eje de simetría^{1 a 4, 9}. El fluoróforo (*parte de la proteína que produce la fluorescencia*) se encuentra en el α -hélice, a resguardo del entorno ambiental (fig. 1).



Fig. 1 Estructura tridimensional de la GFP (modificado de ref 44).

La presencia de las hojas β -plegadas y el hecho de que el fluoróforo esté inmerso en ellas, hace que la proteína sea fisicoquímicamente muy estable y resistente a la acción de agentes desnaturalizantes: permanece fluorescente aún cuando es sometida a 65°C, pH de 11, SDS al 1%, o cloruro de guanidina 6M; además de que resiste la acción de la mayoría de las proteasas conocidas por varias horas^{1, 3}.

La GFP tipo silvestre, o GFP^{wt}, puede formar dímeros a concentraciones mayores a 100 μ M y fuerzas iónicas bajas^{1, 9}, lo cual afecta a las propiedades espectroscópicas de la proteína. Se han identificado a los aminoácidos que participan en la interacción entre dímeros y se sabe que estas interacciones son relativamente fuertes⁹.

2.2 Formación del fluoróforo.

El fluoróforo es una *p*-hidroxibencilidenimidazolinona, que se forma por ciclización y posterior autoxidación de los residuos Ser65, Tyr66 y Gly67^{1, 3, 34}. Para que esta reacción ocurra es necesario que la proteína tenga al menos una estructura terciaria inicial. Si la conformación de la proteína se pierde, se pierde también la fluorescencia^{1, 9, 34}. A continuación se ilustra el mecanismo de reacción más probable para la formación del fluoróforo :

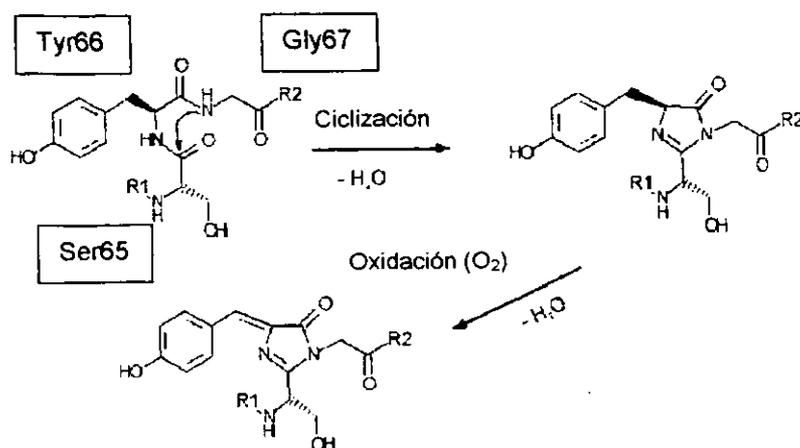


Fig. 2 *Mecanismo de formación del fluoróforo de GFP (modificado de ref. 34).*

Los residuos Ser65 y Tyr66 pueden ser sustituidos por otros aminoácidos, no así el residuo Gly67 el cual ofrece menor impedimento estérico para que se lleve a cabo la ciclización^{1,3}.

La oxidación requiere la presencia de oxígeno molecular, por lo que la proteína no puede producirse en organismos anaerobios. De hecho, se cree que la oxidación es el paso limitante en la formación del fluoróforo³⁴.

En la estructura terciaria de la proteína hay varios aminoácidos cargados alrededor del fluoróforo que forman un microambiente que lo estabiliza y lo protege⁹. Si se producen mutaciones en éstas posiciones, o bien ocurren cambios conformacionales en la proteína que modifican el microambiente del fluoróforo, puede perderse la fluorescencia^{9, 27}.

2.3 Propiedades espectroscópicas.

La GFP^{wt} tiene dos picos de excitación: uno a 395 nm y otro a 475 nm. El primer pico tiene 3 veces más amplitud que el segundo^{1 a 5}.

Cuando se excita a 395 nm, se obtiene un pico de emisión a 508 nm; mientras que si se excita a 475 nm, el pico de emisión se obtiene a 503 nm. A 475 nm se excitan las moléculas de GFP que contienen fluoróforos aniónicos (el anión fenolato), mientras que a 395 nm se excitan las moléculas que tienen fluoróforos neutros o protonados; por lo tanto, la amplitud de los picos de excitación depende del pH del medio (obviamente, considerando un pH extremo)¹.

Para aplicaciones prácticas, sería mejor que la GFP tuviera un pico de excitación de mayor longitud de onda, para que pudieran ser usados en su detección los filtros para fluoresceína; esto sólo sucede cuando se somete a la GFP a pH's muy elevados, debido a que aumenta la proporción de aniones fenolato. Si se trata de medir GFP en tejidos, no se puede modificar drásticamente el pH del medio.

2.4 Efectos del pH y temperatura.

La GFP^{wt} a pH's altos (11-12) pierde amplitud en el pico de excitación de 395 nm y gana amplitud en el pico de 470 nm¹.

El incremento de temperatura de 15°C a 65°C disminuye ligeramente la amplitud del pico a 395 nm y aumenta el pico a 470 nm, esto en la GFP que ya está plegada o como se dice coloquialmente, que ya ha madurado¹. A mayores temperaturas se causa la desnaturalización de la proteína, perdiendo hasta un 50% de la fluorescencia a 78°C¹. A temperaturas muy elevadas se desnaturaliza en forma irreversible, en cambio, la desnaturalización lograda a pH's extremos sí es reversible¹.

2.5 Mutantes de GFP.

En pro de obtener una GFP con propiedades espectroscópicas más convenientes, se empezaron a crear variantes de la proteína a partir de mutaciones puntuales del gen^{1, 5 a 8}. Hasta 1998, se tenían 6 clases de GFP's¹:

Clase 1: Las GFP que son una mezcla de moléculas con el fenol neutral y moléculas con anión fenolato, como la GFP^{wt}.

Clase 2: Las GFP con anión fenolato en el fluoróforo, como la EGFP.

Clase 3: Las GFP con fenol neutral en el fluoróforo.

Clase 4: Las GFP con anión fenolato y un sistema rico en electrones π , como las variedades *yellow*.

Clase 5: Las GFP con un indol en el fluoróforo, como las variedades *cyan* (ECFP).

Clase 6: Las GFP con un imidazol en el fluoróforo, como las variedades *blue*.

En el presente trabajo se utilizaron las variedades EGFP y ECFP, por lo que únicamente se profundizará en las características de éstas.

2.5.1 Variedad EGFP (*enhanced green fluorescent protein*).

La variedad EGFP posee una doble mutación, cambia el residuo serina-65 por una treonina y el residuo fenilalanina-64 por leucina^{7, 8}. La primera mutación provoca que el espectro de excitación posea un solo pico a 485-490 nm, con una amplitud de cuatro a seis veces mayor que la obtenida para la GFP^{wt} (posee un coeficiente de extinción mayor)⁸.

Además se aumenta la velocidad de oxidación del fluoróforo, siendo ésta unas cuatro veces mayor que para la GFP^{wt}⁸. Sin embargo, aún con esta mutación, la proteína necesita madurar (plegarse a su conformación activa) a temperaturas bajas. La mutación en el residuo 64 ayuda a que la proteína adquiera su conformación a mayores temperaturas, y que pueda ser funcional a 37°C⁷.

El pico de emisión de esta variedad se encuentra alrededor de los 507 nm.

2.5.2 Variedad ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*).

La variedad ECFP posee seis mutaciones: el residuo tirosina-66 por un triptofano, lo que sustituye el fenol del fluoróforo por un indol; fenilalanina-64 por leucina, serina-65 por treonina, asparagina-146 por isoleucina, metionina-153 por treonina y valina-163 por alanina^{5, 6}. La mutación en tirosina-66 recorre hacia los azules los espectros de absorción y emisión, pero produce una proteína con baja intensidad de fluorescencia. Las mutaciones restantes mejoran este aspecto, con lo cual se obtiene una proteína brillante con dos picos de excitación: 433 y 453 nm, y dos picos de emisión: 475 nm y 501 nm^{5, 6}.

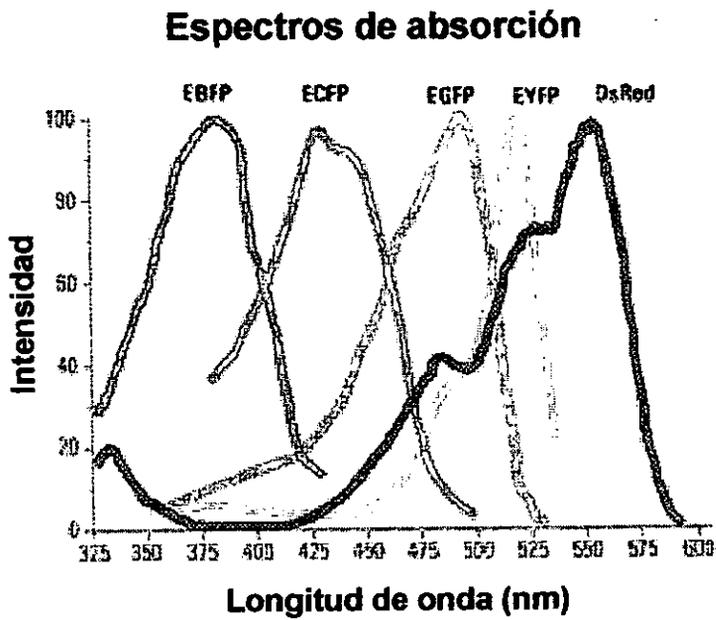


Fig. 3 *Espectros de absorción de las mutantes de GFP (modificado de ref. 45).*

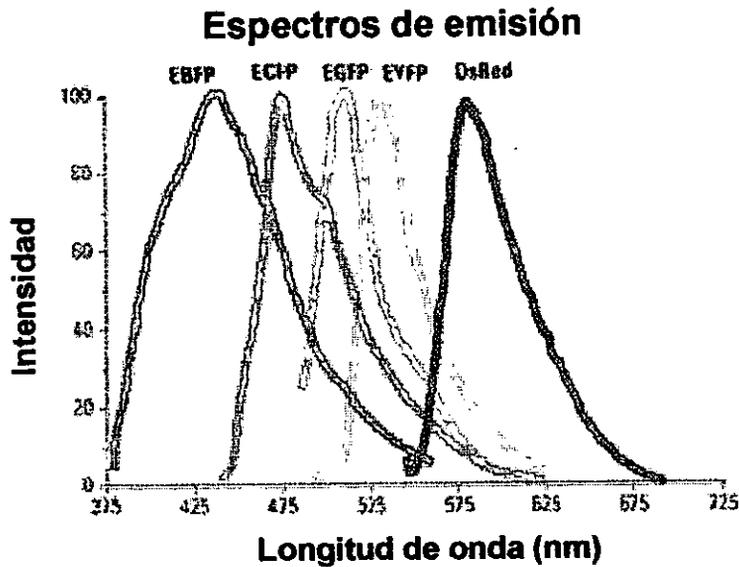


Fig. 4 *Espectros de emisión de las mutantes de GFP (modificado de ref. 45).*

2.6 Aplicaciones de la GFP.

Debido a que la proteína verde fluorescente no requiere de sistemas enzimáticos especiales para expresarse, no es tóxica para las células, no es voluminosa y además, una vez que ha madurado, es bastante resistente a los cambios en el medio, se ha convertido en una herramienta muy útil para diversas actividades.

Puede ser utilizada como un marcador, fusionándola con las proteínas de interés, de manera tal que puede reflejar los niveles de expresión, la localización en la célula y el transporte de estas proteínas^{2,3}.

También puede utilizarse como un indicador activo: por ejemplo, algunas mutantes de la proteína son más sensibles a los cambios de pH que otras, por lo que podrían ser utilizadas para monitorear cambios de este tipo en los organelos celulares^{1, 26}. La GFP puede ser modificada de forma que se vuelve sensible a la fosforilación¹.

La forma más útil de medir cambios bioquímicos con GFP es, sin duda, el hacer uso del efecto FRET entre las mutantes de esta proteína. Mediante este efecto puede medirse la actividad de proteasas, la asociación-disociación de moléculas, los niveles de calcio, etc¹.

3. Transferencia de energía fluorescente en resonancia (FRET).

3.1 Transferencia de energía en resonancia.

Textualmente, la definición de este término es la siguiente:

"Es la transmisión de un cuanto de energía desde su sitio de absorción a su sitio de utilización (en una molécula o sistema de moléculas) por interacción resonante

entre cromóforos a distancias mayores que las interatómicas, sin conversión a energía térmica y sin que el aceptor y el donador entren en colisión cinética⁴².

Una interacción de este tipo puede llevarse a cabo entre cromóforos (*parte de una molécula que absorbe luz*) de diversos tipos, no necesariamente fluorescentes¹⁰. En el caso de que se involucren fluoróforos, el efecto se llama "Transferencia de energía fluorescente en resonancia", o *efecto FRET* (por sus siglas en inglés)¹⁰.

Esto es: un fluoróforo denominado *donador* absorbe energía, la cual excita a sus electrones y los lleva a un estado energético mayor (ver apéndice B). Cuando los electrones regresan a su estado basal liberan la energía, en este caso en forma no radiante. Si la energía liberada corresponde a la energía que requieren los electrones del fluoróforo denominado como *aceptor* para excitarse, entonces se lleva a cabo una transferencia de energía³⁷.

Así, si excitamos al fluoróforo donador y tenemos un aceptor en la vecindad observaremos dos efectos³⁷:

- (a) una disminución en la emisión del donador.
- (b) la aparición o el aumento de la emisión del aceptor, dependiendo de si éste último se excita o no con la misma energía que excita al donador.

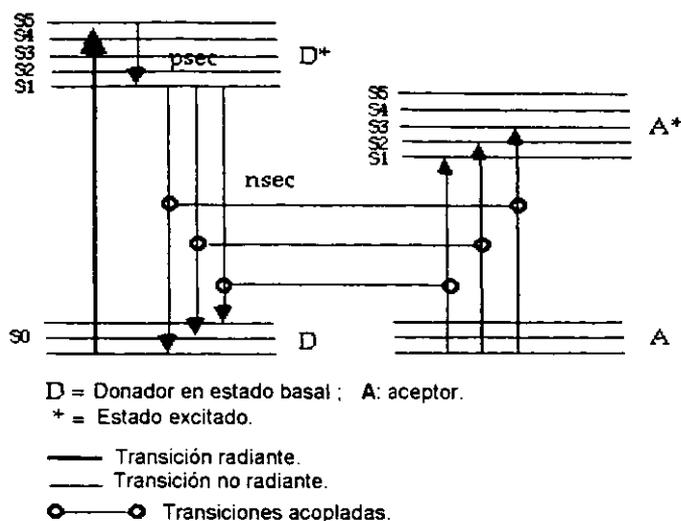


Fig. 5 *Transferencia de energía a nivel electrónico (modificado de ref. 46).*

3.2 Condiciones del efecto FRET.

Para que pueda ocurrir un efecto FRET entre dos fluoróforos, son necesarias algunas condiciones⁴⁶:

- que el donador tenga un amplio rendimiento de emisión de energía.
- que el espectro de emisión del donador se sobrelape considerablemente con el espectro de absorción del aceptor.
- que exista un alineamiento apropiado de los momentos dipolares del aceptor y del donador.
- que la distancia entre el donador y el aceptor sea $1 \pm 0.5 \times R_0$, donde R_0 es la distancia de Förster, o la distancia a la cual la transferencia de energía ocurre con un 50% de eficiencia. Esta distancia es entre 10 y 100 Å para la mayoría de los casos.

La energía que absorbe el donador lo somete a un estrés, y puede relajarse en forma radiante y en forma no radiante. La forma no radiante puede ser calor, por ejemplo³⁵.

La tasa de rendimiento de emisión de energía se refiere a la relación entre el número de fotones absorbidos y el número de fotones emitidos en forma radiante⁴⁶. Si el rendimiento es alto, gran parte de la energía que pudiera emitirse en forma radiante puede transferirse al aceptor aunque no sea como radiación.

Es necesario que el espectro de emisión del donador se sobrelape considerablemente con el espectro de absorción del donador porque, como sabemos, la energía se absorbe y se emite en cantidades discretas llamadas cuantos. La emisión a determinada longitud de onda posee una cantidad discreta de energía. Si los espectros se sobrelapan, quiere decir que esa misma cantidad de energía es la que requiere el aceptor para excitarse, y entonces habría una transferencia³⁷.

La distancia entre ambos fluoróforos debe ser pequeña para que ocurra la transferencia, ya que se requiere de una interacción dipolo-dipolo entre ellos¹⁰.

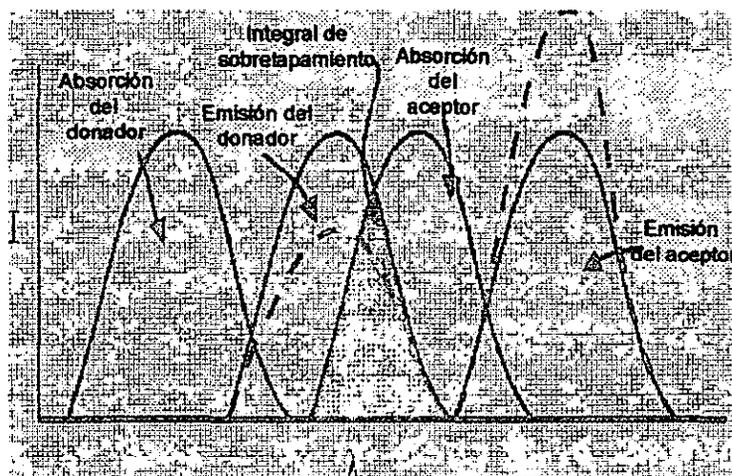


Fig. 6 *Sobreapamiento de los espectros de emisión del donador y absorción del aceptor (modificado de ref. 46).*

3.3 Efecto FRET entre mutantes de GFP.

Hay diversas variantes de la proteína verde fluorescente, pero no todas las parejas de proteínas pueden presentar un buen efecto FRET, cuyos cambios puedan ser medidos¹².

Para elegir una pareja de donador-aceptor adecuada deben considerarse la intensidad de fluorescencia, la sensibilidad al pH, la eficiencia en el plegamiento (maduración) y la resistencia al *photobleaching* (pérdida de fluorescencia por exposición prolongada a la fuente de iluminación) de cada una de las mutantes¹².

Uno de los requisitos para que se dé la transferencia de energía entre fluoróforos es que exista un alineamiento adecuado entre los momentos de los dipolos transitorios del aceptor y el donador³¹. El factor de orientación (k^2) es una medida de la dependencia que existe entre la orientación de los dipolos y la interacción entre ellos. Este factor de orientación es algo difícil de controlar, y

depende mucho de la naturaleza del *oligopéptido de unión* entre fluoróforos, así que sólo pueden compararse las construcciones que tengan el mismo oligopéptido de unión^{12, 31}.

Puesto que en cada proyecto se utilizan diferentes oligopéptidos de unión, puede ser que la pareja de GFP's teóricamente sea una buena opción, pero esto sólo puede comprobarse experimentalmente²⁶.

3.4 Aplicaciones del efecto FRET entre GFP's.

El efecto FRET intramolecular entre GFP's puede servir para medir la actividad de alguna proteasa: si el oligopéptido de unión entre ellas es el sitio activo de la proteasa la actividad podrá medirse por la desaparición del efecto FRET¹¹.

Para medir niveles de calcio se pueden utilizar dos mutantes de GFP acopladas a dos dominios de la proteína sensible a calcio, los cuales sabemos que se encontrarán cercanos cuando aumente el calcio en el medio y la proteína cambie su conformación. Así, la aparición del efecto FRET sería un indicador del aumento del ion. Alternativamente, las mutantes de GFP se acoplarían a dos dominios que se encuentren cercanos en un nivel basal y que se separen al aumentar el calcio^{13,14}.

El efecto FRET puede medirse también entre dos moléculas, lo cual serviría para detectar asociación y disociación entre ellas. Lo único que habría que hacer es acoplar GFP's a ambas¹.

El efecto FRET que se pretende utilizar en el sistema de este trabajo es de tipo intramolecular.

4. Opacamiento de la fluorescencia o *quenching*.

El opacamiento o disminución de la fluorescencia puede deberse a diversos factores^{37,38}:

- 1) Colisión del fluoróforo con otros átomos o moléculas (opacamiento activo).
- 2) Cambios en la concentración y la temperatura.
- 3) Polimerización de la molécula fluorescente (opacamiento pasivo).
- 4) Reacciones de la molécula en su estado excitado (*exciplex*) con otros componentes del medio (opacamiento activo).
- 5) Transferencia de energía.
- 6) Formación de complejos entre una molécula opacante o *quencher* y el fluoróforo. Este complejo tiende a relajarse en forma no radiante (opacamiento pasivo).
- 7) La presencia de oxidantes o reductores fuertes en el medio (opacamiento activo).
- 8) *Quenching* aparente, debido a las propiedades ópticas de la muestra (por ejemplo, por aumento en la densidad óptica o turbidez).

¿Cómo distinguir entre un opacamiento activo y uno pasivo?. Pues bien, al aumentar la temperatura, el opacamiento activo aumenta, puesto que la energía cinética de las moléculas aumenta y con ello aumenta el número de colisiones. En el caso de un opacamiento pasivo ocurre el efecto contrario, porque al aumentar el movimiento la formación de complejos es menos estable³⁷.

5. Ribozimas.

5.1 ¿Qué son las ribozimas?

Descubiertas por Tom Cech y sus colaboradores en la década de los ochentas, las ribozimas se definen como secuencias de ARN antisentido que tienen actividad catalítica, es decir, que pueden hibridarse con una secuencia de ARN complementario y procesarlo sin perder la habilidad de hibridar y procesar otras secuencias de ARN blanco¹⁶. Algunas tienen sólo la habilidad de cortar el ARN complementario, mientras que otras pueden cortar y también ligar las secuencias blanco (como la ribozima *Hairpin*)²⁸.

El ARN mensajero eucariótico (ARNm) tiene que madurar antes de salir del núcleo y poder traducirse a proteína en los ribosomas^{36, 39}. La maduración del ARNm consiste en dos procesos:

- a) Adición de CAP en el extremo 5' y un segmento de poliadeninas en el extremo 3', que protegen de la degradación inmediata.
- b) *Splicing* o escisión y eliminación de los intrones (*secuencias del ARNm que no se traducen a aminoácidos*) y ligación por transesterificación de los exones (*secuencias que sí se traducen a aminoácidos*).

Cech y sus colaboradores descubrieron que algunos intrones eran capaces de catalizar las reacciones de *splicing* para dar lugar al ARNm maduro y les llamaron a estas moléculas de ARN **ribozimas**²⁸.

5.2 Características generales.

Todas las ribozimas (con excepción de la RNAsa P) catalizan reacciones en las que se modifican a sí mismas (actúan en *cis*), sin embargo pueden modificarse por ingeniería genética para que actúen sobre otros sustratos en moléculas ajenas sin alterarse ellas mismas (actuar en *trans*), de ahí su potencial terapéutico²⁸.

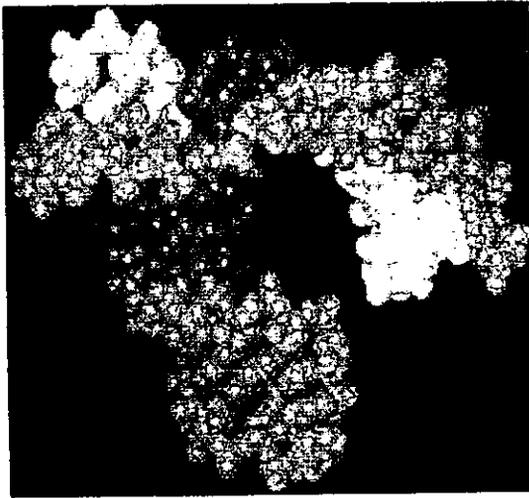


Fig. 7 Estructura secundaria de la ribozima "cabeza de martillo" (Hammerhead). (Modificado de ref. 47).

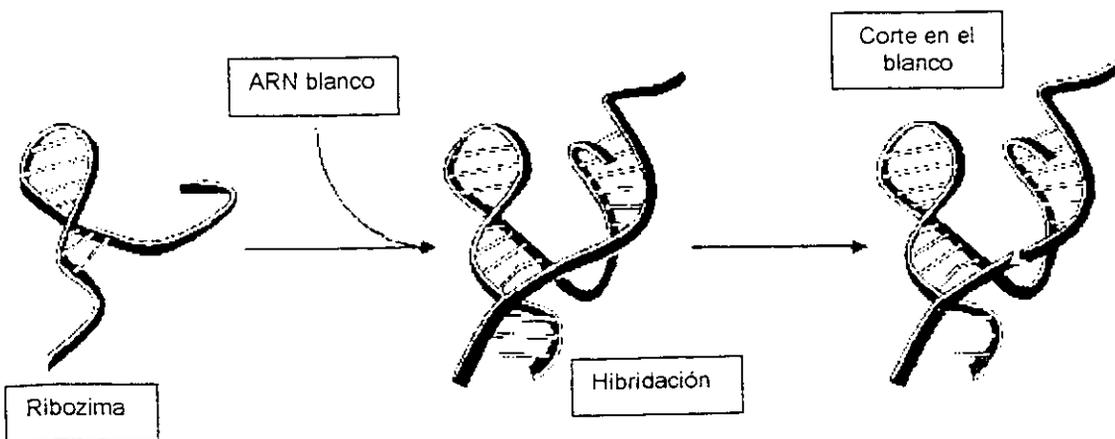


Fig. 8 Modo de acción de las ribozimas (modificado de ref.48).

Las ribozimas son consideradas como metaloenzimas, porque requieren en mayor o menor medida de la presencia del ion Mg^{2+} para llevar a cabo la catálisis^{28,30}.

Su velocidad de catálisis, cuando el substrato está en exceso respecto a la ribozima, se determina por la fórmula K_{cat}/K_m . Se pueden observar rendimientos de $10^8 M^{-1} min^{-1}$ ²⁸.

Su capacidad de recambio es menor que la que poseen los enzimas protéicos, por lo que es fácil que su sitio activo se sature. Ésta es una de las características que pueden modificarse por ingeniería genética²⁸.

Las ribozimas se dividen en dos clases:

- a) **Los ARN's catalíticos grandes** (RNAsa P, intrones de los grupos I y II), cuyo tamaño varía desde algunos cientos de nucleótidos a tres mil nucleótidos. Estos ARN's catalizan reacciones que generan intermediarios y productos con hidroxilos en 3' y fosfatos en 5'. Se les puede encontrar en mitocondrias de hongos y plantas, bacteriófagos, virus de eucariotes, eubacterias, etc.^{28,30}.
- b) **Los ARN's catalíticos pequeños** (ribozimas *hammerhead*, *hairpin*, hepatitis delta y VS), cuyo tamaño va desde 35 a 155 nucleótidos aproximadamente y que generan productos con fosfatos cíclicos 2'-3' e hidroxilos en 5'.

Los ARN's catalíticos pequeños se encuentran generalmente en patógenos de plantas llamados *viroides*, *virusoides* y *virus satélites*, pero también puede encontrárseles en los ARNs satélites de las salamandras, en los hongos como *Neurospora*, y algunos virus satélites de humano²⁸.

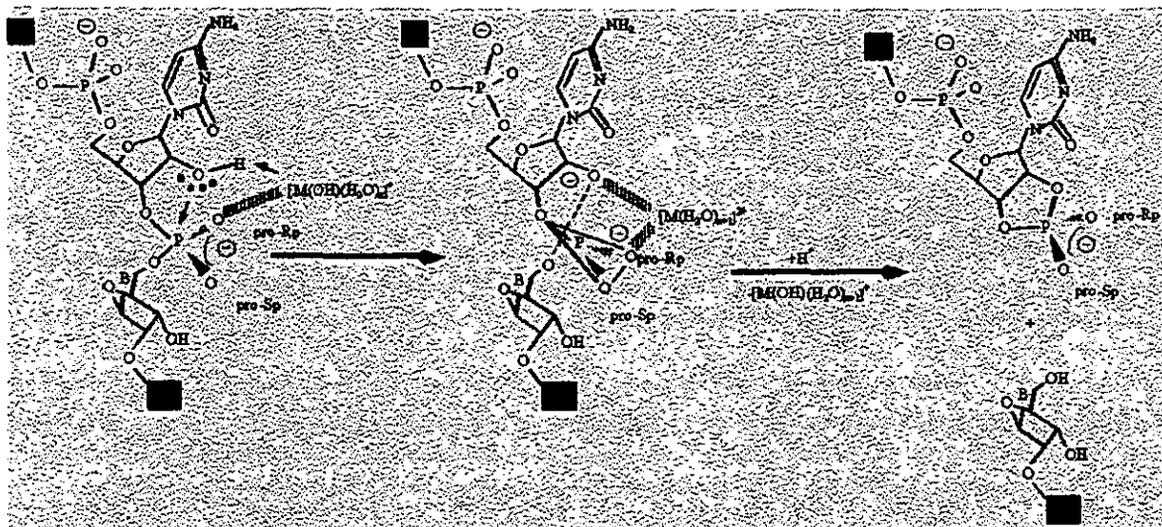


Fig. 9 *Mecanismo de acción de los ARN's catalíticos pequeños (tomado de ref.49).*

Por ser de menor tamaño y más fácilmente manipulables, los ARN's catalíticos pequeños son los que se utilizan con mayor frecuencia como agentes terapéuticos. Se pueden producir por síntesis química e introducir en las células por medio de vectores virales (adenovirus y retrovirus) y no virales (liposomas) 15,28

Como se puede ver en las figuras 7 y 8, las ribozimas adoptan una estructura secundaria característica. Tienen una zona catalítica, y las secuencias aledañas hibridan con el ARN blanco. Estas son las secuencias que se modifican para dirigir a la ribozima contra un substrato específico. Mientras más larga sea la secuencia

complementaria es mayor la especificidad de unión con el sustrato. Sin embargo, si la secuencia complementaria es mayor de 15 nucleótidos, la afinidad aumenta hasta el punto en que la liberación del producto del sitio activo se vuelve muy lenta, lo que impide una catálisis eficiente¹⁵.

5.3 Aplicación terapéutica de las ribozimas.

En general, el uso de ribozimas se ha aplicado a padecimientos que involucran la sobreexpresión de un gen. El blanco puede ser un gen externo al organismo (un gen viral) o bien un gen endógeno con mutaciones (un protooncogen activado, por ejemplo)¹⁵.

¿Qué ventajas tiene el uso de ribozimas sobre otros agentes terapéuticos?: las ribozimas son capaces de encontrar su sustrato entre otros ARN's, además pueden expresarse de forma inducible (poniéndolas bajo un promotor adecuado) y no causan otros efectos biológicos o daños en el organismo en el que se expresan. Además, tienen la capacidad de procesar más de una molécula de blanco sin perder su actividad catalítica, a lo cual se le llama *capacidad de recambio múltiple*¹⁵.

A continuación se mencionan algunos casos en que se han utilizado ribozimas:

- 1 **Infecciones virales agudas y crónicas**, como el cáncer cervicouterino producido por papilomavirus humano tipo 16, el HIV antes de la producción de SIDA, la transformación de linfocitos B por el virus de Epstein-Barr^{15,16,18,20}.

- 1 **Cáncer.** En los casos en que se conoce el producto del oncogen, como el caso de la leucemia mielocítica crónica, o el carcinoma de células EJ de la vejiga¹⁵.
- 1 **Otros padecimientos.** Enfermedades cardiovasculares, rechazo de trasplantes, osteoartritis, enfermedades de tipo inmunológico¹⁵.

5.4 Diseño, selección y evaluación de ribozimas.

Para diseñar nuevas ribozimas se requiere conocer la secuencia del gen que se sobreexpresa y por lo tanto la de su ARNm. Se seleccionan los sitios de corte posibles y sus secuencias aledañas mediante un programa de computadora¹⁵.

Una vez hecho esto, pueden hacerse pruebas con oligonucleótidos antisentido de DNA (*moléculas de una cadena que hibridan con el ARNm impidiendo su actividad, pero que no lo cortan*) dirigidos hacia la misma secuencia que las ribozimas, para probar que los sitios blanco son accesibles¹⁵.

En diversos artículos se han mencionado formas de evaluar las ribozimas, que se enlistan a continuación:

- a) Con substrato marcado radiactivamente: Incubando una mezcla de substrato marcado con [³²P] y ribozima, o haciendo un ensayo de transcripción y traducción *in vitro*, con marca de [³⁵S] metionina. Tras ambos ensayos se hace una electroforesis en gel de poliacrilamida y luego una autorradiografía del gel^{16 a 19, 24, 25}.
- b) Por RT-PCR de los extractos celulares y después revisando por electroforesis cuánto se amplifica el ARNm blanco^{16, 18, 21}.

- c) Usando la secuencia blanco ligada a la secuencia de un gen reportero (*un gen cuyo producto sirve para monitorear la expresión de un gen de interés*), como la β -galactosidasa, CAT (cloramfenicol acetil transferasa) o luciferasa^{17, 20, 23}.
- d) Realizando HPLC (cromatografía líquida de alta afinidad) de la mezcla substrato-ribozima previamente incubada²².

Todos estos sistemas de evaluación presentan desventajas:

- 1) El uso de material radiactivo, lo que involucra el establecimiento de protocolos de seguridad, manejo y desecho de los productos radiactivos.
- 2) La manipulación directa del ARN de las células, que requiere de cuidados especiales y además es inevitable la degradación, aunque sea en menor grado.
- e) La determinación de la actividad de β -galactosidasa, CAT o luciferasa se tiene que hacer con extractos celulares, lo que implica una cuidadosa manipulación de las muestras.
- f) La mayoría de los ensayos son *in vitro*, y los resultados no necesariamente correlacionan con lo que se observa *in vivo*.
- g) El HPLC, aunque es específico, también es *in vitro* y además es muy costoso.

6. Hipótesis.

Con base en esta información, se decidió desarrollar un sistema reportero para evaluar la actividad catalítica de ribozimas terapéuticas *in vivo*, aprovechando que entre dos mutantes de la proteína verde fluorescente (GFP) puede ocurrir un efecto FRET. Seleccionamos las variantes EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), que funciona como aceptor de energía y ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*), que funciona como donador de energía, basándonos en el hecho de que los espectros de emisión de ECFP y de absorción de EGFP se sobrelapan en una sección bastante amplia (figuras 3 y 4).

Nuestro sistema reportero funcionaría de la siguiente manera: un vector plasmídico con los genes para EGFP y ECFP en tándem (para que la distancia sea menor a 100 Å), y entre ellas la secuencia de reconocimiento para la ribozima, se introduce en las células donde se prueba a la ribozima. Cuando el vector plasmídico se transcribe, se produce un ARN mensajero bicistrónico (con las secuencias para ambas mutantes) y pueden suceder dos eventos: si la ribozima es inactiva, el ARN mensajero se conserva y se traduce en una proteína quimérica con un fluoróforo donador y uno aceptor, la cual puede hacer un efecto FRET. Por otro lado, si la ribozima es activa, el ARN mensajero sufre un corte y únicamente se traduce a proteína el fluoróforo aceptor (porque el resto de la secuencia ya no tiene regiones de anclaje al ribosoma), que se encuentra en el extremo 3' de la secuencia, lo que llevaría a la pérdida del efecto FRET porque ya no existiría un donador. (fig.10)

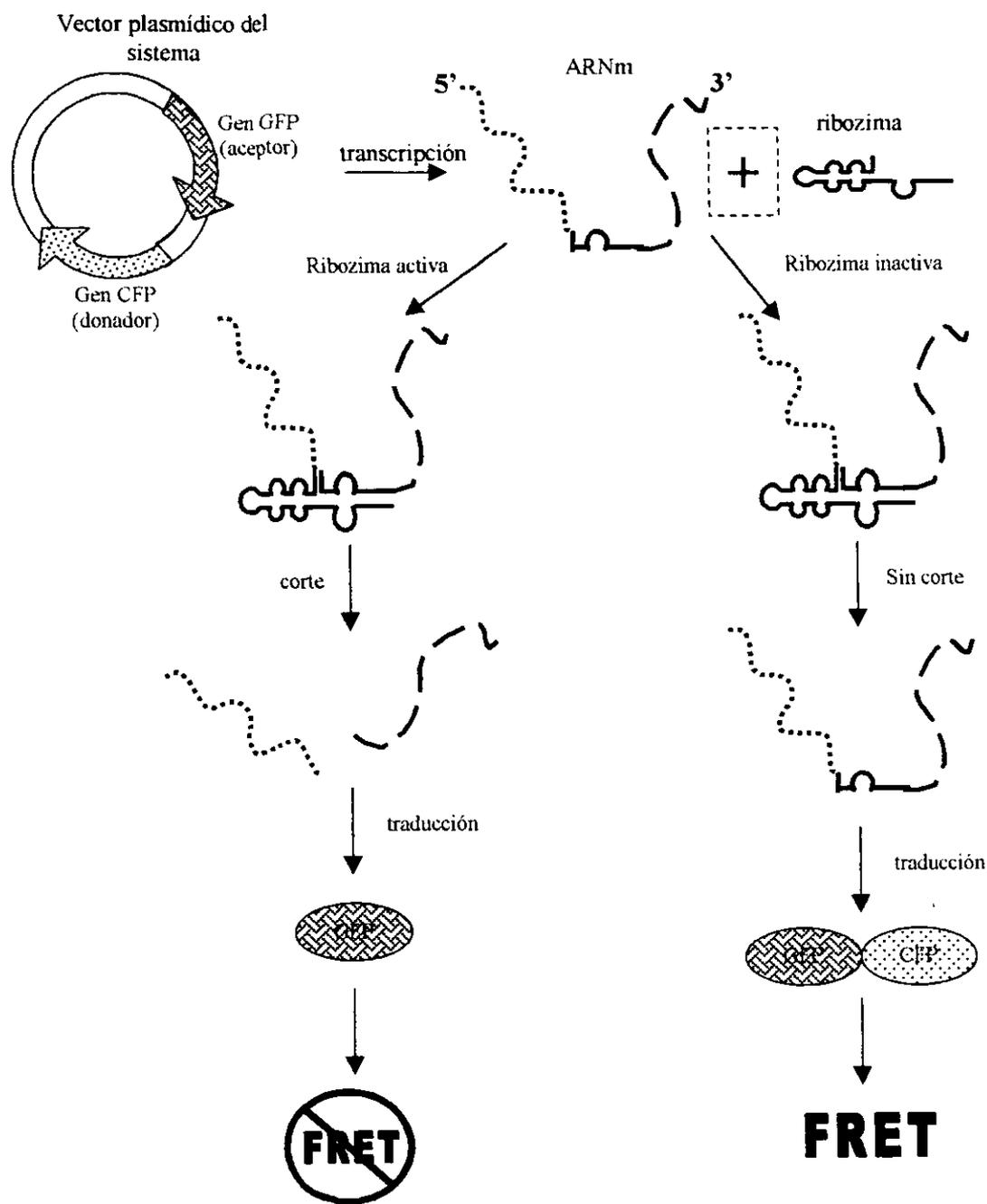


Fig.10 *Funcionamiento del sistema reportero FRET.*

Aún cuando los espectros de emisión y absorción de ECFP y EGFP se sobrelapan, no tenemos la seguridad de que pueda ocurrir un efecto FRET entre ellas, puesto que la aparición del efecto depende de otros requisitos mencionados anteriormente, como la distancia. Por ello es necesario construir un control positivo y probar, mediante experimentos de fluorescencia, que nuestra pareja de donador-aceptor es capaz de presentar un efecto FRET.

El control positivo tiene los mismos elementos que un sistema a desarrollar, únicamente no posee un sitio de reconocimiento para ribozima entre el donador y el aceptor.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

El sistema (control positivo) se construyó para ser expresado en bacterias, puesto que el uso de cultivo celular es muy costoso y nuestro objetivo principal sólo es comprobar que puede suceder un efecto FRET entre la pareja de proteínas verdes fluorescentes elegida.

Se construyó el vector plasmídico del sistema: *pGST-FRET* que, de acuerdo con el mapa que se ilustra en la página 71, contiene de 5' a 3' las secuencias para la glutatión-S-transferasa (GST), la proteína verde fluorescente (GFP, *aceptor*) y la proteína cian fluorescente (CFP, *donador*), separadas éstas últimas entre sí por aproximadamente 63 pares de bases (21 aminoácidos). Todas estas secuencias están en un solo marco abierto de lectura (ORF).

Como esqueleto de construcción de este vector se eligió al plásmido *pGEX-2TK-MCS*, cuyo mapa también se encuentra en la página 67, porque pueden clonarse los genes de las GFP's río abajo del gen para GST y expresarlas como un producto de fusión con este enzima, lo cual facilita su posterior purificación. Su expresión se rige por el promotor de lac, por lo que es inducible con lactosa o análogos de ésta (IPTG). Además posee un gen de resistencia a ampicilina (*amp^r*).

Como controles de este sistema, se generaron otros vectores plasmídicos con el mismo esqueleto:

pGST-GFP (con el que ya contábamos, pero que se describe más adelante cómo se obtuvo) y *pGST-CFP*, que expresan los productos de fusión GST-GFP y GST-CFP respectivamente. Los productos de éstos vectores permiten analizar el comportamiento de las proteínas fluorescentes unidas al enzima.

También se construyó el vector *pGST-FRET1*, que posee todas las secuencias que contiene el vector *pGST-FRET* pero la secuencia para CFP está fuera de marco de lectura, por lo cual el producto de su expresión es similar al de *pGST-GFP*. Al no poseer fluoróforo donador, el producto de fusión de este vector no produce FRET.

A continuación se presentan los diagramas de flujo para la construcción de los vectores plasmídicos.

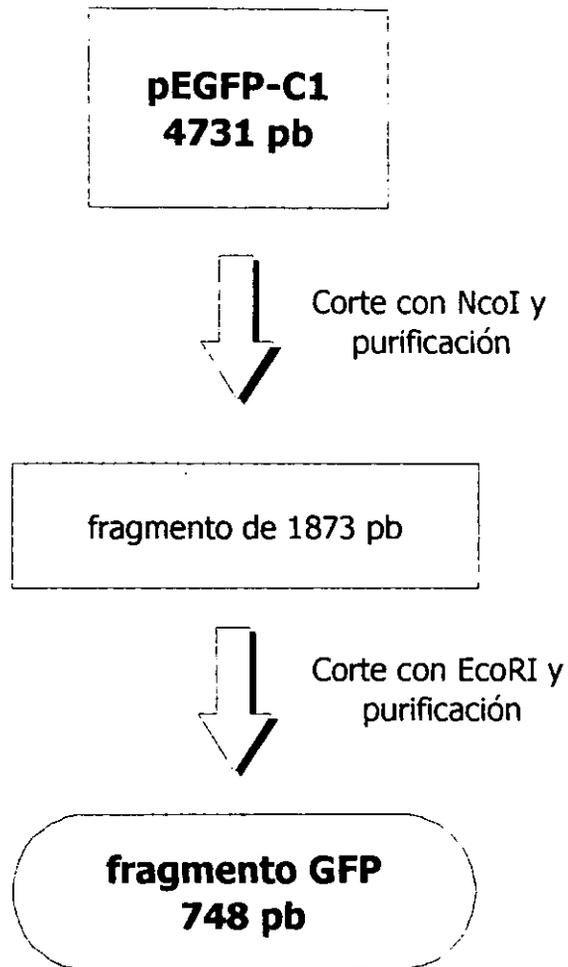


Fig. 11 *Obtención del gen GFP*

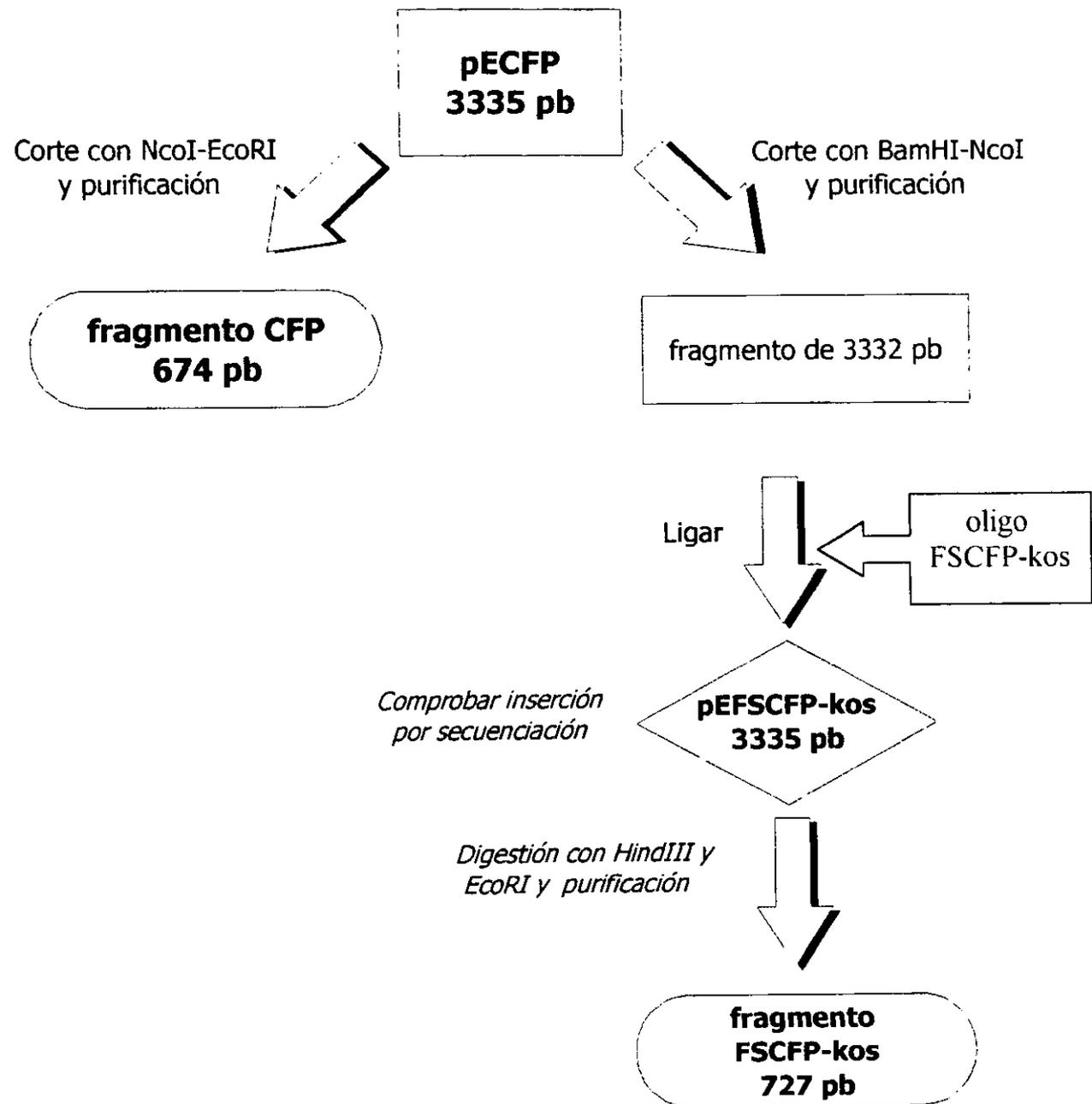


Fig. 12 Obtención del gen CFP

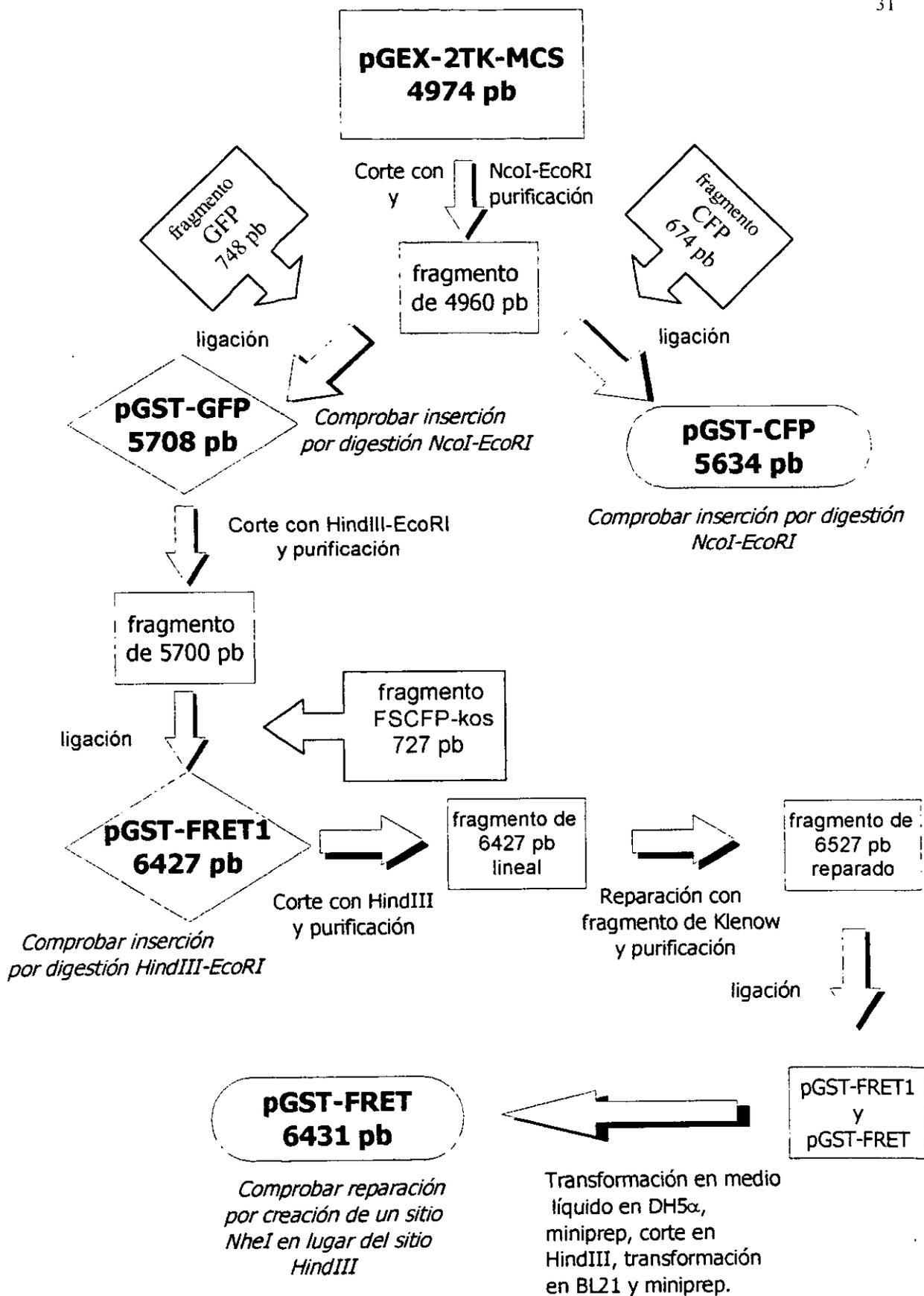


Fig.13 Construcción del sistema FRET y sus controles

OBJETIVOS.

Objetivo general.

- ✓ Construir un sistema reportero (control positivo) con dos mutantes de la proteína verde fluorescente (GFP), que sea capaz de presentar un efecto FRET.

Objetivos particulares.

- ✓ Construir los vectores *pGST-CFP*, *pGST-FRET* y *pGST-FRET1**.
- ✓ Demostrar mediante Inmunolectrotransferencia que la inducción de la expresión en bacterias de los vectores *pGST-GFP*, *pGST-CFP*, *pGST-FRET* y *pGST-FRET1* produce proteínas quiméricas de diferentes tamaños.
- ✓ Demostrar mediante ensayos de fluorescencia *in vivo*, que la proteína quimérica GST-FRET produce efecto FRET.

*Nota: ya contamos con los vectores *pGEX-2TK-MCS* y *pGST-GFP*.

MÉTODOS.

1. Preparación de bacterias competentes.

(Modificado de ref. 43)

En 1970, Mandel y Higa observaron que a las bacterias tratadas con soluciones frías de cloruro de calcio y a las cuales se les aplica un choque térmico, puede introducirseles ADN externo.

Las bacterias obtenidas por el método descrito a continuación, que es similar al de Mandel y Higa, dieron alrededor de 10^6 colonias de transformantes por microgramo de ADN utilizado.

Estas bacterias se conservan viables durante 1 mes si se mantienen congeladas a -70°C .

a) En un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril, se vertieron 30 mL de medio Luria-caldo estéril (*ver apéndice A*) y se guardó a temperatura ambiente y en obscuridad durante una noche para comprobar la esterilidad.

b) Por otro lado, en un tubo de ensayo estéril se vertieron 3 mL de medio Luria caldo estéril, al cual se le inoculó una asada de bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α ($F^+ \phi 80d lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 end A1 hsdR17 (r_k^-, m_k^+) pho A sup E44 \lambda^- thi-1 gyr A96 rel A1$) o BL21 (DE3) ($F^- dcm ompT hsdS (r_b^-, m_b) gal \lambda (DE 3)$). Este tubo se incubó a 37°C con agitación (100 a 200 rpm) durante una noche.

c) Del cultivo bacteriano obtenido en el tubo de ensayo se tomaron 300 μ L y se inocularon en el matraz Erlenmeyer ya mencionado (dilución aproximadamente 1:100). El matraz inoculado se incubó a 37°C con agitación durante 2.5 horas.

d) El contenido de este matraz se dividió en dos tubos de poliestireno de 15 mL estériles con taparosca (*Falcon 2095*), los cuales se incubaron en hielo durante diez minutos.

e) Tras la incubación, ambos tubos se centrifugaron a 2,500 rpm (*centrifuga IEC CENTRA CL2*) durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó en un vaso con hipoclorito de sodio.

f) El botón bacteriano se resuspendió en el medio remanente y se agregó a cada tubo 7.5 mL de una solución estéril fría de cloruro de calcio 0.1 M.

g) Se incubaron ambos tubos durante 25 minutos en hielo.

h) Se centrifugaron ambos tubos a 2 500 rpm (*centrifuga IEC CENTRA CL2*) durante 15 min, tras lo cual volvió a desecharse el sobrenadante en hipoclorito de sodio.

i) El botón bacteriano se resuspendió y se agregaron a cada tubo 0.5 mL de la solución de cloruro de calcio 0.1 M estéril fría.

j) Esta suspensión bacteriana se distribuyó en alícuotas de 50, 100 o 200 μ L, según se necesitó, en microtubos Eppendorf de 1.5 mL. A cada uno de estos microtubos se agregaron dos gotas de glicerol, se mezclaron bien y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

2. Transformación de bacterias.

(Modificado de ref. 43)

El ADN plasmídico se introdujo a las bacterias dándoles un choque térmico, tras el cual se incubaron en medio SOC (ver apéndice A), para que se recuperaran. Para seleccionar las bacterias transformantes, se sembraron en medio con ampicilina, puesto que todos los plásmidos utilizados tienen un gen amp^r .

- a) Se descongelaron los microtubos de bacterias a utilizar en un baño de hielo. A cada microtubo se agregaron al menos 10 ng de ADN y se mezclaron suavemente con la punta de la micropipeta.
- b) La mezcla ADN-bacterias se incubó en hielo durante media hora.
- c) Para dar el choque térmico, se incubaron las bacterias a 42°C durante 2 minutos y se pasaron inmediatamente a un baño de hielo por tres minutos.
- d) Posteriormente, se añadió 1 mL de medio SOC a 37°C, mezclando por inversión.
- e) Las bacterias se incubaron durante una hora a 37°C con agitación vigorosa (a 100 o 200 rpm).
- f) Los microtubos fueron centrifugados a 12,500 rpm durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante en hipoclorito de sodio hasta dejar unos 100 μ L en el microtubo.
- g) El botón bacteriano se resuspendió y se transfirió a una caja de Petri con medio Luria-agar (ver apéndice A) con ampicilina 100 μ g/mL y se espató.
- h) La caja se incubó durante una noche a 37 °C.

3. Extracción de plásmidos.

Para la obtención de plásmidos se utilizó el kit **Quantum Miniprep de Bio Rad**.

- a) Se sembró una asada de la colonia de bacterias seleccionada en 3 mL de medio Luria-caldo con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- b) Se incubó el tubo a 37 °C con agitación (100 o 200 rpm) durante una noche.
- c) Se transfirieron 1.5 mL de este cultivo a un microtubo Eppendorf de 2 mL.
- d) Se centrifugó el microtubo a 12,500 rpm (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*) durante un minuto y se decantó el sobrenadante en un vaso con hipoclorito de sodio.
- e) Se transfirió el resto del cultivo al mismo microtubo y se repitió el paso d.
- f) Se agregaron 200 μL de la solución de resuspensión y se agitó en vórtex hasta resuspender el botón bacteriano.
- g) Se agregaron 250 μL de la solución de lisis y se agitó por inversión suave.
- h) Se añadieron 250 μL de la solución de neutralización y se agitó por inversión suave.
- i) Se centrifugó a 12,500 rpm durante 5 minutos (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*). Mientras tanto, se resuspendió la matriz mediante agitación en vórtex y se colocó un filtro de columna en el siguiente microtubo.
- j) Se agregaron 200 μL de la suspensión de la matriz gota a gota sobre la pared del microtubo.
- k) Se resuspendió dos veces con la micropipeta, de forma suave y sin llevarse el detritus celular adherido a la pared del microtubo.

- l) Se transfirió 1 mL de esta suspensión al microtubo con el filtro.
- m) Se centrifugó el microtubo con filtro a 13,000 rpm durante 30 segundos (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*) y se desechó el líquido filtrado.
- n) Se vertieron 500 μ L de la solución de lavado sobre la arenilla y se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 segundos (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*), posteriormente se desechó el líquido filtrado.
- o) Se repitió el paso n, pero centrifugando durante 2 minutos.
- p) Se vertieron 100 μ L de agua desionizada esterilizada sobre la arenilla y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 segundos (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*).
- q) Se almacenó a -20°C el líquido filtrado.

4. Electroforesis horizontal en gel de agarosa.

(Modificado de ref. 43)

Debido a que el ADN posee carga negativa a pH 8, puede hacerse migrar en un campo eléctrico a través de un soporte, en este caso un gel de agarosa. La distancia que migre el ADN depende de su tamaño y de su conformación. Mediante la electroforesis podemos analizar estas dos características en las muestras de ADN.

- a) Se preparó la cámara de electroforesis (*Horizon 58, Life Techonolgies*) colocando el soporte del gel, los diques y el peine del número de pozos requeridos.

- b) Se fundió la agarosa en amortiguador TBE 1x (*ver apéndice A*) calentando en horno de microondas hasta observar una solución transparente.
- c) Se vertió la solución de agarosa sobre el soporte para el gel y se dejó solidificar.
- d) Se vertió amortiguador TBE 1x en la cámara de electroforesis hasta cubrir la superficie del gel.
- e) Se retiraron los diques y el peine de forma suave, para no romper los pozos.
- f) Se mezcló la muestra con la cantidad de amortiguador de carga adecuado (*BIO RAD*) sobre un parafilm.
- g) Se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular (de 1 kb para plásmidos y 100 pb para oligonucleótidos, *Life Technologies*) en los pozos.
- h) Se corrió el gel a 100 voltios durante 30 minutos.
- i) Se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/mL durante 3 a 5 minutos y se volvió a colocar en la cámara de electroforesis.
- j) Se corrió el gel nuevamente a 100 voltios durante 10 minutos.
- k) Se observó el gel en un transiluminador de luz UV (λ 340 nm) y se le tomó una fotografía.

5. Extracción fenólica y precipitación con etanol de ADN.

(Modificado de ref. 43)

Para retirar proteínas de las soluciones de ácidos nucleicos, se aprovecha que estos últimos no son solubles en solventes orgánicos tales como el fenol y el

cloroformo. Posteriormente, se concentran las muestras con etanol y acetato de amonio, que provocan la precipitación del ADN.

a) Se llevó el volumen de la muestra hasta 100 o 150 μL con agua desionizada esterilizada (ultrapura). Este es el volumen inicial de muestra o *VIM* en los siguientes incisos.

b) Se añadió la mitad del *VIM* de fenol saturado con agua y se agitó vigorosamente.

c) Se añadió la mitad del *VIM* de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 y se agitó vigorosamente en un vórtex.

d) Se centrifugó a 12,500 rpm durante 5 minutos (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*).

f) Se tomó la fase superior y se transfirió a otro microtubo.

g) Se agregó la mitad del *VIM* de acetato de amonio 7.5 M y se agitó vigorosamente.

h) Se agregaron dos *VIM* de etanol absoluto frío y se agitó por inversión.

i) Se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mínimo 1 hora.

j) La muestra se centrifugó a 12,500 rpm durante 30 minutos (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*) y se decantó la fase líquida.

k) Se agregaron dos volúmenes de etanol al 70% y se mezcló por inversión.

l) Se centrifugó a 12,500 rpm durante 5 minutos (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*) y se decantó el sobrenadante.

m) Se secó el botón de ADN durante 5 minutos a temperatura ambiente.

n) Se resuspendió el ADN en un volumen adecuado de agua desionizada esterilizada (10 a 30 μ L), hasta observar una solución transparente.

6. Restricción de plásmidos.

(Modificado de ref. 43)

- a) En un microtubo de 1.5 mL libre de nucleasas se agregó:
- ◆ El plásmido en solución acuosa (desde 500 ng hasta 10 μ g)
 - ◆ Un décimo del volumen final de reacción del amortiguador adecuado para cada enzima (solución concentrada 10x). En el caso de una restricción doble, se añadió el amortiguador en el que ambas enzimas son capaces de cortar de manera eficiente.
 - ◆ 1 a 10 unidades internacionales de la enzima adecuada.
 - ◆ Agua desionizada esterilizada c.b.p. el volumen final deseado.
- b) Esta mezcla se incubó en un baño a 37 °C de una a dos horas.

7. Ligación de vectores con fragmentos.

(Modificado de ref. 43)

- a) En un microtubo de 1.5 ml libre de nucleasas se agregaron:
- ◆ El plásmido linearizado y purificado (unos 100 ng) en solución acuosa.
 - ◆ El fragmento a clonar en solución acuosa y en una proporción molar 3:1 a 10:1 con respecto al plásmido.

- ◆ Un quinto del volumen final de muestra del amortiguador para ligasa T4 (solución concentrada 5x).
 - ◆ Una unidad internacional de ligasa T4.
 - ◆ Agua desionizada esterilizada c.b.p. el volumen final deseado.
- b) Esta mezcla se incubó a 4 °C durante una noche y a 37 °C durante 20 minutos.

8. Secuenciación.

*Se utilizó el método manual de Sanger, que hace uso de la sequenasa. Para este fin se utilizó el kit **T7 Sequenase v.2.0** de **Amersham**.*

Al ADN desnaturalizado por NaOH se agregaron varias moléculas de un oligonucleótido cebador (una secuencia corta de ADN de una hebra) que hibridan con el ADN molde en una zona adyacente a aquélla que se quiere secuenciar. Neutralizamos el medio de reacción y agregamos los deoxinucleótidos trifostados, uno de ellos marcado radiactivamente [α - ^{35}S]dATP, el ditiotreitól que requiere la sequenasa y ésta última, que es una ADN polimerasa.

La polimerasa agrega deoxinucleótidos en la dirección 5'-3' a las moléculas de cebador, de forma que se obtienen varias cadenas de hebra sencilla con la secuencia que nos interesa, de diferentes longitudes y marcadas radiactivamente.

Esta mezcla se divide en microtubos que contienen uno de los nucleótidos en su forma dideoxi, es decir, que en su posición 3' posee un hidrógeno en lugar de un grupo hidroxilo y por lo tanto no puede ligarse a otro nucleótido río abajo. La

polimerasa continúa agregando nucleótidos y se detiene cuando incluye un dideoxinucleótido a cada cadena.

En cada microtubo se obtiene una mezcla de cadenas de diferentes tamaños que terminan en adeninas, citosinas, timinas o en guaninas. Estas mezclas se someten a electroforesis en un soporte de poliacrilamida, cuya resolución es tan alta que permite distinguir entre dos cadenas con un nucleótido de diferencia.

Es importante mencionar que este método no lo desarrollé directamente puesto que no tengo los permisos para manejar material radiactivo.

9. Inducción de proteínas recombinantes.

(Modificado de ref. 50).

Los plásmidos con el gen GST tienen en 5' las regiones regulatorias del operón lac (ver apéndice C), de manera tal que su expresión dentro de las bacterias no es constitutiva, sino inducible.

Para promover su expresión, es necesario cultivar a las bacterias en un medio que contenga lactosa, o bien un galactósido inductor como es el IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido). Estas sustancias promueven la disociación de la proteína represora del promotor, permitiendo que la RNA pol se pueda asentar en esta región y comenzar la transcripción de los genes río abajo.

El macroensayo se utilizó para obtener las proteínas recombinantes para el Western blot, lisando las bacterias obtenidas por sonicación, mientras que el microensayo se utilizó para obtener las bacterias para ensayos de fluorescencia.

Macroensayo:

a) El día anterior al ensayo de inducción se resembraron las muestras de bacterias en 3 mL de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al mismo tiempo se preparó un matraz Erlenmeyer con 50 mL de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ por cada muestra de bacterias. Los matraces se dejaron a temperatura ambiente y en obscuridad durante toda la noche como prueba de esterilidad.

b) El día del ensayo se vertieron los 3 mL de suspensión bacteriana obtenida al matraz correspondiente con 50 mL de medio. Esta mezcla se incubó a 30 °C y 200 rpm durante 2 horas (*Environ Shaker 3528-5, Lab-Line*).

c) Se añadieron a cada matraz 500 μL de una solución de IPTG 100 mM. La mezcla se incubó durante 2 horas más para las muestras con pGST-FRET y pGST-FRET1 y 1.5 horas más para las muestras con pGST, pGST-GFP y pGST-CFP, a 30 °C y 200 rpm (*Environ Shaker 3528-5, Lab-Line*).

d) El contenido de los matraces se vació en tubos estériles Falcon con taparrosca de 50 mL. Estos tubos se enfriaron previamente en un baño de hielo por 10 minutos.

e) Los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos (*centrifuga IEC CENTRA CL2*) para empastillar las bacterias. El sobrenadante se eliminó sobre hipoclorito de sodio.

f) Al botón bacteriano se le agregaron 500 μL de amortiguador de lisis frío (*ver apéndice A*), se resuspendió varias veces con la micropipeta.

g) El botón bacteriano se sonicó en cuatro intervalos de 30 seg alternados por intervalos de 30 seg. en baño de hielo.

h) El lisado obtenido se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm, tras lo cual se separó el sobrenadante en un microtubo limpio. A este microtubo se le agregaron unas gotas de glicerol.

Microensayo:

a) El día anterior al ensayo de inducción se resembraron las muestras de bacterias en 3 mL de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al mismo tiempo se prepararon dos tubos con 3 mL de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por cada muestra de bacterias. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante toda la noche como prueba de esterilidad.

b) El día del ensayo se vertieron 180 μL de la suspensión bacteriana obtenida a cada uno de los tubos correspondientes con 3 mL de medio. Esta mezcla se incubó a 30 °C y 200 rpm durante 2 horas (*Environ Shaker 3528-5, Lab-Line*).

c) Se añadieron 30 μL de una solución de IPTG 100 mM a una serie de tubos (la otra serie funcionó como control no inducido). La mezcla se incubó durante 2 horas más a 30 °C y 200 rpm (*Environ Shaker 3528-5, Lab-Line*).

d) El contenido de los tubos se transfirió a microtubos de 1.5 mL .

e) Los tubos se centrifugaron a 12, 500 rpm durante 1 minuto (*centrifuga Biofugue pico de Sorvall*) para empastillar las bacterias. El sobrenadante se eliminó sobre hipoclorito de sodio. Esto se realizó dos veces.

- f) Al botón obtenido se le agregaron 900 μL de amortiguador PBS (*ver apéndice A*) y se resuspendió la mezcla con la micropipeta.
- g) La mezcla bacterias-amortiguador se centrifugó a 12,500 rpm durante 5 minutos (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*), tras los cuales se eliminó el sobrenadante sobre hipoclorito de sodio.
- h) Se repitieron los pasos e y f dos veces más, pero centrifugando durante 10 y 5 minutos respectivamente.
- i) Tras el tercer lavado, se retiró sobrenadante con la micropipeta hasta dejar un volumen de 500 μL en el microtubo. Las bacterias se resuspendieron en este volumen.

10. Densidad óptica.

- a) Se hicieron diluciones 1:10 (900 μL de PBS + 100 μL de la muestra) de cada muestra bacteriana.
- b) Se determinó la densidad óptica de estas diluciones a 630 nm.
- c) Se ajustó la cantidad de bacterias de las muestras a la densidad óptica de la muestra menos concentrada de cada ensayo, para los ensayos de fluorescencia.

11. Ensayos de fluorescencia.

Las mediciones de fluorescencia se efectuaron en el equipo Fluoroskan Ascent.

A) Barrido de excitación-emisión.

In vivo (usando las bacterias con las construcciones), primero en suspensión en medio de cultivo LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y luego en suspensión en PBS. Se

emplearon los filtros de excitación 355 nm, 395 nm, 430 nm (longitud a la cual se excita preferentemente la proteína cian) y 485 nm (longitud a la cual se excita preferentemente la proteína verde). Se rescataron las emisiones a cinco longitudes de onda: 460, 510, 538, 590 y 620 nm, salvo cuando se excitó a 430 y 485 nm, en cuyo caso no se rescató la emisión a 460 nm porque el fluorómetro no lo permite. Las lecturas se efectuaron con un tiempo de integración de 20 milisegundos (ms) y a temperatura ambiente (25°C a 27.5°C) utilizando 100 µL de cada muestra para cada caso.

B) Efecto de la temperatura.

In vitro (con las proteínas recombinantes purificadas) y usando la proteína a una concentración aproximada de 3 µg/mL en solución PBS (cuantificada con el kit *Nanorange* de *Molecular Probes*). Se emplearon únicamente los filtros de excitación de 430 nm y 485 nm y la emisión se rescató a 510 nm y 538 nm; el tiempo de integración se fijó en 20 ms. Las temperaturas elegidas fueron: temperatura ambiente (27.5 °C), 30°C, 35°C, 37 °C, 40°C y 45°C.

C) Tiempo de integración.

In vitro (con las proteínas recombinantes purificadas) y usando la proteína a una concentración aproximada de 3 µg/mL en solución PBS (cuantificada con el kit *Nanorange* de *Molecular Probes*). Se emplearon únicamente los filtros de excitación de 430 nm y 485 nm y la emisión se rescató a 510 nm y 538 nm; la

temperatura fue la ambiental (27.5 °C). Los tiempos de integración elegidos fueron: 20 ms, 40 ms, 60 ms y 80 ms.

12. Purificación de las proteínas recombinantes ligadas a GST.

(Modificado de ref. 51).

Es importante mantener el material en baño de hielo mientras se trabaja.

a) Se rehidrató el liofilizado de glutatión agarosa (*Sigma G-4510*) agregando al contenido del frasco 10 mL de solución bloqueadora de leche descremada en polvo 1 (*ver apéndice A*).

b) Se guardó la mezcla a 4°C durante 2 horas para promover la hidratación. Se cambió la solución de hidratación al menos 3 veces.

c) Se le agregaron 100 µL de glutatión agarosa bien homogeneizado (50% agarosa y 50% sol. bloqueadora de leche descremada en polvo 1 a 500 µL del extracto de proteínas bacterianas.

d) La mezcla glutatión agarosa - extracto se agitó durante 1 hora a 4°C.

e) Se centrifugó esta mezcla 1 minuto a 12,500 rpm (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*), se tomó el sobrenadante y se colocó en un microtubo nuevo frío, el cual se almacenó a -70°C.

f) A la agarosa se le agregaron 500 µL de amortiguador de lisis bacteriana frío y se resuspendió por inversión.

g) Esta mezcla se centrifugó 1 minuto a 12,500 rpm (*centrífuga Biofugue pico de Sorvall*), tras lo cual se eliminó el sobrenadante con una micropipeta.

h) El paso anterior se repitió 3 veces, tras lo cual se resuspendió a la agarosa con 100 μ L de amortiguador de lisis frío y se almacenó a 4°C hasta su uso.

13. Inmunoelctrotransferencia.

(Modificado de ref.32 y 52).

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).

a) Se utilizó un cassette *Snap-A-Gel* de 1.50 mm de ancho (*Jule Inc. Biotechnologies*) como molde para hacer el gel. En este cassette se vaciaron 15 mL de una solución de acrilamida-bisacrilamida 10% en amortiguador Tris-glicina-SDS 1x (*ver apéndice A*), activada con 150 μ L de solución de persulfato de amonio al 10% (iniciador de la reacción) y 25 μ L de TEMED (catalizador: N, N, N', N' - tetrametiletilendiamino).

b) Una vez que se vertió la acrilamida en el cassette se colocó el peine (que previamente se limpió con agua bidestilada y etanol al 95%).

c) El gel se dejó polimerizar alrededor de 20 minutos, tras lo cual se retiraron los peines y se rompió el extremo inferior del cassette para poner el gel en contacto con el amortiguador.

d) El cassette se colocó en una cámara de electroforesis vertical (*Mighty small II SE 250 Hoefer Scientific Instruments*), que se llenó con amortiguador Tris-glicina-SDS 1x .

e) Una vez que se colocó la cantidad de muestra adecuada en los pozos (agarosa con las proteínas recombinantes), se le aplicó una corriente de 125 volts durante 1.5 horas.

f) Se sacó el gel de proteínas del cassette, rompiendo los extremos laterales, y se sumergió en amortiguador de transferencia (ver apéndice A).

Transferencia a membrana.

a) Se cortó la membrana (*Immobilon P* de Millipore, de fluoruro de polivinilo) al tamaño del gel (unos 7.5 cm x 8 cm.).

b) Para activar la membrana se sumergió ésta en metanol absoluto durante 4 segundos.

c) La membrana se hidrató luego con agua desionizada, y una vez logrado esto (deja de flotar en el agua) se dejó reposar durante 2 minutos.

d) Posteriormente se pasó la membrana a amortiguador de transferencia hasta su utilización.

e) Se colocan en la base de la cámara de transferencia:

- ◆ 3 esponjas.
- ◆ 1 papel filtro.
- ◆ el gel de proteínas.
- ◆ la membrana activada.
- ◆ 1 papel filtro.
- ◆ 3 esponjas

Nota: las esponjas y los papeles filtro se remojan previamente en amortiguador de transferencia.

f) Finalmente se armó el resto de la cámara, tratando de mantener inmóviles las diferentes capas mencionadas en el inciso anterior. Esta cámara se llenó con

amortiguador de transferencia y se le aplicó una corriente de 125 mA durante 1.5 horas.

h) Una vez concluida la transferencia, se dejó secar la membrana sobre una toalla de papel, con la cara que daba al gel boca arriba (y en la cual se encuentran las proteínas), durante 5 minutos.

i) La membrana se almacenó a 4°C en una bolsa etiquetada hasta su uso.

Reacción con anticuerpo.

Es importante mantener la cara de la membrana que estuvo en contacto con el gel boca arriba en todo momento.

a) Nuevamente, se activa la membrana por el procedimiento mencionado anteriormente, con la variante de sumergirla al final en solución de bloqueo (ver apéndice A).

b) Se incubó la muestra en la solución de bloqueo durante 1 hora con agitación.

c) Se retiró la solución de bloqueo y se enjuagó dos veces la membrana con PBS-Tween 0.1% (ver apéndice A).

d) Se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween 0.1%, una lavada de 15 minutos, y dos de 5 minutos con agitación.

e) Se incubó la membrana en una solución de 1:2000 del anticuerpo anti-GFP, durante 1 hora en agitación.

f) Se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween 0.1%, con el protocolo ya descrito.

g) Se incubó la membrana en una solución 1:5000 del anticuerpo anti-IgG de ratón ligado a peroxidasa durante 1 hora con agitación.

h) Se lavó nuevamente la membrana 3 veces con PBS-Tween 0.1%, con el protocolo descrito anteriormente.

i) Se colocó la membrana en una mica y se le aplicó revelador en toda la superficie (*Kit ECL de Amersham*), dejando actuar durante 1 minuto.

j) Se cerró la mica, retirando el exceso de líquido y se le colocó en un cassette para autorradiografía.

k) Se expuso una placa fotográfica a la membrana durante un minuto (en oscuridad).

RESULTADOS.

1. Generación del plásmido pEFSCFP-kos.

El plásmido comercial *pECFP* (mapa pág. 65) contiene el gen de la proteína ECFP, que se expresa en *E.coli* a partir del promotor de *lac*, flanqueado en 5' y 3' por dos sitios de clonación múltiple (MCS) y que además posee en el extremo 5' del gen una *región Kozak* de inicio de la traducción. Esta región favorece que el plásmido se traduzca con gran eficiencia cuando se expresa en un sistema eucariótico.

Puesto que las construcciones hechas en este trabajo se utilizarán en otro proyecto para construir vectores de expresión en eucariontes, era necesario retirar la región Kozak adyacente al gen de la proteína ECFP para que este gen no se expresara en forma independiente de GFP y la región de unión entre ambas. Este propósito se logró sustituyendo la región *BamHI-NcoI* del plásmido comercial con un oligonucleótido de doble cadena de la misma longitud (nombrado *oligo FSCFP-kos*) sin la secuencia Kozak, generando el plásmido *pEFSCFP-kos* (mapa pág. 66), con el cual se transformaron bacterias competentes *E.coli* DH5 α .

De las colonias de bacterias recombinantes obtenidas se tomaron dos candidatos, se les resembró en medio líquido y se les extrajo el plásmido por el método ya descrito (fig. 14).

Uno de estos candidatos se secuenció, y comprobamos que el *oligo FSCFP-kos* estuviera presente (comparar figuras 15 y 16).

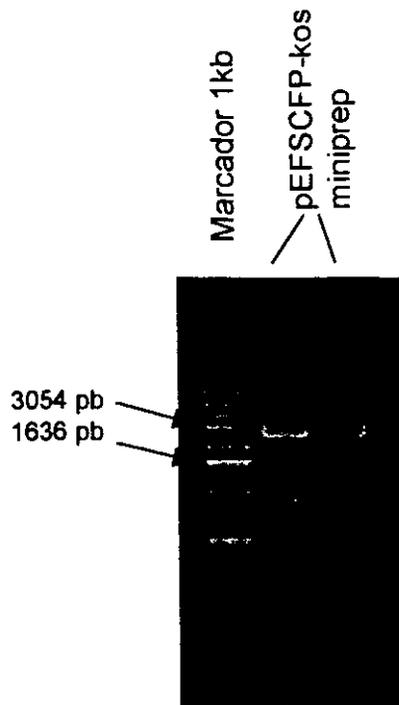


Fig. 14 *Plásmido pEFSCFP-kos*

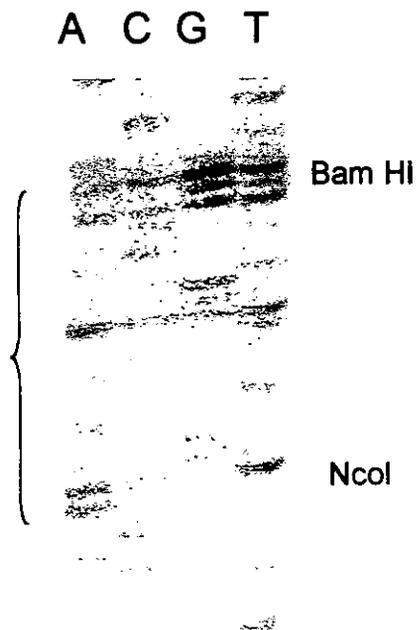


Fig. 15 *Región BamHI - NcoI del plásmido pEFSCFP-kos, Hebra molde*

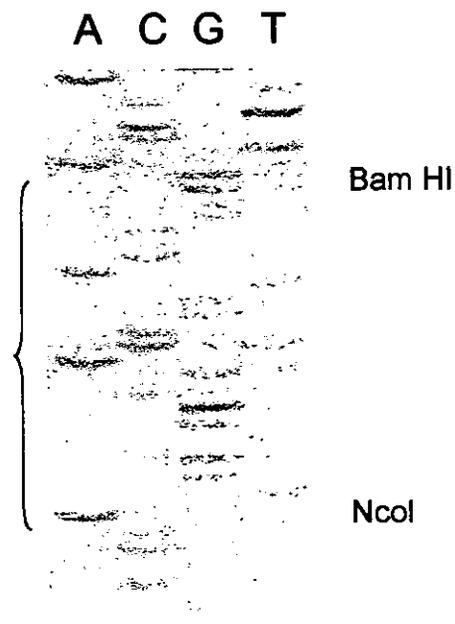


Fig. 16 *Región BamHI - NcoI del plásmido pECFP Hebra molde*

Plásmido pEFSCFP-kos

```

5' BamHI                                     3'
GAT CCC CGG GTA CCT AAT TAT TC
      GG GCC CAT GGA TTA ATA AGG TAC
                                     NcoI

```

Plásmido pECFP

```

5' BamHI                                     3'
GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC AC
      GG GCC CAT GGC ACG CGG TGG TAC
                                     NcoI

```

2. Obtención del fragmento FSCFP-kos

Una vez que se comprobó la clonación anterior, se procedió a extraer el fragmento *FSCFP-kos*, el cual se compone del oligo *FSCFP-kos* ligado al gen de *CFP* (727 pb). Para este fin se hizo una doble restricción con *HindIII* y *EcoRI* del

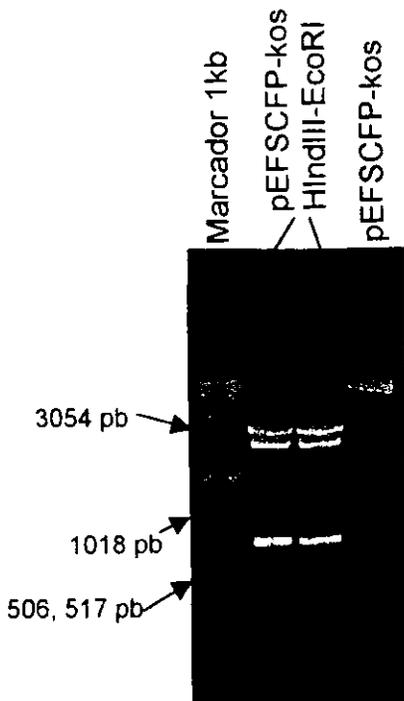


Fig 17 Restricción *HindIII-EcoRI* de *pEFSCFP-kos*

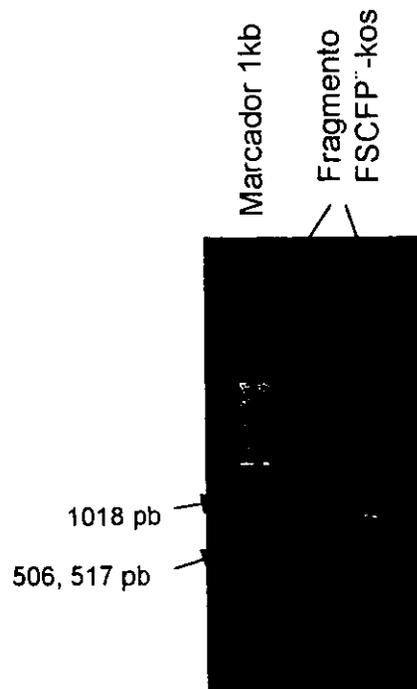


Fig 18 Fragmento *FSCFP-kos* purificado.

plásmido *pEFSCFP-kos* (fig. 17).

El producto de esta restricción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cortó el fragmento de 727 pb, el cual se extrajo del gel por congelación con nitrógeno líquido y se purificó por extracción con fenol y precipitación con etanol-acetato de amonio (fig. 18).

3. Obtención del fragmento CFP.

Al vector comercial *pECFP* se le hizo una doble restricción con *NcoI* y *EcoRI*, cuyo producto se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% (fig. 19), del cual se purificó el fragmento de 674 pb, por los métodos ya descritos (fig. 20).

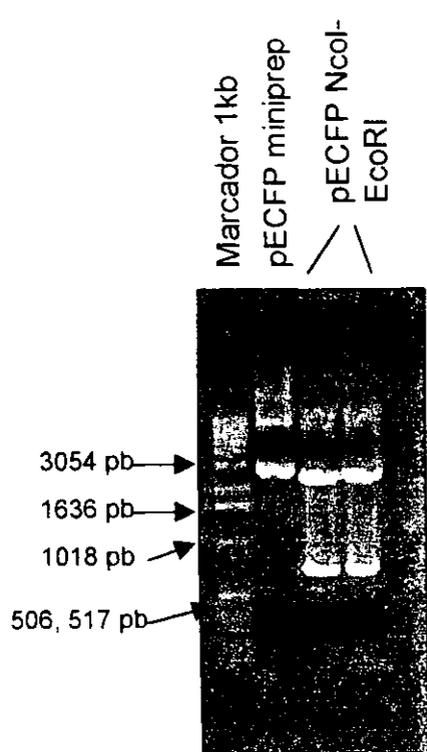


Fig. 19 Restricción *NcoI-EcoRI* de *pECFP*

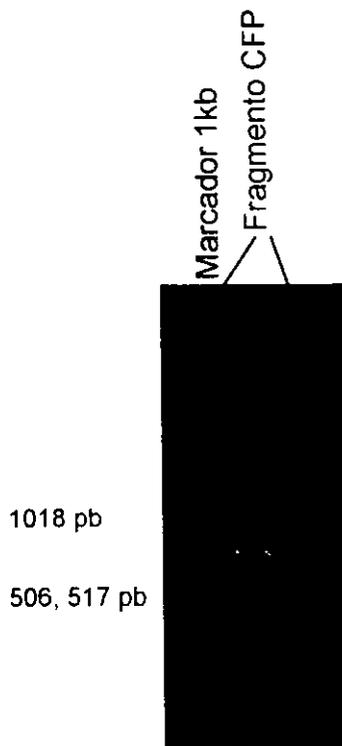


Fig. 20 Fragmento CFP purificado

4. Obtención del plásmido GEX-2TK-MCS.

Al comienzo de este trabajo se contaba ya con el plásmido *pGST-GFP* (mapa pág. 68), procedente de un proyecto anterior y cuyo esquema de construcción se presenta en la sección de "Estrategia experimental".

A este plásmido se le hizo una doble restricción con *NcoI-EcoRI* para separar al vector original (*pGEX-2TK-MCS*) del fragmento GFP. El producto de esta doble restricción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% (fig. 21) y se cortó el fragmento correspondiente al vector original linearizado (4960 pb), extrayéndolo del gel y purificándolo por los métodos ya descritos (fig. 22).

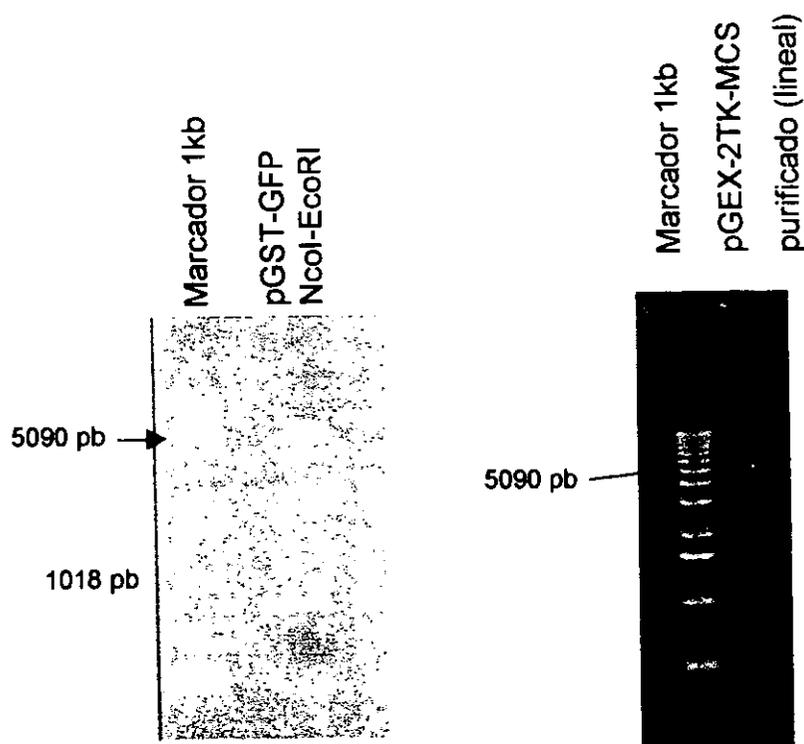


Fig. 21 Restricción *NcoI-EcoRI* *pGST-GFP* Fig. 22 Vector *pGEX-2TK-MCS* linearizado, purificado

Todas las construcciones se hicieron con el esqueleto de este vector (mapa pág. 67) para obtener proteínas recombinantes ligadas a la glutatión S-transferasa. La presencia de este enzima en las proteínas nos permitió separarlas del lisado bacteriano.

5. Generación del plásmido pGST-CFP.

Se ligó al vector *pGEX-2TK-MCS* linearizado y purificado con extremos cohesivos *NcoI-EcoRI*, con el fragmento CFP purificado con los mismos extremos cohesivos. Con esta ligación se transformaron bacterias *E.coli* BL21 (DE 3) y se seleccionaron candidatos los cuales se resembraron en medio LB caldo con ampicilina para hacer extracción de plásmido (fig. 23). Al plásmido obtenido (5634 pb) se le hizo una doble restricción *NcoI-EcoRI* para comprobar la inserción del fragmento CFP (674 pb, ver fig. 24). (Mapa de *pGST-CFP*, pág. 69).

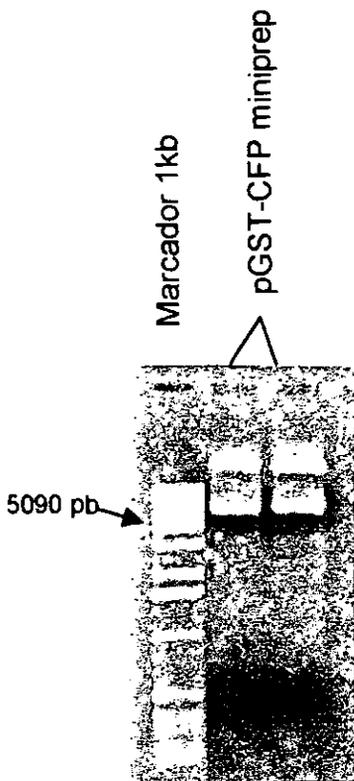


Fig. 23 Miniprep de *pGST-CFP*

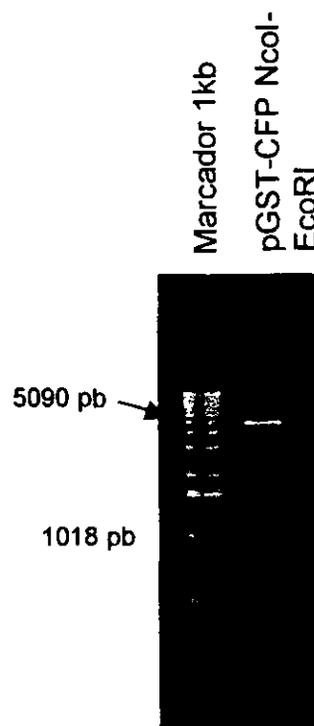


Fig. 24 Restricción *NcoI-EcoRI*

6. Generación del plásmido pGST-FRET1.

Al plásmido *pGST-GFP* se le hizo una doble restricción en *HindIII* y *EcoRI*, cuyo producto se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% (fig. 25), del cual se extrajo el vector linealizado (5700 pb) que se purificó como ya se describió anteriormente para los otros fragmentos (fig. 26).

El vector purificado se ligó al *fragmento FSCFP-kos* purificado y con los mismos extremos cohesivos que el vector. Con esta ligación se transformaron bacterias competentes *E.coli* DH5 α , de las cuales se seleccionaron candidatos que se sembraron en medio LB caldo para hacer extracción de plásmido (fig. 27). Al plásmido obtenido (6427 pb) se le hizo una doble restricción en *HindIII* y *EcoRI* (fig. 27) para comprobar la inserción del fragmento (727 pb).

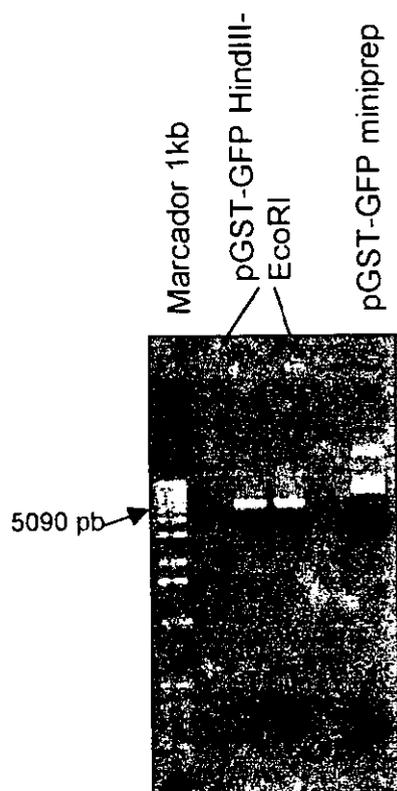


Fig. 25 Doble restricción *HindIII-EcoRI* de *pGST-GFP*

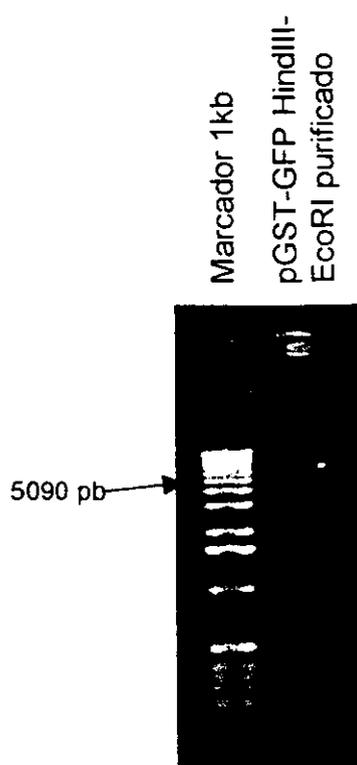


Fig. 26 Vector *pGST-GFP HindIII - EcoRI purificado*

Con el plásmido obtenido se transformaron bacterias competentes *E.coli* BL21 (fig. 28), con las cuales se efectuaron pruebas de inducción de proteínas recombinantes. (Mapa de *pGST-FRET1*, pág. 70).

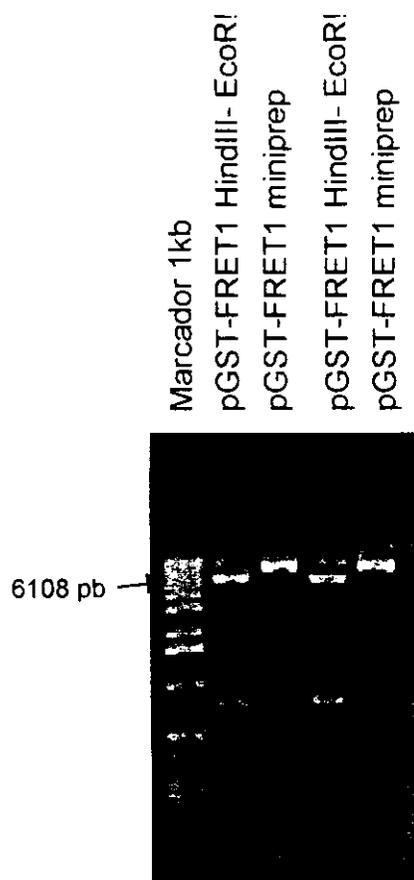


Fig. 27 Plásmido *pGST-FRET1* obtenido de *DH5α* y doble digestión *HindIII* - *EcoRI*

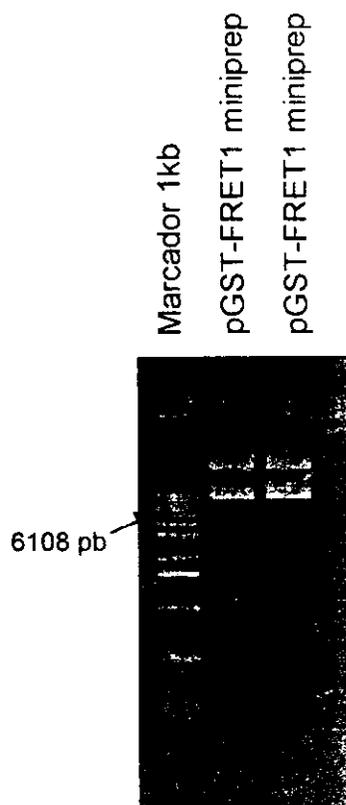


Fig. 28 Plásmido *pGST-FRET1* obtenido de *BL21*

7. Generación del plásmido pGST-FRET.

Al plásmido *pGST-FRET1* se le hizo una restricción en el sitio *HindIII* (fig. 29), en el cual posteriormente se hizo una reparación con la polimerasa de Klenow (fig. 30).

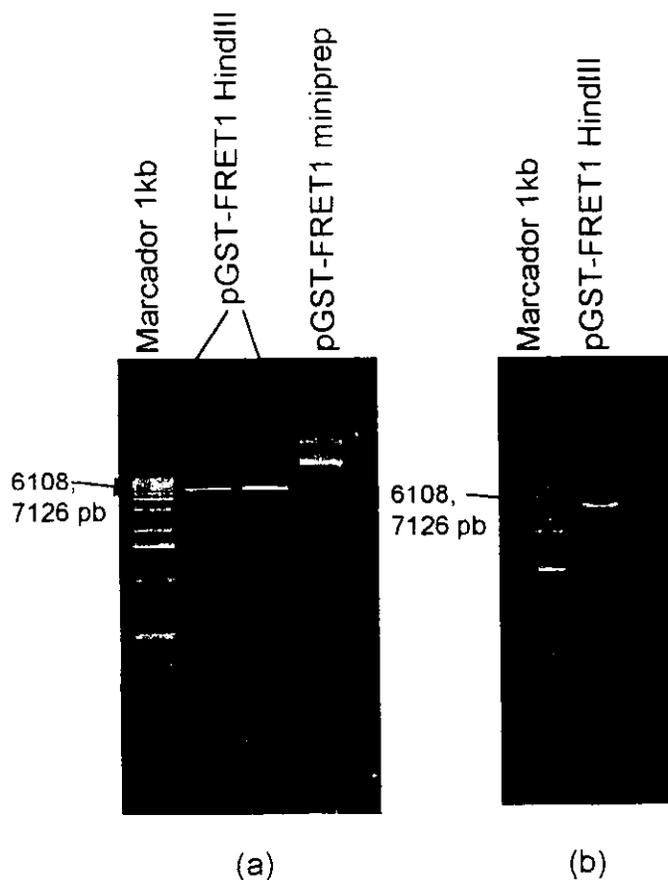
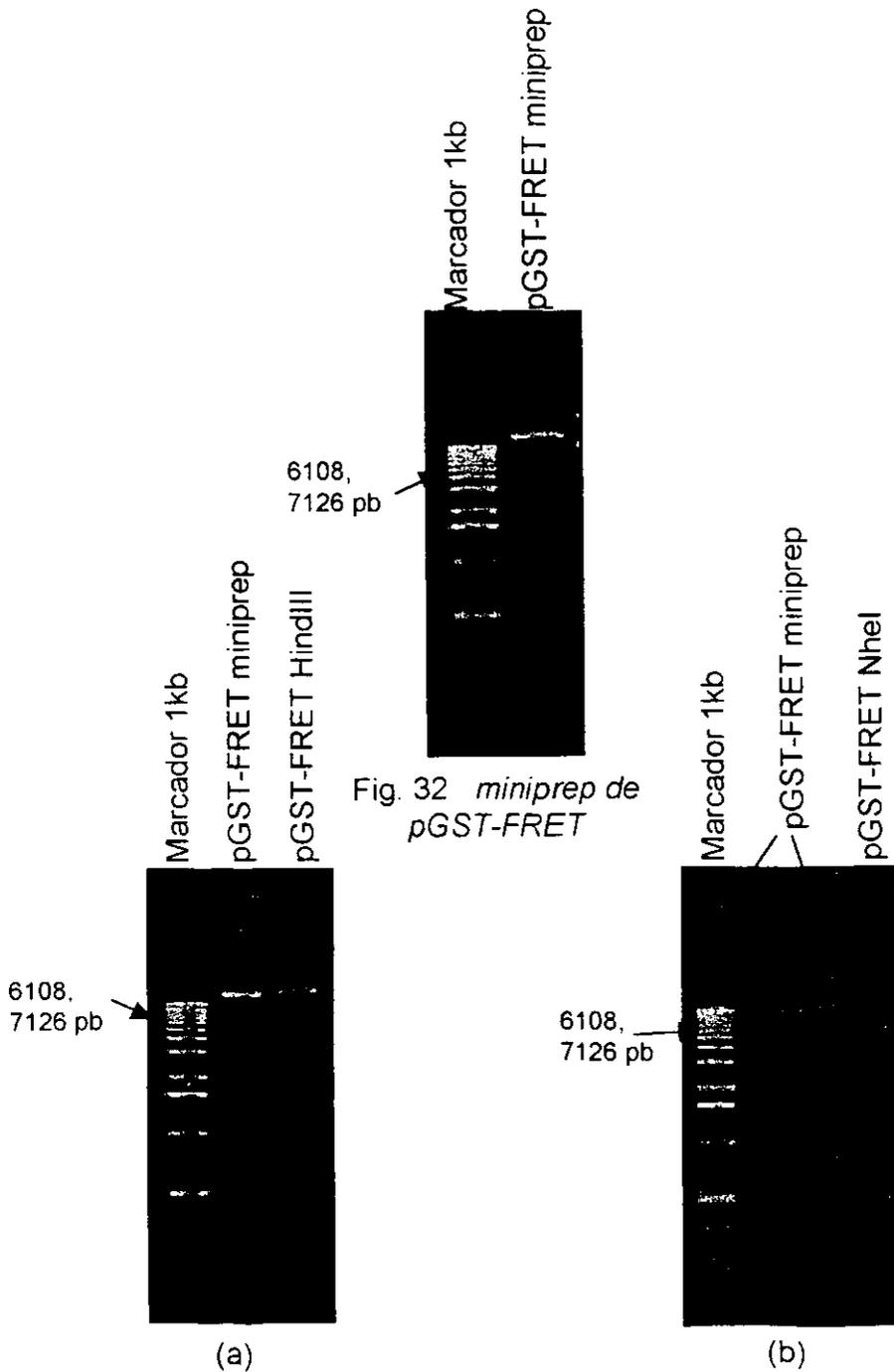


Fig. 29 (a) *Restricción en HindIII de pGST-FRET1 y (b) posterior purificación del plásmido linearizado.*

De esta manera se desplazaron cuatro nucleótidos en la secuencia, poniendo en marco abierto de lectura al gen CFP.

Con la reparación se elimina el sitio *HindIII* del plásmido y se genera en su lugar un sitio *NheI*, como se muestra en las figuras 32 y 33. (Mapa de *pGST-FRET* pág. 71).



8. Inmunolectrotransferencia.

Se hizo un ensayo de Inmunolectrotransferencia de las proteínas recombinantes purificadas en glutatión agarosa, utilizando como anticuerpo primario al anti-GFP y como anticuerpo secundario al anti-IgG de ratón ligado a peroxidasa. Para revelar este ensayo se utilizó el Kit ECL de *Amersham* y se expuso una placa de fotografía durante 3 minutos, que se presenta a continuación (fig. 34).

En todos los pozos se colocó la misma cantidad de proteína, pero no se obtuvo transferencia completa a la membrana de la proteína GST-FRET, por lo que su banda es más tenue. Todas las proteínas tienen los tamaños previstos.

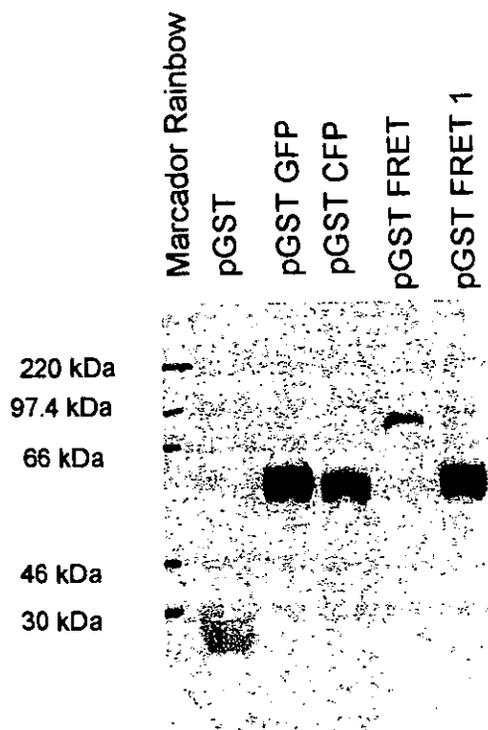
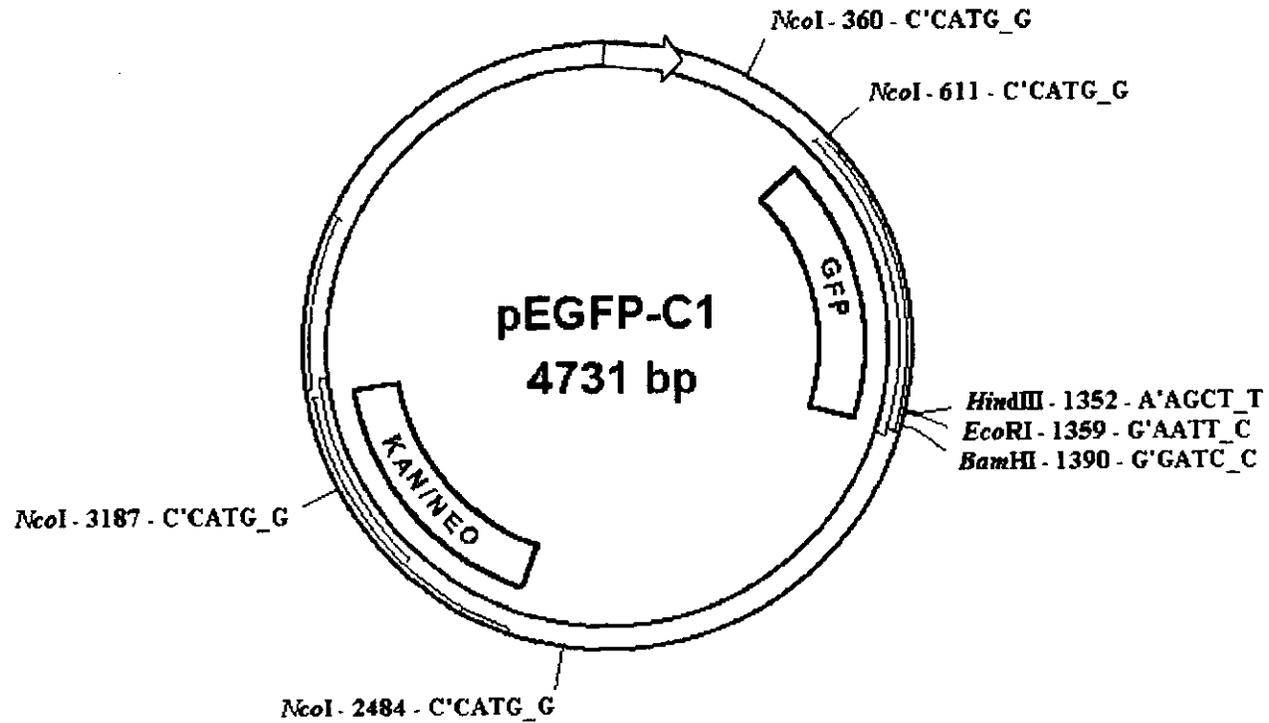
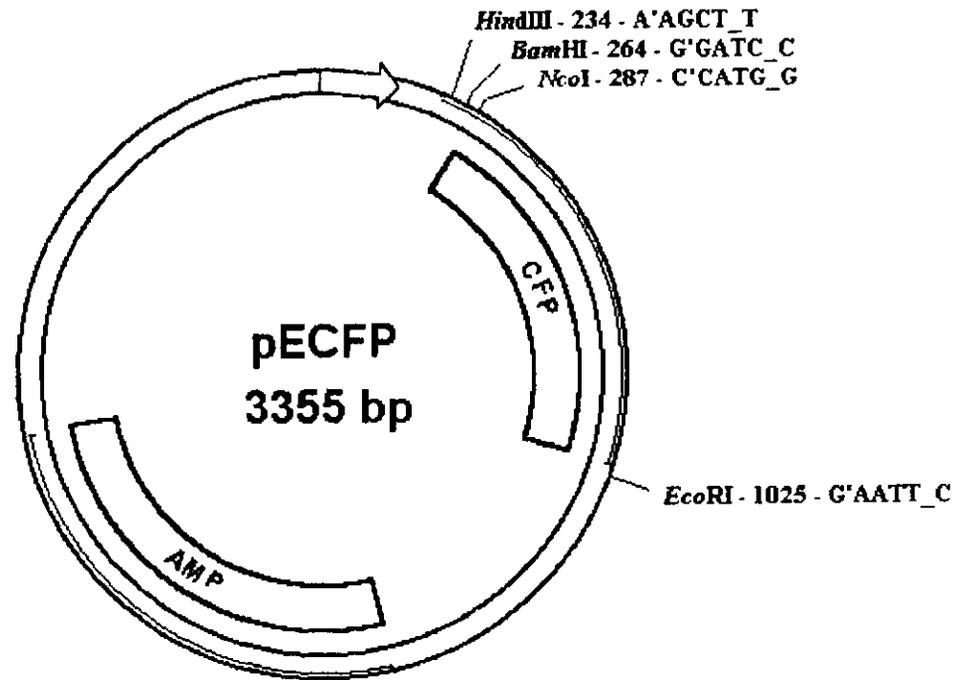


Fig. 34 *Autorradiografía de la Inmunolectrotransferencia efectuada a las proteínas recombinantes.*

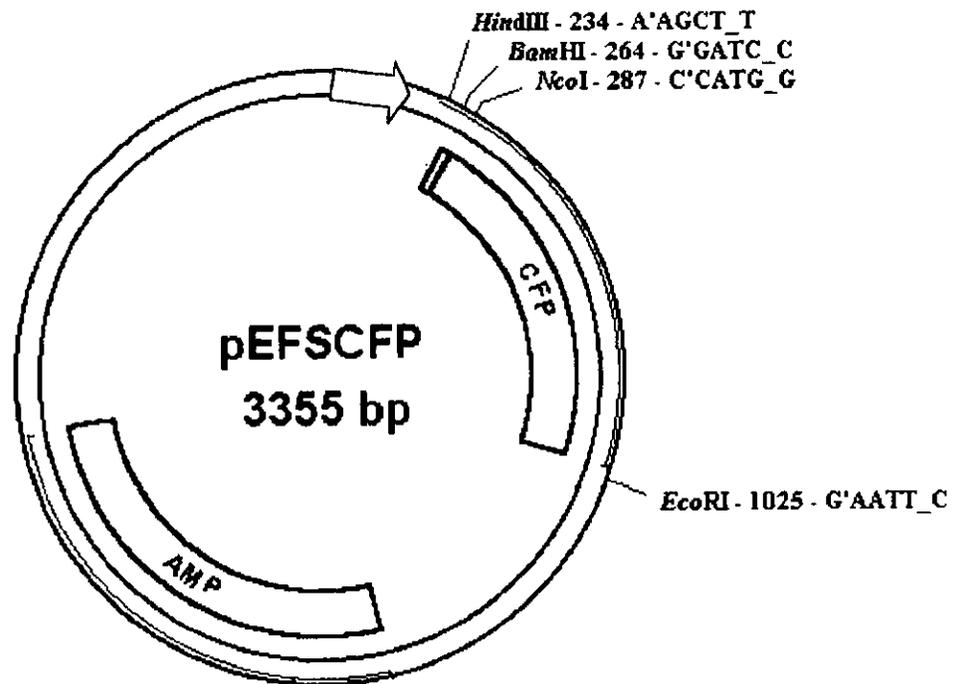
9. MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS.



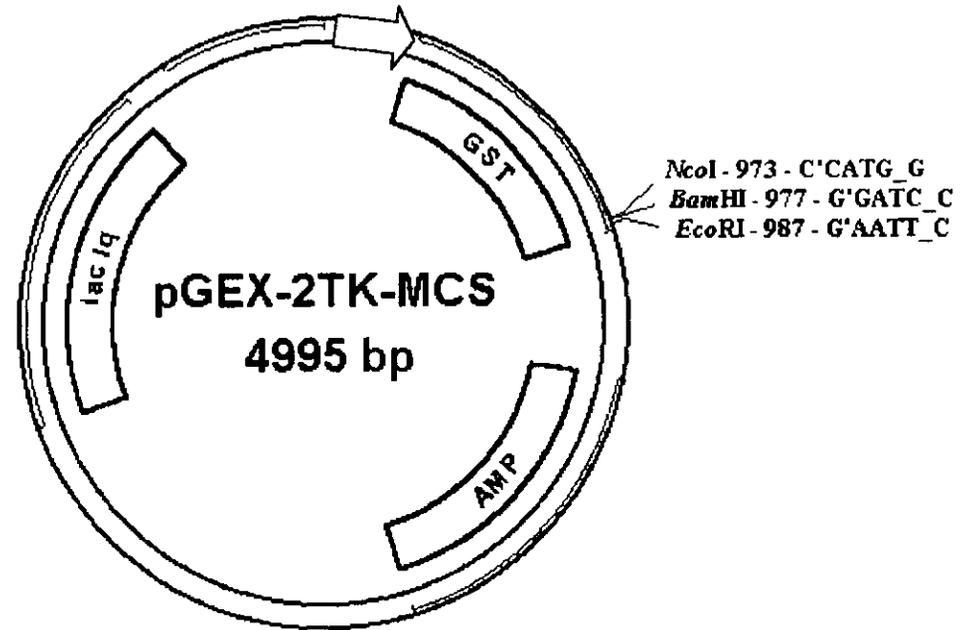
KAN / NEO = RESISTENCIA A KANAMICINA, NEOMICINA.
GFP = GEN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE.



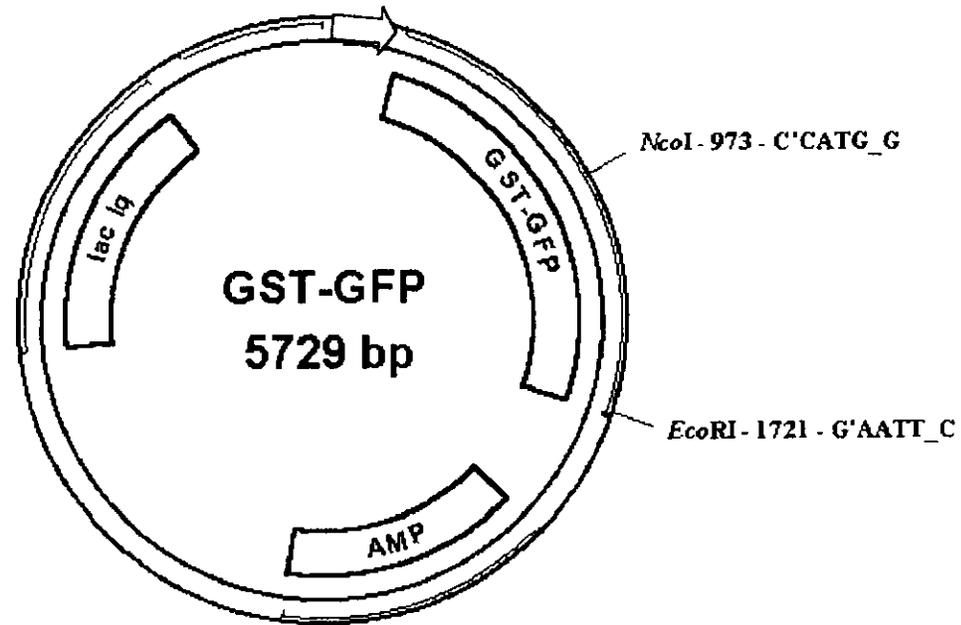
CFP = GEN DE LA PROTEÍNA CIAN FLUORESCENTE
 AMP = GEN DE RESISTENCIA A AMPICILINA.



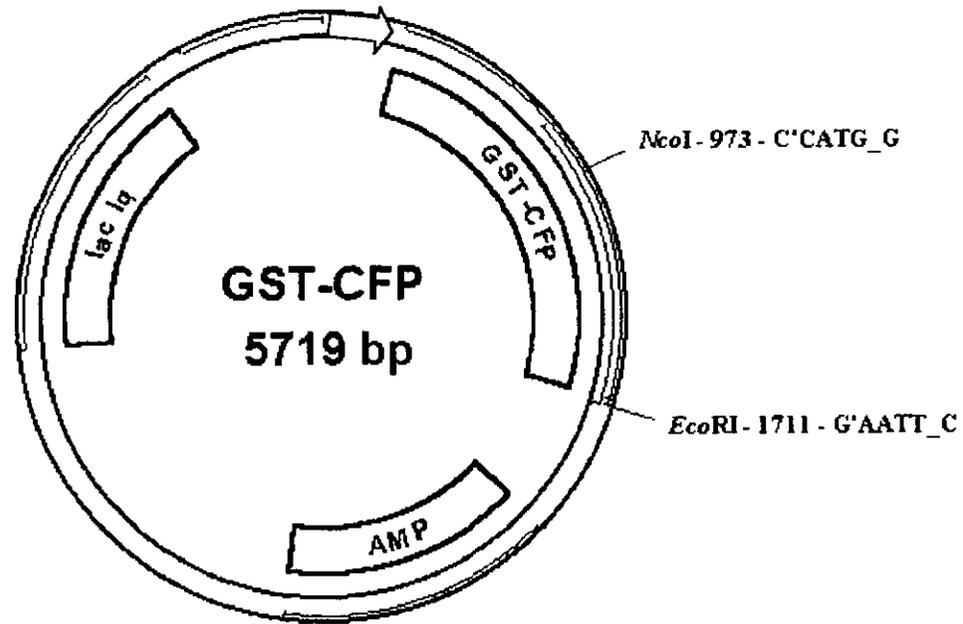
CFP = GEN DE LA PROTEÍNA CIAN FLUORESCENTE
AMP = GEN DE RESISTENCIA A AMPICILINA.



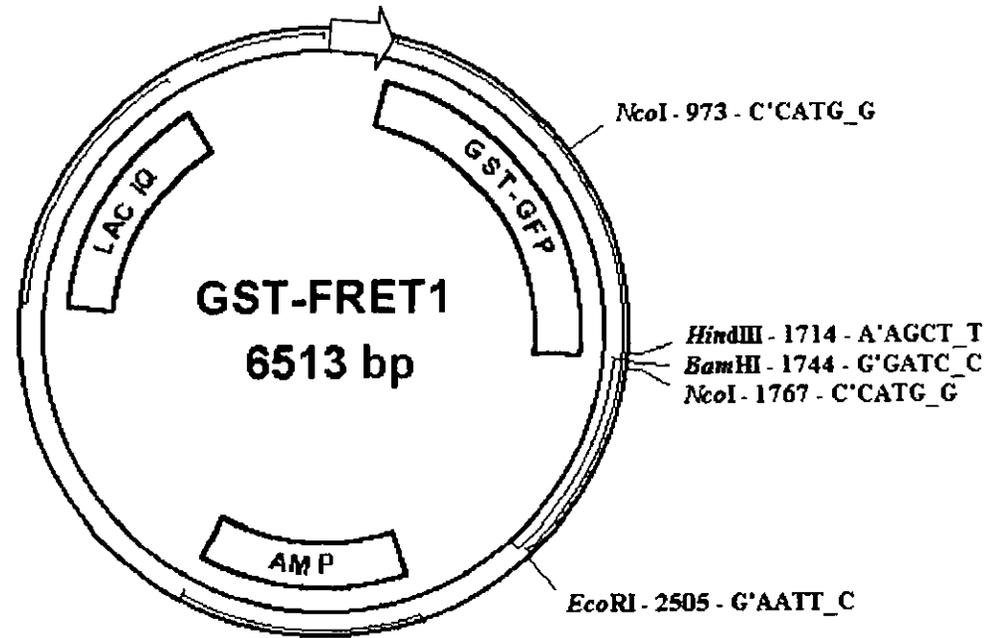
GST = GEN DE GLUTATIÓ-N-S-TRANSFERASA.
 AMP = GEN DE RESISTENCIA A AMPICILINA
 LAC IQ = REPRESOR DE LAC



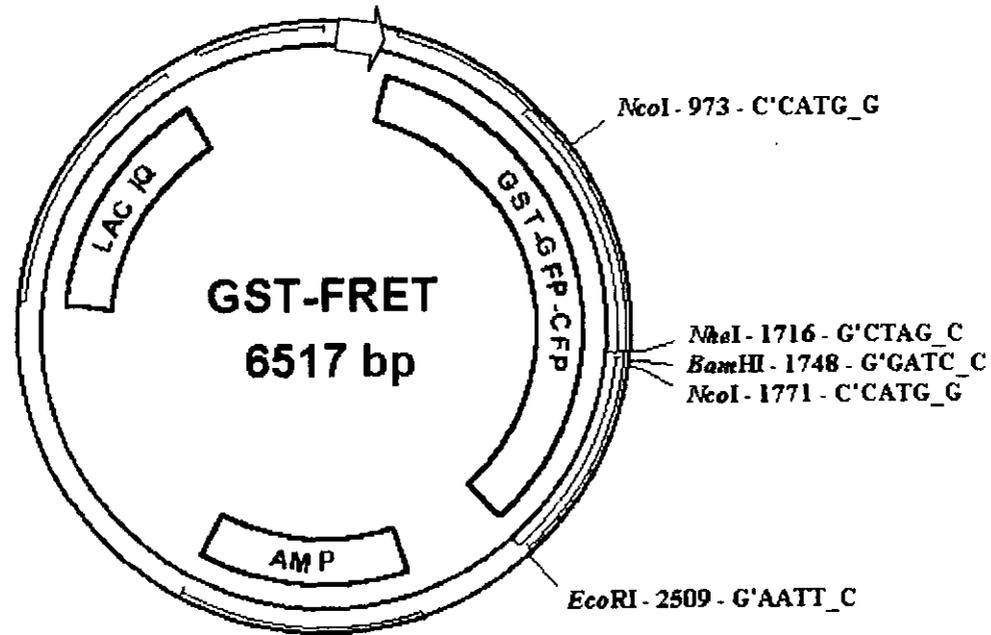
GST = GEN DE GLUTATI3N-S-TRANSFERASA.
 AMP = GEN DE RESISTENCIA A AMPICILINA
 LAC IQ = REPRESOR DE LAC
 GFP = GEN DE LA PROTEINA VERDE FLUORESCENTE.



GST = GEN DE GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA.
 AMP = GEN DE RESISTENCIA A AMPICILINA
 LAC IQ = REPRESOR DE LAC
 CFP = GEN DE LA PROTEÍNA CIAN FLUORESCENTE.



- GST = GEN DE GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA.
- AMP = GEN DE RESISTENCIA A AMPICILINA
- LAC IQ = REPRESOR DE LAC
- GFP = GEN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE.
- CFP = GEN DE LA PROTEÍNA CIAN FLUORESCENTE.



GST = GEN DE GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA.
 AMP = GEN DE RESISTENCIA A AMPICILINA
 LAC IQ = REPRESOR DE LAC
 GFP = GEN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE.
 CFP = GEN DE LA PROTEÍNA CIAN FLUORESCENTE.

10. Ensayos de fluorescencia.

Barrido de excitación-emisión.

En primer lugar se hizo un análisis *in vivo* de excitación y emisión con los filtros disponibles para el fluorómetro *Fluoroskan Ascent*, tal como se describe en la sección de Métodos, en el punto 11 inciso A. Las bacterias utilizadas estaban suspendidas en medio de cultivo LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Con este primer análisis detectamos que el medio de cultivo presenta cierta fluorescencia de fondo y decidimos utilizar como diluyente solución PBS que no presenta este problema. El comportamiento de estos diluyentes se presenta en los gráficos 1 a 4. Los puntos que se grafican corresponden a los promedios de las lecturas obtenidas de 3 ensayos con Luria y 2 ensayos con solución PBS.

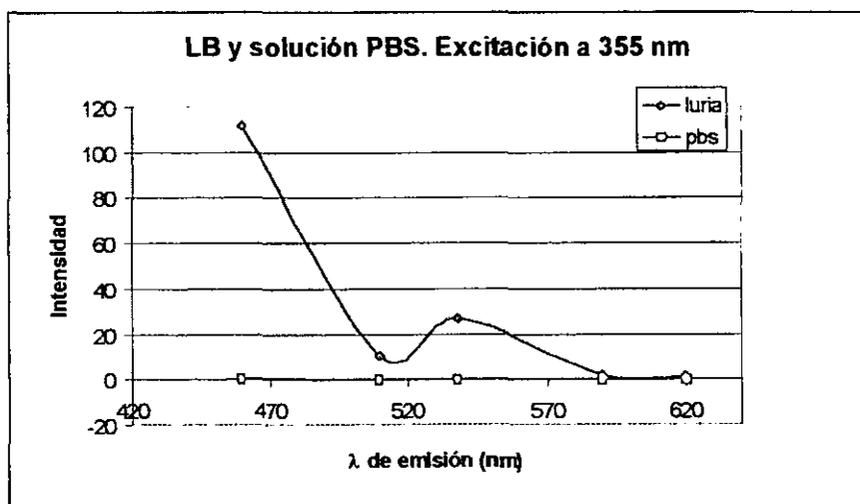


Gráfico 1. *Comparación entre los comportamientos del medio de cultivo LB y la solución PBS, excitando a 355 nm.*

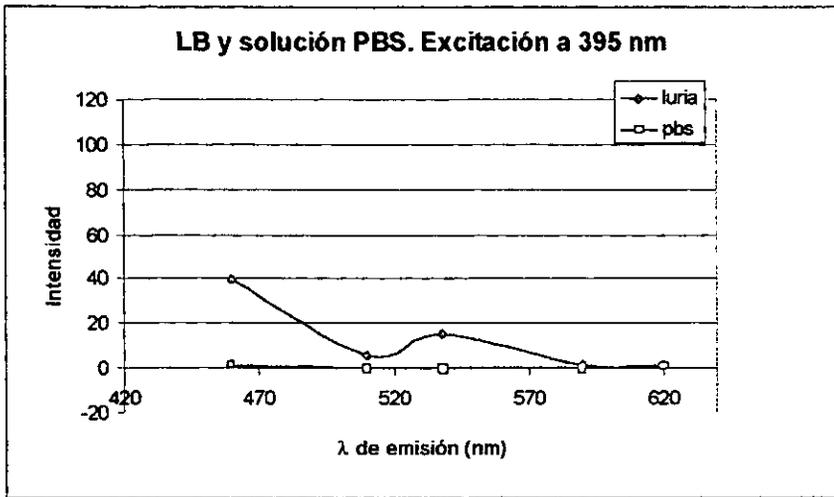


Gráfico 2. Comparación entre los comportamientos del medio de cultivo LB Y la solución PBS, excitando a 395 nm.

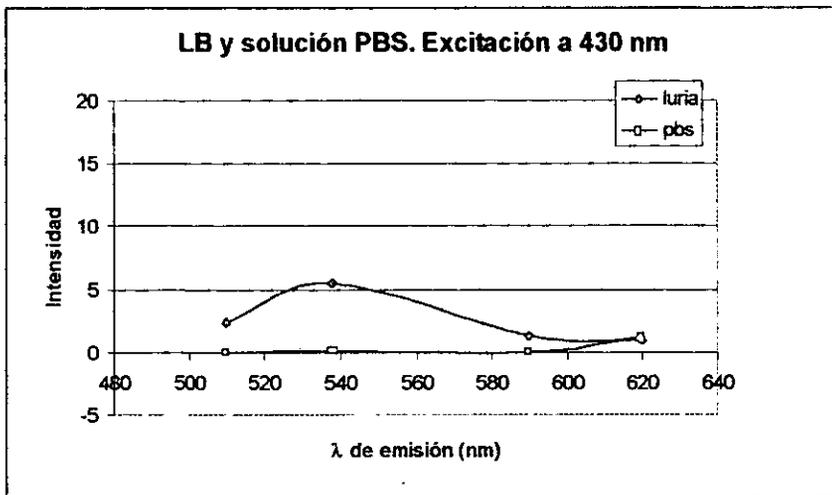


Gráfico 3. Comparación entre los comportamientos del medio de cultivo LB Y la solución PBS, excitando a 430 nm.

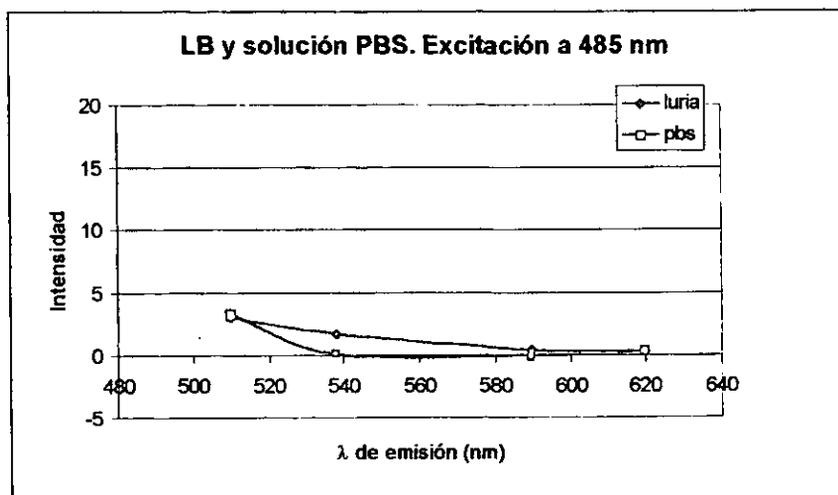


Gráfico 4. Comparación entre los comportamientos del medio de cultivo LB y la solución PBS, excitando a 485 nm.

Una vez eliminado el fondo de fluorescencia del diluyente se procedió a hacer el barrido de emisión y excitación *in vivo* de las muestras problema en solución PBS.

En los gráficos 5 a 8 se presentan los resultados correspondientes a este análisis, que son los promedios obtenidos de dos ensayos.

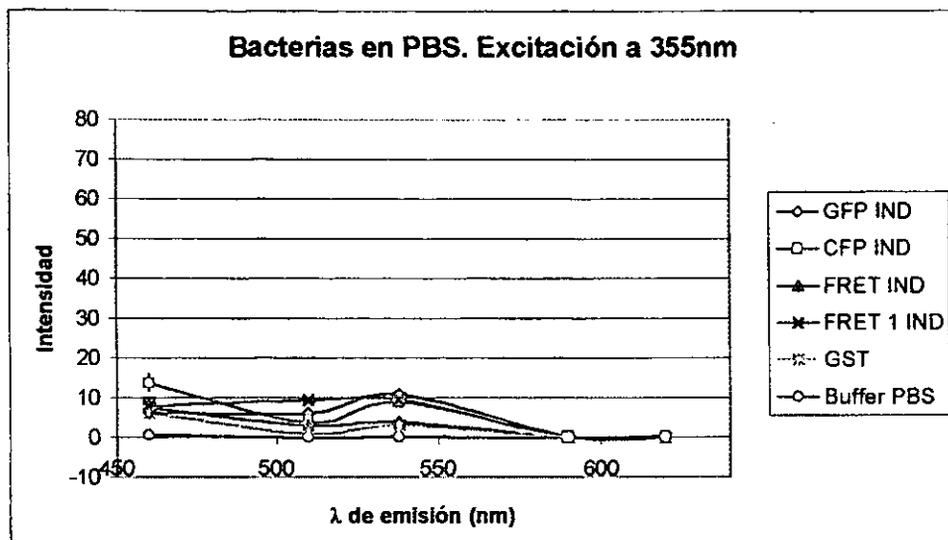


Gráfico 5. *Bacterias en solución PBS. Excitación a 355 nm.*

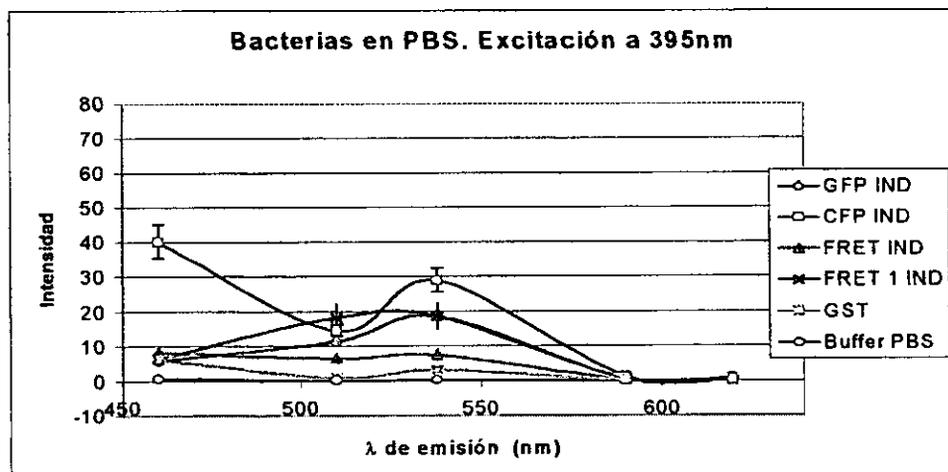


Gráfico 6. *Bacterias en solución PBS. Excitación a 395 nm.*

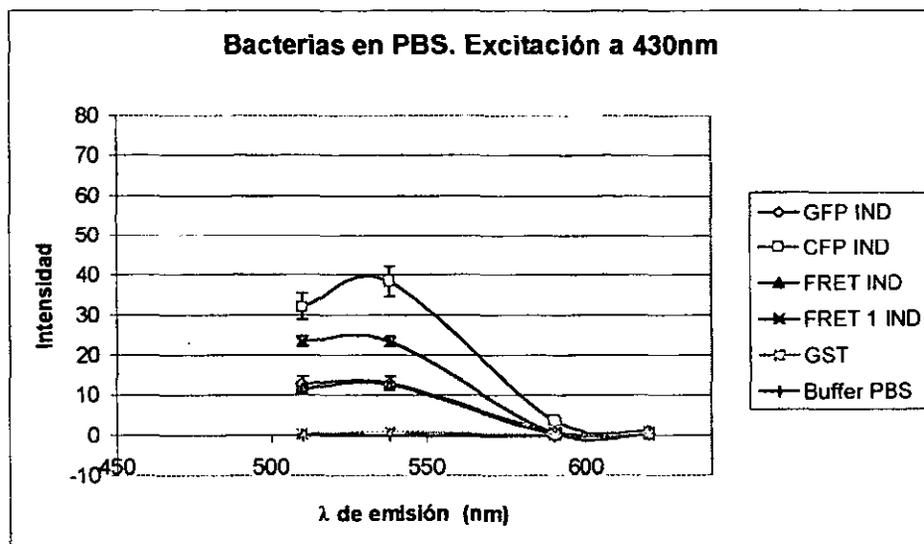


Gráfico 7. Bacterias en solución PBS. Excitación a 430 nm.

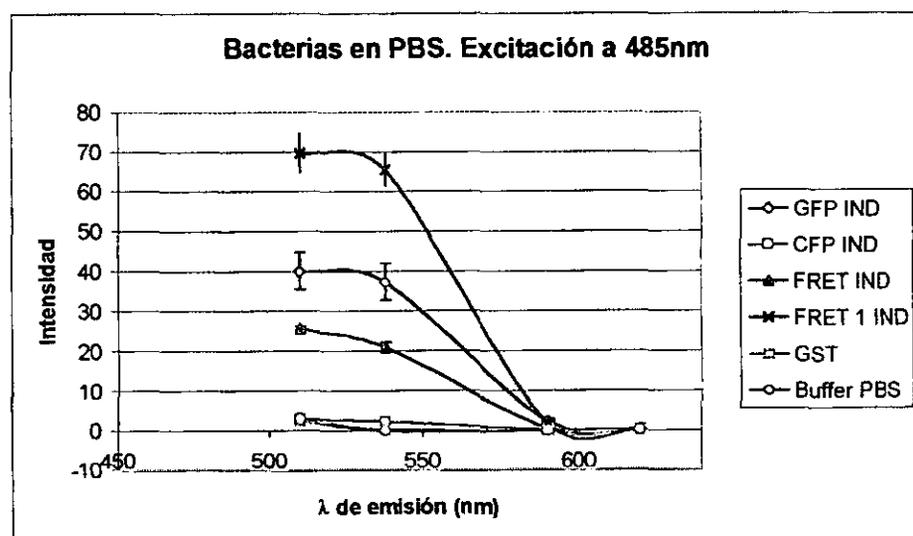


Gráfico 8. Bacterias en solución PBS. Excitación a 485 nm.

Excitando las muestras a 355 y 395 nm (gráficos 5 y 6) se observan emisiones bajas en casi todos los casos (menos de 20 unidades de fluorescencia). Esto era de esperarse, puesto que ninguna de las proteínas utilizadas posee su λ_{exc} óptima en estas regiones.

Con las λ_{exc} de 430 y 485 nm (gráficos 7 y 8) se obtienen lecturas de fluorescencia mayores y se observa el comportamiento esperado para los productos de fusión GST-GFP y GST-CFP, así que para los ensayos *in vitro* se utilizaron únicamente estas longitudes de onda de excitación.

Excitando a 430 nm (ver gráfico 7) se observa que:

Las proteínas GST-CFP y GST-GFP se excitan a esta longitud de onda, pero la proteína GST-CFP muestra una emisión de fluorescencia casi tres veces mayor que GST-GFP.

El pico de emisión de GST-CFP se presenta a 538 nm (que no corresponde a lo esperado), mientras que GST-GFP presenta la misma emisión a 510 nm y a 538 nm.

Cuando se cambia la λ_{exc} a 485 nm, GST-GFP aumenta su emisión de fluorescencia al triple, mientras que GST-CFP no se excita. El pico de emisión de GFP se presenta a 510 nm.

Con respecto a las proteínas FRET: El comportamiento de GST-FRET1 es el de GST-GFP (se excita a 430 nm, pero su emisión aumenta al triple al excitarla a 485 nm), tal como se esperaba puesto que no tiene fluoróforo donador. Las emisiones

de fluorescencia que presenta son más altas; sin embargo nos interesa más que su comportamiento difiera de GST-FRET, que la intensidad de su fluorescencia.

Como ya se mencionó en la sección de Antecedentes, el efecto FRET consiste en excitar la proteína con ambos fluoróforos (GST-FRET) a la longitud de onda de excitación del donador (430 nm, para CFP) y observar la emisión del aceptor (a 510 nm para GFP).

Puesto que en este caso ambos fluoróforos se excitan a la λ_{exc} del donador, veríamos el efecto FRET como el aumento de la emisión del aceptor, y no sólo como la aparición de ésta emisión.

Cabría esperar que al excitar a 430 nm, GST-FRET emitiera a 510 nm con una intensidad mayor a la que se observa para GST-GFP y menor que la que presenta GST-CFP, ya que la transferencia de energía no puede ser 100% eficiente. Sin embargo esto no ocurre así: GST-FRET excitada a 430 nm emite a los niveles de GST-GFP, con lecturas prácticamente iguales a 510 nm y 538 nm (una unidad de fluorescencia de diferencia).

Se podría pensar que GST-FRET se está comportando como GST-GFP, sin embargo, al excitar esta proteína a 485 nm no se observa el aumento de fluorescencia al triple, sino solamente al doble.

Por lo tanto, GST-FRET se comporta en forma distinta a GST-CFP, GST-GFP y GST-FRET1.

Al parecer, esta proteína presenta un **opacamiento de fluorescencia** que afecta a ambos fluoróforos, pero en mayor medida al fluoróforo CFP, puesto que al excitarla a 430 nm no presenta el comportamiento de CFP (un pico de emisión

mayor a 538 nm) a pesar de tener éste fluoróforo. Las explicaciones probables a este efecto se revisarán en la sección de discusión.

Ensayos in vitro.

A continuación se hicieron pruebas *in vitro*, utilizando las proteínas recombinantes purificadas sobre glutatión agarosa, obtenidas por los protocolos descritos en la sección de Métodos. Los ensayos consistieron en analizar el comportamiento de las muestras a diferentes temperaturas (ensayo 1) o tiempos de integración (ensayo 2), excitándolas a 430 nm y 485 nm y capturando las emisiones a 510 nm y 538 nm.

Para ambos ensayos se observó que la proteína GST-FRET se comporta mejor *in vivo*, que *in vitro* (tiene emisiones de fluorescencia más intensas). Posiblemente sea más estable en la primera situación.

Efecto de la temperatura.

Las temperaturas utilizadas fueron: 27.5°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C y 45°C. En los gráficos 9 a 16 se presentan los resultados de este ensayo.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

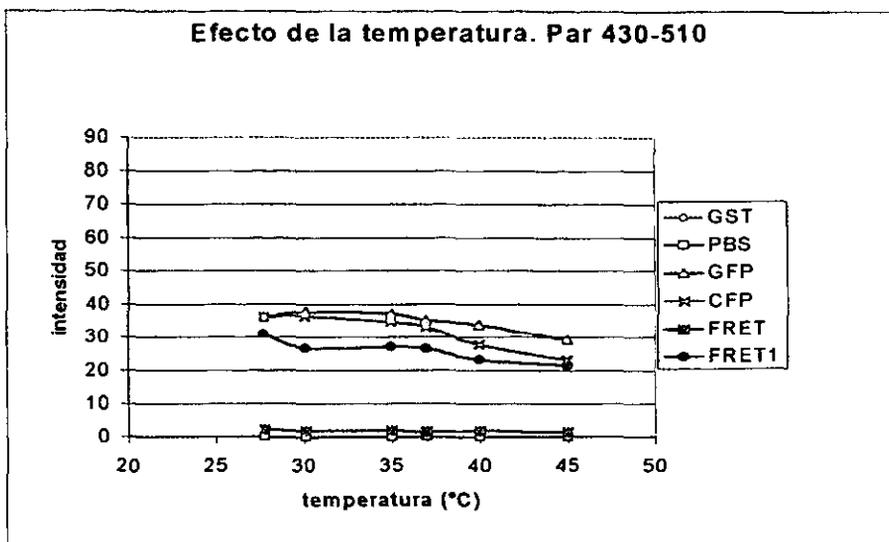


Gráfico 9. *Efecto de la temperatura sobre las proteínas recombinantes. Excitación a 430 nm y recuperación de la emisión a 510 nm.*

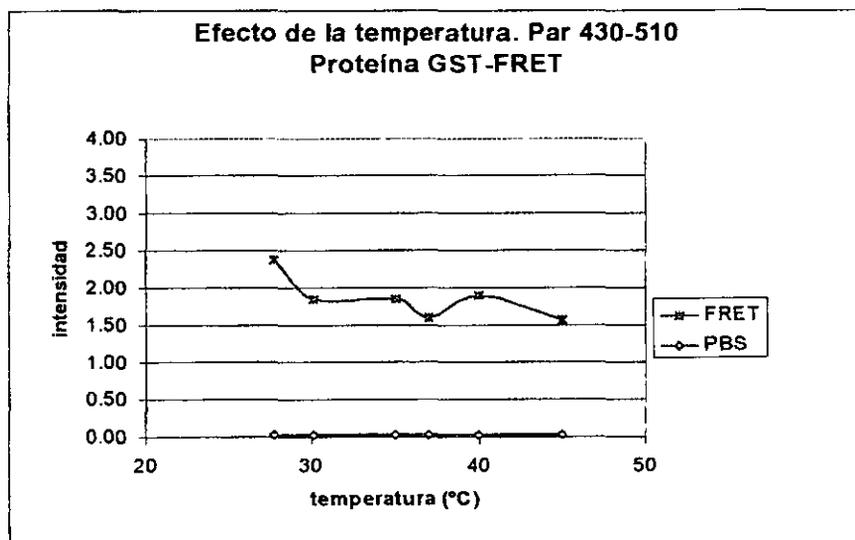


Gráfico 10. *Efecto de la temperatura sobre la proteína GST-FRET. Excitación a 430 nm y recuperación de la emisión a 510 nm.*

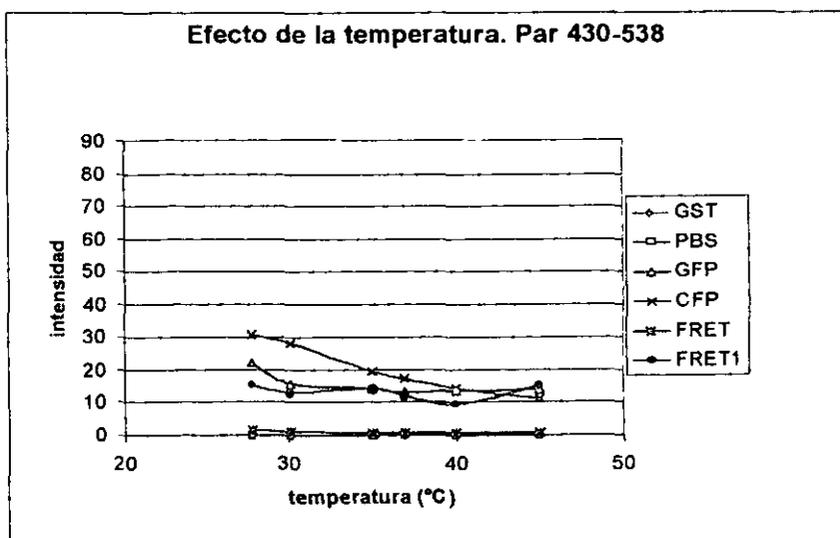


Gráfico 11. *Efecto de la temperatura sobre las proteínas recombinantes. Excitación a 430 nm y recuperación de la emisión a 538 nm.*

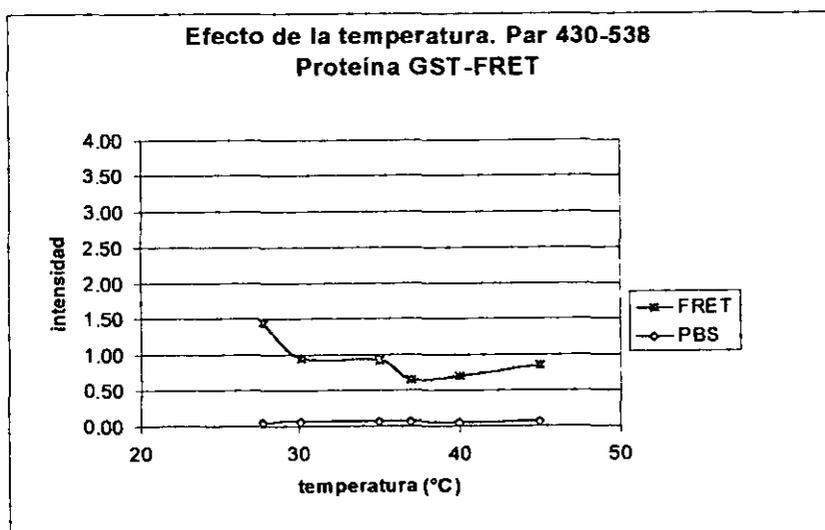


Gráfico 12. *Efecto de la temperatura sobre la proteína GST-FRET. Excitación a 430 nm y recuperación de la emisión a 510 nm.*

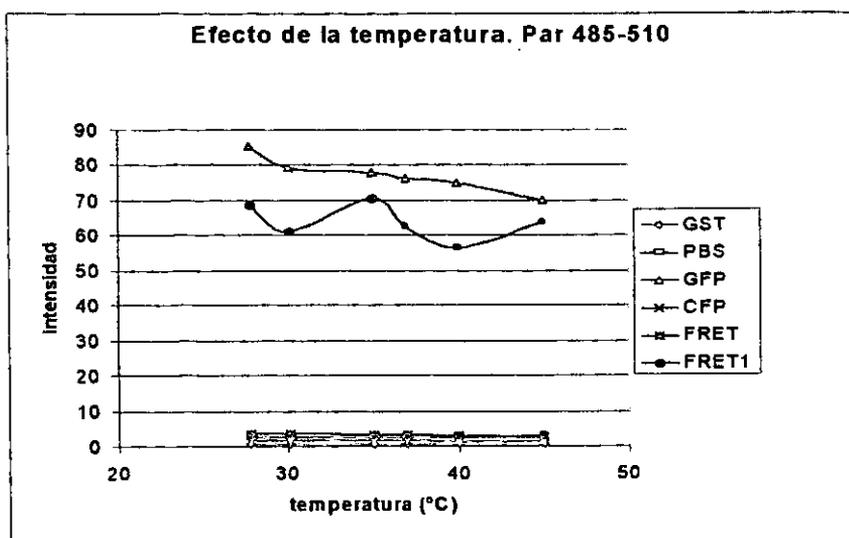


Gráfico 13. *Efecto de la temperatura sobre las proteínas recombinantes. Excitación a 485 nm y recuperación de la emisión a 510 nm.*

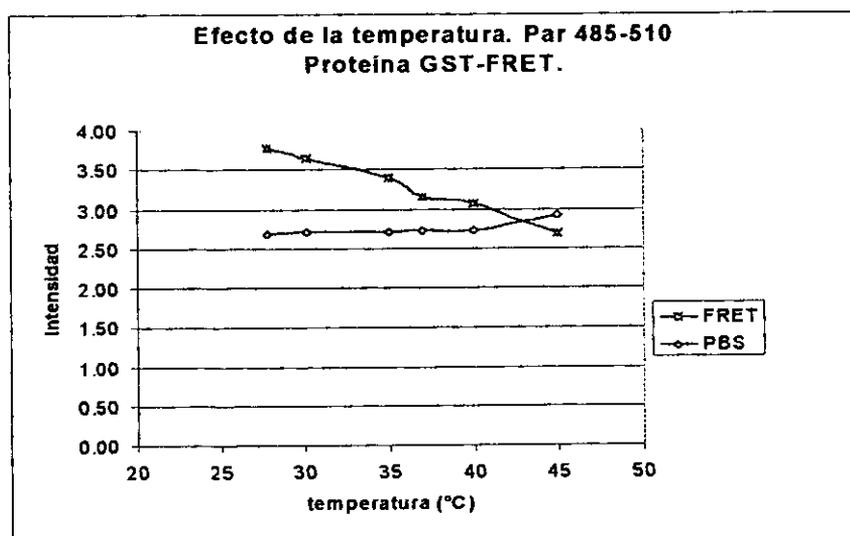


Gráfico 14. *Efecto de la temperatura sobre la proteína GST-FRET. Excitación a 485 nm y recuperación de la emisión a 510 nm.*

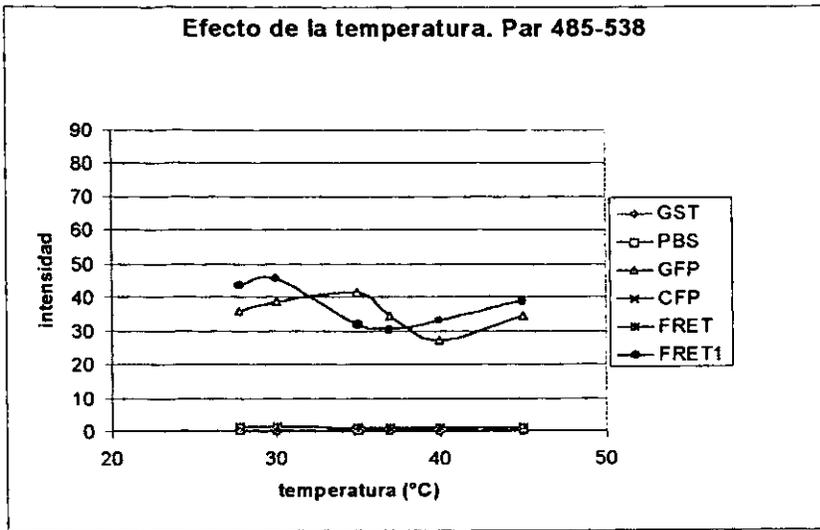


Gráfico 15. *Efecto de la temperatura sobre las proteínas recombinantes. Excitación a 485 nm y recuperación de la emisión a 538 nm.*

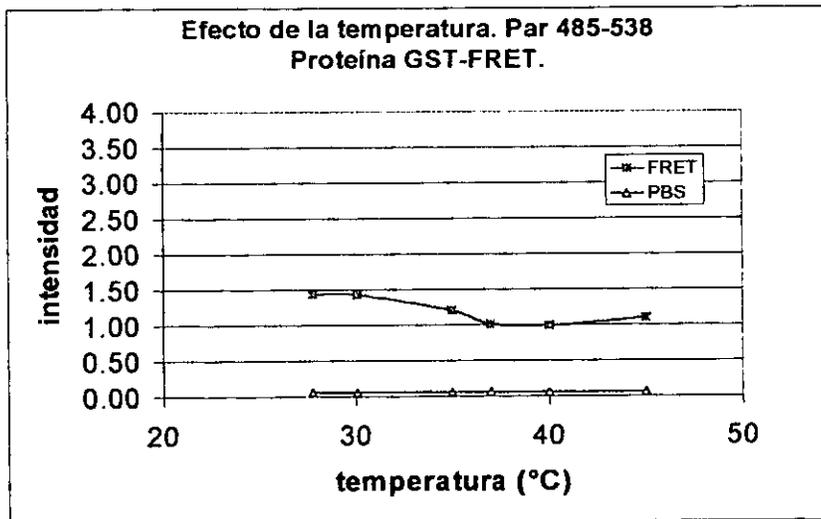


Gráfico 16. *Efecto de la temperatura sobre la proteína GST-FRET. Excitación a 485 nm y recuperación de la emisión a 538 nm.*

La proteína GST-GFP se comporta de manera similar *in vitro* que *in vivo*, se excita a las dos λ_{exc} que se probaron, aunque preferentemente a la de 485 nm (gráficos 9 y 13). Conserva su pico de emisión a 510 nm a ambas λ_{exc} (comparar el gráfico 9 con el gráfico 11, y el gráfico 13 con el gráfico 15).

La proteína recombinante GST-CFP se comporta un poco diferente *in vitro* que *in vivo*, porque su pico de emisión está a 510 nm y no a 538 nm (gráficos 9 y 11), sin embargo se sigue observando que se excita a 430 nm y no a 485 nm (gráficos 9 y 13).

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la fluorescencia, todas las proteínas presentan una tendencia a la baja a medida que aumenta la temperatura, pero la proteína GST-GFP resultó ser más resistente a los cambios en éste parámetro que la proteína GST-CFP.

Para hacer el análisis del efecto, tomamos en cuenta como referencia la lectura de fluorescencia a 27.8°C (temperatura ambiente).

Con el par de excitación-emisión 430nm-510nm, GST-GFP baja su emisión a los 30°C, 35°C y 37°C de un 2 a 3%, y hasta un 20% al aumentar a 45°C.

Con el par de excitación-emisión 485nm-510 nm (el óptimo para esta proteína), la emisión baja a un 7% a los 30°C, a 8% a los 35°C y a un 10.5% a los 37°C; al llegar a los 45°C disminuye hasta un 18%.

Mientras tanto, GST-CFP, a 430-510 nm mantiene su emisión a 30°C, pero la disminuye a un 4% a los 35°C y a un 8.5% a los 37°C; cuando está a 45°C baja

hasta un 36%. La disminución de la emisión es más dramática cuando se usa el par 430-538nm, porque a los 37°C ha disminuido su emisión en un 44% y a los 45°C hasta un 63%.

La proteína GST-FRET1 presenta un comportamiento peculiar. Con el par 430-510, a los 30°C su lectura baja un 13%, y más o menos se mantiene hasta los 37°C. Luego baja hasta un 31% a los 45°C.

Con el par 485-510 la fluorescencia baja un 11% a 30°C, sube otra vez a 35°C al nivel original, baja un 8% a 37°C, sube otra vez a los 40°C y baja hasta un 7% a los 45°C.

La proteína GST-FRET tiene tendencia a disminuir su fluorescencia con el aumento de la temperatura, pero las lecturas de emisión son bajas y por ello el calcular el porcentaje con que disminuye su fluorescencia no es muy confiable, porque una ligera disminución en la emisión tiene un impacto fuerte en el cálculo.

Aunque se observa cierta disminución en la fluorescencia a 37°C a 430-510 y 485-510, el sistema podría ser utilizado a esta temperatura, lo que es deseable, puesto que la finalidad es utilizarlo en células eucariontes que se desarrollan a 37°C. Sin embargo, aunque es de utilidad como orientación, esta prueba no es concluyente porque se trata de un experimento *in vitro* y las condiciones en que se llevó a cabo no son las existentes dentro de las células. Lo más conveniente sería medir la fluorescencia en células con el sistema, a 37°C.

La disminución en la fluorescencia por el aumento de temperatura se debe a que las proteínas cambian su estructura terciaria, lo que provoca que el microambiente del fluoróforo se modifique y pierda estabilidad⁹. Nunca se llegó a la desnaturalización completa de la proteína, ya que nunca se perdió la emisión de fluorescencia. El fluorómetro que utilizamos no nos permite llegar a temperaturas más elevadas, si quisieramos ver el efecto a mayor temperatura sería necesario preincubar la muestra a la temperatura requerida y luego leerla en el aparato.

Variación del tiempo de integración.

El tiempo de integración es el tiempo en que el fluorómetro mide la emisión, con una excitación constante de la muestra. Cuando los fluoróforos reciben energía por un periodo largo de tiempo tienden a perder la fluorescencia, a éste efecto se le conoce como *photobleaching*. Con este experimento se probó qué tan resistentes son las proteínas recombinantes a este efecto.

Se utilizaron cuatro tiempos de integración diferentes: 20 ms, 40 ms, 60 ms, y 80 ms. Las proteínas se excitaron a 430 nm y a 485 nm, y se rescataron las emisiones de fluorescencia a 510 nm y 538 nm.

Los resultados de este ensayo se presentan a continuación en los gráficos 17 a 24.

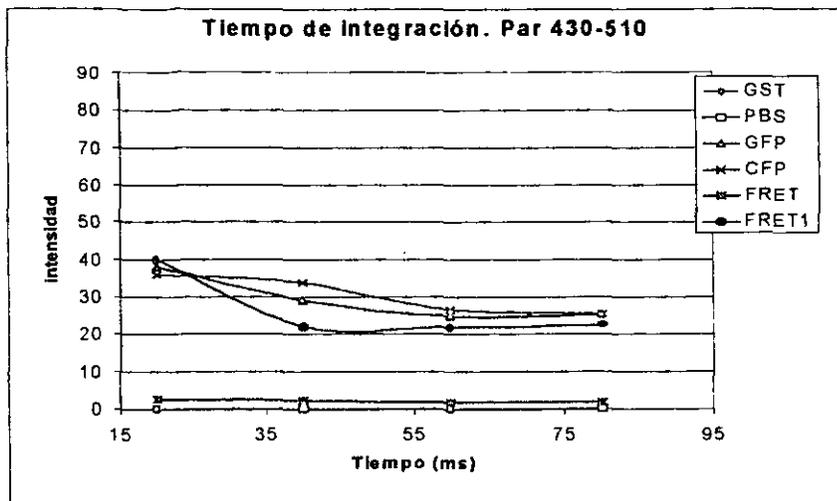


Gráfico 17. Variación del tiempo de integración. Excitación a 430 nm y recuperación de la emisión a 510 nm.

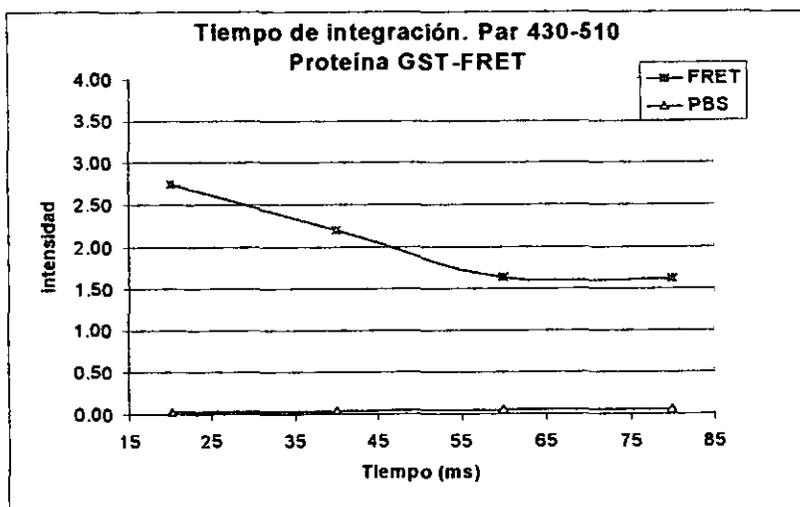


Gráfico 18. Variación del tiempo de integración en la proteína GST-FRET. Excitación a 430 nm y recuperación de la emisión a 510 nm.

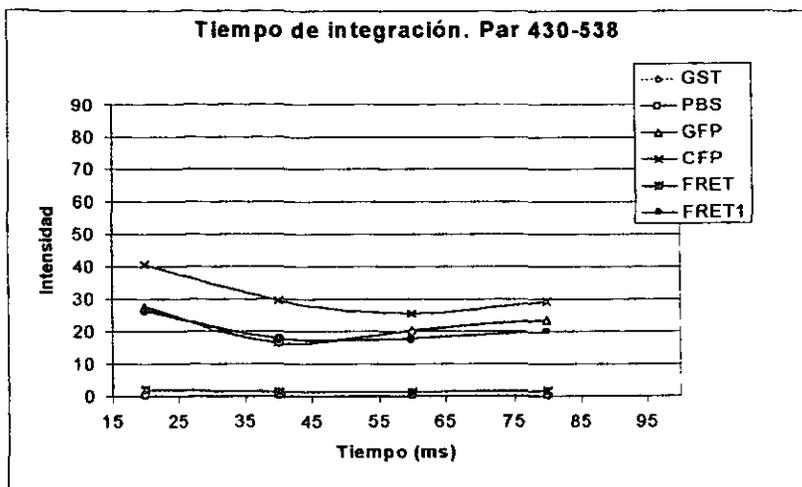


Gráfico 19. Variación del tiempo de integración. Excitación a 430 nm y recuperación de la emisión a 538 nm.

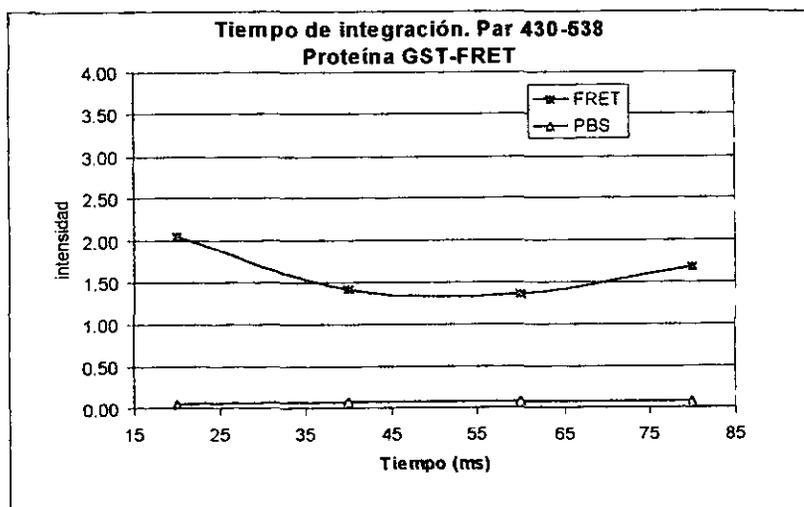


Gráfico 20. Variación del tiempo de integración en la proteína GST-FRET. Excitación a 430 nm y recuperación de la emisión a 538 nm.

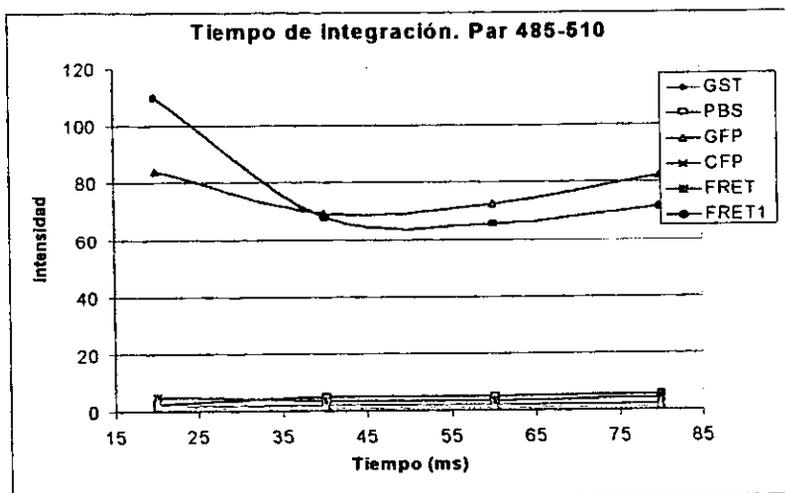


Gráfico 21. Variación del tiempo de integración. Excitación a 485 nm y recuperación de la emisión a 510 nm.

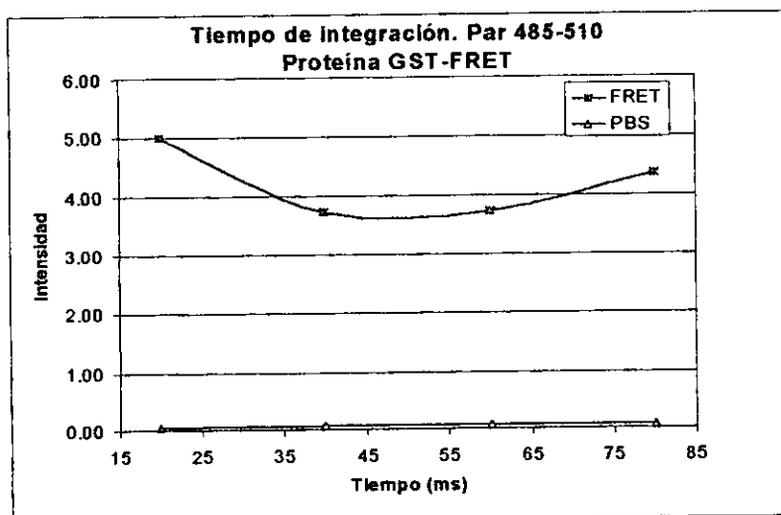


Gráfico 22. Variación del tiempo de integración en la proteína GST-FRET. Excitación a 485 nm y recuperación de la emisión a 510 nm.

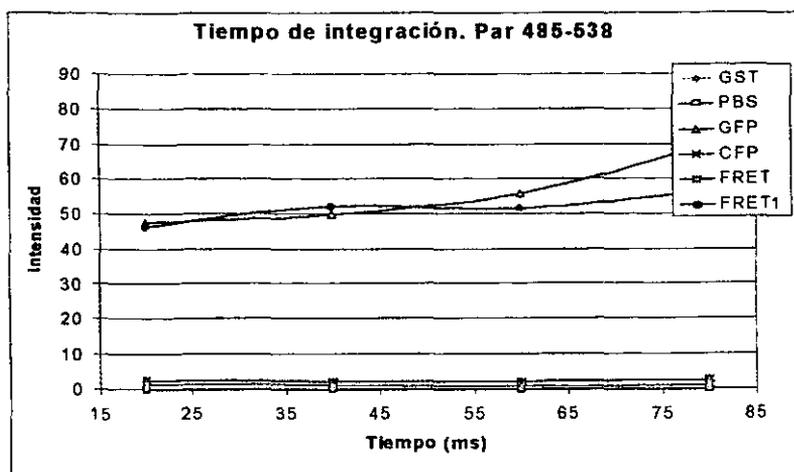


Gráfico 23. Variación del tiempo de integración. Excitación a 485 nm y recuperación de la emisión a 538 nm.

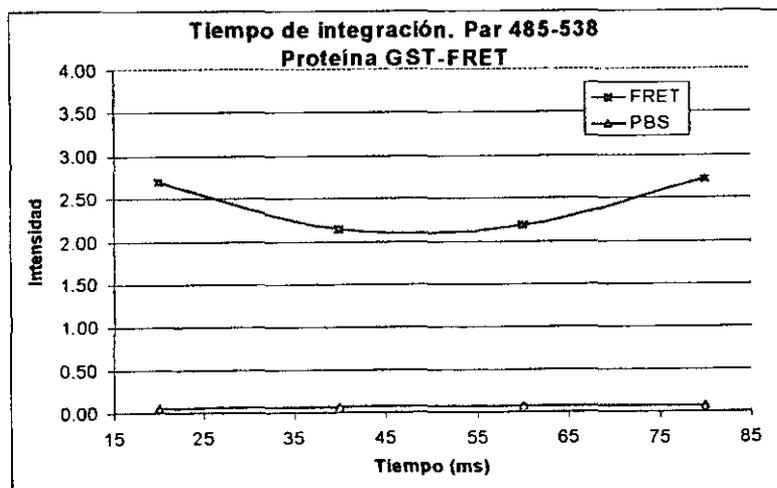


Gráfico 24. Variación del tiempo de integración en la proteína GST-FRET. Excitación a 485 nm y recuperación de la emisión a 538 nm.

Las proteínas verdes fluorescentes (GFP's) son relativamente resistentes al *photobleaching*. Como puede verse en los gráficos 17 a 24, las lecturas de fluorescencia de todas las muestras tienden a bajar conforme aumenta el tiempo de integración (un 20%), con un aumento ligero cuando se llega a los 80 ms (un 2% con respecto a las otras lecturas).

Se determinó que el tiempo de integración óptimo para hacer las lecturas de fluorescencia es el de 20 ms.

DISCUSIÓN.

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un sistema reportero para evaluar ribozimas recombinantes *in vivo*, basado en el efecto FRET entre dos mutantes de la proteína verde fluorescente (GFP).

Los resultados obtenidos con el sistema que construimos nos hacen pensar que éste último no produce un efecto FRET, porque al excitarlo a la λ_{exc} del fluoróforo donador CFP no obtenemos la emisión característica del fluoróforo aceptor GFP. Sin embargo, observamos un efecto de opacamiento de fluorescencia o *quenching* al excitar al sistema a las λ_{exc} óptimas de ambos fluoróforos (ver las páginas 75 a 79 de los resultados, para mayor detalle).

La falta de un efecto FRET en nuestro sistema se puede originar por varias causas:

- a) Polimerización de la molécula fluorescente³⁷.
- b) Cambios de conformación por la presencia de las tres secuencias en la misma molécula (GST y las dos GFPs) que llevan a la desprotección de los fluoróforos^{26, 27}.
- c) La distancia entre fluoróforos o la orientación no es la óptima²⁶

La polimerización de la molécula fluorescente, según Lakowicz³⁷, puede causar disminución de la fluorescencia y explicar el opacamiento observado. Se ha

reportado en diversos artículos^{1, 9} que la GFP tiene la capacidad de formar dímeros a altas concentraciones y además se ha determinado qué aminoácidos participan en la interacción entre GFP's⁹: Ala²⁰⁶, Leu²²¹, Phe²²³, Tyr³⁹, Glu¹⁴², Asn¹⁴⁴, Asn¹⁴⁶, Ser¹⁴⁷, Asn¹⁴⁹, Tyr¹⁵¹, Arg¹⁶⁸, Asn¹⁷⁰, Glu¹⁷², Tyr²⁰⁰, Ser²⁰², Gln²⁰⁴, y Ser²⁰⁸.

Las dos mutantes utilizadas conservan estos aminoácidos y, puesto que la expresión de la proteína quimérica se induce, se espera que la concentración de la molécula en las bacterias sea alta. La interacción de este tipo podría ser intermolecular (es decir, entre dos moléculas de la proteína GST-FRET), o intramolecular (entre los fluoróforos de la misma proteína), dependiendo de qué tan flexible sea el oligopéptido entre los fluoróforos. Esto no lo sabemos con certeza, puesto que no hemos realizado estudios para analizar la estructura de la proteína (cristalografía de rayos X, RMN), pero podría ser posible, ya que la región de unión entre los fluoróforos posee dos prolinas que, según la literatura, producen distorsiones en las cadenas peptídicas.⁴⁰

Sin embargo, si la proteína estuviera dimerizando, el aumento de temperatura a 45°C disociaría el dímero y el opacamiento se liberaría³⁸. No se observa este efecto (ver gráficos 9 a 16), así que es poco probable que ésta sea la causa del opacamiento.

Por otra parte, la orientación entre fluoróforos es un factor que no puede regularse fácilmente y puede afectar sustancialmente a la transferencia de energía^{10,12}, así que el opacamiento podría deberse a este motivo.

Como ya se mencionó anteriormente (ver la sección de antecedentes pág 13), es necesario que entre los fluoróforos exista una interacción dipolo-dipolo para que ocurra la transferencia de energía. Para que exista una interacción entre dipolos, es necesario que los momentos de éstos dipolos estén correctamente alineados entre sí (fig. 35).

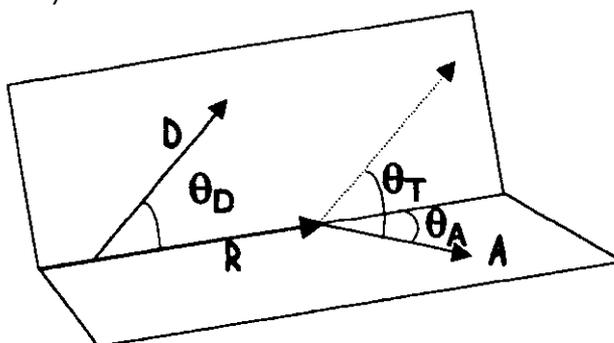


Fig. 35 Orientación de los momentos de los dipolos del donador (D) y del aceptor (A). (Modificado de ref. 31).

El factor de orientación k^2 nos da información sobre la dependencia entre la interacción de los dipolos eléctricos y sus respectivas orientaciones³¹:

El valor del factor de orientación depende de la forma en que se pliega la proteína con los fluoróforos, y es virtualmente imposible obtenerla sin tener información sobre la conformación de la proteína.

La tercera causa de la ausencia del efecto FRET es que la distancia entre fluoróforos no sea la óptima: revisando la secuencia teórica de la proteína GST-FRET, encontramos que el oligopéptido entre ambos fluoróforos es de 28 aminoácidos (fig. 38). Esto es consecuencia de la forma en que se construyó el vector. El gen de GFP se obtuvo cortando el plásmido *pEGFP-C1* en los sitios

NcoI (a 5' del gen) y *EcoRI* (a 3' del gen). Este último sitio se encuentra a 30 nucleótidos del extremo 3' del gen de GFP, como se puede ver en la figura 36.

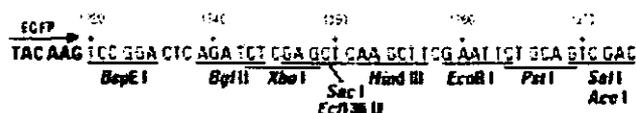


Fig. 36 Fragmento de la secuencia del plásmido pEGFP-C1. (Modificado de ref. 53).



Fig. 37 Fragmento de la secuencia del plásmido pECFP. (Modificado de ref. 54).

El gen de GFP se clonó en el plásmido *pGEX-2TK-MCS* para obtener el vector *pGST-GFP*. Para obtener el vector *pGST-FRET* se clonó al fragmento *FSCFP-kos* (oligo *FSCFP-kos* + gen de *CFP*, ver figura 37) en los sitios *HindIII-EcoRI* de *pGST-GFP* y después se hizo una reparación en el sitio *HindIII*, por lo que entre las secuencias de los genes *GFP* y *CFP*, existen 81 nucleótidos. Cuando *pGST-FRET* se expresa, da lugar a la siguiente secuencia aminoacídica (en clave de una sola letra):

N-terminal

C-terminal

GFP CFP
GMDELYKSGLR SRAQASLHACRSTLEDPRVPNYSMVSKGEELFTGVVPILVELD

Fig. 38 Fragmento de la secuencia de la proteína GST-FRET

Si el enlace peptídico (carbono-nitrógeno) mide en promedio 1.5 \AA ³⁶, el oligopéptido de unión mide 42 \AA . Además, los fluoróforos se encuentran casi en el centro sus respectivas proteínas, las cuales tienen un diámetro de 30 \AA cada una.

Si el oligopéptido de unión permanece lineal (lo cual puede no ser cierto, por la presencia de las prolinas), la distancia entre fluoróforos es de 72 \AA aproximadamente.

La distancia óptima para que ocurra un efecto FRET entre dos fluoróforos es de entre 10 y 100 \AA , difiere para cada par de donador-aceptor utilizado y se puede hacer una aproximación matemática de ella si se tienen todos los parámetros espectroscópicos del donador y del acepto.

En nuestro caso, no podemos hacer el cálculo porque en la literatura no están reportados todos los parámetros espectroscópicos para EGFP y ECFP^{1, 12}, así que la determinación de la distancia óptima para FRET solo se podrá hacer de forma experimental. Esto puede hacerse variando la longitud del oligopéptido de unión y analizando el comportamiento de las emisiones de fluorescencia.

El efecto de opacamiento de la fluorescencia observado para GST-FRET nos puede servir para evaluar la actividad de las ribozimas, puesto que existe una diferencia cuantitativa entre el sistema y sus controles.

En un sistema como este, la actividad catalítica de una ribozima podría ser detectada como una disminución del opacamiento a 485 nm .

El sistema desarrollado presenta importantes ventajas sobre otros métodos ya descritos:

a) En primer lugar, la detección puede hacerse *in vivo*, sin necesidad de romper la células, manipular directamente sus proteínas o su material genético. Esto implica que los resultados se obtienen en ambientes similares a los reales.

Los métodos reportados en la literatura son ensayos *in vitro* y/o requieren de hacer lisados celulares^{16 a 25}.

b) Se puede detectar el corte de manera cuantitativa en el momento en que ocurre (a tiempo real). Además, como se mide fluorescencia, el sistema puede ser muy sensible.

c) No requiere de la manipulación de material radiactivo, ni otros materiales biopeligrosos.

d) A comparación de los otros métodos, no es costoso. Únicamente se requiere de celdas adecuadas para hacer las lecturas y tener acceso a un fluorómetro o un espectrofluorómetro.

Es necesario hacer una caracterización del sistema, hay que probar a cortar el ARN mensajero de éste para ver si la eliminación de la secuencia para CFP lleva a que la proteína se comporte como GST-GFP, y una vez comprobado este punto proceder a determinar la sensibilidad del sistema con diferentes cantidades de substrato y ribozima y comparar los resultados con los obtenidos por otros métodos.

CONCLUSIONES.

Conforme a los objetivos planteados:

- (a) Se obtuvieron las construcciones pGST-CFP, pGST-FRET y pGST-FRET1 con los tamaños adecuados.
- (b) Se demostró por medio de un Western blot que la expresión de estos plásmidos da lugar a proteínas quiméricas con los tamaños y la constitución previstos.
- (c) La proteína GST-FRET no muestra un efecto FRET y sí un opacamiento de fluorescencia. Sin embargo, al ser este opacamiento de fluorescencia un comportamiento cuantitativamente diferente al que presentan las proteínas GST-GFP y GST-CFP, el sistema puede ser utilizado para evaluar la actividad de ribozimas recombinantes en células.

BIBLIOGRAFÍA.

Artículos.

1. Tsien R.; *The green fluorescent protein*. Annu. Rev. Biochem. 67: 509-544 1998.
2. Gerdes H., Kaether C.; *Green fluorescent protein: applications in cell biology*. FEBS Letters 389: 44-47 1996.
3. Cubitt A., Heim R., Adams S., et.al.; *Understanding, improving and using green fluorescent protein*. TIBS 20: 448-455 1995.
4. Chalfie M.; *Green fluorescent protein*. Photochem. Photobiol. 62(4): 651-656 1995.
5. Heim R., Tsien R.; *Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer*. Curr. Biol. 6: 178-182 1996.
6. Heim R., Prasher D., Tsien R.; *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12501-12504 1994.
7. Cormack B., Valdivia R., Falkow S.; *FACS- optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)* Gene 173: 33-38 1996.
8. Heim R., Cubitt A., Tsien R.; *Improved green fluorescence*. Nature 373: 663-664 23 Feb 1995.
9. Yang F., Moss L., Phillips G.; *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nature Biotechnol. 14 (Oct): 1246-1251 1996.
10. Pengguang W., Brand L.; *Resonance energy transfer: Methods and Applications*. Analytical Biochem. 218: 1-13 1994.
11. Mitra R., Silva C., Youvan D.; *Fluorescence resonance energy transfer between blue- emitting and red- shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein*. Gene 173: 13-17 1996.
12. Heim R.; *Green fluorescent protein forms for energy transfer*. Methods in enzymology 302: 408-423 1999.
13. Pollock B., Heim R.; *Using GFP in FRET-based applications*. Trends in Cell Biology 9 (Feb): 57-60 1999.

14. Tsien R., Backsai B., Adams S.; *FRET for studying intracellular signalling*. Trends in Cell Biology 3 (Jul): 242-245 1993.
15. Christoffersen R., Marr J.; *Ribozymes as Human Therapeutic Agents*. Journal of Med. Chem. 38 (12): 2023-2037 1995.
16. Álvarez Salas L., Cullinan A., Siwkowski A., et.al.; *Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 95: 1189-1194 1998.
17. Tatout C., Gauthier E., Pinon H.; *Rapid evaluation in *E. coli* of antisense RNA's and ribozymes*. Letters in Appl. Microbiol. 27: 297-301 1998.
18. Huang S., Stupack D., Mathias P., et.al.; *Growth arrest of Epstein Barr virus immortalized B lymphocytes by adenovirus delivered ribozymes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (Jul): 8156-8161 1997.
19. Vega M., Atkins D., Wade D., et.al.; *Inhibition of *Plasmodium falciparum* proliferation in vitro by ribozymes*. The Journal of Biol. Chem. 272 (27): 16940-16945 1997.
20. Wright L., Milliken S., Biggs J., et.al.; *Ribozyme targeting of HIV-1 LTR*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203 (2): 889-898 1994.
21. Hiromichi M., Masahiro K., Hiroyuki K., et.al.; *Restoration of retinoid sensitivity by MDR1 ribozymes in retinoic acid-resistant myeloid leukemic cells*. Blood, 91 (7): 2452-2458 1998.
22. Citti L., Boldrini L., Nevichi S., et.al.; *Quantitation of in vitro activity of synthetic trans-acting ribozymes using HPLC*. Biotechniques 23: 898-903 1997.
23. Naoya S., Wu C., Wu G.; *Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes*. J.Clin. Invest. 98(12): 2720-2728 1996.
24. Jürgen B., Nassal M.; *Efficient hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the structured hepatitis B virus encapsidation signal in vitro and in cell extracts, but not in intact cells*. Nucleic Ac. Res. 23(24): 4954-4962 1995.
25. Mahieu M., Deschuyteneer R., Forget D., et.al.; *Construction of a ribozyme directed against human interleukin-6 mRNA evaluation of its catalytic activity in vitro and in vivo*. Blood 84(11): 3758-3765 1994.

26. Miyawaki A., Tsien R.; *Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein*. *Methods in Enzymology* 327: 472-501 2000.
27. Deo SK., Daunert S.; *Green fluorescent protein mutant as label in homogeneous assays for biomolecules*. *Anal. Biochem.* 289 (1): 52-59 2001.
28. Tanner N.; *Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 257-275 1999.
29. Sioud M., Leirdal M.; *Therapeutic RNA and DNA enzymes*. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1023-1026 2000.
30. Doherty E., Doudna J.; *Ribozyme structures and mechanisms*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 597-615 2000.
31. Dale R E, Eisinger J, Blumberg W E; *The Orientational freedom of molecular probes. The Orientation factor in intramolecular energy transfer*. *Biophys. J.* 26: 161-194 1979.
32. Bowen B, Steinberg J, Laemmli UK, Weintraub H; *The detection of DNA-binding proteins by protein blotting*. *Nucleic Acids Res.* Jan 11, 8 (1): 1-20 1980.
33. Jacob F, Monod J; *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356 1961.

Libros.

34. Sullivan K, Kay S. *Methods in Cell Biology. Vol. 58: Green fluorescent protein*. Academic Press USA, 1999.
35. Skoog D, West D, Holler J. *Química Analítica. 6ª edición*. Mc. Graw Hill 1995.
36. Voet D, Voet J. *Biochemistry. 2nd edition*. John Wiley and Sons 1995.
37. Lakowicz J R, *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York Plenum Press 1983
38. Lakowicz J, *Topics in fluorescence spectroscopy*. New York Plenum Press 1991-1992. Vol. 2: Principles.

39. Russell, P. *Genetics*. 4th edition. Harper Collins College Pub. 1992.
40. Allen, G. *Protein. A Comprehensive Treatise*. 1st edition. Jai Press Inc. 1997. Vol. 1.
41. Harris D. *Análisis Químico Cuantitativo*. Grupo Editorial Iberoamérica. 1992.
42. Van Der Meer, B W. *Resonance Energy Transfer Theory and Data*. VCH 1994, New York.
43. Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. Vol. 1.

Internet.

44. <http://www.rcsb.org/pdb/> , ID: 1EMA.
45. <http://www.clontech.com/techinfo/manuals/index.html> , *Living Colors™ GFP User Manual*.
46. <http://www.anatomy.usyd.edu.au/mru/fret/abot.html>
47. <http://www.rpi.com/portfolio.cfm> , *Crystal structure of Hammerhead ribozyme*.
48. <http://tulane.edu/biochem/nolan/lectures/rna/frames/harnbtx.html>
49. <http://attila.stevens.tech.edu/chembio/rsamuel/>
50. <http://www.apbiotech.com/technical/technical-index.html> , Area: *Recombinant Protein Expression & Purification*, Sub-area: *Gene Fusion Expression Systems*. **Glutathione Sepharose 4B. Appendix 4.**
51. <http://www.apbiotech.com/technical/technical-index.html> , Area: *Recombinant Protein Expression & Purification*, Sub-area: *Gene Fusion Expression Systems*. **Glutathione Sepharose 4B. Procedure A, procedure B.**
52. <http://www.apbiotech.com/technical/technical-index.html> , Area: *Recombinant Protein Expression & Purification*, Sub-area: *Gene Fusion Expression Systems*. **GST detection Module. Procedure B.**
53. <http://www.clontech.com> , *Vector information, pEGFP-C1* en formato PDF.
54. <http://www.clontech.com> , *Vector information, pECFP* en formato PDF.

APÉNDICE A

COMPOSICIÓN DE REACTIVOS.

1. *Medio caldo Luria:*

Triptona B 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5g/L.

2. *Medio caldo SOC:*

Triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 0.5 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado 5 g/L, glucosa 20 mM.

3. *Medio agar Luria:*

Luria-caldo, agar bacteriológico 15 g/L.

4. *Amortiguador Tris-borato-EDTA (TBE) 1x:*

Tris 100mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1.0 mM, pH 8.33.

5. *Amortiguador de lisis (protocolo de inducción de proteínas recombinantes):*

Cloruro de sodio 100 mM, Tris-HCl pH8 0.02 M, EDTA 1mM, 0.5% IGEPAL (detergente no iónico), 0.5 mM AEBSF (clorhidrato de 4-(2-aminoetil) bencensulfonilfluoruro; inhibidor irreversible de serinproteasas, tripsina, quimiotripsina, plasmina, calicreína y trombina), dos tabletas "Complete" de *Boehringer*, las cuales contienen inhibidores de serinproteasas, cisteinproteasas y metaloproteasas.

Llevar a 200 ml con agua desionizada, y filtrar por membrana de 0.2 micras.

6. *Amortiguador PBS. (mezcla en polvo de Gibco Life Technologies para 1L).*

Amortiguador salino de fosfatos de Dulbecco, sin cloruro de calcio ni cloruro de magnesio, pH 7.2, *Life Technologies*

7. *Solución de bloqueadora de leche descremada en polvo I (protocolo de purificación de proteínas recombinantes ligadas a GST)*

0.05 g de leche Svelty en polvo, 10 mL de amortiguador de lisis bacteriana.

8. *Amortiguador Tris-glicina-SDS 1x (Solución concentrada 10x de Bio Rad)*

Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% p/v, pH 8.3.

9. *Amortiguador de transferencia.*

Amortiguador tris-glicina-SDS 1x, metanol al 15%.

10. *Solución de bloqueo.*

5 g. de leche Svelty en polvo, 100 mL de PBS-Tween 0.1%.

11. *PBS-Tween 0.1%.*

Disolver un sobre de solución PBS (*número 6 de esta sección*) y agregarle 1 mL de Tween 20 (BIO RAD).

APÉNDICE B.

FLUORESCENCIA.

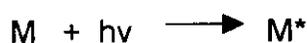
(Revisar referencias 35 y 41).

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética, llevándolas a un estado excitado del cual se relajan liberando su energía como fotones.

Bases teóricas.

Todas las especies moleculares poseen un número limitado de niveles discretos de energía cuyo nivel más bajo se llama "estado fundamental" y que es el nivel en el que están generalmente todas las moléculas a temperatura ambiente.

Una molécula puede absorber un fotón de radiación solamente cuando éste tiene exactamente la energía que necesita la molécula para pasar a uno de sus niveles de mayor energía, quedando la molécula en un estado excitado:



Tras un lapso breve de tiempo (10^{-8} a 10^{-9} s) la molécula se relaja de su estado excitado a su estado basal por tres medios:

- (a) Por relajación vibracional, cediendo su exceso de energía por colisión a los átomos y moléculas en el medio con un aumento ligero de temperatura. Esta relajación ocurre en etapas pues solo ocurre entre niveles vibracionales (cada nivel electrónico tiene diversos niveles vibracionales).

- (b) Por *conversión interna*, cuyos mecanismos no están claros y que consiste en la relajación desde el nivel vibracional más bajo de un nivel electrónico alto, al nivel vibracional más alto de un nivel electrónico más bajo.
- (c) Por descomposición fotoquímica de la molécula, generando nuevas especies.
- (d) Por reemisión de radiación fluorescente o fosforescente. Las moléculas excitadas se pueden relajar a cualquier estado vibracional del estado electrónico basal.

Para entender mejor estos procesos de relajación, observar la figura a continuación:

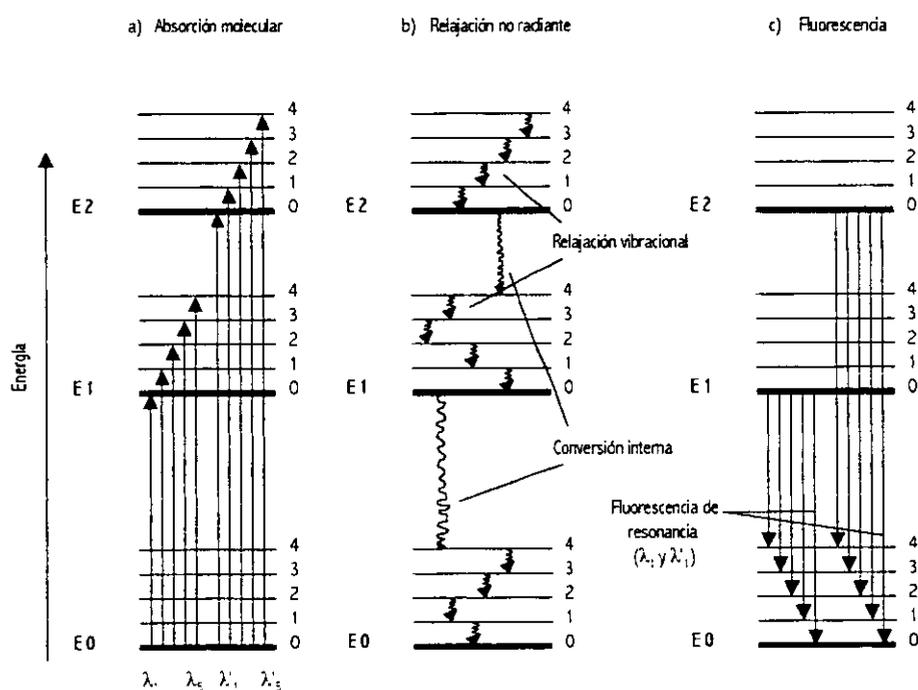


Fig. 1 Diagrama de los niveles energéticos. Cambios que ocurren en la molécula durante la absorción (a), la relajación no radiante (b) y la fluorescencia (c). (Modificado de ref. 35)

¿Por qué unas moléculas fluorescen y otras no?. Las moléculas que no fluorescen cuando son excitadas se relajan por medios no radiantes preferentemente. La vía de relajación radiante se favorece en las moléculas con estructuras más rígidas.

Los compuestos con sistemas aromáticos pueden presentar fluorescencia, y la probabilidad de que esto suceda aumenta mientras más anillos fusionados tengan, incluyendo anillos heterociclos (éstos, por sí solos no producen fluorescencia).

La sustitución en los anillos aromáticos provoca el corrimiento en los espectros de absorción y emisión del compuesto y afecta la eficiencia de la fluorescencia.

La eficiencia de fluorescencia disminuye con el aumento de temperatura, puesto que aumenta la probabilidad de relajación por colisión, y lo mismo ocurre con la disminución en la viscosidad del disolvente.

Las emisiones fluorescentes tienen una energía menor que la radiación absorbida por la molécula, es decir, absorben radiación de una longitud de onda y emiten radiación a una longitud de onda mayor. A este efecto se le llama *corrimiento de Stokes* y se debe a que la molécula excitada puede relajarse por un medio no radiante (relajación vibracional o conversión interna) antes de fluorescer y por lo tanto la radiación emitida será de menor energía (mayor longitud de onda).

Un compuesto fluorescente posee dos espectros característicos: *espectro de excitación* y *espectro de emisión*. El espectro de excitación se obtiene fijando a

cierta longitud de onda la emisión y haciendo un barrido de la longitud de onda de absorción o excitación. El espectro de emisión se obtiene a la inversa.

Dependiendo de qué molécula se trate, el espectro de emisión a veces parece ser una imagen especular (imagen en un espejo) del espectro de absorción, con una pequeña sobreposición. Si se ven como imágenes especulares quiere decir que las diferencias entre los niveles vibracionales son más o menos las mismas y la sobreposición en los espectros ocurre cuando hay longitudes de onda de absorción y emisión idénticas, llamadas *líneas de resonancia*.

Un poco de matemáticas.

La energía de la radiación fluorescente es proporcional a la energía radiante del haz excitado absorbido por el sistema, según la ecuación:

$$F = K'(P_0 - P) \quad \text{Eq. B 1}$$

Donde P_0 es la energía del haz incidente y P es la energía después de atravesar la longitud b del medio. La constante K' depende de la eficiencia cuántica de la fluorescencia. Si se considera a P_0 como constante, se tiene la ecuación:

$$F = KC \quad \text{Eq. B 2}$$

Donde C es la concentración de la especie fluorescente y K es la constante de proporcionalidad. A concentraciones bajas, la relación entre emisión y concentración es lineal, pero cuando la concentración es tal que la absorbancia es mayor que 0.05 (o sea, la transmitancia es menor de 90%), la fluorescencia ya no aumenta. Esto es porque las moléculas del analito absorben la

fluorescencia que producen otras moléculas de analito. A concentraciones muy altas, la fluorescencia comienza a decrecer con el aumento en la concentración.

Instrumentación.

En general, los fluorómetros tienen casi los mismos componentes que un espectrofotómetro, pero también tienen un filtro que selecciona la longitud de onda de la emisión. A continuación se presenta un esquema simplificado de un fluorómetro:

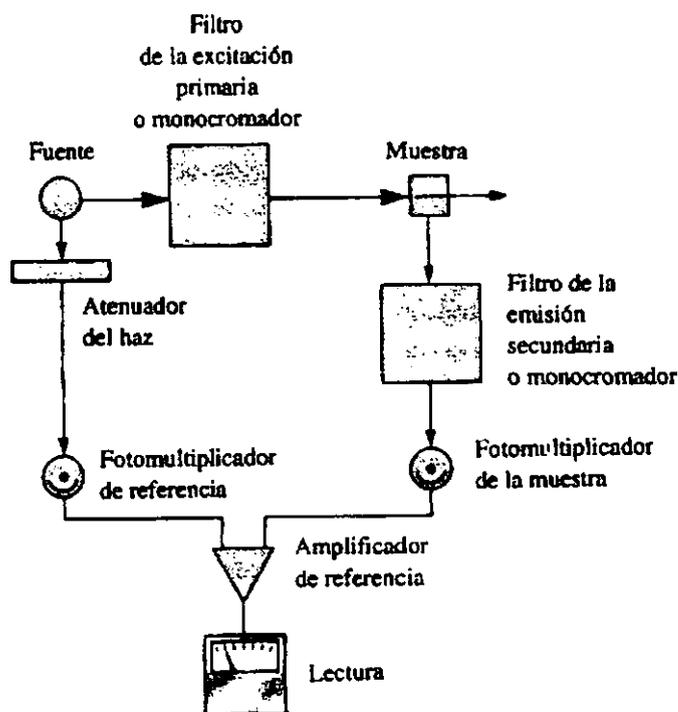


Fig. 2 Componentes de un fluorómetro. (Modificado de ref. 35)

El haz que se dirige a la muestra pasa primero por un filtro o monocromador que selecciona la longitud de onda de excitación y elimina la radiación con la misma longitud que la fluorescencia. La radiación de la fluorescencia se

propaga desde la muestra a todas direcciones, pero se mide mejor en ángulos rectos al haz de excitación.

La radiación emitida pasa por un filtro o monocromador secundario que selecciona radiación de una longitud de onda, y luego llega a un detector fotoeléctrico

También hay un rayo de referencia (contra el que se mide la fluorescencia) y que pasa por un atenuador para disminuir su energía aproximadamente hasta la de la emisión de fluorescencia. Ambas señales se procesan por un amplificador y la diferencia pasa a un registrador.

Los instrumentos que utilizan filtros se llaman fluorómetros, y los que utilizan monocromadores se llaman espectrofluorómetros.

Para las mediciones cuantitativas se prefiere utilizar fluorómetros, porque son más sensibles que los espectrofluorómetros, ya que la fuente y el detector se pueden colocar más cerca de la muestra en estos aparatos. Pero el uso de filtros limita el número de longitudes de onda de excitación y de emisión que se pueden utilizar.

Los métodos de fluorescencia son de uno a tres órdenes de magnitud más sensibles que los métodos que se basan en la absorción, porque la sensibilidad se puede reforzar aumentando la energía del haz de excitación, o por amplificación de la señal del detector, cosas que no se pueden hacer en un aparato de fotometría.

APÉNDICE C.

OPERÓN DE LACTOSA.

(Revisar referencias 36 y 39).

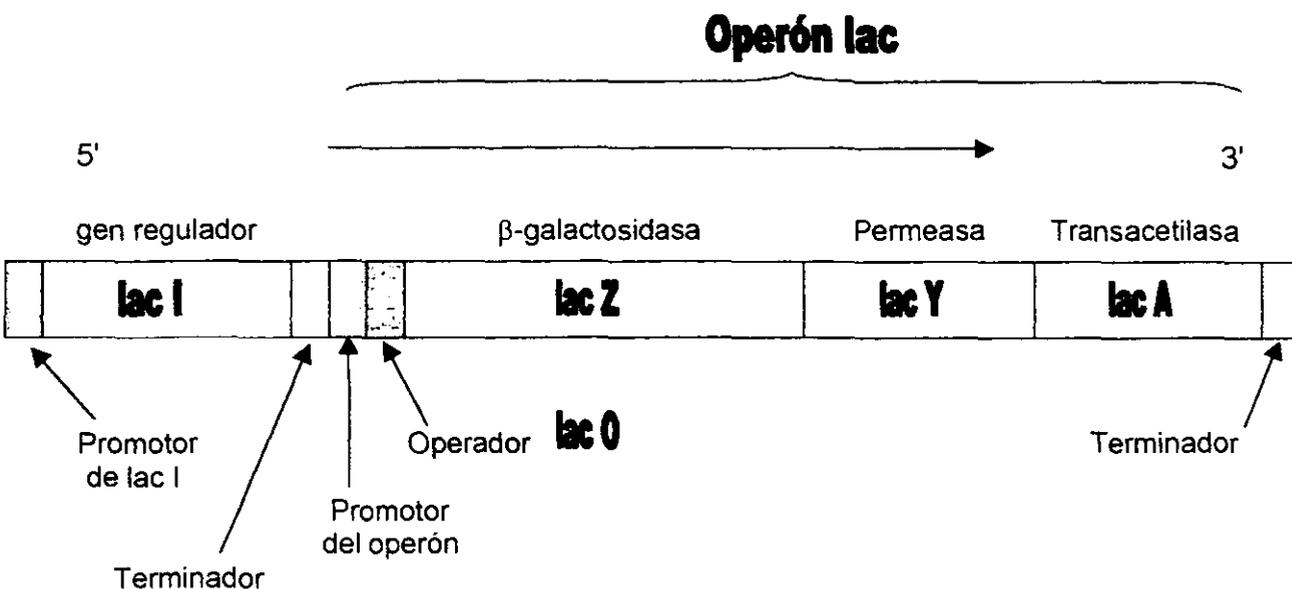
Una característica de los seres vivos es su capacidad de responder a los cambios que se registran en su medio ambiente. Una de las formas que tienen los seres vivos para adaptarse a su medio es alterar su actividad genética, de manera tal que el individuo posee algunos genes que sólo se expresan bajo ciertas condiciones: los genes regulados.

Por ejemplo, cuando la expresión de algunos genes se enciende con la adición de una sustancia al medio, a estos genes se les llama *inducibles* y a la sustancia que enciende su expresión se le llama *inductor*.

Francois Jacob y Jacques Monod³³ observaron un comportamiento de este tipo al agregar lactosa como fuente de carbono a cultivos de *E.coli*. Solamente en presencia de lactosa la bacteria sintetiza los enzimas necesarios para degradarla. Con diversos experimentos estos científicos desarrollaron un modelo para explicar la regulación genética en bacterias, al cual llamaron **operón**.

Un **operón** es un conjunto de genes espacial y funcionalmente relacionados, cuya expresión está regulada por las interacciones entre el operador y una proteína reguladora, y las interacciones entre el operador y el promotor.

La organización del operón de lactosa y sus elementos regulatorios asociados es la siguiente (modificado de ref. 39):



Para la degradación de la lactosa, la bacteria utiliza 3 enzimas:

- ☆ la β-galactosidasa, que convierte a la lactosa en alolactosa, la molécula que activa al operón lac, y que rompe el enlace glucosídico entre la galactosa y la glucosa.
- ☆ La permeasa, que se requiere para el transporte activo de la lactosa del medio a la bacteria.
- ☆ La transacetilasa, cuya función no está bien dilucidada.

Los genes que codifican para estos enzimas se encuentran todos bajo la guía de un solo promotor (*una secuencia regulatoria que no se transcribe a RNAm*), como puede verse en la figura. El promotor es la región en donde se asienta la RNAPol para transcribir a RNA los genes estructurales contiguos. Los genes para los tres enzimas se transcriben en un solo RNAm policistrónico, que después se traduce en los ribosomas en tres proteínas independientes.

Si la bacteria sintetizara los enzimas aún en ausencia de lactosa, estaría echando a la basura mucha energía que podría utilizar en procesos prioritarios.

Por ello, la expresión se encuentra bloqueada la mayor parte del tiempo por una proteína represora que se une a la región llamada *operador* (esta región tampoco se transcribe). Cuando la RNAPol se asienta en el promotor la presencia de la proteína impide que avance y transcriba los genes.

La proteína represora está codificada por el gen *lac I*, que se ilustra en la figura y que es regulado por su propio promotor, independiente del promotor del operón.

El promotor de la proteína represora es débil, por lo que en la bacteria se encuentran sólo algunas moléculas de represor.

La proteína represora no se encuentra fija todo el tiempo en el operador, se asocia y se disocia continuamente, lo que da oportunidad a que se sinteticen los enzimas en bajos niveles.

Cuando hay lactosa en el medio de cultivo, las pocas moléculas de enzima en la bacteria permiten la entrada de un poco de esta lactosa a la célula, la β -galactosidasa la convierte en alolactosa, que se une a la proteína represora en un sitio alostérico y le causa un cambio conformacional que la hace liberar al operador y permitir que la RNAPol transcriba los genes del operón.

Aprovechando el operón *lac* para la ingeniería genética, se pueden introducir genes en la bacteria bajo la regulación del promotor y el operador de lactosa, usando plásmidos (*unidades de DNA de doble cadena, independientes del cromosoma bacteriano y autorreplicables*). Si la bacteria que se transforma contiene el operón de lactosa (tal es el caso de la cepa *E.coli BL21 DE 3*), expresará de forma constitutiva a la proteína represora.

Si no es así, el mismo plásmido puede llevar el gen codificante para el represor.

El plásmido pGEX-2TK-MCS tiene el gen *lac I^q*, que es un mutante que se transcribe con mayor frecuencia (tiene un promotor menos débil que el original) y por lo tanto se producen más copias del represor. Esto hace que la inducción de los genes de interés requiera de mayores concentraciones de lactosa (o un galactósido inductor) que con el modelo original.