



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA GAMA DE BIOSENSORES
FLUORESCENTES DE LA PROTEÍNA CALMODULINA
(CAM-ALEXAS)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ERIKA LEÓN CRUZ

MÉXICO, CD. DE MÉXICO

2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFRA. CASTELLANOS ROMÁN LUZ DEL CARMEN

VOCAL: PROFRA. BERNAD BERNAD MARÍA JOSEFA

SECRETARIO: PROFR. GONZÁLEZ ANDRADE MARTÍN

1er. SUPLENTE: PROFRA. FLORES ÁVILA CAROLINA

2° SUPLENTE: PROFR. MARTÍNEZ CASTILLA LEÓN PATRICIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

TORRE DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

MARTÍN GONZÁLEZ ANDRADE _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

ISABEL VELÁZQUEZ LÓPEZ _____

SUSTENTANTE:

ERIKA LEÓN CRUZ _____

CONTENIDO

RESUMEN	5
ABREVIATURAS.....	6
ANTECEDENTES	8
Proteína calmodulina	8
Calmodulina como blanco molecular de fármacos.....	10
Biosensores	11
Características específicas	13
Parámetros	14
Biosensores fluorescentes	14
Principios básicos de fluorescencia	15
Determinación de la T_m	21
Biosensores de la proteína calmodulina	22
Biosensor hCaM-mBBr	22
Gama de fluoróforos ALEXAS	23
Modificación sitio-específica	24
Reacción del grupo tiol de las cisteínas con las maleimidias	25
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
MATERIALES	27
MÉTODOS.....	27
Construcción de biosensores fluorescentes de la proteína CaM	27
Diseño de los biosensores.....	27
Mutagénesis sitio dirigida.....	27
Purificación de la proteína CaM.....	28
Seguimiento de la purificación mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE	29
Modificación química sitio-específica.....	29
Seguimiento de los biosensores en gel de poliacrilamida a través de luz UV	30
Cuantificación de la concentración de los biosensores utilizando ácido bicinconínico	30
Propiedades espectroscópicas de los biosensores	30

Determinación de las longitudes de onda de excitación y emisión de los biosensores de hCaM Alexas (hCaM AF).....	30
Rendimiento cuántico.....	32
Estabilidad termodinámica de los biosensores	32
Determinación de las k_{ds} de los biosensores utilizando clorpromazina (CPZ) ...	33
Apagamiento colisional (quenching)	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Purificación de la proteína <i>hCaM</i>	34
Modificación química y obtención de los biosensores <i>hCaM AF</i>	35
Propiedades espectroscópicas de los biosensores <i>hCaM Alexa Fluor</i>	36
Estabilidad termodinámica	40
Eficiencia cuántica	41
Determinación de las K_{ds} de los biosensores	41
Apagamiento colisional (Quenching).....	45
CONCLUSIONES.....	46
PERSPECTIVAS.....	47
REFERENCIAS.....	50

RESUMEN

Los biosensores son sistemas híbridos capaces de proporcionar información analítica cuantitativa y semicuantitativa a través de un elemento de reconocimiento molecular (receptor biológico), el cual interacciona específicamente con un analito y transduce la señal a un sistema detector de carácter espectroscópico, eléctrico, mecánico, etc. Los biosensores han adquirido importancia en los últimos años en diferentes industrias como la farmacéutica, la alimentaria, la ambiental y en el sector salud; los cuales son utilizados como herramientas biotecnológicas en el análisis, el diagnóstico y la investigación. El interés en el desarrollo de biosensores ha sido impulsado por las necesidades de contar con nuevas herramientas biotecnológicas capaces de reconocer y traducir las interacciones que presentan algunas proteínas de interés con cierto analito, así como desarrollar técnicas analíticas rutinarias y accesibles para el análisis de un gran número de muestras, con selectividad, sensibilidad y reproducibilidad. El presente trabajo consistió en la caracterización de ocho nuevos biosensores de la proteína calmodulina (CaM) acoplados a la gama de fluoróforos Alexa Fluor® maleimida (CaM-AF) con rangos de emisión de fluorescencia desde 350 a 555 nm. Estos nuevos biosensores están diseñados para evaluar biomoléculas (proteínas y péptidos), y moléculas orgánicas con actividad inhibitoria de la proteína CaM, en diferentes rangos espectroscópicos. Los parámetros utilizados para la caracterización de los biosensores de CaM-AF fueron: propiedades espectroscópicas (longitudes de excitación y emisión de fluorescencia), termoestabilidad (T_m), eficiencia cuántica (ϕ) y constante de disociación (K_d) utilizando a un ligando clásico de la CaM (clorpromazina -CPZ-).

ABREVIATURAS

ΔH_D	Entalpía de desplegamiento
ΔH_D°	Cambio de entalpía para la reacción de desplegamiento
ΔS_D	Entropía de desplegamiento
ΔS_D°	Cambio de entalpía para la reacción de desplegamiento de dos estados
Φ, φ	Rendimiento cuántico
λ	Longitud de onda
λ_{emi}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Longitud de onda máxima
A	Amperes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Fluoróforo Alexa Fluor®
BCA	Ácido bicinconínico
BW	Onda acústica a granel
Ca^{2+}	Ion Calcio
$CaCl_2$	Cloruro de calcio
CaM	Proteína calmodulina
CU (I) y (II)	Iones cuproso y cúprico
Cys	Cisteína
CPZ	Clorpromazina
DO	Densidad óptica
DTT	1,4-ditiotreitol
F_{0D}	Intensidad de fluorescencia del estado desplegado
F_{0N}	Intensidad de fluorescencia del estado nativo
FRET	Fenómeno transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
hCaM	Proteína calmodulina humana
HCl	Ácido clorhídrico
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IR	Infrarrojo
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
K_d	Constante de disociación

kDa	Kilodaltons
L_0	Concentración de ligando
L39C	Modificación del aminoácido leucina 39 por una cisteína
LB	Medio Luria-Bertani
μL	Microlitros
μM	Micromolar
M	Molar
mM	milimolar
M124C	Modificación del aminoácido metionina 124 por una cisteína
Mg^{2+}	Ion magnesio
MbBr	Fluoróforo monobromobimano
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotin adenin dinucleótido
P_0	Concentración de la proteína
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIMs	Polímeros de impresión molecular
PNAs	Ácidos nucleicos peptídicos
ppb	Partes por billón
R	Constante general de los gases
SAW	Onda acústica de superficie
s_N	Pendiente de la línea base de la pre-transición
s_D	Pendiente de la línea base de la pos-transición
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes
T	Temperatura
TPF	Trifluoperazine
T_m	Termoestabilidad
u.a.	Unidades arbitrarias
uv	Ultravioleta
V91C	Modificación del aminoácido valina 91 por una cisteína

ANTECEDENTES

Proteína calmodulina

A partir de los trabajos de Ringer, de Heilbrun y Wiercinsky, quienes reportaron que las contracciones del corazón eran dependientes del contenido intracelular del ion calcio (Ca^{2+}), y que la contracción de las fibras musculares se producía en presencia de pequeñas cantidades de este ión, fue como se dilucidó la importante función del calcio en la fisiología celular [1, 2].

Actualmente, se reconoce al Ca^{2+} como un mensajero de señalización universal que desempeña diversas funciones en los organismos eucariotes. El Ca^{2+} activa múltiples cascadas de señalización bioquímicas con la finalidad de responder a cambios en el medio ambiente, y mantener así la homeostasis celular. Sin embargo, las concentraciones de calcio también requieren ser moduladas, por lo que las células desarrollaron numerosas proteínas “sensoras” que responden a diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Entre las proteínas capaces de unir a este catión para modular la transmisión y recepción de los mensajes intracelulares, posiblemente la más estudiada y mejor caracterizada es la proteína calmodulina (CaM).

La CaM es una proteína ubicua de bajo peso molecular (16.7 kDa) conformada por 148 aminoácidos, contiene cuatro sitios de unión a Ca^{2+} con una K_d de 10^{-6} M [3]. La CaM tiene la capacidad de interactuar y regular múltiples proteínas diana, esta propiedad se debe a sus cuatro dominios estructurales denominados “EF-hand”, conformados por 2 α -hélices conectados por una asa de 12 residuos de aminoácidos, adquiriendo una estructura de mancuerna [4].

En ausencia de Ca^{2+} , las α -hélices de los motivos EF-hand están colocadas casi paralelas entre sí, a esta conformación de la CaM se le conoce como “Apo-CaM”. Sin embargo, tras la unión de Ca^{2+} a la región del bucle, la CaM presenta cambios conformacionales apreciables, donde las α -hélices de los motivos EF-hand cambian su posición relativa entre sí adoptando una conformación casi perpendicular, denominada conformación “abierta”. Este cambio permite aumentar la afinidad de unión de la CaM para cierto número de proteínas diana y ligandos. De igual manera muchos compuestos interactúan con la CaM provocando

cambios conformacionales de la proteína, entre éstos se encuentran diversos fármacos, péptidos y moléculas bioactivas. La trifluoroperazina (TFP) es un ejemplo de un fármaco que actúa como antagonista de esta proteína, la cual conduce al estado “cerrado” de la proteína (Figura 1).

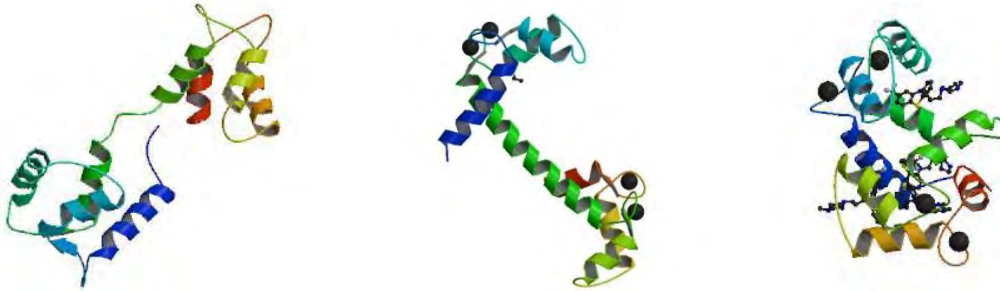


Figura 1. Estructuras de la proteína calmodulina (CaM) en diferentes conformaciones. A) CaM libre de Ca^{2+} (Apo-CaM, 1CFD.pdb), B) CaM unido a Ca^{2+} (1CLL.pdb) y C) CaM+ Ca^{2+} unidos a trifluoroperazina (TFP, 1LIN.pdb).

La concentración normal del ion calcio en casi todas las células del organismo se encuentra en el intervalo de 10^{-8} a 10^{-7} M, cantidad que es insuficiente para activar el sistema de la CaM. Sin embargo, cuando la concentración de calcio aumenta entre 10^{-6} y 10^{-5} M, el grado de unión es adecuado para desencadenar diversas acciones intracelulares de la CaM [5]. La Tabla 1, muestra algunas proteínas receptoras, canales y enzimas reguladas por la CaM en función de la concentración de calcio intracelular.

Tabla 1. Proteínas reguladas por la calmodulina (CaM)

Proteína	Descripción	Referencia
Cabin 1	Regulador transcripcional de timocitos	[6]
NAP-22	Sustrato neuronal de la proteína cinasa	[7]
Estriatina neuronal	Se asocia con la fosfatasa 2A	[8]
CAP-19 neuronal	Neuronal, motivo de unión a calmodulina IQ	[9]
Receptor de EGF humano	CaM se une a la yuxtamembrana	[10]
Miosina del músculo liso de la cadena ligera fosfatasa	Participante en la relajación/contracción muscular	[11]
Conexina 32	Localizado en las uniones gap	[12]
ChURP	Localizado en el núcleo	[13]
Proteína de unión de alto peso molecular (HHWCaMBP)	Fosfoproteína del músculo cardíaco	[14]
Glicoproteína beta-2	Proteína asociada a la membrana en el riñón	[15]
Proteínas de la retina	Participa en la transmisión sináptica neuronal	[16]
Proteínas extracelulares	Localizadas en fluidos corporales de los animales	[17]
Proteínas de esperma	Espermatocito, la reacción del acrosoma	[18]
Proteínas de levadura	Interviene en la división y crecimiento celular	[19]
Fosfatidilinositol 3-cinasa	Componente de receptor de señalización	[20]

Calmodulina como blanco molecular de fármacos.

La proteína CaM es un blanco molecular de varios fármacos debido a que participa en diversos procesos fisiológicos importantes tales como: regulación genética, síntesis de proteínas, contracción del músculo liso, transporte axonal, crecimiento celular, procesos de secreción, función de canales iónicos, motilidad celular y quimiotaxis, entre los más importantes. A través de múltiples células diana, incluyendo las enzimas solubles dependientes de calcio, canales iónicos y bombas primarias; es capaz de llevar a cabo estos procesos. En el ámbito fisiopatológico se encuentran relacionados con enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer), trastornos del comportamiento (Esquizofrenia), cáncer, susceptibilidad viral y baja respuesta inmunológica.

Se han reportado diferentes inhibidores de la proteína CaM entre los que se encuentran los antagonistas derivados de las fenotiazinas, antipsicóticos que se unen a la CaM de manera dependiente de Ca^{2+} . Existen entre 1 y 4 sitios de unión dependiente de Ca^{2+} al fármaco por cada molécula de calmodulina, con constantes de disociación en un rango de 1 a 10 μ M. La clorpromazina, la

trifluoperazine y la flufenazina son considerados inhibidores clásicos de la CaM, muestran una mayor afinidad cuando la proteína se encuentra en su forma saturada con Ca^{2+} [21]. Por ejemplo, se ha propuesto que la clorpromazina inhibe las interacciones Ca^{2+} -CaM a través de la fosfodiesterasa, impidiendo la afluencia de Ca^{2+} en concentraciones más bajas que las requeridas para inhibir la maquinaria contráctil, como en la contracción inducida por Ca^{2+} en los músculos de la piel [22].

Otros procesos fisiológicos como respuestas α -adrenérgicas, funciones catecolaminérgicas, secreción de cloruro en el intestino, la síntesis de ADN, procesos de endocitosis y exocitosis, liberación de insulina, función leucocitaria y plaquetaria, liberación de neurotransmisores y metilación de fosfolípidos son inhibidos por antipsicóticos derivados de las fenotiazinas [23].

Entre los fármacos inhibidores de la CaM también se encuentran relajantes de la musculatura lisa, antitumorales, bloqueadores α -adrenérgicos, antidepressivos, antihistamínicos, anestésicos locales y neuropéptidos.

Biosensores

Durante la segunda mitad del siglo XX, se reconoce la aparición del primer biosensor desarrollado por el bioquímico Leland Clark (1962), utilizado para la determinación de glucosa en sangre; éste consistía en una enzima (glucosa oxidasa) acoplada a un electrodo de oxígeno. Con esta invención se considera el inicio de una nueva era en la búsqueda de herramientas analíticas rápidas, sensibles y precisas; capaces de simplificar arduos procesos analíticos y la instrumentación de costo elevado que se requieren para la detección de analitos de interés [24, 25].

De acuerdo a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un biosensor se define como un dispositivo autónomo, integrado, capaz de proporcionar información analítica cuantitativa y semicuantitativa; a través de un elemento de reconocimiento molecular (receptor biológico), que se encuentra en contacto directo con un elemento de transducción [26]. El elemento biológico provee una especificidad de reconocimiento molecular y al estar en contacto con

un elemento transductor, generalmente de tipo fisicoquímico, el cual puede ser óptico, piezoeléctrico o electroquímico, son capaces de generar una señal cuantificable y analizable.

Los biosensores son utilizados principalmente para determinar la presencia y la concentración de analitos de interés, siendo de mayor aplicación en la industria farmacéutica, alimentaria, ambiental y en el sector salud. Su investigación y desarrollo es amplio, contando con la aportación de disciplinas como la bioquímica, la biología molecular, la físico-química, la química analítica, la electroquímica, la electrónica y la ingeniería en software. Entre muchas de las aplicaciones de estos dispositivos se encuentra la detección oportuna de diversas enfermedades, de tipo cardiovascular, diabetes, cáncer, así como para la evaluación de la toxicidad de diferentes analitos, detección de patógenos y biorremediación [27]. Existe una diversa gama de biosensores, en la Tabla 2 se muestra una clasificación de este tipo de dispositivos.

Tabla 2. Clasificación de los biosensores.

Tipo de interacción	Detección de la interacción
<ul style="list-style-type: none"> ● Biocatalítica ● Bioafinidad 	<ul style="list-style-type: none"> ● Directa ● Indirecta
Elemento de reconocimiento	Tipo de transducción de señales
<ul style="list-style-type: none"> ● Biológico <ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteínas ▪ Enzimas ▪ Organelos ▪ Anticuerpos ▪ Receptores ▪ Ácidos nucleicos ▪ Células ▪ Tejidos ● Sintético <ul style="list-style-type: none"> ▪ PIMs ▪ Aptámeros ▪ PNAs 	<ul style="list-style-type: none"> ● Electroquímicos <ul style="list-style-type: none"> ▪ Amperométrico ▪ Potenciométrico ▪ Conductimétrico ● Ópticos <ul style="list-style-type: none"> ▪ Colorimétrico ▪ Fluorimétrico ▪ IR ▪ Fibra óptica ● Piezoeléctrico <ul style="list-style-type: none"> ▪ Onda acústica a granel (BW) ▪ Onda acústica de superficie (SAW) ● Termométrico ● Nanométrico

Tomada de Evtugyn, Gennady, 2014 [28].

La elección del material biológico/biomimético depende de las características del compuesto a analizar. Por otra parte, la elección del transductor estará condicionado por el tipo de elemento de reconocimiento molecular elegido, ya que éste determinará cuál será la variación en las propiedades físico-químicas que ocurra como consecuencia de la interacción con su analito.

Este tipo de dispositivos tienen características y parámetros específicos, entre los más importantes se encuentran [29]:

Características específicas

- 1. Bajo costo de producción.** Los biosensores puedan ser fabricados en escala pequeña, pero deben poderse escalar a nivel industrial con el fin de disminuir costos de producción, para aumentar su rentabilidad.
- 2. Pre-tratamiento de la muestra.** En lo posible, los biosensores deben ser capaces de monitorear o analizar muestras con mínimo o ningún pre-tratamiento de la muestra.
- 3. Manejo sencillo.** La tecnología del uso de biosensores debe ser lo suficientemente sencilla como para no exigir personal altamente calificado para su empleo.
- 4. Portátiles.** Los biosensores deben ser dispositivos portátiles para poder realizar análisis “*in vitro*” o “*in situ*”.
- 5. Automatizables.** En su aplicación industrial esta característica es fundamental, ya que evita la manipulación humana y errores que pueda contraer, así como alta eficiencia y productividad.
- 6. Multianálisis.** En la actualidad la búsqueda de biosensores que sean capaces de determinar simultáneamente diferentes analitos es cada vez mayor, ya que permitiría profundizar el análisis.

Desventajas. A pesar de las características favorables de estos dispositivos respecto a los sensores convencionales poseen algunas desventajas, debido a que al estar formados de componentes biológicos y de acuerdo a su naturaleza, éstos requieren condiciones controladas de pH, temperatura, fuerza iónica, etc.

Parámetros

1. **Especificidad.** El biosensor debe tener la capacidad para poder discriminar un analito entre diferentes sustancias.
2. **Sensibilidad.** Para poder ser utilizados en el análisis de diferentes analitos, detectando cantidades de partes por billón (ppb), y en casos especiales alcanzar cantidades femtomolares (10^{-15} M).
3. **Tiempo de respuesta.** Los biosensores deben tener tiempos de análisis mínimos para cuantificar el compuesto bajo análisis.
4. **Tiempo de recuperación.** Este tiempo comprende el intervalo entre que un biosensor analiza una muestra y esté listo para analizar la próxima muestra, este parámetro debe ser corto con la finalidad de poder automatizar los análisis.
5. **Tiempo de vida.** El tiempo de vida se determina por la estabilidad del material selectivo, de manera que éste debe ser prolongado para que no obligue al empleo del dispositivo tras un corto período de fabricación, ni a sustituciones frecuentes del mismo.

Biosensores fluorescentes

Los biosensores fluorescentes son dispositivos construidos con fluoróforos como elemento transductor, unido de manera covalente a un elemento de reconocimiento molecular como una proteína de interés. En el caso de nuestro grupo de trabajo, se han construido una serie de biosensores de la proteína CaM con diferentes fluoróforos para analizar distintos tipos de ligandos de esta proteína, así como para estudiar las interacciones con otras proteínas que modula la CaM [30-34]. El interés en el desarrollo de biosensores ha sido particularmente impulsado por las necesidades de contar con nuevas herramientas tecnológicas para caracterizar las interacciones que presentan algunas proteínas de interés, así como desarrollar a futuro técnicas analíticas rutinarias y accesibles para el análisis de un gran número de muestras, con selectividad, sensibilidad y reproducibilidad.

La estrategia en la construcción de estos biosensores comprende tres etapas. I) Un diseño racional de la posición donde se va a marcar de manera

específica a la proteína en cuestión, haciendo uso de herramientas computacionales tales como visualizadores moleculares, datos del área accesible a superficie e información de regiones de interacción, etc. II) Mutagénesis sitio-dirigida con la cual reemplazamos un aminoácido en particular por un residuo de cisteína y con el grupo tiol altamente reactivo. III) un marcaje sito-específico con compuestos fluorescentes reactivos específicos a los grupos tioles de las cisteínas (Figura 2).



Figura 2. Estrategia general en la construcción de biosensores, usando diseño racional, mutagénesis sitio-dirigida y marcaje sitio-específico.

Principios básicos de fluorescencia

La fluorescencia es uno de los métodos más empleados en los estudios biológicos (ensayos “*in situ*”, “*in vivo*”, pruebas médicas, etc.), y se ha convertido en una herramienta bioanalítica y de diagnóstico en términos de versatilidad; por lo que múltiples biosensores han sido diseñados bajo sus principios [35]. Una de las razones del auge de la espectroscopía de fluorescencia fue debido a que, en la década de 1980, estuvieron disponibles las primeras sondas de fluorescencia sintetizadas químicamente para analitos específicos. Éstas eran diseñadas a fin de incluir en la misma molécula dos principales características, la afinidad específica para el ligando y la capacidad de cambiar alguna propiedad intrínseca

fluorescente tras la unión del mismo [36]. En los últimos años, se ha observado un progreso en la síntesis de nuevas sondas químicas como sensores de fluorescencia, las cuales son acoplados principalmente a proteínas y enzimas (biosensores). Estos son utilizados para una amplia detección de analitos bioquímicos de forma robusta, se aprovecha la selectividad y alta afinidad de las proteínas por sus ligandos particulares. Entre las principales ventajas de utilizar proteínas como parte de los biosensores fluorescentes encontramos su alta especificidad, estabilidad, solubilidad en diferentes soluciones, un bajo costo en el diseño, proteínas de diferentes organismos, obtención de éstas por biotecnología, etc. Con el progreso de la ingeniería genética, mediante mutagénesis sitio dirigida, se ha permitido modificar las secuencias de aminoácidos y cambiar algunas propiedades de las proteínas para favorecer la construcción de los biosensores.

La espectrometría de fluorescencia, o también llamada espectrofluorimetría, relaciona los estados vibracionales y electrónicos de las moléculas y átomos. La fluorescencia se define como la luz emitida por una molécula consecuentemente de la absorción de energía electromagnética [37]. Las moléculas con propiedades de fluorescencia se denominan fluoróforos. La forma en que una molécula absorbe radiación electromagnética es por medio de un proceso mecánico cuántico, donde una molécula en un estado basal pasa a un estado excitado de alta energía, para su posterior retorno a su estado original con la producción del fenómeno de fluorescencia.

Los estados electrónicos de las moléculas excitadas se pueden agrupar en dos categorías: estados singlete y triplete (Figura 3). En el estado excitado singlete, un electrón en un orbital excitado está apareado (spin opuesto) a un segundo electrón en un orbital en el estado basal, de manera que todos los electrones en la molécula tienen sus spins apareados, como ocurre en la fluorescencia. Sin embargo, en el estado triplete un par de electrones tienen sus spins desapareados, esto es el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación que un electrón en el estado basal. La fosforescencia es la emisión de luz de estados excitados triplete.

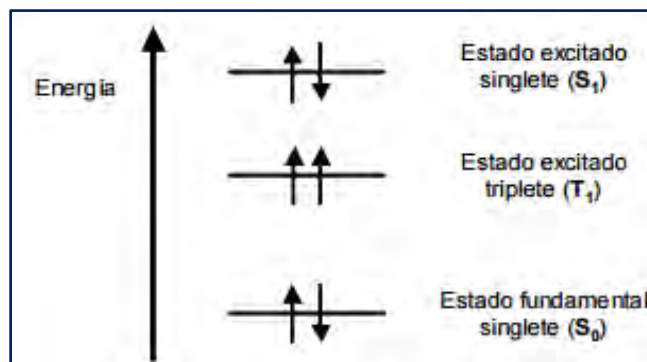


Figura 3. Estado fundamental singlete (S_0) de una molécula y estados excitados singlete (S_1) y triplete (T_1). Los símbolos ($\uparrow\downarrow$) y ($\uparrow\uparrow$) representan pares de electrones apareados y desapareados, respectivamente.

El fenómeno de fluorescencia se inicia cuando una molécula en estado electrónico basal absorbe un fotón de alta energía, sufriendo una excitación electrónica y algunos de sus electrones son promovidos a orbitales moleculares de mayor energía. Posteriormente, los electrones excitados regresan nuevamente a orbitales de menor energía emitiendo luz a longitud de onda mayor.

Dentro de cada uno de estos estados electrónicos hay diferentes estados vibracionales. Los niveles vibracionales, existen debido a que una molécula en un estado electrónico puede absorber pequeños incrementos de energía, aunque mantiene la misma configuración electrónica. Como las moléculas pueden caer en cualquiera de los diferentes niveles de vibración al regresar al estado basal, los fotones emitidos tendrán diferentes energías y por lo tanto diferentes frecuencias. Los procesos de absorción y emisión se representan generalmente mediante un diagrama de Jablonski (Figura 4).

Los espectros de excitación y emisión regularmente tienen un carácter simétrico. En la mayoría de los casos siguen la regla de “*imagen de espejo de Frank-Condon*”, la cual plantea que todas las transiciones electrónicas son verticales, y sin cambios en la posición de los núcleos [38].

Los fluoróforos se caracterizan por tener espectros de absorción y emisión definidos. Sin embargo, existe una diferencia entre los máximos de absorción y emisión, ya que la intensidad de fluorescencia emitida varía en relación con la longitud de excitación, pero no varía la distribución del espectro (Regla de Stokes).

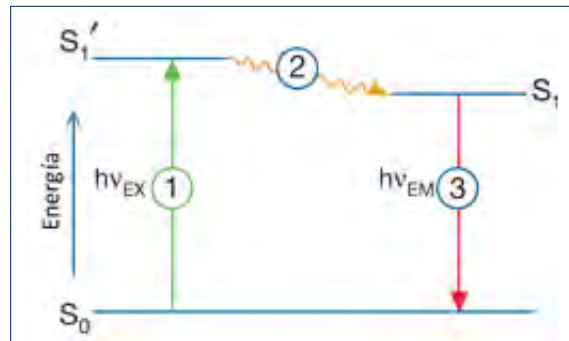


Figura 4. Diagrama de Jablonski. En este diagrama se muestra el proceso implicado en la formación de un estado singlete excitado por absorción óptica y consecuente emisión de fluorescencia. *Etapa 1:* Excitación, un fotón de alta energía $h\nu_{EX}$ es suministrado a una molécula por una fuente externa, creando un estado excitado (S_1'). *Etapa 2:* El estado excitado dura alrededor de 1 a 10 nanosegundos donde el fluoróforo sufre cambios conformacionales y está sujeto a una multitud de posibles interacciones con su entorno molecular, así la energía de S_1' es parcialmente disipada, produciendo un estado excitado singlete relajado (S_1) desde el que se origina la emisión de fluorescencia. *Etapa 3:* Emisión de la fluorescencia, un fotón de energía $h\nu_{EM}$ es emitido y la molécula retorna a su estado fundamental S_0 .

Estas moléculas con capacidad de fluorescencia se clasifican en dos categorías dentro de las biomoléculas: fluoróforos intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos se encuentran de manera natural, y corresponden principalmente a los aminoácidos aromáticos de las proteínas (triptófano, tirosina y fenilalanina; Figura 5), así como las flavinas, derivados del piridoxal, NADH y la clorofila. Los fluoróforos extrínsecos son aquellos que se adicionan de forma sintética a una molécula (biomolécula), con la finalidad de proveer fluorescencia cuando estas carecen de esta propiedad. Estos compuestos han sido desarrollados ampliamente para diversos propósitos y aplicaciones, que van desde el monitoreo de la función celular usando indicadores fluorescentes o moléculas para varias especies bioquímicas (Ca^{2+} , Mg^{2+} , pH, ácidos nucleicos, etc.) o bien, la demarcación de los tumores con una clase relativamente reciente de fluoróforos extrínsecos [39].

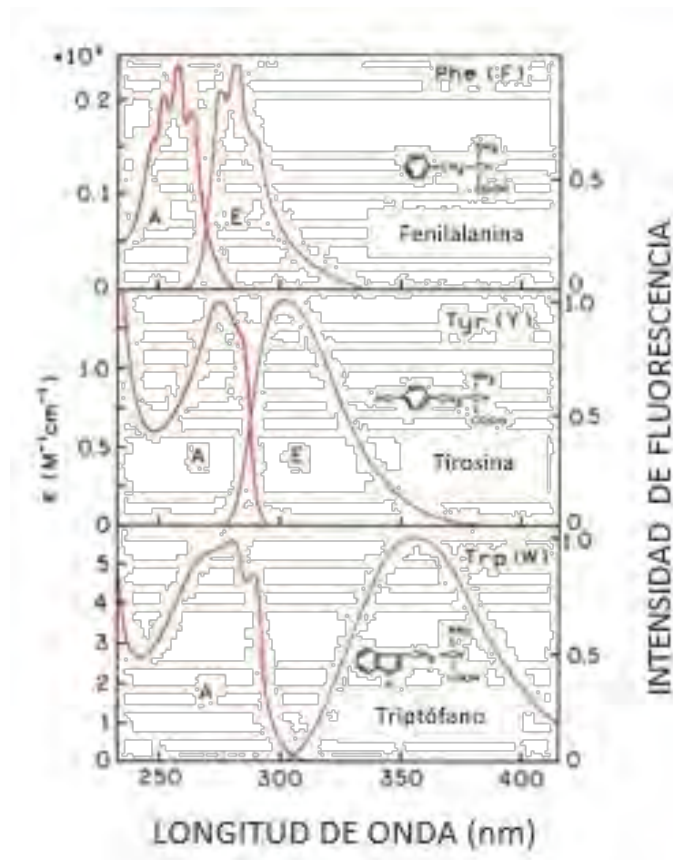


Figura 5. Espectros de absorción (A) y emisión (E) de los aminoácidos aromáticos en las proteínas [38].

Una variedad de compuestos fluorescentes para derivatizar están disponibles en el mercado actualmente: iodoacetamidas y maleimididas, las cuales se usan típicamente para marcar grupos sulfhidrilos, isotiocianatos y cloruros sulfonilos se utilizan para marcar aminas.

En el caso de la monitorización de la función celular y distribución química, muchos colorantes con propiedades fluorescentes se pueden obtener comercialmente para la mayoría de las especies celulares más comunes (Tabla 3).

Tabla 3. Ejemplos de fluoróforos.

Aceptor	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Fluorescein (FITC, FAM)	494	518
TET	525	540
HEX; JOE; VIC; CAL Fluor Orange 560	535	555
ROX (5/6-carboxy Rhodamine); LC Red 610; Red 610	575	605
Rhodamine 101	496	520
Texas Red; LC Red 610, CAL Fluor Red 610	590	610
Cy2	489	506
Cy3; NED; Quasar 570; Oyster 556	550	570
Cy5; LCRed 670; Quasar 670; Oyster 645	649	670
Tetramethyl Rodhamine (TAMRA, TMR, TRITC)	555	580
Acridine orange	500	530
Bodipy 530/550	534	554
BODIPY TR-X	588	616
LC Red 640; Call Fluor Red 635	625	640
Nile Red	485	525
Oregon Green 488	493	520
YOYO-1	493	520
YOYO-2	612	631
Ca-Green	506	534
Ca-Orange	555	576
Ca-Crimson	588	610
Mg-Green	506	532
Na-Green	507	532
Oxonol V	610	639
Proteínas fluoróforas/ fluorescentes		
EGFP	489	508
dsRED	558	583
B-Phycoerythrin	546, 565	575
R-Phycoerythrin	480, 546, 565	578
Allophycocyanin	650	660

Tomada de Butlin N., Corneillie T., & Xu J., 2008 [40].

El tiempo de vida de la fluorescencia y el rendimiento cuántico son los principales parámetros a caracterizar de un fluoróforo. El rendimiento cuántico es el número de fotones emitidos con respecto al número de fotones absorbidos. La relación se muestra a continuación:

$$\Phi F = \frac{\text{fotones emitidos}}{\text{fotones absorbidos}}$$

y se obtiene mediante la comparación de la intensidad de fluorescencia de la molécula en cuestión, con la de una molécula de referencia con un rendimiento cuántico conocido [41].

Las sustancias con los mayores rendimientos cuánticos, muestran las emisiones más brillantes y requieren que se produzca menos luz de excitación de fluorescencia.

El tiempo de vida es el tiempo disponible para que un fluoróforo interactúe con su entorno, y nos proporcione la información disponible a partir de su emisión. Así, la media del tiempo durante el cual las moléculas permanecen excitadas puede oscilar entre los nanosegundos (10^{-9} s) y los picosegundos (10^{-12} s) o milisegundos (10^{-3}) a 1 segundo, y esto depende si una molécula presenta el fenómeno de fluorescencia o fosforescencia.

Determinación de la T_m

La estructura tridimensional de una proteína en condiciones fisiológicas se conoce como estructura nativa, y se considera la estructura más estable y activa que permite su funcionalidad. Si cambiamos las condiciones ambientales, la estructura nativa se pierde, este proceso se denomina desnaturalización [42]. La desnaturalización de una proteína puede ser inducida por cambios en los valores de pH, fuerza iónica, por la presencia de sales inorgánicas, disolventes orgánicos o por la variación en la temperatura. Cuando una proteína que se encuentra en solución y se somete a un incremento de temperatura gradual, sus propiedades fisicoquímicas cambian. Este incremento gradual lleva a un cambio conformacional conocido como desnaturalización térmica. La temperatura en el punto medio de este proceso se conoce como temperatura de fusión de la proteína, T_m por sus siglas en inglés (melting temperature).

Por lo tanto, uno de los parámetros que nos describen la estabilidad de las biomoléculas es la T_m , el cual es ampliamente utilizado para caracterizar termodinámicamente a las proteínas. Por ejemplo, cuando se realiza una mutación en un aminoácido de una proteína y se quiere conocer la contribución energética asociada a esta mutación. En el caso de los biosensores la T_m es un parámetro

que se utiliza para conocer la contribución energética de la mutación y la de la modificación química con el componente transductor [43].

Biosensores de la proteína calmodulina

Debido a que la proteína CaM modula actividades de diversas proteínas estructurales y de transporte, así como la función de enzimas dependientes de Ca^{2+} , que en distintos padecimientos se encuentran afectadas; resulta un excelente sistema biológico para el desarrollo de biosensores enfocados al descubrimiento de moléculas bioactivas (fármacos). Estos son utilizados como una herramienta de investigación para estudiar los procesos fisiológicos mediados por esta proteína o en la búsqueda de nuevas entidades químicas con posibles propiedades farmacológicas.

Biosensor hCaM-mBBr

Entre los biosensores fluorescentes de la proteína CaM, se encuentran los biosensor *hCaM-mBBr* descritos por González-Andrade y colaboradores [30, 31], los cuales consisten en la proteína calmodulina humana como elemento de reconocimiento molecular unido químicamente a un fluoróforo llamado monobromobimano (*mBBr*) en posiciones específicas. Estos biosensores permiten la detección de una señal fluorescente al unir varios ligandos como Ca^{2+} , inhibidores o antagonistas de CaM en solución (clorpromazina y trifluoperazine e inhibidores naturales como el hidrato de tajixantona). La posición donde se encuentra el aminoácido 124 (Metionina 124), es muy susceptible a los inhibidores clásicos de esta proteína. Sin embargo, las posiciones L39/V91 se evaluaron como posiciones que al ser mutadas detectarían la extinción de fluorescencia al unir inhibidores clásicos, no clásicos y calcio. González-Andrade y colaboradores demostraron que la afinidad de TPF por *hCaM L39/V91C-mBBr*, y muy probablemente de otros inhibidores clásicos, está influenciada por la concentración de Ca^{2+} de manera dependiente, en una relación 10:1 μM . Algunos ligandos absorben a longitudes de ondas cercanas a las de excitación y/o emisión para los biosensores *hCaM* conocidos. Por lo tanto, surge la necesidad de contar

con nuevos biosensores de la proteína CaM con diferentes propiedades espectroscópicas para aquellas moléculas que compartan propiedades fluorescentes similares a las de los biosensores ya descritos.

Gama de fluoróforos ALEXAS

Entre los diversos fluoróforos conocidos comercialmente se encuentran una gama extensa de fluoróforos llamada Alexa Fluor[®], los cuales son denominados según el tipo de longitud de onda a la que absorben (Figura 6 y Tabla 4).

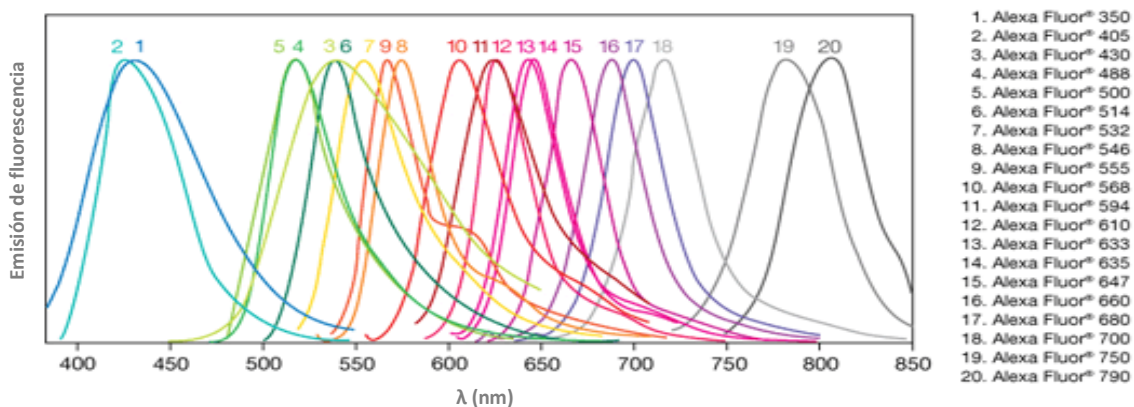


Figura. 6 Los espectros de emisión de la serie Alexa Fluor. (Tomada de <https://www.thermofisher.com>)

Entre las propiedades que comparten estos fluoróforos se encuentran una adecuada adaptación a las principales longitudes de onda de salida de fuentes de excitación comunes, fluorescencia brillante y altamente fotoestables, buena solubilidad en agua, lo que permite que los fluoróforos sean fáciles de conjugar a las proteínas. Los conjugados son generalmente estables en condiciones de almacenamiento estándares. Los espectros son bien diferenciados, al proporcionar muchas opciones de detección multicolor, altos rendimientos cuánticos y tiempos de vida de fluorescencia largos, e insensibilidad de los espectros de absorción y emisión a pH en un amplio intervalo (Thermo Fisher Scientific).

Tabla 4. Propiedades espectrales de los fluoróforos Alexa Fluor.

Alexa Fluor	Absorción máx. (nm) ¹	Emisión máx.(nm)	Color de emisión ²	Coefficiente de extinción
Alexa Fluor [®] 350	346	442	Azul	19,000
Alexa Fluor [®] 405	402	421	Azul	35,000
Alexa Fluor [®] 430	434	539	Verde-Amarillo	15,000
Alexa Fluor [®] 488	495	519	Verde	73,000
Alexa Fluor [®] 514	518	540	Verde	80,000
Alexa Fluor [®] 532	531	554	Amarillo	81,000
Alexa Fluor [®] 546	556	573	Naranja	112,000
Alexa Fluor [®] 555	555	565	Naranja	155,000
Alexa Fluor [®] 568	578	603	Rojo-Naranja	88,000
Alexa Fluor [®] 594	590	617	Rojo	92,000
Alexa Fluor [®] 610	612	628	Rojo	144,000
Alexa Fluor [®] 633	632	647	Cercano a rojo	159,000
Alexa Fluor [®] 635	633	647	Cercano a rojo	140,000
Alexa Fluor [®] 647	650	668	Cercano a rojo	270,000
Alexa Fluor [®] 660	663	690	Cercano a IR *	132,000
Alexa Fluor [®] 680	679	702	Cercano a IR *	183,000
Alexa Fluor [®] 700	702	723	Cercano a IR *	205,000
Alexa Fluor [®] 750	749	775	Cercano a IR *	290,000
Alexa Fluor [®] 790	782	805	Cercano a IR *	260,000

¹ Absorción aproximada y máximos de emisión, en nm, para los conjugados.

² Color de emisión típica visto a través del ocular de un microscopio de fluorescencia convencional con filtros adecuados.

³ Coeficiente de extinción del colorante reactivo en máximo de emisión en $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

*La visión humana es insensible a la luz más allá de $\sim 650 \text{ nm}$; no es posible ver directamente colorantes lejanos al rojo y cerca a IR fluorescentes. (Tomada de <https://www.thermofisher.com>).

Modificación sitio-específica

Las proteínas en su estructura molecular suelen tener dos o más cisteínas (Cys), este aminoácido en su cadena lateral posee un grupo sulfhidrilo llamado tiol (-SH), que a diferencia de otros grupos laterales se encuentran escasamente presentes, lo que hace selectiva la unión del fluoróforo a este grupo químico. Por otra parte, la unión de dos cisteínas origina la formación de un puente disulfuro, debido a la oxidación de los grupos tioles, que permite la unión de distintas cadenas polipeptídicas (base de la estructura de la proteína terciaria o cuaternaria) proporcionándoles buena estabilidad. Al realizar la modificación química (etiquetado) con los fluoróforos, se ha observado que ésta no modifica significativamente la estructura de la proteína [42]. Finalmente, el número de grupos sulfhidrilos libres para colocar la etiqueta fluorescente pueden ser

controlados o modificados, ya que pueden ser generados por reducción de los puentes disulfuros nativos o introducidos en las moléculas de manera química, usando reactivos sulfhidrilos de adición en reacción con aminas primarias, o bien por modificación genética como es nuestro caso.

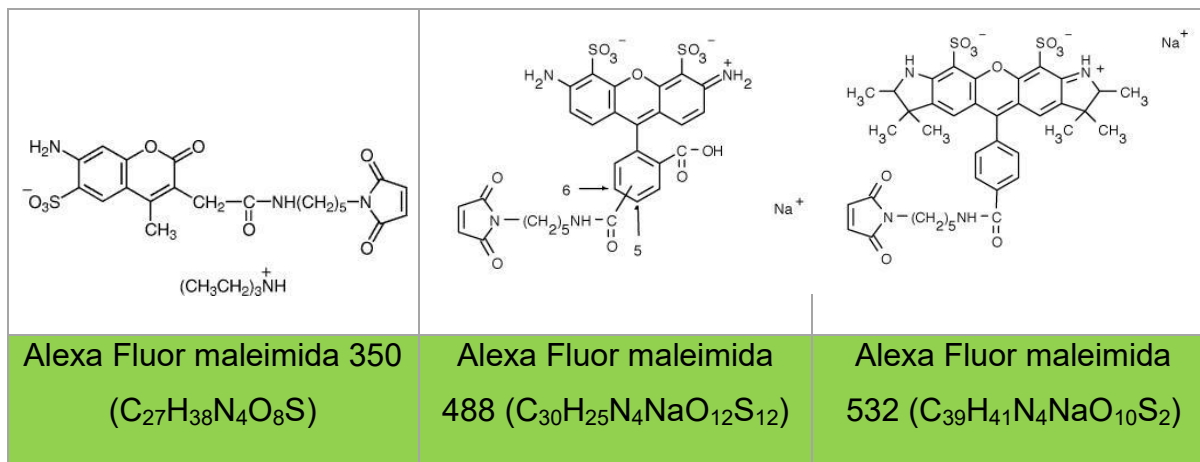


Figura 7. Fluoróforos Alexa Fluor maleimida. (Tomada de <https://www.thermofisher.com>)

Reacción del grupo tiol de las cisteínas con las maleimidias

El grupo maleimida reacciona óptimamente con grupos sulfhidrilo cuando la mezcla de reacción se encuentra en un intervalo de pH entre 6.5 y 7.5, siendo el resultado un enlace tioéter estable e irreversible, puesto que el enlace no puede escindirse con agentes reductores (Figura 8).

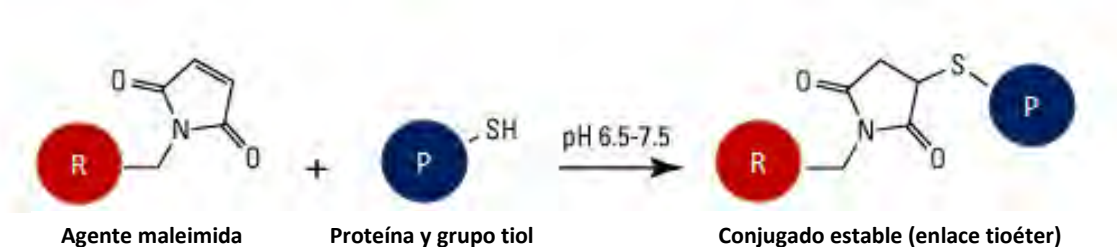


Figura 8. Esquema de reacción para la conjugación química entre la maleimida y un grupo tiol. (R) representa el extremo del grupo maleimida; (P) representa una proteína u otra molécula que contiene el grupo funcional diana, es decir, el grupo tiol (Tomada de <https://www.thermofisher.com>).

OBJETIVO GENERAL

Caracterización de nuevos biosensores de la proteína CaM, contruidos con la gama de fluoróforos Alexa Fluor® maleimida con rangos de emisión de fluorescencia desde 350 a 555 nm; para contar con un mayor intervalo espectroscópico de muestreo para la evaluación de biomoléculas (proteínas y péptidos) y nuevos compuestos con actividad inhibitoria de la proteína CaM.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Purificar la proteína CaM silvestre, una mutante sencilla y una doble mutante (CaM M124C y CaM L39C/V91C).
2. Realizar la modificación química de las mutantes con los fluoróforos Alexa Fluor® maleimida en el rango de 350-555 nm.
3. Estudiar las propiedades espectroscópicas de los ocho nuevos biosensores *hCaM* M124C AF₃₅₀, *hCaM* M124C AF₄₄₈, *hCaM* M124C AF₅₃₂, *hCaM* M124C AF₅₅₅, *hCaM* L39C/V91C AF₃₅₀, *hCaM* L39C/V91C AF₄₄₈, *hCaM* L39C/V91C AF₅₃₂ y *hCaM* L39C/V91C AF₅₅₅.
4. Determinar la T_m de los nuevos biosensores.
5. Calcular la K_d de los biosensores utilizando la CPZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

La mayoría de los reactivos se adquirieron a partir de Sigma Aldrich S.A. de C.V., México. Los fluoróforos Alexa Fluor® Dyes se adquirieron de la compañía Thermo Fisher Scientific Inc.

MÉTODOS

Construcción de biosensores fluorescentes de la proteína CaM

Diseño de los biosensores

Las posiciones 124, 39 y 91 utilizadas para la construcción de los ocho nuevos biosensores fueron diseñados en trabajos previos [44, 45]. Donde fueron consideradas las áreas accesibles al solvente, que las posiciones a marcar estuvieran en estructuras tipo α -hélices, que los residuos a modificar estuvieran cerca de la interacción con sus ligandos (CPZ o Ca^{+2}). Posteriormente, se construyeron los ocho modelos estructurales de los biosensores correspondientes (*hCaM M124C AF₃₅₀*, *hCaM M124 AF₄₈₈*, *hCaM M124C AF₅₃₂*, *hCaM M124C AF₅₅₅*, *hCaM L39C/V91C AF₃₅₀*, *hCaM L39C/V91C AF₄₈₈*, *hCaM L39C/V91C AF₅₃₂* y *hCaM L39C/V91C AF₅₅₅*), empleando el programa Hyperchem™ Release 7.5, y los archivos de la CaM a partir del Protein Data Bank (PDB) en su conformación unida a Ca^{2+} (Conformación “abierta”, 1CLL.pdb) y unida al fármaco trifluoroperazina (Conformación “cerrada”, 1A29.pdb).

Mutagénesis sitio dirigida

Las mutantes con una única cisteína reactiva, se construyeron a partir del plásmido pET12b-CAML1, el cual contiene al gen correspondiente a la proteína CaM de humano y el vector de expresión con resistencia al antibiótico ampicilina. La mutagénesis sitio dirigida se realizó con el Quick Change Kit (Stratagene, La Jolla, CA. USA) utilizando la enzima *Pfu*, siguiendo las especificaciones del proveedor. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones: la cantidad de plásmido pET12b-CAML1 utilizado fue de 100 ng y la de los oligonucleótidos fue de 125 ng, 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1

minuto, hibridación a 55 °C por 1 minuto y polimerización a 68 °C por 10 minutos. Los oligonucleótidos utilizados para obtener las mutantes fueron: para la mutante con una única cisteína reactiva en la posición 124 (M124C): 5'-GTA GAT GAA TGT ATC AGA GAA GC-3' y 5'-GCT TCT CTG ATA CAT TCA TCT AC-3'. Para la doble mutante en las posiciones 39 y 91 los oligonucleótidos fueron: posición 39 (L39C) 5'-CAT GAG GTC ATG TGG TCA GAA CCC-3' y 5'-GGG TTC TGA CCA CAT GAC CTC ATG-3' y posición 91 (V91C) 5'-GGC ATT CCG ATG CTT TGA CAA GG-3' y 5'-CCT TGT CAA AGC ATC GGA ATG CC-3'. Después de la PCR, el producto de amplificación se digirió con la enzima *DpnI* y se usó para transformar células competentes DH5 α , siguiendo las indicaciones del vendedor. Las mutaciones se confirmaron por la secuenciación del vector con un Genetic Analyzer ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer Applied Biosystems) en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.

Purificación de la proteína CaM

Se utilizaron cepas comerciales de *Escherichia coli* BL21-AI™ (Invitrogene Corp. Carlsban, CA), que fueron inoculadas en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB), con 100 μ g/mL de ampicilina. Las bacterias fueron crecidas durante toda la noche a 37 °C con una velocidad de agitación de 250 rpm. Cuando la DO₆₀₀ fue entre 0.8 y 1.0, los 10 mL de este medio fueron inoculados en 500 mL de medio LB, induciendo con 1 g de L-Arabinosa (0.2%) y 0.06 g de IPTG (0.5 mM). El cultivo se creció durante 8 horas a 37 °C a una velocidad de agitación de 250 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos; el paquete celular fue resuspendido en 200 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 y se centrifugó a 4500 RCF durante 15 minutos. El paquete celular obtenido se resuspendió en 50 mL de amortiguador de lisis, el cual contenía Tris-HCl 50 mM, DDT 1 mM, EDTA 2 mM y pH 7.5. Finalmente, se adicionó lisozima a una concentración final de 200 μ g/mL, seguido de una incubación en hielo durante 40 minutos. Las bacterias se sonicaron en un Ultrasonic Homogenizer con pulsos de 5 minutos a una amplitud de 35 %, durante 3 veces con intervalos de descanso. Los restos celulares se sedimentaron a 14000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se removió y se

adicionó CaCl_2 y NaCl a concentraciones finales de 5 mM y 500 mM respectivamente; posteriormente el sobrenadante se colocó en una columna de intercambio hidrofóbico (Phenyl-Sepharose CL-4B), previamente equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, DTT 0.5 mM, CaCl_2 0.1 mM y NaCl 500 mM. La proteína CaM fue eluida con amortiguador de elusión que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM y NaCl 150 mM. Finalmente se pasa por una columna de exclusión molecular (superdex 75). El seguimiento de la purificación se realizó usando utilizando electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE al 12%).

Seguimiento de la purificación mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Se realizó una visualización de la purificación de la proteína CaM, empleando geles de poliacrilamida SDS-PAGE con un gel separador al 12 % y un gel concentrador al 5 %. Las proteínas se calentaron por 10 minutos a 98°C y se dejaron reposar a 20°C por 10 minutos. Se tomó 20 μL de cada una de las muestras y 10 μL de amortiguador de carga, colocándolas en cada carril con un tiempo de corrida de aproximadamente 2 horas y a 20 Amperes. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie por una hora y después se destiñeron con una solución de etanol al 50% y ácido acético al 10%.

Modificación química sitio-específica

La modificación química sitio-específica de las proteínas mutantes purificadas, se realizó incubando éstas con DTT 20 nM y protección a la luz durante 12 h a 4 °C. Posteriormente, se realizó un desalado mediante una columna de filtración HR-100 (Pharma-Biotech) para eliminar el exceso de DTT. La modificación química de las mutantes se realizó inmediatamente con un exceso de 10 veces de fluoróforo con respecto a la proteína CaM. Esta reacción se dejó incubando por 24 h con protección a la luz (Fig.7). La proteína modificada químicamente se lavó con el objetivo de eliminar el exceso de fluoróforos y se concentró, utilizando amicones con un corte de 10000 kD, para después determinar su concentración.

Seguimiento de los biosensores en gel de poliacrilamida a través de luz UV

Se realizó una visualización de los biosensores *hCaM-AF* desarrollados, empleando geles de poliacrilamida SDS-PAGE con un gel separador al 12 % y un gel concentrador al 5 %. Se tomó 15 μL de cada una de las muestras y 10 μL de amortiguador de carga, colocándolas en cada carril con un tiempo de elución de aproximadamente 2 horas y a 20 Amperes. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie por una hora y después se destiñeron con una solución desteñidora (etanol al 50% y ácido acético al 10%).

Cuantificación de la concentración de los biosensores utilizando ácido bicinconínico

La concentración de los biosensores se determinó utilizando el método del ácido bicinconínico. Este método colorimétrico se basa en la reducción cuantitativa de Cu (II) a Cu (I), en presencia de proteínas a pH alcalino; dos moléculas de BCA forman un complejo de color púrpura con los iones de Cu (I), presentando un máximo de absorción a 562 nm. Se ha reportado que la estructura macromolecular de la proteína y la presencia de cuatro aminoácidos, entre ellos cisteína, son los responsables de la formación de color en este ensayo [46].

Propiedades espectroscópicas de los biosensores

Determinación de las longitudes de onda de excitación y emisión de los biosensores de hCaM Alexas (hCaM AF)

Se obtuvieron los máximos de longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia de los nuevos biosensores de *hCaM-AF*, considerando inicialmente los datos que nos proporciona Thermo Fisher Scientific para los fluoróforos Alexa Fluor.

Se determinó la longitud de excitación de cada biosensor de calmodulina, utilizando una concentración final de 1 μM en 2 mL de buffer Tris 50 mM, CaCl_2 10 μM a pH 7.0 del biosensor respectivo. La Tabla 5, muestra las condiciones experimentales utilizadas para la obtención de las longitudes de onda de excitación.

Tabla 5. Condiciones experimentales para la obtención de los espectros de excitación de los biosensores *hCaM* Alexa Fluor[®]

Sitio mutado de la proteína CaM	Fluoróforo Alexa Fluor [®]	Rango de excitación (nm)	λ de emisión (nm)
M124C	350	300-420	442
	488	470-510	520
	532	500-550	555
	555	500-555	565
L39C-V91C	350	300-420	442
	488	470-510	520
	532	500-555	555
	555	500-560	565

A partir de las longitudes de onda máximas obtenidas de los espectros de excitación se obtuvieron los espectros de emisión con las condiciones experimentales mostradas en la Tabla 6 (ver Figura 12 A-H).

Tabla 6. Condiciones experimentales para la obtención de los espectros de emisión de los biosensores *hCaM* Alexa Fluor[®]

Sitio mutado de la proteína CaM	Fluoróforo Alexa Fluor [®]	Rango de excitación (nm)	λ de emisión (nm)
M124C	350	360-650	351*
	488	495-650	482
		510-650	492*
	532	535-650	526*
	555	520-650	515
555-650		549*	
L39C/V91C	350	365-500	353*
	488	495-650	482
		505-650	492*
	532	535-650	532*
	555	535-650	518
555-650		552*	

*Longitudes utilizadas para los ensayos de titulación.

Rendimiento cuántico

Los rendimientos cuánticos (ϕ) de los biosensores *hCaM AF* fueron determinados utilizando la siguiente relación:

$$\phi_{AF} = \phi_{est} \frac{F_{AF} DO_{est}}{F_{est} DO_{AF}} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde, los subíndices *AF* 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_{exc} . Se utilizó como estándar una solución de sulfato de quinina en H_2SO_4 1N, el cual tiene una ϕ de 0.55.

Estabilidad termodinámica de los biosensores

La concentración de proteína utilizada fue de 1 μ M para todas las muestras, en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (volumen final de 2 mL), utilizando una cubeta de cuarzo con paso de luz de 1 cm, 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 10 a 80 °C a una velocidad de 20 °C/h, utilizando un controlador de temperatura (Quantum Northwest) acoplado al espectrofluorómetro [47].

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



Al equilibrio se asume que se puede obtener un ΔG :

$$\Delta G = \Delta H_D - T_m \Delta S_D \quad \text{Ecuación 2}$$

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 la proteína se encuentran en estado nativo y, la otra mitad en estado desnaturalizado.

Arreglando la ecuación al equilibrio resulta:

$$T_m = \frac{\Delta H_D}{\Delta S_D} \quad \text{Ecuación 3}$$

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 [43] se utilizó la siguiente ecuación:

$$F = \frac{F_{0N} + s_N T + (F_{0D} + s_D T) \times e^{\left\{ \frac{-\Delta H_{D^{\circ}} + T \Delta S_{D^{\circ}}}{RT} \right\}}}{1 + e^{\left\{ \frac{-\Delta H_{D^{\circ}} + T \Delta S_{D^{\circ}}}{RT} \right\}}} \quad \text{Ecuación 4}$$

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 de la pre y pos transición, $\Delta H_{D^{\circ}}$ es el cambio de entalpía, $\Delta S_{D^{\circ}}$ 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.

Determinación de las k_{ds} de los biosensores utilizando clorpromazina (CPZ)

Se realizaron curvas de titulación para cada uno de los biosensores (1 μ M), utilizando una solución 20 mM de CPZ, 10 μ M de CaCl_2 , en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25 °C y agitación constante. A partir de la solución de CPZ, se fueron adicionando 1 μ L (1 μ M) de manera continua hasta alcanzar la saturación del sistema en un volumen final de 2 mL. Las condiciones fluorométricas utilizadas para cada biosensor se obtuvieron a partir de la Tabla 6.

Los cambios en los espectros de fluorescencia fueron analizados para obtener la K_d del complejo biosensor-CPZ, utilizando la siguiente ecuación de unión [48,49]:

$$y = \frac{\left(1 + \frac{K_d}{P_0} + \frac{L_0}{P_0}\right) - \sqrt{\left(1 + \frac{K_d}{P_0} + \frac{L_0}{P_0}\right)^2 - 4 \frac{L_0}{P_0}}}{2} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde y corresponde a la intensidad de fluorescencia, P_0 y L_0 son la concentración de proteína y ligando presentes respectivamente, K_d es la constante de disociación.

Apagamiento colisional (quenching)

La medición del apagamiento colisional de fluorescencia de los biosensores *hCaM*-AF se determinó a partir de la diferencia entre el máximo de fluorescencia, correspondiente al 100% de intensidad de fluorescencia, y el mínimo de fluorescencia de los espectros de fluorescencia de éstos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de la proteína *hCaM*

La Figura 9, muestra el seguimiento de la purificación de la proteína *hCaM*, la cantidad de proteína recombinante es alrededor de 80 % de la proteína total, con una pureza de aproximadamente del 98 %. Se obtuvieron alrededor de 160 mg de *hCaM* por litro de medio LB. La gran cantidad de proteína obtenida es atribuida al sistema de expresión empleado, la combinación del vector tipo pET y la cepa de *Escherichia coli* BL21-AI[®]. Lo cual resulta idóneo para la construcción de biosensores en mediana y gran escala.

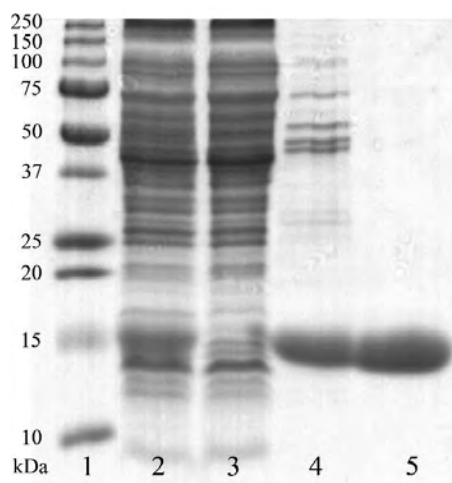


Figura 9. Seguimiento de purificación de *hCaM*. 1) Marcador de peso molecular, 2) Sobrenadante del lisado, 3) Fracción que no se une a la columna phenyl-Sepharose CL-4B, 4) Fracción que se une a la columna phenyl-Sepharose[™] CL-4B y 5) fracción de *hCaM* purificada después de una columna de intercambio catiónico source Q.

Modificación química y obtención de los biosensores *hCaM AF*

Los ocho biosensores *hCaM AF* obtenidos, se muestran en la Figura 10 y 11 irradiados con luz visible y ultravioleta. Los biosensores físicamente adquieren el color característico de cada sonda fluorescente, mantienen una estabilidad estructural y funcional. La Figura 10, muestra el desplazamiento electroforético de los biosensores en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, irradiados con luz uv y teñidos con azul de coomassie. Estos geles muestran la pureza, estabilidad y las propiedades fluorescentes adquiridas de los biosensores *hCaM AF*.

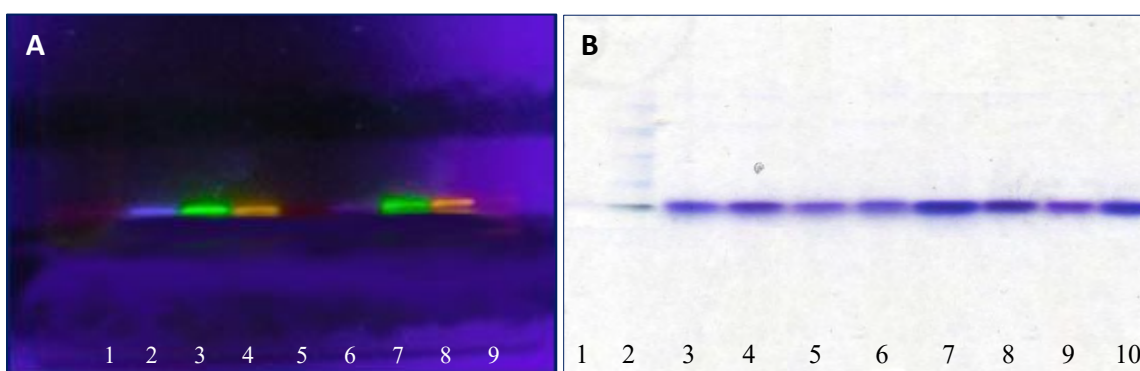


Figura 10. Seguimiento de la obtención de biosensores de *hCaM AF*. Gel de poliacrilamida irradiado con luz ultravioleta (A). 1) *hCaM* silvestre, 2) *hCaM* M124C AF₃₅₀, 3) *hCaM* M124C AF₄₈₈, 4) *hCaM* M124C AF₅₃₂, 5) *hCaM* M124C AF₅₅₅, 6) *hCaM* L39C/V91C AF₃₅₀, 7) *hCaM* L39C/V91C AF₄₈₈, 8) *hCaM* L39C/V91C AF₅₃₂ y 9) *hCaM* L39C/V91C AF₅₅₅. **Gel de poliacrilamida en luz visible (B).** 1) *hCaM* silvestre, 2) Marcador de pesos moleculares *Thermo Fisher Scientific* (10- 180 kDa), 3) *hCaM* M124C AF₃₅₀, 4) *hCaM* M124C AF₄₈₈, 5) *hCaM* M124C AF₅₃₂, 6) *hCaM* M124C AF₅₅₅, 7) *hCaM* L39C/V91C AF₃₅₀, 8) *hCaM* L39C/V91C AF₄₈₈, 9) *hCaM* L39C/V91C AF₅₃₂ y 10) *hCaM* L39C/V91C AF₅₅₅.

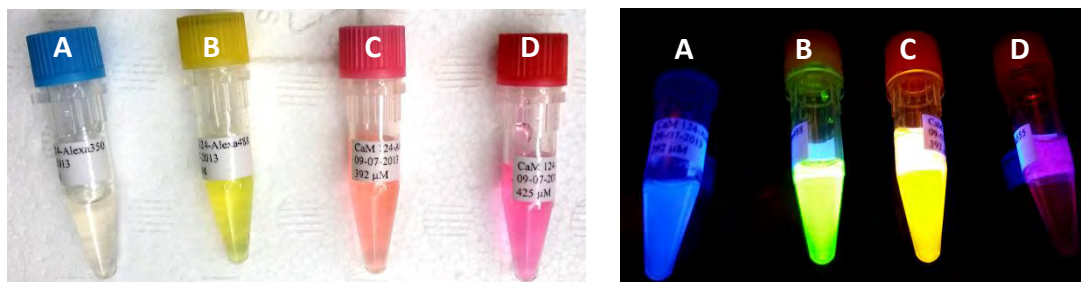


Figura 11. Biosensores fluorescentes de *hCaM Alexa Fluor*. A) *hCaM* M124C AF₃₅₀, B) *hCaM* M124C AF₄₈₈, C) *hCaM* M124C AF₅₃₂ y D) *hCaM* M124C AF₅₅₅. En la izquierda se muestran los biosensores a la luz visible y a derecha se observan los biosensores irradiados con luz ultravioleta.

Propiedades espectroscópicas de los biosensores hCaM Alexa Fluor

Las propiedades espectroscópicas de estos biosensores son adquiridas por cada uno de los fluoróforos extrínsecos (Alexa Fluor® Dyes), las longitudes de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados son reportadas por el proveedor. Sin embargo, éstas pueden ser modificadas por el microambiente donde se localizan en cada uno de los biosensores, por lo que se determinaron éstas unidas a la CaM nuevamente (Tabla 7). Las diferencias entre las longitudes de excitación y emisión de los biosensores de hCaM AF respecto a los fluoróforos varían por uno o dos nm, en la mayoría de los casos. Los biosensores con mayor longitud de excitación y emisión pertenecen a hCaM L39C/V91C AF, probablemente debido a la posición de los fluoróforos en los dos sitios de la proteína.

Los espectros de excitación y emisión de la fluorescencia de los biosensores hCaM AF se muestran en la Figura 12 A-H. Las longitudes de onda de excitación y emisión de los fluoróforos AF₃₅₀, AF₄₈₈, AF₅₃₂ y AF₅₅₅ reportadas por Thermo Fisher Scientific fueron utilizadas como referencia para obtener los espectros de excitación de los biosensores (Tabla 5).

El biosensor hCaM M124C AF₃₅₀ y AF₅₃₂, hCaM L39C/V91C AF₃₅₀ y AF₅₃₂ muestran una única $\lambda_{\text{máx}}$ en el espectro de excitación en fluorescencia. Sin embargo, los otros biosensores tienen dos $\lambda_{\text{máx}}$ las cuales fueron empleadas para evaluar los espectros de emisión (Tabla 6). En el espectro de emisión de cada uno de ellos, se observa que el espectro obtenido a una mayor $\lambda_{\text{máx}}$, figura como imagen simétrica del espectro de excitación inicial de cada biosensor, resultado de la transición de los niveles de energía vibracional de S₀ y S₁ (principio de Franck-Condon). La intensidad de fluorescencia emitida es mayor y no varía su distribución del espectro de emisión de fluorescencia con respecto al excitado a una menor longitud de onda (Regla de Stokes), por lo que esta $\lambda_{\text{máx}}$ es característica de cada uno de nuestros sistemas hCaM AF.

Algunos ligandos de la CaM principalmente de carácter orgánico (fármacos) absorben luz a longitudes de ondas cercanas a las de excitación y/o emisión para los biosensores de hCaM conocidos (hCaM M124C-mBBr), lo que provoca que

existan fenómenos de interferencia, tales como el FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia) o apagamiento de la fluorescencia (quenching). Este problema se resuelve con los nuevos biosensores *hCaM* M124C AF₃₅₀ y *hCaM* L39C/V91C AF₃₅₀, ya que sus espectros de fluorescencia se encuentran en el rango de UV. Adicionalmente, la emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína (tirosina y fenilalanina) y algunos péptidos permite aprovechar el fenómeno de FRET para estudiar las interacciones de tipo CaM-proteína y CaM-péptidos.

Tabla 7. Propiedades espectrales de los fluoróforos Alexa Fluor y datos experimentales de los biosensores.

Fluoróforo Alexa Fluor maleimida	Thermo Fisher Scientific		<i>hCaM</i>		
	λ de excitación (nm)	λ de emisión (nm)	Sitio mutado	λ máx de excitación (nm)	λ máx de emisión (nm)
350	345	444	M124C	351	439
			L39C/V91C	353	440
488	493	516	M124C	492	521
			L39C/V91C	492	521
532	528	552	M124C	526	553
			L39C/V91C	532	554
555	556	572	M124C	549	568
			L39C/V91C	549	568

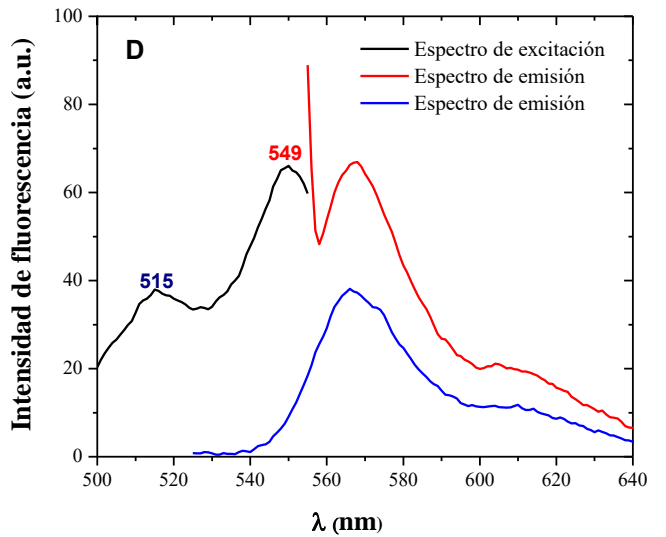
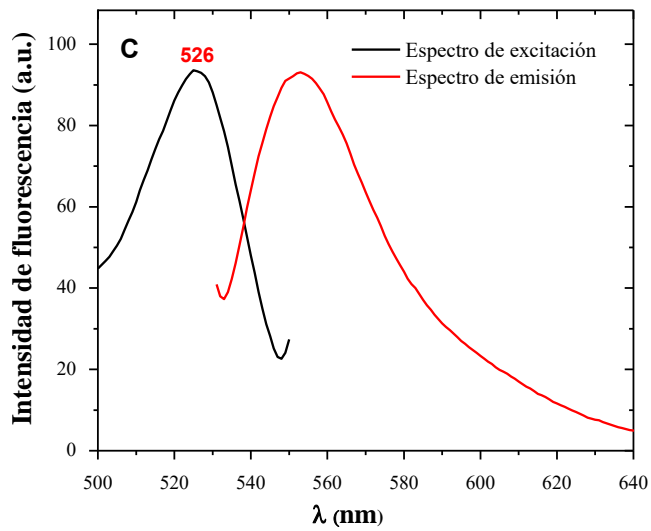
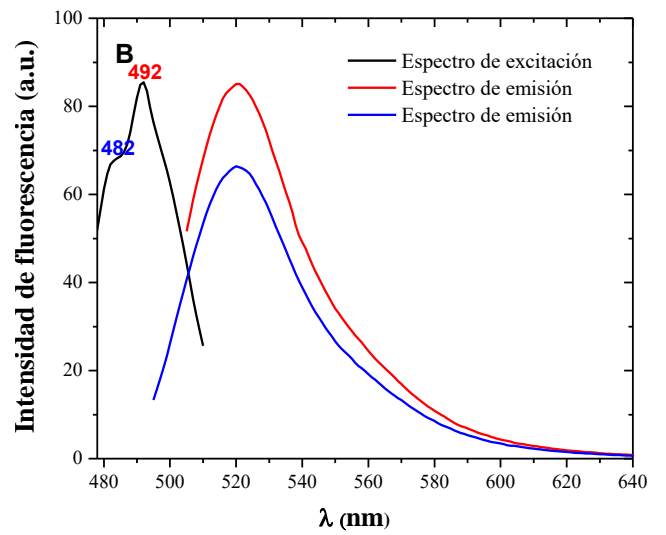
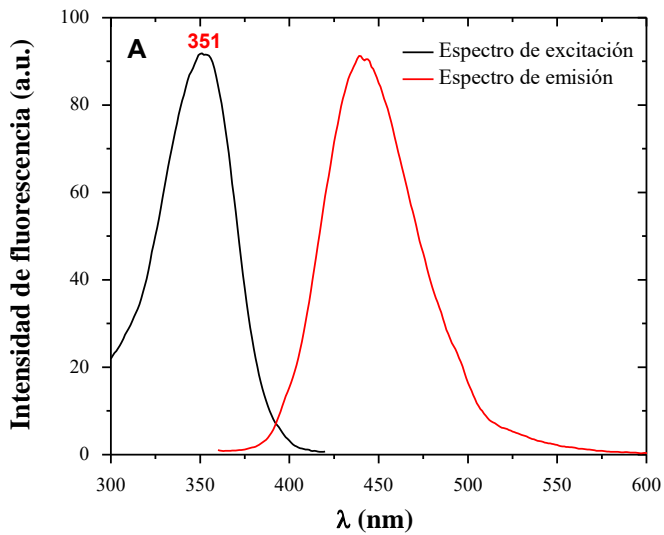


Figura. 12 Espectros de excitación y emisión de los biosensores *hCaM Alexa Fluor*. **A)** Biosensor *hCaM M124C AF₃₅₀*. (—) Espectro de excitación ($\lambda_{exc}=300-420$ nm; $\lambda_{emi}=442$ nm), (—) Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=360-650$ nm; $\lambda_{emi}=351$ nm). **B)** Biosensor *hCaM M124C AF₄₈₈*. (—) Espectro de excitación ($\lambda_{exc}=470-510$ nm; $\lambda_{emi}=520$ nm), (—) Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=510-650$ nm; $\lambda_{emi}=492$ nm), (—) Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=495-650$ nm; $\lambda_{emi}=482$ nm). **C)** Biosensor *hCaM M124C AF₅₃₂*. (—) Espectro de excitación, ($\lambda_{exc}=500-550$ nm; $\lambda_{emi}=555$ nm), (—) Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=535-650$ nm; $\lambda_{emi}=526$ nm). **D)** Biosensor *hCaM M124C AF₅₅₅*. (—) Espectro de excitación ($\lambda_{exc}=500-555$ nm; $\lambda_{emi}=565$ nm), (—) Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=555-650$ nm; $\lambda_{emi}=549$ nm), (—) Espectro de emisión ($\lambda_{exc}=520-650$ nm; $\lambda_{emi}=515$ nm). La detección de los espectros se realizó en amortiguador Tris 50 mM a pH 7.0.

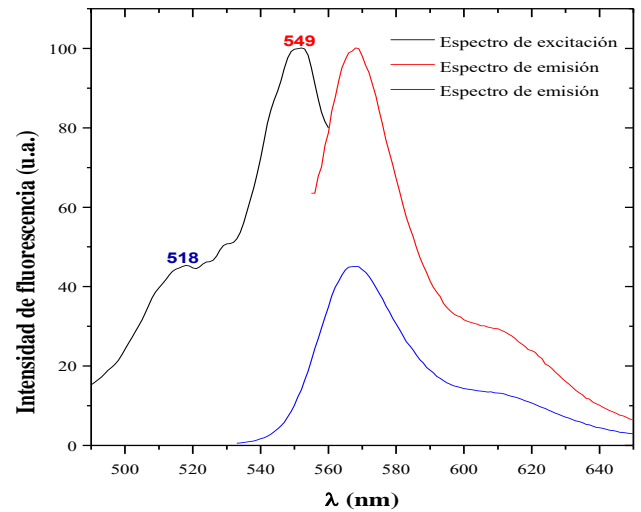
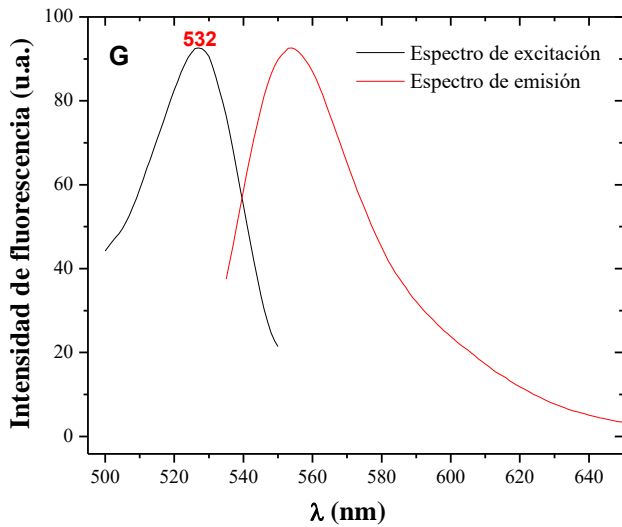
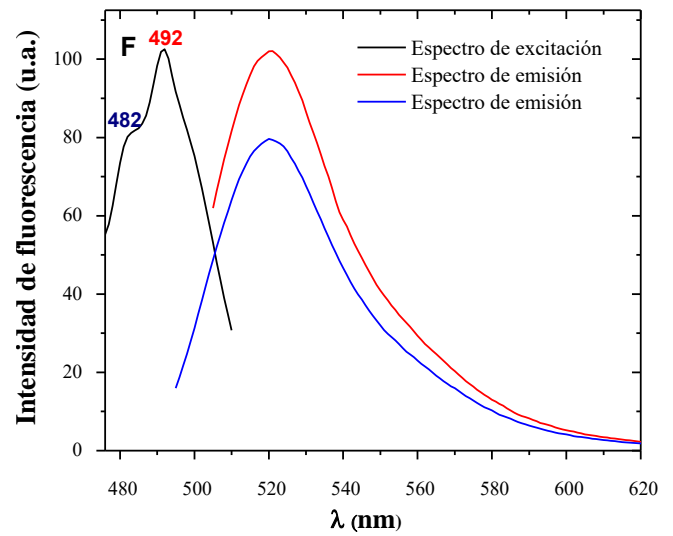
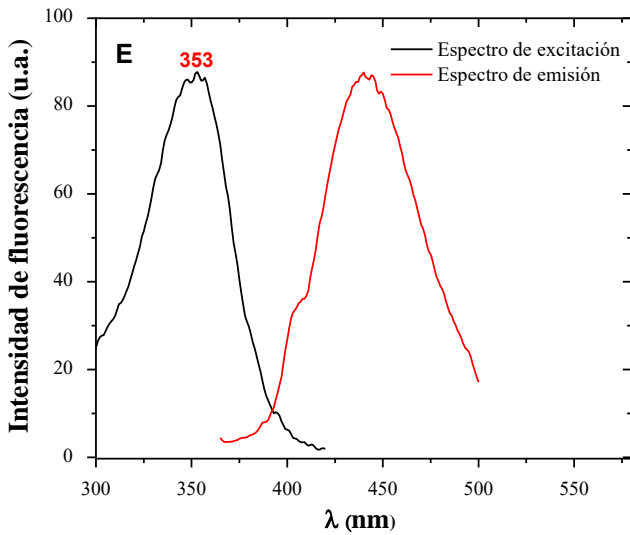


Figura. 12 Continuación. Espectros de excitación y emisión de los biosensores *hCaM* Alexa Fluor. E) Biosensor *hCaM* L39C V91C AF₃₅₀. (—) Espectro de excitación (λ_{exc} =300-420 nm; λ_{emi} =442 nm), (—) Espectro de emisión (λ_{exc} =365-500 nm; λ_{emi} =353 nm). F) Biosensor *hCaM* L39C V91C AF₄₈₈. (—) Espectro de excitación (λ_{exc} =470-510 nm; λ_{emi} =520 nm), (—) Espectro de emisión (λ_{exc} =505-650 nm; λ_{emi} =492 nm), (—) Espectro de emisión (λ_{exc} =495-650 nm; λ_{emi} =482 nm). G) Biosensor *hCaM* L39C V91C AF₅₃₂. (—) Espectro de excitación (λ_{exc} =500-555 nm; λ_{emi} =555 nm), (—) Espectro de emisión (λ_{exc} =535-650 nm; λ_{emi} =532 nm). H) Biosensor *hCaM* L39C V91C AF₅₅₅. (—) Espectro de excitación (λ_{exc} =500-560 nm; λ_{emi} =565 nm), (—) Espectro de emisión (λ_{exc} =555-650 nm; λ_{emi} =549 nm), (—) Espectro de emisión (λ_{exc} =535-650 nm; λ_{emi} =518 nm). La detección de los espectros se realizó en amortiguador Tris 50 mM a pH 7.0.

Estabilidad termodinámica

La estabilidad termodinámica de los biosensores desarrollados en este trabajo fue establecida a través de la determinación de la T_m (Figura 13). Uno de los requisitos primordiales en el desarrollo de biosensores es que el componente biológico mantenga su funcionalidad y estabilidad después de la mutación sitio específica y de la modificación química [50]. La Tabla 8, muestra las T_m calculadas de los ocho biosensores de *hCaM* y la proteína silvestre. La diferencia que existe entre la *hCaM* silvestre y los biosensores de *hCaM* es de alrededor de 2 °C, por lo que podemos establecer que los biosensores mantienen una estabilidad estructural muy semejante al sistema original con las bondades que les proporcionan los fluoróforos extrínsecos.

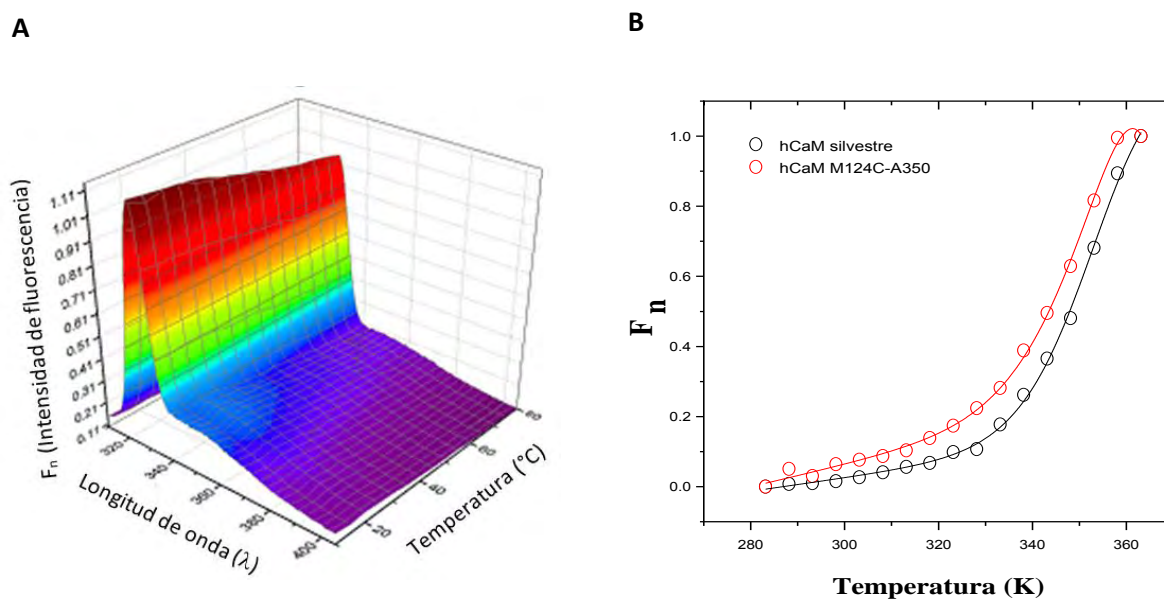


Figura 13. A) Gráfica del proceso de desplegamiento de la *hCaM* silvestre al incrementar la temperatura, siguiendo la intensidad de fluorescencia intrínseca a 326 nm. **B)** Desnaturalización térmica de la *hCaM* silvestre y *hCaM* M124C AF₃₅₀, las líneas continuas muestran el ajuste realizado para obtener los parámetros termodinámicos (ver materiales y métodos).

Tabla 8. Propiedades de los biosensores *hCaM* Alexa Fluor y estándares

Sitio mutado de la <i>hCaM</i>	Fluoróforo Alexa Fluor	T _m (°C)	Eficiencia cuántica (ϕ)	K _d (μ M)	(%) de apagamiento
M124C	350	79.137	0.843	0.607 \pm 0.132	33.20
	488	81.035	0.699	0.467 \pm 0.047	40.91
	532	80.696	0.410	0.940 \pm 0.157	69.28
	555	78.076	0.072	0.582 \pm 0.137	19.86
L39C/V91C	350	80.410	0.897	0.440 \pm 0.118	20.26
	488	79.412	0.674	0.550 \pm 0.109	40.71
	532	81.475	0.436	1.144 \pm 0.199	72.57
	555	80.394	0.119	1.867 \pm 0.352	29.92

hCaM silvestre ($\phi=0.025$), (T_m 79.05 °C); Sulfato de quinina ($\phi=0.55$); *hCaM* M124C- MbBr ($\phi=0.494$); *hCaM* L39C-mBBr/V91C-mBBr ($\phi=0.514$)

Eficiencia cuántica

La eficiencia cuántica de los biosensores de *hCaM* AF se calcularon utilizando al sulfato de quinina ($\phi=0.55$) como referencia (Tabla 8). El biosensor *hCaM* M124C AF₃₅₀ presento la mayor eficiencia cuántica con una $\phi=0.843$, seguido del biosensor *hCaM* M124C AF₄₈₈, *hCaM* M124C AF₅₃₂ y finalmente *hCaM* M124C AF₅₅₅. Para los biosensores de *hCaM* L39C/V91C, el biosensor correspondiente a AF₃₅₀ presenta la eficiencia cuántica mayor ($\phi=0.8965$), siendo casi del doble de la molécula de referencia. La alta eficiencia cuántica de estos biosensores, respecto a la molécula de referencia y biosensores de *hCaM-mBBr*, les proporciona una gran sensibilidad lo que se traduce en mayor precisión y menor error experimental a las mediciones hechas con estos sistemas. Aunado a lo anterior, la cantidad de muestra necesaria para realizar los ensayos es mínima ($\sim 1 \mu$ M).

Determinación de las K_{ds} de los biosensores

Para determinar las K_{ds} de los biosensores se realizaron titulaciones en fluorescencia con el fármaco CPZ, un inhibidor clásico de esta proteína. Los

espectros de fluorescencia obtenidos (Figura 14 a-h) muestran un máximo de fluorescencia al añadir Ca^{2+} ; a saturación (10 μM). Al adicionar la CPZ los espectros de fluorescencia cambian, lo cual es atribuido al cambio del microambiente del fluoróforo en cuestión provocado por dos factores, el cambio conformacional de la proteína y la interacción directa del ligando con los fluoróforos.

En función de determinar los cambios que puede representar las mutaciones de la proteína en estudio con los fluoróforos AF, se determinaron las constantes de disociación la CPZ con los biosensores, este fármaco es capaz de inhibir a la CaM. La K_d calculada se determinó a partir de las diferencias entre las $\lambda_{\text{máx}}$ en función de la concentración del inhibidor, mediante un modelo de unión (Ecuación 4) que relaciona Ca^{2+} /proteína total o CPZ/proteína total.

Los biosensores *hCaM* M124C AF presentan una constante de disociación en un rango de 0.467 a 0.940 μM , siendo en orden de mayor afinidad AF₄₈₈, AF₅₅₅, AF₃₅₀ y finalmente AF₅₃₂ (Tabla 8); en el caso de los biosensores *hCaM* L39C/V91C AF, el orden de afinidad es el siguiente AF₃₅₀ > AF₄₈₈ > AF₅₃₂ > AF₅₅₅.

No obstante, que la proteína fue mutada en uno o dos aminoácidos, se observa que los sistemas desarrollados poseen una buena estabilidad y funcionalidad. Los biosensores *hCaM* AF₃₅₀ y *hCaM* AF₄₈₈ presentan una K_d similar a la de los biosensores de *hCaM* construidos con el fluoróforo monobromobimano en las mismas posiciones, lo que indica que la modificación química con estos fluoróforos no desestabiliza la proteína y mantiene el grado de unión para la CPZ.

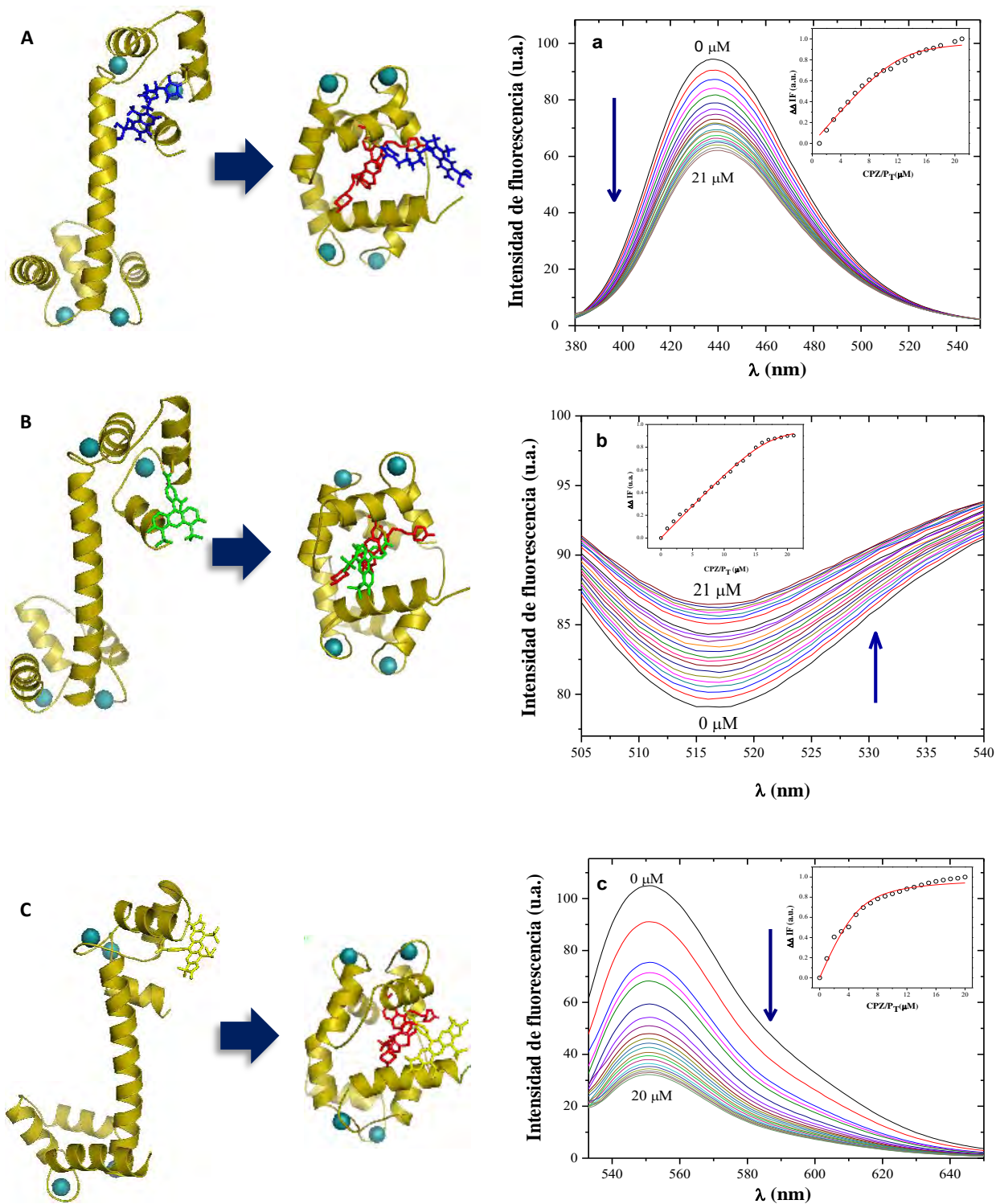


Figura. 14 Modelos tridimensionales de los biosensores en su confirmación abierta y cerrada (A-C). Cambio en la estructura de la proteína *hCaM-AF* (AF-350 estructura en azul, AF-488 en verde y AF-555 en amarillo) unida a Ca^{2+} (esferas azules) en presencia de clorpromazina (estructura en rojo). **Espectros de fluorescencia y titulación de los biosensores con CPZ (a-c).** a) CaM M124C-AF-350. b) CaM M124C-AF-488. c) CaM M124C-AF-532. Todos los espectros de fluorescencia fueron realizados con una concentración saturada de Ca^{2+} (10 μM).

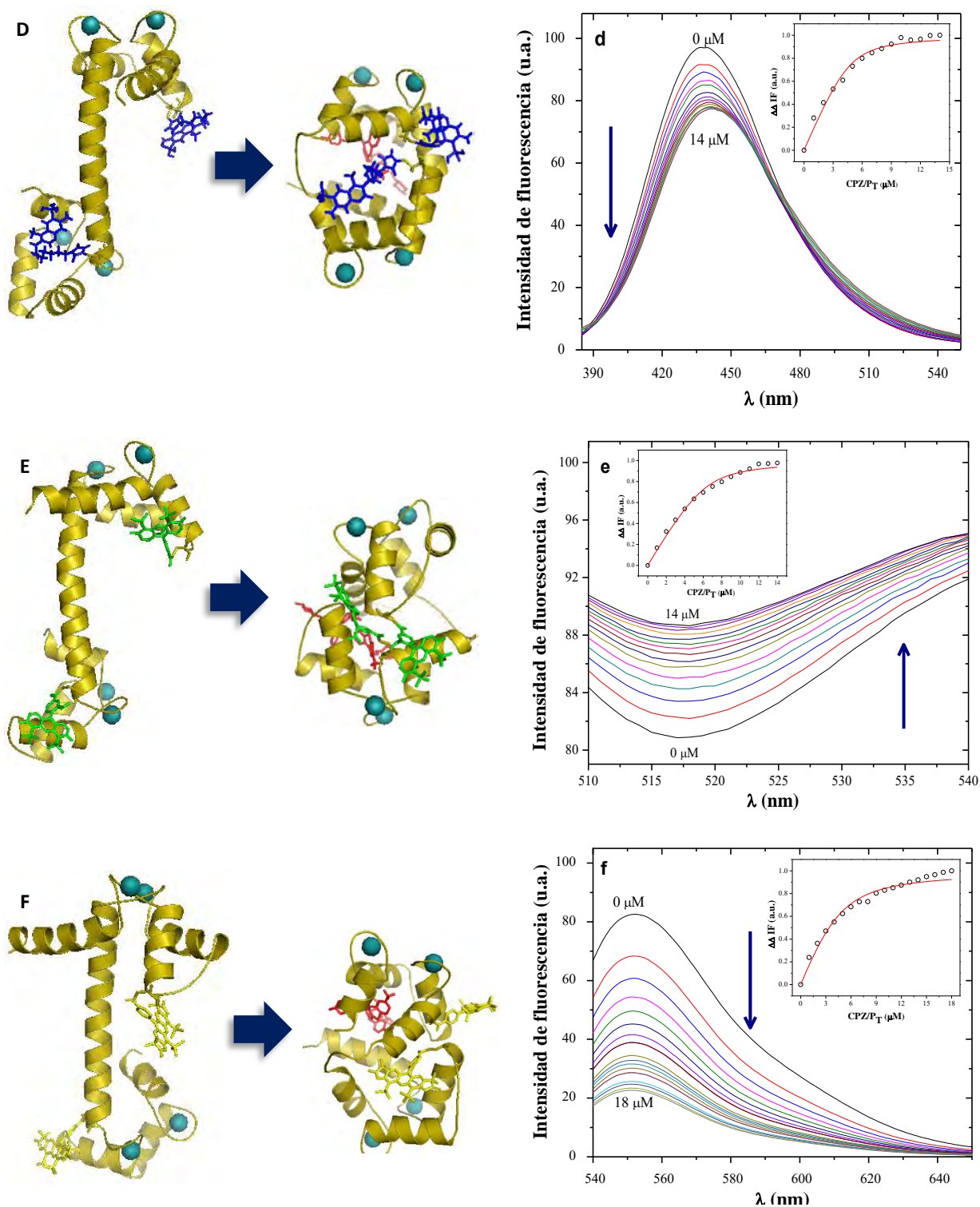


Figura. 14 Continuación. Modelos tridimensionales de los biosensores en su confirmación abierta y cerrada (D-F). Cambio en la estructura de la proteína *hCaM* AF (AF₃₅₀ estructura en azul, AF₄₈₈ en verde y AF₅₅₅ en amarillo) unida a Ca²⁺ (esferas azules) en presencia de clorpromazina (estructura en rojo). **Espectros de fluorescencia y titulación de los biosensores con CPZ (d-f).** d) *hCaM* L39C/V91C AF₃₅₀. e) *hCaM* L39C/V91C AF₄₈₈. f) *hCaM* L39C/V91C AF₅₃₂. Los espectros fueron realizados con una concentración de Ca²⁺ (10 μM).

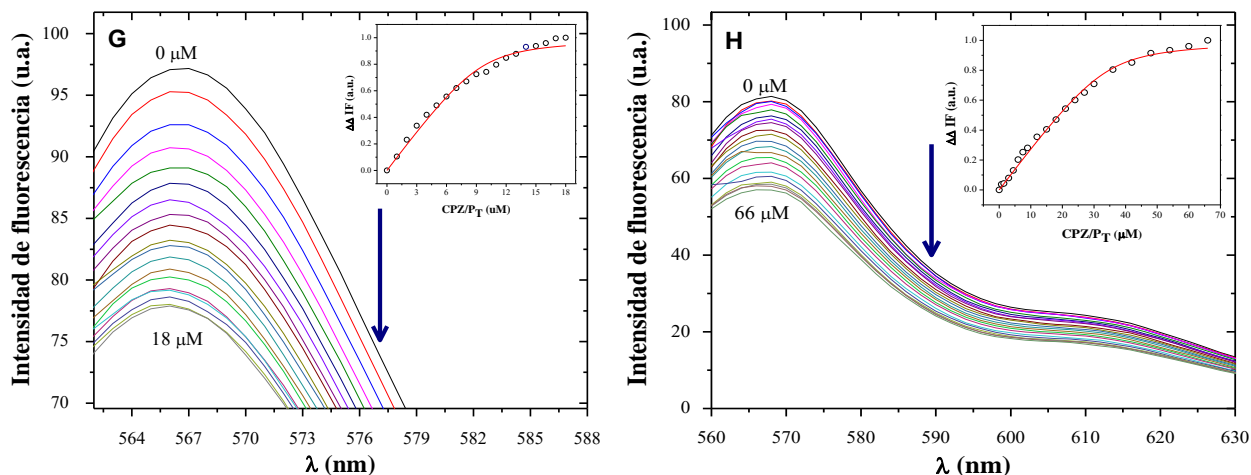


Figura. 14 Continuación. Espectros de fluorescencia y titulación de los biosensores con CPZ. g) *hCaM M124C AF₅₅₅*. h) *hCaM L39C/V91C AF₅₅₅*.

Apagamiento colisional (Quenching)

Los modelos tridimensionales de los biosensores (Fig. 14 A-F) denotan que los fluoróforos en la posición 124 tienen una interacción directa con el inhibidor, que al llevarse a cabo el cambio conformacional es introducido en el bolsillo hidrofóbico de la proteína, lo cual puede ser visible en el apagamiento de la fluorescencia que se observa en los espectros de fluorescencia antes mencionados. Los biosensores con las mutaciones en las posiciones 39 y 91 presentan mayor porcentaje de apagamiento de fluorescencia al unir el inhibidor clásico, lo que representa un mayor rango de monitoreo de inhibición de estos biosensores en un ensayo con un fármaco en estudio que se una a la calmodulina de manera similar a la CPZ.

CONCLUSIONES

Las mutantes (M124C y L39C/V91C) de la proteína *hCaM* modificadas químicamente con los fluoróforos Alexa Fluor (350, 488, 532 y 555) fueron caracterizadas mediante diversos parámetros. Se determinaron las propiedades espectroscópicas (longitud de onda de excitación y emisión) que caracterizan a los biosensores, y que difieren de los fluoróforos AF reportados por la compañía. La proteína unida covalentemente a cada uno de los fluoróforos cambia su estabilidad termodinámica (T_m) de uno a dos grados centígrados, indicando que la mutación sitio específica y la modificación química no altera la funcionalidad y estabilidad estructural de la calmodulina. Los biosensores *hCaM* AF poseen una alta eficiencia cuántica respecto a los ya conocidos (*hCaM*-mBBr), lo que se traduce en una alta precisión y exactitud experimental con la utilización de estos sistemas. Los biosensores *hCaM* M124C AF₃₅₀ y *hCaM* L39C/V91C AF₃₅₀ reportan una alta eficiencia cuántica (0.843 y 0.897, respectivamente) con respecto al estándar de sulfato de quinina (0.55). La afinidad con la cual es capaz de unirse un ligando (CPZ o Ca²⁺) a la CaM fue determinado por la constante de disociación (K_d) que de acuerdo a lo reportado, las K_d s obtenidas para los biosensores se encuentran en los rangos esperados (~1 μ M). Los espectros de fluorescencia de los biosensores disminuyen al añadir el inhibidor (CPZ) hasta un 72 % de apagamiento (*hCaM* L39C/V91C AF₅₃₂), mismo que está relacionado con el cambio conformacional de la proteína y la interacción directa del ligando con los fluoróforos. Los biosensores *hCaM* M124C AF₃₅₀ y *hCaM* L39C/V91C AF₃₅₀ además de tener características compartidas con los otros biosensores, pueden ser utilizados para estudios de interacción CaM-proteína o CaM-péptidos ya que los espectros de excitación y emisión se encuentran en el rango de UV, que evitan que existan fenómenos de interferencia.

PERSPECTIVAS

1. Utilizar estos nuevos biosensores de la proteína CaM, en el descubrimiento de nuevas moléculas inhibitorias de esta proteína, ya sea de origen natural, sintético o biotecnológico.
2. Emplear los biosensores *hCaM M124C AF₃₅₀* y *hCaM L39C/V91C AF₃₅₀* en estudios biodirigidos de búsqueda masiva de moléculas bioactivas en mezclas complejas (extractos).
3. Realizar estudios de interacción CaM-proteína, CaM-péptidos y CaM-proteína-fármaco, aprovechando el fenómeno de FRET en algunos casos.

REFERENCIAS

1. Heilbrunn, L.V. and F.J. Wiercinski, *The action of various cations on muscle protoplasm*. J Cell Physiol, 1947. 29(1): p. 15-32.
2. Ringer, S., *A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart*. J Physiol, 1883. 4(1): p. 29-42 3.
3. Chin, D. and A.R. Means, *Calmodulin: a prototypical calcium sensor*. Trends Cell Biol, 2000. 10(8): p. 322-8.
4. Marshall, C.B., et al., *Calmodulin and STIM proteins: Two major calcium sensors in the cytoplasm and endoplasmic reticulum*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. 460(1): p. 5-21.
5. Hall, J.E., *Guyton & Hall. Tratado de Fisiología Médica*. 12 ed. 2011, España: Elsevier, p.101.
6. Youn, H.D.e.a., *Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2*. Science 1999. 286: p. 790–793.
7. Yamamoto Y., Sokawa Y., and M. S., *Biochemical evidence for the presence of NAP-22, a novel acidic calmodulin-binding protein, in the synaptic vesicles of rat brain*. Neurosci. Lett., 1997. 224(127-130): p. 790–793.
8. Moreno, C.S.e.a., *WD40 repeat proteins striatin and S/G (2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulinbinding proteins that associate with protein phosphatase*. J. Biol. Chem. , 2000. 275: p. 5257–5267.
9. Smith, M.L., et al., *Identification of a neuronal calmodulin-binding peptide, CAP-19, containing an IQ motif*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. 62(1): p. 12-24.
10. Martin-Nieto, J. and A. Villalobo, *The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site*. Biochemistry, 1998. 37(1): p. 227-36.

11. Sobieszek, A., et al., *Purification and characterization of a kinase-associated, myofibrillar smooth muscle myosin light chain phosphatase possessing a calmodulin-targeting subunit*. J Biol Chem, 1997. 272(11): p. 7027-33.
12. Torok, K., K. Stauffer, and W.H. Evans, *Connexin 32 of gap junctions contains two cytoplasmic calmodulin-binding domains*. Biochem J, 1997. 326 (Pt 2): p. 479-83.
13. Lodge, A.P., et al., *Identification of chURP, a nuclear calmodulin-binding protein related to hnRNP-U*. Eur J Biochem, 1999. 261(1): p. 137-47.
14. Kakkar, R., et al., *In vitro phosphorylation of bovine cardiac muscle high molecular weight calmodulin binding protein by cyclic AMP-dependent protein kinase and dephosphorylation by calmodulin-dependent phosphatase*. Mol Cell Biochem, 1997. 177(1-2): p. 215-9.
15. Klaerke, D.A., et al., *Identification of beta2-glycoprotein I as a membrane-associated protein in kidney: purification by calmodulin affinity chromatography*. Biochim Biophys Acta, 1997. 1339(2): p. 203-16.
16. Xu, X.Z., et al., *Retinal targets for calmodulin include proteins implicated in synaptic transmission*. J Biol Chem, 1998. 273(47): p. 31297-307.
17. WenQiang, T., et al., *Extracellular calmodulin-binding proteins in body fluids of animals*. J Endocrinol, 1997. 155(1): p. 13-7.
18. Trejo, R. and G. Delhumeau, *Calmodulin content, Ca²⁺- dependent calmodulin-binding proteins, and testis growth: identification of Ca²⁺-dependent calmodulin-binding proteins in primary spermatocytes*. Mol. Reprod. Dev. , 1997. 48: p. 127–136.
19. Craig, R. and C. Norbury, *The novel murine calmodulin-binding protein Sha1 disrupts mitotic spindle and replication checkpoint functions in fission yeast*. J Cell Sci, 1998. 111 (Pt 24): p. 3609-19.
20. Joyal, J.L., et al., *Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1997. 272(45): p. 28183-6.
21. Hidaka, H. and T. Tanaka, *Calmodulin antagonists and cellular physiology*. 1985, EUA: Academic Press: p. 128-130.

22. K., A., *Essencial hypertension: calcium mechanism and treatment*. 1998, Japan: Springer: p. 178-180
23. Weiss, B., W.C. Prozialeck, and T.L. Wallace, *Interaction of drugs with calmodulin. Biochemical, pharmacological and clinical implications*. Biochem Pharmacol, 1982. 31(13): p. 2217-26.
24. Wise, D.L., *Bioinstrumentation and biosensors*. 1991, EUA: Marcel Dekker, inc.
25. Saltzman, W.M., *Biomedical Engineering. Bridging Medicine and Technoogy*. 2015, R.U.: Cambridge University Press: p. 321
26. Thevenot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. Biosens Bioelectron, 2001. 16(1-2): p. 121-31.
27. Rodriguez-Mozaz, S., M.J. López, and B. D., *Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring*. Anal Bioanal Chem, 2006. 386: p. 1025-1041.
28. Evtugyn, G., *Biosensors: Essentials*. Vol. 84. 2014, India: Springer-Verlag Berling Heidelberg. 265.
29. González, R.V., et al., *Aplicación de biosensores en la industria agroalimentaria. Informe de vigilancia tecnológica*. 2005, CEIM: Madrid. p. 16-18.
30. González-Andrade, M., et al., *An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein*. Analytical Biochemistry, 2009. 387(1): p. 64-70.
31. González-Andrade, M., et al., *Development of the fluorescent biosensor h calmodulin (hCaM)L39C- monobromobimane(mBBR)/V91C-mBBR, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium*. Journal of Medicinal Chemistry, 2011. 54(11): p. 3875-3884.
32. González-Andrade, M., et al., *Biosensor for on-line fluorescent detection of trifluoroperazine based on genetically modified calmodulin*. Anal Bioanal Chem, 2012. 402(10): p. 3211-3218.

33. González-Andrade, M., et al., *Importance of the interaction protein-protein of the CaM-PDE1A and CaM-MLCK complexes in the development of new anti-CaM drugs*. Journal of Molecular Recognition, 2013. 26(4): p. 165-174.
34. Madariaga-Mazon, A., et al., *Potent anti-calmodulin activity of cyclotetrapeptides isolated from Isaria fumosorosea using a newly designed biosensor*. Nat Prod Commun, 2015. 10(1): p. 113-6.
35. Strianese, M., et al., *Fluorescence-based biosensors*. Methods Mol Biol, 2012. 875: p. 193-216.
36. Staiano, M., et al., *Glucose biosensors as models for the development of advanced protein-based biosensors*. Mol Biosyst, 2005. 1(5-6): p. 354-62.
37. Jameson, D.M., *Introduction to fluorescence*. 2014: Taylor & Francis Group, LLC.
38. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd ed. 2006, New York ; London: Kluwer Academic/Plenum. xxiii, 698p.
39. Vo-Dinh, T., *Biomedical photonics handbook: Biomedical diagnostics*. Segunda edición ed. Vol. II. 2014: Taylor & Francis Group. 496-498.
40. Butlin, N.G., T.M. Corneillie, and J. Xu, *Multi-color time resolved fluorophores based on macrocyclic lanthanide complexes*. 2008, Google Patents.
41. Albani, J.R., *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. . 2007, United States of America.
42. Voet, D., J.G. Voet, and C.W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry*. 1999, New York ; Chichester: John Wiley & Sons. xxiii,931, 87 p.
43. Eftink, M.R., *The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins*. Biophysical Journal, 1994. 66(2 Pt 1): p. 482–501.
44. Gonzalez-Andrade, M., et al., *Development of the fluorescent biosensor hCalmodulin (hCaM)L39C-monobromobimane(mBBR)/V91C-mBBR, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium*. J Med Chem, 2011. 54(11): p. 3875-84.

45. González-Andrade, M., et al., *An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein*. Anal Biochem. , 2009. 387(1): p. 64-70.
46. Hill, H.D. and J.G. Straka, *Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents*. Analytical Biochemistry, 1988. 170(1): p. 203-208.
47. Gibrat, G., et al., *Biophysical Study of Thermal Denaturation of Apo-Calmodulin: Dynamics of Native and Unfolded States*. Biophysical Journal. 2008. 95(11) p. 5247–5256.
48. Miller, D.M., 3rd, et al., *Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis*. The Journal of biological chemistry, 1983. 258(22): p. 13665-72.
49. Hulme, E.C. and M.A. Trevethick, *Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation*. British Journal of Pharmacology 2010. 161: p. 1219–1237
50. Bischof J. C. and H. X., *Thermal Stability of Proteins*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. 1066: p. 12–33.