



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“Estructura de proteínas fotoactivables”

PRESENTA

Christian Jovanny Valencia Guzmán

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

Comité Tutorial:

Tutor: Dr. Rogelio Arellano Ostúa

Dr. Michael Conrad Jeziorski
Instituto de Neurobiología
UNAM

Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández
Instituto de Neurobiología
UNAM

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova
Instituto de Neurobiología
UNAM

Dr. Gerardo Rojas Piloni
Instituto de Neurobiología
UNAM

INB-UNAM, Campus Juriquilla

Querétaro, Septiembre de 2015



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.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. GENERALIDADES DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES	4
2. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES	8
3. CROMÓFORO Y SUS VARIANTES	13
4. MECANISMO DE FOTOCAMBIO REVERSIBLE	17
– Mecanismo en PSFP negativas	17
– Mecanismo en PSFP positivas	26
5. USOS Y APLICACIONES DE PROTEÍNAS FOTOTRANSFORMABLES	31
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44

RESUMEN

El conocimiento de los procesos intracelulares ha tenido un avance vertiginoso a partir del desarrollo de las técnicas de biología molecular. Gran parte de estos avances ha sido debido al descubrimiento y aplicación de las proteínas fluorescentes como indicadores de los procesos que ocurren al interior de la célula. Sin embargo, a diferencia de los primeros años en que se contaba con pocas opciones, hoy en día se cuenta con una variedad enorme de proteínas fluorescentes con características de emisión únicas. Entre esta gran variedad destacan las proteínas fototransformables (FTP) que son capaces de presentar cambios de emisión en respuesta a la luz. Las FTP pueden subdividirse en fotoactivables (PAFP), fotoconvertibles (PCFP) y fotocambiables (PSFP) que las hacen ideales para su utilización en métodos modernos de rastreo molecular. En este trabajo describiré las características estructurales de éstas proteínas así como los principios básicos de sus mecanismos de activación y algunas de las aplicaciones que han tenido en la actualidad.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las proteínas fluorescentes se han vuelto herramientas indispensables para el estudio de los procesos intracelulares. Parte de su éxito es debido a la posibilidad de contar con variantes que exhiben colores muy diversos (Duan et al., 2014).

Las proteínas fluorescentes y sus homólogos no fluorescentes pueden ser encontrados en una gran variedad de organismos acuáticos como corales, medusas o crustáceos (Dedecker et al., 2013). La presencia de estas proteínas en especies separadas filogenéticamente, indica que surgieron muy temprano en la evolución. Ésta proteína ancestral divergió en dos superfamilias que comparten similitudes estructurales pero que han cambiado radicalmente en cuanto a su función (Chudakov et al., 2010). En una de estas dos superfamilias se encuentran las proteínas con propiedades estructurales y funcionales similares a la proteína verde fluorescente (GFP). En la segunda superfamilia encontramos a los dominios G2F, que son estructuralmente similares a las proteínas fluorescentes, pero carecen de cromóforo funcional (Dedecker et al., 2013).

Las proteínas fluorescentes tienen un peso molecular de alrededor de 30 kDa plegados en 11 láminas beta anti-paralelas y una estructura en forma de barril (Remington, 2011; Chudakov et al., 2010; Duan y et al., 2014). Al centro del barril, una hélice alfa contiene el cromóforo, una estructura policíclica formada por un proceso de ciclación de los aminoácidos 65-67 en GFP o su equivalente en otras proteínas fluorescentes (Dedecker et al., 2013; Shcherbakova y Verkhusha, 2014).

La modificación sistemática de las proteínas fluorescentes así como el hallazgo de novedosas proteínas fluorescentes en corales y otros organismos han incrementado el número de proteínas con características fluorescentes pero cuyos mecanismos difieren significativamente (Chudakov et al., 2010). Tal es el caso de las proteínas fototransformables (PTFP) que se definen como aquellas que

exhiben cambios en sus propiedades espectrales en respuesta a la luz (Adam y et al., 2014). Esto ha complicado su clasificación debido a que a la fecha no existe un consenso en la categorización de proteínas fluorescentes uniforme.

A pesar de que la clasificación general de las PTFP se encuentra aún en ciernes se han hecho esfuerzos por lograrlo. Así, uno de esos esfuerzos clasifica a las PTFP en proteínas fluorescentes fotoconvertibles (PCFP), proteínas fluorescentes fotoactivables (PAFP) y proteínas fluorescentes fotocambiables (PSFP). Mientras que las dos primeras involucran en su mecanismo de activación, modificaciones irreversibles en los enlaces covalentes del cromóforo en respuesta a la luz, las PSFP modifican reversiblemente sus características espectrales de emisión, en respuesta a la luz por modificaciones de las interacciones no covalentes del cromóforo con aminoácidos vecinos o entre los aminoácidos cercanos al cromóforo (Chudakov et al., 2010; Zhou y Lin 2013; Adam y et al., 2014; Duan y et al., 2014).

Un ejemplo de las discrepancias entre la clasificación de las proteínas fluorescentes es el caso de Dronpa, una proteína fluorescente que en repetidas ocasiones ha sido considerada como PAFP aun cuando sus características de activación la ubican de manera inequívoca como PSFP (Adam y et al., 2014; Duan y et al., 2014).

En este manuscrito describiré las características generales de las proteínas fluorescentes haciendo hincapié en los mecanismos de activación de las PSFP, y sus aplicaciones.

1. GENERALIDADES DE PROTEINAS FLUORESCENTES

Desde que se aisló por primera vez la proteína verde fluorescente (GFP) en el año de 1962 tuvieron que pasar cerca de 30 años hasta que en 1992 se describió la clonación de GFP y no pasó mucho tiempo para que en 1994 se realizara la primera expresión de GFP en un sistema heterólogo (Remington, 2011; Chudakov et al., 2010). Desde entonces GFP y sus variantes han sido utilizadas en una gran variedad de aplicaciones para estudiar la organización y funcionamiento intracelular (Remington, 2011; Dedecker et al., 2013). La utilidad de GFP y proteínas similares recae en su capacidad de emitir fluorescencia, además de que pueden ser expresadas sin necesidad de cofactores o chaperonas (Dedecker et al., 2013).

Desde entonces, se han explotado al máximo sus propiedades tanto para cuestiones recreativas (como peces de inusuales colores) como para el marcaje y rastreo de moléculas organelos o células. Estas proteínas pueden emitir luz como consecuencia de la absorción de fotones de luz a longitudes de onda específicas (Chudakov et al., 2010; Dedecker et al., 2013). En diferentes especies de antozoos sin características fluorescentes, se pueden encontrar proteínas y cromoproteínas con secuencias o estructuras similares a GFP (Chudakov et al., 2010). Más aún, se han encontrado proteínas similares en especies distantes como crustáceos, medusas, e incluso cordados (Dedecker et al., 2013).

Aparentemente todas las proteínas fluorescentes encontradas en medusas, corales o crustáceos comparten un ancestro en común que debió surgir muy temprano en la evolución de los organismos multicelulares (Chudakov et al., 2010). El gen de esta proteína ancestral posteriormente divergió en dos superfamilias de proteínas con plegamientos estructurales similares a GFP (Figura 1). La primera familia está constituida por los dominios G2F que se encuentran en la matriz extracelular de una gran cantidad de organismos y que conservan alta similitud estructural con las proteínas fluorescentes aunque carecen del cromóforo característico (Chudakov et al., 2010; Dedecker et al., 2013).

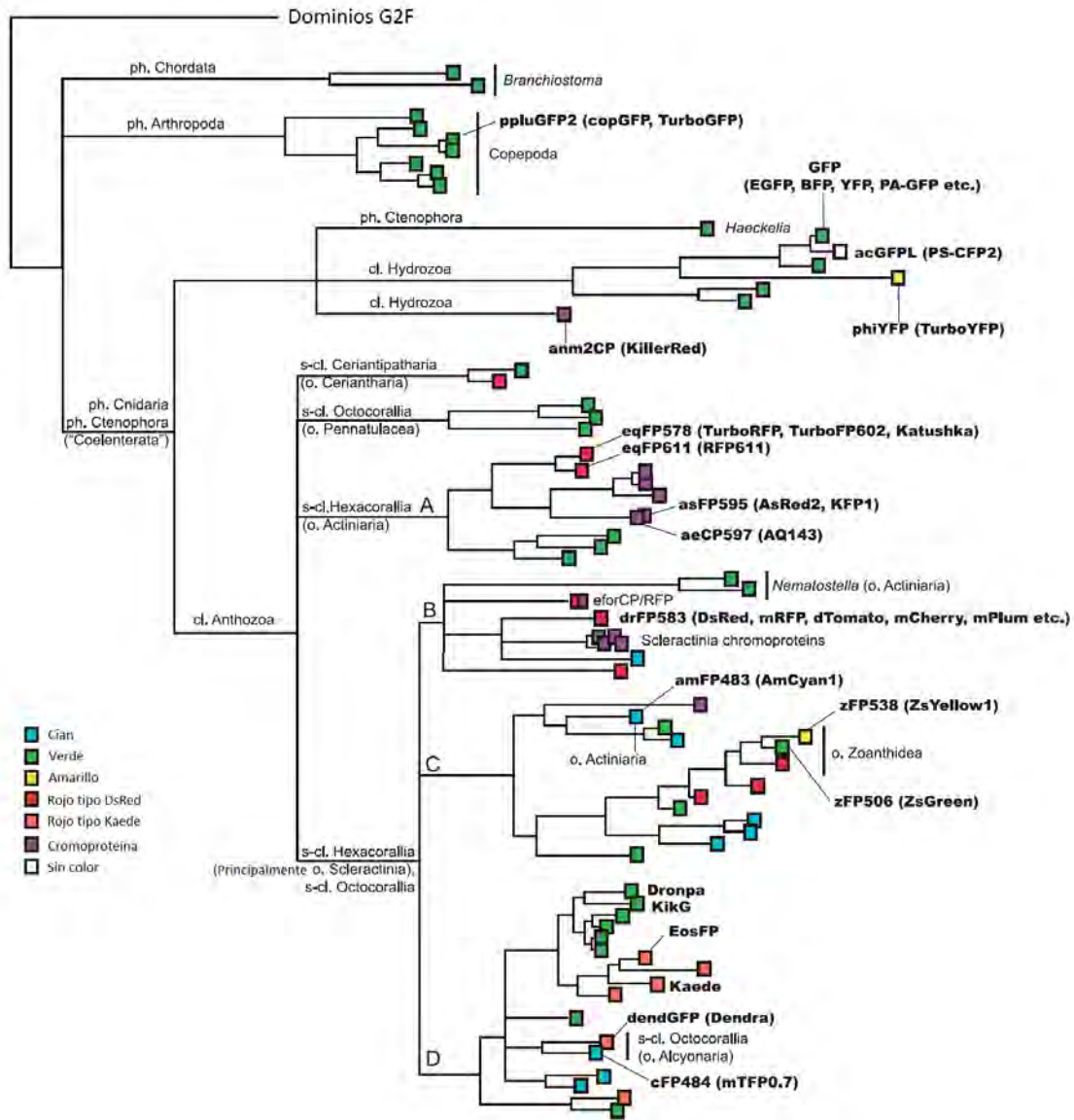


Figura 1. Árbol filogenético representativo de las proteínas fluorescentes en los filos Chordata, Arthropoda, Anthozoa y Ctenophora. Los diferentes colores que emiten las proteínas fluorescentes no son exclusivos de algún filo particular sino que se repiten de manera más o menos constante en cada una de ellas sugiriendo que todas ellas proceden de un ancestro en común. Punto y aparte es el caso de los dominios G2F que son estructuralmente muy similares a las proteínas fluorescentes pero carecen de cromóforo (Chudakov et al., 2010).

En la otra superfamilia se encuentran las proteínas que poseen cromóforo e incluyen a proteínas fluorescentes y cromoproteínas. Estas proteínas han sido encontradas en los filos Chordata (anfioxos), Arthropoda (copépodos), Anthozoa (corales, anemonas) y Ctenophora (medusas) (Dedecker et al., 2013; Ong et al 2011).

Una pregunta que puede formularse en torno a las proteínas fluorescentes es ¿para qué le sirve al organismo poseer una proteína con propiedades fluorescentes? Se ha propuesto que puede ser empleada con propósitos de comunicación (con miembros de un mismo grupo, atraer a la presa o repeler a sus depredadores), conversión de una parte del espectro visible en longitudes de onda más aptas para la fotosíntesis, fotoprotección, como agentes fotoquímicos e inclusive se han propuesto propiedades antioxidantes, inmunitarias y fotosensitivas (Chudakov et al., 2010; Ong et al 2011; Dedecker et al., 2013).

La estructura de GFP así como de las proteínas fluorescentes y cromoproteínas de la familia GFP consisten en una sola cadena polipeptídica de 220-240 aminoácidos (aproximadamente 25-30 kDa) que está ordenado en un barril beta plegado por 11 láminas beta acomodadas en una hélice distorsionada de manera similar al de una lata con una hélice distorsionada (Figura 2) (Chudakov et al., 2010; Duan y et al., 2014). Una serie de segmentos helicoidales cortos y distorsionados encapsulan los extremos del barril. Las dimensiones de la estructura completa es similar a un cilindro de 24 Å de diámetro por 42 Å de altura (Remington, 2011).

La hélice alfa central del cromóforo contiene tres aminoácidos que han sido ciclados para formar el cromóforo. Este cromóforo está formado por una modificación postraduccional única, formada por tres residuos de aminoácidos de la hélice central, modificados en las posiciones 65-67 (numeración acorde a GFP) y corresponden invariablemente al tripéptido XZG en donde X es un residuo variable, Z es un aminoácido aromático (normalmente tirosina) y G que representa al aminoácido glicina que se encuentra altamente conservada entre todas las proteínas fluorescentes (Shcherbakova y Verkhusha, 2014; Duan et al., 2014).

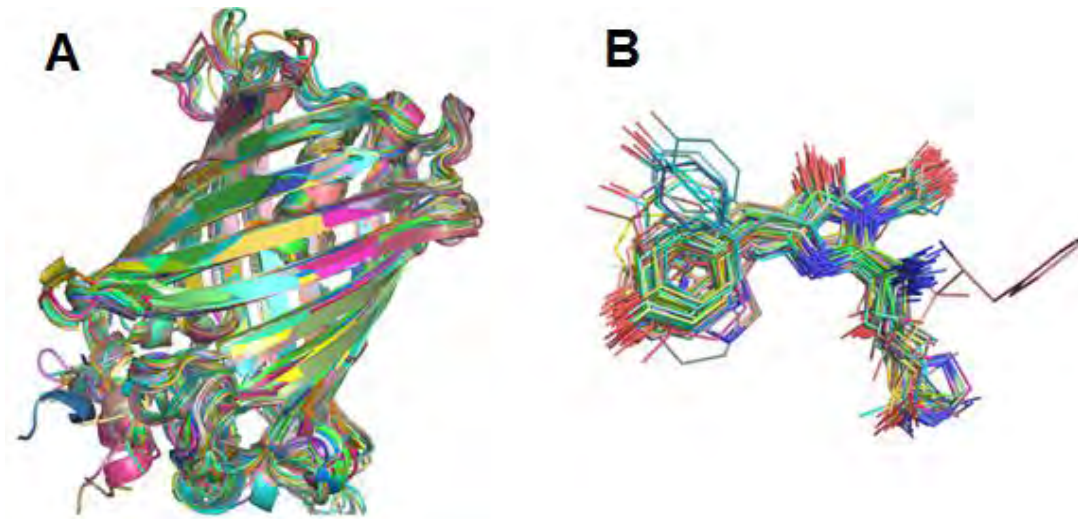


Figura 2. A) Alineamiento de 202 estructuras cristalinas de diferentes proteínas fluorescentes. Se observa la alta similitud estructural existente entre las diferentes proteínas fluorescentes. En cualquier caso, están formadas por una sola cadena polipeptídica de 220-240 aminoácidos estructurados en 11 láminas beta plegadas con un cromóforo central en un estructura cilíndrica. B) el cromóforo está formado por una estructura heterocíclica denominada p-hidroxibencilideno-5-imidazolinona (pHBI) de cuya conformación (entre otras cosas) dependen las características espectrales de la proteína (Dedecker et al., 2013).

La estructura del barril beta de las proteínas fluorescentes es estabilizada por múltiples interacciones no covalentes, que es altamente resistente a la desnaturalización térmica, química o proteolítica. Una función primaria de la estructura de barril beta en proteínas fluorescentes es proteger al cromóforo y evitar el contacto con el medio circundante (Chudakov et al., 2010). De esta manera la energía de excitación se disipa en forma de luz, evitando la generación de procesos no radiantes (Remington, 2011).

Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado evidencia que indica que moléculas pequeñas, como oxígeno, etilenglicol o agua pueden llegar a entrar en contacto con el cromóforo (Duan et al., 2014; Regmi et al., 2013) y que pueden ser importantes en procesos específicos de la funcionalidad de proteínas fototransformables (Grigorenko et al., 2015). Más aún, se ha encontrado evidencia

que sugiere que la conformación global de la proteína contribuye a las propiedades espectroscópicas de las proteínas fluorescentes, indicando que cromóforo y matriz protéica deben considerarse como un todo sin descartar las contribuciones del barril beta (Dedecker et al., 2013).

2. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES

Durante las últimas décadas, el desarrollo de métodos que permiten marcar células y moléculas ha contribuido al avance de la investigación de los procesos intracelulares (Shcherbakova y Verkhusha, 2014). De entre los métodos que más importancia han tenido en el seguimiento espacio-temporal de estos procesos, se encuentran aquellos relacionados con el uso de las proteínas fluorescentes (Gayda et al., 2012).

Las proteínas fluorescentes han sido manipuladas experimentalmente por lo que han tenido una constante evolución. Esto les ha permitido contar con propiedades mejoradas como luminosidad, brillo, color, y activación que no necesariamente se encuentran en sus fuentes naturales (Chudakov et al., 2010; Dedecker et al., 2013). Por ejemplo, la inclusión de aminoácidos aromáticos para reemplazar la tirosina central del cromóforo, genera proteínas con propiedades de emisión color cian o azul (Dedecker et al., 2013).

En los últimos años, se han desarrollado proteínas fluorescentes con propiedades espectrales diferentes en respuesta a la irradiación de luz de longitudes de onda específica proporcionándoles sus propiedades de fluorescencia específicas, la cual puede o no, ser reversible (Remington, 2011; Gayda et al., 2012). Las proteínas silvestres son modificadas mediante procesos de mutagénesis dirigida y/o aleatoria (Remington, 2011). Las modificaciones generadas pueden tener efectos dramáticos en los mecanismos de activación, absorción fotorresistencia o darles características para unirse a moléculas o iones (H^+ , SH_2 , ONO_2^- , Cu^{++} , Ca^{++} , H_2O_2 , $NAD^+/NADH$, ATP/ADP) por modificación de aminoácidos vecinos o incluso, por modificaciones del cromóforo con aminoácidos

sintéticos (Enterina et al., 2015; Péterffy, 2015; Mishin et al., 2015; Duan et al., 2015). En la Figura 3 se muestran algunas de las proteínas fluorescentes desarrolladas así como las proteínas fluorescentes silvestres y el organismo del cual proceden.

Especie	Convencional	PAFP	PCFP	PSFP
<i>Aequoria victoria</i>	E2GFP YFP YFP10C EYFP Citrine GFP EGFP	mApple PAGFP		Dreiklang rsEGFP rsEGFP2 Mut2Q
<i>Clavuliana sp.</i>	cFP484 CFP			mTFP
<i>Discosoma sp.</i>		DsRed mCherry		rsCherry rsCherryRev
<i>E. quadricolor</i>	eqFP578	TagRFP Kaede		rsTagRFP
<i>Trachyphyllia geoffroyi</i>				
<i>Dendronephytia sp.</i>	DendGFP		Dendra Dendra2 IrisFP IrisFP miniFP	
<i>Lobophyllia hemprichii</i>			EosFP mEosFP mEos2 mEos C mEos S mEos M	
<i>Anemonia sulcata</i>				asFP595 KFP
<i>Echinophyllia sp.</i>	22G			PDM1-4 Dronpa-2 Dronpa-3 rs-Fastlime Padron bs-Dronpa

Figura 3. Evolución artificial de las proteínas fluorescentes. Prácticamente ninguna de las proteínas fluorescentes utilizadas hoy en día corresponde a la proteína silvestre, inclusive la forma silvestre de GFP ha sido modificada para exhibir sus propiedades fluorescentes características. En la primera columna se muestran las especies de las cuales han sido aisladas las proteínas fluorescentes, en la segunda columna se señala la forma silvestre aislada y en el resto de las columnas se muestran las proteínas desarrolladas a partir de las formas silvestres. Se señalan sus mecanismos de fototransformación (si los tienen) en cada columna, los colores indican el color de emisión de fluorescencia que presentan. Convencional = Fluorescencia clásica sin fototransformación de emisión; PAFP = Proteína fluorescente fotoactivable; PCFP = Proteína fluorescente fotoconvertible; PSFP = Proteína fluorescente fotocambiable.

A pesar de los avances en el conocimiento de las proteínas fluorescentes no existe una nomenclatura uniforme. En una revisión de 2013 los autores reconocen que no existe claridad en cuanto a la clasificación de las proteínas fluorescentes por lo que diferentes términos son asignados a los mismos significados (Dedecker et al., 2013). Mucho menos en el año 2010 las proteínas

fluorescentes contaban con una clasificación estandarizada que permitiera agruparlas de acuerdo a sus propiedades de fluorescencia. Así Dronpa, asFP595 y rs Cherry proteínas que actualmente son consideradas fotocambiables (PSFP) eran agrupadas como proteínas fotoactivables (PAFP) al igual que PAGFP, mEos2, Kaede o Dendra que hoy en día realmente son consideradas proteínas fotoactivables, la última (Dendra) de hecho es considerada fotoconvertible (PCFP) (Chudakov et al., 2010). Más aun, el término “Proteínas Fluorescentes Fotoactivables” (PAFP) y “Proteínas reversiblemente activables” (PSFP) eran considerados a menudo como sinónimos.

Actualmente se han re-clasificado algunas proteínas fluorescentes de acuerdo a sus propiedades. Las proteínas con la cualidad de cambiar sus respuestas espectrales a longitudes de onda específicas reciben el nombre genérico de proteínas fluorescentes fototransformables (FTP) (Lukianov 2010; Zhou y Lin 2013; Adam y et al., 2014; Duan y et al., 2014).

Las FTP son aquellas proteínas fluorescentes de estructuras similares a GFP, que presentan cambios estructurales, y de emisión en respuesta a la estimulación con luz de longitudes de onda específicas (Adam et al., 2014; Duan et al., 2014). Las FTP pueden ser clasificadas como: proteínas fluorescentes fotoactivables, (PAFP), proteínas fluorescentes fotoconvertibles (PCFP) y proteínas fluorescentes reversiblemente fotocambiables (PSFP) también conocidas como proteínas reversiblemente activables (RSFP) (Gayda et al., 2012; Zhou y Lin 2013; Adam et al., 2014; Duan et al., 2014). La clasificación general de la FTP así como sus características principales se describen en la Figura 4.

Las PAFP y PCFP tienen la cualidad de presentar procesos de activación irreversible por modificación covalente del cromóforo (Figura 4). (Zhou y Lin 2013; Adam et al., 2014; Duan et al., 2014), es decir, solo pueden fotoactivarse una sola vez, por lo que una vez encendidas, ya no pueden apagarse en tanto se mantenga la irradiación con luz de excitación (Chudakov et al., 2010; Zhou y Lin 2013; Adam et al., 2014; Duan et al., 2014).

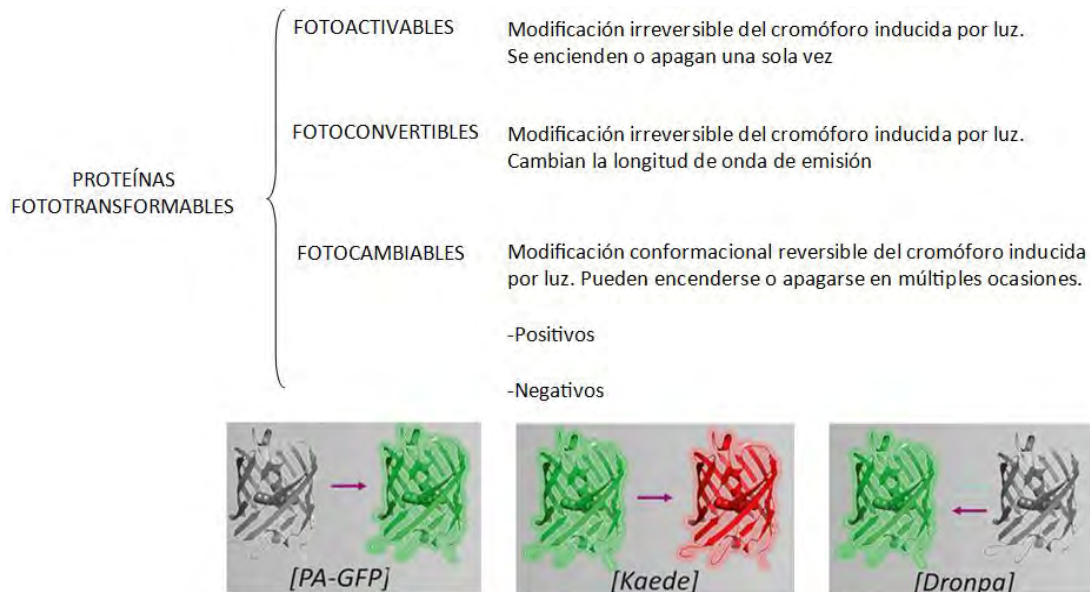


Figura 4. Clasificación de proteínas fluorescentes. Las proteínas fototransformables se clasifican en fotoactivables (PAFP) si su mecanismo de encendido es irreversible, un ejemplo de ellas es PA-GFP; fotoconvertibles (PCFP) si cambia la longitud de onda de emisión, Kaede es miembro de este grupo y fotocambiables (PSFP), capaces pasar de un estado fluorescente a uno apagado, Dronpa es un ejemplo representativo de este grupo.

El término “encender” debe entenderse como el paso desde un estado basal, el cual puede ser o no fluorescente hacia un estado final en el cual la fluorescencia presentada será de una longitud de onda diferente a la basal y por tanto, de diferente color (Chudakov et al., 2010; Shcherbakova y Verkhusha, 2014).

A diferencia de PAFP y PCFP, las PSFP es que presentan procesos de activación reversible (ver Figura 5), por lo que pueden ser encendidas y apagadas repetidamente (Shcherbakova y Verkhusha, 2014; Zhou y Lin 2013; Adam et al., 2014; Duan et al., 2014).

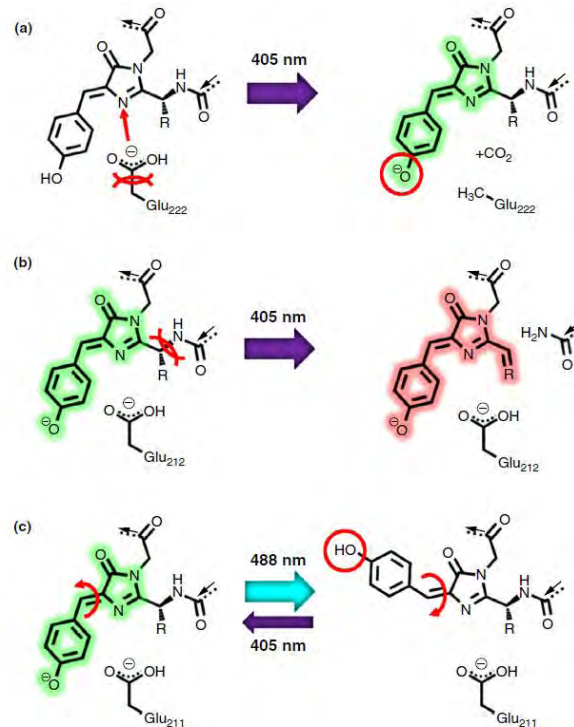


Figura 5. Diferencias de activación de las proteínas fototransformables. A) Proteínas fotoactivables (PAFP); su mecanismo requiere de la descarboxilación de un aminoácido cercano, usualmente es Glu222 o su equivalente. B) Proteínas fotoconvertibles (PCFP); la activación de estas proteínas ocasiona la ruptura de la cadena polipeptídica, extendiendo de esta manera el sistema conjugado. C) Proteínas fotocambiables (PSFP); la excitación con fotones de luz permite la isomerización cis - trans del cromóforo permitiendo la activación o desactivación de la proteína.

La mayoría de las PSFP son de organismos antozoos (corales) de hecho las características fotocambiables está en muy pocas proteínas fluorescentes silvestres de hidozoos. Sin embargo, la sustitución de Glu212 por Gln le confiere propiedades de PSFP a una proteína fluorescente convencional como YFP (Bourgeois y Adam, 2012).

Entre las PSFP pueden, además, observarse poblaciones que difieren en cuanto a su mecanismo de activación o al estado inicial y final de emisión de fluorescencia, así es posible encontrar proteínas que son fluorescentes en su estado inicial y no fluorescentes después de la excitación con luz de longitud de onda específica. Tal es el caso de Dronpa cuyo estado basal le permite en el que

la excitación con iluminación de luz de 490 nm elimina la emisión de fluorescencia. Dicho de otro modo, la activación de Dronpa “apaga su fluorescencia” (Duan et al., 2014).

Las proteínas que tienen este tipo de comportamiento se denominan PSFP “negativas”. Las PSFP “positivas” tienen un comportamiento opuesto a las anteriormente descritas, es decir, pasan de un estado basal no fluorescente a un estado fluorescente. Ejemplo de este subgrupo es Padron, que de hecho, es una variante mutante de Dronpa y que debido a su comportamiento opuesto recibe su nombre (Duan et al., 2014).

3. CROMOFORO Y SUS VARIANTES

Independientemente del origen de la proteína fluorescente, todos los cromóforos están formados por un tripéptido que contiene tirosina y glicina en las posiciones 66 y 67 respectivamente (Shcherbakova y Verkhusha, 2014; Duan et al., 2014). Estos dos aminoácidos son cruciales para la formación del cromóforo, de hecho la sustitución de la Tyr66 genera mutantes no fluorescentes o con fluorescencia disminuida, implicando que, si bien, no es esencial para la formación del cromóforo, sí es importante para las propiedades fluorescentes del mismo (Chudakov et al., 2010). La estructura general del cromóforo se basa en la formación de dos anillos unidos por un doble enlace con una configuración coplanar de ambos anillos (Remington, 2011).

Como se ilustra en la figura 6, el proceso de maduración del cromóforo comienza con un ataque nucleofílico del nitrógeno de la glicina 67 al carbono carbonilo de la serina 65 resultando en la formación de un estructura heterocíclica (Dedecker et al., 2013). Posteriormente ocurre una deshidrogenación alfa-beta de la Tyr66 con oxígeno molecular (Chudakov et al., 2010) seguido por una oxidación con oxígeno molecular (Dedecker et al., 2013).

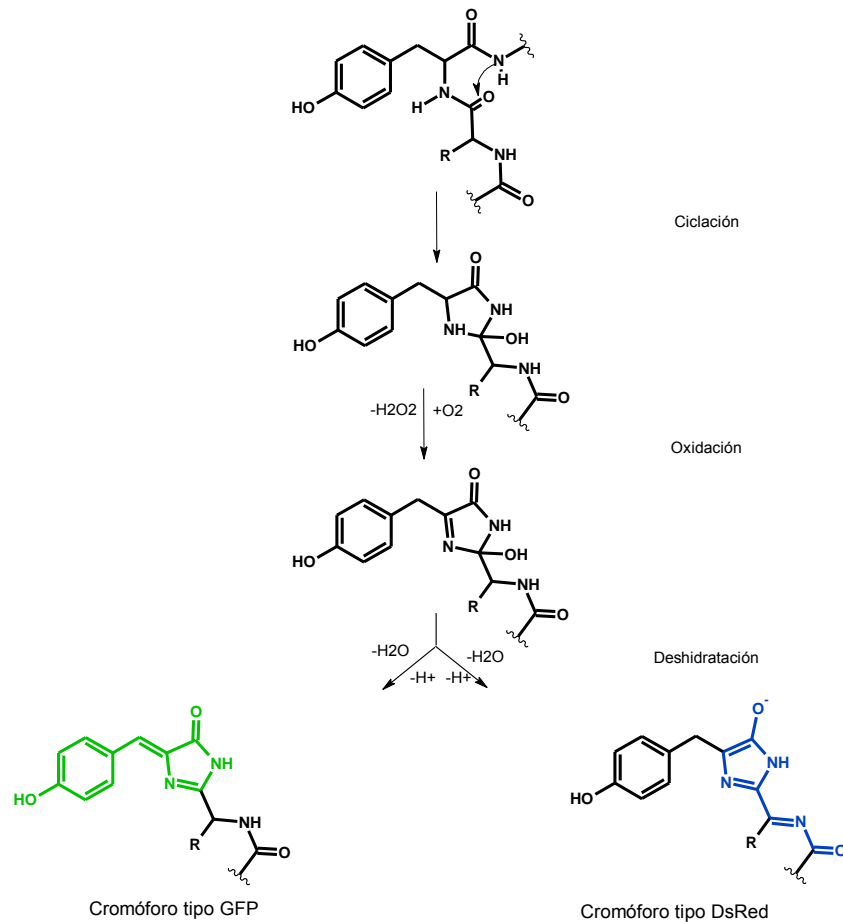


Figura 6. Proceso de maduración del cromóforo. Independientemente de la proteína fluorescente, la síntesis del cromóforo involucra la ciclación mediante el ataque nucleofílico del nitrógeno de la glicina 67 al carbono carbonilo de la serina 65 (en GFP). Después de la oxidación y deshidratación se genera un cromóforo casi maduro. Según sea el sitio de la desprotonación posterior dará lugar a un cromóforo tipo GFP o tipo DsRed

La etapa limitante del proceso es la oxidación, donde el oxígeno es el único reactivo externo utilizado durante el proceso de maduración. Esta estructura recibe el nombre de p-hidroxibencilideno-5-imidazolinona (pHBI) y su formación no requiere de enzimas o cofactores excepto el oxígeno molecular antes mencionado (Dedecker et al., 2013).

La formación de otros tipos de cromóforos están menos entendidos en particular aquellos con emisión de fluorescencia roja. Sin embargo, se sabe que muchas proteínas fluorescentes rojas comparten rasgos en común con la vía de

DsRed. En ella, el cromóforo esencialmente es el mismo que en las proteínas verdes aunque con un sistema conjugado extendido (Dedecker et al., 2013).

La estructura de p-HBI puede encontrarse en dos conformeros cis o trans. En el caso de GFP, solo se presenta el conformero cis protonado y desprotonado en donde ambas formas presentan fluorescencia al ser excitados con luz de longitud de onda adecuada (Remington, 2011). Esto sin embargo, no ocurre en el caso de las proteínas fluorescentes fototransformables (PAFP, PCFP, PSFP) en las cuales hay una respuesta a la luz dependiente de la conformación y el estado de protonación del cromóforo (Adam et al., 2014; Duan et al., 2014).

A diferencia de los aminoácidos de las posiciones 66 y 67 que se encuentran altamente conservadas en las proteínas fluorescentes, la posición 65 es variable. Sugiriendo que su identidad no es vital para la síntesis del cromóforo. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos de las proteínas fluorescentes provenientes de antozoos (corales, anemonas) tienen una alta similitud estructural pero una pobre identidad de secuencia (<30%) con las proteínas fluorescentes provenientes de hidrozooos (medusas) como GFP (Chudakov et al., 2010). En la figura 7 se muestra el alineamiento de diferentes proteínas fluorescentes de diferentes especies.

Es interesante, sin embargo notar que precisamente las proteínas aisladas de medusas no poseen características fototransformables en su forma silvestre (ver Figura 3) y en cambio muchas de las proteínas fototransformables (PAFP, PCFP o PSFP) han sido desarrolladas a partir de organismos antozoos e incluso, algunas de ellas, (por ejemplo DsRed) en su forma silvestre tienen comportamiento de fotocambio reversible (Duan et al., 2014).



Figura 7. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas fluorescentes representativas de diferentes especies de los que han sido aisladas. Se representa en el nombre el color de emisión que exhiben. GFP (*Aequoria victoria*), ppluGFP2 (*Pontellina plumata*), AmphigFP (*Branchiostoma floridae*), zFP506 (*Zoanthus*), DsRed (*Discosoma sp*), Kaede (*Trachyphyllia geoffroyi*), asFP595 (*Anemonia sulcata*), anm2CP (*Anemonia sulcata*).

Por otro lado, las modificaciones del cromóforo (ciclación oxidación, protonación-desprotonación, formación de enlaces de hidrógeno y apilamiento con residuos vecinos), determinan las características espectrales de la proteína. Por ejemplo, la emisión de fotones de longitudes de onda más altas (por ejemplo, rojo), correlaciona con el número de dobles enlaces conjugados (Shcherbakova y Verkhusha, 2014)

4. MECANISMO DE FOTOCAMBIO REVERSIBLE

Las PSFP se subclasifican en negativas y positivas de acuerdo al comportamiento de fotocambio que presentan. Dentro de las proteínas del primer grupo podemos encontrar ejemplos como Dronpa, IrisFP, rsFastlime, rsGFP, la serie de proteínas Geos que se diferencian entre sí por el aminoácido que presentan en la posición 62 correspondiente al primer aminoácido del cromóforo, entre otros, que en su forma basal presentan una intensa fluorescencia y al ser estimulados con luz de energía adecuada, pasan a un estado final carente de fluorescencia (Bourgeois y Adam 2012; Chang et al., 2012). Ejemplos de PSFP positivos encontramos a Padron (que de hecho es una variante de Dronpa que posee un comportamiento de emisión opuesto a Dronpa), asFP595, rsCherry, o KFP1.

Como en todas las PSFP, el proceso de activación (sea positivo o negativo) puede realizarse en múltiples eventos (Chudakov et al., 2010; Bourgeois y Adam 2012; Zhou y Lin, 2013). Una característica importante de las PSFP negativas es que la conformación cis aniónica es termodinámicamente más estable que en las PSFP positivas, en las cuales la forma más estable es la protonada en configuración trans (Duan et al., 2014).

Una tercer subclasificación de las PSFP está integrada Dreiklang como único miembro cuya activación es totalmente distinta a todas las halladas hasta la fecha y que involucra una reacción de hidratación-deshidratación en lugar de una isomerización cis - trans en su mecanismo de activación (Brakemann y et al., 2011).

-Mecanismo en PSFP negativas

Independientemente de la subclasificación, el cromóforo de las PSFP, al igual que en el caso de GFP, es un derivado del p-hidroxibencilidenimidazolinona (pHBI). Está constituido por la unión de dos anillos unidos por un doble enlace a través de un puente metileno con una configuración coplanar de ambos anillos (Remington, 2011).

El mecanismo de fotocambio en PSFP independientemente el subtipo del que se trate, (exceptuando Dreiklang) involucra, invariablemente un proceso de isomerización cis - trans inducida por luz y una rotación en torno al puente metileno que une ambos anillos (Shcherbakova y Verkhusha, 2014). La presencia de fluorescencia requiere que ocurra el proceso cis - trans, se ha observado sin embargo, que la absorción de un fotón de luz por una solución del cromóforo aislado, no genera fluorescencia aun cuando la capacidad de isomerización no está impedida. En otras palabras, ninguna de las conformaciones del cromóforo, es fluorescente *per se* (Bourgeois y Adam 2012). Sin embargo es importante señalar por un lado, que en solución, el cromóforo puede isomerizar espontáneamente de una a otra forma (cis a trans o trans a cis) y por tanto, se presenta una competencia entre las formas presentes, y por otro, la estructura del barril previene la fotoconversión. Es claro también que prevenir la fotoconversión es un proceso insuficiente para explicar la gran fluorescencia encontrada en las proteínas fluorescentes (Dedecker et al., 2013). Aunque la condición de fluorescencia habitualmente requiere de un estado isomérico cis, esto no es estrictamente necesario puesto que se han encontrado proteínas que aun siendo fluorescentes conservan una conformación trans en su estado activado (Brakemann y cols., 2010; Dedecker et al., 2013).

La forma aniónica de pHBI es un híbrido de resonancia entre dos estructuras aniónicas (Ver Figura 8) permitiéndole actuar como un birradical. Las estructuras en resonancia permiten, durante la excitación del cromóforo, la rotación en torno al enlace entre el metileno y el grupo fenoxi (enlace P) o el metileno y el grupo imidazolinona (enlace I) sin embargo, solo la rotación en torno al enlace I permite la isomerización cis - trans (Olsen et al., 2010) y por tanto la rotación en torno al enlace P no produce isomerización cis - trans, por otro lado, la rotación en el enlace I realza la acidez del grupo fenoxi (Li et al., 2010). El mecanismo antes descrito recibe el nombre de Hula Twist y es el mecanismo que mejor explica el proceso de isomerización cis - trans de muchas de las proteínas fluorescentes (Bourgeois y Adam, 2012).

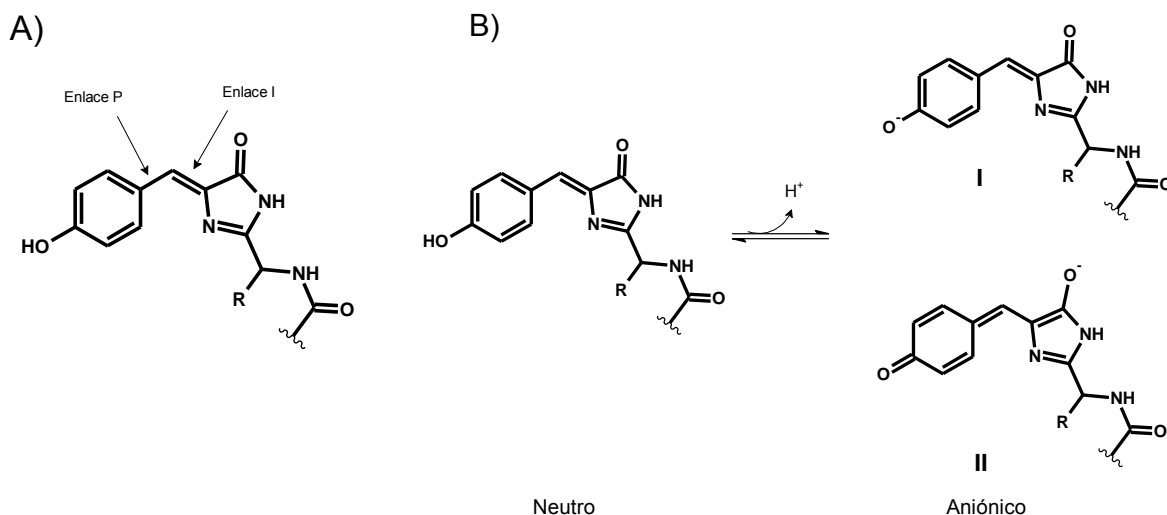


Figura 8. A) Estructura del cromóforo de las proteínas fluorescentes tipo GFP (p-hidroxibencilidenimidazolinona –pHBI-) una estructura bicíclica unida por un metileno se señala la ubicación del enlace P y del enlace I. B) el pHBI aniónico es un híbrido de resonancia entre dos estructuras que mantienen su carga negativa localizada ya sea en el oxígeno del grupo fenoxi (I) o en el carbono carbonilo de la imidazolinona (II). La diferencia de ambas estructuras permite reacomodar el sistema conjugado y alternar el doble enlace del metileno central que une ambos anillos. Solo la rotación en torno al enlace I de la estructura II permite que ocurra el proceso de isomerización cis - trans.

La rotación en torno a los enlaces P o I es una característica intrínseca del cromóforo (Olsen et al., 2010). Sin embargo los aminoácidos de la estructura de la proteína pueden limitar y/o dirigir el tipo y grado de torsión en el cromóforo (Duan et al., 2014). Este proceso puede realizarse por el cambio de posición de aminoácidos vecinos al cromóforo para evitar impedimentos estéricos y así, favorecer los movimientos necesarios del cromóforo (Li et al., 2010).

Por ejemplo para restringir la rotación, se han demostrado que la presencia de residuos vecinales como Arg66, Ser142, Glu144, Ser177, His194, y Glu222 (en IrisFP y en una gran cantidad de PSFP) así como moléculas de agua, están involucrados en la red de enlaces de hidrógeno que mantienen la conformación cis o trans del cromóforo (Duan et al., 2014). En el cromóforo aniónico de mIrisFP

están presentes enlaces de hidrógeno con Ser142 y un apilamiento pi con His194 (Gayda et al., 2012). En Dronpa, la presencia de un enlace de hidrógeno entre el fenolato del cromóforo y la Ser142 estabiliza la conformación cis fluorescente del cromóforo. Por otro lado, Val157 y Met159, dificultan el proceso de isomerización cis - trans de Dronpa. Las sustituciones Met159Thr en Dronpa 2 o Val157Ile y Met159Ala en Dronpa-3 incrementan la velocidad de fotocambio on-off (Zhou y Lin 2013). El cambio en Dronpa de Val157Gly y Met159Tyr de hecho es fundamental para generar Padron, una variante que invierte completamente las propiedades exhibidas por Dronpa (Bourgeois y Adam 2012). En Padron, la tirosina 159 estabiliza el cromóforo en la conformación trans, formando puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo del cromóforo. Y el cambio de valina por glicina en la posición 157 facilita el movimiento de la tirosina de la posición 159 en la conformación trans del cromóforo (Brakemann et al., 2010).

Todas estas observaciones llevaron a Olsen y colaboradores a sugerir que en el proceso de fotoencendido se debe de restringir la rotación y/o torsión alrededor del enlace P para mejorar la eficiencia en la emisión de fluorescencia, limitando pérdidas mediante otros procesos no radiantes (como la emisión de calor), y por otro lado, se debe contar con un microambiente ácido-base adecuado que permita mejorar la eficiencia de isomerización cis - trans (Olsen et al., 2010).

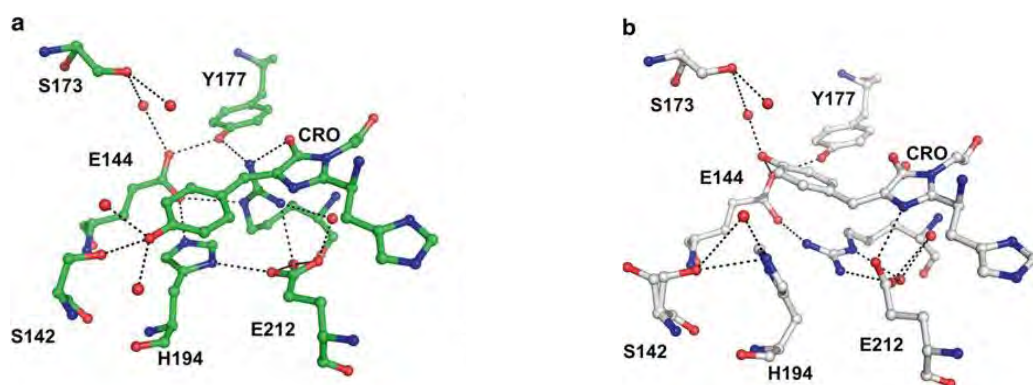


Figura 9. Interacciones relevantes del cromóforo con aminoácidos vecinos en IrisFP en a) cis fluorescente y b) trans no fluorescente. Distintos aminoácidos estabilizan la conformación cis o tras según sea el caso. Por ejemplo, His 194 colabora en la estabilización por medio de apilamiento pi con el hidroxibencil del cromóforo en conformación cis mientras que en la conformación trans la interacción hay reacomodo de los aminoácidos.

La isomerización cis - trans, no es un proceso aislado, sino que es acompañado por cambios conformacionales en la región donde se aloja el cromóforo (bolsillo) que afectan el proceso así como la velocidad y capacidad de cambio del cromóforo (Shcherbakova y Verkhusha, 2014). Por ejemplo, se ha observado en Dronpa que Glu144 provoca una repulsión electrostática del grupo fenoxi del cromóforo, incrementando movilidad del cromóforo (Li et al., 2010). Esta protonación, y reordenamiento en el bolsillo del cromóforo, generan una pérdida de energía no radiante de la energía de excitación (Shcherbakova y Verkhusha, 2014). Observaciones similares se han realizado en mIrisFP (Gayda et al., 2012).

Por otro lado, el estado de protonación del cromóforo influye en el proceso de isomería cis - trans. En IrisFP, la interacción del fenolato del cromóforo con Ser142 favorece su estado desprotonado en conjunto con la interacción de Arg66 con el grupo carbonilo de la imidazolinona que retienen la densidad electrónica en ese anillo. Además, el pKa de IrisFP (5.7), asegura que a pH fisiológico el cromóforo se encuentre desprotonado. Durante la configuración trans, el grupo fenolato cambia su interacción y forma puentes de hidrógeno con el glutamato de la posición 144 que se encuentra desprotonado, a diferencia de lo observado en la forma cis, la interacción de Arg66 está desacoplada de la imidazolinona. Lo anterior, aunado al pKa (>10), asegura que se mantenga protonado a pH fisiológico (Duan et al., 2010).

En el mecanismo de activación on-off (es decir, proceso de apagado) de Dronpa involucra la protonación del cromóforo y la ruptura del puente de hidrógeno con Ser148. Ambos pasos, refuerzan la flexibilidad del cromóforo y la movilización de los aminoácidos circundantes, lo que a su vez, incrementa la flexibilidad del barril (Shcherbakova y Verkhusha, 2014). Esta flexibilidad ocasiona que en la conformación trans del cromóforo en Dronpa, la séptima cadena beta del barril sufra de un desorden relativo (Bourgeois y Adam, 2012). Este desordenamiento, que genera un aumento en la tendencia de multimerización, ha

sido aprovechado como herramienta para la determinación intracelular de viscosidad (Zhou et al 2012; Duan et al., 2014).

Este desorden observado en Dronpa sin embargo no ha sido observado en mTFP0.7 o IrisFP en la misma configuración trans. De hecho se ha postulado que el desplegamiento parcial de la estructura del barril en Dronpa, puede influir significativamente en la densidad electrónica alrededor del cromóforo y por tanto en la ausencia de fluorescencia del conformero trans (Bourgeois y Adam, 2012).

Aparentemente, en Dronpa, el proceso de isomerización cis – trans y la protonación del cromóforo ocurren de manera concertada aunque no está muy claro el orden en el que se llevan a cabo (Gayda et al., 2012). Hay evidencia, que indica que la protonación es posterior a la isomerización (Bourgeois y Adam, 2012). De igual manera, en mlrisFP se ha encontrado evidencia que sugiere que la protonación del cromóforo aniónico puede ocurrir en una etapa posterior a la isomerización cis - trans y que la forma aniónica es estabilizada por enlaces de hidrógeno que favorecen el proceso (Gayda et al., 2012).

Las interacciones del cromóforo con los residuos vecinos son en gran parte responsables de la estabilización del cromóforo y participantes secundarios en el proceso de isomerización. Así, en Dronpa por ejemplo, se observa que en la conformación cis (encendido) el cromóforo forma puentes de hidrógeno con Glu144, His193 y Glu211. Para ser más específicos, en la conformación cis, la serina 142 forma un puente de hidrógeno con el hidroxifenil del cromóforo, mientras que los glutamatos de las posiciones 144 y 212 lo hacen con una molécula de agua. Este último, estabiliza la histidina 193 que a su vez por apilamiento estabiliza el grupo hidroxifenil del cromóforo (Bourgeois y Adam 2012). Por otro lado, en la conformación trans, el patrón de interacciones cambia ligeramente, en donde se observa que el hidroxifenil protonado forma ahora un puente de hidrógeno con el glutamato 144, mientras que la histidina 193 se desacopla del apilamiento con el cromóforo y se interrumpe el enlace de hidrógeno con el glutamato 212 (Bourgeois y Adam 2012; Duan et al., 2014).

Existe evidencia que indica que durante la rotación del hidroxibencil, en torno al enlace I ocurre simultáneamente una rotación en torno al enlace P, permitiendo mantener la planaridad del grupo hidroxibencil (Li et al., 2010) lo cual a su vez, contribuye a mantener estables las interacciones con los aminoácidos circundantes (Duan et al., 2014).

Por otro lado, sin embargo, hay sugerencias en relación a que el ángulo y torsión en conjunto, del grupo hidroxibencil y del grupo imidazolinona en relación al metileno que los separa, puede ser determinante para dictar la rotación final independientemente el subtipo de PSFP, favoreciendo de este modo la isomerización de cis a trans o viceversa según sea el subtipo del que se trate (Brakemann et al., 2010)

En muchos tipos de PSFP, el proceso de isomerización cis - trans, involucra la presencia de un fenómeno conocido como transferencia de protones en estado excitado (ESPT). En asFP595 por ejemplo, se ha demostrado que ocurre este proceso y se ha sugerido que puede forzar la isomerización cis - trans por un mecanismo de Hula Twist (Gayda et al., 2012). Padrón es otro ejemplo en el que se ha demostrado que ocurre un proceso de ESPT durante su mecanismo de isomerización (Fron et al., 2013).

La emisión del cromóforo aniónico se puede describir como la transición del estado excitado al estado basal (Remington, 2011). Se ha propuesto que en el mecanismo de GFP se transfiere un protón desde el cromóforo protonado a través de una molécula de agua y Serina 205 al aceptor final Glu222, esta transferencia además es concertada, es decir, involucra a los 3 protones simultáneamente (del hidroxibencil, del agua y de la Serina 205) (Erez et al., 2011; Remington, 2011). Esta transferencia de protones, permite un rearrreglo en la distribución de los protones en el cromóforo y residuos circundantes facilitando de este modo proceso de protonación-desprotonación del cromóforo (Remington, 2011). Este proceso no es exclusivo de las PSFP, sino que puede encontrarse incluso en proteínas fluorescentes convencionales. Por ejemplo, en GFP la conversión de la forma protonada en la forma desprotonada procede vía ESPT a través de un

intermediario "I". Que es formado tras la excitación del cromóforo protonado se convierte en un intermediario aniónico I* por transferencia de protones siendo esta última especie la que emite un fotón de luz verde. (Oltrogge et al., 2014). En la Figura 10 se describe el mecanismo general del proceso de ESPT del cromóforo de GFP como ejemplo representativo aplicable a las proteínas fluorescentes.

Cabe destacar que en la ESPT no se genera isomerización cis – trans en ningún paso, por lo que se cree que la simple transferencia de protón no produce por sí misma la isomerización. Esto conduce a pensar que (al menos) en GFP los alrededores del cromóforo en GFP bloquean de algún modo la isomerización. Se ha observado que Glu212 interactúa directamente con el nitrógeno de la imidazolinona en la configuración trans del cromóforo, proporcionándole así, una mayor estabilización (Duan et al., 2014). De hecho la mutación Glu212Gln en GFP habilita la capacidad de isomerización del cromóforo generando de esta manera uno de los pocos casos de PSFP diseñados a partir de proteínas fluorescentes de medusas (Grotjohann et al., 2011).

Si bien, ESPT ayuda a explicar cómo inicia el proceso de isomerización, esto no ocurre de todas las PSFP. Se sabe por ejemplo que en IrisFP no ocurre transferencia de protones vía ESPT y se ha encontrado que el cromóforo posee una geometría distorsionada y la conformación trans es termodinámicamente más estable (Duan et al., 2014). El caso de Dronpa por otro lado, continua en debate, pues hay autores que afirman que en el mecanismo de isomerización si ocurre ESPT y que además puede forzar el cambio hacia su forma fluorescente (Bourgeois y Adam 2012; Fron et al., 2013). Esto fue puesto en duda por Warren y colaboradores en 2013 cuando afirmaron de manera tajante que en el proceso de encendido de Dronpa no lo involucra, en su lugar, propusieron enlaces de hidrógeno entre el carbono carbonilo de la imidazolinona del cromóforo y la arginina 66 (Warren et al., 2013).

Para resumir, el mecanismo básico de isomerización del cromóforo en proteínas fluorescentes debe incluir: 1) Protonación-desprotonación del cromóforo que puede o no ser vía ESPT, 2) Reorganización en la orientación y estructura del

barril beta, 3) Isomerización cis - trans vía Hula Twist, y 4) Cambio en las propiedades de emisión de la proteína.

Estos pasos no siguen necesariamente el orden anterior ni son necesariamente iguales en la isomerización cis - trans o trans-cis y dependen en gran medida de la proteína particular, por ejemplo se sabe que en asFP595 la isomerización trans-cis ocurre en el estado neutro del cromóforo, seguido por la desprotonación del cromóforo hacia un estado fluorescente en configuración cis (Bourgeois y Adam, 2012).

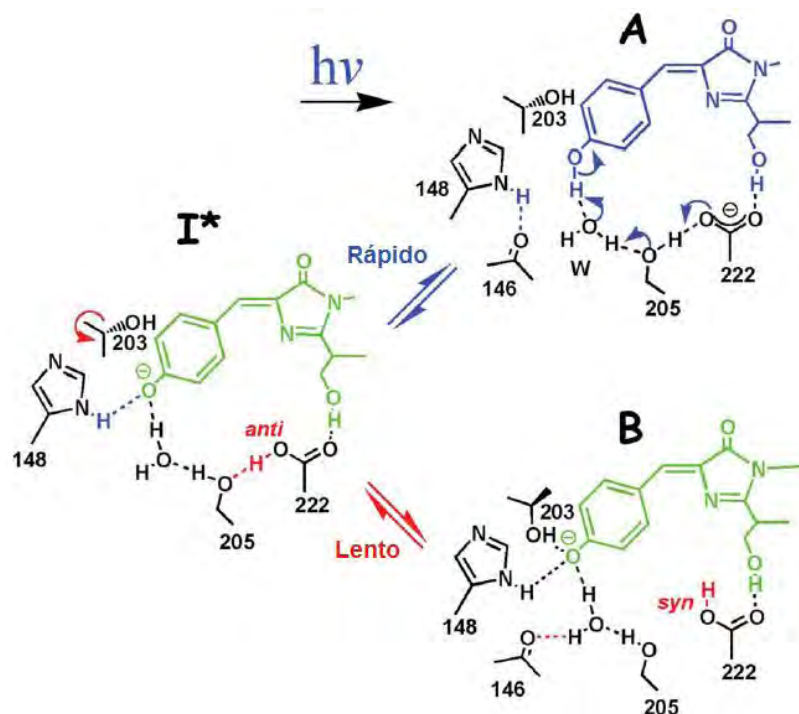


Figura 10. Mecanismo ESPT en GFP. Aunque las formas protonada y desprotonada del cromóforo son fluorescentes solo la forma desprotonada (B) emite fluorescencia verde. El mecanismo de desprotonación conocido como ESPT (transferencia de protón en estado excitado) involucra una rápida transferencia de protones desde el hidroxifenil hacia el aceptor final Glu222 y en donde participan de manera concertada Ser205, e His148 generando un intermediario I.

En mIrisFP, la isomerización cis - trans es posterior a la protonación (Gayda et al., 2012). En Dronpa, la evidencia apunta a que la protonación ocurre después

de la isomerización del cromóforo en un proceso que involucra diferencias de protonación de los aminoácidos cercanos (Li et al., 2010).

-Mecanismo en PSFP positivas

Para poder hablar de las PSFP hemos de tomar a Padron como proteína representativa de este grupo. Padron es otra PSFP positiva diseñada a partir de Dronpa y que contiene dos mutaciones principales: Val157Gly y Met159Tyr las cuales son esenciales para la inversión de propiedades fotocromicas de Padron (Adam, 2014). De hecho, la mutación Met159Tyr fue suficiente para invertir las propiedades exhibidas por Dronpa completamente (Bourgeois y Adam 2012). Esto le permite pasar de un estado “apagado” carente de emisión de fluorescencia a un estado fluorescente “encendido” (Zhou y Lin 2013). Es interesante notar que en muchas proteínas fluorescentes, la diferencia en el fotocomportamiento en PSFP positivos y negativos yace en aminoácidos clave (Schervakova y Verkhusha 2014).

Al ser una variante de Dronpa, su cromóforo de Padron también está formado por los aminoácidos CYG cuya base del mecanismo es la isomerización cis - trans (Brakemann et al., 2010). Como es de esperarse, tanto Dronpa como Padron son estructuralmente similares aun cuando sus propiedades espectrales sean completamente opuestas (Bourgeois y Adam 2012).

Padron presenta una banda de absorción a 504 nm que corresponde a la forma no fluorescente no protonada. La irradiación de esta forma con luz a 504 nm, transforma la forma no fluorescente, en la forma fluorescente, que resulta en la presencia de una banda de absorción a 395 nm y que corresponde a la forma protonada, con una disminución en la absorbancia a 504 nm (Brakemann et al., 2010).

El cambio de metionina por tirosina en la posición 159 permite estabilizar el cromóforo en la conformación trans, formando puentes de hidrógeno con el anillo p-hidroxifenil mediante apilamientos de tipo pi (Zhou y Lin, 2013). Esta interacción, que no se presenta en Dronpa es esencial para la desprotonación del cromóforo trans de Padron. La acción de Tyr159 es en gran medida facilitada por la glicina 159 (valina en Dronpa) que permite el libre movimiento de la tirosina hacia el cromóforo que se encuentra en conformación trans (Adam, 2014).

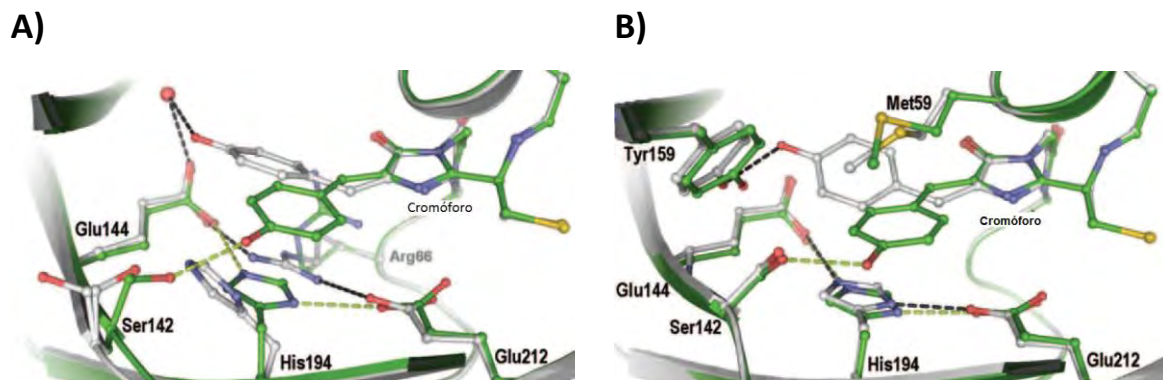


Figura 11. Diferencias en las interacciones del cromóforo en conformación cis (verde) o trans (gris) con los aminoácidos vecinos en A) Dronpa, B) Padron. Padron es una proteína fluorescente fotocambiable de activación positiva creada a partir de Dronpa y con la cual, posee una elevada similitud estructural y de secuencia, aunque su activación es totalmente opuesta a la de Dronpa. En ambos casos, en la posición cis, el cromóforo es estabilizado esencialmente por el mismo grupo de aminoácidos (Ser142, His194 y Glu212) en la conformación trans, la Tyr159 adquiere relevancia en la estabilización del cromóforo en Padron.

Adicionalmente, la estabilización de la forma trans del cromóforo involucra una gran cantidad de puentes de hidrógeno (Figura 11), moléculas de agua e interacciones de van der Waals (Brakemann et al., 2010). Esta estabilización coordinada del cromóforo provoca que a diferencia de lo que ocurre en las PSFP de cambio negativo (como Dronpa), en Padron, la conformación más estable es la forma trans no fluorescente (Adam, 2014).

Otro cambio importante en Padron respecto a Dronpa es el cambio de leucina por prolina en la posición 141. Este cambio permite la modificación de la posición relativa de serina 142 permitiéndole dirigir su grupo hidroxilo con mayor eficiencia hacia el bolsillo del cromóforo en la posición cis estableciendo de esta manera, un puente de hidrógeno con el fenolato del cromóforo que colabora en la estabilización de la forma aniónica (Adam, 2014; Duan et al., 2014).

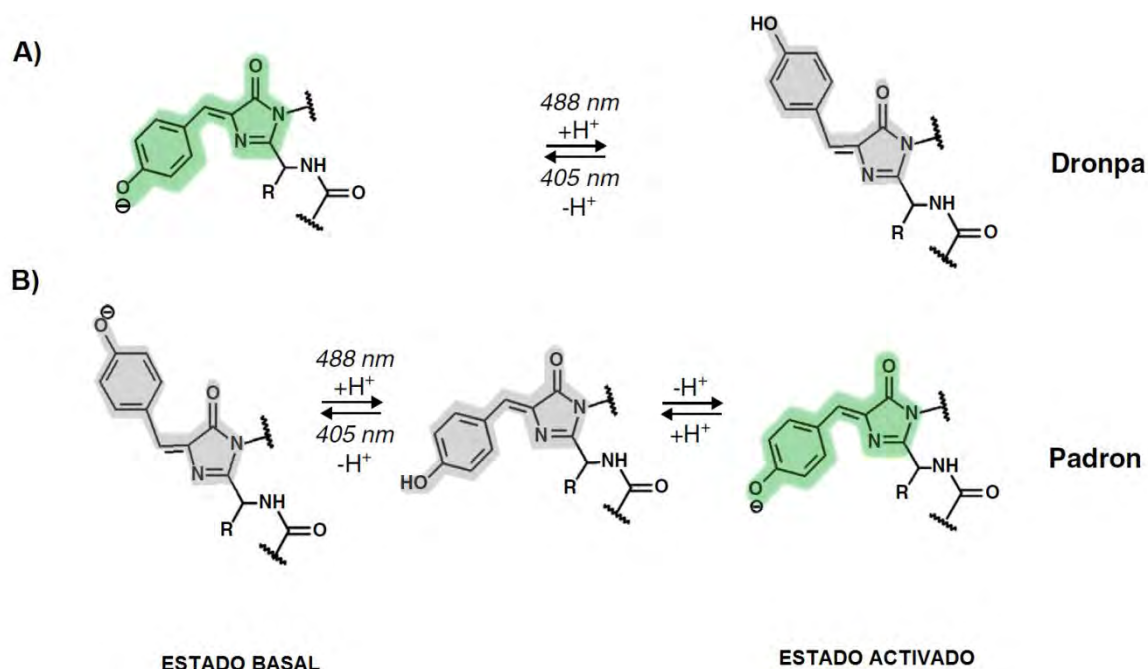


Figura 12. Diferencias de activación de A) Dronpa y B) Padron. Ambas guardan una alta homología estructural y de secuencia, sin embargo Dronpa se encuentra encendido (Conformación cis desprotonado) en estado basal y Padron en estado no fluorescente (Conformación trans desprotonado). En el caso de Padron, la isomerización de la forma trans ocurre en el estado aniónico a una forma cis protonada. La desprotonación de la forma cis protonada es la que da lugar al cromóforo cis desprotonado fluorescente.

Se ha propuesto que estos cambios en la posición relativa de Ser142 son clave en el mecanismo de fotocambio de Padron (Zhou y Lin, 2013). Además, su libertad de movimiento le permite ser responsable del incremento en la afinidad por protones de la pHBI en Padron (Duan et al., 2014). Como consecuencia del movimiento de Ser142, His193 no puede moverse hacia el cromóforo, lo cual favorece que la Arg66 se mantenga en su lugar, lo que conduce a que el grupo

hidroxifenil rote, resultando en un cromóforo en estado apagado con una importante torsión del cromóforo (Adam, 2014; Duan et al., 2014).

En la conformación cis, la posición relativa de los residuos His193, la Arg66, y el Glu211 (equivalentes a His194, Arg66 y Glu212 en IrisFP) se mantiene constante. En cambio, en la conformación trans, se presenta una gran torsión de la Ser 142. La consecuencia de esta diferencia entre ambas conformaciones (cis y trans) favorece que el cromóforo trans sea no fluorescente pero manteniendo un espectro de absorción similar al del estado encendido cis (Duan et al., 2014).

Es claro que los mecanismos que dirigen el fotocambio en PSFP positivas y negativas son diferentes. En PSFP negativas la isomerización del cromóforo parece ser simultáneo con la protonación y acoplado a una gran reestructuración de la proteína (Bourgeois y Adam, 2012). Por ejemplo, en Dronpa el proceso de isomerización involucra un gran cambio en la orientación y re-ordenamiento de los aminoácidos (Duan et al., 2014). En contraste, en Padron la isomerización cis - trans ocurre con mínimos cambios en la orientación local de los aminoácidos circundantes (Brakemann et al., 2010).

Los datos sugieren que la isomerización trans-cis ocurren completamente en el estado aniónico y posteriormente ocurre la protonación. Este proceso ocurre a temperaturas tan bajas como 100 K (Bourgeois y Adam 2012). La eficiencia de isomerización a temperaturas en las cuales la dinámica de la proteína se encuentra interrumpida indica que el bolsillo del cromóforo no dificulta el proceso de isomerización (Duan et al., 2014; Zhou y Lin, 2013).

La isomerización trans-cis del cromóforo de Padron hacia sus formas cis aniónicas ocurre a través de dos intermediarios. Como resultado final se genera una mezcla de cromóforos de conformación cis fluorescente y no fluorescente (Figura 12) (Faro et al., 2011).

Al igual que en otras PSFP, el mecanismo básico de isomerización cis - trans involucra la rotación en torno al enlace I del cromóforo. Hay evidencia sin embargo que sugiere que la isomerización cis - trans es promovida por el ángulo y

torsión en torno al metileno que une ambos anillos. La combinación tanto del ángulo y la torsión estabilizan una de las formas del cromóforo (Brakemann et al., 2010).

En Padron, la forma no fluorescente del cromóforo está exclusivamente desprotonada. En la mayoría de las proteínas fluorescentes esta forma, habitualmente corresponde al estado fluorescente de la proteína. Esto indica que el grado de protonación no explica por sí mismo la presencia o ausencia de fluorescencia (Bourgeois y Adam, 2012).

Por otro lado, en Padrón se observa que la isomerización trans-cis ocurre completamente en el estado aniónico y precede a la protonación (Duan et al., 2014). Este cromóforo aniónico (en conformación cis), en el estado encendido no sufre isomerización y está en equilibrio con la forma no fluorescente del cromóforo (también en conformación cis). La protonación del cromóforo en conformación cis elimina su capacidad fluorescente y habilita la fotoisomerización hacia la forma no fluorescente trans aniónica cuando se irradia con luz violeta (Schervakova y Verkhusha 2014). Hay evidencia sin embargo que sugiere que, un cambio relativo en el grado de protonación no afecta la fotoisomerización (Zhou y Lin 2013). Esto implica que la isomerización trans-cis, puede ocurrir de manera desacoplada a la protonación del cromóforo (Faro et al., 2011).

Además, se ha encontrado información que sugiere que el mecanismo de protonación del cromóforo requiere de un intercambio con el disolvente circundante a la proteína (Duan et al., 2014).

Se ha propuesto que el mecanismo de isomerización de Padron es muy similar al de muchas de las PSFP e involucra los procesos de ESPT, cambios conformacionales del cromóforo (es decir isomería cis - trans) y cambios en la flexibilidad estructural del cromóforo (Fron et al., 2013).

5. USOS Y APLICACIONES DE PROTEÍNAS FOTOTRANSFORMABLES

Todos los procesos biológicos al interior de la célula ocurren en un momento y lugar determinado (Fan y Lin, 2015). El monitoreo de estos procesos ha requerido de estrategias cada vez más sofisticadas. El uso de tinciones orgánicas está en general limitado a células previamente fijadas y no a células vivas (Shcherbakova et al., 2012). Por lo que una de las estrategias más utilizadas es el uso de tinciones y más recientemente el uso de colorantes fluorescentes con gran valor como marcadores intracelulares (Dedecker et al., 2013). Los colorantes químicos requieren impermeabilización de la célula, fijación, adición de un coctel de agentes óxido-reductores para la fotoactivación entre otras (Adam, 2014).

Una de las ventajas de las proteínas fluorescentes, (y en particular las proteínas fototransformables) es que no son citotóxicas, además debido a que poseen un gran contraste entre sus formas activa e inactiva permite discriminar entre señal y ruido de fondo.

Desde un punto de vista estrictamente espectroscópico, las proteínas fluorescentes tienen propiedades muy inferiores a las de fluoróforos orgánicos como la rodamina o derivados de la carbocianina, en términos de brillo y resistencia a la fotodestrucción (Dedecker et al., 2013). Por otro lado, el uso de fármacos para el bloqueo o activación de factores de transcripción puede ser mucho más rápido, pero no mantienen un control espacio temporal y no existen inhibidores específicos para todas las proteínas (Fan y Lin 2015).

Una de las principales ventajas de las proteínas fluorescentes es que pueden ser empleadas en una gran cantidad de estudios relacionados con sistemas vivos y el número de aplicaciones está en continua expansión (Chudakov et al., 2010). El uso de proteínas fluorescentes ha permitido revelar detalles finos de eventos celulares difícilmente observables por otras metodologías (Miyawaki 2013).

La gran mayoría de proteínas fluorescentes actuales son utilizadas como reporteros pasivos, en los cuales el objetivo de la proteína es el de emitir

fluorescencia y no de interactuar con el sistema bajo estudio (Dedecker et al., 2013). Sin embargo, en los últimos años, la modificación de las proteínas fluorescentes ha permitido cambiar sus características espectrales y de activación y las ha convertido de algo más que etiquetas pasivas en herramientas cada vez más versátiles con mayores propiedades y aplicaciones (Enterina et al., 2015).

El principio básico para el uso de proteínas fluorescentes consiste en la clonación de genes de interés en fusión con la secuencia de una proteína fluorescente que funciona como reportero, la construcción obtenida puede ser transferida a células y organismos para resaltar la localización de la expresión de la proteína de interés o como reportero de las condiciones locales al interior celular (Remington, 2011; Chudakov et al., 2010). El progreso en las técnicas modernas de transferencia de genes (mediados por liposomas, vectores virales, o electroporación) permite la expresión eficiente de material exógeno (Miyawaki 2013). Las construcciones obtenidas con esta estrategia, son utilizadas para la visualización de la expresión de proteína, localización, traslocaciones, interacciones y degradaciones en sistemas vivos en tiempo real (Chudakov et al., 2010). Sin embargo el uso de proteínas convencionales tiene el inconveniente de que la distribución de la proteína suele ser uniforme en la célula y los métodos convencionales que resuelven estos problemas (por ejemplo FRAP) normalmente son procedimientos irreversibles (Zhou y Lin., 2013).

El uso de FTP permite solventar estos problemas dado que es posible marcar regiones específicas de manera reversible (o no) según se requiera. Las FTP tienen tres niveles de aplicación: proteínas, organelos y células completas (Duan et al., 2014). A diferencia de otros métodos de rastreo, el uso de FTP permite marcar objetos sin necesidad de una constante visualización. Las FTP presentan ventajas en estudios de migración celular, tisular, desarrollo, y regeneración. Se han utilizado FTP en distintos tipos de organismos modelo como ratones, pollos, peces, moscas e incluso plancton sin que sus características fluorescentes se ven alteradas (Nemet et al., 2015).

La evolución sistemática de las proteínas fluorescentes, que reciben el nombre genérico de fluoróforos inteligentes pueden dividirse entre aquellos que aprovechan la complejidad de las proteínas fluorescentes para obtener sensibilidad a ciertas firmas químicas (fluoróforos químicamente inteligentes) y los que permiten obtener mayor resolución de imágenes o una mayor discriminación espaciotemporal (fotofísicamente inteligentes) (Dedecker et al., 2013). Éste desarrollo ha permitido que las FTP tengan una gran variedad de aplicaciones. Algunas de ellas se pueden ver en el rastreo de proteínas, organelos, migración celular, optogenética, generación de biosensores, experimentos de difusión microscopía de localización de molécula única o de súper-resolución, por mencionar solo algunas de ellas (Nemet et al., 2015).

Estas últimas que abarcan a las PTFP cada vez son más utilizadas en técnicas de nanoscopía que exige en un fluoróforo, características como velocidad de fotoactivación o fotocambio, contraste entre las formas activa e inactiva, fotoestabilidad, resistencia a fatiga y densidad de marca (Uno et al., 2015). En este sentido, las características de las PTFP son usadas para desacoplar la emisión de la excitación de tal manera que la complejidad de las propiedades fotofísicas del fluoróforo no sea evitada sino que participe activamente en la formación de imágenes (Dedecker et al., 2013).

La nanoscopía se clasifica de manera general en microscopía de localización de molécula única (SMLM), microscopía basada en iluminación (PIM) y microscopía basada en correlación de la señal. De entre las estrategias de SMLM más comúnmente utilizadas encontramos a PALM (Microscopía de Localización de Fotoactivación), STORM (Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica) y RESOLFT (microscopía de Transiciones de Fluorescencia Reversible Ópticamente Lineales) que localizan individualmente los fluoróforos por medio de activaciones aleatorias de un subconjunto de moléculas fluorescentes. (Dedecker et al., 2013; Uno et al., 2015). Estas técnicas son las más utilizadas en

microscopía de súper resolución debido a que no requieren equipo especial y son, las que mejor resolución espacial poseen en la actualidad (Duan et al., 2014).

En la microscopía óptica convencional la resolución de imagen está limitada por la difracción de la luz. La nanoscopía permite superar este límite logrando imágenes de superan el límite teórico y convirtiéndolo en microscopía de súper-resolución (Adam, 2014).

La idea básica de las técnicas de súper-resolución es que la información es derivada de la activación estocástica de fluoróforos individuales (Mishin et al., 2015). La señal obtenida es interpretada en un modelo de distribución Gaussiana en donde el centro de masa corresponde a la molécula activada con alta precisión (Zhou y Lin, 2013). La acumulación de todos los centros de masa da lugar a una imagen sub-difraccional (Adam, 2014).

Muchas de las técnicas de súper-resolución son conceptualmente idénticas pero el uso de proteínas fototransformables (PALM, RESOLFT) o de colorantes orgánicos (STORM) hacen la diferencia (Duan et al., 2014).

En RESOLFT por ejemplo (Figura 13), la proteína de interés es marcada con un fluoróforo y la muestra es iluminada en un patrón con forma de dona en la cual solo la zona central permanece activa, mientras que la zona exterior es inactivada, por lo que solo la zona central, menor al límite de difracción de la luz, contribuye a detectar la señal, resultando en una resolución de imagen aumentada (Zhou y Lin, 2013; Duan et al., 2014). Las imágenes obtenidas son complementarias y son posteriormente utilizadas para crear una imagen compuesta con información de súper-resolución (Dedecker et al., 2013).

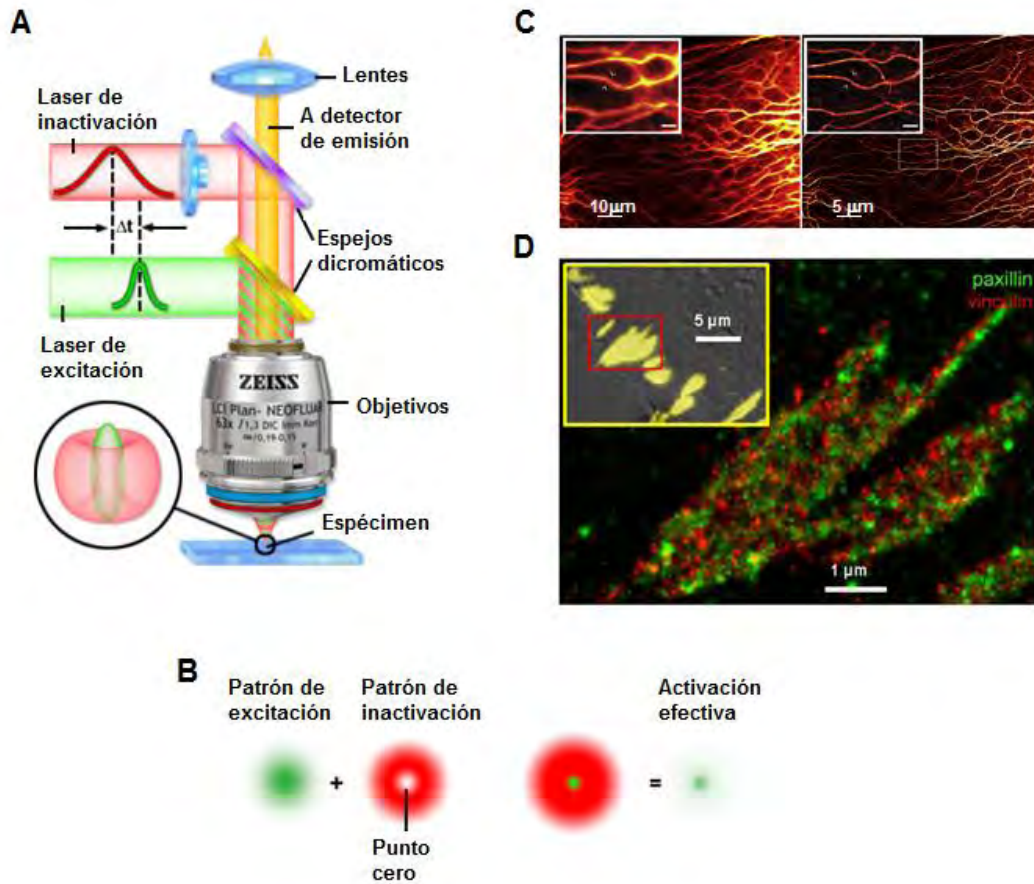


Figura 13. A) Esquema general de activación/inactivación de PSFP en microscopía de alta resolución. Un haz de luz láser inactiva la proteína en un área en forma de dona, el centro de la dona es activado con un segundo haz de luz láser. La información es enviada a un detector de emisión donde será interpretada y transformada en una imagen de alta resolución. B) Detalle de la activación/inactivación de la PSFP. La activación e inactivación simultánea de la PSFP en un arreglo en forma de dona genera una activación efectiva cuyo diámetro es menor al límite de difracción de la luz en microscopía permitiendo visualizar imágenes sub-difraccionales. C) Comparación de microscopía confocal convencional (izquierda) con RESOLFT (derecha). Se realizó una fusión de rsEGFP con queratina. El diámetro de las fibras observadas se estima en 95 nm. D) Comparación de microscopía confocal convencional (recuadro superior izquierdo) con PALM. En ambos casos se fusionó Dronpa a Paxilina y tEosFP a Vinculina respectivamente, nótese que en microscopía confocal convencional ambas quimeras colocalizan generando en una fluorescencia amarilla mientras que en PALM es posible discriminar cada tipo de molécula individualmente.

El uso de PSFP en RESOLFT es deseable debido a que en el proceso únicamente se requiere apagar (o encender) la proteína lo cual disminuye los efectos citotóxicos asociados a la fotodestrucción (Winter y Shroff, 2014; Zhou y Lin, 2013). Dronpa, EosFP y rsEGFP son ejemplo de PSFP utilizadas para estudios de RESOLFT y PALM (Mishin et al., 2015).

El uso de proteínas fluorescentes fototransformables no se limita únicamente al uso en técnicas de súper-resolución. Desde su descubrimiento, las primeras aplicaciones fueron destinadas a técnicas ya conocidas y en las cuales ya era común el uso de proteínas fluorescentes convencionales.

Una de las primeras aplicaciones fue el uso de proteínas fototransformables en técnicas de fotoblanqueamiento. En general, el fotoblanqueado es un fenómeno indeseable pero que puede ser utilizado para estudiar la movilidad de la proteína (Chudakov et al., 2010). Las proteínas fototransformables pueden reemplazar fácilmente a las proteínas fluorescentes convencionales en éstas técnicas debido a sus características de encendido/apagado sin los problemas asociados al fotoblanqueado (Adam, 2014). Las técnicas de fotoblanqueado más ampliamente utilizados son FRAP (recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueado) y FLIP (pérdida de fluorescencia en fotoblanqueamiento). Ambas técnicas consisten en blanquear una pequeña región con intensa radiación luminosa seguido del monitoreo de la tasa de recuperación o pérdida de la fluorescencia respectivamente (Chudakov et al., 2010).

La Transferencia de Energía por Resonancia Föster (FRET) es un proceso en el cual la energía de estado excitado es transferida directamente de un fluoróforo (donador) a moléculas cercanas (aceptores) permitiendo obtener imágenes con resolución de alrededor de 100 nm (Day y Davidson, 2012). El uso de PSFP ya sea como donador o aceptor permite la determinación cuantitativa y

repetible de la eficiencia FRET sin necesidad de correcciones de imagen asociadas a procesos de autofluorescencia (Duan et al., 2014).

Para la transferencia eficiente de energía en FRET (ver Figura 14) se requiere que donador y aceptor estén lo suficientemente cerca, que tengan un adecuado alineamiento dipolo-dipolo y compartir un traslape espectral para que el donador pueda excitar al aceptor (Day y Davidson, 2012). Algunas de las proteínas fototransformables que mejor aplicación tienen en esta metodología son rsCherryRev y rsTagRFP como molécula aceptora, mientras que EYFP es utilizada como molécula donadora (Duan et al., 2014). El uso de estas proteínas permite que la activación de una de las proteínas sea capaz de activar la segunda molécula siempre y cuando cumplan con las reglas anteriormente descritas (Adam, 2014).

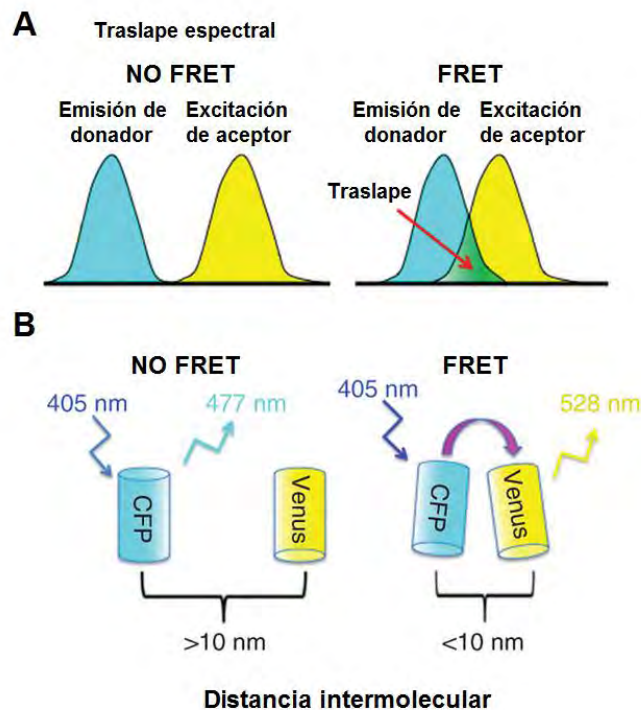


Figura 14. Esquema general de un típico ensayo FRET. A) Si el espectro de emisión de una molécula donadora traslapa con el espectro de absorción de una molécula aceptora se presenta la transferencia de energía (FRET) en caso contrario, no ocurre. B) Un segundo requisito básico para que ocurra FRET es que la distancia entre ambas moléculas sea lo suficientemente pequeña para la transferencia eficiente de energía, esta distancia típicamente es menor a 10 nm.

Además del uso de las FTP en métodos de rastreo molecular, se han realizado esfuerzos por darles características que les permitan funcionar como biosensores. Desde sus inicios, se observó que algunas proteínas fluorescentes podían presentar sensibilidad a ciertos cambios de su medio circundante, ya sea por interacción directa del fenolato del cromóforo con algún analito (protones en el caso de un sensor de pH) o interacción a un sitio adyacente al cromóforo (por ejemplo cloruro en un sensor de halógenos (Enterina et al., 2015).

Actualmente se han descrito novedosas variantes de proteínas fluorescentes sensibles a iones cuyo grupo de enlace con el ión forma parte del cromóforo. En ellas, el grupo hidroxifenil del cromóforo ha sido sustituido por variantes químio-sintéticas (grupos pirimidil, aril, naftil, antril, imidazolil etcétera). Estas proteínas modificadas pueden incrementar dramáticamente su fluorescencia en presencia de Zn^{2+} o Cd^{2+} (Walker et al., 2015). En otros biosensores modernos, la modificación del cromóforo se ha realizado mediante el uso de aminoácidos no naturales. En ellos, se realiza una mutación del cromóforo, en la cual se sustituye la tirosina por un aminoácido no natural distinto a la tirosina (p-azidofenilalanina para sensores de H_2S o p-aminoborofenilalanina para sensores de peroxinitrito) (Enterina et al., 2015).

Para poder ejemplificar como el uso de las proteínas fototransformables han sido aplicadas en el desarrollo de biosensores para analitos específicos tenemos al calcio (Ca^{2+}) el cual actúa como segundo mensajero en la transducción de señales de muchos eventos biológicos como la contracción muscular, transmisión neuronal, secreción y regulación hormonal (Tang et al., 2015; Pérez y Nagai, 2013).

Para estudiar la participación del calcio en estos eventos es indispensable el uso de indicadores que permitan monitorear la dinámica del calcio (Pérez y Nagai, 2013). Sin embargo muchos de los indicadores comerciales tienen la desventaja de tener baja especificidad y la pérdida de señal como consecuencia de la compartimentalización y la pobre retención del indicador después de largos periodos de observación (Horikawa, 2015).

Una alternativa para el monitoreo del calcio es el desarrollado de proteínas fluorescentes cuya fluorescencia es proporcional a la concentración de calcio intracelular durante determinados periodos de tiempo (Enterina et al., 2015). Estos indicadores reciben el nombre genérico de indicadores de calcio genéticamente codificados (GECI) que permiten marcar tipos neuronales o compartimientos celulares específicos por lo que son útiles para la visualización de pequeñas regiones durante periodos largos (Enterina et al., 2015; Rose et al., 2014). Las GECI son proteínas fluorescentes que tienen la capacidad de unirse a calcio y de modificar simultáneamente sus propiedades de absorción o de emisión (Horikawa, 2015).

Las GECI pueden ser divididas en dos clases en función del número de proteínas fluorescentes incluidas en su estructura. En la primer clase se encuentran aquellas que contienen dos secuencias de proteína fluorescente, como por ejemplo Cameleon. En la segunda clase se encuentra aquellas que solo cuentan con una proteína fluorescente. Ejemplos de esta clase son GCaMP, GECO y Camgaroo, por mencionar solo algunos (Pérez y Nagai, 2013). En cualquier caso, el cromóforo no es modificado durante el rearrreglo estructural asociado a la unión de calcio, por lo que los cambios en la fluorescencia son causados por cambios en el espectro de absorción llevando por tanto a cambios en la intensidad de fluorescencia (Horikawa 2015). Las GECI de doble proteína fluorescente toman ventaja del concepto de FRET en el cual una proteína fluorescente actúa como donador que transfiere energía la otra proteína que actúa como aceptor (Pérez y Nagai, 2013).

Camgaroo, que es una proteína fluorescente que incluye la secuencia YFP, cuyos extremos C y N terminales han sido fusionados y se han generado nuevos extremos C y N terminales entre las posiciones 145 y 146. A este procedimiento se le conoce como permutación circular (Horikawa, 2015). En estos nuevos extremos, se ha incluido la secuencia de calmodulina (CaM) de tal manera que dividen a la proteína fluorescente en dos mitades que de manera independiente son no fluorescentes. En ausencia de calcio la proteína es no fluorescente, en

caso contrario, CaM se une al calcio y se generan cambios conformacionales de la proteína que permiten la emisión de fluorescencia de la proteína (Pérez y Nagai, 2013; Horikawa, 2015).

La reconstitución de una proteína fluorescente intacta a partir de fragmentos separados es una estrategia de bio-sensado (biodetección) que ha sido ampliamente utilizada para detectar interacciones proteína – proteína. Sin embargo puede presentar pobre plegamiento de fragmentos, auto-ensamblaje indeseable, y complementación irreversible (Enterina et al., 2015).

Una estrategia similar pero que no divide la proteína fluorescente se ha seguido de las proteínas de la serie GCaMP que consiste en una modificación de la proteína fluorescente EosFP, a la cual se le ha realizado una permutación circular en la posición 149 de GFP pero además de la inserción de CAM se ha incluido el péptido de unión a calmodulina M13 en los extremos terminales resultantes (Horikawa, 2015; Fosque et al., 2015). El complejo CaM/M13 se ubica en una región cercana al cromóforo. La presencia simultánea de Ca^{2+} e irradiación con luz ultravioleta generan el complejo CaM/M13 y cambios conformacionales en la proteína fluorescente (Chen et al., 2013; Fosque et al., 2015).

Recientemente se ha descrito que algunas GECl de la serie de GCaMP tienen la posibilidad de presentar fotoconversión de verde a rojo en respuesta a la estimulación con luz azul sin perder su sensibilidad a calcio. Esta cualidad parece estar asociada a aminoácidos específicos de la proteína fluorescente. Específicamente, la valina de la posición 115 parece ser crítica para la fotoconversión de verde a rojo en GCaMP como lo demuestran los ensayos de sustitución por treonina, glicina o triptófano en los cuales la proteína resultante pierde sus cualidades fluorescentes (treonina) o pierde su capacidad de fotoconversión (glicina o triptófano) (Ai et al., 2015).

CaMPARI (integrador radiométrico fotoactivable modulado por calcio) es otro tipo de GECl, cuya característica principal es su fotoconversión dependiente

de calcio de verde a rojo. La iluminación con luz ultravioleta permite que las neuronas con niveles de actividad altos se observen en color rojo, mientras que las neuronas con baja actividad permanezcan en color verde (Enterina et al., 2015; Fosque et al., 2015). Esto ocurre debido a que la fotoconversión de verde a rojo únicamente ocurre en presencia de Ca^{2+} y en ausencia de éste mantienen su color verde. En ausencia de Ca^{2+} la proteína fluorescente solo emite fluorescencia verde (Chen et al 2013; Fosque et al 2015).

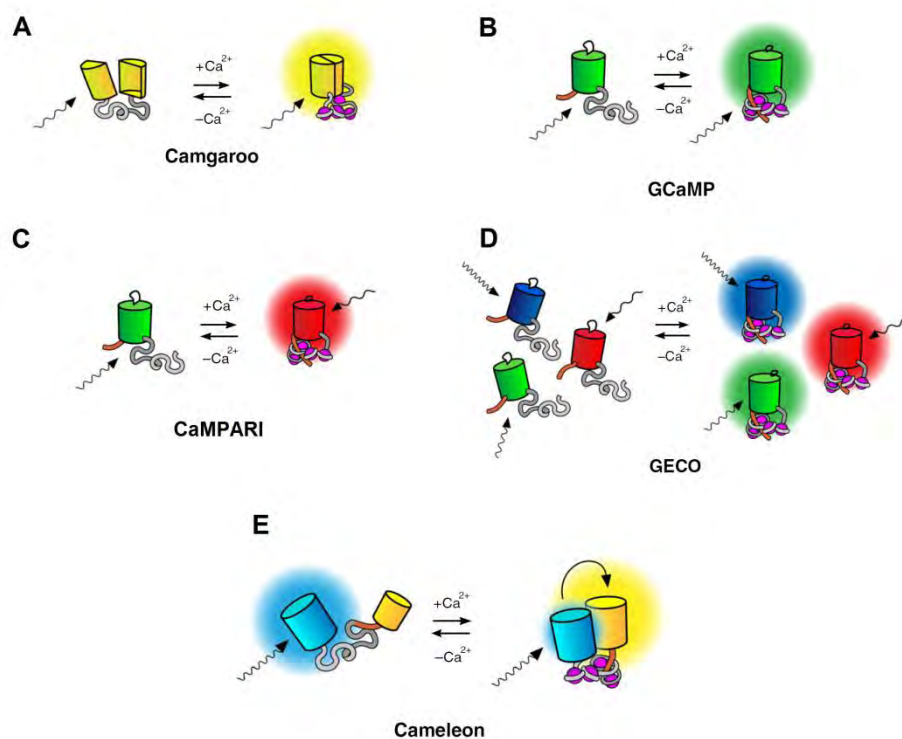


Figura 15. Ejemplo de indicadores de calcio basados en proteínas fluorescentes. A) Camgaroo, B) GCaMP, C) CaMPARI, D) GECO, E) Cameleon. Todas son proteínas quiméricas que poseen al menos una proteína fluorescente en su secuencia. La unión del calcio se realiza a través de la calmodulina que se encuentran en la estructura de cada una de las proteínas. La activación sin embargo puede ser diferente según el caso. En Camgaroo, la proteína se encuentra dividida, por lo que la unión permite que ambas mitades se acoplen, permitiéndoles la emisión de fluorescencia. CaMPARI, GECO y GCamp (o al menos algunas de sus variantes) presentan procesos de fotoconversión en presencia de calcio. Cameleon presenta un mecanismo vía FRET que le permite emitir fluorescencia distinta en presencia o ausencia de calcio.

Otro tipo de proteínas sensibles a calcio reciben el nombre genérico de GR-GECO que al igual que otras proteínas fluorescentes sensibles a calcio, se han hecho sobre la base de una permutación circular para incluir la secuencia de CAM y M13 pero mantienen su propiedad de fotoconversión verde a rojo (Hoy et al., 2013).

Cameleon es una proteína quimérica formada por dos variantes de GFP unidos covalentemente por secuencias de calmodulina (CAM) y del péptido M13. La presencia de calcio permite que se forme el complejo CAM/M13 permitiendo una estructura general más compacta y acercando físicamente a las dos variantes de GFP. La medición de la concentración de calcio es realizada por emisión FRET. Variantes de Cameleon pueden incluir a CFP, YFP, Venus o citrine (Horikawa 2015). Un resumen de las características de algunas de las proteínas sensibles a calcio se presenta en la figura 15.

La diferencia fundamental entre las diferentes clases de proteínas fluorescentes sensibles a calcio yace en el tipo de proteína fluorescente que se une a las secuencias de CAM y M13, así en GCaMP se utiliza EosFP, en GR-GECO se utiliza mApple en Cameleon se utiliza YFP/CFP aunque en otras variantes se han utilizado eCFP/Venus, o cerulean/citrine. Esta última variante además utiliza troponina c en lugar de calmodulina como proteína de enlace con el calcio (Ai et al., 2015; Horikawa, 2015; Hoy et al., 2013; Tian et al., 2013). Es interesante notar que estrictamente esta última proteína no corresponde a una proteína fototransformable clásica en las cuales la excitación de la proteína fluorescente con luz de onda específica es capaz de modificar las propiedades de emisión de luz (Adam et al., 2014; Duan et al., 2014). En cambio en Cameleon la emisión de luz se modifica si y solo si la distancia entre el motivo aceptor (en este caso la región que corresponde a YFP) y el motivo donador (la región que corresponde a CFP) es cercana a los 10 nm y esto ocurre únicamente si se forma el complejo calcio calmodulina (Hoy et al., 2013).

CONCLUSIONES

Las proteínas fluorescentes han sido herramienta importante en la investigación de los procesos celulares en los últimos treinta años. El descubrimiento creciente de nuevas proteínas con características novedosas así como el perfeccionamiento racional de las ya existentes ha permitido encontrar aplicaciones específicas para cada una de ellas aprovechando sus propiedades individuales.

En este trabajo se describió un panorama general de las proteínas fluorescentes fototransformables (PTFP) y se describieron los conocimientos actuales acerca de los mecanismos de activación de las PSFP, proteínas con capacidad de modificar reversiblemente, sus propiedades de emisión en respuesta a pulsos de luz de longitud de onda adecuada.

Las características estructurales de las PTFP las hacen ideales para el desarrollo de nuevas metodologías que aprovechen sus propiedades de fotoactivación. Al mismo tiempo es de esperar que sus propiedades permitan desarrollar biosensores que sean capaces de detectar una mayor variedad de analitos ya sea por aprovechamiento de nuevas proteínas fluorescentes o por modificación estructural de proteínas ya conocidas.

REFERENCIAS

Adam V. (2014) Phototransformable fluorescent proteins: which one for which application? Histochem Cell Biol. **142**(1):19-41

Adam V, Berardozzi R, Byrdin M, Bourgeois D. (2014) Phototransformable fluorescent proteins: Future challenges. Curr Opin Chem Biol. **20**:92-102

Ai M, Mills H, Kanai M, Lai J, Deng J, Schreiter E, Looger L, Neubert T, Suh G (2015) Green-to-Red Photoconversion of GCaMP. PLoS One. **10**(9):1-11.

Bourgeois D, Adam V (2012) Reversible photoswitching in fluorescent proteins: a mechanistic view. IUBMB Life. **64**(6):482-491.

Brakemann T, Andre CS, Weber G, Andresen M, Testa I, Grotjohann T, Leutenegger M, Plessmann U, Urlaub H, Eggeling C, Wahl MC, Hell SH, Jakobs S (2011) A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching. Nat biotech. **29**(10): 942-950

Brakemann T, Weber G, Andresen M, Groenhof G, Stiel AC, Trowitzsch S, Eggeling C, Grubmüller H, Hell SW, Wahl MC, Jakobs S (2010) Molecular basis of the light-driven switching of the photochromic fluorescent protein Padron. J Biol Chem. **285**(19):14603-9

Chang H, Zhang M, Ji W, Chen J, Zhang Y, Liu B, Lu J, Zhang J, Xu P, Xu T (2012) A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications. Proc Natl Acad Sci. **109**(12):4455-60

Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. Nature. 2013 **499**(7458):295-300.

Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. Physiol Rev.**90**(3):1103-1163.

Day RN, Davidson MW (2012). Fluorescent proteins for FRET microscopy: monitoring protein interactions in living cells. Bioessays. 2012 **34**(5):341-350.

Dedecker P, De Schryver FC, Hofkens J. (2013) Fluorescent proteins: shine on, you crazy diamond. J Am Chem Soc.**135**(7):2387-2402.

Duan C, Adam V, Byrdin M, Bourgeois D. (2014) Structural basis of photoswitching in fluorescent proteins. Methods Mol Biol.**148**:177-202.

Enterina JR, Wu L, Campbell RE. (2015) Emerging fluorescent protein technologies. Curr Opin Chem Biol. 27:10-17.

Erez Y, Gepshtein R, Presiado I, Trujillo K, Kallio K, Remington SJ, Huppert D (2011) Structure and excited-state proton transfer in the GFP S205A mutant. J Phys Chem B. **115**(41):11776-11785

Faro AR, Carpentier P, Jonasson G, Pompidor G, Arcizet D, Demachy I, Bourgeois D (2011). Low-temperature chromophore isomerization reveals the photoswitching mechanism of the fluorescent protein Padron. J Am Chem Soc.**133**(41):16362-16365.

Fosque BF, Sun Y, Dana H, Yang CT, Ohyama T, Tadross MR, Patel R, Zlatic M1, Kim DS, Ahrens MB, Jayaraman V, Looger LL, Schreier ER. (2015) Neural circuits. Labeling of active neural circuits in vivo with designed calcium integrators. Science. **347**(6223):755-60.

Fron E, Van der Auweraer M, Hofkens J, Dedecker P. (2013) Excited state dynamics of photoswitchable fluorescent protein Padron. J Phys Chem B. **117**(51):16422-16427.

Gayda S, Nienhaus K, Nienhaus GU. (2012) Mechanistic insights into reversible photoactivation in proteins of the GFP family. Biophys J. **103**(12):2521-2531

Grigorenko BL, Nemukhin AV, Polyakov IV, Khrenova MG, and Krylov AI (2015) A light-induced reaction with oxygen leads to chromophore decomposition and irreversible photobleaching in GFP type proteins. J. Phys. Chem. B. **119**: 5444–5452

Grotjohann T, Testa I, Leutenegger M, Bock H, Urban NT, Lavoie-Cardinal F, Willig KI, Eggeling C, Jakobs S, Hell SW (2011) Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP. Nature. **478**(7368):204-820.

Hoi H, Matsuda T, Nagai T, Campbell RE (2013) Highlightable Ca²⁺ indicators for live cell imaging. J Am Chem Soc. **135**(1):46-9.

Horikawa K. (2015) Recent progress in the development of genetically encoded Ca²⁺ indicators. J Med Invest. 62(1-2):24-8.

Li X, Chung LW, Mizuno H, Miyawaki A, Morokuma K (2010) Primary events of photodynamics in reversible photoswitching fluorescent protein Dronpa. J. Phys. Chem. Lett. **1**: 3328–3333

Lukyanov KA (2011) Green-red flashers to accelerate biology. Chem Biol. **18**(10):1202-1204

Mishin AS, Belousov VV, Solntsev KM and Lukyanov KA (2015) Novel uses of fluorescent proteins Curr Opin Chem Biol. **25** (27) 1-9

Miyawaki A (2013). Fluorescence imaging in the last two decades. Microscopy (Oxf). **62**(1):63-68.

Olsen S, Lamothe K, Martínez TJ. Protonic gating of excited-state twisting and charge localization in GFP chromophores: a mechanistic hypothesis for reversible photoswitching. (2010) J Am Chem Soc. **132**(4):1192-1193

Oltrogge LM1, Wang Q, Boxer SG. (2014) Ground-state proton transfer kinetics in green fluorescent protein. Biochemistry. **53**(37):5947-5957

Ong WJH, Alvarez S, Leroux IE, Shahid RS, Samma AA, Peshkepja P, Morgan AL, Mulcahy S, Zimmer M (2011) Function and structure of GFP-like proteins in the protein data bank. Mol. BioSyst. **7**:984–992

Pérez Koldenkova V1, Nagai T. (2013) Genetically encoded Ca(2+) indicators: properties and evaluation. Biochim Biophys Acta. **1833**(7):1787-97.

Péterffy JP, Szabó M, Szilágyi L, Lányi S, Ábrahám B (2015). Fluorescence of a histidine-modified enhanced green fluorescent protein (EGFP) effectively quenched by copper(ii) ions. part II. Molecular Determinants. J Fluoresc. **25**(4):871-883.

Regmi CK, Bhandari YR, Gerstman BS, Chapagain PP (2013). Exploring the diffusion of molecular oxygen in the red fluorescent protein mCherry using explicit oxygen molecular dynamics simulations. J Phys Chem B. **117**(8):2247-2253.

Remington SJ (2011) Green fluorescent protein: a perspective. Protein Sci. **20**(9):1509-1519.

Shcherbakova DM, Subach OM, Verkhusha VV (2012). Red fluorescent proteins: advanced imaging applications and future design. Angew Chem Int Ed Engl. **51**(43):10724-10738.

Shcherbakova DM, Verkhusha VV (2014) Chromophore chemistry of fluorescent proteins controlled by light. Curr Opin Chem Biol. **20**:60-8

Tang S, Reddish F, Zhuo Y, Yang JJ. (2015) Fast kinetics of calcium signaling and sensor design. Curr Opin Chem Biol. **27**:90-97.

Tian L, Hires SA, Looger LL. (2012) Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators. Cold Spring Harb Protoc **2012**(6):647-56.

Uno SN, Tiwari DK, Kamiya M, Arai Y, Nagai T, Urano Y (2015). A guide to use photocontrollable fluorescent proteins and synthetic smart fluorophores for nanoscopy. Microscopy (Oxf) **64**(4):263-277.

Walker CL, Lukyanov KA, Yampolsky IV, Mishin AS, Bommarius AS, Duraj-Thatte AM, Azizi B, Tolbert LM, Solntsev KM. (2015) Fluorescence imaging using synthetic GFP chromophores. Curr Opin Chem Biol. **27**:64-74

Warren MM, Kaucikas M, Fitzpatrick A, Champion P, Sage JT, van Thor JJ. (2013) Ground-state proton transfer in the photoswitching reactions of the fluorescent protein Dronpa. Nat Commun.**4**:1461

Winter PW, Shroff H (2014). Faster fluorescence microscopy: advances in high speed biological imaging. Curr Opin Chem Biol.**20**:46-53.

Zhou XX, Lin MZ. (2013) Photoswitchable fluorescent proteins: ten years of colorful chemistry and exciting applications. Curr Opin Chem Biol.**17**(4):682-90.

Zhou XX, Chung HK, Lam AJ, Lin MZ (2012) Optical control of protein activity by fluorescent protein domains. Science. **338**(6108): 810–814