



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE INTEREACCIONES PROTEÍNA-LIGANDO
PARA EL DESARROLLO DE BIOSENSORES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

MARTIN GONZÁLEZ

ANDRADE

Tutor: DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO



Ciudad Universitaria, D.F., Junio de 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTUDIO DE INTEREACCIONES PROTEÍNA-LIGANDO PARA EL DESARROLLO DE BIOSENSORES

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Sosa Peinado en el laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM

Este trabajo fue realizado gracias a los proyectos autorizados por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, IN216207) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 53633 y 41328Q). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por el CONACYT con número de registro 185340 y una beca de la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) de la UNAM, para realizar una estancia de investigación en la Universidad Complutense de Madrid.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El jurado de examen doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Mario Luis Calcagno Montans	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dra. Bertha González Pedrajo	IFC, UNAM
Secretario	Dra. Mariana Peimbert Torres	Dep de ciencias Naturales, UAM
Suplente	Dra. Leticia Haydeé Ramirez Silva	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Instituto de Química, UNAM

Estudio de interacciones proteína-ligando para el desarrollo de biosensores.

Resumen

Los biosensores son herramientas analíticas que determinan la presencia de especies moleculares únicas inmersas dentro de mezclas complejas, a través del reconocimiento molecular específico acoplado a mecanismos transductores de eventos de unión a ligandos con señales físicas, por ejemplo señales espectroscópicas. El desarrollo de los biosensores es una necesidad actual para integrar y automatizar los sistemas bioanalíticos en diversas áreas: la medicina, la industria alimenticia, la industria ambiental, etc.

Los biosensores están formados principalmente por dos componentes: una macromolécula de tipo biológica (enzima o anticuerpo), la cual es la parte responsable del reconocimiento molecular y un componente transductor, que puede ser un grupo reportero (por ejemplo un fluoróforo). El objetivo de éste es transducir los eventos de unión de ligandos a la macromolécula en señales físicas cuantificables.

En este trabajo se planteó desarrollar dos biosensores; utilizando la proteína periplásmica de unión a aminoácidos básicos (L-lisina, L-arginina, y L-ornitina) llamada LAO y, un segundo biosensor con la proteína calmodulina (principal proteína transductora de señales intracelulares mediadas por Ca^{+2}) para evaluar posibles compuestos con acción farmacológica basada en la interacción con esta proteína. El componente transductor utilizado para el desarrollo de ambos biosensores es el fluoróforo monobromobimano (*Mbbm*), que tiene como principal característica su alta sensibilidad a los cambios de polaridad relativa de su entorno.

La incorporación del *Mbbm* a las proteínas se realizó utilizando el marcaje sitio-específico de fluoróforos reactivos a grupos tioles de las cisteínas. Para el diseño de los sitios específicos de marcaje se emplean una serie de criterios entre los que se encuentran principalmente herramientas de modelaje molecular, análisis estructural de las macromoléculas e información bibliográfica de sistemas homólogos.

Abstract

Biosensors are analytical tools to determine the presence of unique molecular species in complex mixtures, through specific molecular recognition coupled to mechanisms of ligands-union events transduction to physical signals, for example spectroscopic signals. The development of the biosensors is a present necessity for the integration and automatization of bioanalytical systems in several areas: medicine, nutritional industry, environmental industry.

Biosensors are formed mainly by two components: a biological macromolecule, an enzyme or an antibody, responsible for molecular recognition and a transducer component, which can be a group reporter (for example fluorophore). Its objective is to transduce the union of ligands to the macromolecule in quantifiable physical signals.

This projects proposes to develop two biosensors; the first one using the periplasmic basic amino acids binding protein (L-lysine, L-arginine, and L-ornithine-binding protein) named LAO and the biosensor second one using calmodulin (the main transductor protein of intracellular Ca^{+2} signaling) to evaluate possible compounds with a pharmacological action based in the interaction with this protein. In the development of both of these biosensors, the transducer component used is the fluorophore monobromobimane (mBBr), which main is characteristic a high sensitivity to the changes of relative polarity. In order to incorporate mBBr into the proteins, site-specific labeling of fluorophores reactive to cysteine thiol groups is used.

For the design of the labeling specific sites, a series of criteria is used among which molecular modeling tools, structural analysis of macromolecules and bibliographical information of homologous systems are the main ones.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	3
Índice	4
Abreviaturas	6
Introducción.....	7
Proteínas periplásmicas de unión (PPBs)	8
Proteína LAO.....	10
Proteína Calmodulina	13
Objetivos.....	16
Generales	16
Particulares	16
Materiales y Métodos	17
Reactivos	17
Sistema proteína LAO	17
<i>Amplificación del gen argT.</i>	17
<i>Clonación y Subclonación del gen argT.</i>	18
<i>Mutagénesis.</i>	19
<i>Expresión y purificación de la proteína LAO silvestre y sus mutantes.</i>	20
Sistema proteína CaM	22
<i>Amplificación de gen CAMLI.</i>	22
<i>Clonación y Subclonación del gen CAMLI.</i>	22
<i>Mutagénesis.</i>	23
<i>Expresión y purificación de la proteína CaM silvestre y las mutantes.</i>	24
Determinación de la concentración de proteína	25
Modificación química con Mbbm de las cisteínas reactivas de las proteínas LAO y CaM	25
Fluorescencia en estado estacionario.....	26
<i>Determinación de las K_d de la proteína LAO por fluorescencia.</i>	26
<i>Determinación de la K_d de la proteína CaM por fluorescencia.</i>	27
Rendimiento cuántico	27
Evaluación de la estabilidad termodinámica de la proteína LAO.	28
Bioensayo de inhibición del complejo CaM-PDE1 (actividad de la enzima PDE1)..	30
Modelaje molecular	31
<i>Cálculo del ASAS.</i>	31
<i>Generación de modelos estructurales de las proteínas modificadas químicamente con Mbbm</i>	31
<i>Acoplamiento molecular (Docking).</i>	32
Resultados y Discusión.....	33
Sistema proteína LAO	33
<i>Clonación y subclonación del gen argT.</i>	34
<i>Purificación.</i>	35
<i>Espectro de absorción de la proteína LAO silvestre.</i>	37
<i>Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO silvestre.</i>	38
<i>Efectos del pH en la afinidad de la proteína LAO silvestre por sus ligandos.</i>	40
<i>Análisis de sitios a modificar químicamente con el fluoróforo Mbbm.</i>	41
<i>Expresión, purificación y modificación química de las mutantes con una única cisteína.</i>	44

<i>Espectros de absorción de la proteína LAO modificada químicamente con Mbbm.</i>	45
<i>Estabilidad termodinámica de la proteína LAO y las mutantes modificadas químicamente con Mbbm.</i>	46
<i>Propiedades espectroscópicas de las mutantes modificadas químicamente con el Mbbm.</i>	47
<i>LAO D51C-Bimano.</i>	50
<i>LAO D53C-Bimano.</i>	50
<i>LAO A89C-Bimano.</i>	51
<i>LAO R131C-Bimano.</i>	52
<i>LAO E167C-Bimano.</i>	53
<i>LAO K228C-Bimano.</i>	54
<i>LAO Y230C-Bimano.</i>	54
Conclusiones del sistema LAO.	56
Sistema proteína CaM	57
<i>Clonación y subclonación de CaML1</i>	57
<i>Purificación de la proteína CaM (Homo sapiens).</i>	58
<i>Análisis de sitios a modificar químicamente con el fluoróforo Mbbm.</i>	61
<i>Acoplamiento molecular de la proteína CaM con los inhibidores TFP y CPZ</i>	63
<i>CaM Silvestre.</i>	65
<i>CaM E14C-Bimano</i>	66
<i>CaM K30C-Bimano</i>	67
<i>CaM L39C-Bimano</i>	68
<i>CaM V91C-Bimano</i>	69
<i>CaM T110C-Bimano</i>	70
<i>CaM M124C-Bimano</i>	71
Conclusiones del sistema CaM.	73
Conclusiones generales.	75
Bibliografía.	76

Abreviaturas

ASAS Área superficial accesible al solvente

CaM Proteína calmodulina

Cbp Cuanto baste para

CI₅₀ Concentración inhibitoria al 50 %

CPZ Clorpromazina

DMSO Dimetilsulfóxido

DTNB 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato

K_d Constante de disociación aparente

LAO Proteína periplásmica de unión a L-lisina, L-arginina, L-ornitina y L-histidina

LAO-Bimano Proteína LAO modificada químicamente con *Mbbm*

Mbbm Monobromobimano

PDB Protein Data Bank

PDE1 Fosfodiesterasa 1 dependiente de la Calmodulina

PPBs Proteínas periplásmicas de unión

TFP Trifluoroperazina

WT Enzima silvestre

ε Absortividad molar

φ Rendimiento cuántico

λ Longitud de onda

Introducción

Los biosensores son sistemas que presentan un mecanismo híbrido para transformar la información de interacciones químicas en señales analizables por medio de mecanismos bioquímicos. Estos sistemas están constituidos por un sistema receptor que generalmente es un componente biológico que interactúa específicamente con un analito y transduce la señal a un sistema detector, siendo este último de tipo espectroscópico, eléctrico, mecánico, etc. El interés en el desarrollo de biosensores ha sido particularmente impulsado por las necesidades de contar con técnicas analíticas rutinarias y rápidas para analizar un gran número de muestras con robustez, selectividad, sensibilidad y reproducibilidad. La ventaja de estos sistemas es que el componente biológico les confiere selectividad, mientras que el componente transductor les proporciona sensibilidad y reproducibilidad (Keusgen 2002). La base para el desarrollo de biosensores es precisamente el entendimiento de las interacciones proteína-ligando y proteína-proteína, que determinan su funcionalidad. Algunos ejemplos de este tipo de interacciones son los cambios estructurales que presentan muchos sistemas proteicos al interactuar con sus ligandos o proteínas, tales como las proteínas adenilato cinasa, alcohol deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa, calmodulina (CaM), proteína cheY, citrato cinasa, toxina de la difteria, enolasa, proteasa del HIV-1, inmunoglobulinas, lactoferrina, proteína de unión de L-lisina, L-arginina y L-ornitina (proteína LAO), fosfatasa tirosina, entre los más relevantes (Tama and Sanejouand 2001; Gerstein and Echols 2004).

Existen un gran número de enzimas conocidas que presentan cambios conformacionales apreciables al unirse con ligandos, los cuales pueden ser detectables a través de los cambios en su fluorescencia intrínseca o extrínseca durante los rearrreglos estructurales. Actualmente existen aplicaciones exitosas de algunos biosensores basados

en proteínas modificadas químicamente con fluoróforos u otras señales espectroscópicas: por ejemplo, la apo-enzima glucosa oxidasa marcada con ANS (ácido sulfónico 8-anilino-1-naftaleno) utilizada para determinar la concentración de glucosa (D'Auria, Herman et al. 1999), así como un biosensor para fosfato formado por una proteína de unión a fosfatos y el fluoróforo cumarina (Salins, Deo et al. 2004).

En este trabajo estudiaremos las interacciones proteína-ligando, utilizando el marcaje sitio-específico de proteínas con grupos reporteros fluorescentes, aprovechando los cambios conformacionales de las proteínas cuando estas interactúan con sus ligandos. Este tipo de estudio tiene como finalidad abordar aspectos de ciencia básica, e incorporarlos a un posible desarrollo tecnológico. El desarrollo de biosensores específicos para analitos de interés es cada vez más requerido en las áreas médicas, biotecnológicas así como en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos.

Proteínas periplásmicas de unión (PPBs)

Las proteínas periplásmicas de unión denominadas PPBs, por sus siglas en inglés, son miembros representativos de una amplia superfamilia de proteínas en bacterias Gram (-). Las PPBs son componentes esenciales que sirven como receptores contiguos para el transporte activo y quimiotaxis en los sistemas bacterianos. Estos receptores funcionan como un sistema de captación de diversos analitos como azúcares, iones, aminoácidos, metales, oligopéptidos, etc (Carmon, Baltus et al. 2004). Cada uno de estos receptores une sus ligandos con especificidad y afinidad en rangos desde micromolar a nanomolar (de Lorimier, Smith et al. 2002). Las PPBs tienen un motivo estructural común que consiste de dos dominios unidos por una “bisagra” y un sitio de unión entre los lóbulos de la misma (Figura 1). Una particularidad asociada a esta

superfamilia es el cambio conformacional que presenta al unir sus ligandos: de una forma “abierta” –libre de ligando- a una forma “cerrada” –unida a ligando- (Medintz and Deschamps 2006). Estas proteínas se han clasificado en dos subclases, denominadas clase I y clase II, que difieren en la topología con que la cadena polipéptida es distribuída entre los dos dominios de acuerdo con la clasificación de Scop (Figura 1). Estas proteínas resultan ser excelentes candidatos como elementos de reconocimiento molecular para el desarrollo de nuevos biosensores debido a que los cambios conformacionales inducidos por sus ligandos, junto con un elemento transductor (Un fluoróforo, por ejemplo), son la base del mecanismo de éstos. Utilizando a esta superfamilia se han desarrollado diversos biosensores, algunos ejemplos de los analitos que se han podido detectar y cuantificar con estos sistemas son: la maltosa, la glucosa, la ribosa, la glutamina, el níquel, los sulfatos, los fosfatos y algunos iones metálicos (Salins, Goldsmith et al. 2002; Shrestha, Salins et al. 2002; Tolosa, Ge et al. 2003; Salins, Deo et al. 2004; Dattelbaum, Looger et al. 2005; Cuneo, Changela et al. 2006; Vercillo, Herald et al. 2007).

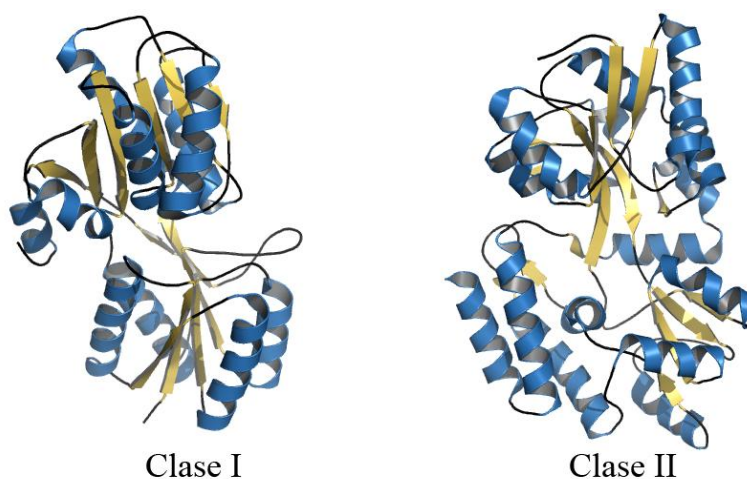


Figura 1. Estructuras representativas de las dos clases de las PPBs. Clase I, con seis hebras β representada por la proteína de unión a arabinosa (1BAP.pdb); Clase II, con cinco hebras β representada por la proteína de unión a maltosa (1PEB.pdb) (Telmer and Shilton 2003).

Proteína LAO

Los sistemas de transporte activo periplásmicos (permeasas) en bacterias Gram (-) tales como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, están compuestos de una serie de proteínas solubles que unen ligandos (carbohidratos, aminoácidos, iones, etc.) denominadas proteínas periplásmicas de unión a ligandos. Estas proteínas se localizan en el periplasma y son capaces de unirse a proteínas de membrana que transportan los ligandos al interior de la célula, las cuales están formadas por cuatro subunidades, dos de carácter hidrófobo embebidas en la membrana y dos con secuencias hidrofílicas (Furlong 1987). Existen secuencias similares en proteínas que atraviesan la membrana y que han sido bien caracterizadas, en particular en proteínas que contienen los motivos conservados implicados en la unión de ATP. La comparación de secuencias de aminoácidos de varias permeasas muestra que son muy similares, por lo que se ha sugerido que todas están relacionadas evolutivamente. La interacción del complejo proteína-ligando con las proteínas de la membrana desencadena una serie de cambios conformacionales en el complejo que resultan en la translocación del ligando. Se ha postulado que una vez que la proteína libera al ligando, pierde la afinidad por las proteínas de la membrana y se libera a su vez de esta, para llevar a cabo un nuevo ciclo de transporte (Figura 2).

El sistema de transporte de aminoácidos de *S. typhimurium* es uno de los más estudiados en la actualidad. Los genes *argT*, *hisJ*, *hisQ* y *hisP* codifican respectivamente a la proteína periplásmica de unión a L-arginina, L-lisina y L-ornitina (proteína LAO), a la proteína periplásmica de unión a L-histidina (proteína J), una proteína de localización aún desconocida denominada proteína Q y una proteína intermembranal llamada proteína P. Se sabe que las proteínas LAO y J interaccionan

con la proteína P, que está unida a la membrana durante el proceso de transporte (Oh, Ames et al. 1994; Gerstein and Echols 2004) (Figuras 2 y 3).

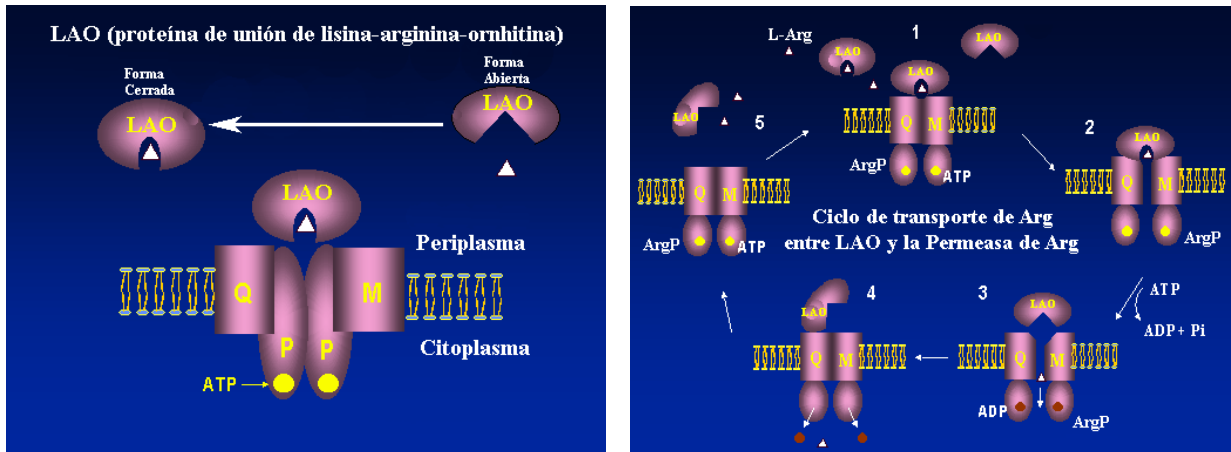


Figura 2. Sistema de transporte de aminoácidos en bacterias Gram (-). A la izquierda se muestra el diagrama de la proteína LAO, que al interactuar con su ligando cambia la conformación de abierta a cerrada y, en el estado cerrado interacciona con las diferentes proteínas de membrana, para transportar el aminoácido correspondiente al interior de la célula. A la derecha se esquematiza el ciclo de transporte de la L-arginina a través de LAO y la permeasa con aporte de ATP.

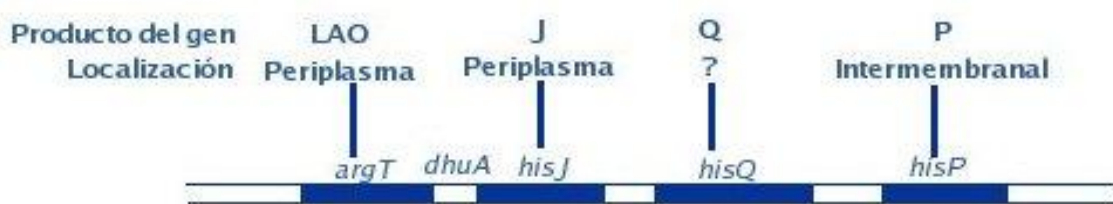


Figura 3. Mapa físico de la región cromosómica de transportadores de *S. typhimurium*.

La proteína LAO está constituida por 238 aminoácidos, y tiene un peso molecular de 26 kDa. Su estructura terciaria es bi-lobular, donde un lóbulo está formado por los residuos 1-88; 195-238 y el otro lóbulo está comprendido por los residuos 93-185, Figura 4 (Kang, Shin et al. 1991). El sitio de unión de aminoácidos se encuentra localizado entre los dos dominios globulares de la proteína.

La K_d de los ligandos para la proteína LAO es de 14, 15, 29 y 500 nM para los aminoácidos L-arginina, L-lisina, L-ornitina y L-histidina, respectivamente (Nikaido and Ames 1992). Las estructuras cristalográficas de la proteína LAO se encuentran disponibles, tanto para la forma apo como para los complejos con cada uno de sus

ligandos (Oh, Pandit et al. 1993; Oh, Ames et al. 1994). Los residuos involucrados en la unión de los ligandos son Tyr-14, Phe-52, Asp-30, Ser-69, Ser-70, Ser-72, Arg-77, Leu-117, Thr-121 y Asp-161 (Oh, Ames et al. 1994). La unión de los ligandos desencadena un gran cambio conformacional de la proteína, de la forma abierta a la forma cerrada (Figura 4). Por contar con estas características, nos propusimos marcar de manera específica la proteína LAO con fluoróforos que permitan monitorear los cambios conformacionales asociados a la unión de ligandos. Debido a que el cambio en la conformación de la proteína modifica el ambiente local de los fluoróforos extrínsecos, el desarrollo de un biosensor para los ligandos de esta proteína resulta factible.

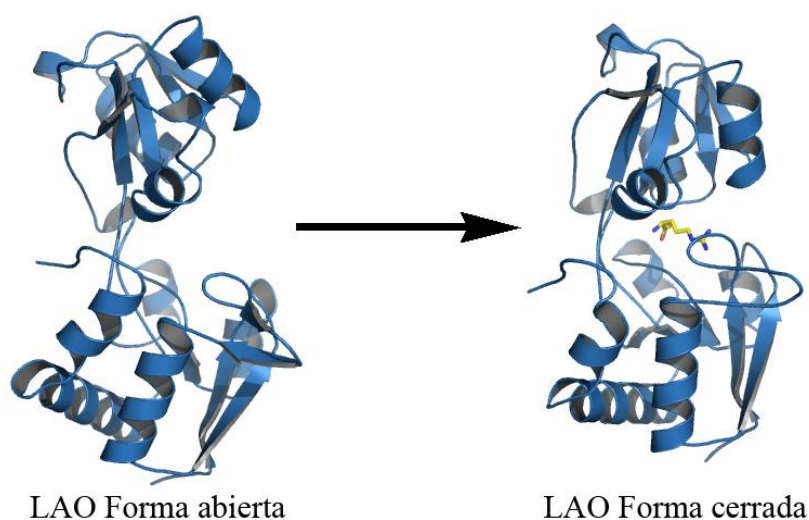


Figura 4. Proteína periplásmica de unión de L-lisina, L-arginina y L-ornitina. A la izquierda se muestra la proteína LAO sin ligando (forma abierta, 2LAO.pdb) y a la derecha la proteína LAO con ligando (forma cerrada, 1LAF.pdb).

Proteína Calmodulina

El calcio es uno de los principales mensajeros secundarios intracelulares para la activación y modulación de procesos bioquímicos y fisiológicos, tanto en organismos eucariotas como en procariotas. La principal proteína receptora de calcio es la calmodulina (CaM), una proteína de 16 kDa, de carácter ácida con un *pI* de 4.5. Estructuralmente, consiste de dos dominios de unión a calcio -cada uno constituido por dos motivos denominados manos EF- resultando en cuatro sitios de unión a calcio. El alineamiento de la secuencia indica que los cuatro sitios de unión a calcio (Sitios I y II en el dominio N-terminal; III y IV en el dominio C-terminal, Figura 5). Sin embargo, la unión de calcio a cada uno de los dominios es secuencial: los sitios III y IV se saturan casi al 100 % antes de la saturación de los sitios I y II (VanScyoc, Newman et al. 2006).

La proteína CaM regula numerosas vías metabólicas que utilizan señalamientos de calcio en las células eucariotas, siendo esta proteína la principal transductora de señales intracelulares de este ión. Adicionalmente, la CaM está relacionada con cerca de 50 proteínas intracelulares conocidas, cuyas actividades están moduladas por el grado de variación de la concentración intracelular de calcio libre. Ejemplos de estas proteínas incluyen algunas proteínas cinasas como la CaM-cinasa II (Nairn and Picciotto 1994), la proteína fosfatasa calcineurina (Aramburu, Rao et al. 2000), la fosfodiesterasa 1 (Miyake and Kakiuchi 1978), la oxido nítrico sintetasa (Cho, Xie et al. 1992), las adenilato ciclasas 1 y 8 (Wang and Storm 2003), algunos canales iónicos (Zuhlke, Pitt et al. 1999), la rianodina (Eu, Xu et al. 1999), los receptores IP3 (Tang, Lin et al. 2001) y un gran número de proteínas citoesqueleticas, incluyendo el caldesmon (Huber, El-Mezgueldi et al. 1996), la espectrina (Bjork, Lundberg et al. 1995) y la aducina (Matsuoka, Hughes et al. 1996). Debido al gran número de proteínas con que interactúa la CaM y por lo tanto al número de procesos celulares esenciales que regula, esta

proteína es de gran importancia y ha sido de interés en el desarrollo de numerosos agentes inhibidores con efectos farmacológicos, tales como fármacos antipsicóticos, relajantes musculares, bloqueadores α -adrenergicos, entre los más importantes. Estos inhibidores pueden ser obtenidos a través de síntesis orgánica (Horvath, Harmat et al. 2005), así como también pueden ser aislados a partir de productos naturales (Rojas, Acevedo et al. 2003) que pueden ser considerados posibles candidatos como inhibidores de CaM. Actualmente, existe la necesidad de contar con un método sensible, sencillo, eficiente y selectivo para identificar moléculas que interaccionen con la CaM y puedan ser posibles inhibidores de la CaM. Por tal motivo, nuestro interés es desarrollar un biosensor de tipo fluorescente con la proteína CaM, basándose en el marcaje sitio-específico de fluoróforos y en los cambios conformacionales que surgen de la interacción proteína-ligando (Yamniuk and Vogel 2004), lo que permitiría descubrir nuevas moléculas relacionadas con ésta. Adicionalmente, este biosensor puede ser utilizado para monitorear concentraciones de calcio e interacciones proteína-proteína.

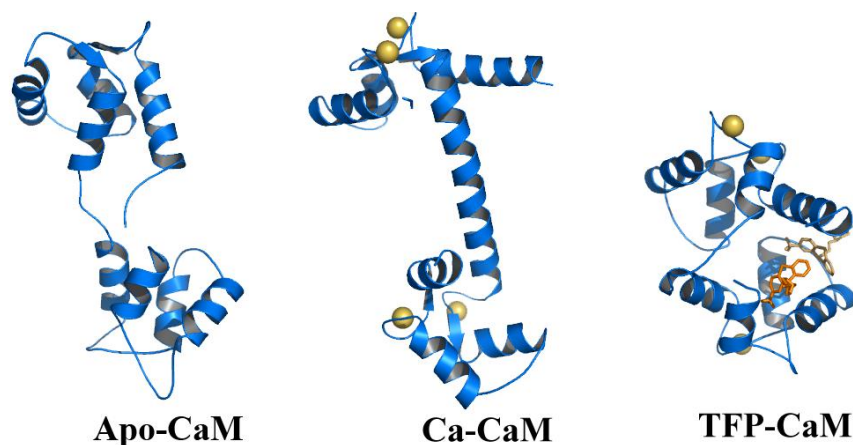


Figura 5. Estructuras tridimensionales de la proteína calmodulina en sus diferentes conformaciones. A la izquierda libre de ligandos (Apo-CaM, 1CFD.pdb), en el centro unida a cuatro iones de calcio (Ca^{+2} -CaM, 1CLL.pdb) y a la derecha unida al inhibidor trifluoperazina (TFP-CaM, 1A29.pdb).

La proteína CaM es una proteína altamente conservada, las secuencias de aminoácidos de las CaMs de bovino y humano son idénticas (Watt, Oakley et al. 2005).

Algunas estructuras resueltas a través de RMN y de difracción de rayos X se encuentran disponibles en la base de datos Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). La forma activa de la proteína CaM contiene cuatro iones de calcio y está formada por dos lóbulos; los dominios de unión a calcio se encuentran separados por ocho giros de una α -hélice (Figura 5). La unión de calcio a la proteína expone regiones hidrofóbicas, que son las responsables de las interacciones con diversas proteínas y ligandos (Yang, Jas et al. 2004). La comparación entre las estructuras en la forma apo-CaM (CaM libre de Ca^{+2}) y la conformación saturada con calcio (CaM- Ca^{+2}) muestra claramente un cambio conformacional como resultado de la unión de este ión metálico (Figura 5). La unión a péptidos derivados de las zonas hidrofóbicas de la proteína, dirige a una nueva conformación donde la sección helicoidal central de la proteína CaM se curva formando un túnel de unión. Finalmente, esta proteína también interacciona con un rango amplio de compuestos (Antagonistas de la CaM), que generalmente presentan superficies hidrofóbicas y cargas positivas como característica común. El complejo CaM- Ca^{+2} actúa también de manera dependiente del complejo de las proteínas cinasas, que son capaces de fosforilar y modificar coordinadamente la actividad de algunas proteínas reguladoras de varios procesos celulares (Dhillon, Sharma et al. 2003).

Objetivos

Generales

Estudiar las interacciones proteína-ligando a través de la introducción de señales fluorescentes sitio específico, en las proteínas LAO y CaM; para obtener información útil aplicable al desarrollo de biosensores.

Particulares

1. Clonar, subclonar y expresar los genes que codifican para las proteínas LAO y CaM.
2. Diseñar las posiciones para introducir señales fluorescentes sitio-específicas en las proteínas LAO y CaM.
3. Construir las mutantes con cisteínas únicas reactivas en las posiciones seleccionadas.
4. Modificar químicamente con el fluoróforo *Mbbm* las proteínas con cisteínas únicas reactivas.
5. Determinar la K_d de las proteínas LAO y CaM para sus respectivos ligandos, siguiendo la señal fluorescente extrínseca de los sistemas.
6. Evaluar la estabilidad termodinámica de las proteínas LAO modificadas químicamente, mediante la desnaturalización y renaturalización térmica de las mismas.
7. Estimar la capacidad de las CaMs modificada químicamente para activar a la enzima PDE1, a través de un bioensayo acoplado.
8. Identificar las regiones idóneas de las proteínas LAO y CaM para colocar grupos reporteros, con el propósito de obtener biosensores funcionales.

Materiales y Métodos

Reactivos

La mayoría de los reactivos utilizados fueron adquiridos de la compañía Sigma Aldrich S.A. de C.V., (St Louis Missouri, USA). El fluoróforo *Mbbm* fue adquirido en la compañía Toronto Chemical Research (Toronto, Canada).

Sistema proteína LAO

Amplificación del gen argT. Se amplificó el gen responsable de la codificación de la proteína LAO utilizando el kit Quick change (Stratagene, La Jolla, CA. USA) siguiendo las especificaciones indicadas por el proveedor: se utilizó a la enzima Taq ADN polimerasa, así como diferentes concentraciones de una suspensión bacteriana de *S. typhimurium* y oligonucleótidos sintéticos diseñados para unirse en los extremos del gen *argT*, con una extensión para el reconocimiento de las enzimas de restricción NdeI y BamHI (LAO_NdeI 5'-GGG AAT TCC ATA TGA AGA AGA CCG TTC TCG C-3' y LAO_BAMHI 5'-CGC GGA TCC GGC GCG TTA TCC CCT TCC CTC-3'). Las condiciones de la PCR fueron: 25 ciclos de desnaturalización (95 °C, 1 minuto), hibridación (55 °C, 1 minuto) y polimerización (68 °C, 10 minutos); seguido por una extensión de 10 minutos (Tabla 1) y finalmente se digirió el producto obtenido con la enzima *DpnI* incubando una hora a 37 °C.

Tabla 1
Protocolo de la amplificación del gen *argT*.

Condición	I	II	III	IV
<i>S. typhimurium</i>	5 µL	10 µL	20 µL	30 µL
Buffer 10X	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Oligo LAO_NDEI	0.25 µg	0.25 µg	0.25 µg	0.25 µg
Oligo LAO_BAMHI	0.25 µg	0.25 µg	0.25 µg	0.25 µg
dNTPs	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
<i>Taq</i>	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
H ₂ O		cbp 50 µL		

Clonación y Subclonación del gen argT. Después de la amplificación del gen *argT*, éste fue clonado dentro del vector pGEM-T Easy Vector System I (Promega Corporation) por ligación. Se utilizaron las relaciones de 1:3 y 1:5 de vector con respecto al producto obtenido de la PCR (gen *argT*), -Tabla 2-. Esta reacción fue realizada incubando 24 horas a 4 °C.

Tabla 2Condiciones de clonación del gen *argT* en el vector pGEM-T Easy Vector System 1.

Relación vector:producto PCR	3:1	5:1	Control (+)
2X Rapad Ligation Buffer, T4 ADN Ligase	5 µL	5 µL	5 µL
pGEM-T Easy Vector	50 ng	50 ng	50 ng
Producto de la PCR	17 ng	10 ng	-
Control Insert ADN	-	-	2 µL
T4 ADN Ligase	1 µL	1 µL	1 µL
H ₂ O		cbp 10 µL	

Posteriormente, se realizó la subclonación del gen *argT* a partir de la construcción pGEM-LAO al vector pET12b (Novagen), digiriendo ambos vectores con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (Tabla 3). La purificación del gen *argT* y del vector pET12b digeridos se realizó a partir de geles de agarosa, con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), siguiendo el procedimiento indicado en la Tabla 4. El producto de las ligaciones fue transformado en células competentes de *E. coli* DH5α, y finalmente se purificó la construcción pET12b-LAO a partir de las mismas células.

Tabla 3Protocolo de digestión de pGEM-LAO y pET12b con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*.

	pGEM-LAO	pET12b
Buffer 4 10X	2µL	2µL
DNA pGEM-LAO	5µL	-
DNA pET12b	-	10µL
<i>NdeI</i>	2µL	2µL
H ₂ O	11µL	6µL
2 horas a 37 °C		
Paso anterior	20µL	20µL
NaCl 1M	2.5µL	2.5µL
BSA 100X	0.25µL	0.25µL
<i>BamHI</i>	1.5µL	1.5µL
H ₂ O	1µL	1µL
3 horas a 37 °C		

Tabla 4Protocolo de ligación del gen *argT* en el vector pET12b.

Relación vector:fragmento	1:0.25	1:0.5	1:1	1:4	(-)
Buffer 4 (10x)	1µL	1µL	1µL	1.2µL	1µL
pET-12b	2µL	2µL	2µL	2µL	2µL
gen <i>argT</i>	0.5µL	1µL	2µL	8µL	-
<i>T4 DNA</i> ligasa	1µL	1µL	1µL	1µL	1µL
H ₂ O	5.5µL	5µL	4µL	-	6µL
24 horas a 12 °C					

Mutagénesis. Las mutantes con una única cisteína reactiva, se construyeron a partir del plásmido pET12b conteniendo el gen de *argT* (Construcción pET12b-LAO). La mutagénesis sitio dirigida se realizó utilizando el kit Quick Change (Stratagene, La Jolla, CA. USA) con la enzima *Pfu*; siguiendo las especificaciones del proveedor. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 100 ng de plásmido (pET12b-LAO), 125 ng de los oligonucleótidos, 25 ciclos de desnaturalización (95 °C, 1 minuto), hibridación (una rampa de temperatura de 45 a 60 °C, a una velocidad de calentamiento de 0.2 °C por segundo) y polimerización (68 °C, 10 minutos). Los oligonucleótidos utilizados para obtener las mutantes con una única cisteína se muestran en la Tabla 5. Posteriormente, una vez realizada la PCR, el producto de amplificación se digirió con la enzima *DpnI* y se transformo en células competentes DH5α, siguiendo las indicaciones del proveedor. Las mutaciones se confirmaron por la secuenciación de los vectores correspondientes utilizando un secuenciador Genetic Analyzer ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer Applied Biosystems) en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.

Tabla 5

Oligonucleótidos utilizados para la obtención de las diferentes mutantes con una única cisteína.

Mutante		Oligonucleótidos
D51C	Forward	5'-GGGTCGCCAGCTGCTTTGATGCGC-3'
	Reverse	5'-GCGCATCAAAGCAGCTGGCGACCC-3'
F52C	Forward	5'-CGCCAGCGACTGTGATGCGCTTATTC-3'
	Reverse	5'-GAATAAGCGCATCACAGTCGCTGGCG-3'
D53C	Forward	5'-CCAGCGACTTTTGTGCGCTTATTCCT-3'
	Reverse	5'-AGGGAATAAGCGCACAAAAGTCGCTGG-3'
D75C	Forward	5'-CTCTCTATCACCTGTAAACGCCAGCAAG-3'
	Reverse	5'-CTTGCTGGCGTTTACAGGTGATAGAGAG-3'
A89C	Forward	5'-GACAAACTTTACTGTGCGGATTCACG-3'
	Reverse	5'-CTGTTTCAAATGACACGCCTAAGTGC-3'
R131C	Forward	5'-GATAACTGGTGCCTAAAGGTG-3'
	Reverse	5'-CACCTTTAGTGCACCAGTTATC-3'
E167C	Forward	5'-GTCGCCGCCAGCTGTGGTTTCTTGAA-3'
	Reverse	5'-CAGCGGCGGTCGACACCAAAGGACTT-3'
K186C	Forward	5'-GGTCCCTCCGTGTGTGATAAAAAATAT-3'
	Reverse	5'-CCAGGAAGGCACACACTATTTTTTATA-3'
K189C	Forward	5'-CCTTCCGTGAAGGATAAATGCTATTTTGGCG-3'
	Reverse	5'-CCCCTCGCCAAAATAGCATTATCCTTCACG-3'
K228C	Forward	5'-CTTACGACAAAATGGCCTGCAAGTACTTCGA-3'
	Reverse	5'-CATTAAAATCGAAGTACTTGCAGGCCATTTG-3'
Y230C	Forward	5'-GGCCAAAAGTGCTTCGATTTTAATG-3'
	Reverse	5'-CATTAAAATCGAAGCACTTTTTGGCC-3'

Expresión y purificación de la proteína LAO silvestre y sus mutantes. La construcción pET12b-LAO se expresó en células competentes de *E. coli* (BL21 DE3). Las bacterias fueron inoculadas en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB), con 100 µg/mL de ampicilina y crecidas durante toda la noche a una temperatura de incubación de 37 °C y en agitación constante a 250 rpm. Posteriormente, 5 mL de este inóculo se transfirieron a 200 mL de medio LB incubando durante una hora a 37 °C. Transcurrido este periodo de incubación, el cultivo fue transferido en 1 L de medio LB. La inducción de la expresión se realizó adicionando 100 µg/ml de IPTG (DO₅₅₀ 0.8-1.0) incubando durante 4 horas. Posteriormente este cultivo fue centrifugado a 4,500 rpm durante 10 minutos, el paquete celular se resuspendió en 250 mL de KAc 10 mM, sacarosa 20 %, EDTA 1 mM, pH 5.1 manteniendo a temperatura ambiente por 10 minutos. A continuación, la suspensión se centrifugó durante 15 minutos a 4,500 rpm. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular se resuspendió en 80 mL de sulfato de magnesio 5 mM, agitando en frío durante 10 minutos. Finalmente, esta solución se

centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante el cual contiene a la proteína de interés (Ames and Lever 1972; Lever 1972). La proteína fue purificada utilizando una columna de intercambio catiónico (Source S, Amersham Biosciences) equilibrada con solución amortiguadora de KAc 10 mM, pH 5.1 y una columna de intercambio aniónico (Source Q, Amersham Biosciences) equilibrada con solución amortiguadora de Bis-Tris propanol 5 mM, pH 8.5. La purificación de las mutantes con cisteínas reactivas se realizó utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente, solamente se adiciono 5 mM de 2-Mercapto-etanol a partir del choque osmótico.

Sistema proteína CaM

Amplificación de gen CAML1. El gen que codifica para la proteína CaM de humano (gen *CAML1*) fue amplificado utilizando el kit Quick change (Stratagene, La Jolla, CA. USA) siguiendo las especificaciones del proveedor. Se utilizó a la enzima *Taq ADN* polimerasa, al vector pCMV6-XL5; el cual contiene al gen *CAML1* obtenido a partir de la compañía OriGene™ (OriGene Technologies, Rockville) y los oligonucleótidos sintéticos diseñados para unirse en los extremos del gen *CAML1*, con una extensión para el reconocimiento de las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (CaM_NdeI 5'-CAT ATG GCT GAT CAG CTG ACC G-3' y CaM_BAMHI 5'-CCT AGG AGT AAA ACG TCA GTA GTA GAC-3'). Las condiciones utilizadas para la PCR fueron: 25 ciclos de desnaturalización (95 °C, 1 minuto), hibridación (una rampa de temperatura de 45 a 60 °C, a una velocidad de calentamiento de 0.2 °C por segundo) y polimerización (68 °C, 10 minutos) seguidos por una extensión final de 10 minutos (Tabla 6). Al final se realizó la digestión del producto obtenido empleando la enzima *DpnI* (37 °C, 1 hora).

Tabla 6
Protocolo de la amplificación del gen *CAML1*.

Condición	I	II	III	IV
Buffer 10X	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
pCMV6-XL5	0.100 µg	0.100 µg	0.200 µg	0.200 µg
Oligo CaM_NdeI	0.125 µg	0.25 µg	0.125 µg	0.25 µg
Oligo CaM_BAMHI	0.125 µg	0.25 µg	0.125 µg	0.25 µg
dNTPs	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
<i>Taq</i>	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
H ₂ O		cbp 50 µL		

Clonación y Subclonación del gen CAML1. Después de la amplificación del gen *CAML1*, éste se clonó dentro del vector pGEM-T Easy Vector System I (Promega Corporation), utilizando las mismas condiciones experimentales del sistema proteína LAO indicadas anteriormente (página 18; protocolo de la Tabla 7).

Tabla 7Protocolo de clonación del gen *CAML1* en pGEM-T Easy Vector System 1.

Relación vector:producto PCR	3:1	5:1	Control (+)
2X Rapad Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µL	5 µL	5 µL
pGEM-T Easy Vector	50 ng	50 ng	50 ng
Producto PCR	17 ng	10 ng	-
Control Insert DNA	-	-	2µL
<i>T4 DNA</i> Ligase	1 µL	1 µL	1 µL
H ₂ O		cbp 10 µL	

La subclonación del gen *CAML1* a partir de la construcción pGEM-CAML1 al vector de expresión pET12b (Novagen), se realizó digiriendo el vector pGEM-CAML1 y el vector pET12b con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (Tabla 8 y 9) y las mismas condiciones experimentales utilizadas para el sistema LAO (página 18).

Tabla 8Protocolo de digestión de pGEM-CAML1 y pET12b con *NdeI* y *BamHI*.

	pGEM-CAML1	pET12b
Buffer 4 10X	2 µL	2 µL
pGEM- CAML1	16 µL	-
pET12b	-	16 µL
<i>NdeI</i>	2 µL	2 µL
H ₂ O	-	-
2 horas a 37 °C		
Paso anterior	20 µL	20 µL
NaCl 1M	2.5 µL	2.5 µL
BSA 100X	0.25 µL	0.25 µL
<i>BamHI</i>	2 µL	2 µL
H ₂ O	1µL	1µL
2 horas a 37 °C		

Tabla 9Protocolo de ligación del gen *CAML1* en el vector pET12b.

Relación vector:fragmento	1:1	1:3	1:6	(-)
2X Rapad Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
pET-12b	1 µL	1 µL	0.5 µL	1 µL
Gen <i>CAML1</i>	1 µL	3 µL	3 µL	-
<i>T4 DNA</i> ligasa	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
H ₂ O	2 µL	-	0.5 µL	3 µL
Incubación toda la noche a 16 °C				

Mutagénesis. Las mutantes con una única cisteína reactiva se construyeron a partir del vector pET12b conteniendo el gen *CAML1* (Construcción pET12b-CAML1).

La mutagénesis sitio dirigida se realizó con el kit Quick Change (Stratagene, La Jolla, CA. USA) utilizando la enzima *Pfu*, se siguieron las especificaciones del proveedor y las condiciones descritas previamente para el sistema LAO (Página 19), utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 10.

Tabla 10

Oligonucleótidos utilizados para la obtención de las diferentes mutantes con una única cisteína.

Mutante		Oligonucleótidos
E14C	Forward	5'-GAATTCAAGTGTGCCTTCTCCC-3'
	Reverse	5'-GGGAGAAGGCACACTTGAATTC-3'
K30C	Forward	5'-GGCACCATCACAACATGTGAACTTG-3'
	Reverse	5'-CAAGTTCACATGTTGTGATGGTGCC-3'
L39C	Forward	5'-CATGAGGTCATGTGGTCAGAACCC-3'
	Reverse	5'-GGGTTCTGACCACATGACCTCATG-3'
V91C	Forward	5'-GGCATTCCGATGCTTTGACAAGG-3'
	Reverse	5'-CCTTGTCAAAGCATCGGAATGCC-3'
T110C	Forward	5'-CGTCACGTCATGTGTAACCTTAGG-3'
	Reverse	5'-CCTAAGTTACACATGACGTGACG-3'
M124C	Forward	5'-GTAGATGAATGTATCAGAGAAGC-3'
	Reverse	5'-GCTTCTCTGATACATTCATCTAC-3'

Expresión y purificación de la proteína CaM silvestre y las mutantes. El vector conteniendo al gen de la CaM (pET12b-CAML1) fue expresado en células competentes de *E. coli* BL21-AI™ (Invitrogene Corp. Carlsban, CA). Las bacterias se inocularon en 10 mL de medio LB, con 100 µg/mL de ampicilina durante 12 horas a 37 °C en agitación (250 rpm). Transcurrido este periodo de incubación, 10 mL del inóculo se transfirieron a 500 mL de medio LB. Cuando la DO₆₀₀ del cultivo se encontró entre 0.8 y 1.0 se indujo la expresión con 1 g de L-Arabinosa (0.2 %). El cultivo se incubó durante 12 horas a 37 °C, en agitación constante (250 rpm). Una vez finalizado este periodo de incubación el cultivo fue centrifugado a 4,500 rpm durante 15 minutos, el paquete celular fue resuspendido, en 200 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 y posteriormente se centrifugó (4,500 rpm, 15 minutos). El paquete celular nuevamente fue resuspendido en 50 mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, pH 7.5 y lisozima a una concentración de 200 µg/mL), incubando a 4 °C durante 40 minutos. Las bacterias fueron sonicadas en un Ultrasonic Homogenizer, con

pulsos de 5 minutos a una amplitud de 35 %, durante 3 veces con intervalos de descanso. Los restos celulares fueron sedimentados por centrifugación (14,000 rpm, 15 minutos), y el sobrenadante se removió. Posteriormente, se adicionaron CaCl_2 y NaCl al sobrenadante a una concentración final de 5 mM y 500 mM, respectivamente. La purificación de la proteína se realizó mediante una columna de intercambio hidrofóbico (Phenyl-Sepharose CL-4B), equilibrada con solución amortiguadora (Tris-HCl 50 mM, DTT 0.5 mM, CaCl_2 0.1 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5) y se eluyó con solución amortiguadora de elusión (Tris-HCl 50 mM, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5). Finalmente, la fracción correspondiente a la proteína CaM del paso anterior se pasó por una columna de intercambio aniónico (Source Q, Amersham Biosciences). El procedimiento de purificación se siguió por SDS-PAGE.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de las proteínas (LAO silvestre, CaM silvestres y las respectivas mutantes modificadas químicamente con *Mbbm*) se determinó utilizando el método del ácido bicinonínico (Smith, Krohn et al. 1985).

Modificación química con *Mbbm* de las cisteínas reactivas de las proteínas LAO y CaM

La modificación química de las mutantes de la proteína LAO y CaM se realizó con un exceso molar de 10 veces de *Mbbm* disuelto en una solución acuosa al 20% (v/v) de DMSO, a una concentración final de solvente orgánico inferior al 5% (v/v). Previo a la modificación química, las muestras se redujeron con 20 mM de DTT durante 12 horas a 4 °C. Una vez transcurrido este periodo las muestras se pasaron por una columna HR-100 (Pharmacia, Biotech), con el objetivo de eliminar el exceso de DTT.

La concentración de proteína utilizada para modificar químicamente fue entre 5 y 10 mg/mL. Después de la modificación química, el exceso del fluoróforo se eliminó utilizando una cromatografía de exclusión molecular, en una columna Superdex 75. La eficiencia del marcaje se determinó por la reactividad de los grupos tioles de las cisteínas al cromogénico DTNB (5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoato), que al reaccionar forma al producto de oxidación TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico), que se cuantificó midiendo su absorptividad molar ($\epsilon_M = 14,250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a una longitud de onda de 409 nm a 25 °C y a un pH 7.4 (Eyer, Worek et al. 2003).

Fluorescencia en estado estacionario

La fluorescencia en estado estacionario se determinó en un espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champine, IL USA), acoplado a un controlador de temperatura (Quantum Northwest). Las rejillas de paso de luz utilizadas para la excitación y la emisión fueron de 0.5 mm y 2 mm, respectivamente.

Determinación de las K_d de la proteína LAO por fluorescencia. Para determinar la K_d (constante de disociación aparente) de la proteína LAO se realizaron diferentes titulaciones de sus ligandos, utilizando una concentración de 1 μM de proteína (en un volumen final de 2 mL). En todas las titulaciones, las soluciones de ligandos utilizadas fueron 100 μM de L-arginina, 100 μM de L-lisina y 310 μM de L-histidina; las cuales fueron adicionadas en alícuotas de 1 μL sin exceder el 1 % del volumen final, en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 30 °C. La λ_{ex} para la proteína LAO silvestre fue de 295 nm y la λ_{em} fue en el rango de 300-340 nm. Para las proteínas LAO-Bimano la λ_{ex} fue de 381 nm y la λ_{em} fue en el rango de 400-550 nm, con diez integraciones, colectando cada nanómetro.

Los cambios en los espectros de fluorescencia fueron analizados para obtener la K_d del complejo proteína-ligando (LAO-aminoácido), utilizando la siguiente ecuación:

$$v_0 = \frac{(1 + k_d / P_0 + L_0 / P_0) - \sqrt{(1 + k_d / P_0 + L_0 / P_0)^2 - 4L_0 / P_0}}{2}$$

en donde P_0 y L_0 son la concentración de proteína y ligando presentes respectivamente, K_d es la constante de disociación (Miller, Olson et al. 1983).

Determinación de la K_d de la proteína CaM por fluorescencia. La determinación de la K_d fue calculada a partir de titulaciones en fluorescencia de la proteína CaM con el inhibidor clorpromazina (CPZ), utilizando una concentración de 5 μ M de proteína (en un volumen final de 2 mL) y una solución de CPZ 20 mM, en amortiguador de KAc 5 mM, pH 5.1 a 37 °C. La λ_{ex} para la proteína CaM silvestre fue de 282 nm y la λ_{em} fue en el rango de 300-340 nm. Para las proteínas CaM-Bimano la λ_{ex} fue de 381 nm y la λ_{em} fue en el rango de 400-550 nm, con diez integraciones y colectando cada nanómetro.

Los valores de K_d , fueron determinados a partir de las diferencias existentes entre las λ_{max} en función de la concentración de inhibidor, con la misma ecuación utilizada para la proteína LAO.

Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico (ϕ) de las proteínas modificadas químicamente se determinó utilizando la siguiente relación (Chen 1965).

$$\phi_x = \phi_{est} \frac{F_x D O_{est}}{F_{est} D O_x}$$

en donde, los subíndices x y est se refieren a la solución problema y estándar respectivamente, ϕ es el rendimiento cuántico, F es la intensidad de fluorescencia

relativa y DO es la densidad óptica a la λ_{ex} . Como estándar se utilizó una solución de sulfato de quinina en H_2SO_4 1N, el cual tiene una ϕ de 0.55. Los espectros de emisión de fluorescencia de los fluoróforos se colectaron a diferentes intervalos; para el sulfato de quinina fue en el rango de 370-700 nm con una λ_{ex} de 360 nm, para la enzima silvestre fue en el rango de 310-450 nm con una λ_{ex} de 295 nm, para las proteínas modificadas químicamente con *Mbbm* fue en el rango de 450-550 nm con una λ_{ex} de 381 nm. La fluorescencia del amortiguador fue sustraída a cada muestra antes de determinar la ϕ en todos los casos.

Evaluación de la estabilidad termodinámica de la proteína LAO.

El proceso de desnaturalización térmica de la proteína LAO silvestre y de las respectivas mutantes modificadas químicamente con el *Mbbm* fueron analizadas por sus propiedades de desplegamiento térmico (Eftink 1994), siguiendo la señal de la fluorescencia intrínseca de la proteína en función de la temperatura.

La concentración de proteína fue de 1 μ M para todas las muestras, en un amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (volumen final de 2 ml), utilizando una celda de 1 cm de paso de luz, con agitación constante, una λ_{ex} = 295 nm y una λ_{em} = 326 nm. Las rejillas de paso de luz para la excitación y la emisión fueron de 0.5 mm y 2 mm, respectivamente. La rampa térmica fue de 40 a 70 °C a una velocidad de 20 °C/h, utilizando un controlador de temperatura (Quantum Northwest) acoplado al espectrofluorómetro.

Los datos de la estabilidad termodinámica fueron analizados asumiendo un modelo de dos estados (estado plegado nativo y estado totalmente desnaturalizado) en equilibrio (Eftink 1994):



Al equilibrio se asume que se puede obtener un ΔG

$$\Delta G = \Delta H_D - T_m \Delta S_D = 0$$

donde ΔG se refiere a la energía libre para la reacción de desplegamiento, ΔH_D es la entalpía de desplegamiento, ΔS_D es la entropía de desplegamiento y la T_m es la temperatura en la que la mitad de las moléculas de proteínas se encuentran en estado nativo y la otra en estado desnaturalizado.

Rearreglando la ecuación anterior al equilibrio tenemos:

$$T_m = \frac{\Delta H_D}{\Delta S_D}$$

usando esta relación, la T_m de cada mutante fue determinada ajustando los datos de fluorescencia en estado estacionario. Para obtener los valores de ΔH_D y ΔS_D (Eftink 1994) utilizando la siguiente expresión matemática:

$$F = \frac{F_{0N} + s_N T + (F_{0D} + s_D T) e^{\left(\frac{-\Delta H_D / 4 + T \Delta S_D / 4}{RT}\right)}}{1 + e^{\left(\frac{-\Delta H_D / 4 + T \Delta S_D / 4}{RT}\right)}}$$

donde F_{0N} es la intensidad de fluorescencia del estado nativo y F_{0D} es la intensidad de fluorescencia del estado desplegado. Las variables s_N y s_D representan las pendientes de las líneas base anterior y posterior a la transición, ΔH_D° es el cambio de entalpía, ΔS_D° es el cambio de entropía para la reacción de desplegamiento de dos estados, T es la temperatura en grados Kelvin y R es la constante general de los gases.

Con base en lo expuesto anteriormente, y utilizando la propuesta realizada por Becktel y Schellman (Becktel and Schellman 1987), los valores de $\Delta \Delta G$ para cada mutante de la proteína LAO modificada químicamente con *Mbbm* pueden ser calculados utilizando la siguiente aproximación:

$$\Delta \Delta G = \Delta T_m * \Delta S_{wt}$$

donde el ΔT_m es la diferencia de las T_m entre la proteína modificada químicamente y la proteína silvestre y ΔS_{wr} es el valor del cambio de entropía entre los estados nativos y desplegados de la proteína LAO silvestre.

Bioensayo de inhibición del complejo CaM-PDE1 (actividad de la enzima PDE1).

Este bioensayo se basó en la medición de la funcionalidad del complejo formado por la proteína CaM y la fosfodiesterasa dependiente de la CaM (CaM-PDE1), siguiendo el procedimiento experimental descrito por Sharma y colaboradores (Sharma, Wang et al. 1997). Para ello, se utilizó una mezcla de reacción con 0.0495 unidades de fosfodiesterasa de cerebro de bovino (PDE1, Sigma), 5.5 μg de proteína CaM, 0.99 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* (Sigma) y 22.5 μL de proteína albúmina sérica bovina (6.21 μM , ASB Boehringer Mannheim) disueltos en 3.0 mL de solución amortiguadora (Tris-HCl 135 mM, acetato de magnesio 16.8 mM, imidazol 135 mM y CaCl_2 2.5 mM, pH 7). Ésta se incubó durante 30 min a 30 °C. Posteriormente, en una placa de ELISA de 96 pozos se adicionaron 10 μL del compuesto a evaluar (disuelto en una mezcla binaria de acetonitrilo-agua 1:1) a las concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 13, 20, 32, 50 y 65 nM y 40 μL de la mezcla de reacción; la placa se incubó durante 30 minutos a 30 °C. Al término de este período, se adicionaron 10 μL de AMPc 10.8 mM a cada pozo, cada 10 segundos y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron a cada pozo 190 μL de una solución de verde de malaquita y molibdato de amonio (2.1 g de molibdato de amonio en 50 mL de ácido HCl 4M y 45 mg de verde de malaquita en 10 mL de agua), con la finalidad de estimar el contenido de fósforo

inorgánico de manera colorimétrica a una absorbancia de 700 nm utilizando un lector de placas de ELISA, marca BIO-RAD modelo 680.

Los datos fueron analizados para estimar la CI_{50} , utilizando las absorbancias obtenidas en función de la concentración del inhibidor utilizando mediante un ajuste no-lineal, con el programa Origin 7.0 como se ha reportado previamente (S. Martínez-Luis 2006).

Modelaje molecular

Cálculo del ASAS. El área superficial accesible al solvente (ASAS) de los aminoácidos se calculó utilizando el algoritmo de Lee-Richards (Lee and Richards 1971; Richards 1977), en el programa NACCESS 2.1.1 (Hubbard, Thornton et al. 1992). Las ASAS para la proteína LAO se calcularon a partir de los archivos pdb de las estructuras cristalinas, para la conformación abierta -2LAO.pdb- (Oh, Pandit et al. 1993) y para la conformación cerrada -1LAF.pdb- (Oh, Ames et al. 1994). En el caso de la CaM los archivos utilizados fueron 1CLL.pdb (Chattopadhyaya, Meador et al. 1992) para la conformación extendida y, 1A29.pdb para el complejo de la CaM con el inhibidor trifluoroperazina (CPZ) (Vertessy, Harmat et al. 1998).

Generación de modelos estructurales de las proteínas modificadas químicamente con Mbbm. Los modelos de LAO-Cys, LAO-Cys-Bimano, CaM-Cys y CaM-Cys-Bimano se realizaron utilizando el programa HyperChem® versión 7.5. El primer paso para la construcción de los modelos es la mutación *in silico* de los residuos seleccionados por L-cisteína, seguida de una optimización geométrica de la mutación, posteriormente se hace una minimización al vacío, utilizando el campo de fuerza AMBER. Así mismo la modificación química *in silico* con el *Mbbm* se realizó a partir de los modelos LAO-Cys y CaM-Cys, donde una vez colocado el fluoróforo se

optimizó geométricamente hasta alcanzar un gradiente mínimo de RMS de 0.01 kcal/[Å mol]. Los archivos de las estructuras cristalográficas y los modelos estructurales generados fueron visualizados con el programa PyMOL (DeLano 2004).

Acoplamiento molecular (Docking). El programa Autodock 4 (Morris, Goodsell et al. 1998) se utilizó para realizar el acoplamiento molecular de los compuestos trifluoroperazina (TFP) y clorpromazina (CPZ), que son inhibidores de la proteína CaM. El procedimiento general del acoplamiento molecular consistió en la generación de mapas electrostáticos para cada tipo de átomo que participa en el acoplamiento molecular, en una caja de 60x60x60 Å, con un espacio de enrejamiento de 0.375 Å, localizada en el centro de la macromolécula, la cual fue construida con AutoGrid 4 (parte del paquete de programas de AutoDock 4). El proceso de acoplamiento molecular se realizó con la modalidad de un algoritmo genético Lamarckian (LGA) utilizando los parámetros recomendados inicialmente; tamaño de población (n=150), número de evaluaciones (2,500,000), número de generaciones (27,000) a excepción del número de corridas que fue de 100. Los programas utilizados para el acoplamiento molecular y su análisis fueron los siguientes: AutoDock 4.00 revisión 1.69 (1991-2007), AutoDockTools versión 1.5.0 revisión 7 (1999-2007 Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) sobre el sistema operativo UNIX distribución Linux 2.6.23.15-80.fc7 x86_64 GNU/LINUX.

Resultados y Discusión

Sistema proteína LAO

Un número importante de PPBs han sido utilizadas como elementos potenciales de reconocimiento molecular en el desarrollo de biosensores para diferentes compuestos, por ejemplo: glucosa (Carmon, Baltus et al. 2004), maltosa (Medintz and Deschamps 2006), fosfato (Salins, Deo et al. 2004), glutamina (Tolosa, Ge et al. 2003) y níquel (Salins, Goldsmith et al. 2002), entre los más conocidos. Las características generales de las PPBs las hacen candidatas para ser utilizadas como componentes de los biosensores ya que son específicas para una variedad de ligandos, presentan un alto grado de afinidad por éstos (K_d en rangos de μM y nM), mantienen un motivo estructural similar y presentan cambios conformacionales apreciables al unirse a sus ligandos (pasando de un estado abierto a uno cerrado, Figura 4). En este contexto, la proteína LAO fue elegida como modelo para ser modificada químicamente con el fluoróforo *Mbbm*. Las posiciones elegidas para colocar grupos reporteros fueron diseñadas basándose en: I) un análisis estructural entre sus dos estados abierto (libre de ligandos) y cerrado (unida a sus ligandos), II) un análisis de homología de secuencia entre diferentes PPBs, III) posiciones donde el ASAS fuera $\geq 40 \text{ \AA}$ en su forma libre de ligandos y IV) información bibliográfica de otras PPBs que han sido modificadas químicamente.

Las mutantes de cisteínas fueron construídas en las posiciones seleccionadas para utilizar el marcaje sitio específico con fluoróforos (Sosa-Peinado and Gonzalez-Andrade 2005) que reporten la unión de ligandos, mediante el cambio del ambiente local del fluoróforo.

Clonación y subclonación del gen argT. A partir del ADN genómico de *S. typhimurium* se clonó el gen *argT*, diseñando oligonucleótidos con sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, por medio de una PCR (Figura 6). La ventaja de utilizar el sitio de corte *NdeI* es que este sitio incluye el codón de inicio (ATG) con el que se puede evitar inserciones o dilecciones no deseadas. Para la amplificación se utilizó a la enzima *Taq* polimerasa que añade extremos del nucleótido adenosina al final de la amplificación facilitando con ello la clonación del producto obtenido en la PCR en el vector pGEM-T con el sistema Easy Vector System I.

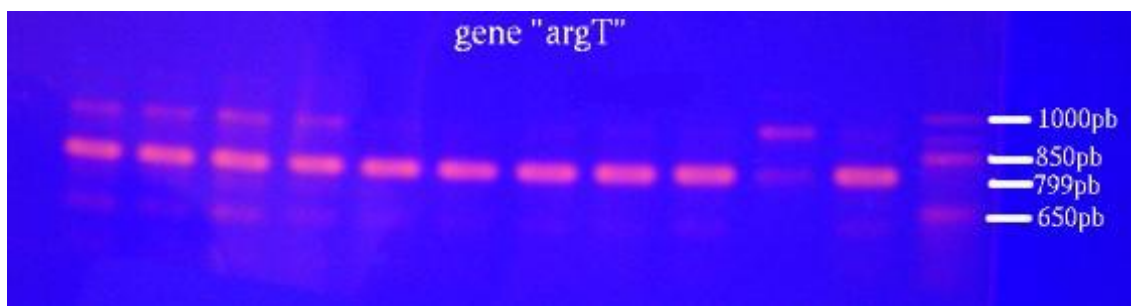


Figura 6. Amplificación del gen *argT*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio: la banda que muestra mayor intensidad es la que corresponde al gen *argT*, la cual contiene alrededor de 780 pb

La subclonación del gen *argT* se realizó en el vector de expresión pET12b, a partir del vector pGEM-T Easy conteniendo el gen *argT*. Éste proceso fue confirmado con la digestión del vector de expresión con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* e identificando al vector pET12b y al gen *argT* en un gel de agarosa (Figura 7). Adicionalmente, el procedimiento de la subclonación fue confirmado de manera inequívoca mediante la secuenciación de éste en un secuenciador Genetic Analyzer ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer Applied Biosystems) en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.

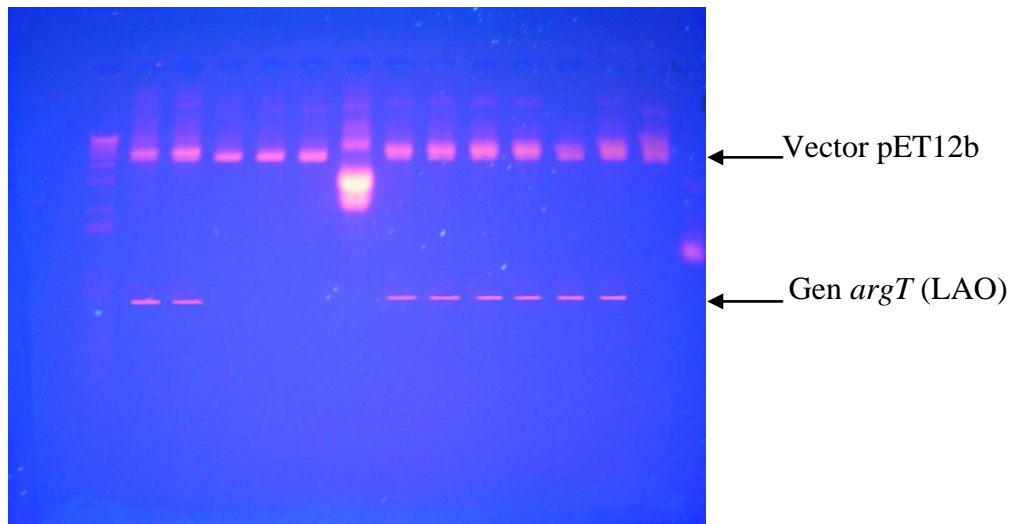


Figura 7. Digestión de la ligación del gen *argT* con el vector pET12b.

Purificación. La purificación de la proteína LAO se realizó en tres etapas: la primera comprendió un choque osmótico, seguida de una cromatografía de intercambio catiónico y finalmente una cromatografía de intercambio aniónico (ver sección de Materiales y Métodos). El método desarrollado para la producción de la proteína LAO fue optimizado en cada una de sus etapas, obteniendo aproximadamente 20 mg de proteína por litro de cultivo. Como la proteína LAO es una proteína periplásmica, cuenta con un péptido señal mediante el cual se exporta al espacio periplásmico de la bacteria. Esto permitió realizar un choque osmótico, donde se purifica de forma casi exclusiva, como se puede observar en el SDS-PAGE (Figura 10). Sin embargo esta proteína se encuentra junto con otras proteínas periplásmicas y, para separarla de éstas, se realiza una purificación a través de una columna de intercambio catiónico (Figura 8), en donde las fracciones correspondientes a la proteína LAO eluyeron a una concentración de 70 mM en un gradiente lineal de 0-200 mM de NaCl en 20 minutos. Posteriormente, para separar la forma abierta (proteína LAO sin ligando) de la forma cerrada (proteína LAO con ligando) se realizó una segunda cromatografía utilizando una columna de intercambio aniónico (columna Source Q) a un pH de 8.5, en un gradiente lineal de 0-100 mM de NaCl en 40 minutos (Figura 9). Las fracciones

correspondientes a la proteína con ligando y sin ligando eluyeron en 37.5 y 47.5 mM de NaCl, respectivamente.

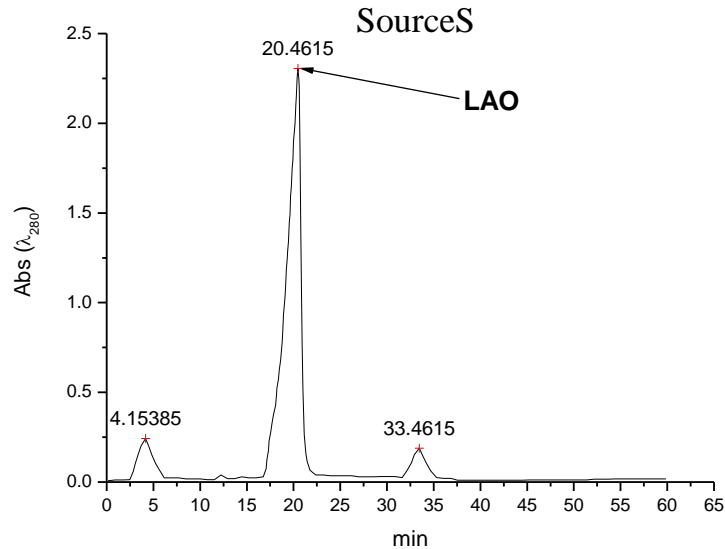


Figura 8. Cromatograma de las fracciones correspondientes a la purificación de la proteína LAO en una columna Source S. Condiciones experimentales: fase móvil de acetato de potasio 10 mM pH 5.1; gradiente lineal de NaCl en la misma fase móvil de 0 mM a 200 mM en 20 minutos; velocidad de flujo de 1 ml/min; detección a 280 nm. Las fracciones que corresponden a la proteína LAO eluyeron en 70 mM de NaCl.

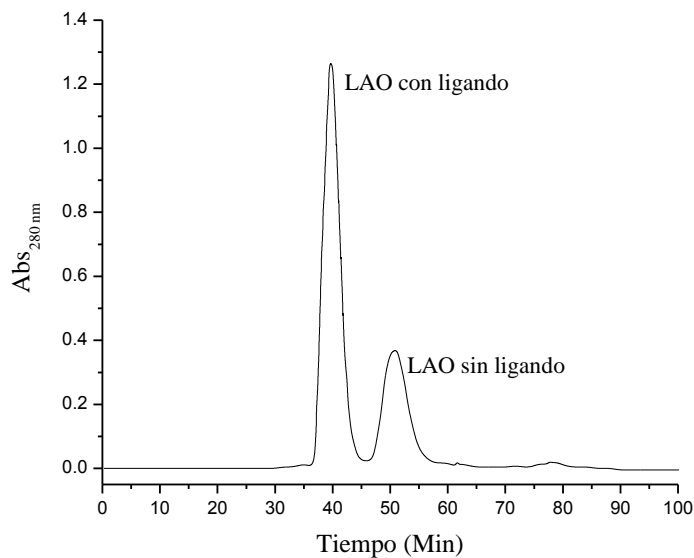


Figura 9. Cromatograma a las fracciones correspondientes de la purificación de la proteína LAO en una columna Source Q. Condiciones experimentales: fase móvil de Bis-Tris-propanol 5 mM pH 8.5; gradiente lineal de NaCl en la misma fase móvil de 0 mM a 100 mM en 40 minutos; velocidad de flujo de 1 ml/min; detección a 280 nm. Las fracciones que corresponden a la proteína LAO eluyeron en 37.5 mM y 47.5 mM de NaCl para la proteína con ligando y sin ligando, respectivamente.

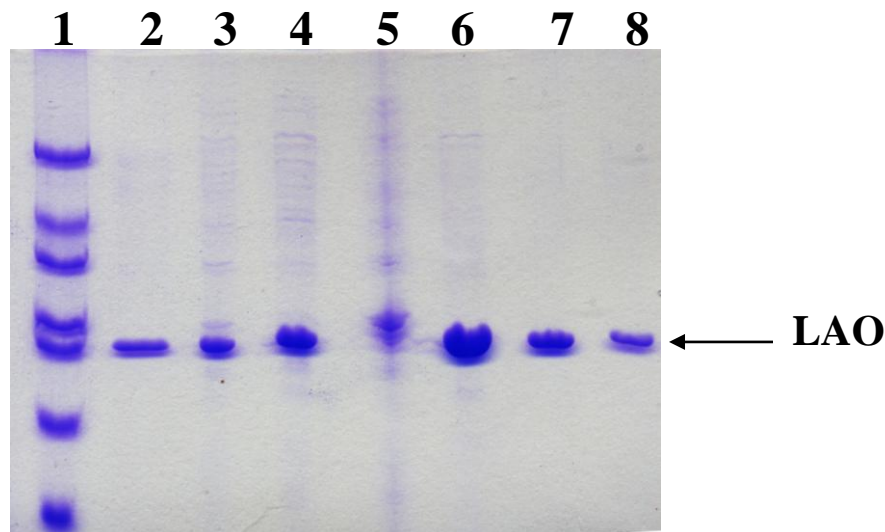


Figura 10. Resolución electroforética de las fracciones a partir de los procesos de purificación de la proteína LAO. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: medio de cultivo; línea 3: primer sobrenadante (sacarosa); línea 4: segundo sobrenadante ($MgSO_4$); línea 5: células después del choque osmótico; línea 6: fracciones de Superdex75; línea 7: fracciones de Source S y línea 8: fracciones de Source Q.

Espectro de absorción de la proteína LAO silvestre. Se realizaron espectros de absorción de la proteína LAO en la forma abierta (sin ligando) y en la forma cerrada (con ligando). Ambos espectros muestran una λ máxima de absorción a 278 nm; sin embargo, se observan diferencias espectroscópicas significativas en la intensidad de la señal entre la proteína LAO libre de ligando y la proteína saturada con el ligando (Figura 11). Estos cambios espectroscópicos pueden ser atribuidos principalmente al cambio en el ambiente local de los residuos aromáticos de la proteína (triptofanos, tirosinas y fenilalaninas). La proteína LAO posee dos triptofanos (W47 y W130), diez tirosinas (Y14, Y88, Y125, Y140, Y146, Y178, Y190, Y223, Y230 y Y236) y 11 fenilalaninas (F17, F26, F29, F52, F83, F169, F180, F191, F210, F231, F233), por lo que resulta complejo tratar de interpretar sus espectros de absorción en función de los residuos implicados. Sin embargo, este cambio espectroscópico proporciona una evidencia de los rearrreglos estructurales que lleva a cabo la proteína al pasar de la forma abierta a la forma cerrada.

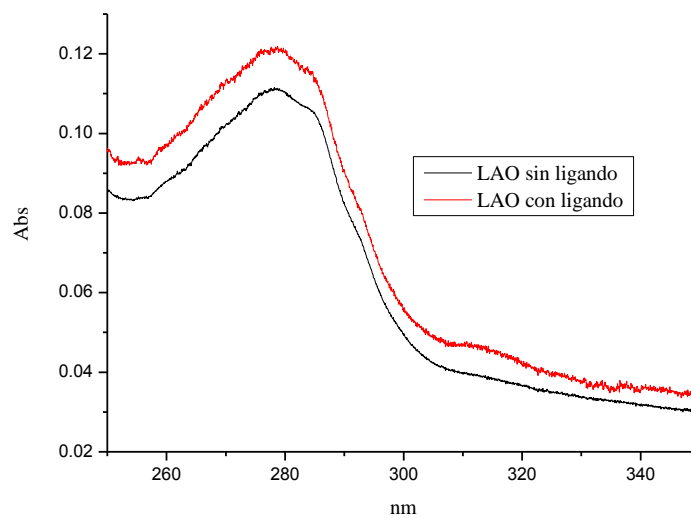


Figura 11. Espectros de absorción de la proteína LAO. Proteína LAO sin ligando (—) y proteína LAO con ligando (—). Los espectros fueron obtenidos en un espectrofotómetro Cary 400 Varian®, en intervalos de 0.05 nm, realizando la corrección con la línea base. A una concentración de 10 μ M de la proteína LAO y saturándola con el aminoácido L-arginina.

Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO silvestre. Los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO con y sin ligando muestran que la proteína sin ligando incrementa un 39 % la intensidad de fluorescencia al adicionarle L-arginina a una concentración saturante (Figura 12A); y prácticamente no se observa ningún cambio en la intensidad de fluorescencia de la proteína proveniente de la purificación con ligando al adicionar la L-arginina (Figura 12B). Basándose en estos resultados se puede concluir que la separación de la proteína LAO en sus dos conformaciones, a través de una cromatografía de intercambio aniónico, es eficiente (Figura 9). Con el cambio en la intensidad de fluorescencia de la proteína LAO al unir sus ligandos, podemos realizar titulaciones con los diferentes ligandos de la proteína para obtener sus propiedades de unión (K_d).

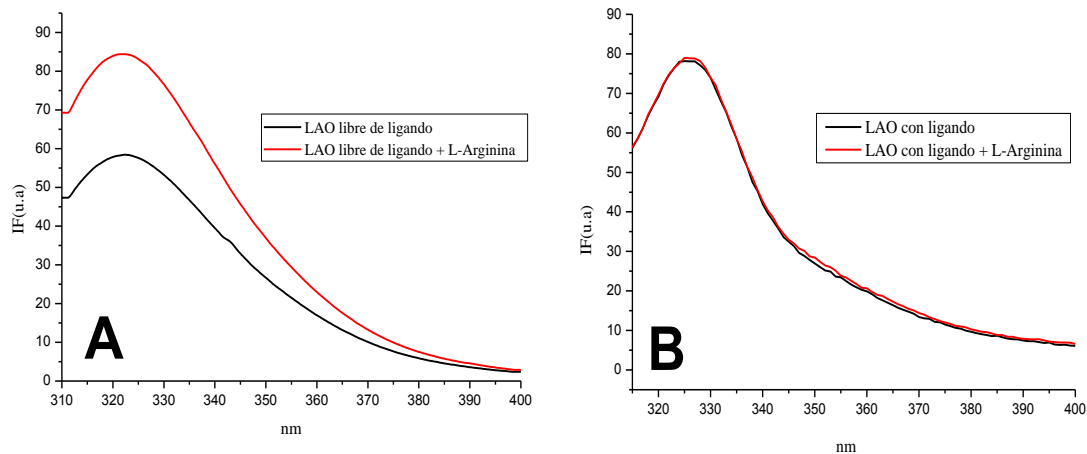


Figura 12. Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO. A) Proteína LAO sin ligando (—), proteína LAO sin ligando adicionando L-arginina en condiciones saturación (—). B) Proteína LAO con ligando (—), proteína LAO con ligando adicionando L-arginina en condiciones saturación (—). La concentración de la proteína utilizada fue de 1 μM en ambos casos, $\lambda_{\text{ex}}=295$ nm y $\lambda_{\text{em}}=310-400$ nm, con pasos de luz de 0.5 mm y 2.0 mm de excitación y emisión, respectivamente; a temperatura de 30 °C.

Determinación de la K_d de la proteína LAO silvestre. El aumento en la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de 324 nm fue utilizada para seguir la unión de los ligandos de la proteína LAO en experimentos de titulación al equilibrio. Se presentó un incremento de la intensidad de fluorescencia de la proteína LAO al adicionarle sus ligandos. Ésto es atribuido principalmente al cambio de ambiente local de los triptofanos (W47 y W130) al pasar de la forma abierta a la forma cerrada.

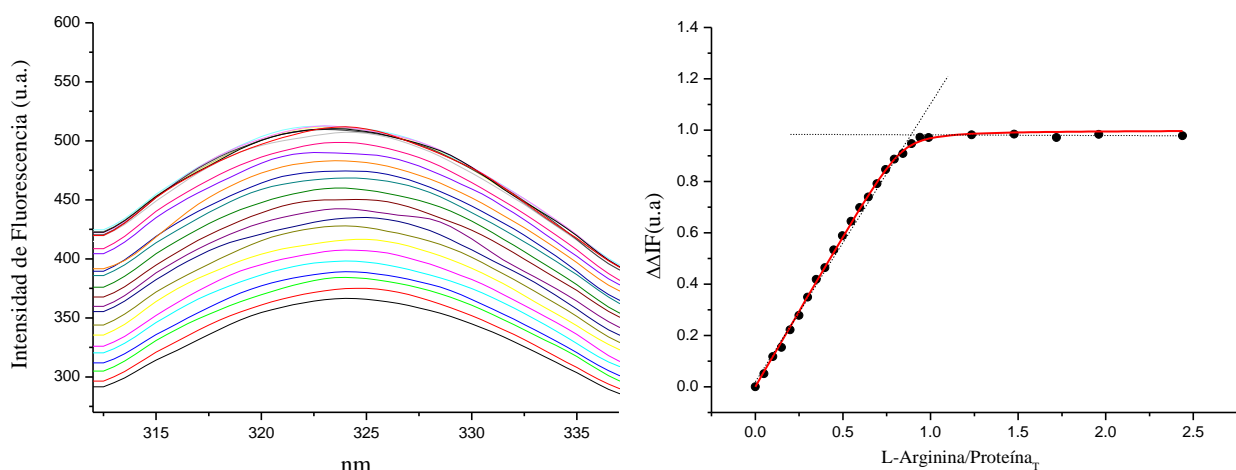


Figura 13. Unión de L-arginina a la proteína LAO silvestre. A la izquierda se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO a diferentes concentraciones de L-arginina (0.2-2.5 mM), $\lambda_{\text{ex}}=295$ nm y $\lambda_{\text{em}}=310-340$ nm, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 30 °C. Espectros similares fueron obtenidos para la L-lisina y la L-histidina. A la derecha se observa la titulación en fluorescencia con L-arginina. La línea sólida (—) corresponde al ajuste obtenido con una $K_D = 6.0 \times 10^{-9}$ M. El punto de intersección de las líneas punteadas concierne a la estequiometría de la reacción en el eje de las ordenadas (0.94).

Tabla 11
Especificidad de unión de la proteína LAO silvestre.

Método	L-arginina K_d (nM)	L-lisina K_d (nM)	L-histidina K_d (nM)
Fluorescente	6	8	687
Radiactivo ¹	14	15	500

¹(Nikaido and Ames 1992).

En la Figura 13 y en la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos de las titulaciones de la proteína LAO silvestre con sus respectivos ligandos para obtener sus K_d . La estequiometría del complejo ligando:proteína es de 0.97, 1.1 y 2.4 para la L-arginina, L-lisina y la L-histidina, respectivamente. Las K_{ds} que se obtuvieron a través de la fluorescencia intrínseca se compararon con las obtenidas mediante el uso de técnicas radiactivas previamente reportadas por Nikaido y Ames (Nikaido and Ames 1992), evidenciando una concordancia (Tabla 11), puesto que el orden de magnitud de ambas se encuentra en el rango nanomolar.

Efectos del pH en la afinidad de la proteína LAO silvestre por sus ligandos. Para evaluar el efecto del pH sobre la afinidad de la proteína LAO por sus ligandos se realizaron titulaciones seguidas por fluorescencia con los aminoácidos L-arginina y L-lisina a diferentes valores de pH -5.1, 7.5 y 8.5- (Figura 14). El pH no afecta la afinidad de la unión de la proteína LAO como lo reflejan las K_d para los ligandos L-arginina y L-lisina (Tabla 12), lo que hace que este sistema sea robusto en un intervalo de pH amplio.

Tabla 12
Especificidad de unión de la proteína LAO WT a diferente pH.

pH	L-arginina K_d (nM)	L-lisina K_d (nM)
5.1	8	46
7.5	6	8
8.5	6	18

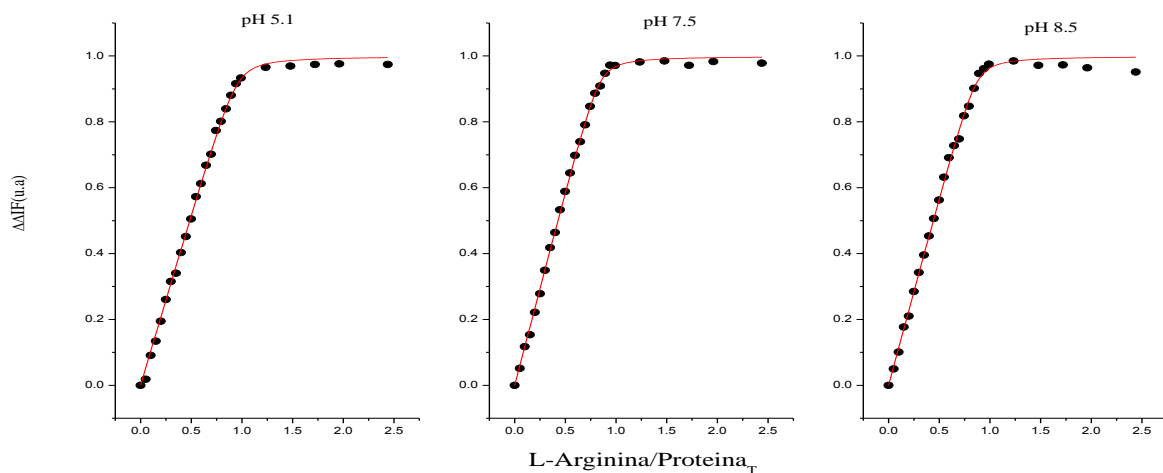


Figura 14. Titulaciones en fluorescencia de la proteína LAO silvestre con L-arginina a diferentes valores de pH. Los amortiguadores utilizados fueron: acetato de potasio 10 mM, Tris-HCl 50 mM y Bis-Tris-Propanol 5 mM para los pH 5.1, 7.5 y 8.5, respectivamente.

Análisis de sitios a modificar químicamente con el fluoróforo Mbbm. Para realizar la selección de las posiciones para realizar el marcaje sitio específico con el fluoróforo *Mbbm* se consideraron los siguientes criterios: 1) un análisis visual de la estructura de la proteína para elegir sitios endostéricos (e), peristéricos (p) y alostéricos (a) según la clasificación de Hellinga (Tian, Cuneo et al. 2007); 2) elección de los residuos que se encuentren en la estructura secundaria tipo α -hélices; 3) la diferencia existente en el área superficial accesible al solvente (ASAS) entre la conformación abierta y cerrada de los residuos; 4) una ASAS preferentemente \geq a 40 \AA^2 en la conformación abierta de los residuos a modificar y 5) información correspondiente al marcaje sitio-específico con diferentes sistemas semejantes a la proteína.

En el análisis estructural de la proteína LAO podemos identificar las regiones importantes de la proteína. Estas regiones comprenden el sitio de unión de ligandos y las zonas que interaccionan con las proteínas de membrana. De este análisis estructural se encontró que los residuos involucrados en la unión de los ligandos son: Tyr-14, Phe-52, Asp-30, Ser-69, Ser-70, Ser-72, Arg-77, Leu-117, Thr-121 y Asp-161 (Oh, Ames et al. 1994) y que los residuos de interacción con las proteínas de la membrana son: Thr13, Asp53, Lys75, Lys76, Gln78, Gln79, Asp144, Ser148, Thr151, Arg154, Lys171,

Gln172, Lys201 y Asp202, (Figura 15) (Kang, Shin et al. 1991). Con esta información podemos clasificar los sitios a seleccionar según su localización en endostéricos (distancias no mayores a 5 Å del sitio de unión), peristéricos (distancias entre 5 y 8 Å del sitio de unión) y alostéricos (distancias mayores a 8 Å del sitio de unión) (de Lorimier, Smith et al. 2002). Para efectuar el marcaje sitio-específico es necesario contar con cisteínas reactivas. En el caso de la proteína LAO, ésta posee dos residuos de cisteína en las posiciones 38 y 45, los cuales forman un puente disulfuro entre ellos (Figura 15), por lo que no son reactivas y no interfieren con el marcaje sitio-específico.

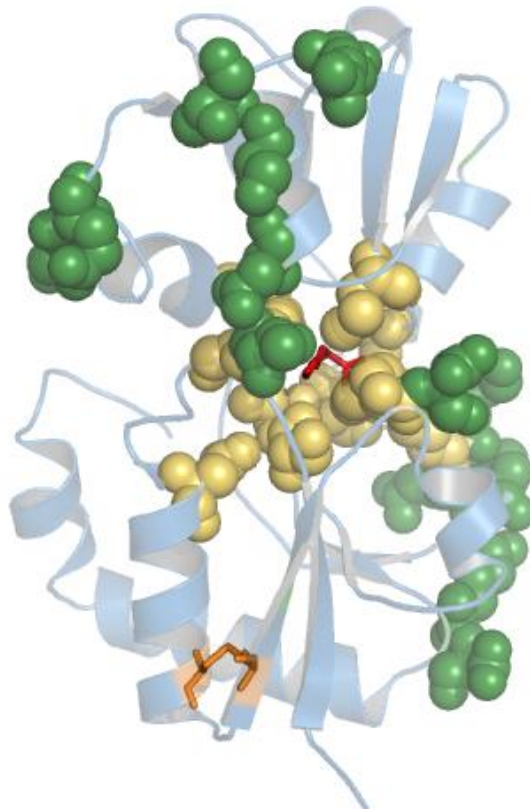


Figura 15. Sitios de unión de ligandos y de interacción con las proteínas de membrana. En esferas amarillas se muestran los residuos involucrados de forma directa con los ligandos de la proteína LAO, en esferas verdes se muestran los residuos que interactúan con las proteínas de membrana, en bastones naranja las dos cisteínas formando un puente disulfuro y en bastones rojos se muestra el ligando (L-lisina).

Para la elección de los sitios a modificar químicamente con fluoróforos, una de las herramientas utilizadas fue el cálculo de las ASAS, que permite evaluar los cambios

conformacionales que presentan los residuos de la proteína al unirse sus ligandos. Adicionalmente, nos permite identificar los residuos que presentan mayores cambios de accesibilidad al solvente entre las dos conformaciones. Un hecho bien documentado es que las propiedades fluorescentes de los grupos reporteros unidos a las proteínas cambian significativamente cuando las proteínas llevan a cabo cambios conformacionales inducidos por sus ligandos (Dwyer and Hellinga 2004; Sosa-Peinado and Gonzalez-Andrade 2005). En la Tabla 13, se muestran los datos obtenidos del cálculo de las ASAS de los residuos seleccionados en la proteína LAO.

Tabla 13

Áreas superficiales accesibles al solvente (ASAS) de diferentes posiciones de la proteína LAO.

Posición	LAO (Å ²)	LAO- Arginina (Å ²)	LAO-Lisina (Å ²)	LAO- Ornitina (Å ²)	LAO- Histidina (Å ²)	ΔASAS (Å ²) ¹
D51	109.64	70.59	72.95	72.50	72.57	39.05
F52	71.66	6.79	7.37	8.18	8.03	64.06
D53	127.39	63.29	66.68	59.88	63.54	64.04
D75	82.68	107.81	108.59	105.71	105.15	24.13
A89	14.63	34.28	33.68	36.92	36.78	19.65
R131	117.35	150.65	149.27	144.09	147.78	30.57
E167	50.68	27.71	27.14	31.41	31.42	22.97
K186	98.37	146.57	147.54	144.91	144.97	47.62
K189	154.02	80.32	80.97	77.61	81.08	74.02
K228	153.25	73.25	74.25	76.77	74.05	78.67
Y230	42.53	54.21	52.69	52.65	51.93	11.68

El cálculo de las ASAS se realizó con el programa NACCES_2.1.1, utilizando los archivos de pdb 2LAO para la proteína LAO sin ligando y 1LAF, 1LST, 1LAH, 1LAG para la proteína LAO con L-arginina, L-lisina, L-ornitina y L-histidina, respectivamente.

¹Estos son valores absolutos calculados mediante la diferencia entre los valores promedios de ASAS de la proteína con ligando y los de la proteína sin ligando.

Todos los residuos seleccionados tienen un valor de ASAS \geq a 40 Å² en la conformación abierta, excepto la posición 89. Se ha reportado que las modificaciones químicas con *Mbbm*, en sitios con un valor de ASAS menor a 40 Å², desestabilizan a las proteínas a una razón de 3 a 5.5 kcal/mol en contraste con el valor de 1.5 kcal/mol cuando se introducen en residuos con una ASAS mayor a 40 Å² (Mansoor, McHaourab et al. 1999). La diferencia del ASAS en todas las posiciones elegidas es significativa para

cambiar el ambiente local de estos sitios. Finalmente, la información proporcionada a partir de los sistemas semejantes a la proteína LAO, en este caso proveniente de la familia de las PPBs, fue un aporte más a los criterios de elección de los sitios (de Lorimier, Smith et al. 2002).

Así, las posiciones seleccionadas para colocar el fluoróforo de manera específica en la proteína LAO fueron los residuos 51, 52, 53, 75, 89, 131, 167, 186, 189, 228 y 230 (Figura 16). De estos sitios seleccionados, tres corresponden a sitios endostéricos, cinco a sitios peristéricos y tres a sitios alostéricos.

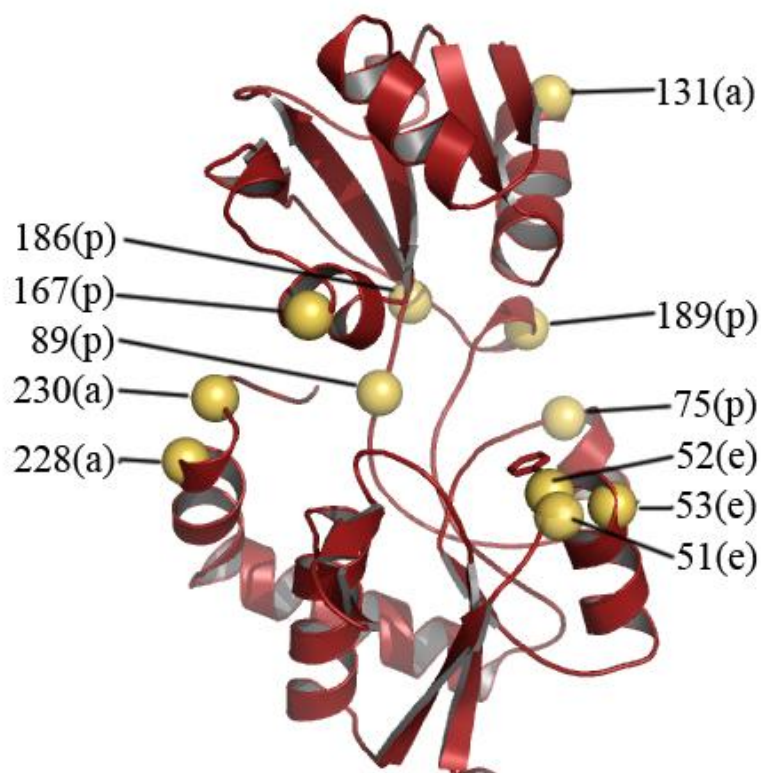


Figura 16. Posiciones seleccionadas para realizar el marcaje sitio específico. En esferas amarillas se muestran los diferentes sitios seleccionados: (a) alostérico, (e) endostérico y (p) peristérico.

Expresión, purificación y modificación química de las mutantes con una única cisteína. En la Tabla 14 se resumen los resultados obtenidos de la expresión y la purificación de las mutantes que contienen una única cisteína. La expresión de todas las

mutantes diseñadas con una única cisteína fue satisfactoria, excepto para la mutante LAO F52C. La posición 52 cumple con el criterio del ASAS, pero es parte del sitio de unión de la proteína y la cadena lateral de residuo se encuentra orientada hacia el interior de la proteína.

Tabla 14

Resumen de los resultados obtenidos sobre la expresión, purificación y modificación química de las mutantes diseñadas.

Mutante	Expresión	Purificación	Modificación química
LAO D51C	✓	✓	✓
LAO F52C	✗	-	-
LAO D53C	✓	✓	✓
LAO D75C	✓	✗	-
LAO A89C	✓	✓	✓
LAO R131C	✓	✓	✓
LAO E167C	✓	✓	✓
LAO K186C	✓	✓	✗
LAO K189C	✓	✗	-
LAO K228C	✓	✓	✓
LAO Y230C	✓	✓	✓

✓ = procedimiento realizado, ✗ = procedimiento no satisfactorio

La purificación de estas mutantes fue similar a la utilizada para la proteína silvestre, manteniéndose en este caso las condiciones reductoras durante toda la purificación, con el objetivo de evitar la formación de puentes disulfuro entre las proteínas. Sin embargo, las mutantes LAO D75C y LAO K189C no pudieron ser purificadas.

Espectros de absorción de la proteína LAO modificada químicamente con Mbbm. Los espectros de absorción de la proteína LAO antes y después de la modificación química con el fluoróforo *Mbbm* se muestran en la Figura 17, en donde se observa una absorción máxima a 278 nm en el espectro de absorción correspondiente a la proteína sin modificar, y dos absorciones máximas a 278 y a 389 nm en la proteína modificada químicamente con el *Mbbm*. La absorción a 278 nm corresponde a los fluoróforos intrínsecos de la proteína y la absorción a 389 nm corresponde al bimanio.

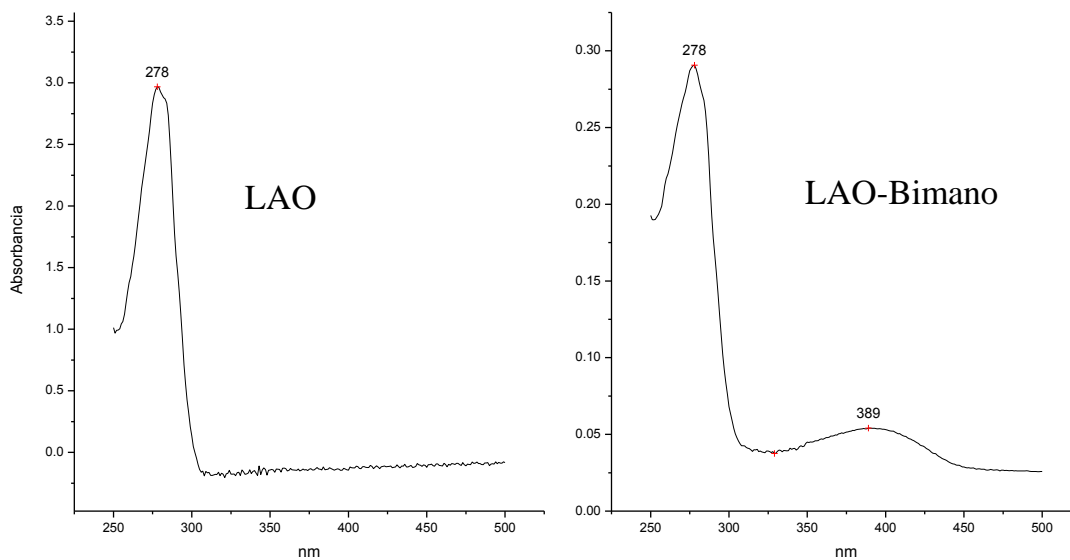


Figura 17. Espectros de absorción de la proteína LAO sin modificar y modificada químicamente con *Mbbm*. La absorción a 278 nm corresponde a los fluoróforos intrínsecos de la proteína y la absorción a 389 nm corresponde al *Mbbm*. La concentración utilizada fue de 5 μ M para ambas proteínas.

Estabilidad termodinámica de la proteína LAO y las mutantes modificadas químicamente con Mbbm. La estabilidad termodinámica fue evaluada mediante la fluorescencia intrínseca de la proteína LAO y, de cada una de las mutantes en función de la temperatura. En la Figura 18, se observa el proceso de desnaturalización y renaturalización en función de la temperatura. La Tabla 15 muestra los parámetros termodinámicos $\Delta\Delta G$ y T_m obtenidos de las mutantes modificadas químicamente con *Mbbm*. La proteína LAO es un sistema reversible térmicamente como se observa en la Figura 18 y este proceso es seguido a través de la fluorescencia intrínseca de la proteína, por lo que puede ser utilizado tanto para la proteína silvestre como para las mutantes modificadas químicamente con el fluoróforo y con ello poder obtener el $\Delta\Delta G$. Las 7 mutantes modificadas químicamente muestran cambios mínimos de $\Delta\Delta G$ y la T_m es muy similar a la de la proteína silvestre. Estos parámetros indican que la estabilidad de las mutantes, no varía considerablemente después de la modificación química. Por lo que se puede considerar que el marcaje sitio-específico con el *Mbbm*, no perturba el sistema original de forma importante.

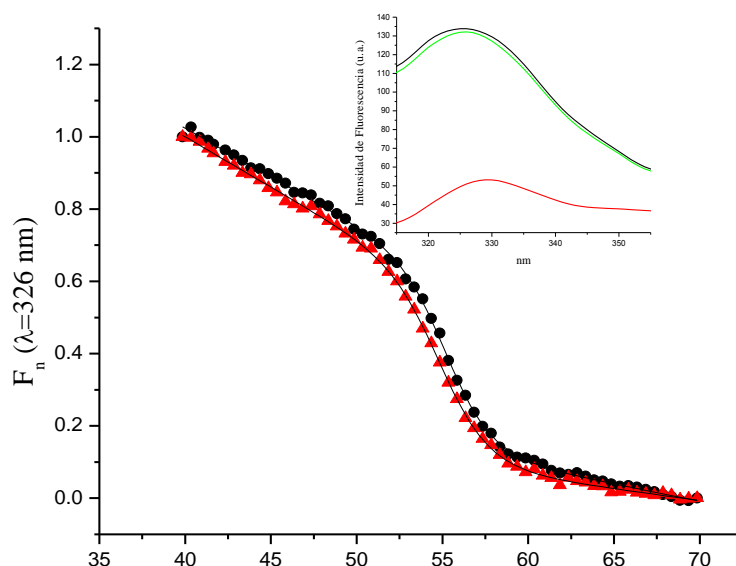


Figura 18. Desnaturalización térmica de la proteína LAO silvestre. La gráfica muestra el proceso de desplegamiento al incrementar la temperatura (●) y el proceso de repliegamiento al disminuir la temperatura (▲), siguiendo la intensidad de fluorescencia intrínseca a 326 nm. Las líneas continuas muestran el ajuste realizado para obtener los parámetros termodinámicos (ver sección de *Materiales y Métodos*). En el regráfico se observan los espectros de fluorescencia de la proteína en estado nativo (—), desplegado (—) y replgado (—).

Tabla 15

Parámetros termodinámicos de la proteína LAO modificada químicamente con *Mbbm*.

Mutante	T_m (°C)	$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)
LAO D51C-Bimano	54.4	0.05
LAO D53C-Bimano	57.2	0.22
LAO A89C-Bimano	53.6	0.02
LAO R131C-Bimano	54.7	0.12
LAO E167C-Bimano	55.6	0.04
LAO K228C-Bimano	52.3	0.11
LAO Y230C-Bimano	49.7	0.41

T_m de la proteína LAO silvestre = 60.2 °C, $\Delta\Delta G = \Delta T_m \times \Delta S_{WT}$ ($\Delta S_{WT} = -0.518 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

Propiedades espectroscópicas de las mutantes modificadas químicamente con el Mbbm. En la Figura 19 se ilustran las posiciones donde se realizaron las diferentes modificaciones químicas con el *Mbbm*. Estas posiciones cumplen con los criterios de selección antes mencionados. En la Tabla 17 se muestran las propiedades espectroscópicas y las K_d de las mutantes modificadas químicamente. Los espectros de fluorescencia de la proteína no muestran desplazamiento considerable en la λ_{max} en condiciones saturantes con sus ligandos. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia muestra un cambio significativo asociado con el cambio en la conformación por la

unión del ligando a la proteína. Estudios previos han podido establecer que el bimano es un fluoróforo sensible a la polaridad del solvente (Kosower, Newton et al. 1980; Mansoor, McHaourab et al. 1999; Sosa-Peinado and Gonzalez-Andrade 2005), por lo que cambios en el microambiente local del bimano unido a la proteína LAO al pasar de la conformación abierta a la conformación cerrada se relacionan con cambios en la intensidad de fluorescencia.

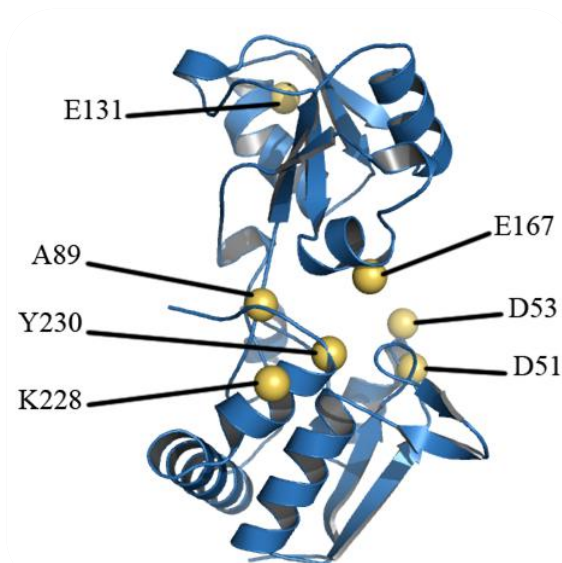


Figura 19. Posiciones seleccionadas para modificar químicamente la proteína LAO con *Mbbm*. Las esferas amarillas representan los sitios seleccionados.

Para generar los modelos estructurales *in silico* de las siete mutantes de la proteína LAO modificadas químicamente con el fluoróforo, en la conformación abierta y en la cerrada, se utilizó el programa HyperChem® (Un ejemplo de estos modelos es LAO E167-Bimano; Figura 20). Se calcularon las ASAS del bimano (Tabla 16), con el objetivo de relacionar las ASAS del bimano en la proteína con los cambios mostrados en los espectros de fluorescencia al unir sus ligandos.

Utilizando las ASAS calculadas del bimano a partir de los modelos generados para las mutantes (Tabla 16) y los cambios en la intensidad de fluorescencia (Tabla 17), se puede establecer una relación.

Tabla 16

Áreas superficiales accesibles al solvente (ASAS) de las mutantes LAO-Cys-Bimano.

Mutante	2LAO (Å ²)	1LAF (Å ²)	ΔASAS (Å ²)*
LAO D51C-Bimano	264	224	-40
LAO D53C- Bimano	291	188	-103
LAO A89C- Bimano	116	133	+17
LAO R131C- Bimano	203	209	+6
LAO E167C- Bimano	180	166	-14
LAO K228C- Bimano	265	272	+7
LAO Y230C- Bimano	197	165	-32

El cálculo de las ASAS se realizó con el programa NACCES_2.1.1, utilizando los pdb's generados con el programas HyperChem, a partir de los pdb's 2LAO para la proteína LAO sin ligando y 1LAF para LAO con L-arginina (ver materiales y métodos).

*La ΔASAS fue obtenida restando el ASAS de cada posición del modelo 1LAF-Cys-Bimano a él ASAS del modelo 2LAO-Cys-Bimano.

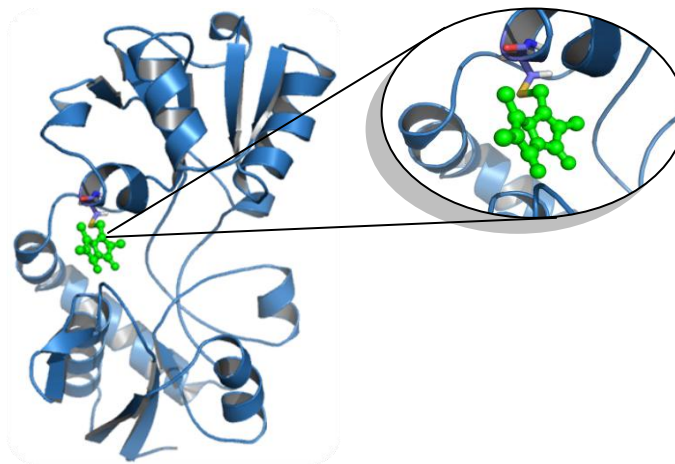


Figura 20. Modelo estructural de LAO E167C-Bimano. Se realizó la mutación *in silico* LAO E167C y la modificada química *in silico* con el bimano, utilizando el programa HyperChem®. Este modelo fue llamado LAO E167C-Bimano, la cual indica la mutación por cisteína y la modificación química con el *Mbbm*.

Tabla 17

Propiedades espectroscópicas y constantes de afinidad de la proteína LAO.

Mutante	Sitio ^a	λ_{\max} , Apo	λ_{\max} , Sat	% de cambio ^b	Eficiencia cuántica (ϕ)	K_d (nM)		
						L-arginina	L-lisina	L-histidina
Silvestre		324	324	+ 39 %	0.033	6 ± 0.10	8 ± 0.21	687 ± 3.68
LAO D51C-Bimano	E	473	472	+ 12 %	0.239	7 ± 0.30	54 ± 1.36	257 ± 9.30
LAO D53C- Bimano	E	473	472	+ 13 %	0.101	7 ± 0.24	10 ± 0.97	95 ± 3.45
LAO A89C- Bimano	P	471	475	- 17 %	0.043	16 ± 0.38	66 ± 0.55	897 ± 12.71
LAO R131C- Bimano ^c	A	325	324	+ 26 %	0.024	2 ± 0.89	25 ± 1.11	715 ± 9.53
LAO E167C- Bimano	P	468	473	+ 30 %	0.773	66 ± 3.68	143 ± 3.36	5663 ± 99.71
LAO K228C- Bimano	A	473	475	+ 21 %	0.057	4 ± 0.31	8 ± 0.62	320 ± 3.52
LAO Y230C- Bimano	A	474	471	+ 34 %	0.012	20 ± 0.41	98 ± 2.15	4049 ± 34.41

^aTipo de sitio (a) alostérico, (e) endostérico, (p) peristérico.

^bIncremento (+) o disminución (-) en la intensidad de fluorescencia al saturar la proteína LAO con sus diferentes ligandos, con respecto a la proteína sin ligando.

^cLos valores fueron obtenidos utilizando la fluorescencia intrínseca de esta mutante.

LAO D51C-Bimano. Esta mutante se encuentra clasificada según su posición como endósterica, ya que la modificación está contigua al sitio de unión en la proteína LAO. La eficiencia cuántica es aproximadamente siete veces mayor respecto a la proteína silvestre. Los modelos estructurales generados muestran un ocultamiento del bimano al pasar de la forma abierta a la forma cerrada (una disminución de 40 \AA^2 en su ASAS). La intensidad de fluorescencia se incrementa en un 12 % al saturar con sus ligandos (Figura 21). Este aumento en la intensidad de fluorescencia es atribuido al cambio en el ambiente local del fluoróforo al disminuir su ASAS.

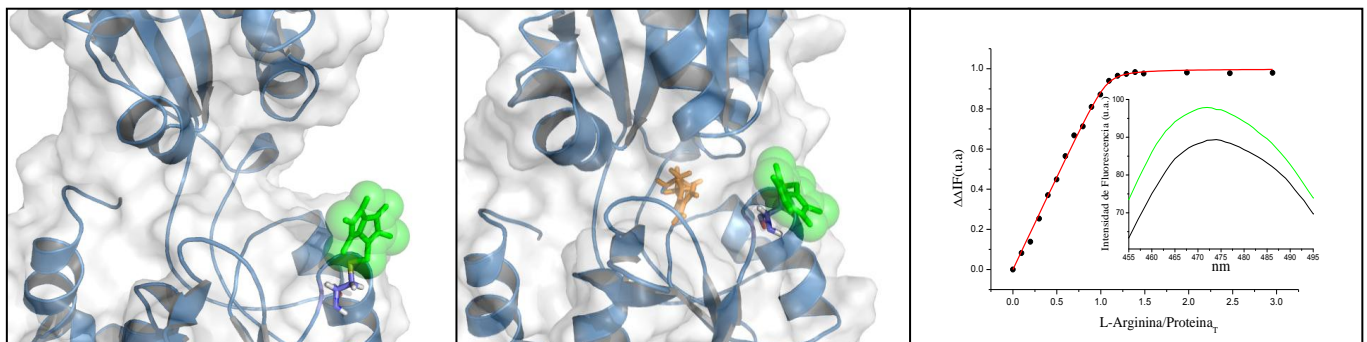


Figura 21. LAO D51C-Bimano. A la izquierda se muestra el modelo estructural de LAO D51C-Bimano en la conformación abierta, en el centro la conformación cerrada (en esferas y bastones verdes se representa el bimano). A la derecha se muestra la titulación en fluorescencia con L-arginina (●); en el regrafico se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia (—) y presencia (—) de L-arginina a saturación.

La afinidad de LAO D51C-Bimano se mantuvo en rangos aceptables para los tres ligandos (Tabla 15). Por otra parte, la desestabilización causada por la modificación química con el *Mbbm* representada por el valor de $\Delta\Delta G$ es de 0.05 Kcal/mol (Tabla 13).

LAO D53C-Bimano. Esta posición se encuentra localizada en la región de interacción con las proteínas de membrana (ver Figura 16), su ASAS disminuye 103 \AA^2 al pasar a la conformación cerrada. La intensidad de fluorescencia aumenta aproximadamente un 13 % al unirse a sus ligandos y la eficiencia cuántica es alrededor de tres veces mayor respecto a la proteína silvestre.

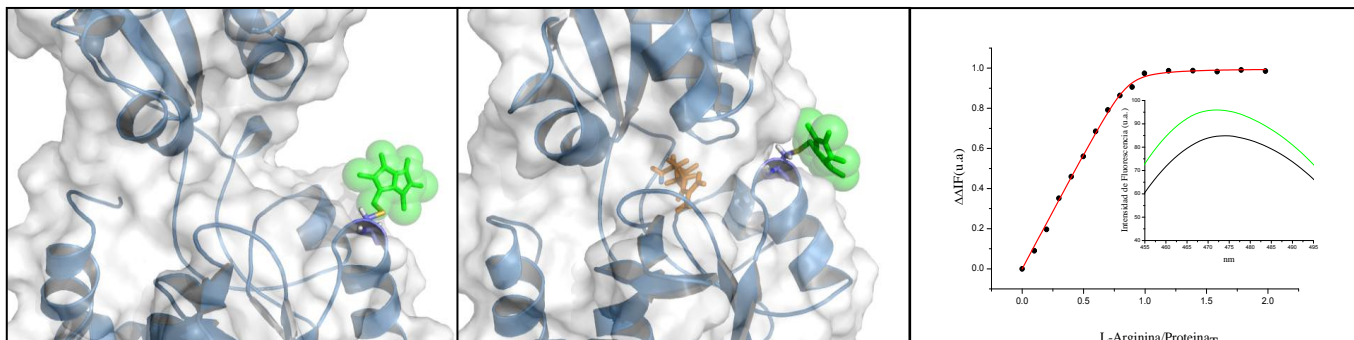


Figura 22. LAO D53C-Bimano. A la izquierda se muestra el modelo estructural de LAO D53C-Bimano en la conformación abierta, en el centro la conformación cerrada (en esferas y bastones verdes se representa el bimano). A la derecha se muestra la titulación en fluorescencia con L-arginina (●); en el regrafico se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia (—) y presencia (—) de L-arginina a saturación.

La modificación química con el fluoróforo muestra un valor de $\Delta\Delta G$ de 0.22 Kcal/mol y modifica en 3 °C la T_m respecto al sistema original. El valor de la constante de afinidad (K_d) de LAO D53C-Bimano para L-arginina y L-lisina se mantiene igual al de la proteína silvestre; sin embargo, para L-histidina muestra un incremento cercano a siete veces.

LAO A89C-Bimano. Esta mutante se encuentra localizada entre los dos lóbulos de la proteína (Figura 23) y está clasificada como una mutante peristérica. El modelo estructural LAO A89C-Bimano muestra un aumento de 17 Å² en la ASAS del bimano al adoptar la conformación cerrada. La intensidad de la fluorescencia disminuye alrededor de 17 % al saturarla con sus ligandos, siendo su eficiencia cuántica de 0.043 similar a la del sistema original ($\phi = 0.033$). El $\Delta\Delta G$ de LAO A89C-Bimano es de 0.02 Kcal/mol y su T_m de 53.6 °C (una diferencia de 6 °C respecto a la proteína silvestre). La afinidad disminuye para los tres aminoácidos L-arginina, L-lisina y L-histidina (Tabla 15).

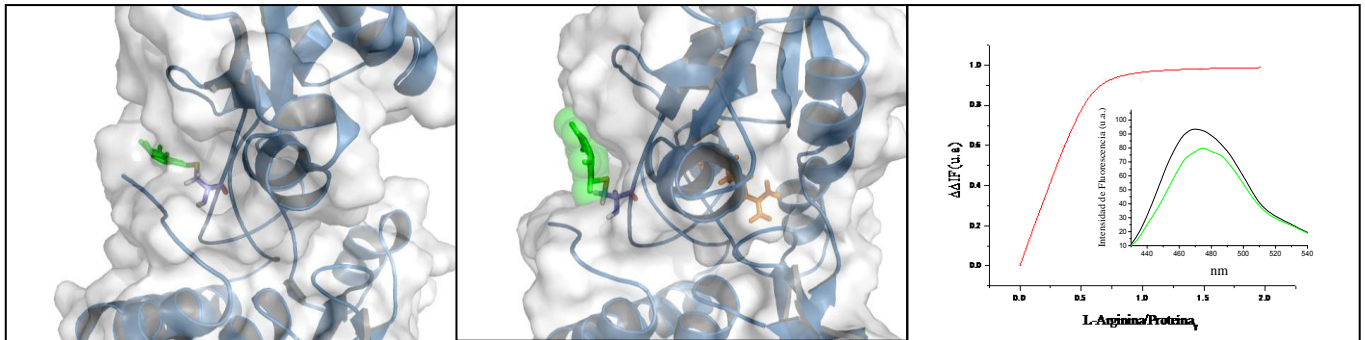


Figura 23. LAO A89C-Bimano. A la izquierda se muestra el modelo estructural de LAO A89C-Bimano en la conformación abierta, en el centro la conformación cerrada (en esferas y bastones verdes se representa el bimano). A la derecha se muestra la titulación en fluorescencia con L-arginina (●); en el regrafico se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia (—) y presencia (—) de L-arginina en condiciones de saturación.

LAO R131C-Bimano. Esta mutante no muestra cambio significativo en la fluorescencia extrínseca (Figura 24, titulación en fluorescencia). Ésto se puede atribuir al residuo de triptofano ubicado en la posición 130 (Figura 25), ya que se ha documentado que residuos de triptofano cercanos al bimano son causa de perturbaciones en las propiedades fluorescentes del fluoróforo (Eisuke Sato 1988; Mansoor, McHaourab et al. 2002).

La eficiencia cuántica calculada para la proteína LAO R131C-Bimano fue de 0.024, menor que la producida por la fluorescencia intrínseca del sistema original (Tabla 15).

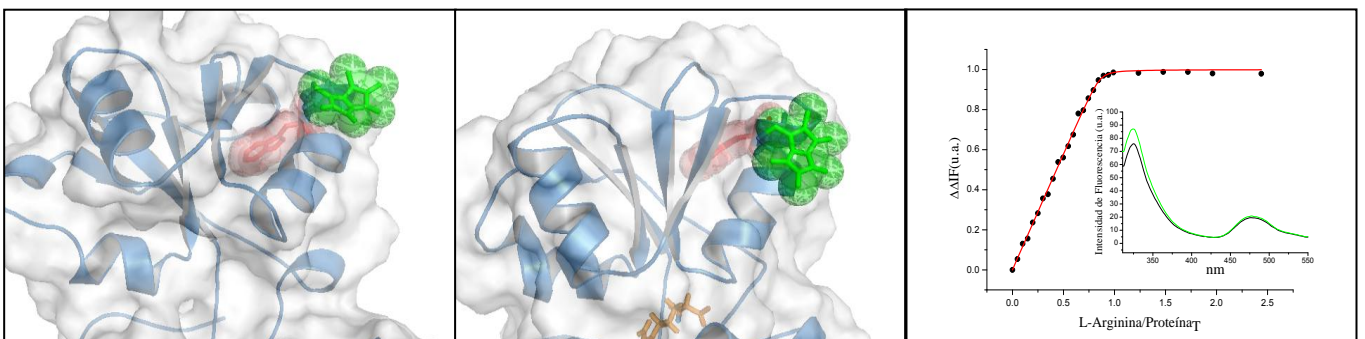


Figura 24. LAO R131C-Bimano. A la izquierda se muestra el modelo estructural de LAO R131C-bimano en la conformación abierta, en el centro la conformación cerrada (en esferas y bastones verdes se representa el bimano, en esferas y bastones rojos se representa el Trp 130). A la derecha se muestra la titulación en fluorescencia con L-arginina (●); en el regrafico se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia (—) y presencia (—) de L-arginina en condiciones de saturación.

La estabilidad de LAO R131C-Bimano muestra un valor en el $\Delta\Delta G$ de 0.12 Kcal/mol y la T_m varía alrededor de 5 °C respecto a la proteína silvestre. Las K_{ds} para los tres aminoácidos mantienen los valores de la proteína silvestre.

LAO E167C-Bimano. Esta posición se encuentra localizada en la periferia, entre los dos lóbulos de la proteína (Figura 25), por lo que se clasificó como peristérica. El modelo estructural de LAO E167C-Bimano muestra una disminución del ASAS de 14 Å² al pasar de la conformación abierta a la cerrada. La intensidad de fluorescencia se incrementó alrededor de 30 % al adicionar sus ligandos en condiciones de saturación. La eficiencia cuántica fue de 0.773, alrededor de 23 veces mayor que la del sistema inicial. La modificación química con el fluoróforo muestra un valor de $\Delta\Delta G$ de 0.04 Kcal/mol y modifica la T_m alrededor de 4 °C respecto a la proteína silvestre. En cuanto a las propiedades de unión de los ligandos, las K_{ds} de LAO E167C-Bimano muestran una disminución de aproximadamente diez veces (Tabla 15).

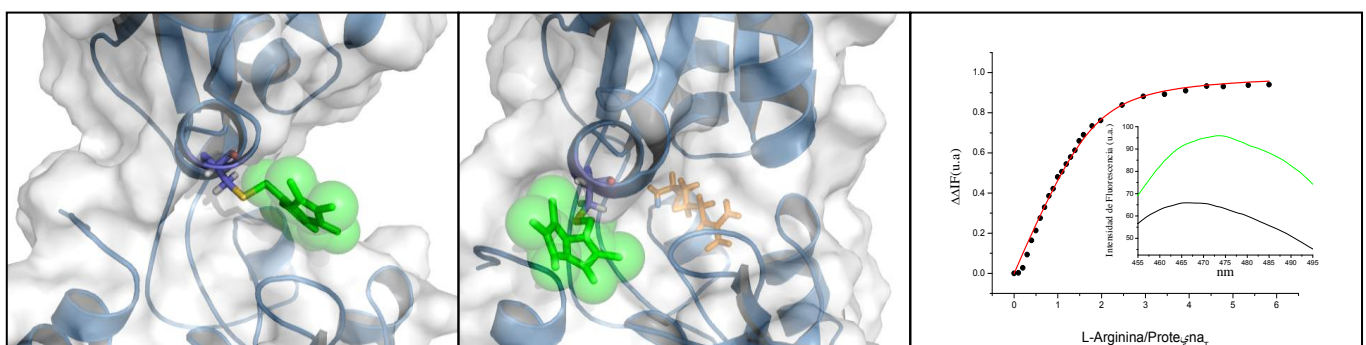


Figura 25. LAO E167C-Bimano. A la izquierda se muestra el modelo estructural de LAO E167C-Bimano en la conformación abierta, en el centro la conformación cerrada (en esferas y bastones verdes se representa el bimano). A la derecha se muestra la titulación en fluorescencia con L-arginina (●); en el regrafico se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia (—) y presencia (—) de L-arginina en condiciones de saturación.

LAO K228C-Bimano. La posición 228 de la proteína LAO se encuentra clasificada como alostérica. El modelo estructural de LAO K228C-Bimano muestra un incremento de 7 \AA^2 en el ASAS. La intensidad de fluorescencia aumenta en un 21% respecto a la proteína silvestre al adicionarle sus ligandos a condiciones de saturación. Sin embargo, en esta posición el cálculo del ASAS predice una disminución en la intensidad de la fluorescencia. Este resultado contradictorio puede deberse a diversos factores como la diferencia mínima encontrada entre la conformación abierta y cerrada en esta posición (aproximadamente 7 \AA^2) o bien la misma interacción del bimano con algunos aminoácidos que afectan su comportamiento.

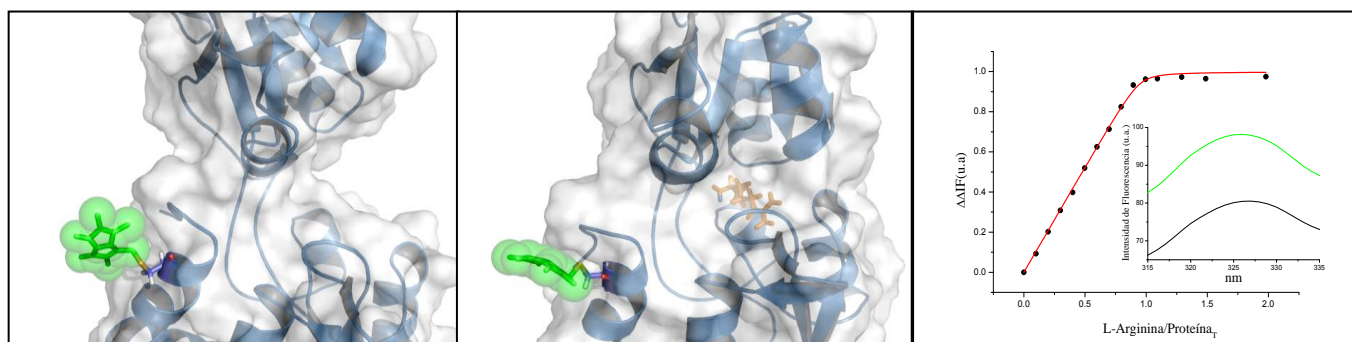


Figura 26. LAO K228C-Bimano. A la izquierda se muestra el modelo estructural de LAO K228C-Bimano en la conformación abierta, en el centro la conformación cerrada (en esferas y bastones verdes se representa el bimano). A la derecha se muestra la titulación en fluorescencia con L-arginina (●); en el gráfico se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia (—) y presencia (—) de L-arginina en condiciones de saturación.

La modificación química con el fluoróforo muestra un valor en el $\Delta\Delta G$ de 0.11 Kcal/mol y modifica en $8 \text{ }^\circ\text{C}$ la T_m con relación al sistema original. La afinidad por sus ligandos prácticamente permaneció inalterada (Tabla 15).

LAO Y230C-Bimano. Esta posición se localiza en las proximidades del C-terminal de la proteína LAO (Figura 27) y está clasificada como alostérica. El modelo estructural de LAO Y230C-Bimano muestra una disminución de 32 \AA^2 en su ASAS, la

intensidad de fluorescencia aumenta en un 34 %, la eficiencia cuántica calculada fue de 0.012 siendo la menor para las posiciones evaluadas. La estabilidad termodinámica de la proteína modificada químicamente resultó ser la más afectada de todas las posiciones evaluadas, con un valor de $\Delta\Delta G$ de 0.41 Kcal/mol y una diferencia de 10 °C en la T_m . Los resultados negativos obtenidos al valorar tanto la eficiencia cuántica como la termoestabilidad pueden atribuirse a que dicha posición tiene mayor grado de libertad al estar situada en el extremo C-terminal, así como una mayor movilidad de la cadena lateral de esta zona. Por estos motivos, el bimanio puede tener un mayor número de contactos con las cadenas laterales de los aminoácidos del entorno que afecten de manera substancial al sistema. En cuanto a la afinidad, esta posición mantiene sus propiedades de unión en un rango adecuado para los aminoácidos L-arginina y L-lisina (Tabla 15).

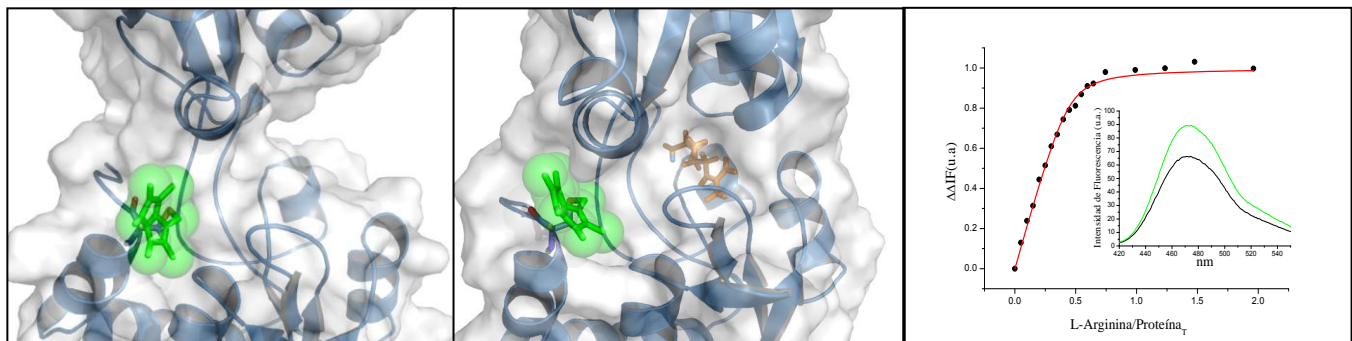


Figura 27. LAO Y230C-Bimano. A la izquierda se muestra el modelo estructural de LAO Y230C-Bimano en la conformación abierta, en el centro la conformación cerrada (en esferas y bastones verdes se representa el bimanio). A la derecha se muestra la titulación en fluorescencia con L-arginina (●); en el gráfico se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia (—) y presencia (—) de L-arginina en condiciones de saturación.

Conclusiones del sistema LAO

Los resultados obtenidos en el sistema LAO donde se modificaron químicamente una serie de posiciones en la proteína con el *Mbbm*, con el propósito de obtener un biosensor para aminoácidos básicos. Nos permiten concluir que las mutantes modificadas químicamente mantienen sus propiedades de unión (K_d) en rangos aceptables para los tres aminoácidos evaluados (Tabla 17), excepto para LAO E167C-Bimano, la cual presenta una K_d diez veces mayor. Respecto a la perturbación de la proteína LAO por la introducción de grupos reporteros (fluoróforos), ésta fue mínima al ser evaluada con parámetros termodinámicos obteniendo valores de $\Delta\Delta G$ entre 0.04 y 0.41 Kcal/mol (Tabla 15). La eficiencia cuántica de la mayoría de las posiciones evaluadas fue mayor que la de la proteína silvestre, siendo la posición 167 la que presenta la mejor eficiencia cuántica (alrededor de 23 veces mayor). Así, la proteína LAO resulta ser un sistema adecuado para el desarrollo de un biosensor para aminoácidos básicos, ya que este sistema presenta ventajas tales como: I) un rango amplio de pH (5.1-8.5) para trabajar; sin perder la afinidad por sus ligandos. II) una excelente estabilidad térmica, ya que el sistema es reversible a la desnaturalización térmica. III) una mínima perturbación por la introducción de grupos reporteros (*Mbbm*). IV) una alta sensibilidad, por la eficiencia cuántica del *Mbbm* unido a la proteína. Adicionalmente, este sistema permite obtener información estructural para otros biosensores potenciales utilizando el motivo estructural de las PBPs.

Sistema proteína CaM

Clonación y subclonación de CaML1. El gen *CaML1* obtenido de la compañía OriGene® (<http://www.origene.com/>) codifica para la proteína calmodulina 1 de *Homo sapiens* (cinasa fosforilasa, delta) y tiene la secuencia de referencia NM_006888.2. El conocimiento de la secuencia permitió el diseño de oligonucleótidos, con sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, para la amplificación del gen *CaML1* por medio de una PCR (Figura 28).

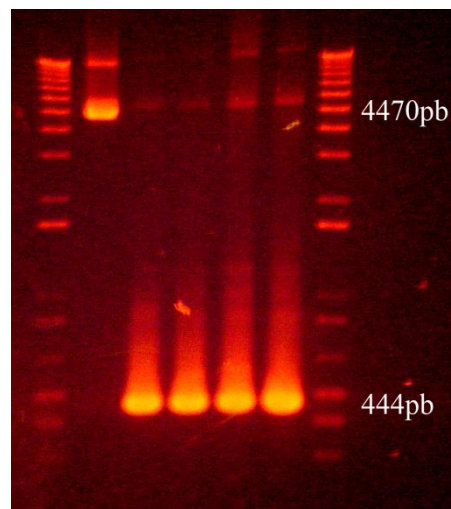


Figura 28. Amplificación del gen *CaML1*. Producto de la PCR del gen *CaML1* con sitios para las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*.

La subclonación del gen *CaM1* se realizó en un vector de expresión tipo pET12b a partir del vector pGEM-T Easy. Esta subclonación fue confirmada mediante digestión enzimática por enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, identificando tanto el vector pET12b como el gen *CaM1* en un gel de agarosa (Figura 29). Adicionalmente se secuenció en un secuenciador Genetic Analyzer ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

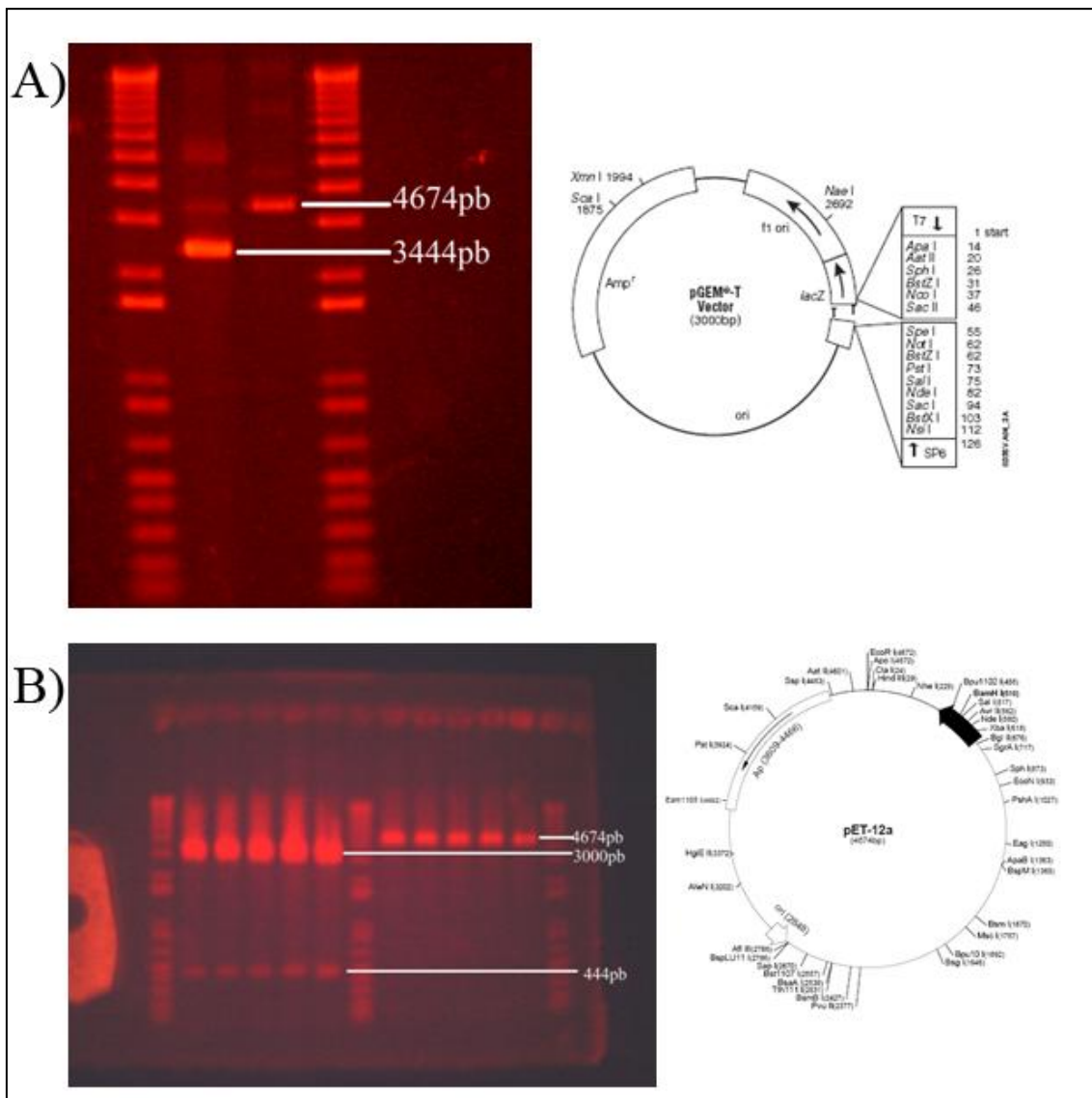


Figura 29. Clonación y subclonación del gen *CAML1*. A) Gel de agarosa conteniendo la construcción pGEM-T-CaML1 (3444 pb) y el vector pET-12b (4674 pb). B) Gel de agarosa mostrando la digestión con las enzimas *NdeI* y *BamHI* de la construcción pGEM-CaML1 (3000 pb y 444 pb respectivamente) y del vector pET-12b (4674 pb).

Purificación de la proteína CaM (Homo sapiens). La proteína recombinante CaM fue purificada mediante una columna de Phenyl-Sepharose CL-4B (Figura 30) y una columna de intercambio aniónico (Source Q).

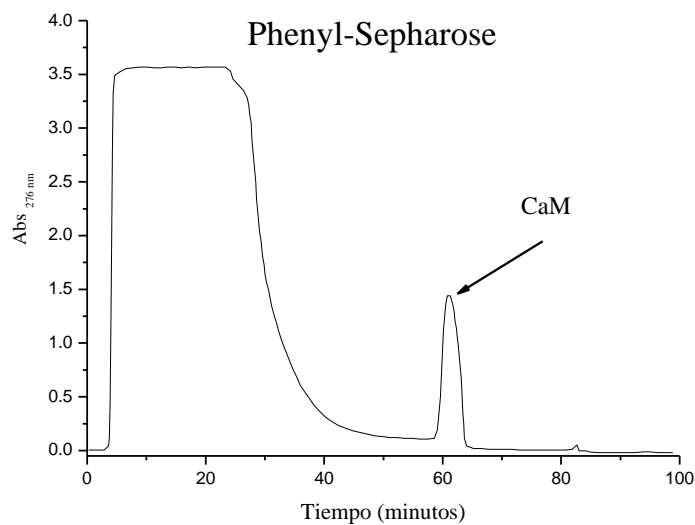


Figura 30. Cromatograma de la purificación de la proteína CaM, correspondiente a la columna Phenyl-Sepharose CL-4B. La fase móvil utilizada fue Tris-HCl 50 mM, DTT 0.5 mM, CaCl₂ 0.1 mM y NaCl 500 mM (pH 7.5), a una velocidad de 1 ml/min. La CaM fue eluida en amortiguador Tris-HCl 50 mM, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM y NaCl 150 mM (pH 7.5); detección a 276 nm. Las fracciones correspondientes a la proteína CaM eluyen entre los minutos 58 al 64.

Para obtener la proteína CaM en su forma Apo (sin Ca⁺²), y las mutantes con cisteínas reactivas libres de agente reductor, las fracciones obtenidas se pasaron por una columna Hit Trap[®] (Figura 31).

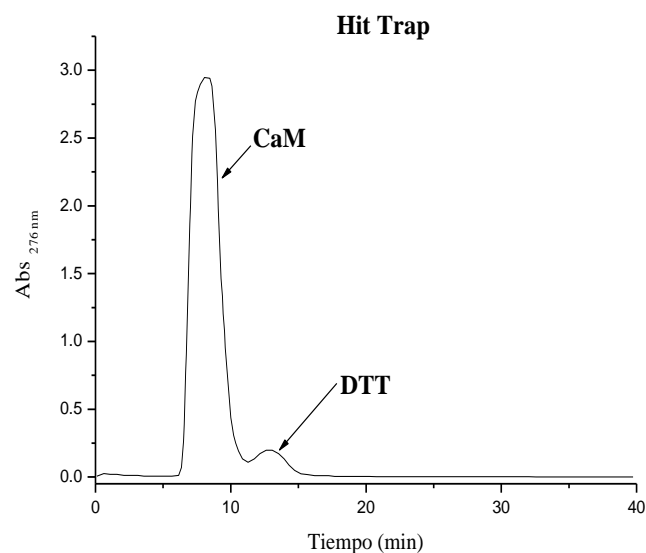


Figura 31. Cromatograma correspondiente al desalado de la proteína CaM en una columna Hit-Trap[®]. Fase móvil: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; flujo: 1 ml/min.

Las mutantes modificadas químicamente con el fluoróforo, se pasaron a través de una columna de exclusión molecular Superdex 75, con el objetivo de remover el exceso de *Mbbm* sin reaccionar (Figura 32).

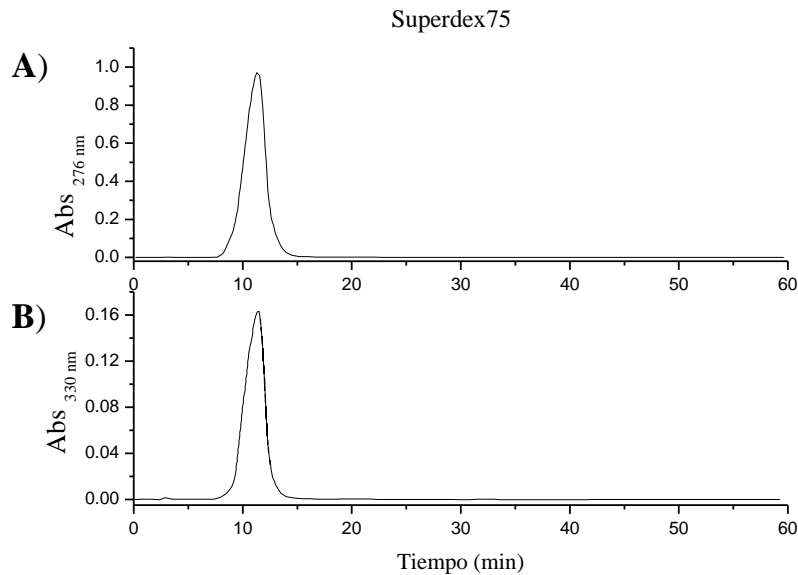


Figura 32. Cromatograma de la proteína CaM modificada químicamente con *Mbbm*, en una columna superdex75. Fase móvil: Tris-HCl, pH 7.5; flujo: 1 ml/min; Detección: A) 276 nm y B) 330 nm.

En la figura 33 se ilustra el seguimiento de la purificación de la proteína CaM por SDS-PAGE. El gel de acrilamida fue analizado con el programa Imagen J[®] para obtener la intensidad de cada carril según la escala de tonalidades de la imagen digitalizada y computarizada. Se estima que la cantidad de proteína recombinante es alrededor del 80 % de la proteína total, con una pureza del 98 %, obteniendo 160 mg de CaM recombinante por litro de medio de cultivo LB.

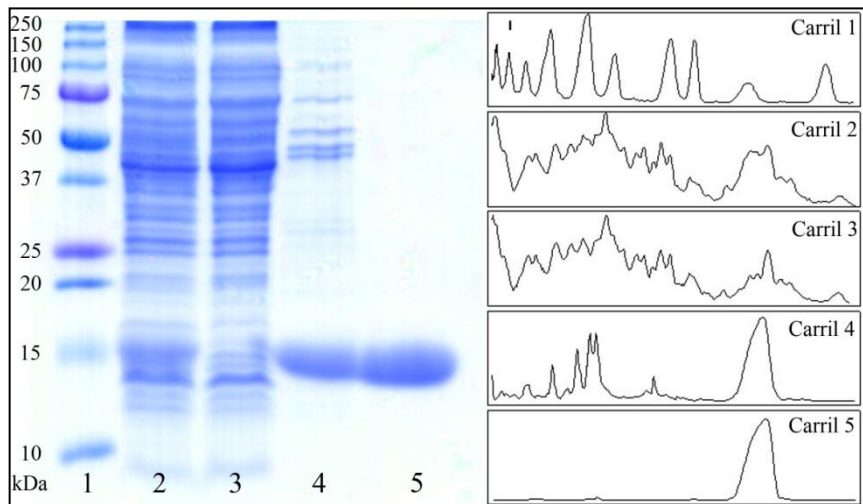


Figura 33. Seguimiento de la purificación de la proteína CaM por SDS-PAGE. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: sobrenadante después de sonicar; carril 3: fracción sin unirse a la columna Phenyl-Sepharose CL-4B; carril 4: fracción unida a la columna Phenyl-Sepharose CL-4B y carril 5: fracción correspondiente a la CaM después de pasar por la columna de intercambio iónico. La imagen digitalizada y los perfiles lineales fueron generados usando el programa Imagen J® (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Análisis de sitios a modificar químicamente con el fluoróforo Mbbm. Para seleccionar los residuos a modificar químicamente en la proteína CaM, se utilizaron los criterios antes mencionados para el sistema de la proteína LAO. Así, el análisis visual de la proteína CaM, realizado con el objetivo de identificar los residuos involucrados con los sitios de unión al calcio, son los siguientes: sitio I Phe19, Asp20, Lys21, Asp22, Gly-23, Asp24, Gly25, Thr26, Ile27, Thr28 y Glu31; sitio II Val55, Asp56, Ala57, Asp58, Gly59, Asn60, Gly61, Thr62, Ile63, Asp64 y Glu67; sitio III Phe92, Asp93, Lys94, Asp95, Gly96, Asn97, Gly98, Tyr99, Ile100, Ser101 y Glu104; sitio IV Tyr99, Ala128, Asp129, Ile130, Asp131, Gly132, Asp133, Gly134, Gln135, Val136, Asn137 y Glu140 -Figura 34- (VanScyoc, Newman et al. 2006).

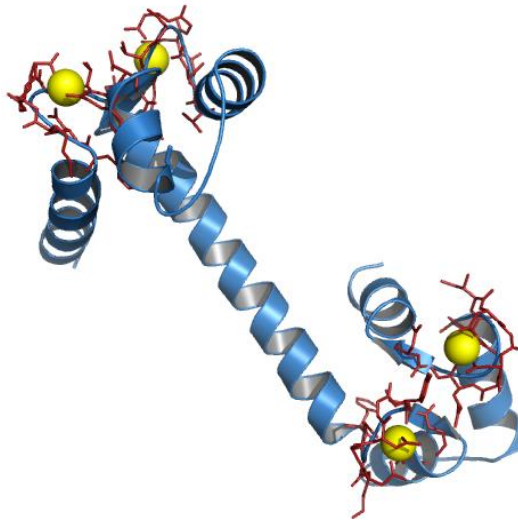


Figura 34. Proteína CaM saturada con calcio. En esferas amarillas se muestran los iones calcio, en líneas rojas se muestran los residuos involucrados en cada uno de los sitios de unión a calcio. El modelo estructural se realizó con PyMOL a partir del archivo 1CLL.pdb.

Tabla 18

Áreas superficiales accesibles al solvente de los diferentes estados de la proteína CaM.

Posición	Ca ⁺² +CaM (Å ²)	CaM+TFP (Å ²)	ΔASAS (Å ²) ¹
E14	130.99	97.39	33.6
K30	124.75	150.52	-25.77
L39	118.69	48.58	70.11
V91	98.25	40.71	57.54
T110	50.17	93.27	-43.1
M124	74.53	84.46	-9.93

El cálculo de las ASAS se realizó con el programa NACCES_2.1.1 utilizando los pdb's 1CLL para la proteína CaM saturada con calcio y 1A29 para la proteína CaM unida al inhibidor trifluoroperazina.

¹ Los valores fueron calculados restando el valor del ASAS de la proteína CaM con el inhibidor a la proteína CaM saturada con calcio (1CLL-1A29).

En la Tabla 18 se muestra el cálculo de las ASAS de las posiciones seleccionadas para realizar el marcaje sitio específico. Todas las posiciones seleccionadas para la modificación química con el *Mbbm* tienen una ASAS \geq a 40 Å. Los sitios seleccionados para colocar al grupo reportero en la proteína CaM fueron los siguientes: Glu14, Lys30, Leu39, Val91, Thr110 y Met124 (Figura 35). Estos residuos tienen las características de no interferir con los sitios de unión al calcio, encontrarse en estructuras tipo α -hélices y la mayoría de estos interactúan con la región de unión de los inhibidores de la CaM (fenotiazinas), según datos obtenidos a partir de la cristalografía de la proteína (1A29.pdb).

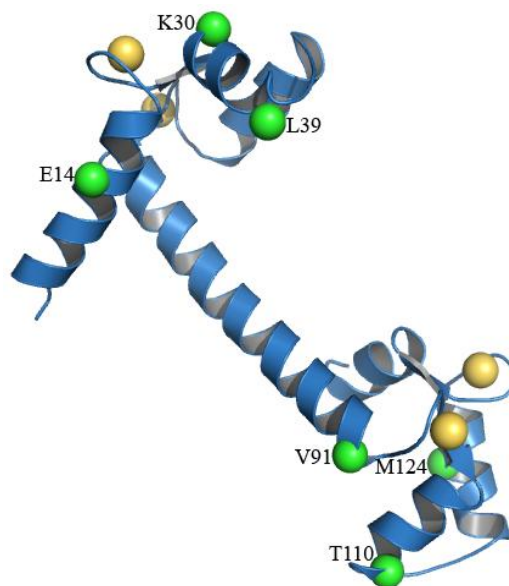


Figura 35. Posiciones seleccionadas para modificar químicamente la proteína CaM con el *Mbbm*. Las esferas verdes representan los sitios seleccionados y las esferas doradas representan los iones calcio. La imagen estructural se realizó con PyMOL a partir del archivo 1CLL.pdb.

Acoplamiento molecular de la proteína CaM con los inhibidores TFP y CPZ. El acoplamiento molecular (Docking) de la proteína CaM con los inhibidores trifluoroperazina (TFP) y clorpromazina (CPZ) se realizó con el objetivo de evaluar si ambos ligandos se unen en el mismo sitio a la CaM. Ya que la estructura cristalizada se encuentra con TFP y nosotros disponíamos de la CPZ. La generación de los modelos estructurales utilizados para el acoplamiento molecular se hizo a partir de las estructura cristalinas de la proteína CaM con el inhibidor TFP (1A29.pdb) y utilizando a la CPZ como ligando. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que ambos inhibidores se unen en el mismo sitio (Figura 36). Los valores de RMSD de los carbonos α fueron de 1.76 y 1.88 Å para la TFP y CPZ, respectivamente; cabe mencionar que la mayor parte de esta desviación es atribuida a la presencia del sustituyente del anillo tricíclico en ambas estructuras. Las K_i calculadas fueron de 3.26 μ M con una energía libre de unión estimada de -10.1 Kcal/mol para el caso de la TFP y 4.58 μ M con una energía libre de unión estimada de -7.28 Kcal/mol para la CPZ. Estos resultados nos permiten

concluir que ambos inhibidores son análogos y la información obtenida será de gran utilidad en la interpretación de los experimentos de fluorescencia correspondientes.

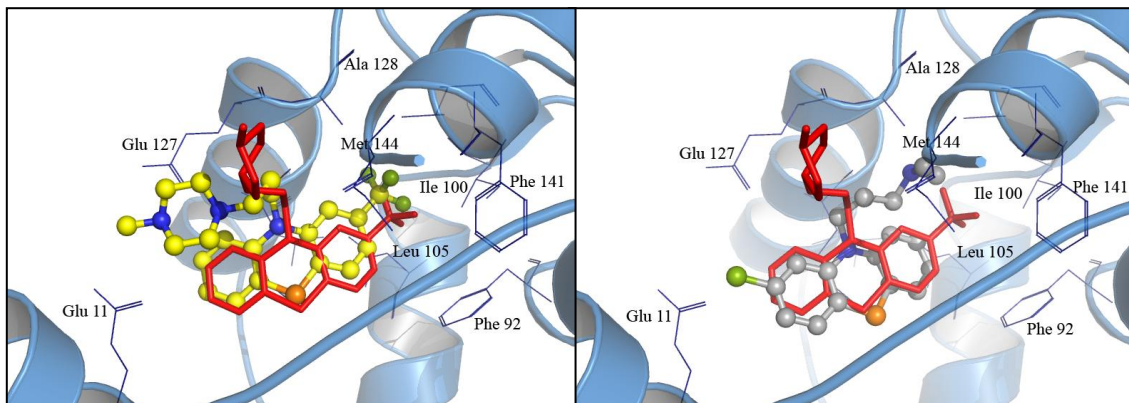


Figura 36. Docking molecular de la proteína CaM con los inhibidores TFP y CPZ. En bastones rojos se muestra la TFP de referencia (a partir de la estructura cristalizada; 1A29.pdb), a la derecha en bastones amarillos la TFP predicha por AutoDock4 y a la izquierda en bastones grises se observa la CPZ estimada por AutoDock4.

Propiedades espectroscópicas de la proteína CaM modificadas químicamente con Mbbm. En la Figura 37 se muestran los espectros de absorción y de fluorescencia de la proteína CaM-Bimano, así como el inhibidor CPZ, en los que se observa la absorción máxima a las longitudes de onda de 381 y 306 nm, respectivamente. Por otra parte, en los espectros de fluorescencia excitando a 381 nm, solamente la proteína modificada muestra una fluorescencia excitando a esta longitud de onda.

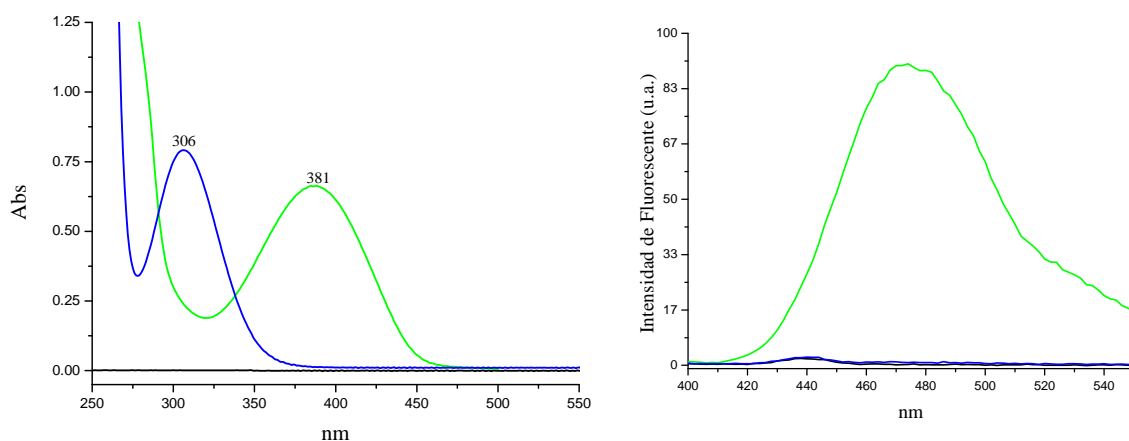


Figura 37. Espectros de absorción y fluorescencia de la proteína CaM modificada químicamente con Mbbm. En la gráfica de la izquierda se muestran los espectros de absorción del amortiguador de KAc 5 mM, pH 5.1 (—), la proteína CaM-Bimano (—) e inhibidor clorpromazina (—). En la gráfica de la derecha se observan los espectros de fluorescencia del amortiguador de KAc 5 mM, pH 5.1 (—), la proteína CaM-Bimano (—) e inhibidor clorpromazina (—); λ_{ex} = 381 nm, λ_{em} = 400-550 nm.

Por lo tanto al utilizar la fluorescencia extrínseca de la proteína modificada químicamente con *Mbbm*, los cambios en la intensidad de fluorescencia son atribuidos de forma exclusiva a la respuesta del fluoróforo extrínseco.

CaM Silvestre. La fluorescencia intrínseca de la proteína CaM es atribuida exclusivamente a la presencia de los aminoácidos fenilalanina y tirosina (VanScyoc, Newman et al. 2006). La eficiencia cuántica de la proteína es de 0.025. La intensidad de la fluorescencia respecto a la de la forma Apo se incrementa en un 54 % al ser saturada con calcio y disminuyó aproximadamente un 83 % al ser saturada con el inhibidor CPZ (Figura 38). El cambio observado al saturar a la proteína con la CPZ es atribuido a efectos de apagamiento de los aminoácidos aromáticos de la proteína ocasionados por la interacción directa del inhibidor con éstos. Además, el cambio en la intensidad de la fluorescencia puede deberse a la absorción de fotones por la CPZ en la λ en la que se excitan los fluoróforos intrínsecos de la proteína. La K_d calculada a través de fluorescencia fue 1.71 μM y la IC_{50} calculada a través del bioensayo de la PDE1 fue de 4.2 μM . Ambas se encuentran en el rango reportado en la literatura (Golinski, DeLaLuz et al. 1995).

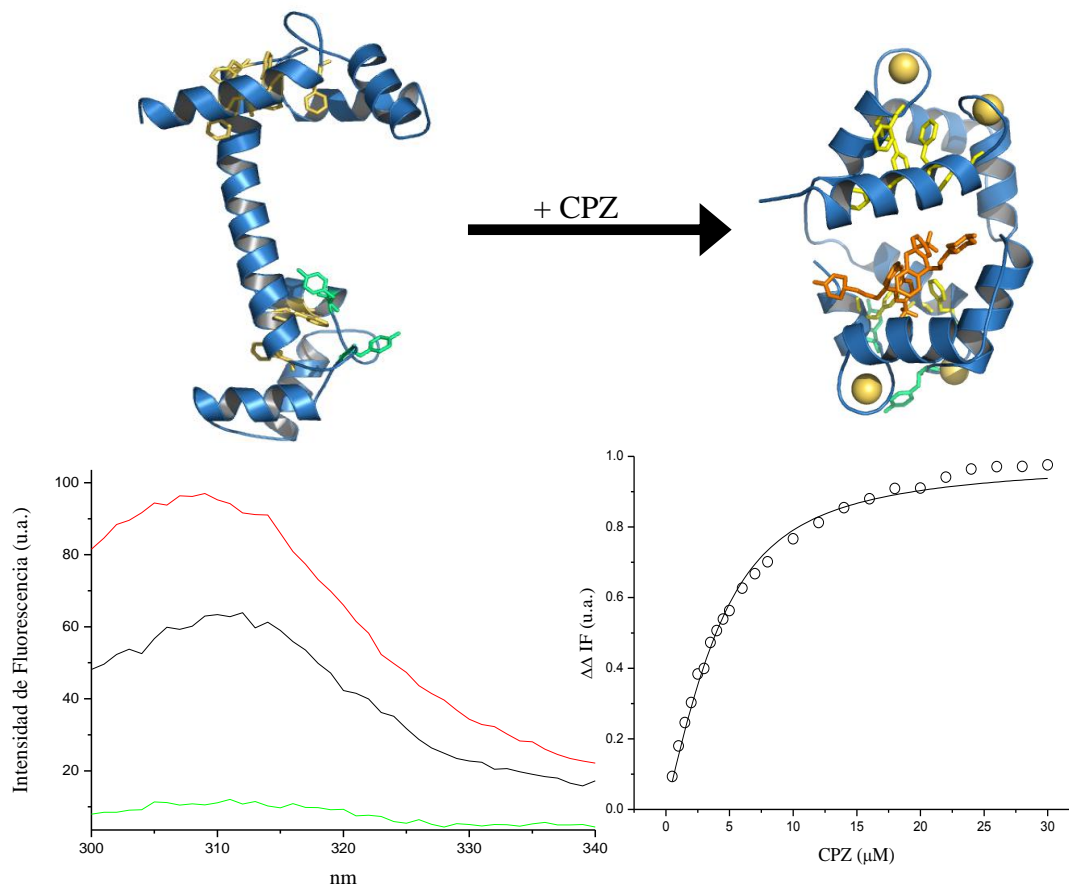


Figura 38. Fluorescencia intrínseca de CaM Silvestre. En la gráfica de la izquierda se muestran los espectros de fluorescencia de la CaM silvestre Apo (línea negra), CaM silvestre con Ca^{+2} (línea roja) y CaM saturada con CPZ (línea verde), $\lambda_{\text{ex}}=282$ nm, $\lambda_{\text{em}}=300-340$ nm en KAc 5 mM, pH 5.1. La gráfica de la derecha muestra la titulación con CPZ, la línea sólida muestra el ajuste realizado. En la parte superior se muestran los modelos estructurales de la proteína CaM en la conformación saturada con Ca^{+2} y unida al inhibidor, mostrando en esferas doradas los iones de calcio, en bastones amarillos las PHE, en bastones verdes las TYR y en bastones naranja al inhibidor.

CaM E14C-Bimano. Esta mutante muestra una eficiencia cuántica de 0.273, 11 veces mayor que el calculado para la CaM silvestre. La intensidad de fluorescencia no cambia al adicionarle calcio hasta saturación, pero lo contrario ocurre cuando se adiciona el inhibidor CPZ hasta saturación: la intensidad de fluorescencia disminuye un 51%. Este comportamiento puede atribuirse a que esta posición se encuentra alejada de los sitio de unión a calcio (Figuras 35 y 39 para la forma abierta y cerrada, respectivamente). La disminución de la intensidad de fluorescencia al adicionar la CPZ puede ser debida a la interacción directa que muestra el inhibidor con el bimano en esta posición (Figura 39). Esta mutante adquiere importancia para obtener señales exclusivas

de compuestos que interaccionan de la misma manera que la CPZ. La CI_{50} , calculada utilizando el método del bioensayo, es de $3.31 \mu\text{M}$ y la K_d , obtenida a través de fluorescencia, es de $0.40 \mu\text{M}$ (cuatro veces menor que de la CaM silvestre).

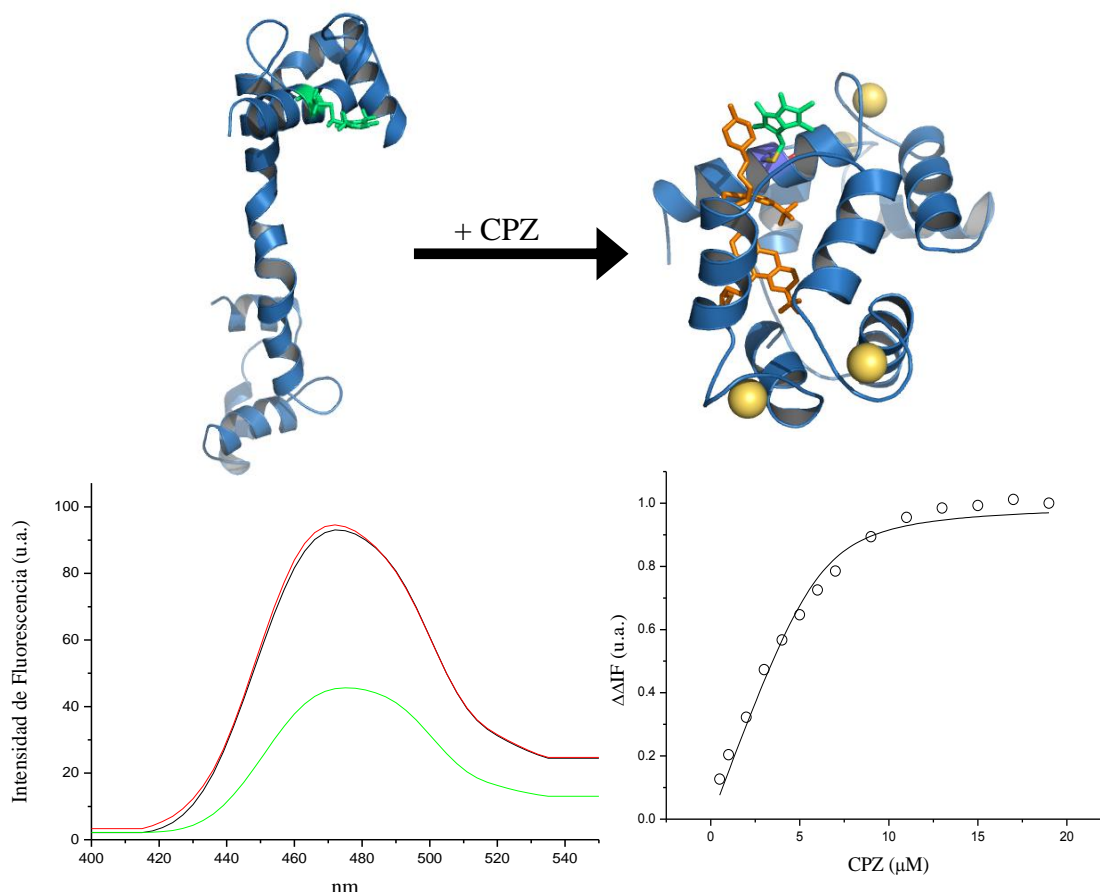


Figura 39. Fluorescencia extrínseca de CaM E14C-Bimano. En la gráfica de la izquierda se muestran los espectros de fluorescencia de la CaM E14C-Bimano Apo (línea negra), CaM E14C-Bimano con Ca^{+2} (línea roja) y CaM E14C-Bimano a saturación con CPZ (línea verde), $\lambda_{\text{ex}}=381 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=400\text{-}550 \text{ nm}$ en KAc 5 mM , $\text{pH } 5.1$. La gráfica de la derecha muestra la titulación con CPZ, la línea sólida muestra el ajuste realizado. En la parte superior se muestran los modelos estructurales generados con HyperChem de la proteína CaM E14C-Bimano en la conformación saturada con Ca^{+2} y en la conformación con el inhibidor, mostrando en esferas doradas los iones de calcio, en bastones verdes el bimano y en bastones naranja al inhibidor.

CaM K30C-Bimano. Esta mutante presenta una eficiencia cuántica de 0.414 , que es 16 veces mayor a la observada con el sistema silvestre. La intensidad de fluorescencia se incrementa en 31% al adicionarle calcio, mientras que al adicionar a la CPZ no se observa cambio. Lo anterior puede deberse a que esta posición se encuentra alejada del sitio de unión del inhibidor a la proteína (Figura 40). Por lo anterior, esta

mutante puede ser selectiva sólo para la unión de metales, manteniendo su capacidad para activar a la enzima PDE1, con una CI_{50} de 16.87 μM .

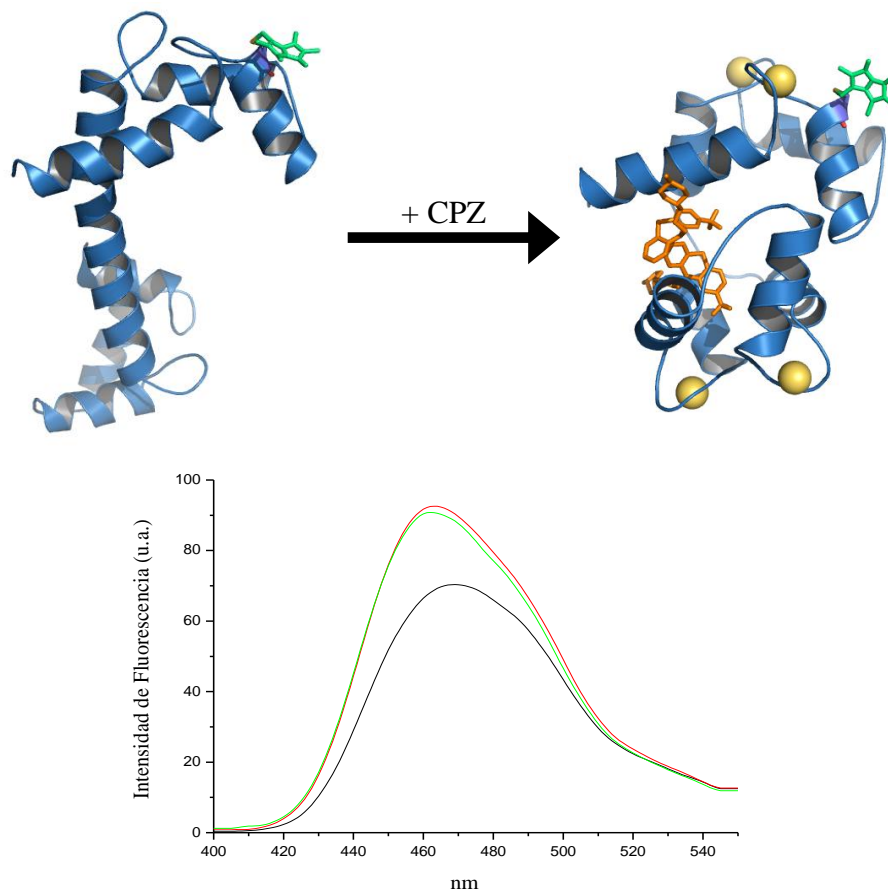


Figura 40. Fluorescencia extrínseca de CaM K30C-Bimano. En la gráfica de la izquierda se muestran los espectros de fluorescencia de la CaM K30C-Bimano Apo (línea negra), CaM K30C-Bimano con Ca^{+2} (línea roja) y CaM K30C-Bimano a saturación con CPZ (línea verde), $\lambda_{\text{ex}} = 381 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}550 \text{ nm}$ en KAc 5 mM pH 5.1. En la parte superior se muestran los modelos estructurales generados con HyperChem de la CaM K30C-Bimano en la conformación saturada con Ca^{+2} y la conformación con el inhibidor, mostrando en esferas doradas los iones de calcio, en bastones verdes al bimano y en bastones naranja el inhibidor.

CaM L39C-Bimano. La eficiencia cuántica calculada para esta posición fue de 0.298, alrededor de 12 mayor que la presentada por la proteína CaM silvestre. La adición de calcio y de la CPZ ocasiona una disminución en la intensidad de la fluorescencia con valores del 11 y un 79 %, respectivamente (Figura 41). Por otra parte, la CI_{50} calculada sobre la activación de la enzima PDE1 fue de 8.78 μM y la K_d ,

estimada con los experimentos de fluorescencia, fue de $3.02 \mu\text{M}$ (casi el doble que la mostrada por la CaM silvestre).

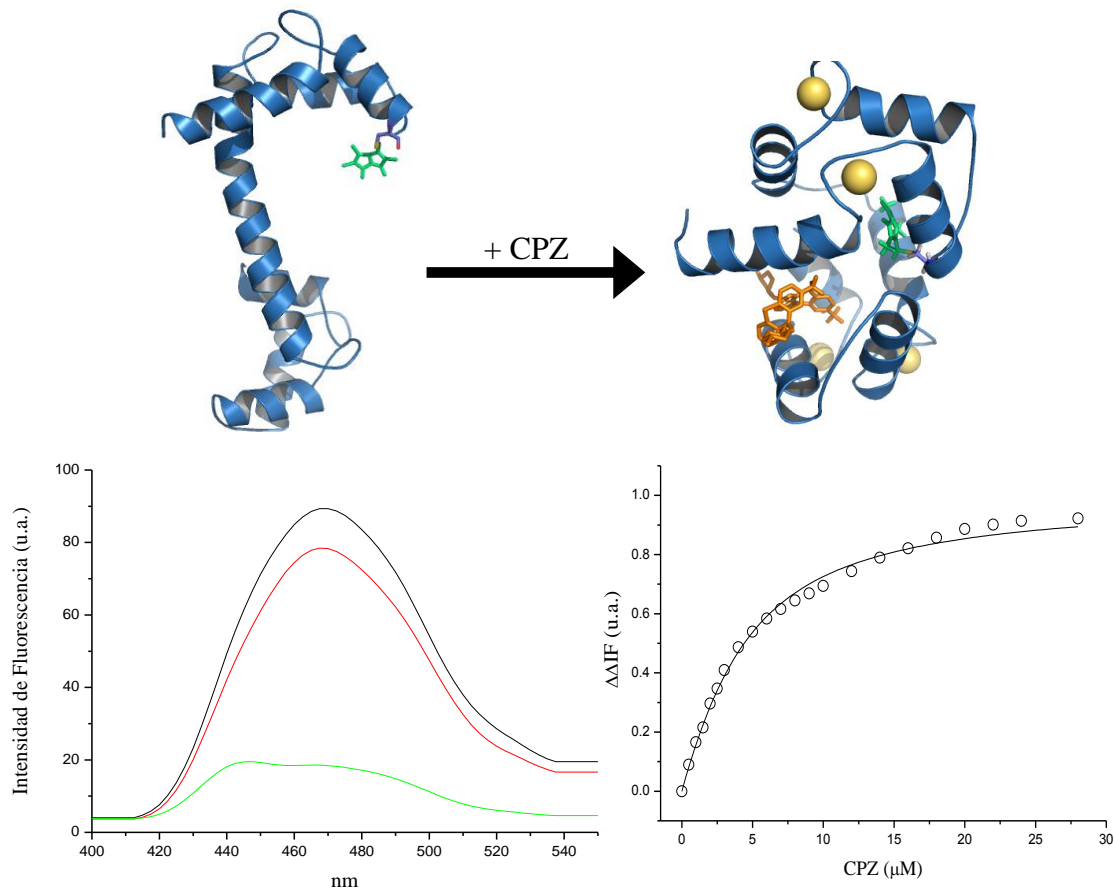


Figura 41. Fluorescencia extrínseca de CaM L39C-Bimano. En la gráfica de la izquierda se muestran los espectros de fluorescencia de la CaM L39C-Bimano Apo (línea negra), CaM L39C-Bimano con Ca^{+2} (línea roja) y CaM L39C-Bimano a saturación con CPZ (línea verde), $\lambda_{\text{ex}} = 381 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}550 \text{ nm}$ en KAc 5 mM pH 5.1 . La gráfica de la derecha muestra la titulación con CPZ, la línea sólida muestra el ajuste realizado. En la parte superior se muestran los modelos estructurales generados con HyperChem de la proteína CaM L39C-Bimano en la conformación saturada con Ca^{+2} y la conformación con el inhibidor, mostrando en esferas doradas los iones de calcio, en bastones verdes el bimano y en bastones naranja el inhibidor.

CaM V91C-Bimano. Respecto a esta mutante, la eficiencia cuántica calculada fue alrededor de 20 veces mayor ($\phi = 0.514$) en comparación con la de la proteína silvestre. La intensidad de la fluorescencia de esta posición al adicionarle calcio se incrementó (7 %) y el caso contrario ocurrió con la adición del inhibidor CPZ (disminuyó alrededor de 62 %) (Figura 42). La CI_{50} , calculada en el bioensayo realizado sobre la enzima PDE1, es de $10.94 \mu\text{M}$ y la K_d es de $0.75 \mu\text{M}$.

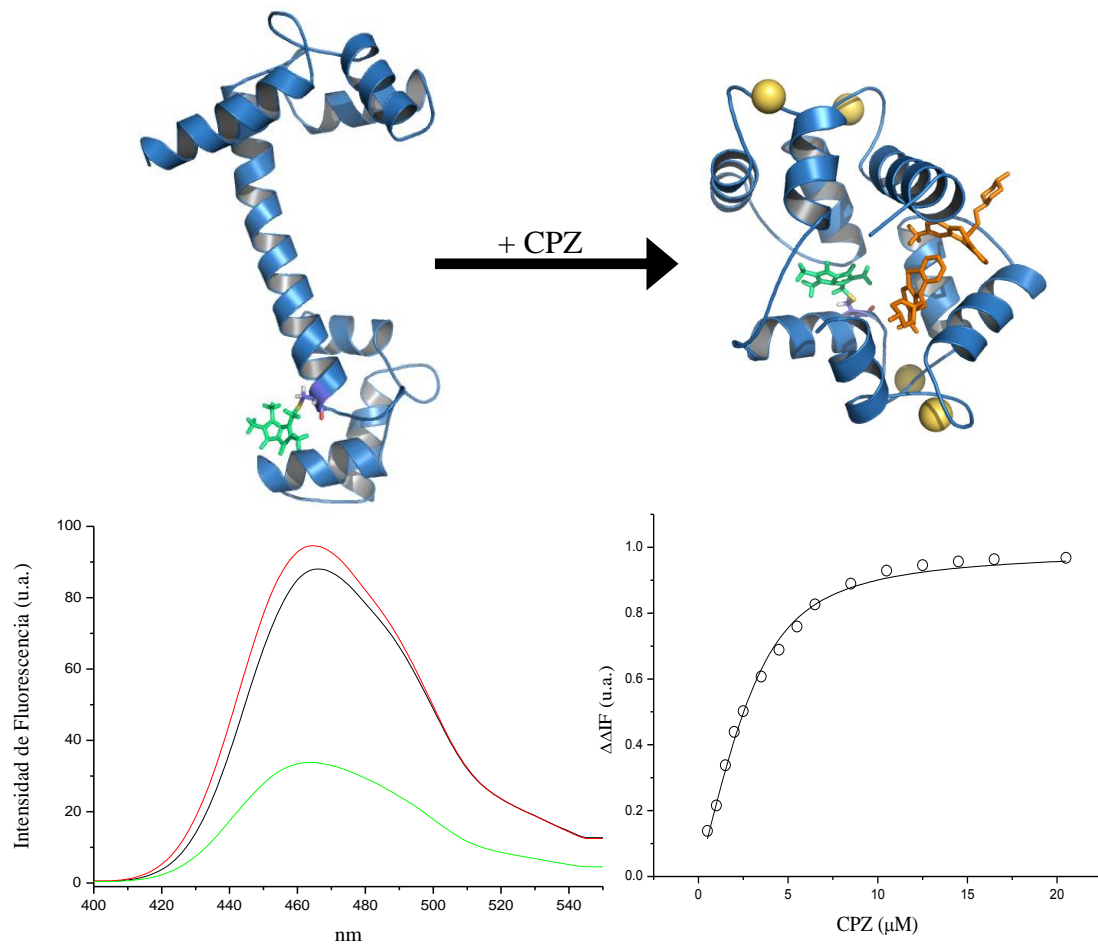


Figura 42. Fluorescencia extrínseca de CaM V91C-Bimano. En la gráfica de la izquierda se muestran los espectros de fluorescencia de la CaM V91C-Bimano Apo (línea negra), CaM V91C-Bimano con Ca^{+2} (línea roja) y CaM V91C-Bimano a saturación con CPZ (línea verde), $\lambda_{\text{ex}}=381$ nm, $\lambda_{\text{em}}=400-550$ nm en KAc 5 mM pH 5.1. La gráfica de la derecha muestra la titulación con CPZ, la línea sólida muestra el ajuste realizado. En la parte superior se muestran los modelos estructurales generados con HyperChem de la proteína CaM V91C-Bimano en la conformación saturada con Ca^{+2} y la conformación con el inhibidor, mostrando en esferas doradas los iones de calcio, en bastones verdes el bimano y en bastones naranja el inhibidor.

CaM T110C-Bimano. Esta mutante presenta una eficiencia cuántica de 0.303, alrededor de 12 veces mayor que la proteína silvestre. La intensidad de fluorescencia disminuye en un 3 y 19 %, durante la adición de calcio y del inhibidor CPZ, respectivamente. Esta mutante es la que presenta la menor disminución de la intensidad de fluorescencia al unir el inhibidor. Finalmente, los valores de la CI_{50} y K_d calculadas a través del bioensayo y con la titulación en fluorescencia son 7.22 y 2.32 μM , respectivamente.

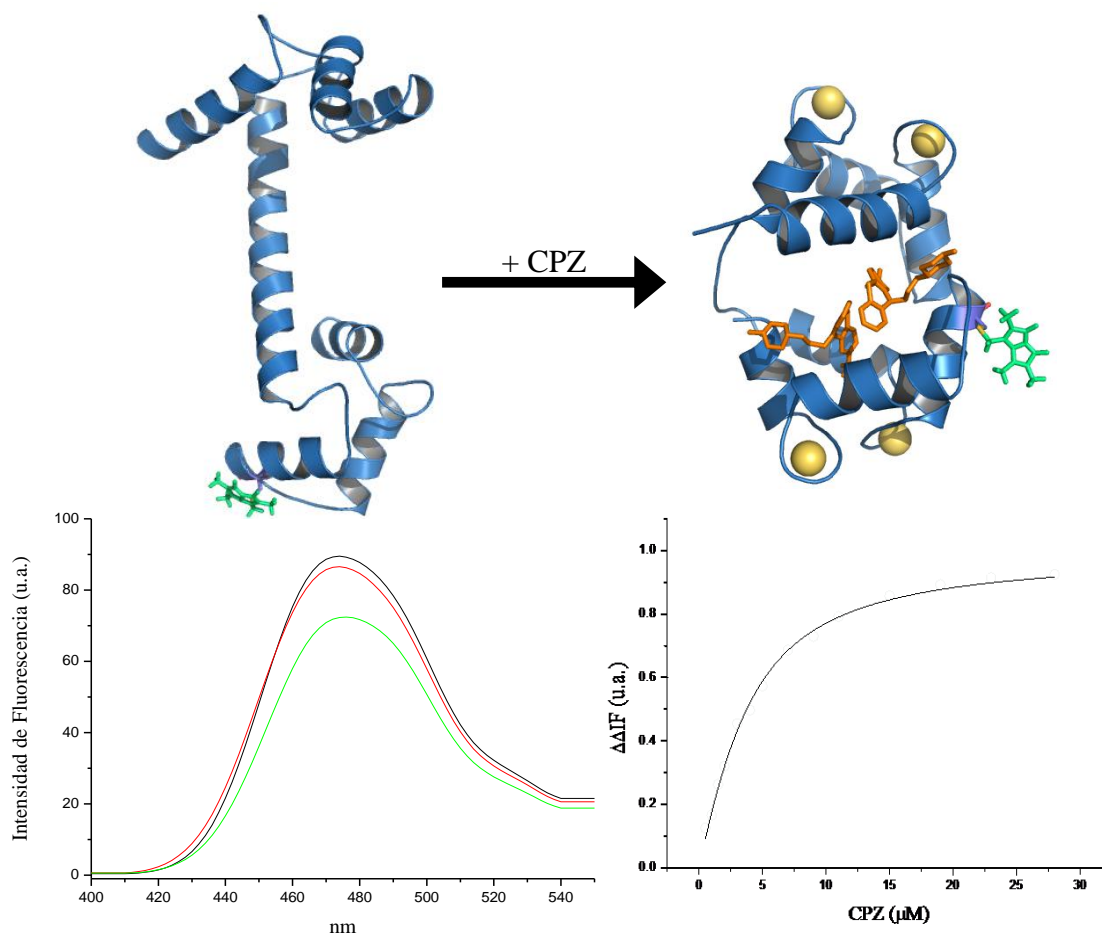


Figura 43. Fluorescencia extrínseca de CaM T110C-Bimano. En la gráfica de la izquierda se muestran los espectros de fluorescencia de la CaM T110C-Bimano Apo (línea negra), CaM T110C-Bimano con Ca^{+2} (línea roja) y CaM T110C-Bimano a saturación con CPZ (línea verde), $\lambda_{\text{ex}} = 381$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 400-550$ nm en KAc 5 mM pH 5.1. La gráfica de la derecha muestra la titulación con CPZ, la línea sólida muestra el ajuste realizado. En la parte superior se muestran los modelos estructurales generados con HyperChem de la proteína CaM T110C-Bimano en la conformación saturada con Ca^{+2} y la conformación con el inhibidor, mostrando en esferas doradas los iones de calcio, en bastones verdes el bimano y en bastones naranja el inhibidor.

CaM M124C-Bimano. La eficiencia cuántica de esta posición fue alrededor de 20 veces mayor ($\phi = 0.494$) que la del sistema original. La intensidad de fluorescencia al adicionar calcio incrementa moderadamente (9 %); sin embargo, la adición de la CPZ ocasiona una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia (84 %). Es posible que esta disminución sea atribuida a la interacción directa del fluoróforo con dos moléculas de CPZ en esta posición (Figura 44). La CI_{50} calculada para este mutante

fue de 19.00 μM (bioensayo) y la K_d fue de 1.71 μM (titulación seguida por fluorescencia).

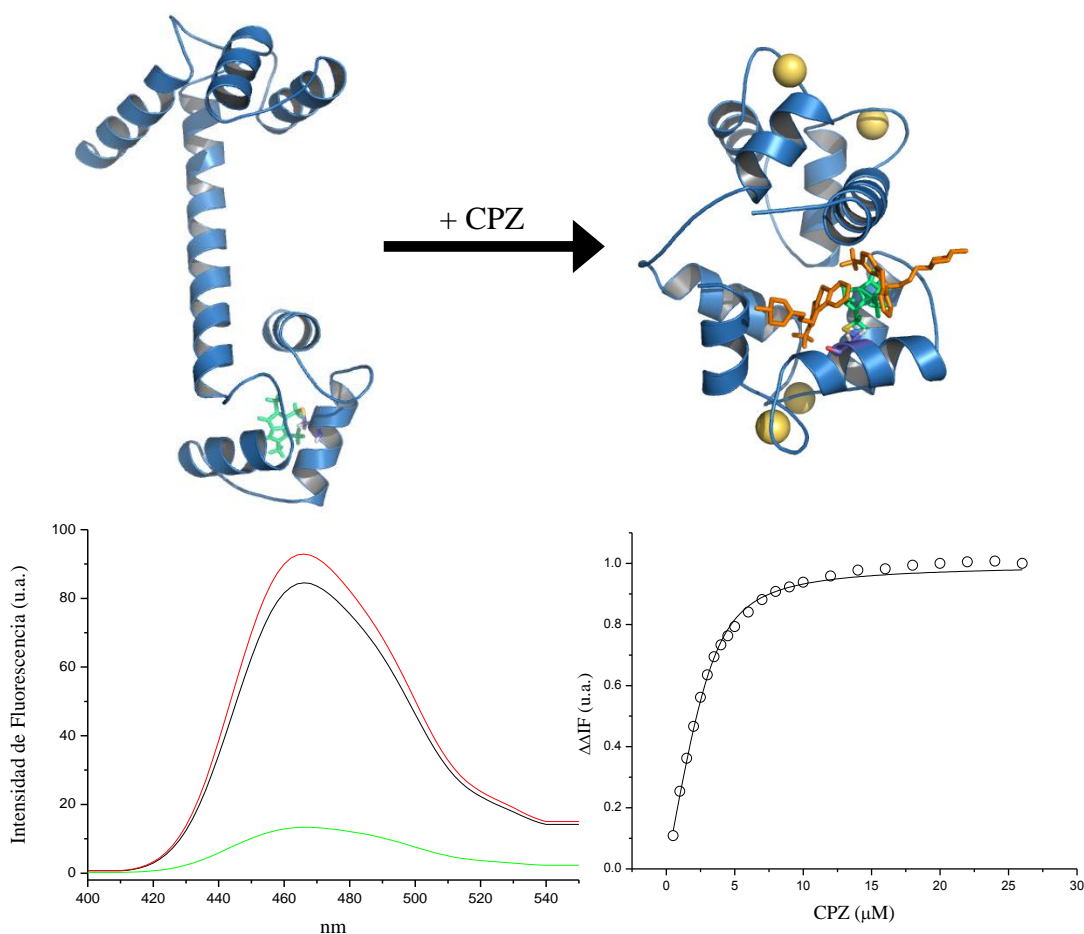


Figura 44. Fluorescencia extrínseca de CaM M124C-Bimano. En la gráfica de la izquierda se muestran los espectros de fluorescencia de la CaM M124C-Bimano Apo (línea negra), CaM M124C-Bimano con Ca^{+2} (línea roja) y CaM M124C-Bimano a saturación con CPZ (línea verde), $\lambda_{\text{ex}} = 381 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}550 \text{ nm}$ en KAc 5 mM pH 5.1. La gráfica de la derecha muestra la titulación con CPZ, la línea sólida muestra el ajuste realizado. En la parte superior se muestran los modelos estructurales generados con HyperChem de la proteína CaM M124C-Bimano en la conformación saturada con Ca^{+2} y la conformación con el inhibidor, mostrando en esferas doradas los iones de calcio, en bastones verdes el bimano y en bastones naranja el inhibidor.

La Tabla 19 resumen los resultados espectroscópicos y farmacológicos de la CaM y las diferentes posiciones modificadas químicamente con el *Mbbm*.

Tabla 19

Propiedades espectroscópicas y farmacológicas de la proteína CaM y las diferentes posiciones modificadas químicamente con fluoróforos.

Mutante	CI ₅₀ (μM) ¹	K _d (μM) ²	Rendimiento cuántico (ϕ) ³	% de Cambio en Fluorescencia	
				Ca ⁺²	CPZ
CaM Silvestre	4.25 ± 0.46	1.71 ± 0.16	0.025	+54 %	-83 %
CaM E14C-Bimano	3.31 ± 0.44	0.40 ± 0.12	0.273	0 %	-51 %
CaM K30C-Bimano	16.87 ± 1.38	-	0.414	+31 %	0 %
CaM L39C- Bimano	8.78 ± 1.65	3.02 ± 0.21	0.298	-11 %	-79 %
CaM V91C-Bimano	10.94 ± 0.74	0.75 ± 0.08	0.514	+7 %	-62%
CaM T110C-Bimano	7.22 ± 0.86	2.32 ± 0.17	0.303	-3 %	-19 %
CaM M124C-Bimano	19.00 ± 1.78	1.71 ± 0.18	0.494	+9 %	-84 %

¹ CI₅₀ determinada a través de bioensayo (activación de la enzima PDE1).

² K_d determinada a través de titulaciones en fluorescencia.

³ ϕ de la quinina es de 0.55.

Conclusiones del sistema CaM

Todas las mutantes modificadas químicamente con el *Mbbm* mantienen su funcionalidad sobre la activación de la enzima dependiente PDE1. Sin embargo, se observan diferencias significativas en los valores calculados a partir de los datos obtenidos en el bioensayo enzimático empleado para calcular la CI₅₀; en algunos casos son hasta cinco veces mayores. Estos pueden deberse por una parte a la posible interferencia de los fluoróforos en la interacción proteína-proteína durante la formación del complejo CaM:PDE1 y también a las variables experimentales del bioensayo (temperatura, pH, tiempo de incubación, lotes homogéneos de las enzimas utilizadas, etc.) durante la realización del mismo.

Los valores de las K_d obtenidas mediante las titulaciones en fluorescencia se encuentran dentro de los valores esperados, como se resumen en la Tabla 19. En todos los casos, las mutantes evaluadas presentan una mayor eficiencia cuántica que la mostrada por la proteína CaM silvestre, siendo en algunos casos hasta 20 veces mayor. Esto se manifiesta en una mayor sensibilidad en los sistemas propuestos. Con base en estos resultados podemos señalar que estas mutantes modificadas químicamente con el fluoróforo *Mbbm* pueden ser utilizadas como biosensores, para el ión calcio como para

inhibidores del tipo fenotiazinas, como es el caso de la CPZ y TFP (tricíclicos), con excepción de las mutantes CaM E14C-Bimano (la cual solamente responde al inhibidor CPZ) y CaM K30C-Bimano (la cual es sensible exclusivamente a la presencia de iones calcio). Las mutantes con mayor eficiencia cuántica fueron la CaM V91C-Bimano y la CaM M124C-Bimano, siendo su eficiencia cuántica 20 veces mayor que la de la CaM silvestre. Los sistemas que presentaron el cambio más significativo en la intensidad de fluorescencia para el inhibidor CPZ fueron la CaM M124C-Bimano y la CaM L39C-Bimano con una disminución de la intensidad de la fluorescencia del 84 y 79 %, respectivamente.

Conclusiones generales

Los biosensores son dispositivos de gran importancia que permiten la detección de analitos de forma selectiva, directa y rápida lo que supone un ahorro de tiempo y costos importantes. El desarrollo de los biosensores implica la elección adecuada de sus componentes principales, la macromolécula biológica y el componente transductor. En este trabajo se utilizaron dos proteínas (LAO y CaM) que tienen como características comunes ser proteínas monoméricas, pequeñas, flexibles y estables. En cuanto al componente transductor se utilizó el fluoróforo *Mbbm* que responde adecuadamente a los cambios de polaridad relativa de su entorno. En la construcción de los biosensores se utilizó el marcaje sitio específico de fluoróforos, para la incorporar el componente transductor. Para elegir las posiciones a marcar en estas proteínas propusimos una serie de criterios básicos: una $ASAS \geq 40 \text{ \AA}$ de los residuos, posiciones que no interfieran con los sitios importantes de las proteínas, residuos que se encuentren en estructuras de tipo α -hélices, posiciones alejadas de aminoácidos aromáticos. Los resultados obtenidos para ambos sistemas fueron satisfactorios, logrando obtener biosensores funcionales con una alta sensibilidad, selectividad y robustez. En el sistema LAO la mutante LAO E167C-Bimano se considerada el mejor diseño, ya que muestra la mayor eficiencia cuántica y un apreciable % de cambio en la intensidad de fluorescencia. Para el sistema CaM el diseño óptimo para identificar compuestos análogos al inhibidor CPZ es la CaM M124C-Bimano, considerando el mismo argumento descritos en el sistema LAO.

Bibliografía

- Ames, G. F. and J. E. Lever (1972). "The histidine-binding protein J is a component of histidine transport. Identification of its structural gene, hisJ." J Biol Chem **247**(13): 4309-16.
- Aramburu, J., A. Rao, et al. (2000). "Calcineurin: from structure to function." Curr Top Cell Regul **36**: 237-95.
- Becktel, W. J. and J. A. Schellman (1987). "Protein stability curves." Biopolymers **26**(11): 1859-77.
- Bjork, J., S. Lundberg, et al. (1995). "Characterization of the binding of calmodulin to non-erythroid spectrin." Eur J Cell Biol **66**(2): 200-4.
- Carmon, K. S., R. E. Baltus, et al. (2004). "A piezoelectric quartz crystal biosensor: the use of two single cysteine mutants of the periplasmic Escherichia coli glucose/galactose receptor as target proteins for the detection of glucose." Biochemistry **43**(44): 14249-56.
- Cuneo, M. J., A. Changela, et al. (2006). "The crystal structure of a thermophilic glucose binding protein reveals adaptations that interconvert mono and disaccharide binding sites." J Mol Biol **362**(2): 259-70.
- Chattopadhyaya, R., W. E. Meador, et al. (1992). "Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution." J Mol Biol **228**(4): 1177-92.
- Chen, R. F. (1965). "Fluorescence quantum yield measurements: vitamin B6 compounds." Science **150**(703): 1593-5.
- Cho, H. J., Q. W. Xie, et al. (1992). "Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages." J Exp Med **176**(2): 599-604.
- D'Auria, S., P. Herman, et al. (1999). "The fluorescence emission of the apo-glucose oxidase from *Aspergillus niger* as probe to estimate glucose concentrations." Biochem Biophys Res Commun **263**(2): 550-3.
- Dattelbaum, J. D., L. L. Looger, et al. (2005). "Analysis of allosteric signal transduction mechanisms in an engineered fluorescent maltose biosensor." Protein Sci **14**(2): 284-91.
- de Lorimier, R. M., J. J. Smith, et al. (2002). "Construction of a fluorescent biosensor family." Protein Sci **11**(11): 2655-75.
- DeLano, W. L. (2004). "Use of PYMOL as a communications tool for molecular science." Abstracts of Papers of the American Chemical Society **228**: U313-U314.
- Dhillon, N. K., S. Sharma, et al. (2003). "Biochemical characterization of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase from *Candida albicans*." Mol Cell Biochem **252**(1-2): 183-91.
- Dwyer, M. A. and H. W. Hellinga (2004). "Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering." Curr Opin Struct Biol **14**(4): 495-504.
- Eftink, M. R. (1994). "The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins." Biophys J **66**(2 Pt 1): 482-501.
- Eisuke Sato, M. S., Yuichi Kanaoka and Edward M. Kosower (1988). "Organic fluorescent reagents : XIV. Novel fluorogenic substrates for microdetermination of chymotrypsin and aminopeptidase: Bimane fluorescence appears after hydrolysis." Bioorganic Chemistry **16**(3): 298-306.
- Eu, J. P., L. Xu, et al. (1999). "Regulation of ryanodine receptors by reactive nitrogen species." Biochem Pharmacol **57**(10): 1079-84.

- Eyer, P., F. Worek, et al. (2003). "Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment." Anal Biochem **312**(2): 224-7.
- Furlong, C. E. (1987). "in "Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology"." American Society for Microbiology(F. C. Neidhardt, ed.): 768.
- Gerstein, M. and N. Echols (2004). "Exploring the range of protein flexibility, from a structural proteomics perspective." Curr Opin Chem Biol **8**(1): 14-9.
- Golinski, M., P. J. DeLaLuz, et al. (1995). "Synthesis, binding affinity, and cross-linking of monodentate photoactive phenothiazines to calmodulin." Bioconjug Chem **6**(5): 549-57.
- Horvath, I., V. Harmat, et al. (2005). "The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug." J Biol Chem **280**(9): 8266-74.
- Hubbard, S. J., J. M. Thornton, et al. (1992). "Substrate recognition by proteinases." Faraday Discuss(93): 13-23.
- Huber, P. A., M. El-Mezgueldi, et al. (1996). "Multiple-sited interaction of caldesmon with Ca(2+)-calmodulin." Biochem J **316** (Pt 2): 413-20.
- Kang, C. H., W. C. Shin, et al. (1991). "Crystal structure of the lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from Salmonella typhimurium at 2.7-Å resolution." J Biol Chem **266**(35): 23893-9.
- Keusgen, M. (2002). "Biosensors: new approaches in drug discovery." Naturwissenschaften **89**(10): 433-44.
- Kosower, N. S., G. L. Newton, et al. (1980). "Bimane fluorescent labels. Characterization of the bimane labeling of human hemoglobin." Biochim Biophys Acta **622**(2): 201-9.
- Lee, B. and F. M. Richards (1971). "The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility." J Mol Biol **55**(3): 379-400.
- Lever, J. E. (1972, Jul 10). "Purification and properties of a component of histidine transport in Salmonella typhimurium. The histidine-binding protein J." J Biol Chem Retrieved 13, 247.
- Mansoor, S. E., H. S. McHaourab, et al. (1999). "Determination of protein secondary structure and solvent accessibility using site-directed fluorescence labeling. Studies of T4 lysozyme using the fluorescent probe monobromobimane." Biochemistry **38**(49): 16383-93.
- Mansoor, S. E., H. S. McHaourab, et al. (2002). "Mapping proximity within proteins using fluorescence spectroscopy. A study of T4 lysozyme showing that tryptophan residues quench bimane fluorescence." Biochemistry **41**(8): 2475-84.
- Matsuoka, Y., C. A. Hughes, et al. (1996). "Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C." J Biol Chem **271**(41): 25157-66.
- Medintz, I. L. and J. R. Deschamps (2006). "Maltose-binding protein: a versatile platform for prototyping biosensing." Curr Opin Biotechnol **17**(1): 17-27.
- Miller, D. M., 3rd, J. S. Olson, et al. (1983). "Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis." J Biol Chem **258**(22): 13665-72.
- Miyake, M. and S. Kakiuchi (1978). "Calcium dependent activator protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase from rat and bovine brain; presence of N-epsilon-trimethyllysine residue." Brain Res **139**(2): 378-80.

- Morris, G. M., D. S. Goodsell, et al. (1998). "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function." Journal of Computational Chemistry **19**(14): 1639-1662.
- Nairn, A. C. and M. R. Picciotto (1994). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinases." Semin Cancer Biol **5**(4): 295-303.
- Nikaido, K. and G. F. Ames (1992). "Purification and characterization of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*." J Biol Chem **267**(29): 20706-12.
- Oh, B. H., G. F. Ames, et al. (1994). "Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein." J Biol Chem **269**(42): 26323-30.
- Oh, B. H., J. Pandit, et al. (1993). "Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand." J Biol Chem **268**(15): 11348-55.
- Richards, F. M. (1977). "Areas, volumes, packing and protein structure." Annu Rev Biophys Bioeng **6**: 151-76.
- Rojas, S., L. Acevedo, et al. (2003). "Calmodulin inhibitors from *Leucophyllum ambiguum*." J Nat Prod **66**(2): 221-4.
- S. Martínez-Luis, R. R.-S., L. Acevedo, M. C. González, A. Lira-Rocha and R. Mata (2006). "Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*." Tetrahedron **62**: 1817-1822.
- Salins, L. L., S. K. Deo, et al. (2004). "Phosphate binding protein as the biorecognition element in a biosensor for phosphate." Sens Actuators B Chem **97**(1): 81-9.
- Salins, L. L., E. S. Goldsmith, et al. (2002). "A fluorescence-based sensing system for the environmental monitoring of nickel using the nickel binding protein from *Escherichia coli*." Anal Bioanal Chem **372**(1): 174-80.
- Sharma, R. K., J. H. Wang, et al. (1997). "Mechanisms of inhibition of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase by dihydropyridine calcium antagonists." J Neurochem **69**(2): 845-50.
- Shrestha, S., L. L. Salins, et al. (2002). "Rationally designed fluorescently labeled sulfate-binding protein mutants: evaluation in the development of a sensing system for sulfate." Biotechnol Bioeng **78**(5): 517-26.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Sosa-Peinado, A. and M. Gonzalez-Andrade (2005). "Site-Directed Fluorescence Labeling Reveals Differences on the R-Conformer of Glucosamine 6-Phosphate Deaminase of *Escherichia coli* Induced by Active or Allosteric Site Ligands at Steady State." Biochemistry **44**(46): 15083-92.
- Tama, F. and Y. H. Sanejouand (2001). "Conformational change of proteins arising from normal mode calculations." Protein Eng **14**(1): 1-6.
- Tang, J., Y. Lin, et al. (2001). "Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels." J Biol Chem **276**(24): 21303-10.
- Telmer, P. G. and B. H. Shilton (2003). "Insights into the conformational equilibria of maltose-binding protein by analysis of high affinity mutants." J Biol Chem **278**(36): 34555-67.
- Tian, Y., M. J. Cuneo, et al. (2007). "Structure-based design of robust glucose biosensors using a *Thermotoga maritima* periplasmic glucose-binding protein." Protein Sci **16**(10): 2240-50.

- Tolosa, L., X. Ge, et al. (2003). "Reagentless optical sensing of glutamine using a dual-emitting glutamine-binding protein." *Anal Biochem* **314**(2): 199-205.
- VanScyoc, W. S., R. A. Newman, et al. (2006). "Calcium binding to calmodulin mutants having domain-specific effects on the regulation of ion channels." *Biochemistry* **45**(48): 14311-24.
- Vercillo, N. C., K. J. Herald, et al. (2007). "Analysis of ligand binding to a ribose biosensor using site-directed mutagenesis and fluorescence spectroscopy." *Protein Sci* **16**(3): 362-8.
- Vertessy, B. G., V. Harmat, et al. (1998). "Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies." *Biochemistry* **37**(44): 15300-10.
- Wang, H. and D. R. Storm (2003). "Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system." *Mol Pharmacol* **63**(3): 463-8.
- Watt, S. J., A. Oakley, et al. (2005). "Comparison of negative and positive ion electrospray ionization mass spectra of calmodulin and its complex with trifluoperazine." *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**(15): 2123-30.
- Yamniuk, A. P. and H. J. Vogel (2004). "Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides." *Mol Biotechnol* **27**(1): 33-57.
- Yang, C., G. S. Jas, et al. (2004). "Structure, dynamics and interaction with kinase targets: computer simulations of calmodulin." *Biochim Biophys Acta* **1697**(1-2): 289-300.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, et al. (1999). "Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels." *Nature* **399**(6732): 159-62.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein

Martín González-Andrade^a, Mario Figueroa^b, Rogelio Rodríguez-Sotres^b, Rachel Mata^b, Alejandro Sosa-Peinado^{a,*}

^aFacultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

^bFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2008

Available online 13 January 2009

Keywords:

Calmodulin

Fluorophore-labeled CaM protein

Fluorescence assay

CaM inhibitors

ABSTRACT

This article describes the development of a new fluorescent-engineered human calmodulin, *hCaM* M124C–mBBr, useful in the identification of potential calmodulin (CaM) inhibitors. An *hCaM* mutant containing a unique cysteine residue at position 124 on the protein was expressed, purified, and chemically modified with the fluorophore monobromobimane (mBBr). The fluorophore-labeled protein exhibited stability and functionality to the activation of calmodulin-sensitive cAMP phosphodiesterase (PDE1) similar to wild-type *hCaM*. The *hCaM* M124C–mBBr is highly sensitive to detecting inhibitor interaction given that it showed a quantum efficiency of 0.494, approximately 20 times more than the value for wild-type *hCaM*, and a large spectral change (~80% quenching) when the protein is in the presence of saturating inhibitor concentrations. Two natural products previously shown to act as CaM inhibitors, malbrancheamide (**1**) and tajixanthone hydrate (**2**), and the well-known CaM inhibitor chlorpromazine (**CPZ**) were found to quench the *hCaM* M124C–mBBr fluorescence, and the IC₅₀ values were comparable to those obtained for the wild-type protein. These results support the use of *hCaM* M124C–mBBr as a fluorescence biosensor and a powerful analytical tool in the high-throughput screening demanded by the pharmaceutical and biotechnology industries.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Calmodulin (CaM)¹ is a small Ca²⁺-modulated protein of 148 amino acids (16,706 Da) considered as the primary transducer of Ca²⁺-mediated signals in eukaryotes. It has four motifs called EF hands (each bind a single Ca²⁺ ion) that are composed of two α -helices linked by a 12-residue loop. CaM amino acid sequence is highly conserved in animal and plants, although the latter organisms express several CaM isoforms.

CaM acts on many cellular targets, including soluble enzymes, ion channels, and primary pumps, resulting in a variety of essential downstream cellular effects [1–6]. Accordingly, this protein influences a number of important physiological processes representing

an important drug target [7]. Indeed, many CaM inhibitors are well-known antipsychotic smooth muscle relaxants, antitumoral and α -adrenergic blocking agents, among others. The interaction of CaM with its physiological targets depends on the exposure of two hydrophobic pockets (Fig. 1) following the conformational change elicited by Ca²⁺ binding to the protein.

Many compounds, including drugs, pesticides, and research tools, interact with CaM at the same hydrophobic sites also provoking conformational changes in the protein. Many of these substances behave as CaM antagonists, the best-known structural examples of these interactions are the antipsychotic analogs of trifluoroperazine (TFP) (Fig. 1) [8]. Such interactions can be detected using several analytical methods, including affinity chromatography, ultraviolet (UV), circular dichroism (CD) spectroscopy [9], gel electrophoresis [10,11], nuclear magnetic resonance (NMR) [12,13], X-ray diffraction [8,14–16], functional enzymatic assays [17–19], and fluorescence-based technologies such as fluorescence resonance energy [20–23]. The fluorescence-based methods are highly specific, low cost, selective, and they have rapid reaction time, although sometimes the preparation of the sensing element can be laborious. Among the fluorescence-based methods, the use of site-selective fluorescently labeled CaM has become popular

* Corresponding author. Fax: +52 5 55 623 2419.

E-mail address: asosa@bq.unam.mx (A. Sosa-Peinado).

¹ Abbreviations used: CaM, calmodulin; TFP, trifluoroperazine; UV, ultraviolet; CD, circular dichroism; NMR, nuclear magnetic resonance; *hCaM*, human CaM; mBBr, monobromobimane; *hCaM* M124C–mBBr, *hCaM* labeled with mBBr at position 124; PDE1, calmodulin-sensitive cAMP phosphodiesterase; **1**, malbrancheamide; **2**, tajixanthone hydrate; **CPZ**, chlorpromazine; PCR, polymerase chain reaction; cDNA, complementary DNA; LB, Luria–Bertani; OD, optical density; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DTT, dithiothreitol; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTNB, 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid; TNB, 2-nitrobenzoate; BSA, bovine serum albumin; ACN, acetonitrile; SEM, standard error of the mean.

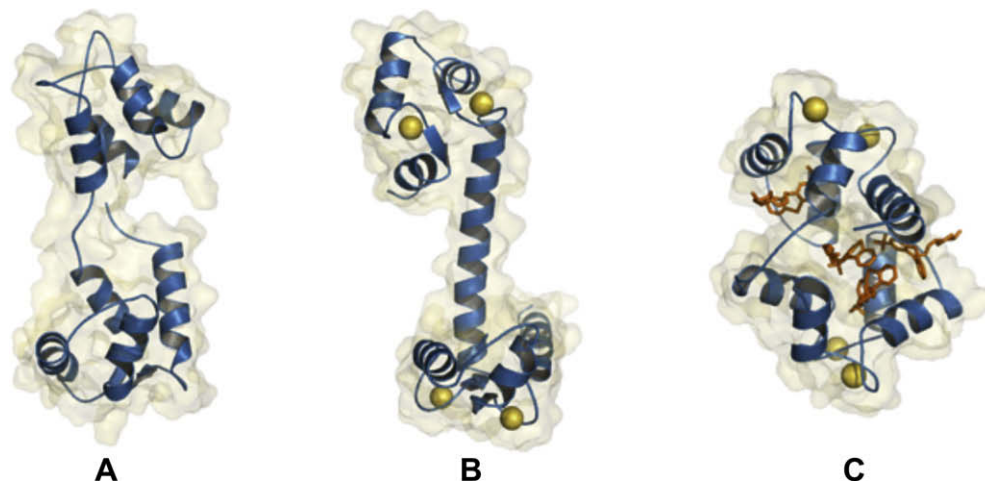


Fig. 1. Three-dimensional structures of CaM in its different conformations: (A) calcium free (Protein Data Bank [PDB] code: 1CFD); (B) with calcium (PDB code: 1CLL); (C) with TFP (PDB code: 1LIN). The structures were drawn using the PyMOL program [38].

recently. In addition, these methods have been demonstrated to be a powerful biosensing system for screening certain classes of drugs such as tricyclic antidepressants [24]. One of the most widely used procedures involves the covalent attachment to CaM of a thiol-reactive fluorophore strategically located using site-directed cysteine mutagenesis. With such a molecular probe, it is possible to correlate the conformational changes with ligand binding by the changes in the emission properties of the labeled proteins.

In previous investigations, it has been determined that the attachment of different fluorophores at the cysteine residue located at position 109 produced better extrinsic fluorescence enhancement on ligand binding [25]. Here we describe the development of a fluorescence-based assay useful for detecting potential CaM inhibitors using a fluorescent human CaM (*hCaM*). The protein was engineered by rational design, replacing Met124 by cysteine using site-directed mutagenesis; the resulting protein, *hCaM* M124C, was purified by hydrophobic exchange chromatography and monobromobimane (mBBr) was attached covalently to Cys124 as fluorescent probe. The fluorophore mBBr was selected because of its high sensitivity. Such sensitivity has been successfully exploited in the elucidation of the secondary structure of T4 lysozyme [26]. The stability and functionality of *hCaM* M124C–mBBr (*hCaM* labeled with mBBr at position 124) were determined by CD measurement and functional enzymatic assay using calmodulin-sensitive cAMP phosphodiesterase (PDE1) as a monitor enzyme. Furthermore, the usefulness of *hCaM* M124C–mBBr was demonstrated by testing the ability of the known CaM inhibitors malbrancheamide (**1**), tajixanthone hydrate (**2**) [27,28], and chlorpromazine (**CPZ**) (Fig. 2) to quench the fluorescence of the engineered protein and to inhibit CaM–PDE1 complex.

Materials and methods

Reagents

CALM1 (human phosphorylase kinase, delta) gene was purchased from Origene Technology (Rockville, MD, USA). pGEM-T Easy Vector System I was purchased from Promega (Madison, WI, USA). pET12b vector was obtained from Novagen (Darmstadt, Germany). Pfu DNA polymerase was purchased from Stratagene (La Jolla, CA, USA). *Nde*I and *Bam*HI were obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Primers for polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis and *Escherichia coli* BL21-AI One Shot were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). mBBr was purchased

from Toronto Chemical Research (Toronto, Canada). All other reagents were of analytical reagent grade and were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Subcloning of gene encoding for *hCaM* and site-directed mutagenesis

CALM1 gene encoding *hCaM* was amplified using PCR from the complementary DNA (cDNA) clone pCMV6-XL5 (Origene Technology) along with the primers (5'-CATATGGCTGATCAGCTGACCG-3' and 5'-CCTAGGAGTAAAACGTCAGTAGT AGAC-3') to insert restriction sites *Nde*I and *Bam*HI at the start and end of the gene. Amplified products were cloned into a vector (pGEM-T Easy Vector System I) and further subcloned into the protein expression vector pET12b Novagen (EMD Chemicals, Darmstadt, Germany). Single amino acid substitutions were generated by overlapping PCR mutagenesis using the Quick Change Kit (Stratagene). All clones and mutations were confirmed by nucleotide sequencing with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). In all cases, the single methionine at position 124 in the wild-type sequences was replaced by cysteine to facilitate conjugation of the reporter group to this thiol. Plasmids were transformed into *E. coli* BL21-AI One Shot following the specifications of the kit's manufacturer.

Protein purification of *hCaM* and the mutant *hCaM* M124C

A single colony of *E. coli* strain BL21-AI/pET12b was grown in Luria-Bertani (LB) medium containing 100 mg/ml of ampicillin overnight with shaking at 37 °C and was inoculated into 500 ml of LB medium containing 100 mg/ml of ampicillin until the optical density (OD) of the culture at 550 nm reached between 0.8 and 1.0. Expression was induced by the addition of L-(+)-arabinose (0.2%, w/v) overnight with shaking at 37 °C. The cells were harvested by centrifugation (10 min, 4000g), resuspended in 50 mM Tris-HCl, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), and 200 mg/ml of egg white lysozyme at pH 7.5 and were chilled on ice for 30 min. Resuspended cells were lysed by sonication, and cellular debris was removed by centrifugation for 15 min at 15,000g. The supernatant was collected, and CaCl₂ and NaCl were added to final concentrations of 5 and 500 mM, respectively. The protein was purified using a Phenyl Sepharose CL-4B chromatographic column. Briefly, the supernatant was applied to the column preequilibrated with 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM CaCl₂, and 500 mM NaCl at pH 7.5. The col-

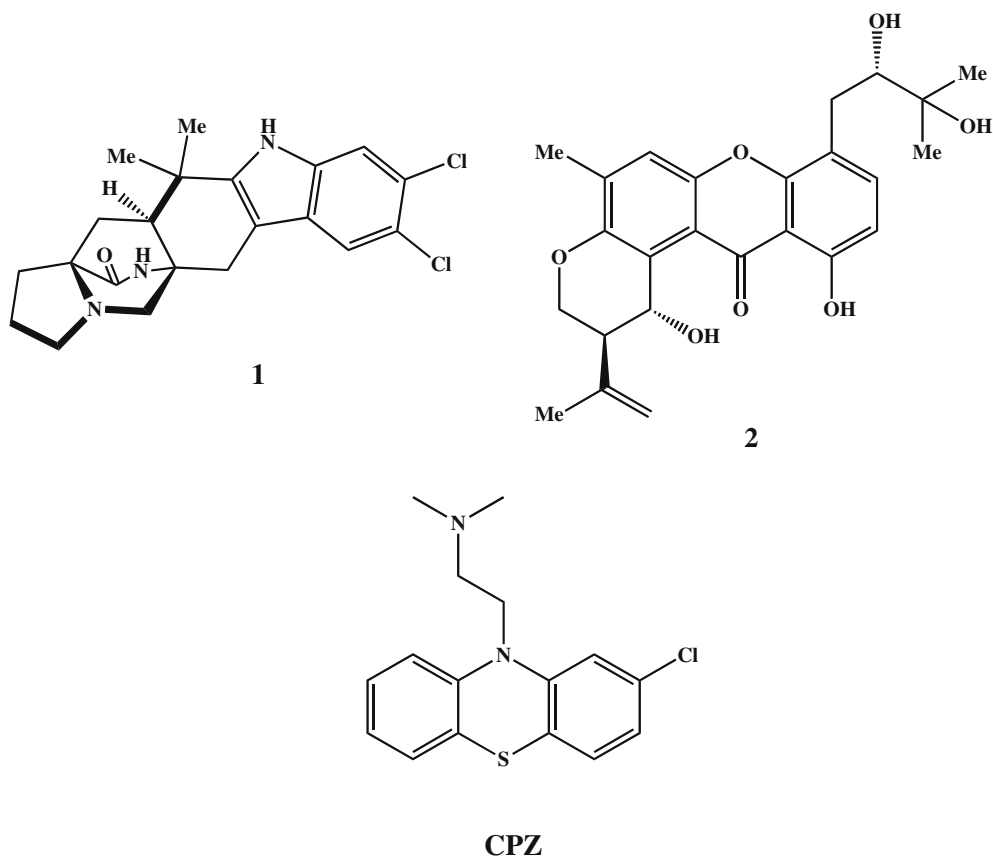


Fig. 2. Structures of compounds **1**, **2**, and **CPZ**. The structures were drawn with ChemBioDraw software (version 11.0, CambridgeSoft, <http://www.cambridgesoft.com>).

umn was washed with loading buffer, followed by the same with 1 mM EDTA and 150 mM NaCl. Finally, the protein was loaded on a cationic exchange column (Source Q, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) at pH 8.8 and was eluted by a linear gradient of 40 min (0–100%) with 500 mM NaCl. Protein was collected in fractions and assessed for purity by gel electrophoresis. All preparations were at least 98% pure by this criterion (Fig. 3).

Chemical modification of unique reactive cysteine of hCaM M124C protein with mBBR

All fluorophore conjugations steps were typically carried out at room temperature. To a protein at a concentration of 5 to 10 mg/ml, 5 mM was added and incubated for 3 h to reduce intramolecular disulfide bonds, and then it was washed on a gel filtration HR-

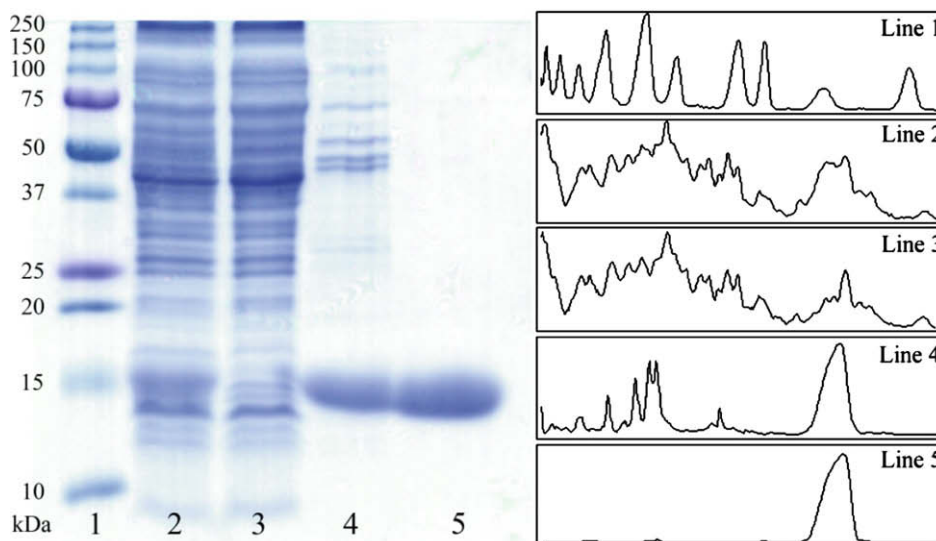


Fig. 3. Purification of hCaM M124C by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and line profiles. Line 1: molecular weight standard proteins; line 2: supernatant of lysate; line 3: fraction nonbound at Phenyl Sepharose CL-4B column; line 4: fraction bound at Phenyl Sepharose CL-4B column; line 5: hCaM after cationic exchange column. The densitometric profiles were obtained using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

100 column (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). A thiol-reactive fluorophore (20% in dimethyl sulfoxide [DMSO]) was added in small aliquots to reach a final concentration of 10 molar excess and DMSO of approximately 5%. Conjugation proceeded in the dark overnight at 4 °C. Separation of protein from unreacted fluorophore was achieved by size exclusion chromatography (Superdex 75). The efficiency of report group attachment was assessed by reactivity of the protein against 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB), measuring the release of 2-nitrobenzoate (TNB). Next, protein concentrations of both wild-type and labeled *hCaM* were determined with the bicinchoninic acid method [29].

Circular dichroism

CD wavelength scans and thermal melting data were recorded on a JASCO J-715 spectropolarimeter under an N₂ atmosphere with an attached thermal Peltier temperature control module. Thermal denaturation of *hCaM* wild-type and *hCaM* M124C-mBBR was monitored at 222 nm with a resolution step of 0.5 °C, a bandwidth of 1.0 nm, and a response time of 16 s. The concentration of protein used was 5 μM in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 5.1). The sample was heated at a rate of 60 °C/h from 20 to 90 °C. Data were analyzed using the spectra manager software (version 1.50.00) supplied with the instrument and using a nonlinear regression analysis to a two-state model with the Origin 7.0 program (Origin-Lab, Northampton, MA, USA):

$$\theta = \frac{(\theta_N + m_N[T]) + (\theta_U + m_U[T])e^{-(\Delta H_m/RT + \Delta H_m/RT_m)}}{1 + e^{-(\Delta H_m/RT + \Delta H_m/RT_m)}}, \quad (1)$$

where θ_N and θ_U represent the molar ellipticity in the native and unfolded states, respectively; m_N and m_U represent the temperature dependence of the molar ellipticity in the native and unfolded states, respectively; T represents temperature (K); R represents ideal gas constant (kcal mol⁻¹ K⁻¹); ΔH represents change in enthalpy (kcal mol⁻¹ K⁻¹); and T_m represents melting temperature (K).

Steady-state fluorescence

All measurements were conducted with an ISS-PC1 spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL, USA) with sample stirring at 37 °C. The protein *hCaM* M124C-mBBR (5 μM) was incubated in buffer (100 mM phosphate [pH 5.1] and 10 mM CaCl₂). Fluorescence emission spectra were acquired with excitation and emission slit widths of 4 and 8 nm, respectively. The excitation wavelength was 381 nm, and emission wavelengths of 420 to 640 nm were measured. The fractional degree of saturated *hCaM* M124C-mBBR with ligand (y) was calculated by changes in fluorescence on ligand binding according to $y = (F - F_0) / (F_\infty - F_0)$, where F_∞ represents the fluorescence intensity at saturation of the ligand, y is plotted as a function of the inhibitor concentration, and the apparent dissociation constants (K_d) were obtained by fitting to Eq. (2):

$$y = \frac{(1 + K_d/P_0 + L_0/P_0) - \sqrt{(1 + K_d/P_0 + L_0/P_0)^2 - 4L_0/P_0}}{2}, \quad (2)$$

where y represents the fractional degree of fluorescence intensity at 470 nm, K_d is the apparent dissociation constant for the ligands, and P_0 and L_0 are the total concentrations of the protein and ligand, respectively. The data were analyzed using the Origin 7.0 program.

hCaM-PDE1 bioassay

hCaM-PDE1 assay was performed in a 96-well plate as described previously [30] with some modifications. Briefly, wild-type *hCaM* or *hCaM* M124C-mBBR (0.08 μg) was incubated with 0.015 units of CaM-deficient/CaM-dependent cAMP phosphodiesterase

from bovine brain for 30 min in 40 μl of assay solution containing 0.063 units of 5'-nucleotidase, 45 mM Tris-HCl, 5.6 mM magnesium acetate, 45 mM imidazole, 2.5 mM calcium chloride, and 10 μM bovine serum albumin (BSA) at pH 7.0. Test compounds were then added to the assay medium at 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 13, 20, 32, 50, and 65 μM in acetonitrile (ACN)/water (1:1), and the samples were incubated for 30 min. After that, 10 μl of 10.8 mM cAMP was added to start the assay. After 15 min, the assay was stopped by the addition of 190 μl of Malachite green solution. The phosphodiesterase reaction was coupled to the 5'-nucleotidase (*Crotalus atrox* venom from Sigma) reaction; the amount of inorganic phosphate released, measured spectrophotometrically at 700 nm, was correlated with the activity of the PDE1. All of the results are expressed as the mean of at least six experiments ± standard error of the mean (SEM). The IC₅₀ values were determined by nonlinear regression analysis performed with the Origin 7.0 program as reported previously [28].

Results and discussion

Design of a suitable site for *hCaM* mutagenesis

The specificity of the interaction of CaM with its molecular targets and its role in the regulation of several biochemical processes make this protein a powerful research tool to explore its physiological role and a target for drug discovery. Therefore, we have specifically labeled a cysteine residue at 124 with mBBR, a sensitive fluorescent probe, to yield a new *hCaM* variant (Fig. 4) following a rational approach with the goal of preserving the structural and functional properties of the native protein. The cysteine residue was introduced exchanging Met124 by site-directed mutagenesis. This position was selected for the following reasons. First, X-ray analyses of cocrystallized CaM-Ca²⁺-TFP complex indicated the participation of 14 side chains in the binding site [25], including Met124; specifically, this position interacts with two molecules of TFP (Fig. 4). Furthermore, when TFP binds to CaM-Ca²⁺, residue Met124 moves from being totally exposed to a buried position near the hydrophobic pocket (Fig. 4). Second, Met124 is located in a relative rigid α-helical region; therefore, disruption in the native fold

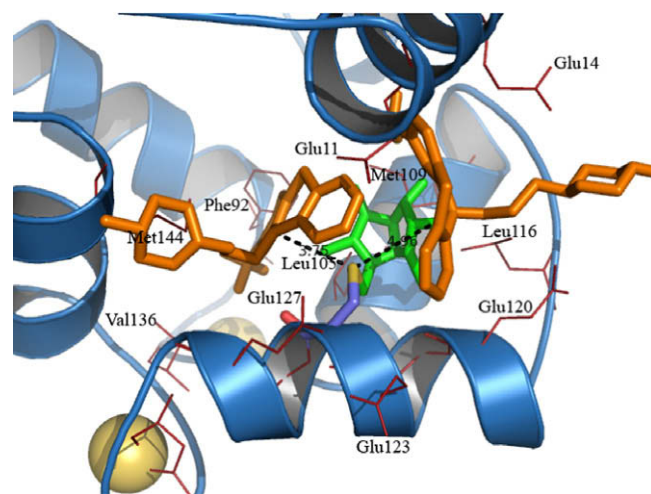


Fig. 4. In silico model of the mutation of cysteine residue and bimane attachment (*hCaM* M124C-mBBR) created using HyperChem software (version 7.5, HyperCube, <http://www.hyper.com>), by a geometric optimization using the AMBER force field, reaching a minimum gradient of 0.01 kcal Å⁻¹ mol⁻¹. Red lines show amino acid of the site binding in the CaM-TFP complex, green sticks show mBBR, orange sticks show TFP, and pale yellow balls show Ca²⁺. Hydrogens are omitted for clarity. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

of the protein for the formation of disulfide-linked aggregates is unlikely. This position also shows a large chemical shift change in the ^1H and ^{13}C NMR spectra when the protein is titrated with the inhibitor W-7 [31]. Therefore, the microenvironment surrounding position 124 is very susceptible to CaM inhibitors. Accordingly, attachment of a fluorophore at this position should report any conformational change on the inhibitor binding. Third, we carried out *in silico* studies of the modified protein using the HyperChem 7.5 program. When the structure was minimized to a 0.09 kcal/mol gradient with the AMBER94 force field, the linear distances from the thiol group of Cys124 (Cys124 SG) to N1 of each TFP molecule present in the Ca^{2+} -CaM-TFP complex were 3.75 and 4.96 Å, respectively. These distances were small enough to allow fluorescent quenching by the inhibitors but large enough to pose no severe steric hindrance on binding of a medium-sized ligand. Fourth, the solvent accessibility of hCaM M124C calculated by the Lee-Richards algorithm implemented in NACCESS 2.1.1 software [32] was 60.5 \AA^2 ; thus, the inclusion of a small fluorophore such as mBBr should not affect its stability [26]. In summary, modification at position 124 was in agreement with previous work described in the literature [26,33].

The hCaM M124C was generated as described in Materials and methods and was chemically modified to give the corresponding hCaM M124C-mBBr.

Stability and functionality of hCaM M124C-mBBr

The folding, stability, and functionality of both the wild-type and mutant hCaM M124C-mBBr were studied by monitoring structural changes in the overall conformation using physical methods [34,35] (far-UV CD) and an enzymatic assay. The percentages of secondary structure elements calculated from the far-UV CD spectra of both wild-type and hCaM M124C-mBBr do not show significant variations (84.27% α -helix and 1.24% β -structure) (Fig. 5A). The T_m values of wild-type hCaM and hCaM M124C-mBBr were 61 and 57 °C, respectively, suggesting thermal stability in both cases (Fig. 5B). The modified protein also displayed a significant activation of the PDE1. The IC_{50} values obtained for CPZ by PDE1 assays are consistent with those reported previously in the literature [9,36,37] (Table 1).

Titration of hCaM M124C-mBBr with compounds 1, 2, and CPZ

The modified protein showed a quantum efficiency of 0.494, approximately 20 times more than the value for wild-type hCaM

Table 1

Experimental IC_{50} values and apparent K_d values of compounds 1, 2, and CPZ determined by PDE1 and fluorescent assays.

Compound	hCaM WT	hCaM M124C-mBBr	
	IC_{50} (μM) ^a	IC_{50} (μM) ^a	K_d (μM) ^b
1	3.65 ± 0.74	3.04 ± 0.11	0.261 ± 0.023
2	5.62 ± 1.25	5.58 ± 0.20	0.033 ± 0.006
CPZ	21.98 ± 1.94	19.20 ± 0.36	1.714 ± 0.184

^a Determined by PDE1 assay.

^b Determined by fluorescent assay.

($\phi = 0.025$). hCaM M124C-mBBr displayed the largest fluorescence response at 470 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 381 \text{ nm}$), thereby avoiding any interference due to UV absorption of most common ligands.

Fig. 6 and Table 1 summarize the concentration-dependent effect of compounds 1, 2, and CPZ on the fluorescence response of hCaM M124C-mBBr. The addition of compound 2 and CPZ quenched the fluorescence of the engineered protein in approximately 84%, whereas compound 1 showed a slightly smaller response (78%). In all cases, the effect correlated with the structural changes of the protein on binding of the inhibitor (Figs. 4 and 6).

The signal changes maximal in fluorescence (470 nm) was plotted versus the inhibitor/protein total ratio, and the fitting curves provided an apparent K_d (see Materials and methods). The K_d of CPZ was similar to that reported previously for antagonists of the CaM [40]. The IC_{50} values calculated for CPZ, 1, and 2 were consistent with those previously reported [9,27,36] and those found in the current study with native hCaM (Table 1), providing an important evidence of the specificity of hCaM M124C-mBBr.

Conclusions

A new fluorescent-engineered hCaM, hCaM M124C-mBBr, has been designed by a combination of site-directed mutagenesis and covalent attachment of a fluorophore probe. The protein is stable and functional for activation of PDE1 and shows promise for detecting new CaM inhibitors in a reliable, quick, and sensitive manner. The fluorophore-labeled protein detects classic CaM inhibitors such as CPZ and was used strategically for reevaluating two natural products. Its efficacy was demonstrated by means of a functional enzymatic assay and by fluorescence spectroscopy. Finally, hCaM M124C-mBBr can be used as an important tool for identifying new CaM inhibitors that will be useful as potential

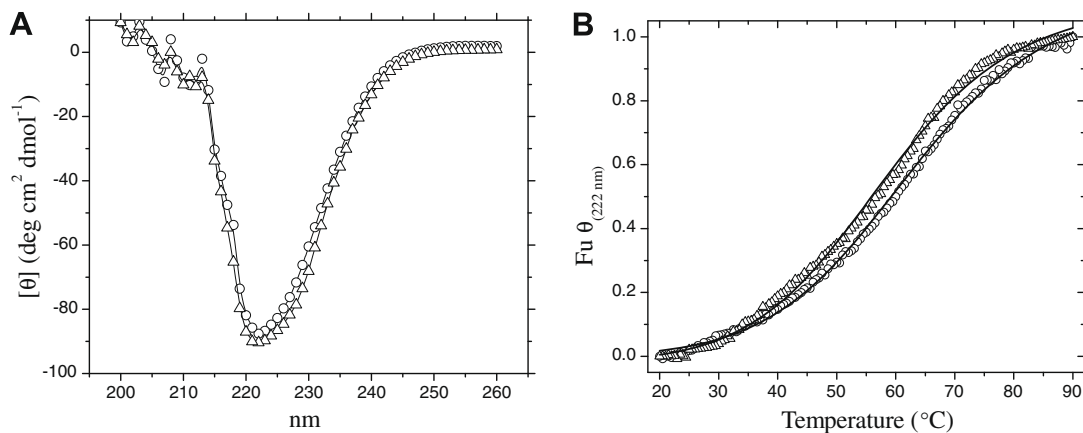


Fig. 5. Far-UV CD spectra (A) and molar ellipticity at 222 nm (B) for Apo-hCaM WT (○) and hCaM M124C-mBBr (Δ). The secondary structures in the presence of Ca^{2+} were determined from CD spectra using K2D2 program [39]. Thermal denaturation for both proteins were monitored by the changes in molar ellipticity as a function of the temperature, from 20 to 90 °C. The buffer was 100 mM sodium phosphate (pH 5.1). The solid lines are the best fits using Eq. (1) (see Materials and methods).

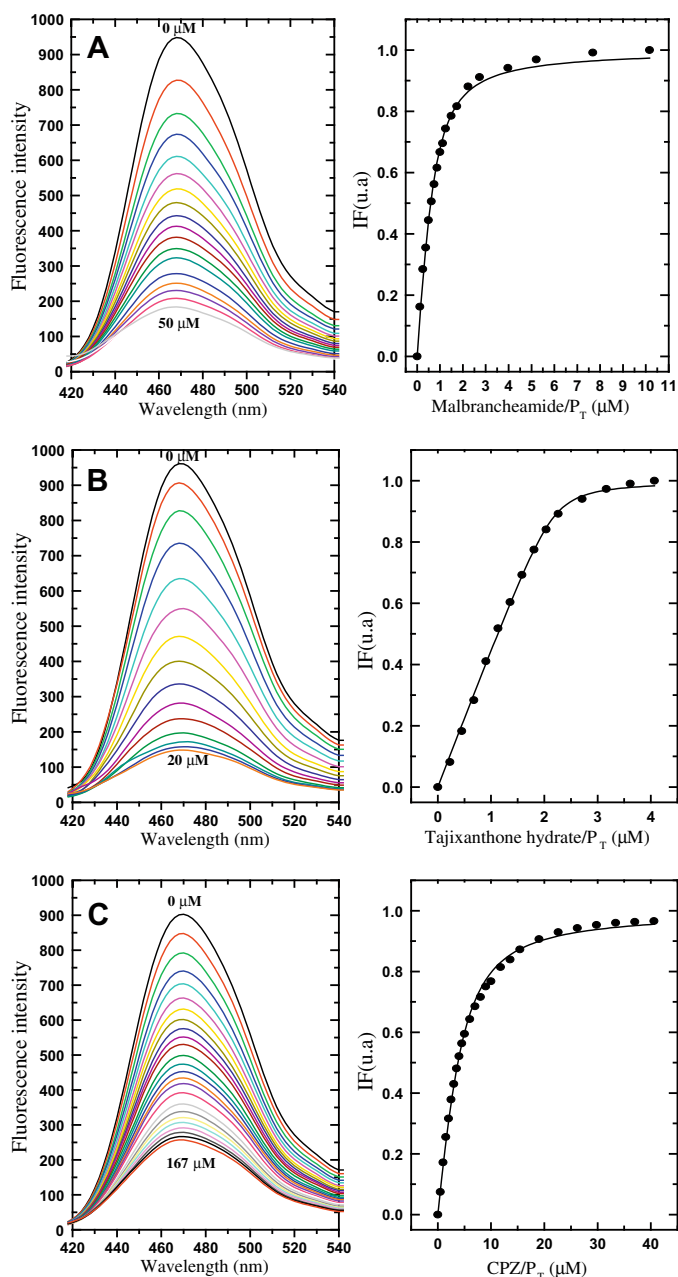


Fig. 6. Titration by fluorescence of engineered *hCaM* with compounds **1** (A), **2** (B), and **CPZ** (C) (left panels). Buffer was 5 mM KAc (pH 5.1) at 37 °C and 1 mM CaCl₂, and excitation was at 381 nm. The absolute changes of fluorescence emission at 470 nm ($\Delta\Delta\text{IF}$) were plotted against the ratio inhibitor/protein and fitted to the binding equation model to obtain the fractional degree of saturated *hCaM* M124C-mBBr (right panels).

drugs or pesticides. Another possibility not tested in this work is to use *hCaM* M124C-mBBr to detect new potential protein–protein interactions given that this protein conserved functionality to interact with PDE1.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, IN216207) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 53633 and 41328Q). The technical assistance of Isabel Rivero-Cruz is also recognized. M.G.A. acknowledges a fellowship for Ph.D. studies from CONACyT.

References

- [1] E. Carafoli, C.B. Klee, Calcium as a Cellular Regulator, Oxford University Press, New York, 1999.
- [2] M. Zhang, T. Yuan, Molecular mechanisms of calmodulin's functional versatility, *Biochem. Cell Biol.* 76 (1998) 313–323.
- [3] H. Weinstein, E.L. Mehler, Ca²⁺-binding and structural dynamics in the functions of calmodulin, *Annu. Rev. Physiol.* 56 (1994) 213–236.
- [4] R.E. Zielinski, Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 697–725.
- [5] K.T. O'Neil, W.F. DeGrado, How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices, *Trends Biochem. Sci.* 15 (1990) 59–64.
- [6] M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis, and remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 517–529.
- [7] R. Dagher, C. Pigault, D. Bonnet, D. Boeglin, C. Pourbaix, M.C. Kilhoffer, P. Villa, C.G. Wermuth, M. Hibert, J. Haiech, Use of a fluorescent polarization based high throughput assay to identify new calmodulin ligands, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 1250–1255.
- [8] B.G. Vertessy, V. Harmat, Z. Bocskei, G. Naray-Szabo, F. Orosz, J. Ovadi, Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies, *Biochemistry* 37 (1998) 15300–15310.
- [9] S. Martínez-Luis, A. Perez-Vasquez, R. Mata, Natural products with calmodulin inhibitor properties, *Phytochemistry* 68 (2007) 1882–1903.
- [10] M. Charpentreau, K. Jaworski, B.C. Ramirez, A. Tretyan, R. Ranjeva, B. Ranty, A receptor-like kinase from *Arabidopsis thaliana* is a calmodulin-binding protein, *Biochem. J.* 379 (2004) 841–848.
- [11] B. Liao, M.C. Gawienowski, R.E. Zielinski, Differential stimulation of NAD kinase and binding of peptide substrates by wild-type and mutant plant calmodulin isoforms, *Arch. Biochem. Biophys.* 327 (1996) 53–60.
- [12] J.J. Chou, S. Li, A. Bax, Study of conformational rearrangement and refinement of structural homology models by the use of heteronuclear dipolar couplings, *J. Biomol. NMR* 18 (2000) 217–227.
- [13] D.J. Lalor, T. Schnyder, V. Saridakis, D.E. Pilloff, A. Dong, H. Tang, T.S. Leyh, E.F. Pai, Structural and functional analysis of a truncated form of *Saccharomyces cerevisiae* ATP sulfurylase: C-terminal domain essential for oligomer formation but not for activity, *Protein Eng.* 16 (2003) 1071–1079.
- [14] R. Chattopadhyaya, W.E. Meador, A.R. Means, F.A. Quijcho, Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 228 (1992) 1177–1192.
- [15] H. Kuboniwa, T. Tjandra, S. Grzesiek, H. Ren, C.B. Klee, A. Bax, Solution structure of calcium-free calmodulin, *Nat. Struct. Biol.* 2 (1995) 768–776.
- [16] T. Okubo, S. Okada, Kinetic analyses of colloidal crystallization in alcoholic organic solvents and their aqueous mixtures as studied by reflection spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 204 (1998) 198–204.
- [17] S.P. Chock, C.Y. Huang, An optimized continuous assay for cAMP phosphodiesterase and calmodulin, *Anal. Biochem.* 138 (1984) 34–43.
- [18] A.C. Harmon, H.W. Jarrett, M.J. Cormier, An enzymatic assay for calmodulins based on plant NAD kinase activity, *Anal. Biochem.* 141 (1984) 168–178.
- [19] R.K. Sharma, J.H. Wang, Preparation and assay of the Ca²⁺-dependent modulator protein, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10 (1979) 187–198.
- [20] M.W. Allen, R.J. Urbauer, A. Zaidi, T.D. Williams, J.L. Urbauer, C.K. Johnson, Fluorescence labeling, purification, and immobilization of a double cysteine mutant calmodulin fusion protein for single-molecule experiments, *Anal. Biochem.* 325 (2004) 273–284.
- [21] B. Sharma, S.K. Deo, L.G. Bachas, S. Daunert, Competitive binding assay using fluorescence resonance energy transfer for the identification of calmodulin antagonists, *Bioconj. Chem.* 16 (2005) 1257–1263.
- [22] E. Dikici, S.K. Deo, S. Daunert, A whole-cell assay for the high throughput screening of calmodulin antagonists, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2073–2079.
- [23] J.P. Gangopadhyay, Z. Grabarek, N. Ikemoto, Fluorescence probe study of Ca²⁺-dependent interactions of calmodulin with calmodulin-binding peptides of the ryanodine receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323 (2004) 760–768.
- [24] P.M. Douglass, L.L. Salins, E. Dikici, S. Daunert, Class-selective drug detection: fluorescently-labeled calmodulin as the biorecognition element for phenothiazines and tricyclic antidepressants, *Bioconj. Chem.* 13 (2002) 1186–1192.
- [25] L.C. Vesna Schauer-Vukasinovic, S. Daunert, Rational design of a calcium sensing system based on induced conformational change of calmodulin, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 11102–11103.
- [26] S.E. Mansoor, H.S. McHaourab, D.L. Farrens, Determination of protein secondary structure and solvent accessibility using site-directed fluorescence labeling: studies of T4 lysozyme using the fluorescent probe monobromobimane, *Biochemistry* 38 (1999) 16383–16393.
- [27] M. Figueroa, M.C. González, R. Rodríguez-Sotres, A. Sosa-Peinado, M. González-Andrade, C.M. Cerda-García-Rojas, R. Mata, Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp., *Bioorg. Med. Chem.* (in press), doi:10.1016/j.bmc.2008.10.079.
- [28] S. Martínez-Luis, L. Acevedo, M.C. González, R. Rodríguez-Sotres, A. Lira-Rocha, R. Mata, Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*, *Tetrahedron* 62 (2006) 1817–1822.
- [29] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.

- [30] B. Rivero-Cruz, I. Rivero-Cruz, R. Rodríguez-Sotres, R. Mata, Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin, *Phytochemistry* 68 (2007) 1147–1155.
- [31] M. Osawa, M.B. Swindells, J. Tanikawa, T. Tanaka, T. Mase, T. Furuya, M. Ikura, Solution structure of calmodulin–W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition, *J. Mol. Biol.* 276 (1998) 165–176.
- [32] B. Lee, F.M. Richards, The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 379–400.
- [33] R.M. de Lorimier, J.J. Smith, M.A. Dwyer, L.L. Looger, K.M. Sali, C.D. Paavola, S.S. Rizk, S. Sadigov, D.W. Conrad, L. Loew, H.W. Hellinga, Construction of a fluorescent biosensor family, *Protein Sci.* 11 (2002) 2655–2675.
- [34] R.R. Biekofsky, S.R. Martin, J.E. McCormick, L. Masino, S. Fefeu, P.M. Bayley, J. Feeney, Thermal stability of calmodulin and mutants studied by ^1H – ^{15}N HSQC NMR measurements of selectively labeled $[^{15}\text{N}]$ Ile proteins, *Biochemistry* 41 (2002) 6850–6859.
- [35] L. Masino, S.R. Martin, P.M. Bayley, Ligand binding and thermodynamic stability of a multidomain protein, calmodulin, *Protein Sci.* 9 (2000) 1519–1529.
- [36] S.Z. Khan, C.L. Longland, F. Michelangeli, The effects of phenothiazines and other calmodulin antagonists on the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1797–1806.
- [37] M. Figueroa, M.C. González, R. Mata, Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*, *Nat. Prod. Res.* 22 (2008) 709–714.
- [38] J.D. Johnson, L.A. Wittenauer, A fluorescent calmodulin that reports the binding of hydrophobic inhibitory ligands, *Biochem. J.* 211 (1983) 473–479.
- [39] W.L. DeLano, Use of PYMOL as a communications tool for molecular science, *Abstracts Papers Am. Chem. Soc.* 228 (2004) U313–U314.
- [40] M.A. Andrade, P. Chacon, J.J. Merelo, F. Moran, Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network, *Protein Eng.* 6 (1993) 383–390.